

生物制药领域蛋白质团聚检测技术的研究进展

高恺旻 颜晓梅*

(厦门大学化学化工学院化学生物学系, 谱学分析与仪器教育部重点实验室,
化学生物学福建省重点实验室, 厦门 361005)

摘 要 21 世纪是生物制药的黄金时代, 以重组蛋白药物和治疗性抗体为代表的蛋白质药物已成为生物技术药物的重要组成部分, 其对恶性肿瘤、自身免疫性疾病、病毒感染等重大疾病的治疗效果和生物安全性远高于小分子化学药物。但是蛋白质稳定性差, 在生产、纯化、运输和储存等过程中, 容易因环境刺激或自身稳定性等因素产生团聚, 从而导致药效降低, 并可能引发免疫反应。发展灵敏度高、分辨率好、简便实用的蛋白质团聚检测技术和方法, 对蛋白质药物的研发和改良可起到积极的推动作用。本文针对蛋白质团聚的检测技术和方法进行综述, 从检测原理、性能和应用范围等方面, 对体积排阻色谱法、凝胶电泳法、分析超速离心法、场流分离法、浊度法、动态光散射法、纳米颗粒跟踪分析技术、流式细胞术和电子显微技术等进行分析比较, 并对蛋白质团聚检测技术未来的发展趋势进行了展望。

关键词 蛋白质药物; 蛋白质团聚; 尺寸分离; 光散射; 流式细胞术; 评述

1 引言

蛋白质药物是生物技术药物中发展最快、最重要的一类, 主要包括蛋白类激素、生长因子、细胞因子、单克隆抗体、重组抗体、蛋白酶和蛋白疫苗等^[1]。与小分子化学药物相比, 蛋白质药物具有活性高、特异性强和毒副作用低等优势, 广泛用于恶性肿瘤、自身免疫性疾病、遗传疾病、糖尿病、细菌和病毒感染等重大疾病的治疗^[2]。据统计, 全球蛋白质药物的市场规模 2014 年已经超过 1400 亿美元, 并持续稳定增长^[3]。因此蛋白质药物的发展对人类健康和社会经济均具有重大意义。但是蛋白质药物也存在缺陷, 尤其是稳定性差。在生产、纯化、运输和储存等过程中, 蛋白质药物极易因环境和自身稳定性等因素发生部分肽段解折叠、氨基酸残基氧化和二硫键断裂等, 最终都可能导致蛋白质团聚^[4]。图 1 以单克隆抗体 (Monoclonal antibody, mAb) 为例阐明蛋白质经由多种途径形成团聚的示意图^[4], 双箭头表示可逆团聚步骤; 单箭头表示不可逆团聚步骤; 红色序列表示蛋白质上的“热点”, 正常状态下主要位于完全折叠单体的内部; 蛋白质部分解折叠后, 通过暴露的“热点”间相互作用形成团聚体; 核为最小的不可逆蛋白质团聚体, 从核到形成可溶性团聚体主要是通过结合部分解折叠的单体或现有的团聚体实现, 这些途径对大多数蛋白质均适用。蛋白质团聚体的形成不仅会降低蛋白质药物的疗效^[5], 更严重的是蛋白质团聚体通过静脉注射进入患者体内会诱发免疫反应, 甚至引起过敏性休克, 严重则危及生命^[6]。所以对蛋白质药物的团聚程度进行检测是生物制药的重要环节。例如《美国药典》的《<787> Subvisible Particulate Matter in Therapeutic Protein Injections》章节提出: 在每瓶蛋白质注射剂中, 粒径 $\geq 10 \mu\text{m}$ 的颗粒总数不得超过 6000 个, 粒径 $\geq 25 \mu\text{m}$ 的颗粒总数不得超过 600 个, 并建议监测粒径 $\leq 10 \mu\text{m}$ 以下颗粒的总数。由于现有的检测技术的限制, 该章节中所述颗粒既包括蛋白质团聚体也包括其它生物和非生物颗粒。由于蛋白质团聚体异质性大、形貌多样、尺寸分布极广 (从几纳米到数百微米均有分布), 目前尚无一种技术或方法能对蛋白质团聚进行全方位的检测^[7]。其中, 蛋白质团聚体按形貌可分为球形团聚体、纤维状团聚体和无定形团聚体等; 按结合方式可分为共价结合、非共价结合等; 按尺寸可分为纳米、亚微米、微米、亚可见和可见尺度^[8]。自 1982 年首个蛋白质药物重组人胰岛素被美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准上市以来, 随着蛋白质团聚检测技术和方法的不断发展, 蛋白质团聚机制的研究、

2018-04-26 收稿; 2018-08-08 接受

本文系国家自然科学基金项目 (Nos. 21225523, 21627811) 资助

* E-mail: xmyan@xmu.edu.cn

基于化学修饰和分子生物学改造的蛋白质稳定性提升、蛋白质团聚抑制剂的探索和蛋白质药物物质控标准的完善等均取得了长足的进步^[7]。本文针对蛋白质团聚检测技术和方法进行综述,就体积排阻色谱法(Size-exclusion chromatography, SEC)、凝胶电泳法(Gel-electrophoresis, GE)、分析超速离心法(Analytical ultracentrifugation, AUC)、场流分离法(Field-flow fractionation, FFF)、浊度法(Turbidimetry/nephelometry)、动态光散射法(Dynamic light scattering, DLS)、纳米颗粒跟踪分析技术(Nanoparticle tracking analysis, NTA)、流式细胞术(Flow cytometry, FCM)和电子显微技术(Electron microscopy, EM)等按检测原理进行分类,分析和讨论这些检测技术和方法在蛋白质团聚研究中的性能及应用进展。

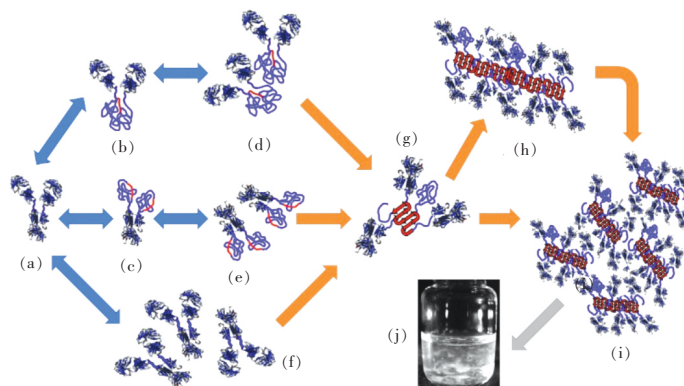


图 1 单克隆抗体经由多种途径形成蛋白质团聚体的示意图^[4]

Fig.1 Schematic diagram of multiple aggregation pathways for monoclonal antibody (mAb)^[4]

(a) Folded monomer; (b, c) Partly unfolded monomers; (d, e) Partly unfolded 'clusters'; (f) Folded 'clusters'; (g) Nuclei; (h) Oligomers and soluble filaments; (i) Soluble aggregates; (j) Macro particles phase separation.

2 蛋白质团聚的检测技术和方法

2.1 基于尺寸分离原理的蛋白质团聚检测方法

“尺寸分离”是指根据待测样品尺寸、分子量等的大小差异,分离成不同组分以分别收集和检测。由于构成不同蛋白质团聚体的单体数量不同,因此不同蛋白质团聚体的尺寸和分子量存在差异,可以根据尺寸分离原理对蛋白质团聚体按大小进行分离并检测。目前常见的基于尺寸分离原理的蛋白质团聚检测技术和方法主要有体积排阻色谱法、凝胶电泳法、分析超速离心法和场流分离法等。

2.1.1 体积排阻色谱法 SEC 是一种根据待测分子的尺寸大小进行分离的色谱技术,是寡聚蛋白质的常规分离和检测方法。SEC 既能根据尺寸对寡聚蛋白质进行分离,也能对不同大小寡聚蛋白质的含量进行相对定量。结合 SEC 的高效液相色谱(SEC-HPLC)可实现对几纳米(≤ 30 nm)尺寸范围内寡聚蛋白质的检测,并能够根据寡聚蛋白质的形状和大小进行选择性的快速分离^[7]。SEC 的主要优势是除了必要的稀释步骤,无需任何前处理就可以高通量、高分辨率地对寡聚蛋白质进行分离和检测。其次,SEC 检测结果可靠性高,已广泛用于蛋白质药物生产过程中的团聚监测和药物物质控。但是 SEC 也具有一定的局限性:其一,为了使各洗脱峰之间具有良好的分辨率,通常需要对流动相的成分、pH 值和温度等进行调整,可能会改变蛋白质团聚的原始状态;其二,蛋白质溶液在分离过程中被流动相稀释,蛋白质团聚体可能会发生解离^[9];其三,蛋白质可能会与填料相互作用导致蛋白质团聚体吸附在色谱柱内^[10]。

2.1.2 凝胶电泳法 GE 是一种利用电场分离具有不同电荷和分子量的待测分子的方法,是目前分离和检测生物大分子的通用方法^[11]。其中十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)是在蛋白质的分离和检测最常用的方法。SDS-PAGE 可用于分离和检测分子量为 5~500 kDa 的共价结合或不会被 SDS 降解的寡聚蛋白质^[12],通过使用梯度凝胶或特定缓冲系统能进一步扩大检测范围^[13]。使用加入二硫苏糖醇或巯基乙醇等的还原性 SDS-PAGE 时,可以破坏蛋白质的二硫键,常用于判断寡聚蛋白质的共价结合类型是否为二硫键。可通过光密度法测定不同寡聚蛋白质的相对含量,例如 Surroca 等^[14]根据蛋白质条带的光密度值,获得了单体、二聚体、三聚体和寡聚体的相对浓度。SDS-PAGE 的局

限性在于检测蛋白质团聚体的尺寸范围极窄, 相对定量的准确性欠佳。其次, 加热步骤可能会导致蛋白质团聚体在 SDS 中降解^[15]。

2.1.3 分析超速离心法 AUC 是一种利用超速离心机根据沉降特性对待测分子进行分离, 并利用检测系统对待测分子的沉降动态过程进行实时监控, 从而对待测分子的理化性质等进行检测的方法(图 2A)。其中, 待测分子的沉降特性与其分子量、尺寸和形状相关^[16]。近年来 AUC 已成为科研和生物制药中迅速发展的蛋白质团聚检测技术之一^[17-19]。AUC 检测分子沉降特性的实验模式主要有沉降平衡实验(Sedimentation equilibration, SE)和沉降速度实验(Sedimentation velocity, SV)两种^[18]。其中 AUC-SE 可提供分子的摩尔质量、结合常数和化学计量学信息, AUC-SV 可提供有关分子大小和形貌的流体动力学信息^[20-21], 故主要使用 AUC-SV 对寡聚蛋白质进行检测。如 Philo 等^[22]使用 AUC-SV 实现了对 mAb 从单体至七聚体 7 个组分的定量检测(图 2B)。AUC 的优势在于蛋白质溶液的检测浓度范围广, 寡聚蛋白质的检测灵敏度高。AUC 的局限性主要有专业性强、技术要求高、不易操作和数据分析复杂等^[23]。此外, 结果容易受共溶质、缓冲系统和非理想效应等因素的影响^[24]。尽管具有一定局限性, AUC 仍然是生物制药中蛋白质团聚分析的重要方法, 尤其是 AUC-SV 在寡聚蛋白质的分离和检测中具有广阔的应用前景。

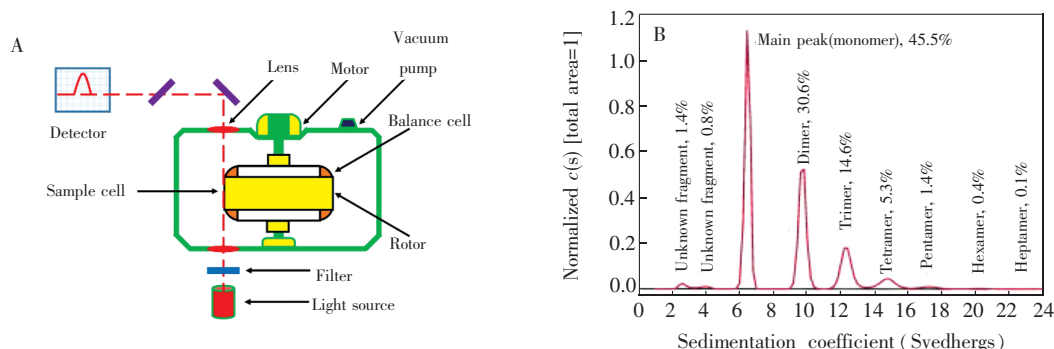


图 2 (A) 分析超速离心法的原理; (B) 寡聚 mAb 的沉积系数分布图^[22]

Fig.2 (A) Principle of analytical ultracentrifugation (AUC); (B) Sedimentation coefficient distribution of mAb oligomers^[22]

2.1.4 场流分离法 FFF 是利用载流流经柱槽时在外加物理力场的作用下, 基于待测样品质量、体积、扩散系数、电荷等物理性质差异实现分离和检测的方法。外加物理力场主要有流体场、电场、热场、离心力和磁场等^[25]。FFF 被广泛用于分离和检测不同大小的各种生物颗粒, 尤其是蛋白质团聚体的分离和检测。如图 3A 所示, 根据流体力学原理, 柱槽中不同的流层具有不同的线速度, 外加的物理力场和溶液的扩散力会使载流中的颗粒根据尺寸大小分离至不同流层, 并随不同流速的流层先后流出柱槽, 最后被检测器所检测^[26]。根据外场作用力和槽柱厚度的不同, FFF 可以实现尺寸从几纳米至数微米的蛋白质单体、寡聚体以及可溶性团聚体的分离和检测^[27]。目前以横向流作为外加力场的非对称流场流分离法(Asymmetric flow FFF, AF4)在蛋白质团聚体的分离和检测中应用最广^[26]。Gabrielson 等^[28]通过对比 AF4、SEC 和 AUC 等对 mAb 团聚体的检测结果证明, AF4 分离蛋白质团聚体的尺寸范围更宽。FFF 的优势在于, 相比于 SEC 不需要固定相, 避免了固定相导致的蛋白质吸附、失活和变性等。此外, FFF 的样品回收率高, 尺寸分辨率高, 选择性好, 操作简单, 易于控制、调节和优化等。FFF 的局限性在于分离过程中存在稀释和浓缩过程^[27]。AF4 加入的横向流会改变载流的成分和蛋白质的浓度, 可能会破坏蛋白质团聚的原始状态, 而使用的超滤膜可能会吸附蛋白质^[9]。虽然 FFF 存在一定的不足, 但其凭借高分辨率的分离性能和宽泛的尺寸分离范围, 逐渐成为蛋白质团聚研究中重要的分离和检测手段之一^[29-31]。

综上所述, SEC、SDS-PAGE、AUC 和 FFF 均是基于尺寸分离原理的经典蛋白质团聚检测方法, 能够实现寡聚蛋白质的分离和检测。其中 SEC 和 SDS-PAGE 目前在科研和生物制药领域广泛使用, AUC 和 FFF 正在的应用范围也逐渐扩大, SEC 和 FFF 也被用于蛋白质药物的纯化。

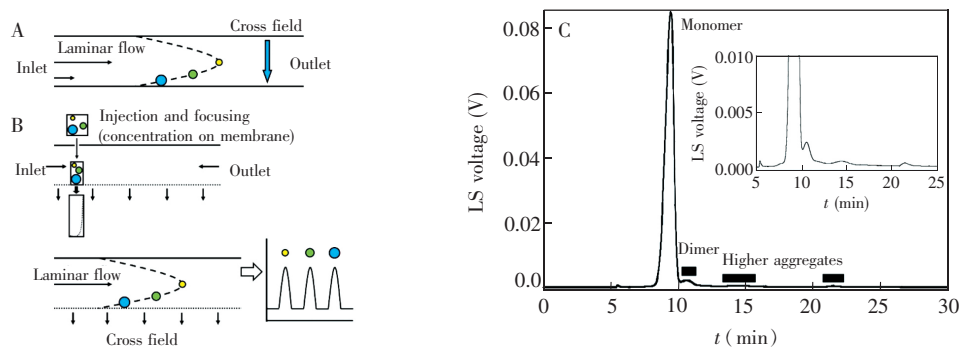


图 3 (A) 场流分离法的原理; (B) 非对称流场流分离法的原理; (C) FFF 分离寡聚 mAb 的洗脱图^[26]

Fig.3 (A) Principle of field-flow fractionation (FFF); (B) Principle of asymmetric flow FFF (AF4); (C) Representative elution profile of mAb oligomers by FFF^[26]

2.2 基于光散射原理的蛋白质团聚检测方法

光散射是指入射光照射到悬浮的颗粒时偏离入射方向而分散传播的现象。散射光的散射角和强度等与悬浮颗粒的粒径等物理参数相关^[32]。蛋白质溶液中悬浮的蛋白质团聚体具有光散射性质,可以通过检测蛋白质溶液的散射光对蛋白质团聚体进行检测。目前基于光散射原理的蛋白质团聚检测技术和方法主要有浊度法、动态光散射法、纳米颗粒跟踪分析技术和流式细胞术等。

2.2.1 浊度法 浊度法是依据溶液中颗粒的瑞利散射性质,通过直接或间接测量溶液散射光强度来测定浊度的方法。直接测量和比较散射光强度为散射测浊法,测量和比较透射光强度以间接检测散射光强度为透射测浊法。蛋白质溶液的浊度由蛋白质的浓度、悬浮颗粒的大小和浓度等决定^[33]。目前浊度法广泛用于蛋白质液体剂型中团聚体的检测^[34-38]。《欧洲药典》2.2.1 节对注射类药物的澄明度作出规定,将澄明度根据浊度单位值 (NTU) 分为 4 个等级,分别为“澄清”(NTU ≤ 3)、“轻度乳白光”(NTU ≤ 6)、“乳白光”(NTU ≤ 18)和“重度乳白光”(NTU ≤ 30),据此可通过目视或使用浊度仪对蛋白质药物的团聚程度进行检测。浊度法的优点是操作简单、检测速度快和溶液无需稀释等,局限性是溶液的蛋白质浓度和温度等会影响溶液的浑浊程度^[33],故使用浊度法对不同检测批次的蛋白质药物进行对比时,需要先对浊度值的可比性进行评价。此外,浊度法不具备尺寸和浓度检测能力,只能通过浊度值对溶液中蛋白质团聚的程度和变化进行初步判断,最好仅在定性分析和比较中使用浊度法。

2.2.2 动态光散射法 DLS 通过检测某一固定空间内微粒由于在溶液中做布朗运动而产生的散射光强度涨落,并利用光子相关光谱分析微粒粒径。其工作原理为入射光照射溶液时,溶液中悬浮的微粒会产生散射,理论上散射光频率与入射光频率相同,当直径 < 10 μm 的微粒受到四周溶剂分子的碰撞后会做布朗运动,根据多普勒效应微粒的散射光频率会以散射光初始频率为中心进行随机波动,散射光强度也随之进行随机波动^[39]。一般情况下,微粒较小时布朗运动快,散射光频率和强度波动快;微粒较大时布朗运动慢,散射光频率和强度波动慢。通过散射光强度的波动可以获得微粒的扩散系数 D ,进而根据 Stokes-Einstein 方程 (1) 可推导出微粒的水和动力学直径 d_H 。

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta d_H} \quad (1)$$

其中 k_B 为玻尔兹曼常数, T 为开尔文温度, η 为溶液粘度。DLS 的粒径检测范围在 1 nm ~ 10 μm 之间,因此可用于检测纳米和亚微米尺度的蛋白质团聚体。DLS 是整体分析方法,适用于定量检测溶液中单分散微粒的粒径。当溶液中微粒的粒径分布差异较大时, DLS 更适用于定性检测,利用散射光频率和强度波动获得的分布系数 (Particle dispersion index, PDI) 表征微粒粒径的均一程度。但当溶液中不同微粒的粒径相差足够大时, DLS 能够检测各种微粒的相对含量^[40]。DLS 还能用于在反应过程中跟踪微粒的聚合动力学^[41],可用于蛋白质团聚动力学研究。DLS 的优势在于可将散射光强度相关的粒径分布转换为与质量、体积或数量相关的粒径分布,一次检测即可获得微粒的丰富信息;其次, DLS 检测蛋白质

的浓度可以高达 50 mg/mL, 故绝大多数蛋白质药物无需作稀释处理。此外, DLS 的样品用量少, 仅需 10~100 μL 。但是, DLS 的粒径分辨率低^[42], 无法准确测定分散性极大的蛋白质团聚体的粒径; 其次, DLS 无法测定蛋白质团聚体的浓度。这些因素限制了 DLS 在蛋白质团聚检测中的应用。

2.2.3 纳米颗粒跟踪分析技术 NTA 是近几年发展起来的一种利用散射光对溶液中单个微粒的布朗运动路径进行跟踪从而实现微粒大小和浓度进行检测的方法^[43~47]。如图 4A~4C 所示, NTA 的检测原理是: 利用激光照射溶液, 悬浮微粒产生的散射光使微粒可视化, 用光学显微镜和高速相机拍摄微粒在溶液中做布朗运动的视频, 利用软件跟踪每个微粒的位移, 进而根据二维 Stokes-Einstein 方程(2)计算微粒的水合动力学直径 d_H , 同时对微粒的浓度进行测定。

$$(x, y)^2 = \frac{k_B T t_s}{3\pi\eta d_H} \quad (2)$$

其中, $(x, y)^2$ 为均方位移, k_B 为玻尔兹曼常数, T 为开尔文温度, t_s 为采样时间, η 为溶液粘度。根据瑞利散射原理, NTA 对粒径的检测下限取决于微粒的相对折射率, 对蛋白质团聚体的粒径检测范围为 30~1000 nm^[43]。例如 Filipe 等^[43] 通过对免疫球蛋白 1 (IgG1) 和胰岛素 (Insulin) 团聚体进行检测, 对比了 NTA 与 DLS 的检测性能, 尽管 NTA 无法表征粒径小于 30 nm 的蛋白质团聚体, 但是分辨率优势明显 (图 4D)。文献 [44~46] 分别对 NTA 检测蛋白质团聚体的实验方案进行了探索。Zhou 等^[44] 使用 NTA 对人血清白蛋白 (HSA) 团聚随温度和时间的变化进行了实时跟踪。NTA 属于单颗粒分析技术, 粒径测量准确度高, 相比于 DLS 具有明显的粒径分辨率优势, 并能测定蛋白质团聚体的浓度。此外, 最新的 NTA 装置具备荧光检测功能, 可以利用荧光染色区分蛋白质团聚体和杂质。但是, NTA 是根据瑞利散射理论测定, 微粒的散射光强度与粒径的 6 次方成正比^[32], 故大微粒的散射光强度远强于小微粒, NTA 每次摄像会同时拍摄多个被激光照射的蛋白质团聚体, 因此小团聚体的散射光易被邻近大团聚体的散射光掩盖, 造成小团聚体数据丢失, 导致统计结果不准。虽然 NTA 存在一定局限性, 但其凭借强大的检测性能正逐渐取代 DLS 而成为检测纳米和亚微米尺度蛋白质团聚体的常用手段。

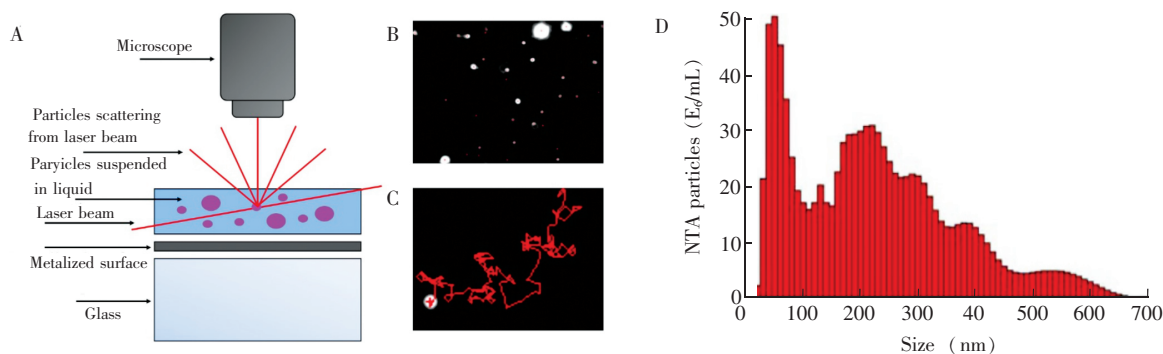


图 4 (A) 纳米颗粒跟踪分析技术的原理; (B) NTA 拍摄视频的画面截图^[47]; (C) NTA 跟踪 1 个微粒的布朗运动路径^[47]; (D) NTA 检测 IgG1 团聚体的粒径分布^[43]

Fig.4 (A) Principle of nanoparticle tracking analysis (NTA); (B) One frame from a video captured by NTA^[47]; (C) Typical moving motion of one nanoparticle tracked by NTA^[47]; (D) Size distribution of IgG1 aggregates by NTA^[43]

2.2.4 流式细胞术 FCM 是对快速直线流动的单列细胞或细胞大小颗粒进行逐个、多参数、快速、定量分析或分选的技术。FCM 主要由流动室与液流系统、光源与光学系统、信号收集与转换系统、计算机与分析系统四大模块组成。如图 5A 所示, FCM 的工作原理为: 流动室中鞘流将样品流压缩成极细的流束, 使细胞等颗粒在液流中呈单个串状排列, 鞘液的载流作用使样品流高速运动; 之后用特定波长的激光束垂直照射高速流动的液流, 此时需保证激光探测区内只有单个颗粒。穿越激光探测区的单个颗粒会产生散射光, 如果颗粒上结合有荧光染料会向四周发射荧光。FCM 利用光学系统对散射光和荧光进行分光, 多个检测器分别同时接收前向散射光、侧向散射光和多色荧光信号。收集的信号经分析系统处

理后通过信号的强弱反映单个颗粒的理化和生化特性^[48]。近年来,FCM 开始应用于蛋白质团聚体的检测,主要检测粒径大于 1 μL 的蛋白质团聚体。如 Mach 等^[49]最先将流式细胞仪(FC500)用于蛋白质团聚体的检测,受限于散射检测的灵敏度限制,使用 SYPRO Orange 染料对蛋白质团聚体进行染色在荧光通道检测,但实验结果表明,如果染料的浓度选择不当,会影响检测结果。Nishi 等^[50]使用灵敏度更高的流式细胞仪(FACSCanto II)建立了蛋白质团聚体的无染色检测方法。FCM 具有检测通量高、速度快、样品需求量少、能够对蛋白质团聚体粒径和浓度进行定量检测等优势,是一种发展迅速的蛋白质团聚检测技术。随着 FCM 检测灵敏度的不断提升,其对蛋白质团聚体的检测范围正向亚微米甚至纳米尺度迈进。厦门大学颜晓梅教授课题组^[51-54]首创性地结合瑞利散射和鞘流单分子荧光检测技术,研制成功具有自主知识产权的超高灵敏流式检测装置(High sensitivity flow cytometer, HSFCEM),将二氧化硅纳米颗粒、病毒、纳米药物、细胞外囊泡的流式散射检测下限分别降低到 24、27、30 和 40 nm,较传统流式细胞仪的散射检测灵敏度提升 4~6 个数量级。Filipe 等^[55]使用流式细胞术考察了血浆条件对微米尺度的 IgG1 团聚的影响(图 5B)。HSFCEM 可以每分钟高达 10000 个颗粒的速率对单个纳米颗粒的散射和多色荧光信号进行同时检测,实现颗粒粒径、浓度和多种生化性状的定量表征,粒径分辨率媲美透射电镜,会为纳米尺度蛋白质团聚体的检测提供了一种快速、高分辨的表征技术。

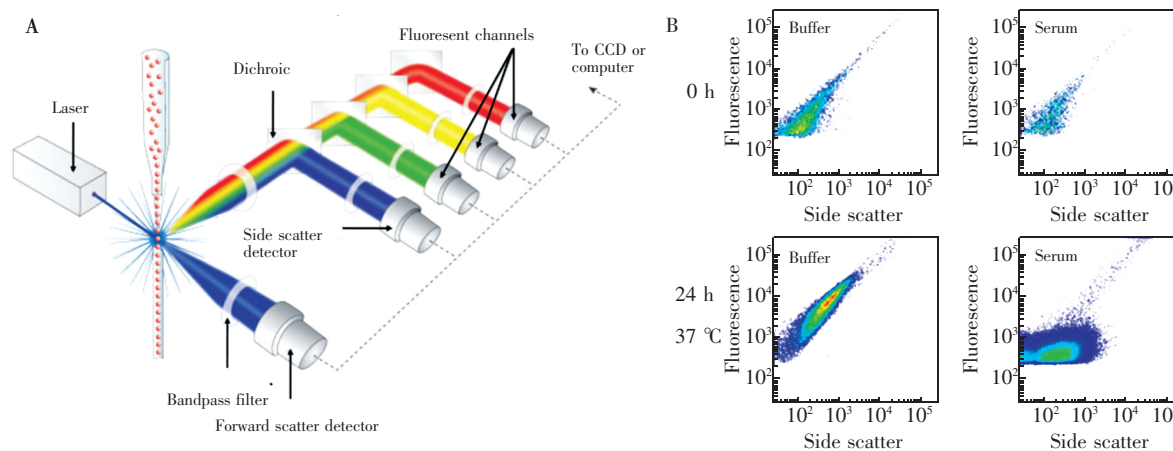


图 5 (A) 流式细胞术的原理; (B) Alexa fluor 488 标记的 IgG1 团聚体的侧向散射-荧光散点图^[55]

Fig.5 (A) Principle of flow cytometry (FCM); (B) Fluorescence vs. side scatter FCM plots of Alexa fluor 488 labeled IgG1 aggregates^[55]

对比 FCM、NTA 和 DLS 可知,FCM 直接根据散射光强度对颗粒大小进行测定,而 NTA 和 DLS 是基于扩散系数和 Stokes-Einstein 方程计算颗粒的水和动力学直径。虽然 NTA 和 FCM 都属于单颗粒检测技术,但在 NTA 检测中小颗粒的散射光容易被大颗粒散掩盖,造成统计结果不准,FCM 的激光每次只照射单个颗粒,避免了颗粒间散射光的干扰,故使用 FCM 检测微米尺度的蛋白质团聚体更准确。相比于 DLS,FCM 分辨率高,具备荧光检测功能,而 HSFCEM 的发展将为纳米尺度蛋白质团聚体的检测提供灵敏、快速的检测方案。

2.3 基于电子显微技术的蛋白质团聚体形貌表征

电子显微术是一种利用电子显微镜的高分辨能力、高放大倍率对样品的大小、形貌和结构进行表征的方法,其中透射电子显微镜(Transmission electron microscopy, TEM)和扫描电子显微镜(Scanning electron microscopy, SEM)应用最为普遍。TEM 和 SEM 均常用于蛋白质团聚体的形貌表征和研究^[55-60]。例如 Okada 等^[56]使用 TEM 对 β -淀粉样蛋白 β -(1-40) 在有单唾液四己糖神经节苷脂条件下的纤维状团聚体进行了形貌表征(图 6A)。Chin 等^[57]使用 TEM 发现两亲性共聚物 P188 和 T1107 对溶菌酶(Lysozyme)团聚的抑制效果优于聚乙二醇。Ahmed 等^[58]同时使用 TEM 和 SEM 对 HSA 在丙酮醛刺激下形成的团聚体进行了形貌表征。Moretti 等^[59]利用超疏水表面的层流模拟人脑环境,使用 SEM 研究了与阿尔兹海默症相关的 tau 蛋白团聚机制。Sung 等^[60]使用 cryo-TEM 对 IgG 团聚体的形貌进行

了表征(图 6B)。EM 可以高分辨率、高放大倍数对纳米至微米尺度蛋白质团聚体的形貌进行表征,但其难以测定蛋白质团聚体的浓度;其次,复杂的样品前处理步骤和真空干燥过程等均可能改变蛋白质团聚的原始状态。

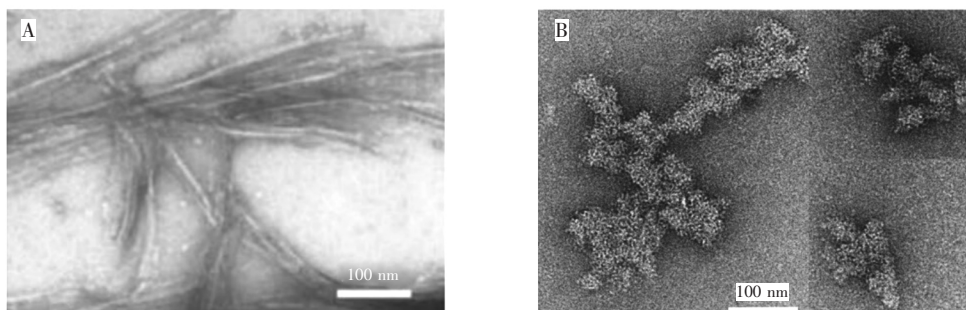


图 6 (A) $A\beta$ -(1-40) 纤维状团聚体的 TEM 成像^[56]; (B) IgG 团聚体的 cryo-TEM 成像^[60]
Fig.6 (A) TEM image of $A\beta$ -(1-40) fibrils^[56]; (B) Cryo-TEM image of IgG aggregates^[60]

3 蛋白质团聚检测技术和方法的应用

随着蛋白质团聚检测技术和方法的不断发展,目前已基本上能满足各种蛋白质药物中蛋白质团聚体的实际检测需求。但是蛋白质团聚体异质性大、粒径分布广,尚没有一种检测技术和方法具备足够宽的检测范围,可以检测所有的蛋白质团聚体^[7],故多以尺寸大小为标准对蛋白质团聚体进行分别检测。以下根据蛋白质团聚体尺寸的划分,分别对纳米尺度、亚微米和微米尺度、亚可见和可见尺度 3 个范围对应的不同检测技术和方法的应用实例进行介绍,并讨论检测技术联用的应用进展。

3.1 纳米尺度

纳米尺度蛋白质团聚体主要包括“核”等寡聚蛋白质和尺寸小于 100 nm 的可溶性团聚体,是形成大尺寸团聚体的前体。检测该尺度蛋白质团聚体对蛋白质团聚机制的研究和预防极为重要。该尺度范围主要适用的检测技术和方法有 SEC、SDS-PAGE、AUC、FFF、DLS、NTA 和 EM 等。其中 SEC、SDS-PAGE、AUC 和 FFF 适用于寡聚蛋白质的分离和检测。例如 Shokker 等^[61]利用 SDS-PAGE 和 SEC-HPLC 考察了 β -乳球蛋白(β -Lactoglobulin)的寡聚现象,发现寡聚体均为非共价连接,且分子量主要分布在 $10^3 \sim 10^4$ kDa。此外,研究还发现,寡聚体的分子量随加热时间和溶液离子强度的增加而增大。Kiese 等^[62]利用 SEC-HPLC 考察了 IgG1 的寡聚现象,通过对比搅拌和振动,发现搅拌更容易导致 IgG1 寡聚,且发现添加聚山梨酯 20(PS 20)对 IgG1 具有保护作用,但在 0.0025% (W/V) 的 PS 20 浓度条件下反而会促进寡聚体增加。Wafer 等^[18]利用 AUC-SV 对免疫球蛋白 A (IgA) 和 Pfizer 公司 IgG-ADC 中的单体、二聚体和多聚体进行了分离和检测,利用贝叶斯分析和 F 统计对不同大小寡聚体的含量进行了计算。Yohannes 等^[63]利用 FFF 考察了低密度脂蛋白(LDL)的团聚现象,发现 α -糜蛋白酶、鞘磷脂酶和硫酸铜会显著促进 LDL 团聚,且 LDL 团聚体的粒径主要分布在 30~160 nm。虽然 DLS 和 NTA 受限于分辨率和灵敏度等无法区分寡聚体,但在纳米尺度的检测上限远大于 SEC、SDS-PAGE 和 AUC。总之,SEC、SDS-PAGE、AUC 和 FFF 等检测技术和方法的不断发展将为蛋白质团聚的分子水平研究提供先进的分析手段。

3.2 亚微米和微米尺度

亚微米和微米尺度蛋白质团聚体主要指尺寸在 100 纳米到几十微米之间的团聚体。其中亚微米尺度是仅次于纳米尺度的蛋白质团聚体尺寸主要分布范围。亚微米和微米尺度范围的团聚体主要适用的检测技术和方法有 FFF、DLS、NTA、FCM 和 EM 等。例如 Saeseaw 等^[64]利用 FFF 对 β -lactoglobulin 尺寸在 0.4 μm 以下的团聚体进行了检测,通过对比 Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 的影响,发现 Zn^{2+} 更容易促进 β -lactoglobulin 团聚,且在 10 mmol/L Zn^{2+} 作用下,团聚体的平均粒径从 0.19 μm 增大至 0.38 μm 。Xu 等^[65]利用 DLS 考察了肝素(Heparin)对 Insulin、 β -lactoglobulin 和 BSA 纳米和亚微米尺度团聚的影响,发现由于

Heparin 与不同蛋白质的相互作用方式不同,对不同蛋白质团聚的抑制效果存在极大差异。Bai 等^[66]使用 NTA 和微流成像颗粒分析系统 (Micro-flow imaging, MFI) 对干扰素- β -1 α (Interferon- β -1 α) 的纳米至微米尺度的团聚体进行了检测,发现团聚体的粒径与温度密切相关,在 5 $^{\circ}$ C 条件下新生团聚体的粒径主要分布在 0.03~25 μ m 之间,在 25 $^{\circ}$ C 条件下,粒径在 1~10 μ m 的团聚体增长更显著。Filipe 等^[55]使用 FACSCanto II 流式细胞仪探究了微米尺度 IgG1 团聚受血浆条件的影响,发现改变 pH 值会促进小粒径团聚体的形成(图 5B)。Probst 等^[67]使用 ImageStream^X Mark II 成像分析流式细胞仪对 ProteoStat 试剂盒的 IgG 和 Lysozyme 团聚体进行了高分辨率荧光成像,实现了对 2~25 μ m 粒径范围蛋白质团聚体大小、形貌和浓度的同时检测。Debnath 等^[68]使用 Epics XL 流式细胞仪实现了对微米尺度 Insulin、Lysozyme 和抗利尿激素 (ADH) 等团聚体散射光和自发荧光的的同时检测。Sung 等^[60]使用 cryo-TEM 对 IgG 团聚体的形貌进行了表征,并利用编写的图形处理程序对尺寸在 0~3.4 μ m 的团聚体进行了粒径分布统计。

3.3 亚可见和可见尺度

亚可见和可见尺度蛋白质团聚体是指尺寸在数微米以上的团聚体和沉淀等。该尺度蛋白质团聚体的存在主要体现于蛋白质溶液呈现浑浊或乳白光,主要使用浊度法进行检测。Giger 等^[69]利用浊度法考察了 Heparin 对 Insulin 团聚的抑制效果,发现在溶液 pH 值临近 pI 和低离子强度的条件下,Heparin 可有效抑制 Insulin 团聚,他们还对比 Heparin 与 Insulin 静电相互作用的机理进行了阐述。Mahler 等^[70]利用浊度法考察了聚山梨酯 80 (PS 80) 对 IgG1 团聚的影响,发现添加 PS 80 后只有在搅拌刺激下 IgG1 才会形成亚可见和可见尺度团聚体。Kiese 等^[62]利用 SEC-HPLC 考察 IgG1 寡聚的同时,也利用浊度法考察了 IgG1 在亚可见和可见尺度的团聚现象,证明 IgG1 受外界刺激在该尺度的团聚变化与寡聚一致。

3.4 蛋白质团聚检测技术和方法的联用

上述蛋白质团聚检测技术和方法的联用,或与其它分析技术的联用,对蛋白质团聚机制等的研究起到了积极的推动作用。例如 Sahin 等^[71]利用 SEC-HPLC 和 AUC 对 BSA 的团聚动力学进行了研究,发现 BSA 通过“单体连续添加”和“团聚体相互作用”方式形成团聚均不可逆,其中“单体连续添加”只在低于 T_m 1~2 $^{\circ}$ C 的条件下发生,而“团聚体相互作用”无论在低于或高于 T_m 的温度均可发生。Sugimoto 等^[72]利用 SEC、SDS-PAGE、DLS 和浊度法对 3 种材质容器包装的 Roche 公司 Avastin[®] (bevacizumab) 的团聚现象进行了表征,发现 3 种材质容器中的 bevacizumab 团聚体含量略微增加,单体含量略微减少,但单体减少量均 \leq 1%,表明不同材质容器不会促进 bevacizumab 团聚。Surroca 等^[14]利用 SDS-PAGE 和质谱法 (Mass spectrometry, MS) 对热刺激 β -Lactoglobulin 团聚的机制进行了研究,发现二聚 β -lactoglobulin 是通过分子间形成 C121-C66、C160-C160 或 C121-C160 二硫键导致的。Liu 等^[73]利用 SEC、SDS-PAGE、MS、圆二色光谱法 (Circular dichroism, CD) 和核磁共振技术 (Nuclear magnetic resonance, NMR) 对 IgG 的 Fc 区导致团聚的机制进行了研究,发现 C_H2 和 C_H3 结构域的 Met 33 和 Met 209 氧化会改变 Fc 区的构象并降低其稳定性,从而促进 IgG 团聚。Roessl 等^[74]利用 SEC-HPLC 和 MS 对重组人粒细胞集落刺激因子 (rhG-CSF) 的团聚机制进行了研究,发现团聚是由于 rhG-CSF 分子内二硫键被切断和分子间二硫键形成导致的,且新生二硫键均位于 Cys 18。

综上所述,蛋白质团聚的检测技术和方法各具优势和局限性,深入了解其工作原理和检测特性,能够有效地结合多种检测方法研究蛋白质团聚的机制和抑制措施,促进蛋白质药物的分子生物学改造和团聚抑制剂的研发。

4 结论与展望

蛋白质团聚体是生物制药最棘手的不良产物之一,蛋白质团聚在蛋白质药物的生产和储存过程中难以避免。蛋白质团聚造成的蛋白质药物生物安全性威胁和药效降低一直是全球生物制药及医疗领域的关注热点,灵敏、可靠的蛋白质团聚检测技术和方法是解决该问题的关键。利用合适的表征策略对蛋白质团聚进行监测,可以为蛋白质团聚机制的研究提供重要的信息和思路,也可以为蛋白质药物的质量控制提供有效保障。由于蛋白质团聚机制十分复杂,目前尚无一种技术或方法能够同时满足所有种类和尺寸范围蛋白质团聚体的检测需求,也没有检测蛋白质团聚的金标准。在特定的研究或应用中,仍需

根据所研究蛋白质团聚的种类和所需检测的理化参数选择合适的检测技术和方法。蛋白质团聚检测技术需要在以下几个方向进一步发展:第一,发展高灵敏、高通量的检测技术和方法,实现纳米尺度蛋白质团聚体的快速、高分辨表征;开展多种检测技术的联用,实现对蛋白质团聚体的全尺度覆盖。第二,在测定蛋白质团聚的尺寸分布和颗粒浓度的基础上,同时提供蛋白质团聚体的形貌及其组成单体的结构、结合方式等信息。第三,解决蛋白质药物检测需要稀释的问题,发展新型蛋白质原液检测技术,可以获得更准确的蛋白质团聚理化信息。蛋白质团聚检测方法学的创新必将推动蛋白质药物的研发、蛋白质团聚机制的研究、以及蛋白质团聚抑制措施的探寻。

References

- 1 Walsh G. *Nat. Biotechnol.*, **2010**, 28(9): 917-924
- 2 Chung J. *Exp. Mol. Med.*, **2017**, 49(3): e304
- 3 Walsh G. *Nat. Biotechnol.*, **2014**, 32(10): 993-1000
- 4 Roberts C J. *Trends Biotechnol.*, **2014**, 32(7): 372-380
- 5 Nicoud L, Owczarz M, Arosio P, Morbidelli M. *Biotechnol. J.*, **2015**, 10(3): 367-378
- 6 Moussa E M, Panchal J P, Moorth, B S, Blum J S, Joubert M K, Narhi L O, Topp E M. *J. Pharm. Sci.*, **2016**, 105(2): 417-430
- 7 Das T K. *AAPS PharmSciTech*, **2012**, 13(2): 732-746
- 8 Narhi L O, Schmit J, Bechtold-Peters K, Sharma D. *J. Pharm. Sci.*, **2012**, 101(2): 493-498
- 9 Liu J, Andya J D, Shire S J. *AAPS J.*, **2006**, 8(3): 580-589
- 10 Arakawa T, Philo J S, Ejima D, Tsumoto K, Arisaka F. *BioProcess Int.*, **2006**: 32-42
- 11 Maizel J V J. *Science*, **1966**, 151(3713): 988-990
- 12 Shire S J, Shahrokh Z, Liu J. *J. Pharm. Sci.*, **2004**, 93(6): 1390-1402
- 13 Schagger H. *Nat. Protoc.*, **2006**, 1(1): 16-22
- 14 Surroca Y, Haverkamp J, Heck A J R. *J. Chromatogr. A*, **2002**, 970(1): 275-285
- 15 Taylor F R, Prentice H L, Garber E A, Fajardo H A, Vasilyeva E, Blake P R. *Anal. Biochem.*, **2006**, 353(2): 204-208
- 16 Varley P G, Brown A J, Dawkes H C, Burns N R. *Eur. Biophys. J.*, **1997**, 25(5-6): 437-443
- 17 Krayukhina E, Uchiyama S, Nojima K, Okada Y, Hamaguchi I, Fukui K. *J. Biosci. Bioeng.*, **2013**, 115(1): 104-110
- 18 Wafer L, Kloczewiak M, Luo Y. *AAPS J.*, **2016**, 18(4): 849-860
- 19 Gandhi A V, Potheary M R, Bain D L, Carpenter J F. *J. Pharm. Sci.*, **2017**, 106(8): 2178-2186
- 20 Laue T M, Stafford W F I. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **1999**, 28: 75-100
- 21 Berkowitz S A. *AAPS J.*, **2006**, 8(3): 590-605
- 22 Philo J S. *Am. Biotechnol. Lab.*, **2003**, 21(11): 22-26
- 23 Gabrielson J P, Randolph T W, Kendrick B S, Stoner M R. *Anal. Biochem.*, **2007**, 361(1): 24-30
- 24 Gabrielson J P, Arthur K K, Kendrick B S, Randolph T W, Stoner M R. *J. Pharm. Sci.*, **2009**, 98(1): 50-62
- 25 Giddings J C. *Science*, **1993**, 260(5113): 1456-1465
- 26 Arakawa T, Philo J S, Ejima D, Sato H, Tsumoto K. *BioProcess Int.*, **2007**, 5(10): 52-70
- 27 Giddings J C. *Anal. Chem.*, **1990**, 62(21): 2306-2312
- 28 Gabrielson J P, Brader M L, Pekar A H, Mathis K B, Winter G, Carpenter J F, Randolph T W. *J. Pharm. Sci.*, **2007**, 96(2): 268-279
- 29 Arosio P, Barolo G, Müller-Späth T, Wu H, Morbidelli M. *Pharm. Res.*, **2011**, 28(8): 1884-1894
- 30 Reschiglian P, Roda B, Zattoni A, Tanase M, Marassi V, Serani S. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2014**, 406(6): 1619-1627
- 31 Tanase M, Zolla V, Clement C C, Borghi F, Urbanska A M, Rodriguez-Navarro J A, Roda B, Zattoni A, Reschiglian P, Cuervo A M, Santambrogio L. *Nat. Protoc.*, **2015**, 10(1): 134-148
- 32 Van de Hulst H C. *Light scattering by Small Particles*. New York: Wiley, **1957**: 2
- 33 Sukumar M, Doyle B L, Combs J L, Pekar A H. *Pharm. Res.*, **2004**, 21(7): 1087-1093
- 34 Eberlein G A, Stratton P R, Wang Y J. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, **1994**, 48(5): 224-230
- 35 Nuhu M M, Curtis R. *Biotechnol. J.*, **2015**, 10(3): 404-416

- 36 Bey H , Gtari W , Aschi A , Othman T. *Int. J. Biol. Macromol.* , **2016** , 92: 860–866
- 37 Bickel F , Herold E M , Signes A , Romeijn S , Jiskoot W , Kiefer H. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* , **2016** , 107: 310–320
- 38 Ropiak H M , Lachmann P , Ramsay A , Green R J , Mueller-Harvey I. *PLoS One* , **2017** , 12(1) : e0170768
- 39 GUO Feng-Qi , LIU Qiu-Xia. *J. Light Scatt.* , **1997** , 9(2) : 96–98
郭凤岐 , 刘秋霞. *光散射学报* , **1997** , 9(2) : 96–98
- 40 Arakawa T , Philo J S , Ejima D , Tsumoto K , Arisaka F. *BioProcess Int.* , **2007** , 5(4) : 36–47
- 41 Aymard P , Nicolai T , Durand D , Clark A. *Macromolecules* , **1999** , 32(8) : 2542–2552
- 42 Krishnamurthy R , Sukumar M , Das T K , Lacher N A. *BioProcess Int.* , **2008** , 6(5) : 32–42
- 43 Filipe V , Hawe A , Jiskoot W. *Pharm. Res.* , **2010** , 27(5) : 796–810
- 44 Zhou C , Krueger A B , Barnard J G , Qi W , Carpenter J F. *J. Pharm. Sci.* , **2015** , 104(8) : 2441–2450
- 45 Krueger A B , Carnell P , Carpenter J F. *J. Pharm. Sci.* , **2016** , 105(4) : 1434–1443
- 46 Gross J , Sayle S , Karow A R , Bakowsky U , Garidel P. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* , **2016** , 104: 30–41
- 47 Shang J , Gao X. *Chem. Soc. Rev.* , **2014** , 43(21) : 7267–7278
- 48 CHEN Zhu-Bo , CAO Xue-Tao. *Flow Cytometry-Principle , Operation & Application*. Beijing: Science Press , **2010** : 14
陈朱波 , 曹雪涛. *流式细胞术——原理、操作及应用*. 北京: 科学出版社 , **2010** : 14
- 49 Mach H , Bhambhani A , Meyer B K , Burek S , Davis H , Blue J T , Evans R K. *J. Pharm. Sci.* , **2011** , 100(5) : 1671–1678
- 50 Nishi H , Mathas R , Furst R , Winter G. *J. Pharm. Sci.* , **2014** , 103(1) : 90–99
- 51 Zhu S B , Ma L , Wang S , Chen C X , Zhang W Q , Yang L L , Hang W , Nolan J P , Wu L N , Yan X M. *ACS Nano* , **2014** , 8(10) : 10998–11006
- 52 Ma L , Zhu S B , Tian Y , Zhang W Q , Wang S , Chen C X , Wu L N , Yan X M. *Angew. Chem. Int. Edit.* , **2016** , 55(35) : 10239–10243
- 53 Chen C X , Zhu S B , Wang S , Zhang W Q , Cheng Y , Yan X M. *ACS Appl. Mater. Interfaces* , **2017** , 9(16) : 13913–13919
- 54 Tian Y , Ma L , Gong M F , Su G Q , Zhu S B , Zhang W Q , Wang S , Li Z B , Chen C X , Li L H , Wu L N , Yan X M. *ACS Nano* , **2018** , 12(1) : 671–680
- 55 Filipe V , Poole R , Oladunjoye O , Braeckmans K , Jiskoot W. *Pharm. Res.* , **2012** , 29(8) : 2202–2212
- 56 Okada T , Wakabayashi M , Ikeda K , Matsuzaki K. *J. Mol. Biol.* , **2007** , 371(2) : 481–489
- 57 Chin J , Mustafi D , Poellmann M J , Lee R C. *Phys. Biol.* , **2017** , 14(1) : 016003
- 58 Ahmed A , Shamsi A , Khan M S , Husain F M , Bano B. *Int. J. Biol. Macromol.* , **2018** , 113: 269–276
- 59 Moretti M , Allione M , Marini M , Giugni A , Torre B , Das G , Di Fabrizio E. *Microelectron. Eng.* , **2018** , 191: 54–59
- 60 Sung J J , Pardeshi N N , Mulder A M , Mulligan S K , Quispe J , On K , Carragher B , Potter C S , Carpenter J F , Schneemann A. *J. Pharm. Sci.* , **2015** , 104(2) : 750–759
- 61 Schokker E P , Singh H , Pinder D N , Creamer L K. *Int. Dairy J.* , **2000** , 10(4) : 233–240
- 62 Kiese S , Pappenberg A , Friess W , Mahler H C. *J. Pharm. Sci.* , **2008** , 97(10) : 4347–4366
- 63 Yohannes G , Sneek M , Varjo S J , Jussila M , Wiedmer S K , Kovanen P T , Oorni K , Riekkola M L. *Anal. Biochem.* , **2006** , 354(2) : 255–265
- 64 Saeseaw S , Shiowatana J , Siripinyanond A. *Anal. Bioanal. Chem.* , **2006** , 386(6) : 1681–1688
- 65 Xu Y , Seeman D , Yan Y , Sun L , Post J , Dubin P L. *Biomacromolecules* , **2012** , 13(5) : 1642–1651
- 66 Bai S , Murugesan Y , Vlasic M , Karpes L B , Brader M L. *J. Pharm. Sci.* , **2013** , 102(2) : 347–351
- 67 Probst C , Zeng Y , Zhu R R. *J. Pharm. Sci.* , **2017** , 106(8) : 1952–1960
- 68 Debnath S , Nath B , Chakrabarti A. *Protein Pept. Lett.* , **2017** , 24(10) : 969–973
- 69 Giger K , Vanam R P , Seyrek E , Dubin P L. *Biomacromolecules* , **2008** , 9(9) : 2338–2344
- 70 Mahler H C , Muller R , Friess W , Delille A , Matheus S. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* , **2005** , 59(3) : 407–417
- 71 Sahin Z , Demir Y K , Kayser V. *Eur. J. Pharm. Sci.* , **2016** , 86: 115–124
- 72 Sugimoto M A A , Toledo V , Cunha M R R , Carregal V M , Jorge R , Leao P , Fialho S L , Silva-Cunha A. *Arq. Bras. Oftalmol.* , **2017** , 80(2) : 108–113

- 73 Liu D , Ren D , Huang H , Dankberg J , Rosenfeld R , Cocco M J , Li L , Brems D N , Remmele R L J. *Biochemistry* , **2008** , 47(18) : 5088–5100
- 74 Roessler U , Wiesbauer J , Leitgeb S , Birner-Gruenberger R , Nidetzky B. *Biotechnol. J.* , **2012** , 7(8) : 1014–1024

Recent Advances in Analysis of Protein Aggregation in Biopharmaceuticals

GAO Kai-Min , YAN Xiao-Mei*

(Department of Chemical Biology , College of Chemistry and Chemical Engineering ,
The MOE Key Laboratory of Spectrochemical Analysis & Instrumentation , The Key Laboratory for Chemical
Biology of Fujian Province , Xiamen University , Xiamen 361005 , China)

Abstract Protein drugs , represented by recombinant protein drugs and therapeutic antibodies , have become important components of biotech medicines. The efficacy and biosafety of protein drugs are superior to small molecule drugs in the treatment of serious diseases such as malignant tumor , autoimmune disease and virus infection. However , the stability of proteins is poor and they are prone to aggregate upon environmental stimulation or due to their own instability during the process of production , purification , transportation and storage. Protein aggregation may reduce therapeutic efficacy and thus induce immune responses. High-sensitivity , high-resolution , simple and practical techniques for protein aggregation detection are of great importance in the development and advancement of protein drugs. This paper intends to review the techniques used for protein aggregation analysis such as size-exclusion chromatography , gel-electrophoresis , analytical ultracentrifugation , field flow fractionation , turbidimetry/nephelometry , dynamic light scattering , nanoparticle tracking analysis , flow cytometry , and electron microscopy. The principle , strengths , limitations and applications of these techniques are discussed , and the direction in the future development is prospected.

Keywords Protein drugs ; Protein aggregation ; Size separation ; Light scattering ; Flow cytometry ; Review

(Received 26 April 2018; accepted 8 August 2018)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21225523 , 21627811) .