

CE-LIF对重组人促红细胞生成素糖基的快速分析

---针对《食品安全国家标准-动物性食品中兽药最大残留限量（报批稿）》

Comparation the N-Glycan of different source's recombinant human erythropoietin by using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detector

任挺钧 (Tingjun Ren)¹, 李响 (Xiang Li)², 高铁 (Tie Gao)¹, 陈泓序 (Hongxu Chen)¹

¹ CE & Biopharma, Sciex, China

² 中国食品药品检定研究院重组药物室, 北京

¹ CE & Biopharma, Sciex, China

² Division of Recombinant Biological Products, National Institute of Food and Drug Control, Beijing, China

Key Words: rhuEPO, Glycosylation, CE-LIF, Fast

Abstract: Recombinant human erythropoietin (rhuEPO) has been extensively used as a pharmaceutical product for treating anemia in clinic. The rhuEPO is a typical glycoprotein, and the glycosylation is up to 40%. So, glycosylation of rhuEPO is of great importance and could affects the biological activity, immunogenicity and pharmacokinetics. In this study, by using effective glycan capture by magnetic microparticles, we can realize the glycan releasing and labeling in 60 mins, and analysis in conjunction with a rapid high-resolution capillary electrophoresis analysis method for the prepared samples using laser induced fluorescence detection (CE-LIF) in 5 mins. Also, the GU software can identify the glycan structure automatically. As far as we know, this is the first time to compare different company's glycan of rhuEPO qualitatively and quantitatively by using CE-LIF. The proposed method is fast and has good reproducibility, which allowed the inter-day RSD of migration time and peak area were around 0.2% and 2.6% (n=5), respectively. Hence, this method has great significance of studying the glycan glycosylation of rhuEPO.

前言

重组人促红细胞生成素 (Recombinant human erythropoietin, rhuEPO) 是目前临床治疗肾性贫血的主要药物且EPO是一类含有

高糖基化的蛋白, 糖类含量高达40%, 糖基的存在对于EPO合成后的分泌、体外活性以及药理药效安全有着重大意义。

目前, EPO糖基化的分析方法, 主要利用的分离技术如CE或LC, 对其进行三个水平的分析: 包括完整糖蛋白的分析、蛋白酶解得到的糖肽水平的分析, 以及糖苷酶解释放的糖基的分析。其中, 完整蛋白分析方法无需对蛋白进行前处理, 可通过分离获得EPO的蛋白异构体信息, 这些异构体主要由糖基的异质性引起。欧洲药典中使用毛细管区带电泳法对EPO进行完整蛋白的分离^[1], 可以分离得到8-10个蛋白异构体。然而, 完整蛋白的分析无法确定每个糖基化位点的修饰程度。糖肽分析能够进一步获得糖基和糖基化位点间的对应关系的信息^[2]。但糖肽分析方法的不足是方法太复杂, 而且对各糖基定量的准确度不高。

糖基分析是将糖链从蛋白上酶解下来, 使用荧光标记物对糖链进行标记, 之后再使用分离分析技术对荧光标记的糖链进行分析。相比于完整蛋白分析和糖肽分析, 糖基水平的分析方法更加灵敏, 定量更加准确。

我们采用CE-LIF方法对rhuEPO进行了糖基水平的快速分析。结合磁珠辅助对糖基进行酶切和标记, 前处理过程在60分钟即可完成。在优化的CE分离条件下, 分离过程可在5分钟内完成, 并可使用数据库进行实时的糖基鉴定。该方法重复性好, (迁移时间RSD小于0.2%, 校正峰面积RSD小于2.6%), 可对糖蛋白样品中的糖基进行定性和定量分析。本文中, 我们使用该方法对不同来源的rhuEPO样品中糖基的差异进行了比较。

仪器和试剂

1 仪器

毛细管电泳仪 (PA800 Plus生物制药分析系统, LIF检测器, Sciex); 32 Karat软件 (Version 10.0, 带有GU 数据库; 激光诱导荧光检测器, 激发波长488 nm, 检测波长520 nm; 5430 型台式高速冷冻离心机 (Eppendorf, Germany); 恒温混匀仪 (Eppendorf, Germany); MA3涡旋混合器 (IKA, Germany); 水银温度计 (0-100℃) 。

2 试剂与耗材

快速糖分析试剂盒 (Sciex, B94499 PTO), 其中包含有磁珠悬浮液、电泳缓冲液、标记试剂APTS、荧光标记的定位标准品BST (DP2、DP15) 和未标记内标IST (DP3) 等试剂; N-糖苷酶-F (New England BioLabs, P0704L); 乙腈 (Sigma-Aldrich, 34998); 1 M NaBH₃CN, 溶于THF (Sigma-Aldrich, 296813); 0.1 M NaOH和0.1 M HCl (Sciex); 二次去离子水 (DDI Water, Milli-Q Labssystem, Millipore)。Ultracel YM-10 滤膜 (Millipore PN A11530)。变性溶液、酶解溶液和标记溶液的配制步骤可参见Fast Glycan Labeling And Analysis Kit Application Guide^[3]。

3 样品及前处理

本研究中所有样品均来自中国食品药品检定研究院。三支样品Sample 4、Sample 8和Sample 12浓度分别为0.957 mg/mL、1.69 mg/mL和1.77 mg/mL。欧洲药典rhuEPO标准品 (Std., 0.1 mg, 购自EDQM)。对Sample 4、Sample 8、Sample 12、Std.四个样品用10 K的超滤膜进行超滤浓缩, 浓缩后的浓度分别为7.0 mg/mL、6.8 mg/mL、6.4 mg/mL和5.0 mg/mL。

样品的前处理可分为糖基的释放与糖基的标记两部分内容。实验前, 需用水银温度计确保恒温仪温度的准确。

糖基的释放: 取200 μ L磁珠悬浮液和10 μ L样品于PCR管中进行混合。预热1分钟后加入5 μ L变性试剂, 于60 $^{\circ}$ C反应8分钟。再加入12 μ L酶解液, 于60 $^{\circ}$ C反应20 分钟。取出后快速涡旋10秒, 加入200 μ L乙腈用于糖基的捕获。再次快速涡旋10秒后静置1分钟使糖基与磁珠结合。最后移除溶液。

糖基的标记: 取10 μ L标记溶液加入到上述步骤的PCR管中, 快速涡旋后于60 $^{\circ}$ C水浴20分钟。取出后, 用乙腈和二次去离子水反复清洗3-4遍, 去除多余的标记试剂。最终加入100 μ L二次去离子水洗脱磁珠上捕获的糖基。随后即可进样分析。前处理过程见图1。

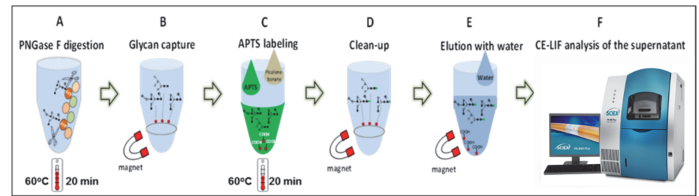


图1. 磁珠辅助法进行N-糖分析的样品前处理流程图。

CE方法

毛细管: 熔融石英毛细管, 20/30 cm有效/总长度, 50 μ m内径; 进样: DDI Water, 0.3 psi 压力进样5秒; 样品, -5 kV电动进样 3秒; BST, -1 kV电动进样1秒。毛细管温度: 25 $^{\circ}$ C; 样品储存温度: 10 $^{\circ}$ C。

新毛细管的预平衡: DDI Water, 80 psi压力冲洗2分钟; 0.1 M NaOH, 80 psi压力冲洗2分钟; 0.1 M HCl, 80 psi压力冲洗2分钟; DDI Water, 80 psi压力冲洗2分钟。

每针之间的冲洗: Gel Buffer, 80 psi压力冲洗2分钟。

结果与讨论

1 CE-LIF方法对rhuEPO中N-糖的快速分析

我们以rhuEPO标准品为样品, 使用Sciex公司快速糖基分析试剂盒中的前处理方法及CE分离条件, 在60 分钟内完成了前处理, 5分钟内实现了对样品的分离, 电泳图参见图2。其中2.3 分钟前的峰为标记试剂的峰, 2.3、2.6和5.0分钟的峰分别为荧光标记的定位标准品BST (DP2、DP15) 和内标IST (DP3)。分离结束后依靠数据库实时的进行糖基鉴定。对于该rhuEPO标准品, 软件自动鉴定出FA2BG2S2、A2(6)G1S1、FA2(3)G1S1、A2B、FA2B、FA2(6)G1、M7[D3]、M8[D1D3]和A2(3)G1九种糖基。

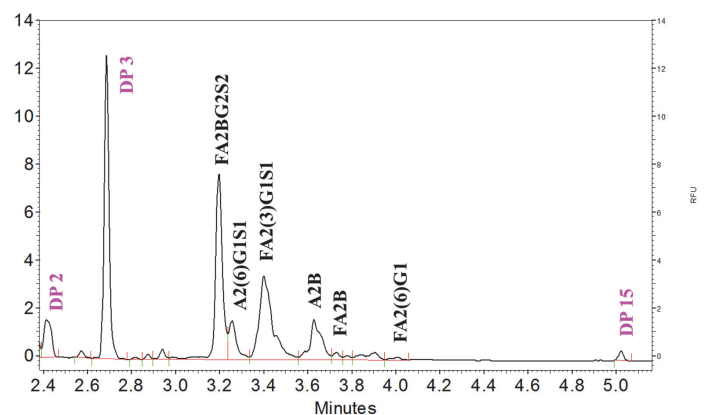


图2. CE-LIF法分离rhuEPO标准品糖基的电泳图。

2 方法重复性的考察

以rhuEPO标准品连续5针进样，对方法的重复性进行考察。经计算，FA2BG2S2、FA2(3)G1S1和A2B三个较高含量糖基峰的迁移时间RSD均小于0.2%，校正峰面积RSD均小于2.6%。

3 不同来源rhuEPO样品中糖基差异的比较

为了考察方法在rhuEPO糖基监控中的应用可行性，我们对三种不同来源的rhuEPO样品进行了CE-LIF分析及比较（图3）。几种不同的样品中，共自动鉴定出9种糖基，分别为FA2BG2S2、A2(6)G1S1、FA2(3)G1S1、A2B、FA2B、FA2(6)G1、M7[D3]、M8[D1D3]和A2(3)G1（其糖基结构见图3）。S1、S2分别表示半乳糖上连接1个或2个唾液酸。峰1、峰2和峰3均为含有复杂结构唾液酸的糖基，且具有一个核心岩藻糖。A2B则表示样品均含有平分型N-乙酰葡萄糖胺类糖基。基于上述糖基的鉴定和校准峰面积的积分，对各种rhuEPO样品的糖基种类和含量差异进行了比较，比较结果参见图3。在糖基种类上，各个样品均含有FA2BG2S2、A2(6)

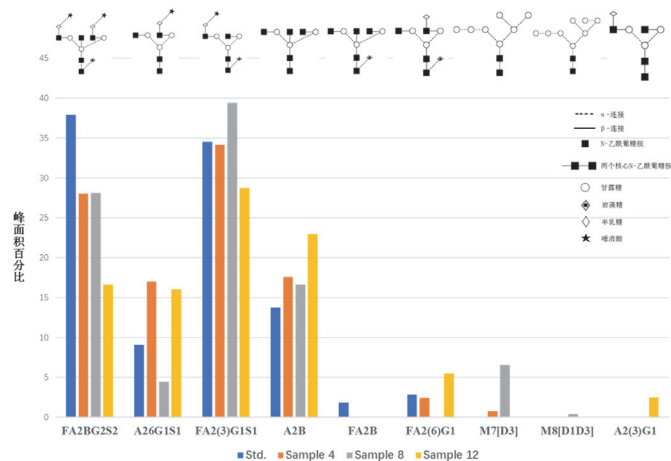


图3. 不同来源rhuEPO样品中糖基种类及含量的比较。

G1S1、FA2(3)G1S1、A2B这四个相对高丰度的糖基，差异主要体现在FA2B、FA2(6)G1、M7[D3]、M8[D1D3]和A2(3)G1这五个微量的糖基中。比如Sample 4和Sample 8含有M7[D3]和M8[D1D3]（含有7或8个甘露糖），而Sample 12和Std.则不含该两种糖基。除了糖基种类的差异外，不同样品间各种糖基的含量也均存在差异。

结论

采用CE-LIF快速糖基分析法，成功实现了对rhuEPO样品中糖基的快速定性及定量分析。方法所需前处理时间60分钟、分离时间5分钟，是目前报道的rhuEPO糖基分析最快的方法。根据此方法，对不同来源rhuEPO的糖基类型及含量进行了比较。从所含糖基种类上看，四个样品中均含有FA2BG2S2、A2(6)G1S1、FA2(3)G1S1、A2B四个糖基，其所含有的糖基类型的差异体现在FA2B、FA2(6)G1、M7[D3]、M8[D1D3]和A2(3)G1这五个糖基上。含量上，不同样品中每种糖基的含量均存在差异。该方法分析速度快，重复性好，可用于以rhuEPO为代表的糖蛋白药物的糖基分析。并在克隆筛选、产品质控及药物一致性评价中具有重要的应用前景。

参考文献

- [1] European Pharmacopoeia Erythropoietin concentrated solution Elaboration of a European Pharmacopoeia[S]. 1528-1532.
- [2] Li F, Progress in research on glycosylation analysis of erythropoietin, [J]. Chin J Biologicals, 2018, 31, (3): 328.
- [3] Fast Glycan Labeling And Analysis Kit Application Guide, Sciex, B94499 PTO .

For Research Use Only. Not for use in Diagnostics Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEX.

© 2019. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-9790-ZH-A



SCIEX中国公司

北京分公司
地址：北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808 1388
传真：010-5808 1390
全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897

上海公司及亚太区应用支持中心
地址：上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419 7200
传真：021-2419 7333
网址：www.sciex.com.cn

广州分公司
地址：广州市天河区珠江江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510 0200
传真：020-3876 0835
微博：@SCIEX