

人促红素糖链单糖残基组成解析

安怡方,史新昌,于 雷,李 响,周 勇

(中国食品药品检定研究院/卫生部生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室,北京 100050)

[摘要] **目的:** 利用人促红素 cIEF-MS 检测结果,解析其糖链单糖组成。**方法:** 经 cIEF 检测后获得 cIEF 峰,并对每个峰进行了 MS 检测,得到每个峰的高分辨质谱分子量,扣除蛋白分子量后,将分子量差值与单糖残基分子量组合数据库进行比对(精度约 0.01%),获得一系列质量数基本相符的单糖组合方式,并对单糖数量及单糖之间关系合理性进行分析。**结果:** 经 cIEF 检测后获得 10 个 cIEF 峰,MS 检测获得不少于 32 个峰质量数,比较后获得各质量数对应的一系列单糖组合形式,文中只列举了离子数量最高峰 P3 的组合形式,经有效性分析结果显示其最具有延伸性的组合方式为 19 个 GlcNAc/GlaNAc 残基、22 个 Man/Gla 残基、12 个 Neu5Ac 残基和 3 个 Fuc 残基。**结论:** 获得人促红素蛋白糖链单糖组合方式,为进一步完整蛋白糖型的解析和表征奠定基础。

[关键词] 毛细管等电聚焦电泳质谱联用;人促红素;等电点异构体;N-糖基化修饰;O-糖基化修饰;单糖残基组合

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)08-0853-05

Analysis of monosaccharide residues composition in human erythropoietin

AN Yi-fang, SHI Xin-chang, YU Lei, LI Xiang, ZHOU Yong

(Key Laboratory of the Ministry of Health for Research on Quality and Standardization of Biotech Products, National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the monosaccharide composition of human erythropoietin by cIEF-MS. **Methods:** The cIEF peak was obtained after cIEF detection, and each peak was detected by MS to obtain the high resolution mass spectral molecular weight. After deducting the protein molecular weight, the redundant molecular weight was compared with the molecular weight combination database of monosaccharide residues (accuracy being about 0.01%) to obtain a series of monosaccharide combination manners with basically consistent mass, and the rationality of monosaccharide quantity and the relationship between monosaccharides were analyzed. **Results:** Ten cIEF peaks were obtained by cIEF detection, and no less than 32 peak mass numbers were obtained by MS detection. After comparison, a series of monosaccharide combination forms corresponding to each mass number were obtained. Only the combination form with the highest ion number P3 was listed in this paper. The effectiveness analysis results showed that the most extensible combination manners were 19 GlcNAc/GlaNAc residues, 22 Man/Gla residues, 12 Neu5Ac residues and 3 Fuc residues. **Conclusion:** The monosaccharide combination manner of

[基金项目] 国家质量基础设施体系资助项目(2021YFF0600804)

[作者简介] 安怡方,女,硕士研究生,研究方向:重组药物质量控制。E-mail: anyf2021@163.com。共同第一作者:史新昌,男,研究员,研究方向:重组药物质量控制。E-mail: shixc@nifdc.org.cn。

[通讯作者] 周勇,男,研究员,研究方向:重组药物质量控制。E-mail: zhouyong@nifdc.org.cn。李响,男,主任技师,研究方向:重组药物质量控制。E-mail: lix@nifdc.org.cn。

human erythropoietin protein glycosylation chain was obtained, which laid a foundation for the further analysis and characterization of complete protein glycoforms.

[Key words] capillary isoelectric focusing-mass spectrum; human erythropoietin; isoelectric point isoform; *N*-glycosylation; *O*-glycosylation; monosaccharide residues composition

人促红细胞生成素(human erythropoietin, hEPO, 以下简称人促红素)正常情况下由肾脏合成,其主要作用是促进骨髓生成红细胞^[1]。目前我国市场上流通的人促红素由中国地鼠卵巢细胞(Chinese hamster ovary cell, CHO)表达,用于治疗补充铁剂后无效的肾性贫血,人促红素具有一定的器官保护作用,有助于预防或治疗急性肾损伤^[2-3],由165个氨基酸残基组成,氨基酸组成蛋白部分的平均分子量18 235.70 Da,含2对二硫键,有3个*N*-糖基化位点和1个*O*-糖基化位点^[4-5]。

糖基化对人促红素分子生物学体内活性有重要影响,可以延长药品在体内半衰期,对其糖基检测和控制对制品的稳定性和生产工艺控制性有重要意义^[6-7]。在重组蛋白类药物的质量控制中,糖基化分析和鉴定越来越受到重视^[8]。

毛细管等电聚焦电泳-质谱联用(capillary isoelectric focusing-mass spectrum, cIEF-MS)对人促红素等电点异构体的检测和分析具有优势。本研究选取一批符合《中华人民共和国药典》要求的人促红素原液委托合肥市永道致远技术服务公司进行cIEF-MS检测,文中只列举部分谱图,重点进行等电点异

构体分子量单糖残基组合分析。

本文通过建立单糖残基组合数据库,并结合《中华人民共和国药典》对人促红素的要求以及完整糖蛋白的合理性结构分析,总结出最有可能存在的人促红素单糖残基组合,为其他重组蛋白类药物单糖残基组合分析扩展思路。

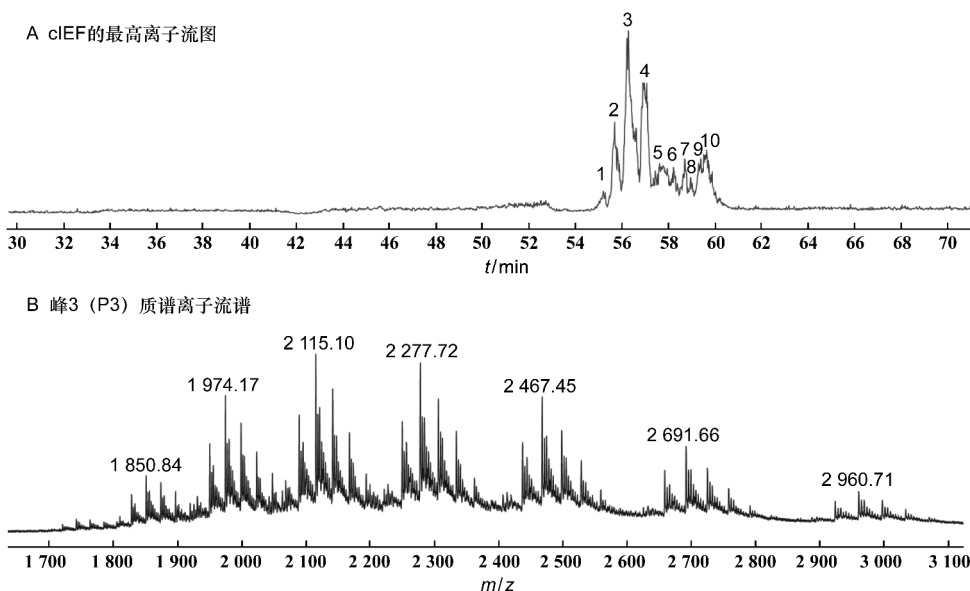
资 料

由中国食品药品检定研究院提供3支符合《中华人民共和国药典》要求的人促红素原液,委托于永道致远技术服务公司进行cIEF-MS检测,本文仅对人促红素cIEF-MS检测结果解析,得到可能存在的人促红素单糖残基组合。

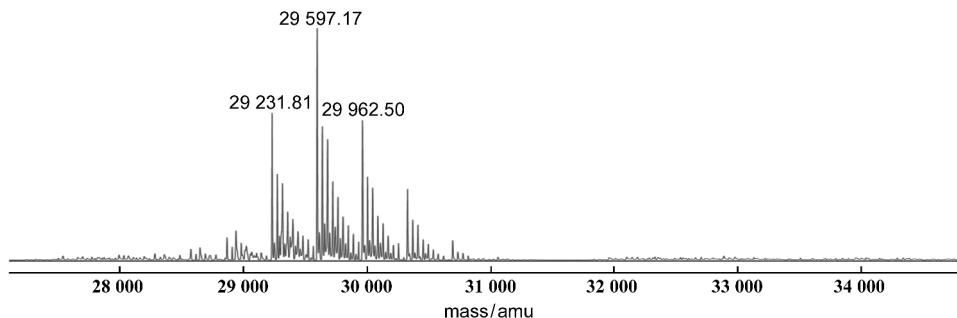
方法和结果

1 cIEF-MS 检测结果

CR3520型全自动cIEF-MS检测结果如下,其中cIEF的最高离子流图见图1A,从左至右标注峰1~峰10(P1~P10)。以最高峰P3举例说明,其质谱离子流谱图见图1B,经去卷积处理后P3平均分子量谱图见图1C。将全部数据汇总至表1。



C 卷积处理后峰3 (P3) 平均分子量谱图



A: 从左至右标注峰 1~10 (P1~10)

图 1 人促红素 cIEF-MS 检测结果

表 1 人促红素 cIEF-MS 分析结果汇总

峰号	各峰对应质量数								
P1	27 918.38	28 283.88	28 649.32	29 015.03	29 380.49				
P2		28 575.01	28 940.37	29 305.77	29 671.13	30 036.59			
P3			29 231.18	29 597.17	29 962.50	30 327.96	40 693.42		
P4			29 522.73	29 888.59	30 253.78				
P5					30 253.88	30 619.02			
P6						30 619.38	30 984.50		
P7							30 984.13	31 349.83	31 715.11
P8								31 349.91	31 715.01
P9				30 179.71					
P10				30 178.97	30 544.91	30 910.34			

2 检测结果分析

将检测结果按上表位置排列后,横向为同一 cIEF 峰中不同分子量峰,相邻差(365.46 ± 0.28) Da, 为 1 个 *N*-乙酰葡萄糖胺 (*N*-acetylglucosamine, GlcNAc) 残基与 1 个半乳糖 (galactose, Gal) 残基质量数和;纵向分成 5 组,第 1 组为 P1、第 2 组为 P2、第 3 组为 P3、第 4 组为 P4~8、第 5 组为 P9~10 峰,相邻组间差 (291.185 ± 0.25) Da,为唾液酸 (sialic acid, Neu5Ac) 残基质量数。综上,表 1 横向展示为加/减“分支”,纵向展示为加/减唾液酸。

3 建单糖残基组合数据库

N-乙酰葡萄糖胺和 *N*-乙酰半乳糖胺 (*N*-acetylgalactosamine, GalNAc) 平均分子量均为 221.2078 Da, 将两者合并简写成 GG; 半乳糖 (Gal) 和甘露糖 (mannose, Man) 平均分子量均为 180.1559 Da, 将两者合并简写成 GM; 岩藻糖 (fucose, Fuc) 平均分子量为 164.1565 Da, 简写成 F; 唾液酸平均分子量为 309.2699 简写成 SA; 水分子的平均分子量为 18.0153, 人促红素氨基酸组成 (蛋白部分) 平均分子量 18235.70 Da, 简写成 EPOp (以上分子量源自

《中华人民共和国药典》原子量表。注意:糖链与蛋白链连接处所脱水分子计入单糖残基)。

扣除水分子后残基分子量分别为:203.1925, 162.1406, 291.2546 和 146.1412 Da。GG 数量 0~49、GM 数量 0~49、SA 数量 0~19 和 F 数量 0~3 的所有数量组合构建一个数据库。共计 20 万种单糖残基分子量组合,数据库承载于 Excel 文件中。

4 单糖残基组合数据库查询和分析

以 P3 峰中丰度最大的峰为例进行说明, P3 峰中丰度最大的峰实测分子量为 29597.17 Da。按 ± 1.5 Da (精度在 0.01% 左右) 搜索数据库后可以得到 55 种单糖残基组合方式, 结果见表 2。其中 N 糖位点和 O 糖位点均饱和的组合方式有 14 种, 即编号 41~55。有一些是明显不合常理的, 如 41 号, 因不能形成 3 个完整的五糖核心。根据按《中华人民共和国药典》检测的唾液酸含量结果, 唾液酸应不低于 10 个, 因此 43, 45, 47, 49, 51, 53, 54 和 55 号均不符合。另有一些组合 GG 的数量与 GM 的数量不能形成哺乳动物的糖型; 如 42 号冗余 GM, 这种情况必须通过形成高甘露糖型才能解决。这种

单糖残基组合提示各单糖残基数量中存在某种关系,如岩藻糖残基数量要少于 N 糖条数等。

表 2 单糖残基组合结果

编号	GG	GM	SA	F	分子量(MW)	说明	编号	GG	GM	SA	F	分子量(MW)	说明
1	6	41	12	0	29 597.6	Fuc 饱和度低	29	6	32	16	2	29 595.7	Fuc 饱和度低
2	10	27	17	0	29 596.7	Fuc 饱和度低	30	9	48	5	2	29 595.7	Fuc 饱和度低
3	13	43	6	0	29 596.7	Fuc 饱和度低	31	10	27	16	2	29 597.8	Fuc 饱和度低
4	17	29	11	0	29 595.8	Fuc 饱和度低	32	13	43	5	2	29 597.8	Fuc 饱和度低
5	20	45	0	0	29 595.8	Fuc 饱和度低	33	17	29	10	2	29 596.9	Fuc 饱和度低
6	21	24	11	0	29 597.9 ^a	Fuc 饱和度低	34	21	15	15	2	29 595.9 ^a	SA 饱和度高
7	24	40	0	0	29 597.9	Fuc 饱和度低	35	24	31	4	2	29 596.0	Fuc 饱和度低
8	25	10	16	0	29 597.0	Fuc 饱和度低	36	25	10	15	2	29 598.0	Fuc 饱和度低
9	28	26	5	0	29 597.0	Fuc 饱和度低	37	28	26	4	2	29 598.0	Fuc 饱和度低
10	32	12	10	0	29 596.1	Fuc 饱和度低	38	32	12	9	2	29 597.1	Fuc 饱和度低
11	36	7	10	0	29 598.2	Fuc 饱和度低	39	39	14	3	2	29 596.2	Fuc 饱和度低
12	43	9	4	0	29 597.3	Fuc 饱和度低	40	43	9	3	2	29 598.3	Fuc 饱和度低
13	4	48	9	1	29 598.6	Fuc 饱和度低	41	4	39	13	3	29 596.7	五糖核心不完整
14	8	34	14	1	29 597.7	Fuc 饱和度低	42	8	25	18	3	29 595.7	冗余 Glc/Man
15	12	20	19	1	29 596.8	Fuc 饱和度低	43	11	41	7	3	29 595.8	SA 饱和度低
16	15	36	8	1	29 596.8	Fuc 饱和度低	44	12	20	18	3	29 597.8	SA 饱和度过高
17	19	22	13	1	29 595.9 ^a	Fuc 饱和度低	45	15	36	7	3	29 597.8	SA 饱和度低
18	22	38	2	1	29 595.9	Fuc 饱和度低	46	19	22	12	3	29 596.9 ^a	基本合理
19	23	17	13	1	29 598.0	Fuc 饱和度低	47	22	38	1	3	29 596.9	SA 饱和度过低
20	26	33	2	1	29 598.0	Fuc 饱和度低	48	23	8	17	3	29 596.0	五糖核心不完整
21	27	3	18	1	29 597.1	Fuc 饱和度低	49	26	24	6	3	29 596.0	SA 饱和度低
22	30	19	7	1	29 597.1	Fuc 饱和度低	50	27	3	17	3	29 598.1	SA 饱和度过高
23	34	5	12	1	29 596.2	Fuc 饱和度低	51	30	19	6	3	29 598.1	SA 饱和度低
24	37	21	1	1	29 596.2	Fuc 饱和度低	52	34	5	11	3	29 597.2	五糖核心不完整
25	38	0	12	1	29 598.2	Fuc 饱和度低	53	37	21	0	3	29 597.2	SA 饱和度过低
26	41	16	1	1	29 598.2	Fuc 饱和度低	54	41	7	5	3	29 596.3	五糖核心不完整
27	45	2	6	1	29 597.3	Fuc 饱和度低	55	45	2	5	3	29 598.4	五糖核心不完整
28	2	46	11	2	29 596.6	Fuc 饱和度低							

a:表示结构组合可能合理

找出的可能合理组合包括:在 3 条 N 糖链和一条 O 糖链的情况下,岩藻糖残基 3 个为 46 号组合;岩藻糖只有 1 个为 17 号,没有岩藻糖残基为 6 号;在 3 条 N 糖链和没有 O 糖链的情况下,岩藻糖 2 个情况下为 34 号组合符合;其他情况均没有组合符合。岩藻糖通常被认为是哺乳动物 N 糖的重要标志,并且人促红素分子具有较高的糖基化水平,故暂

不考虑岩藻糖不饱和情况。其他种组合向其周边峰的延伸性不如 46 号组合(即 19GG + 22GM + 12SA + 3F 组合)。

5 其他峰组合

其他峰也如上进行分析并将其归纳入表 3,展现的规律与实测展现值相同,并且理论上可以覆盖所有的峰质量数。

表 3 cIEF-MS 电荷异质性质谱分析结果汇总

峰号	各峰对应组合关系									
#1	16,19,10,3	17,20,10,3	18,21,10,3	19,22,10,3	20,23,10,3					
#2		17,20,11,3	18,21,11,3	19,22,11,3	20,23,11,3	21,24,11,3				
#3			18,21,12,3	19,22,12,3	20,23,12,3	21,24,12,3	22,25,12,3			
#4 ~ #8			18,21,13,3	19,22,13,3	20,23,13,3	21,24,13,3	22,25,13,3	23,26,13,3	24,27,13,3	25,28,13,3
#9 ~ #10				19,22,14,3	20,23,14,3	21,24,14,3				

数据排列顺序为 GG(N-乙酰葡萄糖胺或 N-乙酰半乳糖胺),GM(半乳糖或甘露糖),SA(唾液酸),F(岩藻糖)

讨 论

蛋白质的糖基化修饰研究逐渐成为热点,但由于糖型的复杂性和多样性,尤其对完整糖蛋白的研究更是遇到诸多瓶颈。本文提供了利用 cIEF-MS 检测完整糖蛋白高精度分子量的分析方法,进一步解析其糖链(包括 N 糖链和 O 糖链)中单糖残基组成,通过必要的已知条件,排除不合理组合,进而估计糖蛋白的糖基总体分布情况。

单糖残基组合有效性判断是判断单糖残基组合是否合理的核心环节,其执行需要有一定的依据或出发点。就本文而言,首先用于检测的是符合《中华人民共和国药典》要求的一批人促红素原液(CHO 细胞表达),其唾液酸化度达到 10 以上^[9],即每分子糖蛋白具有超过 10 个唾液酸,糖链末端处于一种接近饱和的状态,并且是哺乳动物糖型^[10]。

通过对人促红素单糖残基组成有效性的分析,我们可以得到以下一些所分析人促红素单糖残基组合的特点:① 五糖核心为 2 个 N-乙酰葡萄糖胺残基和 3 个甘露糖残基,不完整的五糖核心暂不考虑。② O 糖核心为 1 个 N-乙酰半乳糖胺残基和 1 个半乳糖残基。③ 去除五糖核心和 O 糖核心后剩余 GG 残基数量与 GM 残基数量相等。④ 唾液酸残基数量可能不多于 14 个(可能为 3 条 N 糖链各有 4 个位置,加上 O 糖链 2 个位置,连续唾液酸形成链式结构未考虑)。⑤ O 糖链可能形成分叉结构。⑥ 1 个 N-乙酰葡萄糖胺残基和 1 个半乳糖残基组合形成的分支结构是以一个整体的方式接入糖链。⑦ 每条 N 糖链上应有 1 个岩藻糖残基,缺失形式不是一个很好的延伸模型。

本文在搜索数据库时,误差控制在 ± 1.5 Da 之内,也可适当放宽至接近 ± 2.0 Da,最好不要过于放宽,因为蛋白结构中的二硫键影响可以达到这个水平,至于由于 N 端一致性或 C 端一致性带来的影响可能较大,并且容易误判,因此在进行 cIEF-MS 完整糖蛋白分析时,需要先进行蛋白结构确证,以方便后期的原因排查。

从文中的 cIEF 结果来看,氨酰基受到周围微环境的影响会产生较大的变化,其结合强度可能与其

距离蛋白表面位置相关或是否暴露于周围环境相关,如果在完全暴露的情况下可以达到 0.12R,6~7 个结合强度就与一个唾液酸的解离强度相当^[11]。

从本研究看,可有饱和的 N-糖基化位点和 O-糖基化位点存在的可能,但需要以其他复杂糖基化形式存在为前提条件,这似乎不符合“最小耗能模式”原则^[12]。本方法侧重于对糖蛋白总体表征,因此更侧重于关注糖蛋白糖链加成方式和组成方式的合理性,并未过多关注其特殊组成方式。

糖链结构复杂,单糖残基组成分析可以为完整糖蛋白的糖链分析提供一个方法,勾勒出糖蛋白糖链结构的总体情况,为其表征提供了新的参考。

[参 考 文 献]

- [1] DONNELLY S. Why is erythropoietin made in the kidney? The kidney functions as a critimeter[J]. *Am J Kidney Dis*, 2001, 38(2): 415-425.
- [2] LEE JS, HA TK, LEE SJ, et al. Current state and perspectives on erythropoietin production [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 95(6): 1405-1416.
- [3] MOORE E, BELLOMO R. Erythropoietin (EPO) in acute kidney injury[J]. *Ann Intensive Care*, 2011, 1(1): 3.
- [4] WANG Q, YANG GL, WANG TX, et al. Characterization of intact glycopeptides reveals the impact of culture media on site-specific glycosylation of EPO-Fc fusion protein generated by CHO-GS cells[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2019, 116(9): 2303-2315.
- [5] GONG B, BURNINA I, STADHEIM TA, et al. Glycosylation characterization of recombinant human erythropoietin produced in glycoengineered *Pichia pastoris* by mass spectrometry[J]. *J Mass Spectrom*, 2013, 48(12): 1308-1317.
- [6] GHEZLOU M, MOKHTARI F, KALBASI A, et al. Aggregate forms of recombinant human erythropoietin with different charge profile substantially impact biological activities[J]. *J Pharm Sci*, 2020, 109(1): 277-283.
- [7] JIANG J, TIAN F, CAI Y, et al. Site-specific qualitative and quantitative analysis of the N- and O-glycoforms in recombinant human erythropoietin[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406(25): 6265-6274.
- [8] 韦薇. 解析重组糖蛋白激素的生物效价与质量控制[J]. *中国新药杂志*, 2015, 24(2): 139-142, 194.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2020年版. 三部. 北京:中国医药科技出版社,2020:594
- [10] EGRIE JC, BROWNE JK. Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP) [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2001, 16(Suppl 3): S3-S13.
- [11] 李响, 史新昌, 范文红, 等. 重组人促红素异构体唾液酸化程度分析[J]. *中国药学杂志*, 2018, 53(19): 1682-1686.
- [12] 史新昌, 李响, 于雷, 等. 重组白介素-15 融合蛋白成像毛细管等电聚焦电泳谱图分析[J]. *中国药学杂志*, 2020, 55(9): 745-754.

编辑:刘卓越/接受日期:2022-10-17