·实验研究·

重组 Arg^{34}-GLP-1[7-37]杂质的分离纯化及质谱解析

梁　涛,高　婷,李进军,赵　晨,葛　燕,李端华,王　辂
(成都大学四川抗菌素工业研究所,成都 610052)

[摘要]　**目的:** 对重组 Arg^{34}-胰高血糖素样肽-1(Arg^{34}-Glucagon-like Peptide-1[7-37],Arg^{34}-GLP-1[7-37])生产制备过程中的潜在杂质进行分离纯化和结构确证。**方法:** 将发酵后的料液进行高效液相色谱分析检测,利用离子交换色谱和制备液相纯化得到 Arg^{34}-GLP-1[7-37]纯品和杂质组分,使用纯品进行高温、酸碱等不同条件下的破坏实验,来探知杂质产生机理,利用 MALDI-TOF 质谱、蛋白质全序列测序等方式推断杂质的分子量与结构。**结果:** 经阴离子交换色谱及反相制备纯化后,Arg^{34}-GLP-1[7-37]的纯度可达 97.9%。分离出 3 种主要杂质并将其纯化至 91.4%,99.2% 和 96.7%。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry,MALDI-TOF)测试其$[M+H]^+$分子量分别为 1 033.544 6,2 744.239 7 和 3 112.447 5,通过破坏实验及 Arg^{34}-GLP-1[7-37]的氨基酸序列来推测杂质 1、杂质 3 与杂质 9 可能序列分别为 E-F-I-A-W-L-V-R, H-A-E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-K-E-F-I-A-W, H-A-E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-K-E-F-I-A-W-L-V-R。将纯化前后的成分进行比对,表明上述 3 个主要杂质是由发酵过程产生,通过极端条件处理这些杂质,其含量会显著增加。本研究解析的 3 个杂质结构及机理探究均为首次发表。**结论:** 由于重组 Arg^{34}-GLP-1[7-37]在高温、过酸过碱及氧化环境中不稳定,为防止纯化过程中主产物降解,应注意避免这些条件。本研究为胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide1,GLP-1)及其类似物的研究指出了一些应避免的误区。

[关键词]　杂质谱;重组 Arg^{34}-GLP-1[7-37];多肽纯化;高分辨质谱
[中图分类号] R917　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003－3734(2021)06－0562－07

Isolation, purification and mass spectral analysis of recombinant Arg^{34}-GLP-1 [7-37]

LIANG Tao, GAO Ting, LI Jin-jun, ZHAO Chen, GE Yan, LI Duan-hua, WANG Lu
(*Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, Chengdu University, Chengdu* 610052, *China*)

[**Abstract**]　**Objective**: To identify the potential impurities generated during manufacturing of recombinant Arg^{34}-GLP-1 [7-37]. **Methods**: After fermentation, the broth extract was analyzed by HPLC, then the main product Arg^{34}-GLP-1 [7-37] and impurities were separated and purified by ion exchange chromotography and preparative HPLC respectively. The main product was treated by extreme conditions such as high temperature, acid and alkali experiments in order to figure out how the impurities were generated. MALDI-TOF, protein sequencing and other methods were used to identify the structures of impurities. **Results**: The purity of the main product reached 97.9% after purification by anion exchange chromatography and preparation of liquid phase. Three main impurities were isolated and purified to 91.4%, 99.2%, and 96.7%. Their MWs of $[M+H]^+$ were 1 033.544 6, 2 744.239 7,

[基金项目]　四川省科学技术厅国际合作资助项目(20GJHZ0211);成都市科技局基金资助项目(2016-XT00-00023-GX);国际科技创新合作资助项目(2020YFH0013)
[作者简介]　梁涛,男,硕士研究生,主要从事蛋白与多肽类药物分离纯化研究。联系电话:(028)84216031,E-mail:1369327437@qq.com。
[通讯作者]　王辂,男,副研究员,主要从事多肽与生物技术药物研究。联系电话:(028)84216031,E-mail:wanglu@cdu.edu.cn。

and 3 112.447 5 as determined by MALDI-TOF. Through the destructive test and the amino acid sequences of Arg^{34}-GLP-1 [7-37] it was speculated that the possible sequences of impurity 1, impurity 3, and impurity 9 may be E-F-I-A-W-L-V-R, H-A-E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-K-E-F-I-A-W, H-A-E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-K-E-F-I-A-W-L-V-R. Comparison of the components before and after purification showed that the above three main impurities were generated by the fermentation process, and the contents of these impurities would increase significantly by extreme conditions. The structure analysis and mechanism investigation of the three impurities analyzed in this study were all published for the first time. **Conclusion**: Since recombinant Arg^{34}-GLP-1 [7-37] is unstable in high temperature, peracid and alkali, and oxidizing environments, care should be taken to avoid these conditions in order to prevent degradation of the main product during purification. This paper shows some pitfalls to avoid for the research of GLP-1 and its analogs peptides.

[**Key words**] impurity profile; recombinant Arg^{34}-GLP-1 [7-37]; peptide purification; high resolution mass spectrometry

GLP-1 是含有 31 个氨基酸的多肽类激素，其发现始于 1971 年肠促胰素效应的提出。研究表明，GLP-1 可以通过促进胰岛素分泌等机制来调节血糖，还可以抑制 β 细胞凋亡与胰高血糖素分泌[1]，因其在人体内易被降解失活，所以其半衰期极短。以 GLP-1 为中间体，通过结构修饰、氨基酸序列改造等方式以延长半衰期，出现了利拉鲁肽、阿必鲁肽与杜拉鲁肽等药物，在糖尿病治疗领域应用广泛，一般与双胍类或磺脲类药物联合使用，效果显著且为首选药物[1]。Arg^{34}-GLP-1[7-37]是利拉鲁肽的中间体，此药物的原研企业诺和诺德公司已经在国内上市，但国内仿制药还未获得上市批件[2]，对于其中间体 Arg^{34}-GLP-1[7-37]的杂质，特别是对于单个杂质的结构及归属更是极少有文献报道。

本研究以本实验室发酵获得的重组 Arg^{34}-GLP-1[7-37]粗品为对象，以高效液相色谱法为检测分析手段[3]，通过离子交换色谱及反相制备液相进行纯化[4-5]，由于在原研企业与国内仿制工艺中，都采用离子交换色谱作为重组 Arg^{34}-GLP-1[7-37]的初步纯化手段，所以本研究以离子交换后的样品为对象进行杂质谱研究。制备后的 Arg^{34}-GLP-1[7-37] 纯品进行不同条件下的破坏实验探索杂质产生机理，将制备获得的杂质纯品进行基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱测试分子量，推测杂质一级结构，然后将含量最高的杂质进行氨基酸全序列测序，验证高分辨质谱所推测的结构序列。本研究对重组 Arg^{34}-GLP-1[7-37]及其杂质进行了纯化及检测，首次阐明了 3 种主要杂质的可能氨基酸序列。

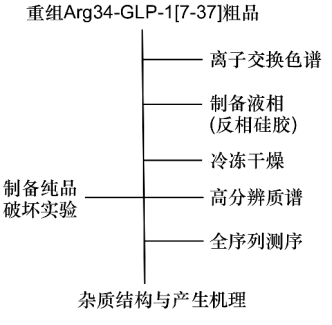


图 1 重组 Arg^{34}-GLP-1[7-37]杂质研究流程

材　　料

1 试药和试剂

重组 Arg^{34}-GLP-1[7-37]粗品（成都大学四川抗菌素工业研究所生物技术与酶工程制药课题组）；乙腈（Fisher Scientific 公司，色谱纯）；三氟乙酸（成都科龙化工试剂厂，分析纯），盐酸（四川科隆化学品有限公司，分析纯）；氢氧化钠（四川科隆化学品有限公司，分析纯）；Tris（生工生物工程股份有限公司，分析纯）；氯化钠（四川科隆化学品有限公司，分析纯）；巯基乙醇（成都科龙化工试剂厂，分析纯）；双氧水（成都科龙化工试剂厂，分析纯）。

2 仪器

LC－2010A 岛津高效液相色谱仪（日本岛津公司）；Direct-Q3-Millipor 纯水仪（德国 Merck 公司）；DF－101S 集热式恒温加热磁力搅拌器（郑州汇成科工贸有限公司）；AX204 电子天平（美国 METTLER 公司）；冷冻干燥机（北京博医康实验仪器有限公司）；5800 MALDI-TOF/TOF（美国爱博才思公司，AB SCIEX）。

方法与结果

1 重组 Arg^{34}-GLP-1[7-37]杂质分析

1.1 高效液相色谱(high performance liquid chromatography,HPLC)分析方法 称取 0.121 g Tris 溶于 100 mL 的超纯水中配制成 10 mmol·L^{-1} Tris 缓冲溶液。称取冻干后重组 Arg^{34}-GLP-1[7-37]粗品 5 mg 溶于 1 mL 缓冲溶液,溶解后过 0.45 μm 滤膜,用于 HPLC 检测。

采用 SWELL-Ultimate-XB-C4 色谱柱(250 mm × 4.6 mm,5 μm);流动相体系为 A:超纯水 + 0.1% TFA,B 相:80% 乙腈 + 0.1% TFA;阶梯梯度程序:(0 ~ 10 min,B 20% ~ 43%;10 ~ 20 min,B 43%;20 ~ 23 min,B 43% ~ 52%;23 ~ 33min,B 52%;33 ~ 40 min,B 52% ~ 80%;40 ~ 45 min,B 20%);流速:1 mL·min^{-1};紫外检测波长:220 nm;柱温:30 ℃;进样量:5 μL。

1.2 离子交换纯化方法 称取冻干后重组 Arg^{34}-GLP-1[7-37]粗品 1 g 溶于 200 mL 的 10 mmol·L^{-1} Tris 缓冲溶液中,完全溶解后用于离子交换色谱纯化。

采用填料为博格隆的阴离子交换树脂填料 Diamond MIX-A,离子柱装填规格:(直径:2.5 cm,柱高:6 cm,体积:30 mL);流动相:(A 相:10 mmol·L^{-1} Tris, pH 8.01;B 相:10 mmol·L^{-1} Tris, 500 mmol·L^{-1} NaCl,pH 8.05);以柱体积为单位进行梯度洗脱:(B 0%,8CV;B 10%,2CV;B 20%,3CV;B 32%,5CV;B 50%,2CV;B 75%,2CV;B 100%,4CV);流速:5 mL·min^{-1};进样量:5 mL。

依据离子交换方法收集 32% 的 B 相洗脱的样品,然后用 1 mol·L^{-1} HCl 调节 pH 至 4.8 沉淀,转速 5 000 r·min^{-1} 离心 5 min,最后取少量沉淀用 10 mmol·L^{-1} Tris 缓冲溶液溶解进行 HPLC 杂质谱方法检测,选择杂质较多组分图谱为杂质谱,纯度较高组分进行反相制备。

1.3 重组 Arg^{34}-GLP-1[7-37]杂质谱 重组 Arg^{34}-GLP-1[7-37]粗品的 HPLC 色谱图,见图 2。经高效液相色谱分析检测,粗品重组 Arg^{34}-GLP-1[7-37]的纯度为 58.9%,检测到的杂质峰数目为 17 个。

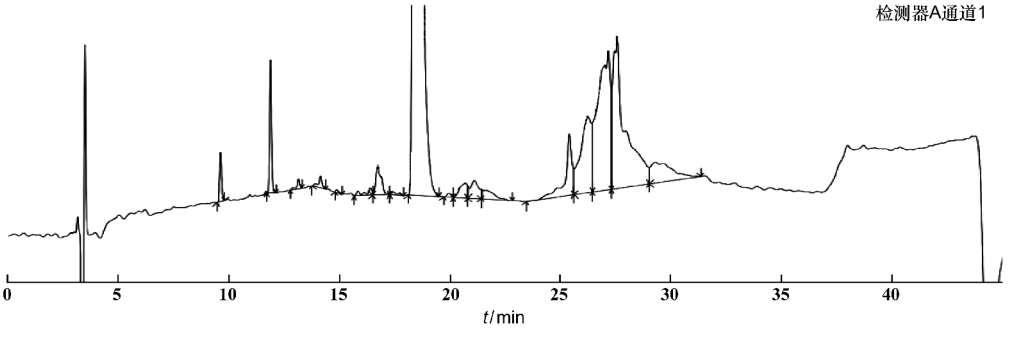


图 2 重组 Arg^{34}-GLP-1[7-37]粗品的 HPLC 色谱图

根据离子交换方法进行纯化,上样样品纯度为 58.9%,上样量为 5 mL,重复多次上样累积样品。纯化后收样所得纯度较低组分为图 3,其质量为 0.286 g,收率为 38.7%,纯度为 79.9%,以此为杂质谱。通过离子交换收集了纯度较高组分质量为 0.384 g,收率为 58.1%,纯度达到了 89.3%,用于下一步的反相制备纯化。

进行 HPLC 检测获得了其杂质谱,结果如图 3,纯化后杂质峰数目为 16 个,将其编号并进行归属见表 1,其中含量最高的是杂质 9。

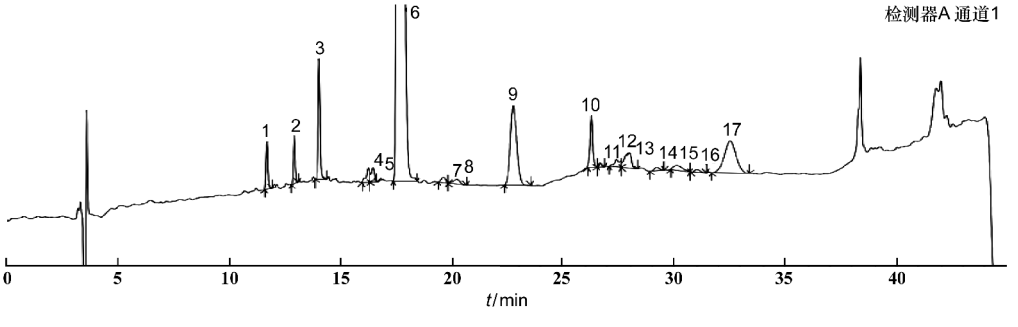


图 3 重组 Arg^{34}-GLP-1[7-37]经离子交换后的 HPLC 杂质谱

表 1 重组 Arg^{34}-GLP-1[7-37]杂质归属

杂质编号	保留时间/min	含量/%	杂质分类
1	11.669	0.975	亲水性杂质
2	12.904	0.979	亲水性杂质
3	14.013	2.542	亲水性杂质
4	16.240	0.601	亲水性杂质
5	16.443	0.487	亲水性杂质
6	17.582	79.837	重组 Arg^{34}-GLP-1[7-37]
7	19.616	0.303	疏水性杂质
8	20.218	0.338	疏水性杂质
9	22.753	5.617	疏水性杂质
10	26.272	1.563	疏水性杂质
11	26.655	0.153	疏水性杂质
12	27.400	0.485	疏水性杂质
13	27.994	1.117	疏水性杂质
14	29.213	0.180	疏水性杂质
15	30.099	0.513	疏水性杂质
16	31.023	0.172	疏水性杂质
17	32.517	4.137	疏水性杂质

2 重组 Arg^{34}-GLP-1[7-37]杂质制备

2.1 液相制备方法 称取离子交换后纯度较高组分沉淀 0.15 g,溶于 30 mL 10 mmol·L^{-1} Tris 缓冲溶液中,搅拌溶解,过 0.45 μm 滤膜,用于反相制备。

采用 hplcone 色谱柱(250 mm × 20 mm,5 μm,300A);流动相体系:(A:超纯水 + 0.1% TFA;B 相:乙腈 + 0.1% TFA);梯度洗脱程序:(0 ~ 15 min,B 35%;15 ~ 30 min,B 35% ~ 39%;30 ~ 43 min,B 39%;43 ~ 58 min,B 39% ~ 68%;58 ~ 70 min,B 100%);流速:10 mL·min^{-1};紫外检测波长:220 nm;柱温:30 ℃;进样量:1 mL。

收集各峰,减压旋转蒸发去除有机溶剂后冻干,取少量冻干后样品用 10 mmol·L^{-1} Tris 缓冲溶液溶解冻干后样品进行 HPLC 杂质谱方法检测,纯度合格的杂质样品进行质谱检测,含量最多的杂质进行氨基酸全序列测序。

2.2 杂质制备结果 重组 Arg^{34}-GLP-1[7-37]反相制备图谱,见图 4。依据反相制备方法进行纯化,分别收集保留时间为 10,12,28 和 38 min 的色谱峰,累积后进行旋蒸浓缩及冷冻干燥。其中,收集保留时间为 51 min 的峰进行 HPLC 检测,结果表明它是多个疏水性杂质的混合物,且经过尝试,反相色谱柱很难将其中各杂质分开。根据 HPLC 方法检测制备后的冻干样品,对比 HPLC 图谱,可以确定得到的 3 种杂质为杂质 1、杂质 3 及杂质 9,纯度分别为 91.4%,99.2%,96.7%,冷冻干燥后所得杂质质量为 0.84,2.28,13.66 mg,纯品重组 Arg^{34}-GLP-1[7-37]用于破坏实验探索杂质产生机理,3 种杂质进行基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry,MALDI-TOF/TOF)检测。

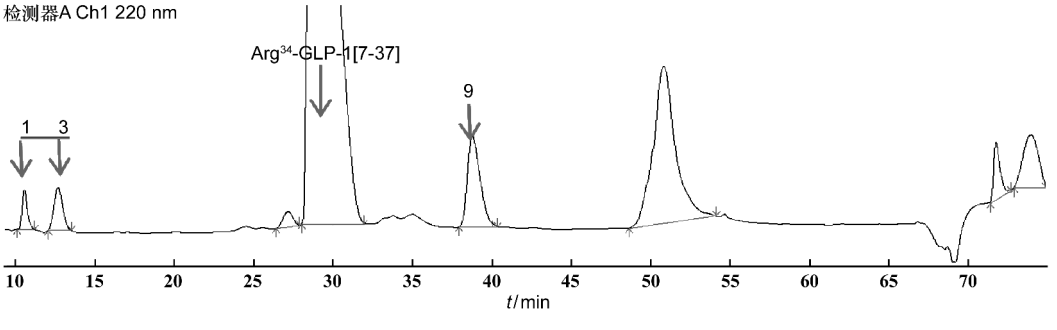


图 4 重组 Arg^{34}-GLP-1[7-37]反相制备图谱

3 重组 Arg^{34}-GLP-1[7-37]杂质鉴定

3.1 杂质 9 的质谱测试与氨基酸测序 制备的杂质 9 进行 MALDI-TOF/TOF 测试,委托上海中科新生命生物科技有限公司,结果见图 5。

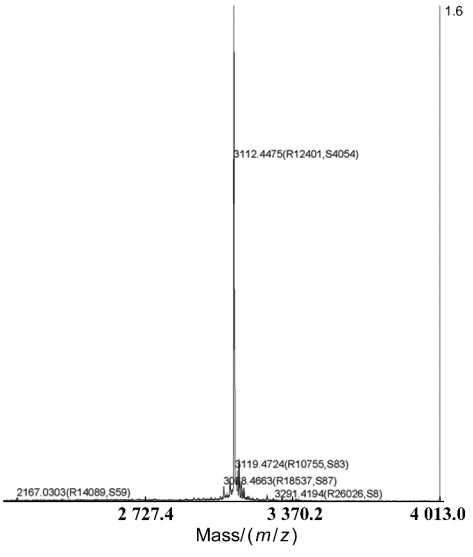


图 5 杂质 9 的 MALDI-TOF/TOF 图谱

测得杂质 9 的单同位素相对分子量[M + H]$^+$为:3 112.447 5,推测其结构序列为 H-A-E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-K-E-F-I-A-W-L-V-R, 序列理论分子量为 3 111.530 2,误差为 26.58 ppm,高分辨质谱测得分子量与理论分子量基本一致。

杂质 9 进行 MALDI-TOF/TOF 测序,确证该杂质序列为: H-A-E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-K-E-F-I-A-W-L-V-R,验证了高分辨质谱测试结果。

3.2 杂质 1 与杂质 3 的 MALDI-TOF/TOF 测试

杂质 1 的 MALDI-TOF/TOF 测试见图 6。

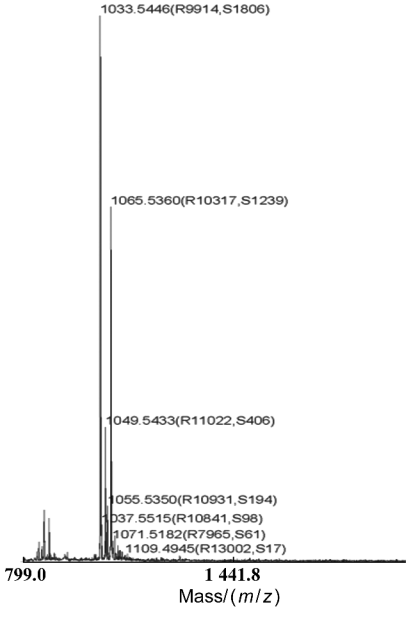


图 6 杂质 1 的 MALDI-TOF/TOF 图谱

测得杂质 1 的单同位素相对分子量[M + H]$^+$为:1 033.544 6,推测其结构序列为 E-F-I-A-W-L-V-R。序列理论分子量为 1 032.575 7,误差为 30.13 ppm,高分辨质谱测得分子量与理论分子量基本一致。

杂质 3 的 MALDI-TOF/TOF 测试见图 7。

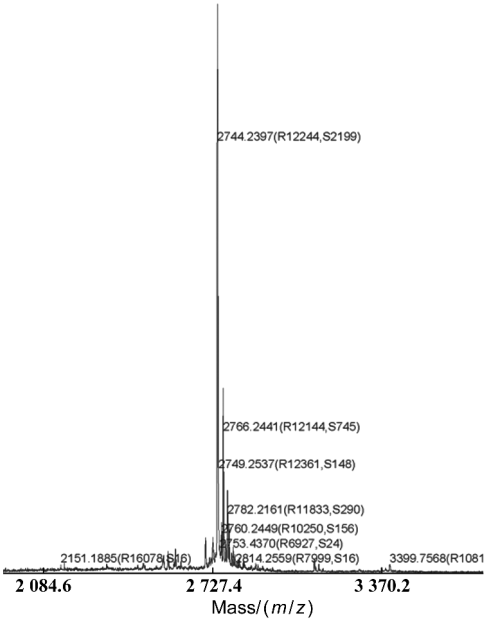


图 7 杂质 3 的 MALDI-TOF/TOF 图谱

测得杂质 3 的单同位素相对分子量[M + H]$^+$:2 744.239 7,推测其结构序列为 H-A-E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-K-E-F-I-A-W。序列理论分子量为 2 743.276 6,误差为 13.45 ppm,高分辨质谱测得分子量与理论分子量基本一致。

4 破坏试验

反相制备及冷冻干燥后获得了重组 Arg^{34}-GLP-1[7-37]冻干纯品,其纯度为 97.9%,质量为 557.25 mg。取纯品 5 mg,溶于 10 mL 10 mmol·L^{-1} Tris 缓冲液中,取 5 支离心管,等量分装后,进行以下破坏实验[6-7]。

4.1 碱破坏 取 0.05 mL 2 mol·L^{-1} NaOH 溶液加入离心管中,振荡后静置 5 h 取出进行 HPLC 检测。

4.2 酸破坏 取 0.05 mL 2 mol·L^{-1} HCl 加入离心管中,振荡后静置 5 h 取出进行 HPLC 检测。酸碱破坏后的图谱见图 8。

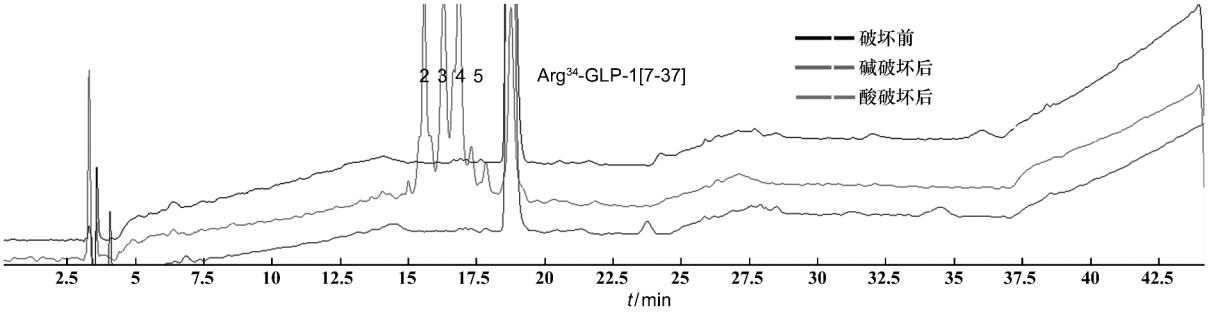


图 8 纯品 Arg^{34}-GLP-1[7-37]经酸碱破坏后的 HPLC 图谱

4.3 高温破坏 将离心管置于恒温 95 ℃水浴锅内,5 h 后取出取样进行 HPLC 检测,结果见图 9。

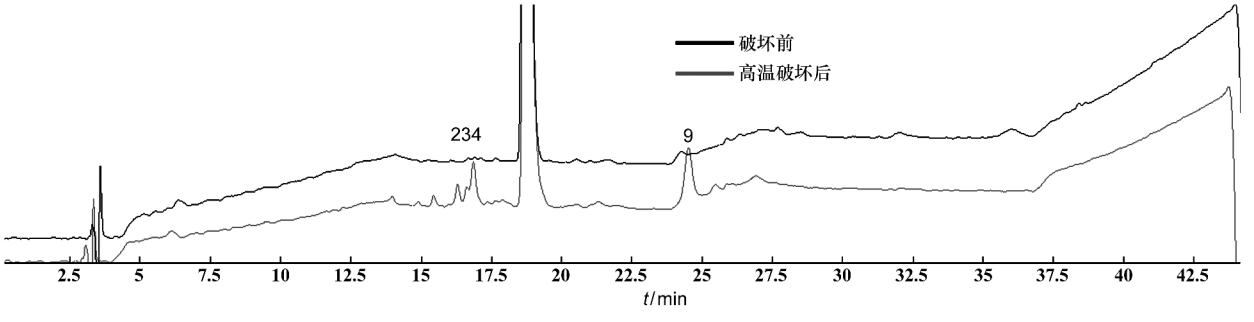


图 9 纯品 Arg^{34}-GLP-1[7-37]经高温破坏后的 HPLC 图谱

4.4 氧化破坏 取 0.05 mL H_2O_2 溶液加入离心管中,振荡后静置 5 h 取出进行 HPLC 检测。

4.5 还原破坏 取巯基乙醇 0.05 mL 加入离心管中,振荡后静置 5 h 取出进行 HPLC 检测。氧化还原破坏后的图谱见图 10。将破坏后 HPLC 图谱与杂质谱进行对比,判断杂质产生机理。

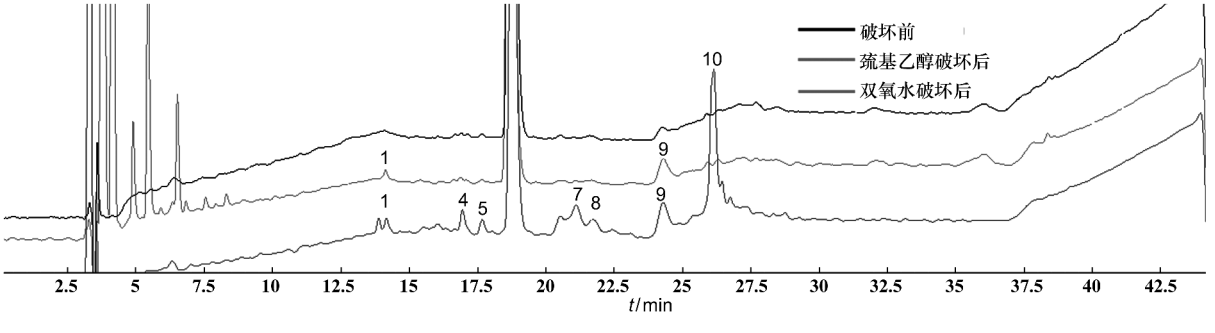


图 10 纯品 Arg^{34}-GLP-1[7-37]经氧化还原破坏后的 HPLC 图谱

将 Arg^{34}-GLP-1[7-37]纯品经破坏后的图谱与杂质谱进行比对:① 高温破坏后杂质 2、杂质 4 含量增加,杂质 3、杂质 9 含量显著增加。② 酸破坏杂质无明显变化,碱破坏后 Arg^{34}-GLP-1[7-37]含量显著下降,杂质 2、杂质 3、杂质 4 含量显著增加,杂质 5 含量增加,说明杂质 2、杂质 3、杂质 4、杂质 5 可能为主峰降解杂质。③ 经 H_2O_2 氧化后杂质 10 的含量增加明显,杂质 1、杂质 4、杂质 5、杂质 7、杂质 8、杂质 9 含量稍有增加,巯基乙醇还原后,杂质 1、杂质 9 含量增加,且产生了一些亲水性杂质。由此判断出杂质谱中杂质主要是在高温、碱性和氧化环境中产生的。

讨　论

本试验从重组 Arg^{34}-GLP-1[7-37]粗品开始,以HPLC方法为检测手段,获得了粗品的杂质图谱。对离子交换纯度较低组分进行检测获得了杂质数目为16的杂质谱。离子交换所得纯度较高组分进行了反相制备,得到重组 Arg^{34}-GLP-1[7-37]纯度为97.9%,杂质1、杂质3及杂质9纯度分别为91.4%,99.2%,96.7%,冻干后所得质量为0.84,2.28,13.66 mg,杂质单体浓缩冻干后进行MALDI-TOF质谱确定其分子量,结合 Arg^{34}-GLP-1[7-37]的分子量和氨基酸序列,推导出3种杂质的可能结构序列。杂质9进行氨基酸全序列测序验证了高分辨质谱所推导的序列结构无误。杂质产生机理的探索实验表明,杂质1、杂质3及杂质9均为 Arg^{34}-GLP-1[7-37]的降解片段。氧化破坏会出现杂质1,高温和氧化条件都会使得杂质9含量升高,但高温条件下增加更为明显。高温和碱性条件都会让杂质3含量增加,但高温环境下增加更为明显。高温、氧化及碱破坏会产生较多杂质,氧化破坏产生的杂质最多,碱破坏后 Arg^{34}-GLP-1[7-37]含量显著下降,杂质2、杂质3、杂质4含量显著增加,杂质5含量增加,说明杂质2、杂质3、杂质4、杂质5可能为主峰降解杂质。综上所述,本课题建议,在 Arg^{34}-GLP-1[7-37]生产过程中,为防止纯化过程中主产物降解,应控制适宜温度,避免过酸过碱及一些易被氧化的条件。本研究解析的3个杂质的分离制备及结构解析均为首次发表,为重组 Arg^{34}-GLP-1[7-37]生产过程中杂质的控制和规避提供参考,也为其储存条件提供了建议。

[参 考 文 献]

[1] 陆珣靓,李成江. GLP-1的生理作用及其机制研究进展[J]. 浙江医学,2011,33(1):137-140.

[2] 吴婷婷,李小兵,张兰青. GLP-1受体激动剂联合阿卡波糖治疗T2DM临床效果及其影响[J]. 浙江临床医学,2018,20(4):626-628.

[3] 王小平, 容蓉, 田景振. 多肽类药物分析方法的研究进展[J]. 食品与药品, 2009, 11(9): 55-58.

[4] FARILLA L, BULOTTA A, HIRSHBERG B, *et al*. Glucagon-like peptide 1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets[J]. *Endocrinology*, 2003, 144(12): 5149-5158.

[5] SANZNEBOT V, BENAVENTE F, TORO I, *et al*. Separation and characterization of complex crude mixtures produced in the synthesis of therapeutic peptide hormones by liquid chromatography coupled to electrospray mass spectrometry (LC-ES-MS)[J]. *Anal Chimica Acta*, 2004, 521(1): 25-36.

[6] 井绪文, 吴优, 李柏林, 等. 高效液相色谱法测定扎那米韦鼻用粉雾剂含量和相关杂质的研究[J]. 中国新药杂志, 2018, 27(20): 2447-2450.

[7] 周冠月. 清开灵注射液中多肽含量的快速测定及杂质蛋白的限量检查[D]. 北京: 北京中医药大学, 2011.

[8] D'HONDT M, BRACKE N, TAEVERNIER L, *et al*. Related impurities in peptide medicines[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 101: 2-30.

编辑:刘卓越/接受日期:2020-03-24