

# 罕见病酶替代疗法药物重组人 $\alpha$ -半乳糖苷酶 A 酶活性测定方法研究

王绿音, 张孝明, 李晶\*, 梁成罡\* (中国食品药品检定研究院激素室, 国家药品监督管理局生物制品质量研究与评价重点实验室, 国家药品监督管理局化学药品质量研究与评价重点实验室, 北京 102629)

**摘要:**目的 基于酶反应动力学理论对重组人 $\alpha$ -半乳糖苷酶 A (recombinant human  $\alpha$ -galactosidase A, rh $\alpha$ -GAL) 酶活性测定反应条件进行系统研究, 建立更灵敏简便、准确稳定的 rh $\alpha$ -GAL 酶活性测定方法。方法 优化反应体系后的最适条件为: 以  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  对硝基苯基- $\alpha$ -D-吡喃半乳糖苷的为底物, 酶质量浓度为  $1.67 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴准确反应 15 min 后, 加入甘氨酸缓冲液 (pH10.5) 终止反应, 采用酶标仪在 400 nm 波长处测定产物对硝基苯酚的光密度值。结果 该方法专属性良好, rh $\alpha$ -GAL 在  $(0.83 \sim 2.51 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1})$  ( $r=0.9998$ ) 质量浓度范围内与酶促反应速率呈良好的线性关系; rh $\alpha$ -GAL 在 50%、80%、100%、125% 及 150% 浓度水平验证溶液的回收率在 94.2% ~ 101.8% 范围内 ( $n=18$ ), 测定结果的变异系数 (CV) 在 2.0% ~ 5.5% ( $n=18$ ); 同一份供试品溶液的 12 次独立测定结果的 CV 为 2.21%; 考察反应体系中的水浴温度、反应时间和底物浓度微小变化对测定结果的影响, 结果表明方法的耐用性较好; 复溶后的样品于  $2 \sim 8 \text{ }^\circ\text{C}$  存放 48 h 稳定性较好; 水解产物对硝基苯酚在  $(0.01 \sim 0.15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1})$  ( $r=0.9997$ ) 范围内与光密度呈良好的线性关系, 5 个浓度水平的回收率在 94.9% ~ 105.1% 之间 ( $n=9$ ), CV 均小于 2% ( $n=9$ ); 采用该法分析 2 个已上市产品的酶活性。结论 建立了生色底物法测定 rh $\alpha$ -GAL 的酶活性, 该方法灵敏度高、精密度及准确度较好, 可用于 rh $\alpha$ -GAL 产品的酶活性评价和质量控制。

**关键词:** 罕见病用药; 酶替代疗法; 重组人 $\alpha$ -半乳糖苷酶 A; 酶活性测定; 生色底物法; 方法验证

doi:10.11669/cpj.2024.08.010 中图分类号:R917 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)08-0738-07

## Activity Assay of Recombinant Human $\alpha$ -Galactosidase A for Enzyme Replacement Therapy of Rare Diseases

WANG Lüyin, ZHANG Xiaoming, LI Jing\*, LIANG Chenggang\* (NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Biological Products, NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Chemical Drugs, Division of Hormone, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish a more sensitive, simple, accurate and stable method for determining the activity of recombinant human  $\alpha$ -galactosidase A (rh $\alpha$ -GAL) based on the kinetic theory of enzyme reaction and study the assay conditions for the activity assay. **METHODS** The optimum conditions of the assay system were as follows:  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside was used as the substrate, the concentration of the enzyme was  $1.67 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , the reaction was accurately carried out in a water bath at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  for 15 min, then the reaction was terminated by glycine buffer (pH 10.5), and the absorbance was measured at 400 nm using a microplate reader. **RESULTS** The method had good specificity. Rh $\alpha$ -GAL showed a good linear relationship with the enzymatic reaction rate in the range of  $0.83 \sim 2.51 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $r=0.9998$ ). The recoveries of validation solutions at 50%, 80%, 100%, 125% and 150% concentrations were in the range of 94.2% - 101.8% ( $n=18$ ), and the CVs of the measured results were between 2.0% and 5.5% ( $n=18$ ). The CV of 12 independent tests of the same sample was 2.21% ( $n=12$ ). The effects of slight changes in water bath temperature, reaction time and substrate concentration in the reaction system on the results were investigated, confirming the good robustness of the method. The reconstituted sample showed good stability when stored at  $2 \sim 8 \text{ }^\circ\text{C}$  for 48 h. *p*-Nitrophenol showed a good linear relationship with the absorbance in the range of  $0.01 \sim 0.15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $r=0.9997$ ). The recoveries of *p*-nitrophenol solution at five concentrations were in the range of 94.9% - 105.1% ( $n=9$ ), and the CVs were all below 2.0% ( $n=9$ ). The activity of two rh $\alpha$ -GAL products was determined by this method. **CONCLUSION** A chromogenic substrate method was established to determine the activity of rh $\alpha$ -GAL and validated with good sensitivity, precision and accuracy, which can be used for the activity evaluation and quality control of the product.

**KEY WORDS:** rare disease product; enzyme replacement therapy; rh $\alpha$ -GAL; activity assay; chromogenic substrates assay; method validation

作者简介:王绿音,女,硕士,助理研究员 研究方向:激素类药物质量控制研究 \*通讯作者:梁成罡,男,研究员 研究方向:激素类药物质量控制研究 Tel:(010)67095380;李晶,女,主任药师 研究方向:激素类药物质量控制研究 Tel:(010)53851638

罕见病用药是用于治疗、诊断、预防罕见疾病的药品,这类疾病具有发病率低、诊断难度大、治疗可及性差的特点<sup>[1]</sup>。溶酶体贮积症(lysosomal storage disorders, LSD)是一种与遗传因素密切相关的代谢性罕见病,由于溶酶体内的酶、转运蛋白或酶修饰剂等缺陷致使代谢物无法被有效降解而在溶酶体中过度贮积,引发进行性的多器官多系统病变<sup>[2-3]</sup>。法布里病是一种位于 X 染色体上编码  $\alpha$ -半乳糖苷酶 A 基因突变导致的遗传性溶酶体贮积症,已被列入中国首批罕见病目录,酶替代疗法(enzyme replacement therapy, ERT)是目前公认最有效的治疗手段<sup>[4-5]</sup>,患者需持续终生用药。注射用阿加糖酶  $\beta$ (fabrazyme, 法布赞)和阿加糖酶  $\alpha$  注射用浓溶液(replagal, 瑞普佳)分别于 2019 年和 2020 年在我国获准上市,目前尚无国产药物上市<sup>[6]</sup>。上述两个产品均系利用重组 DNA 技术生产的重组人  $\alpha$ -半乳糖苷酶 A(recombinant human  $\alpha$ -galactosidase A, rh $\alpha$ -GAL),这是一种能够特异性催化  $\alpha$ -半乳糖从中性糖鞘脂(neutral glycosphingolipid)分子上水解的人溶酶体酸性水解酶。这种以  $\alpha$ -半乳糖为末端的中性糖鞘脂主要是酰基鞘氨醇三己糖苷(globotriaosylceramide, GL-3),还包括半乳糖神经酰胺(galabiosylceramide)等<sup>[7-8]</sup>。

rh $\alpha$ -GAL(EC 3.2.1.22)是一种相对分子质量约为  $1 \times 10^5$  的同源二聚体糖蛋白,由 2 个相对分子质量约为  $5 \times 10^4$  的亚基组成,每个亚基含 398 个氨基酸。成熟的 rh $\alpha$ -GAL 通过切除信号肽,随后在 4 个 N-连接糖基化位点引入糖链,进行翻译后糖基化修饰,通过甘露糖-6-磷酸(M6P)受体介导的路径靶向进入溶酶体<sup>[9]</sup>。作为一个结构复杂的糖基化修饰重组蛋白酶,酶活性是反映此类产品有效性的关键质量属性,研究建立特异性强、快速简便、准确稳定的酶活性测定方法对于产品的质量控制在至关重要。目前,已上市产品采用可以被 rh $\alpha$ -GAL 催化水解的合成底物来测定其酶活性,分别为荧光底物 4-甲基伞形酮基- $\alpha$ -D-吡喃半乳糖苷和生色底物对硝基苯基- $\alpha$ -D-吡喃半乳糖苷,通过定量酶解底物产生的荧光分子 4-甲基伞形酮或发色基团对硝基苯酚检测酶活性。荧光底物法利用荧光分光光度计依次测定配制的标准曲线溶液和酶底物反应溶液中 4-甲基伞形酮的荧光值,由于 4-甲基伞形酮的荧光衰减较快,不够稳定,方法的准确性有待提高。与荧光底物法相比,生色底物法检测时间更短,产物对硝基苯酚也更稳定。但该方法采用外标法测定样品反

应液中的对硝基苯酚,依赖于经标化的对硝基苯酚标准品,为充分溶解底物,在稀释溶液中加入乙醇,这不仅会影响酶促反应速率,其挥发性还会导致方法精密度变差。因此,有必要对现有的酶活性测定方法进行优化,进一步提高方法的灵敏度、准确度和精密度。

本研究以酶反应动力学理论为指导,对生色底物法酶活性测定体系中的底物浓度、酶量、缓冲液的 pH 值、反应时间进行了优化,利用对硝基苯酚在 400 nm 波长下的摩尔消光系数对该物质进行定量,建立了更灵敏、快速简便、准确稳定的 rh $\alpha$ -GAL 酶活性测定方法,并按照国际人用药品注册技术协调会-分析方法验证(ICHQ2)进行了方法学研究。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司,型号: SpectraMax M5e); 恒温水浴锅(美国 Thermo Scientific 公司,型号: HAAKE S30); 电子天平(METTLER TOLEDO 公司,型号: AG245); 超纯水机(美国 Millipore 公司,型号: Milli-Q IQ7000)。

### 1.2 试剂

rh $\alpha$ -GAL 产品(企业 A, 科室留样, 批号: DW0305, DW0306, DW0283, 每瓶 5 mg); rh $\alpha$ -GAL 产品(企业 B, 科室留样, 批号: TRVL22A04, TRVJ18A01, TRVB04A06, 每瓶 3.5 mg, 3.5 mL); 对硝基苯基- $\alpha$ -D-吡喃半乳糖苷、对硝基苯酚、柠檬酸一水合物、无水磷酸氢二钠、甘氨酸、氢氧化钠、牛血清白蛋白、氯化钠(美国 Sigma 公司)分析纯; 实验用水为纯化水。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液制备

**2.1.1 稀释缓冲液** 称取枸橼酸一水合物 4.15 g, 无水磷酸氢二钠 4.30 g, 加水 900 mL, 加入 5% 牛血清白蛋白溶液 20 mL, 混匀后测定溶液的 pH 值, 如有必要, 以  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  枸橼酸溶液或  $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液调节 pH 值至 5.00, 加水稀释至 1 000 mL。以稀释缓冲液作为空白溶液。

**2.1.2 底物溶液** 称取对硝基苯基- $\alpha$ -D-吡喃半乳糖苷 15.00 g, 加入稀释缓冲液 1 000 mL, 于室温下搅拌混匀 90 min 直至完全溶解, 制成每 1 L 含对硝基苯基- $\alpha$ -D-吡喃半乳糖苷 50 mmol 的底物溶液, 分装冻存于  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

**2.1.3 终止缓冲液** 称取甘氨酸 37.54 g,加水 900 mL 充分溶解,以  $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液调节 pH 值至 10.50,加水稀释至 1 000 mL。

**2.1.4 供试品溶液** 取 rh $\alpha$ -GAL,照说明书加注射用水复溶为每 1 mL 含 5 mg rh $\alpha$ -GAL 的溶液,采用稀释缓冲液,先连续进行 2 次 10 倍稀释,再稀释 30 倍,3 次共稀释 3 000 倍,即为每 1 mL 含 rh $\alpha$ -GAL 1.67 mg 的供试品溶液。

## 2.2 测定方法

于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴中避光解冻底物溶液,直至所有固体完全溶解,将底物溶液置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  保温(不超过 5 h)。取稀释缓冲液 500  $\mu\text{L}$ ,加入终止缓冲液 500  $\mu\text{L}$ ,混匀后加入酶标仪配套的光程校正比色皿中,放入酶标仪的比色皿槽中,用于校正最终反应混合液在 96 孔板中的液面光程。

精密量取底物溶液 225  $\mu\text{L}$  于 1.2 mL 微管中,置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  保温 5 min。用排枪加入供试品和空白溶液各 25  $\mu\text{L}$ ,立即计时,于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  准确反应 15 min,加入终止缓冲液 250  $\mu\text{L}$ 。混匀后取上述各反应混合溶液 200  $\mu\text{L}$  于透明 96 孔板中,打开酶标仪的光程路径校正,在 400 nm 波长下测定空白和供试品溶液的光密度。在上述条件下,定义每分钟水解底物产生  $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  对硝基苯酚所需要的酶量为 1 个酶活性单位 U,按公式 1 计算比活性:

$$\text{比活性} = \frac{\Delta\text{OD}_{400} \times \text{稀释倍数} \times 20}{\Delta t \times \varepsilon \times \rho} \quad \text{公式(1)}$$

式中比活性为每 1 mg rh $\alpha$ -GAL 的酶活性; $\Delta\text{OD}_{400}$  为供试品反应液与空白溶液光密度之差; $\Delta t$  为反应时间 15 min; $\varepsilon$  为摩尔消光系数  $18.3 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ; $\rho$  为酶质量浓度,约  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;20 为供试品溶液在反应体系中的稀释倍数。

## 2.3 方法优化

酶活性测定的本质就是以最大反应速率表征酶量,因此需要对酶促反应体系中的关键实验条件进行优化,使得反应速率趋近于最大反应速率。

**2.3.1 底物浓度** 取 rh $\alpha$ -GAL,照“2.2”项下方法测定其在底物浓度分别为 0.5、2.5、6.0、12.0、19.2、36.0、42.0、48.0  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时的酶活性。以底物浓度对比活性作图,得到 Michaelis-Menten 方程,计算酶动力学参数  $K_m$  和  $V_{max}$ , $K_m$  为  $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , $V_{max}$  为  $88 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。当底物浓度足够大时,反应速率趋近于最大反应速率,反应速率不受底物浓度影响,而与酶质量浓度成正比,见图 1。根据酶反应动力学理论,底物浓度通常选择  $5 \sim 10K_m$ ,本方法中为

$25 \sim 50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,同时还应综合考虑底物分子的溶解性<sup>[10]</sup>。原方法采用了更高浓度的底物溶液 ( $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),为了提高底物的溶解性,采用含乙醇的缓冲液进行配制,有机溶剂的加入不利于酶底物反应,其挥发性也会影响方法的精密度。本实验采用无有机溶剂的稀释缓冲液配制浓度为  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $10K_m$ ) 的底物溶液,可实现充分溶解。通过进一步优化反应体系中底物和酶的加入体积,最终反应体系中底物与酶的摩尔比高于原方法,更有助于消除底物浓度对酶活性测定的影响。综上,选择  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的底物浓度进行酶活性测定。

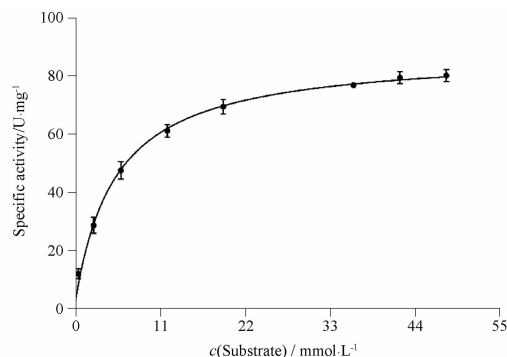
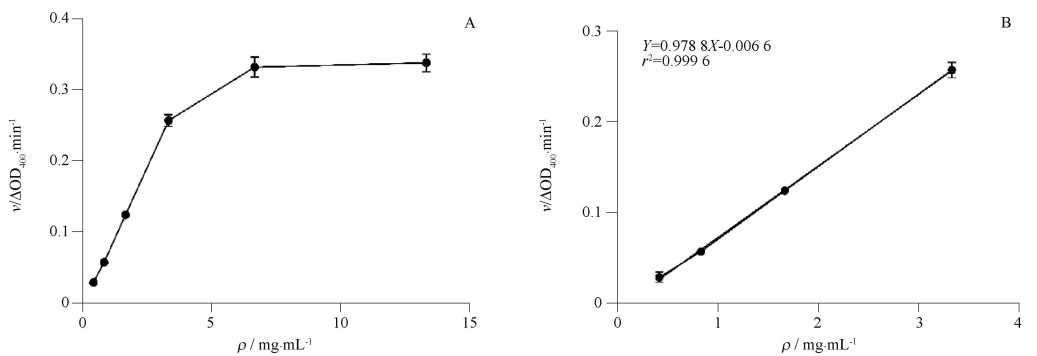


图1 底物浓度对酶促反应速率的影响(Michaelis-Menten 曲线).  $n=3, \bar{x} \pm s$

Fig.1 Effect of substrate concentration on reaction rate (Michaelis-Menten curve).  $n=3, \bar{x} \pm s$

**2.3.2 酶质量浓度** 按照“2.2”项下方法测定不同稀释倍数(12 000、6 000、3 000、1 500、750、375)对应的不同酶质量浓度(0.42、0.83、1.67、3.33、6.67、13.33  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )供试品溶液的酶促反应速率( $\Delta\text{OD}_{400} \cdot \text{min}^{-1}$ ),考察酶质量浓度与反应速率的关系。根据 Michaelis-Menten 方程,当酶质量浓度远小于底物浓度时,反应速率与酶质量浓度成正比,当反应体系达到酶饱和后,底物浓度的迅速下降会使得反应速率增加变慢。当加入的酶质量浓度在  $0.42 \sim 3.33 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,反应速率与酶质量浓度成线性增加;当加入的酶质量浓度大于  $3.33 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,反应速率增加幅度变小,不再与酶质量浓度成线性关系,见图 2。由此可见,应选择小于等于  $3.33 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的酶质量浓度。酶质量浓度为  $3.33 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,酶标仪测得的  $\text{OD}_{400}$  为 4.6 左右,超出了仪器的检测上限 4.0。而当酶质量浓度为  $1.67 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时  $\text{OD}_{400}$  读数为 2.8 左右,较好地处于仪器检测范围内,因此反应体系中加入的酶质量浓度应为  $1.67 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。



A - rhα-GAL 酶质量浓度 0.42 ~ 13.33 mg · mL<sup>-1</sup> 时的反应速率; B - rhα-GAL 酶质量浓度 0.42 ~ 3.33 mg · mL<sup>-1</sup> 时的反应速率。

A - the reaction rate when the concentration of rhα-GAL is 0.42 - 13.33 mg · mL<sup>-1</sup>; B - the reaction rate when the concentration of rhα-GAL is 0.42 - 3.33 mg · mL<sup>-1</sup>.

图2 重组人α-半乳糖苷酶 A (rhα-GAL) 在不同酶质量浓度下的反应速率.  $n=3, \bar{x} \pm s$

Fig. 2 Reaction rates of rhα-GAL under different enzyme concentrations.  $n=3, \bar{x} \pm s$

**2.3.3 反应时间** 取 rhα-GAL, 照“2.2”项下方法测定不同反应时间(2、5、10、15、20、30 min)的酶促反应速率( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ), 结果见图3。在反应时间 2 ~ 15 min 内, 反应速率较为恒定。随着酶催化反应的进行, 底物浓度不断降低, 反应速率越来越慢。反应时间超过 15 min 后, 反应速率开始下降。由于反应时间较短时, 测定误差较大, 本实验选择 15 min 作为反应时间进行酶活性测定。

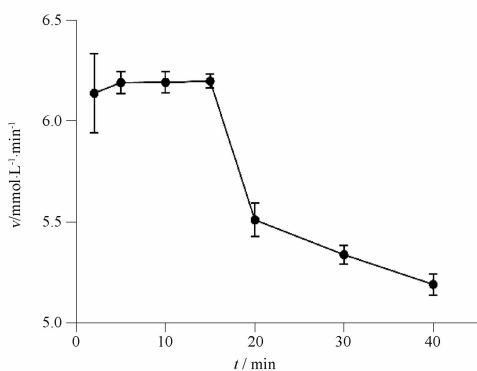


图3 rhα-GAL 在不同反应时间的反应速率.  $n=3, \bar{x} \pm s$

Fig. 3 Reaction rates of rhα-GAL under different reaction time.  $n=3, \bar{x} \pm s$

**2.3.4 稀释缓冲液的 pH 值** 影响酶促反应速率的因素, 除上述内因以外, 还包括反应 pH、离子强度、反应温度等。为考察不同 pH 值对反应速率的影响, 本实验采用不同 pH 值的稀释缓冲液制备供试品溶液。共配制 9 种不同 pH 值的稀释缓冲液, 分别为 3.0、4.0、4.3、4.5、5.0、5.5、7.0、8.0 和 9.0。稀释缓冲液 pH 值为 5.0 时, 反应速率最大, 酶的催化能力最强。pH 值小于 4 或大于 5.5 时, 偏离了最

适 pH 范围, 过酸或过碱导致酶失活, 酶促反应速率显著下降。以 5.0 为最适 pH 值, 也与 rhα-GAL 在人溶酶体 pH 为 5 的酸性环境中对底物进行水解的生物学功能相适应。见图 4。

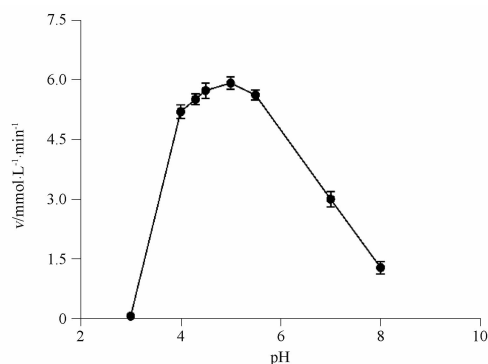


图4 rhα-GAL 在不同 pH 条件下的反应速率.  $n=3, \bar{x} \pm s$

Fig. 4 Reaction rates of rhα-GAL under different pH conditions.  $n=3, \bar{x} \pm s$

**2.3.5 反应温度和离子强度** 作为 ERT 治疗用产品, rhα-GAL 最终进入人体细胞的溶酶体中发挥其水解作用。为更接近人体生理温度, 选择 37 °C 作为方法的反应温度。在考察离子强度这一影响因素时, 尝试配制了 7 种磷酸钠浓度不同的稀释缓冲液, 分别为 5、10、20、30、40、50 和 60 mmol · L<sup>-1</sup>。结果表明, 磷酸钠浓度不同的稀释缓冲液测得的酶活性没有显著差异 (419.24、424.71、414.40、421.92、416.56、417.83、414.51 U · mL<sup>-1</sup>,  $P > 0.05$ )。

### 3 方法学验证

#### 3.1 专属性

以 rhα-GAL 制剂缓冲液作为辅料空白溶液、以

稀释缓冲液代替供试品溶液作为样品空白溶液,取 rh $\alpha$ -GAL 分别按“2.2”项下方法进行测定。辅料空白溶液、样品空白溶液和 rh $\alpha$ -GAL 的光密度平均值分别为 0.887、0.886、2.734,表明样品中的辅料基质对酶活性测定无干扰。

### 3.2 中间精密度

本验证考察不同实验人员、不同检测时间对方法中间精密度的影响,采用稀释缓冲液对 rh $\alpha$ -GAL 溶液(批号:DW0305)进行稀释,得到 5 个酶质量浓

度为 0.83、1.34、1.67、2.09、2.51 mg · mL<sup>-1</sup> 的待测溶液, rh $\alpha$ -GAL 浓度水平分别为 50%、80%、100%、125% 及 150%。由 2 名实验人员按“2.2”项下方法在 3 d 内进行酶活性测定,每天每人重复测定 3 次,每次以 2 份结果的均值为测定值,结果见表 1。5 个稀释水平测定值的平均值分别为:411.69、402.74、403.15、390.51、379.83; 变异系数(CV)分别为 2.00%、3.33%、3.42%、5.53%、5.51%,符合中间精密度的可接受标准( $\leq 15\%$ )。

表 1 不同稀释水平 rh $\alpha$ -GAL 酶活性测定结果.  $n = 18$

Tab.1 The results of rh $\alpha$ -GAL activity measured by different dilution ratios.  $n = 18$

Concentration levels/%	Analyst A/U · mL <sup>-1</sup>			Analyst B/U · mL <sup>-1</sup>		
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1	Day 2	Day 3
50	403.70	441.70	422.06	416.12	374.26	426.16
	383.68	450.66	417.38	423.08	388.52	435.92
	396.42	431.74	431.74	389.28	377.44	400.54
80	415.54	440.44	407.76	394.38	384.99	380.46
	406.04	442.26	411.03	387.28	391.71	377.25
	423.90	430.08	414.53	391.71	386.26	363.65
100	398.22	402.67	407.24	387.26	409.71	423.22
	396.22	406.02	405.08	388.70	391.35	442.87
	395.73	404.70	401.35	384.95	398.69	412.69
125	409.08	394.40	399.19	377.71	374.46	387.21
	406.23	392.60	396.92	383.16	370.31	396.92
	404.11	394.16	402.42	374.62	366.52	399.19
150	385.15	384.67	375.32	368.19	376.03	393.87
	383.58	380.57	380.43	369.58	374.44	388.91
	384.37	381.45	373.51	371.81	372.95	392.20

### 3.3 重复性

取同一批 rh $\alpha$ -GAL(批号:DW0305),由 2 名实验人员分别按“2.1”项下方法平行制备 6 份,在同一天内按“2.2”项下的方法测定酶活性。12 份供试品溶液的测定结果的平均值为 403.10 U · mL<sup>-1</sup>, CV 为 2.21%,符合重复性的可接受标准( $\leq 10\%$ )。

### 3.4 准确度

以本文中间精密度和重复性测定结果的平均值作为该批次 rh $\alpha$ -GAL(批号:DW0305)酶活性的参考值(403.13 U · mL<sup>-1</sup>),以反映测定值与参考值之间的接近程度回收率(公式 2)来评价准确度。表 1 中 5 个稀释水平(50%、80%、100%、125% 和 150%)的回收率分别为 94.22%、96.47%、100.01%、99.18%、101.81%,均在 90% ~ 110% 范围内,符合准确度的验证标准(75% ~ 125%)。

$$\text{回收率}(\%) = \frac{\text{酶活性测定值}}{\text{酶活性参考值}} \times 100\% \quad \text{公式(2)}$$

### 3.5 线性与范围

以“3.2”项下 5 个待测溶液的酶促反应速率( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )参考值为 X 轴,以相应的测定

值为 Y 轴,线性回归方程为  $Y = 0.9116X + 0.0679$ ,  $r = 0.9994$ ,斜率接近于 1.0,表明本方法在 50% ~ 150% 的稀释水平范围内具有良好的线性。

### 3.6 耐用性

考察反应温度、反应时间、底物浓度发生微小变化对实验结果的影响。取 rh $\alpha$ -GAL,按照“2.1”项下方法制备供试品溶液,按照“2.2”项下方法,将水浴锅温度分别设置为 36.5、37.0、37.5 °C,测定酶活性;将同一份供试品溶液加至底物溶液中,分别反应 14、15、16 min 后测定其酶活性;取浓度为 45、50、55 mmol · L<sup>-1</sup> 的底物溶液用于分析同一份供试品溶液的酶活性。结果表明,上述参数发生微小变化时,测定结果的 CV 均小于 5%,方法的耐用性符合可接受标准( $\leq 10\%$ )(表 2)。

### 3.7 样品溶液的稳定性

取 rh $\alpha$ -GAL 加水复溶后存放于 2 ~ 8 °C,分别于 0、8、24、48 h 取样进行酶活性测定。计算 8、24、48 h 相对于 0 h 酶活性测定结果之比,分别为 98.34%、96.86%、94.12%,均在 90% ~ 110% 之间。

表2 rh $\alpha$ -GAL 酶活性检测方法耐用性考察结果

Tab.2 The robustness of activity assay for rh $\alpha$ -GAL

Condition	Activity/U · mL <sup>-1</sup>	CV/%
Temperature/°C	36.5	391.73
	37.0	404.65
	37.5	411.01
Reaction time/min	14	400.23
	15	406.59
	16	408.08
Concentration of substrate solution/mol · L <sup>-1</sup>	45	401.60
	50	398.51
	55	397.46

### 3.8 对硝基苯酚的检测范围

本方法定义单位时间内 rh $\alpha$ -GAL 水解底物产生 1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  对硝基苯酚所需的酶量为 1 个酶活性单位,采用消光系数法对产物对硝基苯酚进行定量。因此,除了考察酶浓度与酶促反应速率的线性关系以外,还应考察对硝基苯酚与光密度的线性范围。根据“3.1”项下样品空白溶液的测定结果可知,底物溶液在 400 nm 处存在较高的背景光密度,因此本研究在底物溶液中配制不同浓度的对硝基苯酚。为模拟酶促反应体系,于上述含不同浓度对硝基苯酚的底物溶液中加入等体积的终止缓冲液,通过测定各溶液在 400 nm 波长下的光密度计算对硝基苯酚浓度,从而评价对硝基苯酚在检测范围内的准确度和精密度。

**3.8.1 准确度** 精密称取对硝基苯酚 27.8 mg 于 25 mL 量瓶中,加入“2.1”项下的底物溶液溶解并稀释至刻度线,即为对硝基苯酚浓度为 8 mmol · L<sup>-1</sup> 的底物溶液。将含 8 mmol · L<sup>-1</sup> 对硝基苯酚的底物溶液逐步稀释为每 1L 含对硝基苯酚 0.02、0.04、0.10、0.20 和 0.50 mmol 的底物缓冲液,以底物溶液为空白溶液。于上述各溶液中分别加入等体积的终止缓冲液,取 200  $\mu\text{L}$  于透明 96 孔板中,打开酶标仪的光程路径校正,在 400 nm 波长下测定 OD,计算各溶液的  $\Delta\text{OD}_{400}$ 。共进行 3 次实验,每次实验报告 3 份溶液测定结果的均值,通过消光系数法计算对硝基苯酚的毫摩尔浓度,通过计算回收率(测定值与理论值之比)评价准确度,测定结果见表 3。加入等体积终止缓冲液后,底物溶液中对硝基苯酚理论浓度分别为 0.01、0.025、0.05、0.10 和 0.15 mmol · L<sup>-1</sup>, 5 个浓度水平的回收率均在 90.0% ~ 110% 之间,回收率较好。

**3.8.2 线性与范围** 以表 3 中对硝基苯酚的理论浓度对 3 次测定的  $\Delta\text{OD}_{400}$  作图,结果见图 5,线性

回归方程为  $Y = 17.60X + 0.0158$ ,  $r = 0.9997$ ,水解产物对硝基苯酚在 0.01 ~ 0.15 mmol · L<sup>-1</sup> 浓度范围内与光密度呈线性,对应的  $\Delta\text{OD}_{400}$  范围为 0.183 ~ 2.745。该范围可涵盖本方法酶质量浓度范围(0.83 ~ 2.51 mg · mL<sup>-1</sup>) 下测得的对硝基苯酚上下限(0.05 ~ 0.15 mmol · L<sup>-1</sup>)。

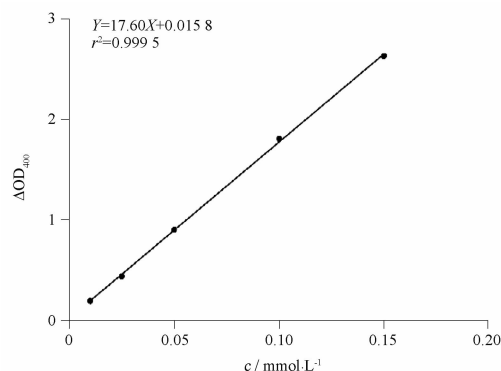


图5 对硝基苯酚在不同浓度下的光密度.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig.5 Absorbance of *p*-nitrophenol under different concentrations.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

**3.8.3 精密度** 计算表 3 中各对硝基苯酚浓度水平的 CV 值,分别为 0.47%、1.55%、0.93、0.90% 和 0.25%,本方法在 0.01 ~ 0.15 mmol · L<sup>-1</sup> 对硝基苯酚范围内的精密度小于 2%。

### 3.9 样品测定

采用本方法对已上市的两款 rh $\alpha$ -GAL 产品进行酶活性测定,每批样品平行制备 3 份,来自生产企业 A 的 3 批 rh $\alpha$ -GAL 产品的比活性分别为 82.37、81.11、84.51 U · mg<sup>-1</sup>,来自生产企业 B 的 3 批 rh $\alpha$ -GAL 产品的比活性分别为 79.74、88.39 和 85.72 U · mg<sup>-1</sup>。

## 4 讨论与结论

我国的罕见病患者人数已超过 2 000 万<sup>[11]</sup>,为改善 ERT 罕见病治疗酶类药物目前完全依赖国外进口的现状,国家大力支持罕见病用药的研制和生产,国内 ERT 罕见病酶类产品的开发正逐渐发展<sup>[12-13]</sup>。然而 ERT 罕见病酶类产品大多为含有多个糖基化位点的复杂糖蛋白,其质量评价方法的开发仍是国内企业开发此类药物的主要技术挑战。作为 rh $\alpha$ -GAL 的关键质量属性,酶活性测定方法的优化与建立不仅有利于推动此类产品的质量提升与标准提升,也为国内同类产品的早期研发、工艺优化、提升产品质量的可控性提供技术支持。

本研究对生色底物法测定体系中的关键因素

表3 对硝基苯酚验证溶液回收率测定结果.  $n=9$

Tab.3 recoveries of *p*-nitrophenol validation solutions.  $n=9$

$c(p\text{-Nitrophenol})/\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	Test	Mean $\Delta\text{OD}_{40}$	$c(\text{Experimental})/\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	Recovery/%	Mean Recovery/%
0.01	test 1	0.192	0.010	104.74	105.07
	test 2	0.193	0.011	105.65	
	test 3	0.192	0.010	104.84	
0.025	test 1	0.434	0.024	94.94	95.51
	test 2	0.445	0.024	97.19	
	test 3	0.432	0.024	94.40	
0.05	test 1	0.894	0.049	97.73	98.56
	test 2	0.900	0.049	98.39	
	test 3	0.911	0.050	99.55	
0.10	test 1	1.815	0.099	99.19	98.83
	test 2	1.790	0.098	97.82	
	test 3	1.821	0.099	99.49	
0.15	test 1	2.642	0.144	96.24	95.97
	test 2	2.633	0.144	95.92	
	test 3	2.629	0.144	95.76	

进行了优化,根据酶反应动力学理论确定了最适底物浓度、酶浓度、反应时间、水浴温度和稀释缓冲液的 pH 值,确定了最适酶促反应条件。采用该条件降低了所使用的底物浓度,解决了高浓度底物不易溶解的问题,避免了助溶剂乙醇的加入,提高了检测的灵敏度。本方法无需使用对硝基酚标准品,提高了检测效率,节省了检测成本,可以更灵敏、简便、准确地表征 rh $\alpha$ -GAL 的酶活性。根据 ICHQ2 对所建立的方法进行了完整的方法学验证,采用 50%、80%、100%、125% 和 150% 共 5 个不同的酶稀释水平评价方法的中间精密度和准确度,通过对同一份供试品溶液的 12 次测定评价重复性。此外,微调酶促反应温度、反应时间和底物浓度并未给实验结果带来明显变化。复溶后的样品于 2~8 °C 存放 48 h 后,溶液稳定性较好。为确保产物对硝基苯酚在其检测范围内可被准确定量,采用底物溶液配制 5 个不同浓度的对硝基苯酚溶液,考察对硝基苯酚浓度与光密度的线性关系,通过计算各浓度水平测定值相对于其理论值的回收率百分比以及各浓度水平 9 个测定结果的 CV 考察对硝基苯酚检测范围内的准确度和精密密度。最后,应用本研究建立的方法,测定了不同企业的 rh $\alpha$ -GAL 产品的酶活性。

综上所述,本研究优化建立了一种生色底物法测定 rh $\alpha$ -GAL 的酶活性。与现有方法相比,本方法操作更简便、灵敏度更高、结果更稳定准确,可作为常规检验方法用于 rh $\alpha$ -GAL 产品的质量控制在。

## REFERENCES

[ 1 ] SUN Y H, LIU S W. The development status and path of diagnosis and treatment of rare diseases and orphan drugs in China [J]. *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报),2023, 39(4): 601-605.

[ 2 ] LIU Y, WU B B, WU X H, *et al.* Lysosomal storage disease: revealing lysosomal function and physiology [J]. *J Jinan Univ* (暨南大学学报),2013, 34(4): 360-366.

[ 3 ] PASQUALE V D, SCARCELLA M, PAVONE M L. Molecular mechanisms in lysosomal storage diseases: from pathogenesis to therapeutic strategies [J]. *Biomedicines*,2022, 10(4): 922-925.

[ 4 ] DENG M L, ZHOU H Y, ZHENG K X, *et al.* Expression, purification and functional verification of recombinant human  $\alpha$ -galactosidase A in suspension CHO-S[J]. *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报),2023, 39(4): 774-781.

[ 5 ] van der VEEN S J, HOLLAK C E M, van KUILENBURG A B P, *et al.* Developments in the treatment of Fabry disease [J]. *J Inherit Metab Dis*,2020, 43(5): 908-921.

[ 6 ] CHENG S Y, KOU Y Z, LUO J H. Research progress of enzyme replacement therapy for rare diseases products and their pharmaceutical assessment[J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志),2020, 55(13): 1128-1132.

[ 7 ] GUCE A I, CLARK N E, SALGADO E N, *et al.* Catalytic mechanism of human alpha-galactosidase[J]. *J Biol Chem*,2010, 285(6): 3625-3632.

[ 8 ] MODREGO A, AMARANTO M, GODINO A, *et al.* Human  $\alpha$ -galactosidase A mutants: priceless tools to develop novel therapies for Fabry Disease[J]. *Int J Mol Sci*,2021, 22(12): 6518. Doi: 10.3390/ijms22126518.

[ 9 ] SHEN J S, BUSCH A, DAY T S, *et al.* Mannose receptor-mediated delivery of moss-made alpha-galactosidase A efficiency corrects enzyme deficiency in Fabry mice[J]. *J Inherit Metab Dis*, 2016, 39(2): 293-303.

[ 10 ] ZHANG F, CHENG L F, CAO H, *et al.* Optimization of lipase activity assay system based on enzyme reaction kinetic theory[J]. *China Oils Fats* (中国油脂),2023,48(5): 146-152.

[ 11 ] YU H Y, ZHOU L R. Current situation of medicine supply policy for patients with rare disease in China and considerations on improvement[J]. *Eval Anal Drug Use Hosp China* (中国医院用药评价与分析),2023,23(5): 632-636.

[ 12 ] CAO Y S, YANG Y, LIU M Z, *et al.* Expression and characterization of UCE, a key enzyme of lysosomal hydrolase to synthesize mannose-6-phosphate[J]. *Chin Med Biotechnol*(中国医药生物技术),2022,17(6): 481-487.

[ 13 ] RANG W L, TAN Y X, WANG Y L, *et al.* Expression and identification of recombinant human  $\alpha$ -galactosidase A in CHO cells [J]. *Mil Med*(军事医学),2011,35(1): 54-57.

(收稿日期:2023-09-29)