

生物检定

全柱成像毛细管等电聚焦 (iCIEF) 技术分析
重组人 IgG VEGFR:Fc- 融合蛋白电荷异质性

刘振东, 韩国华, 杨勇, 王庆民*

(齐鲁制药有限公司药物研究院, 济南 250100)

摘要 目的: 建立全柱成像毛细管等电聚焦法 (iCIEF) 分析重组人 IgG VEGFR:Fc- 融合蛋白 (血管内皮生长因子受体-抗体 Fc 融合蛋白) 的电荷异质性。方法: 首先对全柱成像毛细管等电聚焦方法在蛋白浓度、助溶剂、两性电解质、聚焦时间等方面进行了条件优化。并应用优化的方法进行 Fc- 融合蛋白的电荷异质性及等电点检测及重复性验证, 并将结果与毛细管等电聚焦 (cIEF) 及平板胶等电聚焦 (IEF) 结果进行对比分析。结果: 在优化的实验条件下, 分析 Fc- 融合蛋白的电荷异质性及等电点具有良好的分离度和重复性, 分离效果明显好于 cIEF 和 IEF, 且主成分的 pI 重复测定 RSD 均小于 0.5%。结论: iCIEF 作为一种新的技术手段, 用于重组蛋白类药物电荷异质性及等电点分析, 方法快速、准确, 重复性好, 能够较好地检测高度糖基化的重组 VEGFR:Fc- 融合蛋白产品的电荷异质性, 为保障 Fc- 融合蛋白类产品生产工艺的稳定性及质量控制提供了一种快速、可靠的分析方法。

关键词: 血管内皮生长因子受体-抗体 Fc 融合蛋白; 电荷异质性; 条件优化; 全柱成像毛细管等电聚焦

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2018) 03-0539-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.03.25

Charge heterogeneity analysis of human IgG VEGFR:Fc-fusion protein
with imaging capillary isoelectric focusing electrophoresis (iCIEF)

LIU Zhen-dong, HAN Guo-hua, YANG Yong, WANG Qing-min*

(The Research and Development Department, Qilu Pharmaceutical Co., Ltd., Jinan 250100, China)

Abstract Objective: To develop an imaged capillary isoelectric focusing electrophoresis method for charge heterogeneity analysis of recombinant human IgG VEGFR:Fc-fusion protein. **Methods:** This study first optimized the imaged capillary isoelectric focusing on the electrophoresis method including working concentration of protein, additives, pH range of ampholytes, focusing time, and then analyzed the charge heterogeneity and isoelectric points of Fc-fusion protein using the optimized method. The results were compared with the cIEF and IEF. **Results:** Under the optimal conditions, the charge heterogeneity and isoelectric points of Fc-fusion protein were very accurate with a perfect resolution and repeatability. The iCIEF separation is significantly better than cIEF and IEF, and the RSD of pI was less than 0.5% with repeat assay. **Conclusion:** iCIEF as a new technique can be used to determine the charge heterogeneity and isoelectric points of recombinant proteins, which is rapid, accurate and

* 通信作者 Tel:(0531) 83126940; E-mail: qingmin.wang@qilu-pharma.com

第一作者 Tel:(0531) 83129565; E-mail: liuzhendong0403@163.com

repeatable. The charge heterogeneity of VEGFR:Fc-fusion protein, which was highly glycosylated detected by iCIEF excellently. ICIEF provides a rapid and reliable assay method for charge heterogeneity research and quality control of Fc-fusion proteins.

Keywords: VEGFR:Fc-fusion protein; charge heterogeneity; condition optimization; imaging capillary isoelectric focusing electrophoresis

某些具有潜在治疗作用的细胞因子与人 IgG Fc 融合后,可提高其在血液中的半衰期,增强其治疗效果。目前临床上用于治疗类风湿关节炎(RA)的 Enbrel(药品通用名依那西普,etanercept)以及治疗老年性黄斑变性(AMD)的 VEGF-Trap(药品通用名阿柏西普,Aflibercept)等,均为相应细胞因子与人 IgG Fc 的融合蛋白^[1]。Fc-融合蛋白多是一种高度糖基化的糖蛋白,糖基化的不均一性,往往导致其体内活性及体内半衰期的差异^[2]。糖基化的不均一性直接体现在其电荷异质性的差异。因此,应用快速、稳定、准确、灵敏的电荷异质性分析方法控制 Fc-融合蛋白的电荷不均一性,是一项关键质量控制指标。

新一代全柱成像毛细管等电聚焦电泳技术[capillary isoelectric focusing-whole column imaging detection, CIEF-WCID(iCE)]^[3]是一种将毛细管等电聚焦电泳与全柱成像技术相结合的新型电泳系统,它结合了毛细管电泳自动分离检测、可定量分析和成像技术的双重优势。当样品进行等电聚焦时,互补性金属氧化物半导体(complementary metal-oxide-semiconductor translator, CMOS)作为成像检测技术,可以对整个聚焦分离通道聚焦过程进行实时监控和记录,这一过程中无须移动样品,直接进行检测。该方法使得分析结果不受干扰,提高了电荷异质性分析的准确性和重复性,通常能在几分钟内完成测定,所需时间大大缩短,可实现高通量检测^[4-5]。全柱成像毛细管等电聚焦(iCIEF)在重组生物技术产品,尤其在高度糖基化等复杂样品电荷异质性分析的准确性、重复性和分辨率较平板胶等电聚焦(IEF)及毛细管等点聚焦(cIEF)具有明显的优势,更有利于重组生物技术药物的质量控制和稳定性研究^[6-7]。

本研究采用全柱成像毛细管电泳技术及带涂层的毛细管柱对 VEGFR:Fc-融合蛋白药物的电荷异质性进行分析。通过对样品分析浓度、聚焦时间、两性电解质种类及比例多个参数进行优化,并对助溶剂(不同浓度尿素)对分离效果的影响进行了研究,使

iCIEF 分离效果达到最佳,准确性、重复性可满足质量控制的要求。

1 实验材料

1.1 试剂

载体两性电解质 AESlyte HR3-10、HR5-8,阳极电解液($80\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ H}_3\text{PO}_4+0.1\%\text{ MC}$)、阴极电解液($100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NaOH}+0.1\%\text{ MC}$)和 pI Marker(pI 6.14、pI 8.79)均由 Advanced Electrophoresis Solutions(AES)公司提供;尿素、羟丙基甲基纤维素(HPMC)均购自 Sigma 公司。

1.2 仪器

CE Infinite 全柱成像毛细管等电聚焦电泳仪及氟碳(FC)涂层毛细管购自 AES 公司;Centrifuge 5415R 离心机 Eppendorf 公司;实验用水均为 Milli-Q(Millipore 公司)超纯水。

1.3 样品

重组人 VEGFR:Fc-融合蛋白:齐鲁制药有限公司药物研究院生物技术研究制备。

2 实验方法

2.1 全柱成像毛细管等电聚焦电泳(iCIEF)

在 CE Infinite 自动进样器位置 1 放入装有 0.3% HPMC 的清洗瓶。设置方法参数,每次进样前吸取 0.3% HPMC 50 μL 冲洗毛细管,依次在各样品位置吸取 50 μL 样品进样,聚焦时间 6 min(1 kV-1 min, 2 kV-1 min, 3 kV-4 min)。

2.2 毛细管等电聚焦电泳(cIEF)

按照 BECKMAN COULTER 公司 PA 800 plus 毛细管电泳仪使用说明进行。

2.3 平板胶等电聚焦电泳(IEF)

使用 Phast Gel IEF 预制胶,按照 Phast System 电泳仪(均为 GE 公司产品)使用说明进行平板胶 IEF 实验。

3 条件优化及结果

3.1 全柱成像毛细管等电聚焦电泳(iCIEF)条件优化

3.1.1 蛋白浓度的选择 合适的样品工作蛋白浓度(简称蛋白浓度)可使 iCIEF 分析具有较好的灵敏度和

可重复性。一般较高的蛋白浓度会使分析结果具有较好的灵敏度和低丰度电荷异质体的精确定量,但过高的蛋白浓度往往导致 iCE 毛细管中蛋白质聚集而析出,电泳图谱上出现尖峰信号,导致其重复性变差^[8]。

本研究在初步采用尿素 $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (终浓度)、两性电解质 AESlyte HR3-10-AESlyteHR5-8 (1:3)、聚焦时间 7 min 的条件下,选择了几种不同的蛋白浓度进行分析对比,结果表明 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 VEGFR:Fc-融合蛋白 iCIEF 分析均具有较高的分离度、灵敏度和重复性。为降低高浓度蛋白易发生聚集和吸附毛细管的风险,选择样品终浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

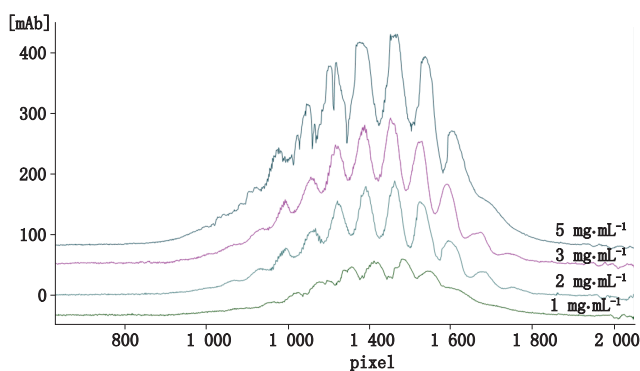


图1 不同工作浓度的 VEGFR:Fc-融合蛋白全柱成像毛细管等电聚焦电泳图谱

Fig. 1 iCE electropherograms of VEGFR:Fc-fusion protein with various concentrations in the prepared samples

3.1.2 尿素摩尔浓度的选择 CE 及 iCE 分析中,通常需要向运行缓冲液中加入适量的助溶剂来改善电泳分离的选择性,抑制蛋白沉淀、管壁吸附,提高分离效率。常用助溶剂种类有表面活性剂、有机溶剂、两性离子等,如尿素、蔗糖、甘油、聚乙二醇等,以阻止等电聚焦中样品沉淀及分子间的相互作用^[8-9]。尿素作为一种使用较为普遍的助溶剂,目前在 CE 分析中应用较多。尿素添加到缓冲液中可以增加蛋白质溶解度,避免蛋白沉淀,其不同浓度对缓冲液的助溶能力有不同影响。当尿素浓度过低时,起不到增溶作用,蛋白容易沉淀;浓度过高会增加缓冲液中离子强度,进而产生大量的焦耳热,使柱效降低,峰展宽,分离度下降,甚至引起蛋白质变性^[10-11]。

本研究在初步采用样品蛋白终浓度 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、两性电解质 AESlyte HR3-10-AESlyteHR5-8 (1:3)、聚焦时间 7 min 的条件下,对 0、2、4、 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素浓度进行考察,不同尿素浓度对样品分离效果的影响见图 2。如图所示,不加尿素,分离过程中会发生蛋白

沉淀(出现锯齿状尖峰信号)。当尿素浓度为 $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,VEGFR:Fc-融合蛋白各电荷异质峰分离效果较好,因此实验中选择尿素的终浓度为 $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

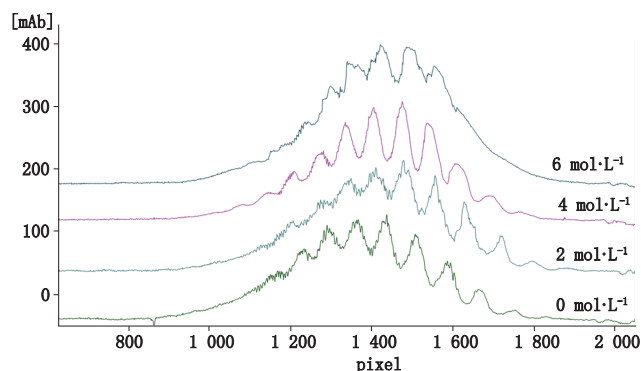


图2 不同浓度尿素 VEGFR:Fc-融合蛋白全柱成像毛细管等电聚焦电泳图谱

Fig. 2 The effects of urea concentration on the separation of VEGFR:Fc-fusion protein in iCIEF

3.1.3 两性电解质的选择 在初步确定样品蛋白终浓度 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、尿素终浓度 $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、聚焦时间 7 min 的条件下,选择不同范围及配比的两性电解质, AESlyte HR3-10、AESlyte HR5-8,进行优化,确定最佳的分离条件。

仅用 AESlyte HR3-10 的两性电解质中 VEGFR:Fc-融合蛋白电荷异构体未完全分离;仅用 HR5-8 两性电解质中 VEGFR:Fc-融合蛋白电荷异质峰较宽、峰高偏低。在 AESlyte HR3-10-AESlyte HR5-8 (1:7) 的条件下获得了较好的 VEGFR:Fc-融合蛋白等电聚焦分离效果,图谱见图 3。因此,确定 VEGFR:Fc-融合蛋白 iCIEF 分析所用两性电解质为 AESlyte HR3-10-AESlyte HR5-8 (1:7)。

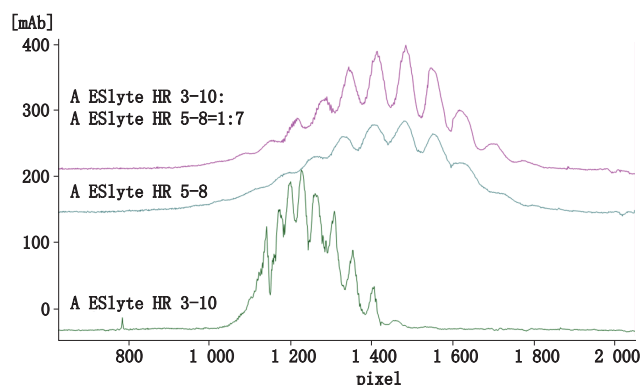


图3 不同 pH 范围两性电解质的 VEGFR:Fc-融合蛋白全柱成像毛细管等电聚焦电泳图谱

Fig. 3 The effects of pH range of ampholytes on the separation of VEGFR:Fc-fusion protein in iCIEF

3.1.4 聚焦时间的选择 在“3.1.1”、“3.1.2”和“3.1.3”优化条件的基础上,进行聚焦时间的选择,以期得到较好的 VEGFR:Fc-融合蛋白分离聚焦时间。聚焦电压为第1 min-1 kV、第2 min-2 kV、第3 min-及以上3 kV,聚焦时间为3个阶段的时间之和。结果如图4所示,5 min时各峰尚未聚焦完成,聚焦6 min和7 min各峰峰形均无明显变化,说明6 min已聚焦完成。因此选择聚焦时间为6 min。

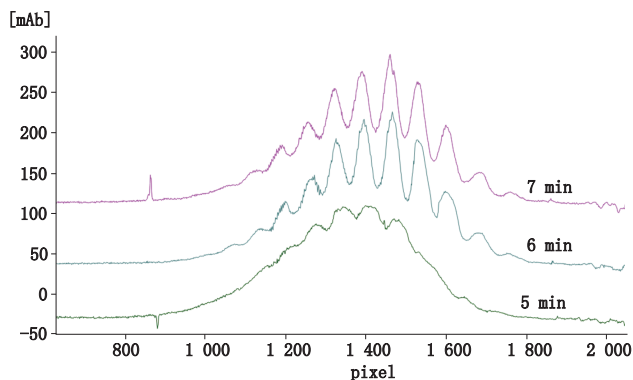


图4 不同聚焦时间的 VEGFR:Fc-融合蛋白全柱成像毛细管等电聚焦电泳图谱

Fig. 4 The effects of focusing time on the separation of VEGFR:Fc-fusion protein in iCIEF

通过不同蛋白浓度、尿素浓度、两性电解质、聚焦时间的优化,最终确定 VEGFR:Fc-融合蛋白全柱成像毛细管等电聚焦电泳的实验条件(见表1)。

表1 VEGFR:Fc-融合蛋白全柱成像毛细管等电聚焦电泳实验条件

Tab. 1 Experiment condition of VEGFR:Fc-fusion protein in iCIEF

实验条件 (experimental conditions)	优化结果 (optimization results)
样品浓度(sample concentration) / (mg · ml ⁻¹)	2
尿素浓度(urea concentration) / (mol · L ⁻¹)	4
两性电解质(ampholine)	AESlyte HR3-10: AESlyte HR5-8=1:7
聚焦时间(focus time) /min	6
聚焦电压(focus voltage)	1 kV-1 min, 2 kV-1 min, 3 kV-4 min

3.2 VEGFR:Fc-融合蛋白 iCIEF 检测方法的重复性验证

应用“3.1”优化了的方法对 VEGFR:Fc-融合蛋白 iCIEF 检测的重复性进行考察。图5为 pI Marker (pI 6.14、pI 8.79) 与样品的混合溶液单针检测及连续进样6次的等电聚焦电泳图谱,在重复实验

中 pI Marker 及样品峰形和峰位置均无明显变化,主要峰 pI 相对标准偏差均小于 0.5%。重复性良好,该方法能够满足该类产品质量控制的要求。

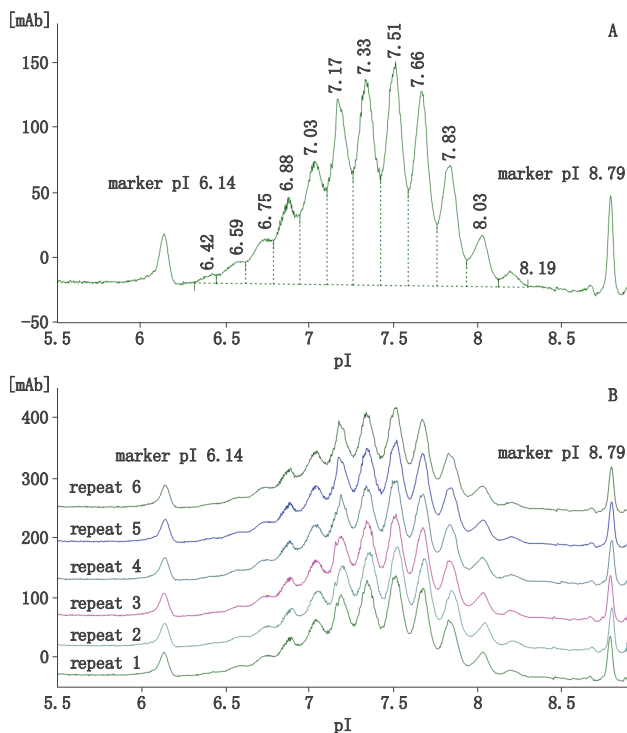


图5 pI Marker (pI 6.14、pI 8.79) 和样品单针检测 (A) 及连续进样6次 (B) iCIEF 电泳图谱

Fig. 5 iCIEF electropherograms of pI marker and sample single run (A) and repeat six times (B)

3.3 VEGFR:Fc-融合蛋白经 iCIEF、cIEF、IEF 分析结果对比

采用全柱成像毛细管等电聚焦 (iCIEF)、毛细管等电聚焦 (cIEF, PA800 plus) 及凝胶 (平板预制胶) 等电聚焦 (IEF) 3 种方法,分别检测 VEGFR:Fc-融合蛋白的电荷异质性,并进行对比。结果如图6, iCIEF 分离效果显著好于 cIEF 和 IEF, 且分析时间仅需几分钟,远小于 cIEF 和 IEF (约为 cIEF 的 1/10, IEF 的 1/20),大大缩短检测时间,可实现高通量。

3.4 重组人 VEGFR:Fc-融合蛋白 iCIEF 质量控制

重组人 Fc-融合蛋白多为唾液酸化的糖蛋白,唾液酸化的不均一性导致 Fc-融合蛋白类药物多呈现复杂的电荷异质性。唾液酸化水平为该药物的关键质量属性 (CQA), iCIEF 出色的重复性和准确性可用于控制该类药物的唾液酸化水平相关产品质量和批间一致性。

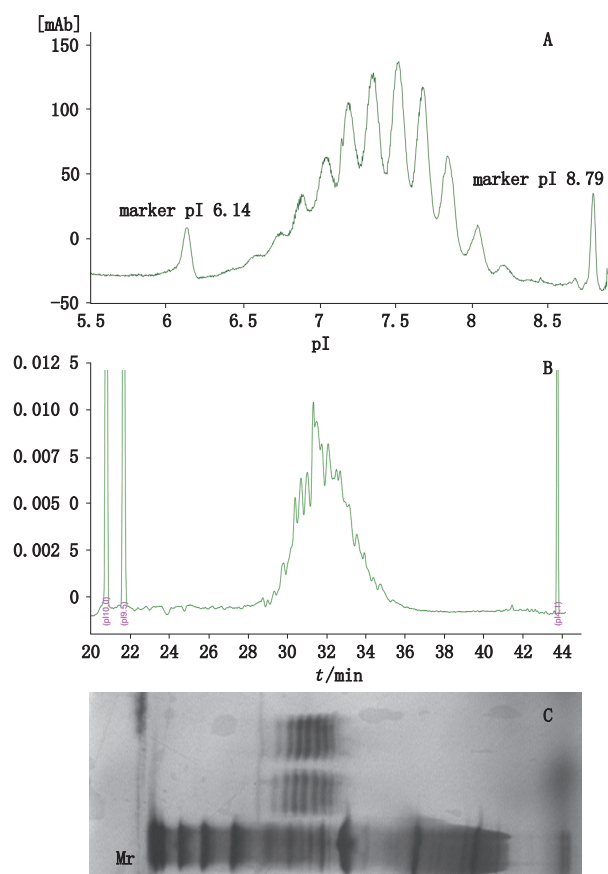


图6 VEGFR:Fc-融合蛋白经iCIEF、cIEF(PA800 plus)及IEF分析结果对比

Fig. 6 Profile comparison of iCIEF, cIEF and slab gel IEF

本研究针对重组人 VEGFR:Fc-融合蛋白电荷异质性及 iCIEF 图谱特征,并依据多批次及多次检测结果的一致性,可参考图 7,将峰 1~6 作为目标峰控制产品质量,并制定合适的质控标准。参考以上研究结果针对该产品 iCIEF 质控标准可设定为:本品应有 6 个主峰, pI 在 7.2~8.0 之间(峰 1~6),且 iCIEF 图谱应与典型图谱基本一致。

4 讨论

常规的平板预制胶 IEF 较毛细管等电聚焦电泳(cIEF)稳定性差,特别是在融合蛋白等高度糖基化的重组生物制品检测中表现更为突出^[12]。虽然 cIEF 可获得较稳定结果,但由于检测器为单点检测器,样品聚焦后需采用物理或化学迁移的方法,使各聚焦条带顺序通过检测窗口进行检测。在迁移过程中可能会造成 pH 梯度改变、蛋白质沉淀等^[13],从而

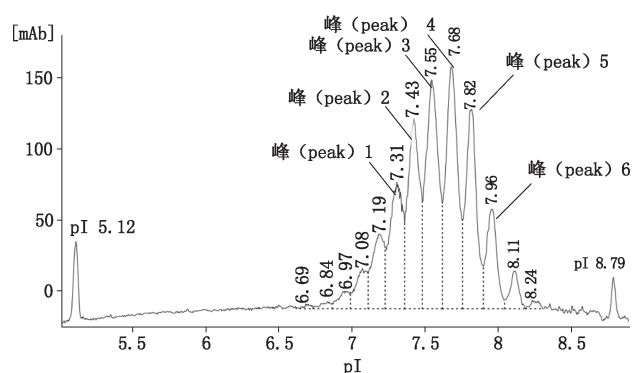


图7 重组人 VEGFR:Fc-融合蛋白 iCIEF 图谱

Fig. 7 iCIEF electropherogram of rhIgG VEGFR:Fc-fusion protein

使已完成聚焦的条带发生重叠和扭曲,导致分辨率下降、结果偏离; iCIEF 则是蛋白质样品在两性电解质聚焦后,应用全柱实时成像系统,无须移动样品,充分保持毛细管等电聚焦的高重复性、高柱效和高分辨率,后者的准确性和稳定性明显高于前者^[14-16]。

尽管应用 iCIEF 技术进行重组蛋白药物电荷异质性的研究有文献报道,但针对上述高度糖基化的 Fc-融合蛋白,应用 iCIEF 技术进行电荷异质性分析以及条件优化的研究报道甚少。本研究应用 iCIEF 技术开展 VEGFR:Fc-融合蛋白类药物的电荷异质性分析,并进行了全面的方法优化,得到了分离效果较好的实验条件,能够较好地控制该类产品的质量。相比于其他等电聚焦电泳方法,该技术快速、准确、重复性好,且具有高通量的优势,这将为重组 Fc-融合蛋白类药物电荷异质性研究及质量控制提供一种更为准确、稳定、高效的分析方法。

本研究对 Fc-融合蛋白类药物及其他重组类生物制品的电荷异质性分析及质量控制,特别是对提高生物类似药的表征分析技术水平,保障重组蛋白类生物技术药物质量标准的高要求,具有重要的实际指导意义和应用价值。

参考文献

- [1] MORELAND LW. Soluble tumor necrosis factor receptor (p75) fusion protein (Enbrel) as a therapy for rheumatoid arthritis [J]. Rheum Dis Clin North America, 1998, 24(3): 579
- [2] 何椿鹏. 不同 TNFR-Fc 融合蛋白 N-糖基化结构分析及其对蛋白功能影响的初步研究 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2013
- [3] HE CP. N-glycan Structural Analysis of Different TNFR-Fc Fusion Proteins and the Influence on Protein Functions [D]. Nanning: Guangxi Medical University, 2013
- [4] WU J, TRAGAS C, WATSON A, et al. Capillary isoelectric focusing

- with whole column detection and a membrane sample preparation system [J]. *Anal Chim Acta*, 1999, 383: 67
- [4] 刘洁欣, 方均建, 王心正, 等. 全柱成像毛细管等电聚焦电泳测定艾塞那肽等电点 [J]. *生物技术通讯*, 2014, 25(3): 381
LIU JX, FANG JJ, WANG XZ, *et al.* Determination of isoelectric point of exenatide by capillary isoelectric focusing-whole column imaging detection [J]. *Lett Biotechnol*, 2014, 25(3): 381
- [5] LI N, KESSLER K, BASS L, *et al.* Evaluation of the iCE280 analyzer as a potential high-throughput tool for formulation development [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 43(3): 963
- [6] THOMASSEN YE, VAN EIKENHORST G, VAN DER POL LA, *et al.* Isoelectric point determination of live polioviruses by capillary isoelectric focusing with whole column imaging detection [J]. *Anal Chem*, 2013, 85(12): 6089
- [7] BO T, PAWLISZYN J. Protein thermal stability and phospholipid protein interaction investigated by capillary isoelectric focusing with whole column imaging detection [J]. *J Sep Sc*, 2006, 29(7): 1018
- [8] HE XZ, QUE AH, MO JJ. Analysis of charge heterogeneities in mAbs using imaged CE [J]. *Electrophoresis*, 2009, 30(5): 714
- [9] 王丽, 周勇, 王军志. 成像毛细管等电聚焦技术分析重组人促红素异质性 [J]. *药物分析杂志*, 2014, 34(6): 1049
WANG L, ZHOU Y, WANG JZ. Study on heterogeneity of recombinant human erythropoietin by imaged cIEF [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2014, 34(6): 1049
- [10] HE Y, LACHER NA, HOU W, *et al.* Analysis of identity, charge variants, and disulfide isomers of monoclonal antibodies with capillary zone electrophoresis in an uncoated capillary column [J]. *Anal Chem*, 2010, 82(8): 3222
- [11] HEMPE JM, CRAVER RD. Separation of hemoglobin variants with similar charge by capillary isoelectric focusing: Value of isoelectric point for identification of common and uncommon hemoglobin variants [J]. *Electrophoresis*, 2000, 21(4): 743
- [12] JOCHHEIM C, NOVICK S, BALLAND A, *et al.* Separation of Enbrel (rhuTN- α :Fe) isoforms by capillary isoelectric focusing [J]. *Chromatographia*, 2011, 53(S): 59
- [13] 于建钊. 基于 cIEF 的全柱成像检测在生命分析中的应用 [J]. *哈尔滨商业大学学报 (自然科学版)*, 2012, 28(1): 54
YU JZ. Application of capillary isoelectric focusing with whole column imaging detection in bio-analytical chemistry [J]. *J Harbin Univ Comm (Nat Sci Ed)*, 2012, 28(1): 54
- [14] MAO Q, PAWLISZYN J. Capillary isoelectric focusing with whole column imaging detection for analysis of proteins and peptides [J]. *J Biochem Biophys Methods*, 1999, 39(1-2): 93
- [15] LUBINIECKI A, VOLKIN DB, FEDERICI M, *et al.* Comparability assessments of process and product changes made during development of two different monoclonal antibodies [J]. *Biologicals*, 2011, 39(1): 9
- [16] RUSTANDI RR, PEKLANSKY B, ANDERSON CL. Application of imaged capillary isoelectric focusing technique in development of biopharmaceutical glycoprotein-based products [J]. *Electrophoresis*, 2012, 33: 1538

(本文于 2017 年 12 月 25 日修改回)