

唾液酸的定量分析

Royle L, Hendel J, Kozak RP

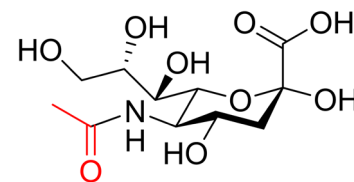
Ludger Ltd, Culham Science Centre, Oxfordshire, UK

为何唾液酸分析很重要？

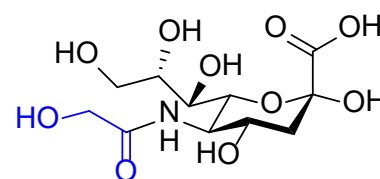
唾液酸是在聚糖的非还原末端上发现的带负电荷的单糖。它们对糖蛋白的稳定性和3D构象很重要，并且参与许多生物相互作用。唾液酸通常具有关键性的功能作用：例如，免疫球蛋白（IgG）上N-聚糖的唾液酸化可以增强抗炎活性；氧乙酰化的唾液酸可以更改配基的相互作用，并且影响降解（EPO上可以找到包括Neu5,9Ac₂在内的氧乙酰化的唾液酸）；唾液酸的存在同时也通过防止位于肝细胞上的去唾液酸糖蛋白受体吸收，从而增加糖蛋白的血清半衰期。

在自然界中可以找到多种多样的唾液酸，但在生物药品中N-聚糖和O-聚糖上发现的两种主要唾液酸是N-乙酰神经氨酸（Neu5Ac或 NANA）和N-羟乙酰神经氨酸（Neu5Gc 或 NAGA）。人体不能合成 Neu5Gc，并且含有 Neu5Gc 的药物可能导致免疫反应，如慢性炎症。抗Neu5Gc的 抗体能在正常人的唾液中检测到，可以中和任何含有Neu5Gc的生物制药，从而降低药物的功效。重要的是要注意，细胞系的选择可以极大地影响生物制药中唾液酸的类型，例如小鼠IgG上的大部分唾液酸通常是Neu5Gc。

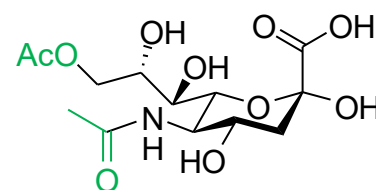
因此，为确保药物的安全和效用，需要检测产品生命周期所有阶段的唾液酸水平和类型，以及批次间质控的一致性。因此，唾液酸分析是ICH Q6B产品执行标准中的一项监管规定，针对对象为 生物药物。



N-乙酰神经氨酸
Neu5Ac



N-羟乙酰神经氨酸
Neu5Gc



5-N-乙酰基-9-O-乙酰神经氨酸
Neu5,9Ac₂

使用Ludger试剂盒和标准品可以获取哪些信息？

- 唾液酸（Neu5Ac 和 Neu5Gc）按nmol/mg 蛋白的定量
- 氧乙酰化的Neu5,9Ac₂的相对定量

如何使用Ludger试剂盒和标准品来进行唾液酸的定量分析：

唾液酸释放

唾液酸是由糖蛋白样品温和酸解后释放；样品通常是一式三份的50μg，尽管唾液酸化水平很低的样品可能需要更大量，例如 单克隆抗体（MAbs）。我们推荐在整个过程中使用大量对照品进行过程控制：样品缓冲液或水作为阴性对照；胎球蛋白（GCP-FET-50U）和/或定量的糖肽（BQ-GPEP-A2G2S2-10U）作为阳性对照。样品和过程对照品用2M 乙酸溶液培养2小时，温度控制在80° C。

DMB 标记

接着用1,2-二氨基-4,5-亚甲氧基苯二盐酸盐荧光标记释放的唾液酸，以确保探测敏感。2 HCl（DMB）-请参见图1。当唾液酸环打时，它会暴露羧酸旁边的酮组，DMB连接这两个相邻的酮组，生成荧光（其他单糖没有这些相邻的酮组，因此没有被荧光标记）。酸水解样品和过程对照品以及 Ludger唾液酸标准品：Neu5Ac（CM-NEUAC-01），Neu5Gc（CM-NEUGC-01），唾液酸参照品（CM-SRP-01），以及Neu5,9Ac₂（CM-NEU5,9,AC2-01）如果使用的话，放置在50° C下，DMB标记培养3 小时。

LC 分析

Neu5Ac 和 Neu5Gc 标准品被稀释，生成这两种唾液酸定量的标准曲线。唾液酸参照品（CM-SRP-01）和 Neu5,9Ac₂ 被用于唾液酸鉴定。样品和对照品的分析可使用HPLC LudgerSep-R1柱（LS-R1-4.6x150，见表 1）进行高压液相色谱分析，或者LudgerSep-uR2柱（LS-UR2-2.1x100，见表 2）进行超高压液相色谱分析，从而加快 运行时间。图 1（A和B）显示的是典型的唾液酸参照品图谱。

LC 条件

溶剂 A = 乙腈:甲醇:水9:7:84; 溶剂 B = 乙腈

荧光: 激发波长 λ : 373 nm; 发射波长 λ : 448 nm, 柱温 = 30° C; 进样温度 = 10° C

时间 (min)	流速 mL/min	%A	%B
0	0.5	100	0
19	0.5	100	0
19.5	0.5	10	90
23.5	0.5	10	90
24	0.5	100	0
30	0.5	100	0

表 1. 进行30分钟HPLC分析的操作, 使用LudgerSep-R1 柱 (4.6 x 150 mm, 3 μ m颗粒)
LS-R1-4.6x150。进样量 = 25 μ L

时间 (min)	流速 mL/min	%A	%B
0	0.25	100	0
7	0.25	100	0
7.5	0.25	10	90
8	0.25	10	90
8.5	0.25	100	0
15	0.25	100	0

表 2. 进行15分钟UHPLC分析的操作, 使用LudgerSep-uR2 柱 (2.1 x 100 mm, 1.9 μ m颗粒)
LS-UR2-2.1x100。进样量 = 5 μ L

LC 数据

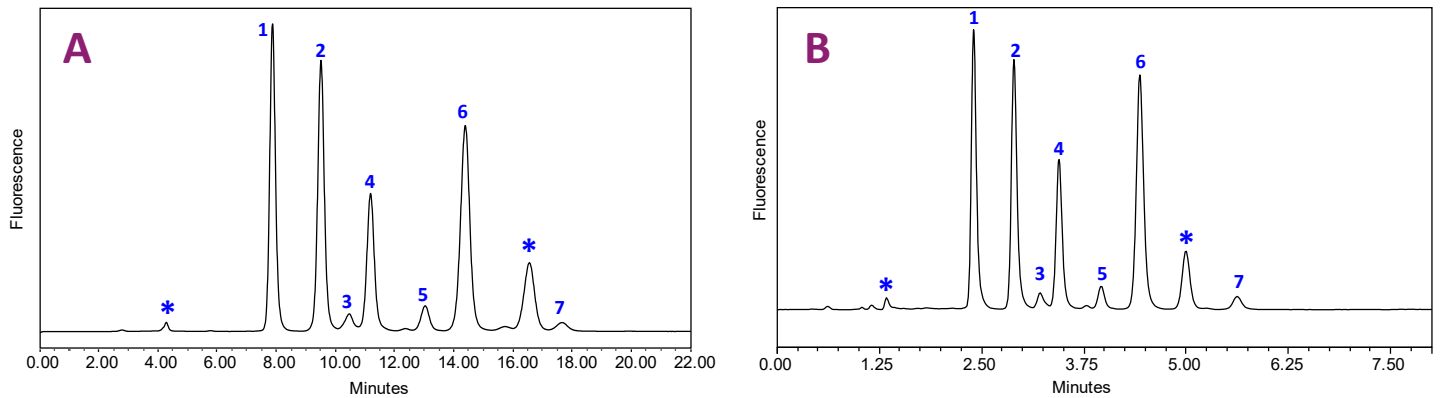


图 1. DMB标记唾液酸参照品 (CM-SRP-01) 在LudgerSep-R1 HPLC柱跑出的液相图谱。

峰: 1 = Neu5Gc; 2 = Neu5Ac; 3 = Neu5,7Ac₂; 4 = Neu5Gc,9Ac; 5 = Neu5,8Ac₂; 6 = Neu5,9Ac₂; 7 = Neu5, x, xAc₃ (此处x表示未知乙酰基位置); * = 试剂。

结果

样品中Neu5Ac 和 Neu5Gc的峰面积与标准曲线进行对比, 以提供样品和过程对照品中唾液酸数量的量化数据。图 2 显示了老鼠和人的IgGs所释放唾液酸的数据。老鼠的IgG具有较高水平的非人类唾液酸 Neu5Gc, 在这方面, 人 IgG比老鼠IgG的唾液酸多出4倍。图3 显示了EPO中唾液酸的数据。Neu5Ac和 Neu5Gc的绝对数量可以通过与标准曲线比较确定。不过, EPO还包含氧乙酰化的唾液酸 Neu5,9Ac₂。在水性条件下, 9位的乙酸酯可以迁移至8位, 因此对于Neu5,9Ac₂很难有充分的量化标准。所以, 唾液酸是通过与标准品的保留时间比较来确认的, 并且Neu5Ac, Neu5Gc和 Neu5,9Ac₂的比例都是从其峰面积确定的

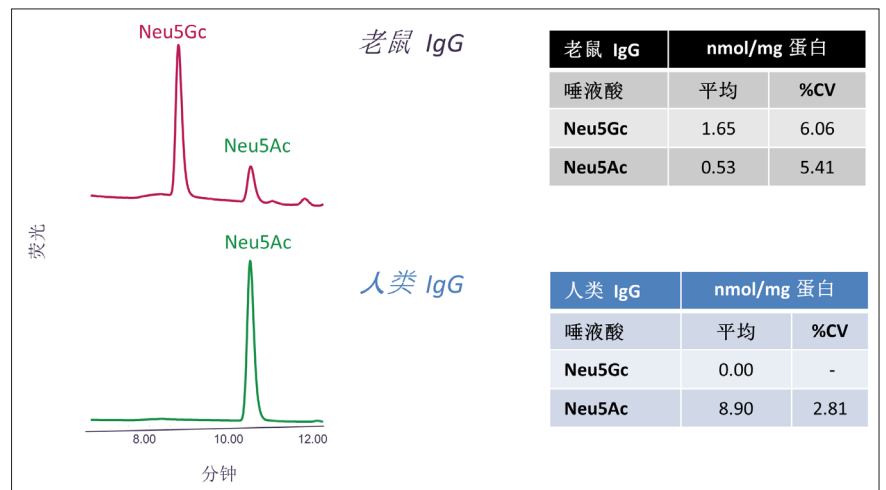


图 2. 老鼠和人IgG 上 Neu5Ac和Neu5Gc的识别与定量。LudgerSep-R1 HPLC 柱的分析。

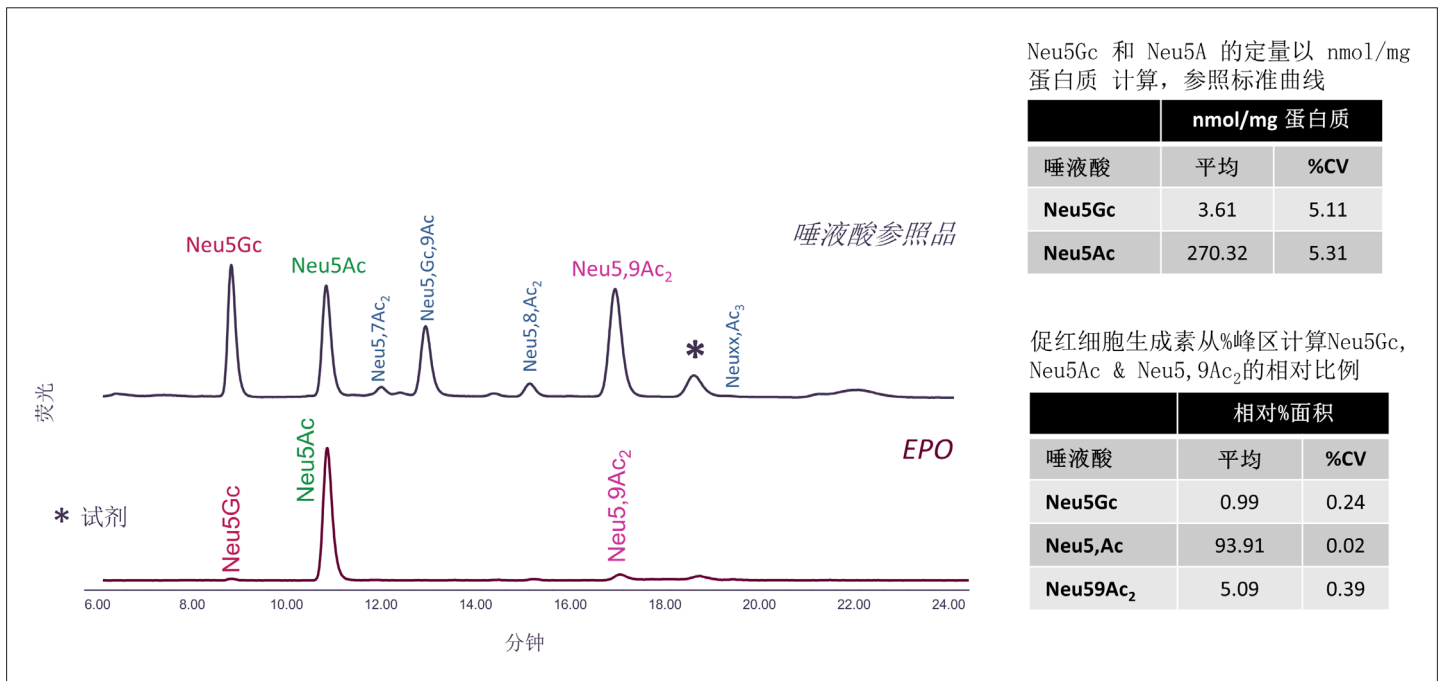


图 3. EPO中唾液酸的识别与定量。Ludger R1 HPLC 色谱柱分析

产品/订购信息

唾液酸释放和标记

LT-KDMB-A1 LudgerTag DMB 唾液酸释放和标记试剂盒

阳性对照品

GCP-FET-50U-X4 胎球蛋白标准品
BQ-GPEP-A2G2S2-10U LudgerBioQuant GPEP A2G2S2 糖肽标准品

唾液酸标准品

CM-NEUAC-01 N-乙酰神经氨酸 (Neu5Ac or NANA) 定量标准品
CM-NEUGC-01 N-羟乙酰神经氨酸 (Neu5Gc or NGNA) 定量标准品
CM-NEU5,9,AC2-01 5-N-乙酰基-9-O-乙酰基神经氨酸标准品 (Neu5,9Ac2)
CM-SRP-01 唾液酸参照品

LC 分析

LS-R1-4.6x150 LudgerSep R1 HPLC 色谱柱
LS-UR2-2.1x100 LudgerSep uR2 UHPLC 色谱柱

