

УДК 606

## Метод капиллярного зонного электрофореза для анализа гликозилированного рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона

© 2019 В.С. МОНАХОВА<sup>1,\*</sup>, М.Е. СУШКИН<sup>1</sup>, А.С. СИМБИРЦЕВ<sup>1</sup><sup>1</sup>ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург 197110

\*e-mail: v.s.monakhova@hpb.spb.ru

Поступила в редакцию 26.03.2019 г.

После доработки 20.06.2019 г.

Принята к публикации 17.07.2019 г.

Подобраны условия для анализа сиалированных изоформ рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) методом капиллярного зонного электрофореза. ФСГ является гипергликозилированным гетеродимером и содержит большое количество остатков сиаловых кислот, оказывающих влияние на его основные биологические и физико-химические свойства. Оптимального разделения белка на шесть изоформ удалось достичь, используя в качестве фонового электролита раствор с рН 4,3, содержащий 0,01 М трицина, 0,01 М хлорида натрия, 7 М мочевины и 2,5 мМ 1,4-диаминобутана.

*Ключевые слова:* изоформы фолликулостимулирующего гормона, капиллярный зонный электрофорез, сиаловые кислоты, фолликулостимулирующий гормон

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-4-55-64

Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) – гормон передней доли гипофиза, который играет важную роль в репродуктивной функции. Он отвечает, главным образом, за созревание фолликулов у женщин и участвует в сперматогенезе у мужчин [1]. Препараты рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона человека (рчФСГ) широко применяются для индукции овуляции яичников при проведении процедуры экстракорпорального оплодотворения.

ФСГ входит в семейство гормонов-гликопротеинов, включающее также тиреотропный гормон, лютеинизирующий гормон и хорионический гонадотропин. По своей структуре ФСГ является гетеродимером и состоит из двух цепей – альфа и бета. Альфа-цепь имеет аминокислотную последовательность идентичную последователь-

ности тиреотропного и лютеинизирующего гормонов и хорионического гонадотропина, последовательности бета-цепей у гормонов-гликопротеинов различны. Молекулярная масса ФСГ человека составляет 34 кДа и 35% от этой нее составляют гликаны [2]. У гликопротеина имеется 4 сайта N-гликозилирования: два – на альфа-цепи и два – на бета-цепи (рис. 1). Микрогетерогенность ФСГ определяется различным составом сахаров в составе N-гликанов.

Сиаловые кислоты являются концевыми остатками олигосахаридных цепей N-гликанов в составе ФСГ. Ввиду наличия отрицательного заряда сиаловые кислоты играют ключевую роль в определении заряда N-гликанов [3] и тем самым оказывают значительное влияние на биологическую активность и фармакокинетику белкового

*Список сокращений:* ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ДАБ – 1,4-диаминобутан; ДАП – 1,3-диаминопропан; рчФСГ – рекомбинантный фолликулостимулирующий гормон человека (hFSH); КЗЭ – метод капиллярного зонного электрофореза; ФСГ – фолликулостимулирующий гормон (FSH); ФЭ – фоновый электролит; ХГЧ – хорионический гонадотропин человека; ЭПО – эритропоэтин; МТ<sub>r</sub> – относительное время миграции; pI – изоэлектрическая точка; RSD – относительное стандартное отклонение.

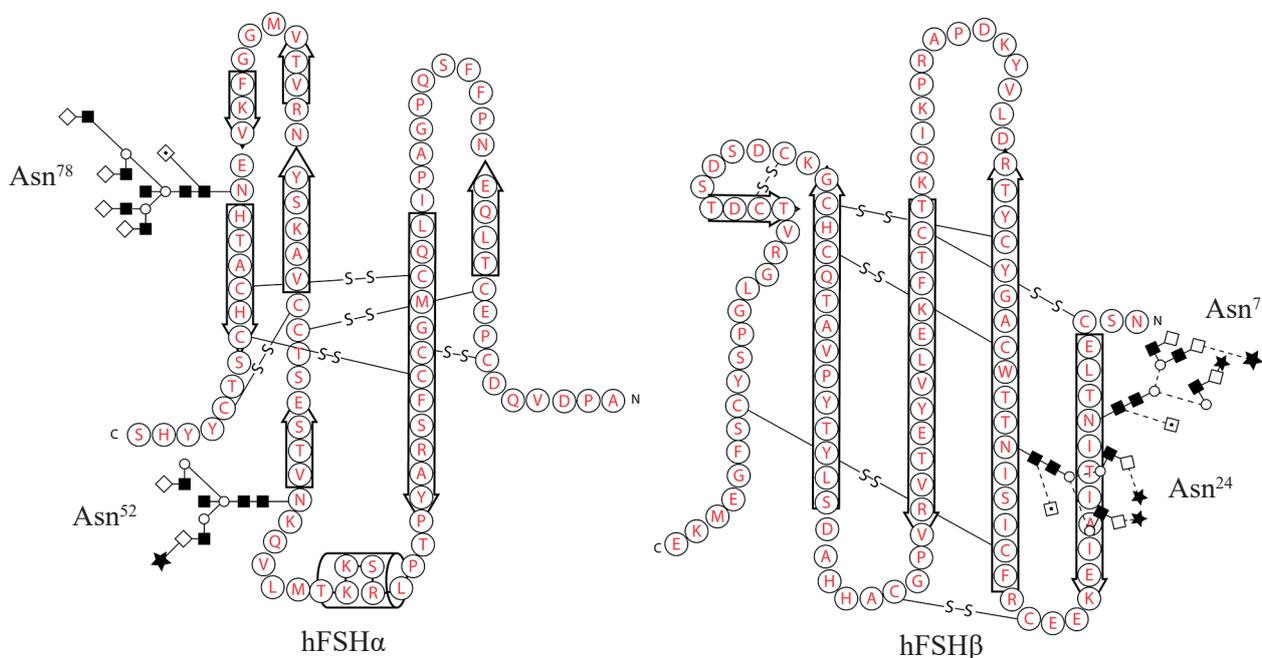
препарата ФСГ. Изоформы, содержащие меньшее количество сиаловых кислот, обладают большей биологической активностью, поскольку лучше связываются с рецептором [4, 5]. В свою очередь, изоформы с большим количеством сиаловых кислот дольше циркулируют в организме, оказывая терапевтический эффект [6]. Наличие сиаловых кислот в составе гликопротеина увеличивает время его циркуляции в организме, поскольку несиалированные белки распознаются асиалогликопротеиновыми рецепторами печени и элиминируются из системного кровотока.

В настоящее время существуют различные препараты фолликулостимулирующего гормона. Ряд препаратов содержит ФСГ, полученный из мочи постменопаузальных женщин, другие препараты получают с помощью рекомбинантных технологий. На микрогетерогенность белка в составе препарата могут оказывать влияние особенности технологии очистки белка [7] и условия культивирования клеток штамма-продуцента [8]. Поэтому необходим мониторинг состава изоформ белка как на стадии разработки препаратов ФСГ, так и на стадии контроля качества готового препарата.

Для оценки степени гликозилирования белков применяют различные подходы. В случае рчФСГ используют методы изоэлектрического

фокусирования и высокоэффективной жидкостной хроматографии с определением гликанового профиля. Метод изоэлектрического фокусирования позволяет определить изоэлектрические точки отдельных изоформ интактного белка. В работе [9] было показано, что рчФСГ представляет собой набор белков с рI в диапазоне 3,0–5,5. Также было показано, что различия в рI возникают вследствие наличия у гликопротеина сиаловых кислот. Данный метод был использован для оценки контроля качества препаратов рчФСГ в международном исследовании [10]. Метод ионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с последующей детекцией на масс-спектрометре был использован для количественной оценки сиалирования N-гликанов и дальнейшего контроля качества препарата рчФСГ [11]. В работе впервые было подсчитано гипотетическое зарядовое число Z для данного белка, представляющее собой сумму площадей гликоформ, каждая из которых умножена на соответствующее количество сиаловых кислот в составе гликана.

Капиллярный электрофорез является одним из методов анализа, позволяющий оценить сиалирование интактного белка. В настоящем исследовании осуществляли подбор условий для



**Рис. 1.** Строение цепей фолликулостимулирующего гормона hFSH $\alpha$ . Asn<sup>52</sup>, Asn<sup>78</sup>, Asn<sup>7</sup>, Asn<sup>24</sup> – сайты гликозилирования на альфа- и бета-цепи. Аминокислоты показаны графически буквами в кружках

**Fig. 1.** Follicle-stimulating hormone chains structure. Glycosylation sites Asn<sup>52</sup>, Asn<sup>78</sup> on alpha-chain and Asn<sup>7</sup>, Asn<sup>24</sup> on beta-chain are shown. The letters in the circles indicate amino acids

разделения изоформ рчФСГ методом капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ). Данный метод представляет собой анализ белков в тонком кварцевом капилляре под действием электрического поля. Изоформы белка разделяются в капилляре в зависимости от заряда и размера молекул в водном растворе, который называется фоновым электролитом. Капиллярный зонный электрофорез имеет ряд преимуществ: небольшой объем пробы, низкая стоимость реагентов, быстрота анализа.

Цель работы – создать оптимальную методику анализа, позволяющую разделить изоформы рчФСГ в зависимости от присутствия в их составе остатков сиаловых кислот.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Материалы

В работе были использованы трехводный ацетат натрия и хлорид натрия (Panreac, США), мочевины и трицин (Applichem, США), борная кислота и соляная кислота («Нева Реактив», Россия), гидроксид натрия (Sigma, США), 1,4-диаминобутан дигидрохлорид (ДАБ) (Acros Organics, США). Все растворы готовили на деионизованной воде Milli-Q (Merck-Millipore, Германия).

В исследовании использовали образец рчФСГ, полученный в клетках линии СНО, выделенный и очищенный из культуральной жидкости с помощью препаративной ВЭЖХ. Перед анализом белок диализовали против натрий-фосфатного буфера (Росмедбио, Россия) и концентрировали на колонках Amicon Ultra 0.5 (Merck Millipore) с пределом отсечения 10 кДа. Для десалирования белка применяли  $\alpha$ -2,3,6,8-нейраминидазу (New England Biolabs, США).

### Методы

Для определения оптимальных условий разделения в качестве фонового электролита были исследованы боратный буфер и электролит, используемый для анализа эритропоэтина в Статье Европейской фармакопеи [12].

### Приготовление боратного буфера

При проведении анализа использовали 100 мМ боратный буфер рН 8,9, содержащий 5 мМ ДАБ. Для приготовления буфера изначально готовили следующие растворы: 0,309 г борной кислоты растворяли в 10 мл деионизованной воды, получали 0,5 М раствор борной кислоты,

0,0882 г ДАБ добавляли в 1 мл деионизованной воды (1 М ДАБ). Далее смешивали 2 мл 0,5 М раствора борной кислоты и 50 мкл 1 М ДАБ, добавляли деионизованной воды до объема 8 мл, доводили рН до 8,9 с помощью 0,5 М раствора гидроксида натрия и вновь добавляли деионизованной воды до конечного объема 10 мл.

### Приготовление фонового электролита

За основу фонового электролита, был взят раствор, описанный в Статье Европейской фармакопеи для разделения сиалированных изоформ рекомбинантного эритропоэтина человека (ЭПО-раствор) [12].

Для приготовления ЭПО-раствора 0,0584 г хлорида натрия, 0,1729 г трицина и 0,136 г трехводного ацетата натрия растворяли в 10 мл деионизованной воды, получали концентрированный раствор фонового электролита. Далее 4,2 г мочевины растворяли в 7 мл деионизованной воды, в полученный раствор мочевины добавляли 1 мл концентрированного фонового электролита и 25 мкл 1М ДАБ, значения рН от 7,0 до 4,3 доводили 10%-ной уксусной кислотой или 1 М соляной кислотой (при отсутствии ацетата натрия в растворе) и добавляли деионизованную воду до конечного объема 10 мл.

### Проведение анализа

Капиллярный зонный электрофорез проводили с помощью системы для капиллярного электрофореза «Капель-105М» («Люмэкс», Россия). Для анализа использовали непокрытый кварцевый капилляр с внутренним диаметром 50 мкм, общей длиной 50 см и эффективной длиной 40 см. Новый капилляр последовательно промывали: деионизованной водой – 2 мин, 1 М раствором соляной кислоты – 10 мин, водой – 5 мин, 0,5 М раствором гидроксида натрия – 10 мин, водой – 5 мин. Ввод растворов осуществляли под давлением 2000 мбар. Непосредственно перед анализом использовали следующую схему промывки капилляра: 0,5 М раствор гидроксида натрия – 5 мин, вода – 3 мин, раствор фонового электролита – 5 мин для стабилизации базовой линии электрофореграммы. После промывки осуществляли ввод давлением образца (30 мбар, 10 с) и проводили анализ при постоянном напряжении 25 кВ и температуре 28 °С. Для детекции изоформ белка использовали ультрафиолетовый детектор (214 нм), установленный возле катодного выхода капилляра. После анализа промывали капилляр 0,1 М раствором гидроксида натрия в течение 3 мин.

## Обработка результатов анализа

Обработку результатов анализа проводили с помощью программы Эльфоран («Люмэкс»). Вычисляли площадь каждой изоформы в процентах от общей площади пиков белка, рассчитывали относительное стандартное отклонение (RSD, %). Для идентификации пиков также использовали относительное время миграции ( $MT_r$ ), равное отношению времени миграции отдельной изоформы белка ко времени миграции системного пика.

## Обработка образца белка $\alpha$ 2-3,6,8-нейраминидазой

Для проведения исследования к 50 мкл рЧФСГ (1 мг/мл) добавляли 35 мкл деионизованной воды, 5 мкл  $\alpha$ 2-3,6,8-нейраминидазы (50000 МЕ/мл) и 10 мкл буфера для нейраминидазы. Образец инкубировали 12 ч при 37 °С. Для дегазирования десалированного белка перед анализом образец центрифугировали при 2400 g.

## Электрофорез белков в полиакриламидном геле

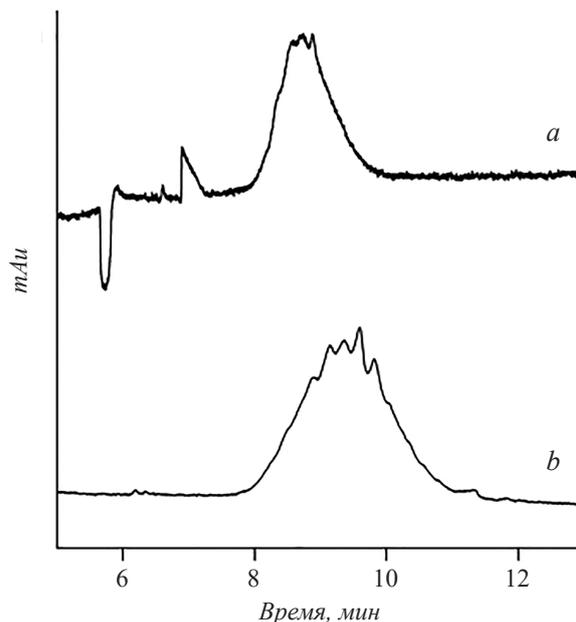
Электрофорез белка проводили по методу Лэммли в 3,75%-ном концентрирующем геле и 15%-ном разделяющем геле на установке Mini-PROTEAN II TETRA CELL (Bio-Rad, США). В качестве маркера молекулярных масс использовали Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Scientific, США). Пробы смешивали с буфером для нанесения, содержащем 400 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанола. Полученные образцы тщательно перемешивали, прогревали в течение 10 мин при 70 °С и переносили в лунки концентрирующего геля. Электрофорез белков проводили при напряжении 180 В в течение 1 ч. После трехкратной промывки геля в дистиллированной воде в течение 5 мин, проводили окрашивание раствором Optiblot Blue Gel Stain (Abcam, США) в течение 15 мин. Затем проводили трехкратную отмывку геля в дистиллированной воде в течение 10 мин.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Использование боратного буфера для разделения белка на изоформы

Рекомбинантный человеческий фолликуло-стимулирующий гормон ранее уже был объектом исследования в системе капиллярного зонного электрофореза. П.Л. Сторринг и соавт. использовали метод КЗЭ для прогноза биологической ак-

тивности гормона в зависимости от времени миграции рЧФСГ [10]. Тогда в исследовании не удалось достичь эффективного разделения белка на отдельные изоформы, поэтому для оценки скорости миграции использовали значение медианы мигрирующего пика белка. В качестве фонового электролита в работе использовали 100 мМ боратный буфер, pH 8,9, содержащий 5 мМ 1,3-диаминопропана. ДАП, являясь катионным амином, взаимодействует с отрицательно заряженными стенками капилляра и увеличивает время миграции белка. Это способствует наилучшему разделению гликоформ [13]. В настоящем исследовании вместо 1,3-диаминопропана использовали 1,4-диаминобутан. Такая замена является допустимой, так как ДАП и ДАБ в равной степени изменяют электроосмотический поток [14]. Единственным различием по сравнению с описанной методикой было использование более короткого капилляра – 40 см вместо 60 см. В эксперименте были получены аналогичные результаты, и не удалось получить значительного разделения изоформ белка (рис. 2а).



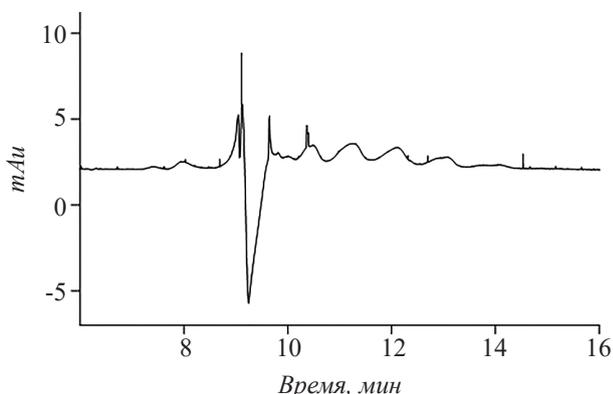
**Рис. 2.** Электрофореграмма анализа белка с использованием боратного буфера: *a* – 100 мМ боратный буфер (pH 8,9), 5 мМ ДАБ; *b* – 25 мМ боратный буфер (pH 8,8), 5 мМ ДАБ. Непокрытый кварцевый капилляр 50(40) см × 50 мкм; ввод образца давлением 30 мбар, 10 с; 25 кВ, 28 °С

**Fig. 2.** Electropherogram of protein analysis using borate buffer: (*a*), 100 mM borate buffer (pH 8.9), 5 mM DAB; (*b*), 25 mM borate buffer (pH 8.8), 5 mM DAB. 50(40) cm × 50  $\mu$ m bare fused-silica capillary; injection 30 mbar, 10 s; 25 kV, 28 °C.

В дальнейшем были предприняты попытки изменить условия анализа, согласно описанным в статье [15]. В данной работе изучали микрогетерогенность другого структурно схожего белка – хорионического гонадотропина человека (ХГЧ). Метод КЗЭ использовали для разделения сialiрированных изоформ ХГЧ. Для анализа в качестве фонового электролита также был выбран боратный буфер, но другой молярной концентрации и рН – 25 мМ, рН 8,8. В фоновый электролит, согласно данным статьи, также добавляли 5 мМ ДАП, который в нашем эксперименте был заменен на 5 мМ ДАБ. Применение фонового электролита данного состава также не позволило разделить изоформы рчФСГ (рис. 2*b*). Авторы статьи были вынуждены отказаться от использования боратного буфера и рассмотреть другие варианты фоновых электролитов, применяемых для разделения сialiрированных изоформ гликопротеинов.

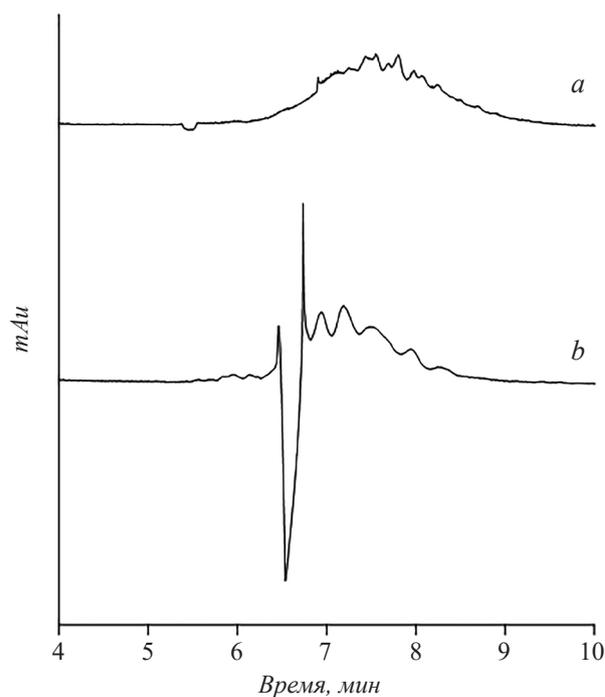
**Влияние компонентов ЭПО раствора на разделение сialiрированных изоформ рчФСГ**

С целью улучшения разделения изоформ и дальнейшей оптимизации условий была выбрана методика, описанная в Европейской фармакопее для анализа рекомбинантного эритропоэтина. Эритропоэтин, как и фолликулостимулирующий гормон, является гиперсialiрированным белком [16]. Фоновый электролит (ЭПО-раствор), используемый в анализе, содержал 0,01 М хлорида натрия, 0,01 М трицина, 0,01 М ацетата натрия, 7,0 М мочевины, 2,5 мМ ДАБ, рН 5,5. Для оптимизации разделения изменяли рН ЭПО-раствора в диапазоне 7,0–4,9. Наилучшего разделения пи-



**Рис. 3.** Электрофореграмма анализа рчФСГ с использованием ЭПО-раствора при рН 5,75. Условия проведения анализа см. на рис. 2

**Fig. 3.** Electropherogram of rhFSH analysis using EPO solution pH 5.75. Conditions as in Fig. 2



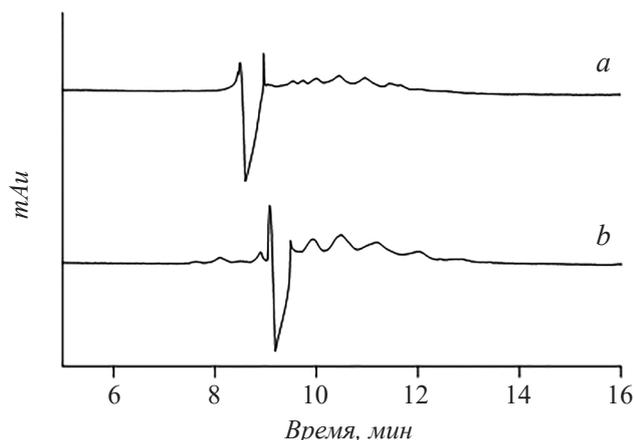
**Рис. 4.** Электрофореграмма, полученная при разделении изоформ рчФСГ, при удалении из ЭПО-раствора мочевины (а), ДАБ (b). Условия проведения анализа см. на рис. 2

**Fig. 4.** Electropherogram of rhFSH isoforms separation using EPO solution without (a) urea, (b) DAB. Conditions as in Fig. 2

ков удалось получить при рН 5,75, однако, происходило наложение системного пика на пики изоформ (рис. 3).

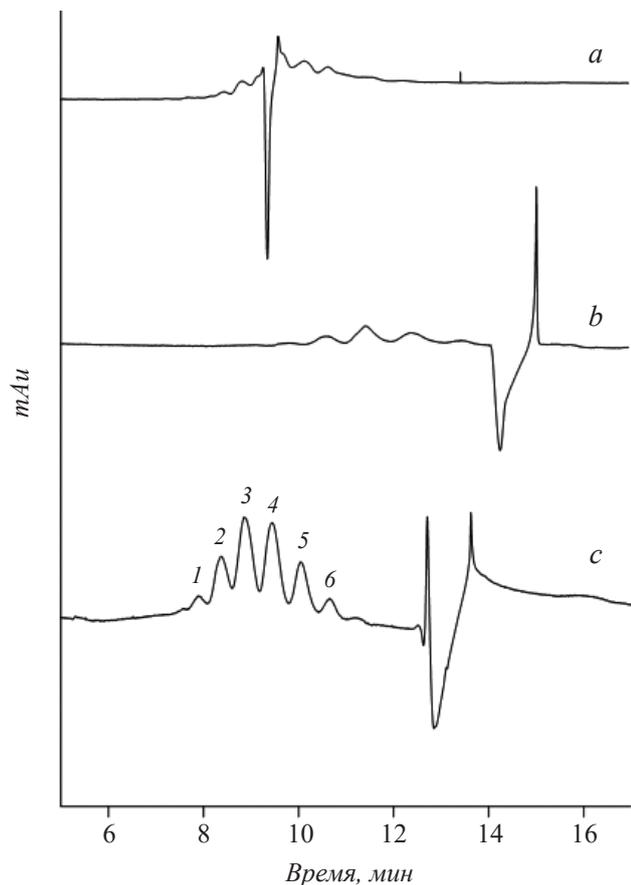
В дальнейшем было проведено исследование влияния отдельных компонентов фонового электролита на разделение сialiрированных изоформ рчФСГ. В процессе приготовления фонового электролита из состава раствора поочередно удаляли один из компонентов и проводили анализ. При удалении мочевины (рис. 4*a*) не происходило разделение белка на изоформы. Данный эффект можно объяснить тем, что мочевина препятствует агрегации белковых молекул, тем самым способствуя разделению белка на изоформы. При удалении ДАБ (рис. 4*b*) анализ проходил быстрее, разрешение между пиками изоформ уменьшалось, системный пик относительно пиков изоформ не сдвинулся.

Более высокую скорость анализа можно объяснить отсутствием взаимодействия между положительно заряженными аминогруппами ДАБ и отрицательно заряженной внутренней поверхностью капилляра, что приводит к увеличению электроосмотического потока [17]. При удалении хлорида натрия разделение ухудшилось, что,



**Рис. 5.** Электрофореграмма, полученная при разделении изоформ рчФСГ, при удалении из ЭПО-раствора (а) хлорида натрия, (б) трицина. Условия проведения анализа см. на рис. 2

**Fig. 5.** Electropherogram of rhFSH isoforms separation using EPO solution without (a) sodium chloride, (b) tricine. Conditions as in Fig. 2



**Рис. 6.** Электрофореграмма, полученная при разделении изоформ рчФСГ, для ЭПО-раствора без ацетата натрия: а – рН 5,75; б – рН 4,7; с – рН 4,3. 1–6 – пики изоформ. Условия проведения анализа см. на рис. 2

**Fig. 6.** Electropherogram of rhFSH isoforms separation using EPO solution without sodium acetate: (a) pH 5.75, (b) pH 4.7, (c) pH 4.3. 1–6 – пики изоформ. Conditions as in Fig. 2

вероятно, было связано со снижением ионной силы раствора и уменьшением стэкинг-эффекта (рис. 5а). Мочевина, ДАБ и хлорид натрия являются модифицирующими добавками при оптимизации состава фонового электролита.

При удалении трицина и использовании ацетата натрия в качестве основного компонента фонового электролита разделение ухудшалось (рис. 5б).

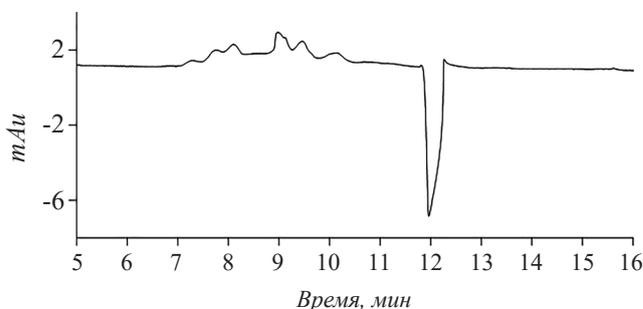
При удалении ацетата натрия и сохранении рН 5,75 относительное время миграции системного пика не менялось, вместе с тем разделение пиков изоформ белка оставалось удовлетворительным (рис. 6а). Данный состав фонового электролита был также успешно применен в работе, посвященной разделению сиалированных изоформ эритропоэтина [18].

Таким образом, было показано, что сочетание трицина и модифицирующих добавок (хлорид натрия, ДАБ, мочевина) является оптимальным в качестве фонового электролита для разделения изоформ рчФСГ. При удалении ацетата натрия и снижении рН до 4,7, а затем до 4,3 наблюдался сдвиг системного пика относительно пиков изоформ белка без существенного ухудшения разделения (см. рис. 6б, 6с).

Данные условия были наиболее оптимальными для разделения сиалированных изоформ рчФСГ. На электрофореграмме определялось шесть отдельных пиков изоформ. Был проведен контрольный эксперимент, в котором в качестве фонового электролита выступал ЭПО-раствор с рН 4,3, в результате происходило ухудшение разделения пиков (рис. 7).

#### Анализ десалированного белка с помощью оптимизированной методики

Для подтверждения разделения рчФСГ на сиалированные изоформы гликопротеин обрабатывали нейраминидазой. Успешное десалирование



**Рис. 7.** Электрофореграмма анализа рчФСГ с использованием ЭПО-раствора, рН 4,3. Условия проведения анализа см. на рис. 2

**Fig. 7.** Electropherogram of rhFSH analysis using EPO solution pH 4.3. Conditions as in Fig. 2

белка было подтверждено с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (рис. 8). Молекулярная масса цепей гормона снизилась на 2–4 кДа, что согласуется с данными, полученными в статье [19] о молекулярной массе десиализованного белка.

При проведении КЗЭ десиализованного рчФСГ разделение на изоформы не происходило. На электрофореграмме (рис. 9) видно, что широкий пик белка, обработанного ферментом, выходил раньше, чем пики гетерогенного гликопротеина до обработки нейраминидазой. Смещение пика происходило вследствие удаления отрицательно заряженных сиаловых кислот из состава гликанов, что приводило к более быстрой миграции белка к катоду.

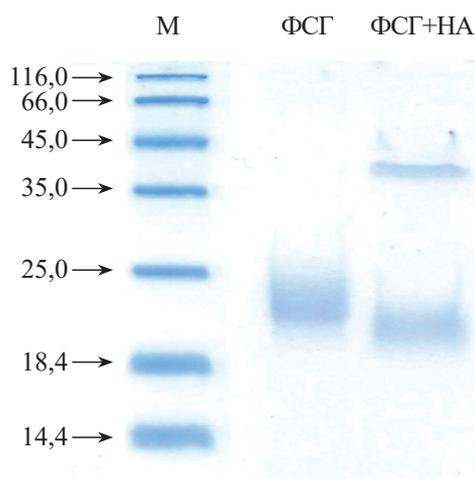
### Прецизионность методики

После того, как были подобраны оптимальные условия разделения сиалированных форм рекомбинантного ФСГ, оценивали показатели прецизионности метода, т.е. сходимости и воспроизводимости. Также было подсчитано относительное стандартное отклонение. В расчетах системный пик использовали как внутренний стандарт для определения относительного времени миграции отдельных изоформ. Относительное время миграции также может быть использовано для идентификации пиков изоформ белка.

Для определения сходимости результатов была проведена серия из трех анализов в течение одного дня. Относительное стандартное отклонение по времени составило не более 1,02%, по площади пика – 1,4% (табл. 1).

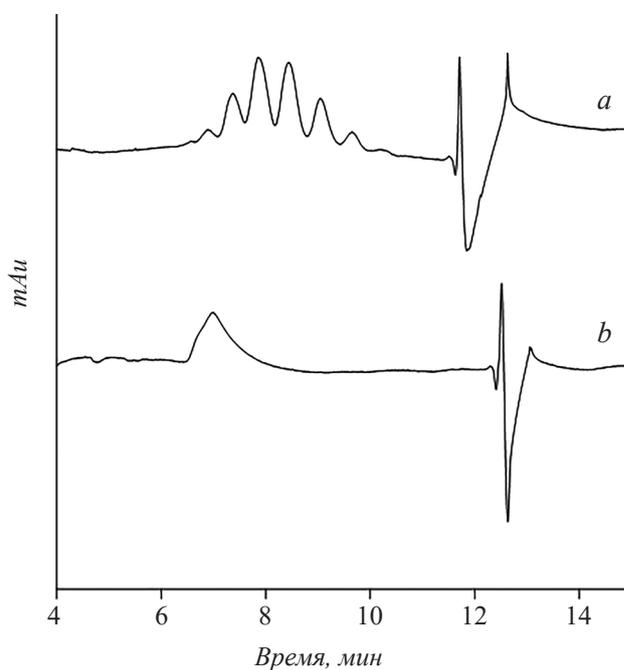
Воспроизводимость результатов оценивали при анализе одного и того же образца в один день с использованием разных фоновых электролитов и анализе одного и того же образца на одном и том же электролите в разные дни. Результаты приведены в табл. 2 и табл. 3. RSD по времени выхода пиков составляло менее 5%, RSD по площади пиков превысило 5% только для краевых пиков. В статье Розмана Д.С. и Вейнберга Р., посвященной разделению изоформ гепаран-N-сульфатазы, также отмечено увеличение RSD для краевых пиков вследствие их небольшой площади [20]. По этой причине в работе Alahmad et al. валидацию методики разделения изоформ интерлейкина-7 проводили только для центральных пиков [21].

Было подсчитано относительное стандартное отклонение по времени выхода системного пика, во всех случаях оно составляло не более 2,21%.



**Рис. 8.** Электрофорез в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях сиалированного и десиализованного рчФСГ. М – маркер молекулярной массы, ФСГ – фолликулостимулирующий гормон, НА – нейраминидаза

**Fig. 8.** Denaturing polyacrylamide gel electrophoresis of sialylated and desialylated rhFSH. M – molecular weight marker, ФСГ (FSH) – follicle-stimulating hormone, НА (NA) – neuraminidase



**Рис. 9.** Электрофореграмма анализа десиализованного белка с использованием оптимизированной методики: (a) необработанный рчФСГ, (b) десиалированный рчФСГ. Условия проведения анализа см. на рис. 2

**Fig. 9.** Electropherogram of desialylated protein analysis using optimized EPO method: (a) non-treated rhFSH, (b) desialylated rhFSH. Conditions as in Fig. 2

Таблица 1

**Сходимость результатов анализа**  
**Repeatability of analysis results**

| Пик           | Время, мин | RSD по времени, % | Площадь, % | RSD по площади, % | MT <sub>r</sub> |
|---------------|------------|-------------------|------------|-------------------|-----------------|
| 1             | 6,9        | 0,41              | 2,8        | 1,3               | 0,59            |
| 2             | 7,4        | 0,22              | 15,3       | 0,4               | 0,63            |
| 3             | 7,9        | 0,38              | 29,9       | 0,3               | 0,67            |
| 4             | 8,5        | 0,26              | 29,1       | 0,2               | 0,72            |
| 5             | 9,1        | 0,41              | 17,3       | 0,7               | 0,77            |
| 6             | 9,7        | 0,28              | 5,7        | 1,4               | 0,82            |
| Системный пик | 11,8       | 1,02              | –          | –                 | –               |

*Примечание:* Здесь, в табл. 2 и 3 приведены средние значения времени миграции и относительных площадей пиков изоформ белка.

*Note:* Here and in table 2 and table 3 average values of migration time and relative peak areas are given protein isoform.

Таблица 2

**Воспроизводимость результатов анализа в один день с использованием разных фоновых электролитов**  
**Intra-day reproducibility using two different electrolytes**

| Пик           | Время, мин |       | RSD по времени, % | Площадь, % |       | RSD по площади, % | MT <sub>r</sub> |
|---------------|------------|-------|-------------------|------------|-------|-------------------|-----------------|
|               | ФЭ №1      | ФЭ №2 |                   | ФЭ №1      | ФЭ №2 |                   |                 |
| 1             | 7,0        | 6,9   | 0,78              | 3,4        | 2,8   | 8,49              | 0,58            |
| 2             | 7,5        | 7,4   | 1,31              | 16,3       | 15,8  | 6,81              | 0,62            |
| 3             | 8,0        | 7,9   | 1,34              | 30,6       | 30,7  | 1,89              | 0,66            |
| 4             | 8,6        | 8,5   | 1,38              | 28,4       | 28,6  | 2,05              | 0,71            |
| 5             | 9,2        | 9,1   | 1,50              | 16,0       | 16,3  | 4,87              | 0,76            |
| 6             | 9,8        | 9,7   | 1,47              | 5,2        | 5,4   | 8,78              | 0,81            |
| Системный пик | 12,1       | 12,0  | 1,77              | –          | –     | –                 | –               |

Таблица 3

**Воспроизводимость результатов анализа в разные дни с использованием одного и того же электролита**  
**Inter-day reproducibility using the same electrolyte**

| Пик           | Время, мин |        | RSD по времени, % | Площадь, % |        | RSD по площади, % | MT <sub>r</sub> |
|---------------|------------|--------|-------------------|------------|--------|-------------------|-----------------|
|               | День 1     | День 2 |                   | День 1     | День 2 |                   |                 |
| 1             | 7,0        | 6,9    | 1,06              | 3,3        | 2,8    | 6,67              | 0,58            |
| 2             | 7,4        | 7,3    | 1,54              | 16,3       | 16,2   | 2,25              | 0,61            |
| 3             | 7,9        | 8,0    | 1,53              | 30,1       | 30,4   | 1,12              | 0,65            |
| 4             | 8,5        | 8,7    | 1,64              | 28,9       | 28,8   | 0,74              | 0,70            |
| 5             | 9,1        | 9,2    | 1,70              | 16,0       | 16,0   | 0,91              | 0,75            |
| 6             | 9,7        | 9,8    | 1,71              | 5,4        | 5,5    | 1,39              | 0,80            |
| Системный пик | 12,1       | 12,0   | 2,21              | –          | –      | –                 | –               |

*Примечание:* площадь системного пика в расчетах не учитывалась.

*Note:* the area of the system peak was not taken into account in the calculations.

Таким образом, в работе удалось подобрать условия для разделения сиалированных форм интактного рчФСГ с помощью капиллярного зонного электрофореза. Оптимизировав существующую методику анализа для эритропоэтина, удалось достичь разделения рчФСГ на шесть изоформ. Данная методика может быть использована для оценки соотношения сиалированных форм не только рекомбинантных препаратов ФСГ, но и белка, полученного из других источников.

## ЛИТЕРАТУРА

- Pierce J.G., Parsons T.F. Glycoproteins hormones: structure and functions. *Annual. Rev. Biochem.*, 1981, 50(1), 465–495. doi: 10.1146/annurev.bi.50.070181.002341
- Ленинджер А. Основы биохимии. Том 3. М.: Мир, 1985.
- Шпаков А.О. Гонадотропины – от теории к клинической практике. СПб: Политех-пресс, 2018.
- Bousfield G.R., Butnev V.Y., Rueda-Santos M.A. Macro and Micro Heterogeneity in Pituitary and Urinary Follicle-Stimulating Hormone Glycosylation. *J. Glycomics Lipidomics*, 2014, 125(4), 1–16. doi: 0.4172/2153-0637.1000125
- Davis J.S., Kumar T.R., May J.V., Bousfield G.R. Naturally occurring follicle-stimulating hormone glycosylation variants. *J. Glycomics Lipidomics*, 2014, 117(4), 1–5. doi: 10.4172/2153-0637.1000e117
- Wide L., Eriksson K. Low-glycosylated forms of both FSH and LH play major roles in the natural ovarian stimulation. *Upsala J. Med. Sci.*, 2018, 123(2), 100–108. doi: 10.1080/03009734.2018.1467983
- Ribela M.T., Gout W.P., Bartolini P. Synthesis and chromatographic purification of recombinant human pituitary hormones. *J. Chromatography B*, 2003, 790(1–2), 285–316. doi: 10.1016/S1570-0232(03)00125-9
- Chotigeat W., Watanapokasin Y., Mahler S., Gray P.P. Role of environmental conditions on the expression levels, glycoform pattern and levels of sialyltransferase for hFSH produced by recombinant CHO cells. *Cytotechnology*, 1994, 15(1–3), 217–221. doi: 10.1007/BF00762396
- Cerpa-Poljak A., Bishop L.A., Hort Y.J., et al. Isoelectric charge of recombinant human follicle-stimulating hormone isoforms determines receptor affinity and in vitro bioactivity. *Endocrinology*, 1991, 132(1), 351–356. doi: 10.1210/endo.132.1.8419133
- Storring P.L., Das R.E.G., Mulders J.W.M., Halder M. Physicochemical methods for predicting the biological potency of recombinant follicle stimulating hormone: an international collaborative study of isoelectric focusing and capillary zone electrophoresis. *Biologicals*, 2002, 30(3), 217–234. doi: 10.1006/biol.2002.0333
- Gervais A., Hammel Y.-A., Pelloux S., et al. Glycosylation of human recombinant gonadotrophins: characterization and batch-to-batch consistency. *Glycobiology*, 2003, 13(3), 179–189. doi: 10.1093/glycob/cwg020
- Erythropoietin concentrated solution. Ph. Eur. 9<sup>th</sup> edition. 2391.
- Choi D., Kim M., Park J. Erythropoietin: physico- and biochemical analysis. *J. Chromatography B*, 1996, 687(1), 189–199. doi: 10.1016/S0378-4347(96)00308-8
- Davis J.M., Arakawa T., Strickland T.W., Yphantis D.A. Characterization of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry*, 1987, 26(9), 2633–2638. doi: 10.1021/bi00383a034
- Morbeck D.E., Madden B.J., McCormick D.J. Analysis of the microheterogeneity of the glycoprotein chorionic gonadotropin with high-performance capillary electrophoresis. *J. Chromatography A*, 1994, 680(1), 217–224. doi: 10.1016/0021-9673(94)80070-7
- Jiang J., Tian F., Cai Y, et al. Site-specific qualitative and quantitative analysis of N- and O-glycoforms in recombinant human erythropoietin. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, 406(25), 6265–6274. doi: 10.1007/s00216-014-8037-8
- Pantazaki A., Taverna M., Vidal-Madja C. Recent advances in the capillary electrophoresis of recombinant glycoproteins. *Analytica Chimica Acta*, 1999, 383(1–2), 137–156. doi: 10.1016/S0003-2670(98)00495-4
- Watson E., Yao F. Capillary electrophoretic separation of human recombinant erythropoietin (r-HuEPO) glycoforms. *Anal. Biochem.*, 1993, 210(2), 389–393. doi: 10.1006/abio.1993.1212
- Na K.H., Kim S.C., Seo K.S., et al. purification and characterization of recombinant human follicle stimulating hormone produced by chinese hamster ovary cells. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, 15(2), 395–402.
- Roseman D.S., Weinberger R. Quantitative capillary zone electrophoresis method for the precise determination of charge differences arising from the manufacture of heparan-N-sulfatase. *J. Pharmaceutical Biomedical Analysis*, 2013, 85, 67–73. doi: 10.1016/j.jpba.2013.05.018
- Alahmad Y., Tran T.N., Duboeuf J., et al. CZE for glycoform profiling and quality assessment of recombinant human interleukin-7. *Electrophoresis*, 2009, 30(13), 2347–2354. doi: 10.1002/elps.200800789

# A Capillary Zone Electrophoresis Method for Analysis of Glycosylated Recombinant Human Follicle-Stimulating Hormone

V.S. MONAKHOVA<sup>1,\*</sup>, M.E. SUSHKIN<sup>1</sup>, and A.S. SIMBIRTSEV<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St.-Petersburg, 197110 Russia*

\**e-mail: v.s.monakhova@hpb.spb.ru*

Received March 26, 2019

Revised June 20, 2019

Accepted July 17, 2019

**Abstract**—Conditions for analyzing sialylated isoforms of recombinant follicle-stimulating hormone (FSH) by the method of capillary zone electrophoresis have been selected. Follicle-stimulating hormone is a glycosylated heterodimer with the large number of sialic acids that affect its basic biological and physicochemical properties. The optimum protein separation into 6 isoforms was achieved using as a background electrolyte of a solution with pH 4.3 containing 0.01 M trycin, 0.01 sodium chloride, 7 M urea and 2.5 mM 1,4-diaminobutane.

*Key words:* follicle-stimulating hormone isoforms, capillary zone electrophoresis, sialic acids, follicle-stimulating hormone.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2019-35-4-55-64