

## 糖基化修饰对重组 CTLA4-Ig 稳定性影响的研究

朱磊<sup>1</sup>, 单改仙<sup>2</sup>, 王兰<sup>3\*</sup>

(1. 火箭军总医院 特勤医学科, 北京 100088; 2. 解放军第 306 医院放疗科, 北京 100101;

3. 中国食品药品检定研究院 单克隆抗体产品室 卫生部生物技术产品检定方法及标准化重点实验室, 北京 102629)

**摘要** 目的: 探讨糖基化修饰对细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 抗体融合蛋白 (CTLA4-Ig) 融合蛋白稳定性的影响。方法: 应用多种糖苷酶 N-糖苷酶 F (PNGase F)、内切糖苷酶 F2 (EndoF2)、唾液酸酶 (neuraminidase) 和 O-糖苷酶 (O-glycosidase) 对样品进行处理。通过分子排阻色谱 (SEC) 测定不同酶切时间处理后样品纯度变化; 应用差示扫描荧光 (DSF) 测定样品整体热力学参数的变化; 应用差示扫描量热 (DSC) 测定样品各结构域热力学参数变化; 在 45 °C 条件下加热, 分别于 0、1、3、5、7、9、11 和 12 周取样, 通过 SEC 测定样品纯度的变化。结果: 在 N-糖苷酶 F、内切糖苷酶 F2 和唾液酸酶分别处理过程中, CTLA4-Ig 的聚体含量逐渐增加, 而 O-糖苷酶酶切过程中, 聚体虽无明显变化, 但碎片含量逐渐增加; 经 DSF 测定, N-糖苷酶 F 和内切糖苷酶 F2 处理后解链温度 ( $T_m$ ) 均明显下降, 而唾液酸酶和 O-糖苷酶处理后  $T_m$  无明显变化; 经 DSC 测定, N-糖苷酶 F 和内切糖苷酶 F2 处理后  $T_m1$  下降,  $T_m2$  不变,  $T_m3$  上升, 而唾液酸酶处理后  $T_m1$  和  $T_m3$  都略微有所上升,  $T_m2$  基本不变, O-糖苷酶处理后  $T_m$  值均变化; 加速试验过程中, N-糖苷酶 F 和唾液酸酶处理样品的聚体上升, 内切糖苷酶 F2 处理样品的聚体不变; O-糖苷酶处理样品的聚体不变, 而碎片偏高。结论: 通过多种分析手段研究发现, 糖基化修饰与 CTLA4-Ig 的稳定性密切相关。

**关键词:** 细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 抗体融合蛋白; 融合蛋白; 单抗类药物; 糖基化修饰; 稳定性; N-糖基化; O-糖基化

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2019) 01-0070-08

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.01.09

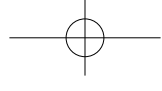
## Effect of glycosylation modification on the stability of recombinant CTLA4-Ig

ZHU Lei<sup>1</sup>, SHAN Gai-xian<sup>2</sup>, WANG Lan<sup>3\*</sup>

(1. Special Service Department, The General Hospital of the Rocket Force PLA, Beijing 100088, China; 2. Department of Radiation Oncology, PLA No. 306 Hospital, Beijing 100101, China; 3. Division of Monoclonal Antibody, National Institutes for Food and Drug Control, Key Laboratory of the Ministry of Health for Research on Quality and Standardization of Biotech Products, Beijing 102629, China)

**Abstract Objective:** To investigate the effect of glycosylation modification on the stability of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4-immunoglobulin (CTLA4-Ig). **Methods:** The samples were

\* 通信作者 Tel: (010) 53852159; E-mail: iamouran@163.com  
第一作者 Tel: 17310750260; E-mail: zhulei217@126.com



treated with various glycosidase enzymes ( PNGase F, EndoF2, neuraminidase and *O*-glycosidase ). the changes of sample purity were determined by molecularsize exclusion chromatography ( SEC ), tested overall thermodynamic parameters by differential scanning fluoroscopy ( DSF ), and analyzed by differential scanning calorimetry ( DSC ) for each domain thermodynamic parameters. Heated at 45 °C, the samples were determined by SEC for purity analysis at 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11 and 12 weeks, respectively. **Results:** During the treatment of PNGase F, EndoF2 and neuraminidase, respectively, the content of CTLA4-Ig polymer increased gradually. The dimer had no obvious variation in *O*-glycosidase digestion process, but the debris content gradually increased. DSF analysis showed that the melting temperature ( $T_m$ ) of samples treated with PNGase F and EndoF2 were significantly decreased, while that of treated with neuraminidase and *O*-glycosidase were no significant changes. DSC analysis showed that  $T_{m1}$  decreased,  $T_{m2}$  remained unchanged and  $T_{m3}$  increased after PNGase F and EndoF2 treatment,  $T_{m1}$  and  $T_{m3}$  slightly increased and  $T_{m2}$  remained unchanged after neuraminidase treatment, and  $T_m$  values changed after *O*-glycosidase treatment. In the accelerated experiment, the dimers of PNGase F and neuraminidase treated samples increased, it was unchanged to EndoF2 treated samples. To *O*-glycosidase treated samples, the dimer unchanged, while the fragments were slightly higher. **Conclusion:** It was found that glycosylation modification was closely related to the stability of CTLA4-Ig by various analytical methods.

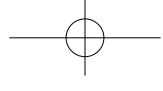
**Keywords:** CTLA4-Ig; fusion protein; monoclonal antibody; glycosylation modification; stability; *N*-glycosylation; *O*-glycosylation

自从 1986 年美国食品药品监督管理局批准抗 CD3 单抗以来,已经有超过 70 种治疗性单克隆抗体及其衍生物获得批准上市,其中单克隆抗体衍生物包括抗体的结合片段、Fc 融合蛋白、放射免疫复合物、抗体偶联药物以及双功能抗体<sup>[1]</sup>,其被广泛地应用到人类的疾病治疗过程中,包括肿瘤、风湿、感染、高血压以及高血脂等<sup>[2-5]</sup>。与小分子药物所不同,单抗类药物是高分子量的蛋白质,虽然具有较高的异质性,但又被广泛地应用,这是因为它们的异质性具有可控性,功能具有特异性,并且具有较长的半衰期。

抗体融合蛋白一般都具有  $1.00 \times 10^5 \sim 1.50 \times 10^5$  的高相对分子质量,且含有非常复杂的翻译后修饰<sup>[6]</sup>。这些复杂的翻译后修饰,糖基化修饰无疑是其中最为重要的一种。糖基化修饰可以改变蛋白质的性质,如药代动力学、功能、免疫原性、溶解性以及稳定性等<sup>[7]</sup>。以往研究表明,表达系统、蛋白质的空间构象以及发酵条件等都可以影响糖基化修饰。诸多的影响因素不但可以导致糖谱的改变,而且可以改变糖基化修饰位点<sup>[8]</sup>。糖基化修饰过程在细胞内是一个复杂的酶联反应过程,这一过程受到多种因素的影响,包括可以获得的前体糖单元、辅助因子以及酶的活性水平等,所有的这些决定了最终蛋白上所修饰的糖结构<sup>[9]</sup>。综上所述,糖基化修饰对于糖蛋白来说非常重要。

类风湿性关节炎是一种常见的疾病,在美国发病率大约有 1%<sup>[10]</sup>,我国发病率略低,大约 0.42%<sup>[11]</sup>。T 细胞在类风湿关节炎 ( RA ) 的发生和发展过程中起到重要的作用,如 Th17 的激活可以诱导抗瓜氨酸蛋白的抗体,从而对骨和关节产生损伤<sup>[12]</sup>。抗原提呈细胞 ( APC ) 通过主要组织相容性复合体 ( MHC ) 和免疫共刺激分子双信号激活 T 细胞,通过信号级联反应促进多种细胞因子,从而导致骨等组织的损伤。治疗 RA 常用的抗体类药物包括阿达木单抗 ( ADA ) 等单抗药物,以及融合蛋白阿巴西普 ( ABT )。这些药物的主要作用机理分为两类:其一,针对级联反应终末期的细胞因子,阻断其发挥生物学功能,从而减少骨等组织的损伤;其二,针对反应的启动阶段,阻止 T 细胞的激活,从而在源头阻断免疫级联反应的发生,其典型代表为 ABT。2005 年 FDA 批准 ABT 用于治疗顽固性 RA,经过十多年的应用,给 RA 患者带来了福音<sup>[13]</sup>。

ABT 是一种融合蛋白,由两部分组成:人 CTLA4 的胞外段和人  $\gamma 1$  型免疫球蛋白的 Fc 段 ( 铰链区, CH2 和 CH3 结构域 )。其作用机理是通过高亲和力与 APC 表面分子 CD80 或者 CD86 结合,从而阻断其与 T 细胞表面的 CD28 结合,使 T 细胞丧失第二活化信号,以阻断 T 细胞的活化。CTLA4-Ig 被批准用于急性复发性 RA 的病人,以减轻关节炎症和疼痛,从



而减少关节损伤<sup>[14]</sup>。但是,蛋白类药物都是在哺乳动物细胞内表达,分子量大,结构复杂、含大量翻译后修饰。大量研究发现翻译后修饰对蛋白质的结构和功能具有重要的影响。而 CTLA4-Ig 作为融合蛋白既有可结晶片段部分,也有 CTLA-4 胞外段,这两部分都存在复杂的糖基化修饰。在以前的研究中发现,此融合蛋白含有 6 个 *N*-糖基化位点,每个位点的糖基化种类与普通单抗药物类似,但糖结构更加复杂,且含有较高比例的末端唾液酸,与此同时,在铰链区 T8-9 肽段的 2、8、11 和 20 位的丝氨酸上存在 *O*-糖基化修饰<sup>[15]</sup>。虽然 FDA 在 2005 年就已批准用于临床,但是对其糖基化修饰研究报道很少,并且其还存在复杂的 *O*-糖基化修饰;再者糖基化修饰对其结构和稳定性影响的研究未见报道。各种糖苷酶的商业化,为糖蛋白的糖基化修饰研究提供了很好的基础,例如本文所应用的 4 种酶, *N*-糖苷酶 F 可以将天冬酰胺上的 *N*-糖完全酶切掉,但是同时将天冬酰胺转化为天冬氨酸;内切糖苷酶 F2 是在 2 个 *N*-乙酰葡萄糖胺间进行酶切,将 1 个 *N*-乙酰葡萄糖胺残基保留在蛋白质上;唾液酸酶可以切除 *N*-糖和 *O*-糖末端的唾液酸; *O*-糖苷酶则可以切除不含唾液酸的 *O*-糖残基<sup>[15]</sup>。本研究详细探讨了 CTLA4-Ig 的糖基化修饰与其稳定性的关系,为 CTLA4-Ig 的质量控制提供参考,同时为 CTLA4-Ig 生物类似药研究打下基础。

## 1 实验材料

### 1.1 试剂

超纯水(Millipore 公司 Milli-Q 制水系统制备),磷酸二氢钾、氢氧化钾、氯化钠、二水合磷酸二氢钠、十二水合磷酸氢二钠、浓盐酸、乙酸铵、无水氯化钙、碳酸氢铵均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司), *N*-糖苷酶(PNGase F)、*O*-糖苷酶(*O*-glycosidase)、唾液酸酶(neuraminidase)、内切糖苷酶 F2(EndoF2)(上海张江生物技术有限公司), Protein Thermal Shift Dye Kit(Applied Biosystems 公司), Decon 90 清洗剂(英国迪康公司)。

### 1.2 样品

CTLA4-Ig 融合(中国食品药品检定研究院留样)。

### 1.3 主要仪器设备及耗材

超高压液相色谱仪 H-class Bio 系统(Waters 公司), Acquity UPLC BEH200 SEC 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 1.7 μm; Waters 公司), 7500 Fast Real-

Time PCR 系统(Applied Biosystems 公司), DSC 系统(Malvern 公司), 电泳仪(Bio-Rad 公司), GS 800 校准型光密度仪(Bio-Rad 公司)。

## 2 试验方法

### 2.1 SEC 测定不同酶切时间处理前后样品纯度

**2.1.1 样品的酶切处理** ① *N*-糖苷酶 F 酶切:取样品 30 mg,加入 *N*-糖苷酶 F300 μL,补充酶切缓冲液至 4.5 mL, 37 °C 水浴酶切,即得 *N*-糖苷酶 F 酶切组;同时设立对照组,不加酶。② 内切糖苷酶 F2 酶切:取样品 30 mg,加入内切糖苷酶 F2 酶 0.6 mg,补充酶切缓冲液至 7.5 mL, 37 °C 水浴酶切,即得内切糖苷酶 F2 酶切组;同时设立对照组,不加酶。③ 唾液酸酶酶切:取样品 60 mg,加入唾液酸酶 1.5 mL,补充酶切缓冲液至 15 mL, 37 °C 水浴酶切,即得唾液酸酶酶切组;同时设立对照组,不加酶。④ *O*-糖苷酶酶切:取③中唾液酸酶酶切后的样品 30 mg,应用 50 kDa 超滤离心管置换缓冲液至 *O*-糖苷酶酶切缓冲液,并去除唾液酸酶后,加入 *O*-糖苷酶 450 μL,补充酶切缓冲液至 35 mL, 37 °C 水浴酶切,即得 *O*-糖苷酶酶切组;同时设立对照组,不加酶。

在 0、2、4、6、8、12、16、20、22、24 和 26 h 分别取以上各酶切组及其对照组的蛋白质 2 mg,应用 50 kDa 超滤离心管,将其置换到 2 mL PBS 缓冲液中,在此过程中同时去除了酶切体系中的酶,以进行后续的实验研究。

**2.1.2 液相色谱条件** 采用 Acquity UPLC BEH200 SEC(4.6 mm × 150 mm, 1.7 μm)色谱柱,柱温 25 °C,流动相(0.2 mol · L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾, 0.9% 氯化钠, pH 6.8),流速 0.2 mL · min<sup>-1</sup>,检测波长 280 nm,运行时间 12 min,进样量 10.0 μg。

**2.2 DSF 测定不同酶切时间处理前后在完整蛋白水平热力学参数变化**

**2.2.1 样品的配切处理** 同“2.1.1”项下方法。

**2.2.2 DSF 条件** 起始温度 25 °C,最终温度 99 °C,温度变化速率 1%,进样量 12.5 μg。

**2.3 DSC 测定不同酶切时间处理前后各结构域热力学参数变化**

**2.3.1 样品的配切处理** 同“2.1.1”项下方法。

**2.3.2 DSC 条件** 起始温度 20 °C,最终温度 110 °C,温度变化速率 90 °C · h<sup>-1</sup>,进样量 400 μg。

### 2.4 加速试验

**2.4.1 样品的配切处理** 同“2.1.1”项下方法。

**2.4.2 加速处理** 将样品分装于无菌 EP 管内,然后置于 45 ℃ 条件下的水浴锅内进行孵育,在 0、1、3、5、7、9、11 和 12 周分别取出 100 μg 进行 SEC 检测。

## 2.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测酶切效果

**2.5.1 样品的配切处理** 同“2.1.1”项下方法。

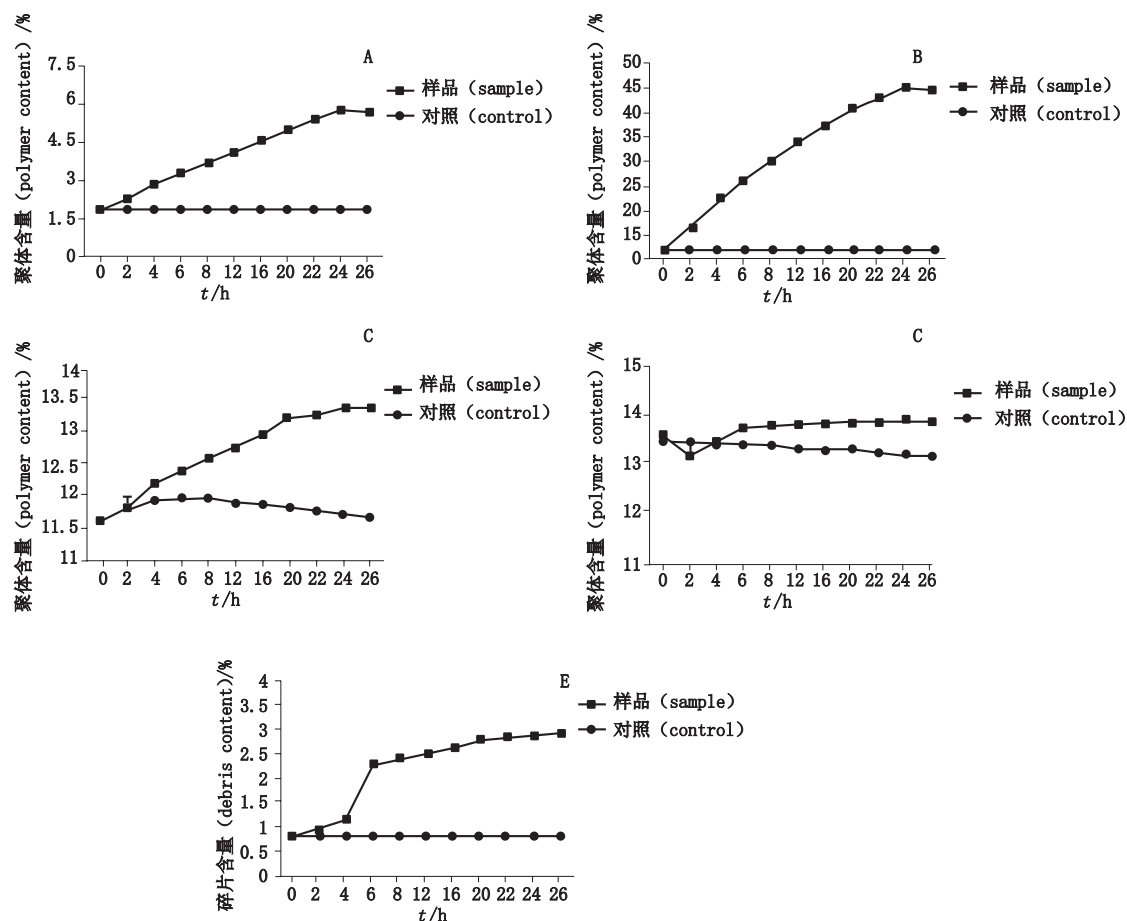
**2.5.2 SDS-PAGE 条件** 浓缩电压 (80 V, 电泳时间 15 min), 分离电压 (120 V, 电泳时间 70 min), 染色 (过夜), 脱色 (0.5 h, 4 次), 上样量 8.0 μg。

## 3 试验结果

### 3.1 SEC 测定不同酶切时间处理前后样品纯度

应用多种酶 (*N*-糖苷酶 F、内切糖苷酶 F2、唾液酸酶和 *O*-糖苷酶) 对样品进行处理, 在不同的

时间点取样, 进行 SEC 纯度检测。如图 1-A 所示, 应用 *N*-糖苷酶 F 将 *N*-糖逐渐切除后, CTLA4-Ig 的聚体含量逐渐增加, 聚体的比例由酶切前的 1.8% 增加到 5.6%。因 *N*-糖苷酶 F 将 *N*-糖逐渐切除后, 糖基化位点处的氨基酸 (天冬酰胺) 变为天冬氨酸, 为进一步证明是由 *N*-糖修饰, 而不是因氨基酸变化所引起的, 选择内切糖苷酶 F2 对样品进行处理。内切糖苷酶 F2 在去除 *N*-糖基化修饰时, 只是破坏了糖的结构, 并没有导致氨基酸序列的变化。结果如图 1-B 所示, 随着内切糖苷酶 F2 酶切时间的延长, CTLA4-Ig 的聚体含量也逐渐增加, 聚体的比例由酶切前的 12% 增加到 45%。



A. *N*-糖苷酶 F 酶切后聚体变化情况 (the changes of polymers in PNGase F digested group) B. 内切糖苷酶 F2 酶切后聚体变化情况 (the changes of polymers in EndoF2 digested group) C. 唾液酸酶酶切后聚体变化情况 (the changes of polymers in neuraminidase digested group) D. *O*-糖苷酶酶切后聚体变化情况 (the changes of polymers in *O*-glycosidase digested group) E. *O*-糖苷酶酶切后碎片变化情况 (the debris changed in *O*-glycosidase digested group)

图 1 不同时间点酶切样品 SEC 纯度分析

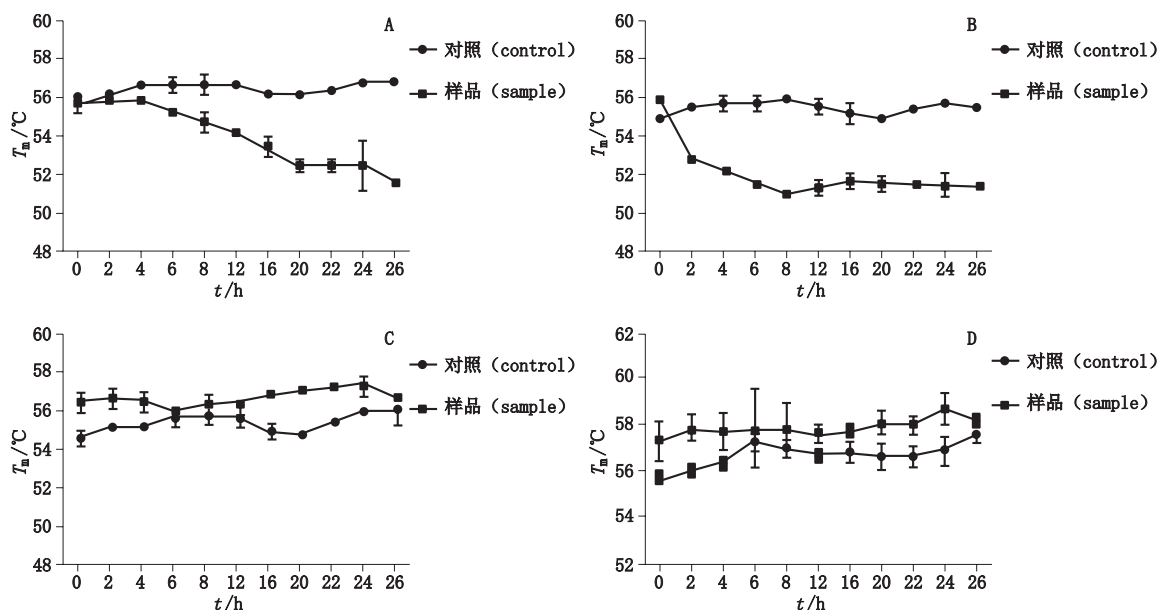
Fig. 1 SEC purity analysis of enzymatic digestion samples at different time points

为进一步研究唾液酸与 CTLA4-Ig 的稳定性相关,应用唾液酸酶将末端的唾液酸去除。结果如图 1-C 所示,随着唾液酸酶酶切时间的延长,CTLA4-Ig 的聚体含量也略有增加,聚体的比例由酶切前的 11.5% 增加到 13.4%。同时研究了 *O*-糖修饰与稳定性的关系,结果如图 1-D、E 所示,随着 *O*-糖苷酶酶切时间的延长,CTLA4-Ig 的聚体并没有发生明显变化,然而碎片的含量却有所增加,碎片的比例由酶切前的 0.8% 增加到 2.8%,证明 *O*-糖修饰也与 CTLA4-Ig 的稳定性密切相关。

### 3.2 DSF 测定不同酶切时间处理前后在完整蛋白水平热力学参数变化

不同酶切处理后的样品经 SEC 检测发现,糖基

化修饰与 CTLA4-Ig 的稳定性有着密切的关系。进一步在热动力学方面进行了研究,DSF 通过对样品进行缓慢地加热,在加热的过程中,检测荧光物质与结构发生改变的蛋白相结合的量,以研究蛋白质的热稳定。如图 2 所示,与未经酶切处理的样品相比,*N*-糖苷酶 F 酶切后的样品  $T_m$  值逐渐由 55.5 °C 下降到 51.5 °C 左右;内切糖苷酶 F2 酶切后的样品  $T_m$  值逐渐由 56 °C 下降到 51.5 °C 左右;唾液酸酶酶切的样品  $T_m$  值基本维持在 56 °C 左右;*O*-糖苷酶酶切的样品  $T_m$  值基本维持在 56.5 °C 左右。



A. *N*-糖苷酶 F 酶切后稳定性 ( $T_m$ ) 变化情况 (the melting temperature ( $T_m$ ) in PNGase F digested group) B. 内切糖苷酶 F2 酶切后稳定性 ( $T_m$ ) 变化情况 (the melting temperature ( $T_m$ ) in EndoF2 digested group) C. 唾液酸酶酶切后稳定性 ( $T_m$ ) 变化情况 (the melting temperature ( $T_m$ ) in neuraminidase digested group) D. *O*-糖苷酶酶切后稳定性 ( $T_m$ ) 变化情况 (the melting temperature ( $T_m$ ) in *O*-glycosidase digested group)

图 2 不同时间点酶切样品 DSF 稳定性分析

Fig. 2 SEC stability analysis of enzymatic digestion samples at different time points

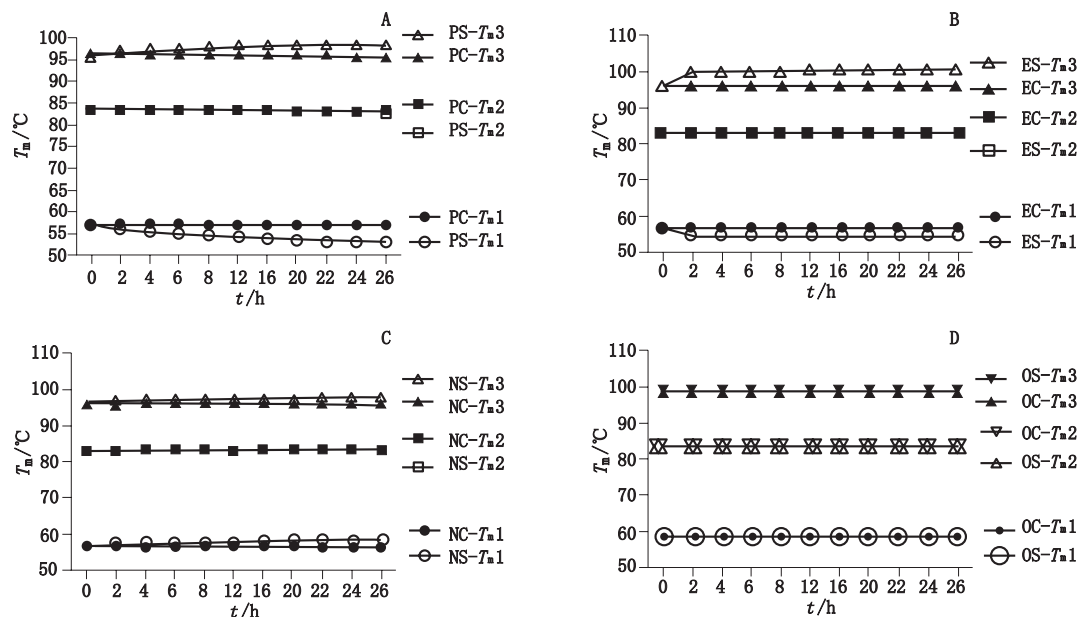
### 3.3 DSC 测定不同酶切时间处理前后各结构域热力学参数变化

不同酶切处理后的样品经 SEC 和 DSF 检测均发现,糖基化修饰与 CTLA4-Ig 的稳定性有着密切的关系,进一步在热动力学方面进行了研究。DSC 通过对样品进行缓慢地加热,检测蛋白质结构发生改变时热量的变化,来研究蛋白质的热稳定。DSC 是一种非常精密的量热仪器,可以反映不同结构域的微量热变化。如图 3-A (图中 PS 表示 *N*-糖苷酶 F 酶切

后,PC 表示酶切前)所示,随着 *N*-糖苷酶 F 酶切的进行, $T_{m1}$  由 56.7 °C 逐渐下降到 52.7 °C 左右, $T_{m2}$  基本维持在 83.4 °C 左右, $T_{m3}$  却由 96 °C 逐渐上升到 98 °C 左右;如图 3-B (图中 ES 表示内切糖苷酶 F2 酶切后,EC 表示酶切前)所示,内切糖苷酶 F2 酶切样品的变化趋势与 PNGase F 酶处理基本一致;如图 3-C (图中 NS 表示唾液酸酶酶切后,NC 表示酶切前)所示,随着唾液酸酶酶切的进行, $T_{m1}$  和  $T_{m2}$  都略微有所上升, $T_{m3}$  基本维持在 83.4 °C 左右;如图

3-D(图中 OS 表示 *O*-糖苷酶酶切后, OC 表示酶切前)所示,随着 *O*-糖苷酶酶切的进行,  $T_m1$ 、 $T_m2$  和

$T_m3$  都基本保持不变,  $T_m1$  维持在 58.5 °C 左右,  $T_m2$  维持在 83.4 °C 左右,  $T_m3$  维持在 98.8 °C 左右。



A. *N*-糖苷酶 F 酶切后稳定性 ( $T_m$ ) 变化情况 (The melting temperature ( $T_m$ ) in PNGase F digested group) B. 内切糖苷酶 F2 酶切后稳定性 ( $T_m$ ) 变化情况 (The melting temperature ( $T_m$ ) in EndoF2 digested group) C. 唾液酸酶酶切后稳定性 ( $T_m$ ) 变化情况 (The melting temperature ( $T_m$ ) in neuraminidase digested group) D. *O*-糖苷酶酶切后稳定性 ( $T_m$ ) 变化情况 (the melting temperature ( $T_m$ ) in *O*-glycosidase digested group)

图 3 不同时间点酶切样品 DSC 分析各结构域稳定性

Fig. 3 DSC analysis of stability of domains in enzymatic digestion samples at different time points

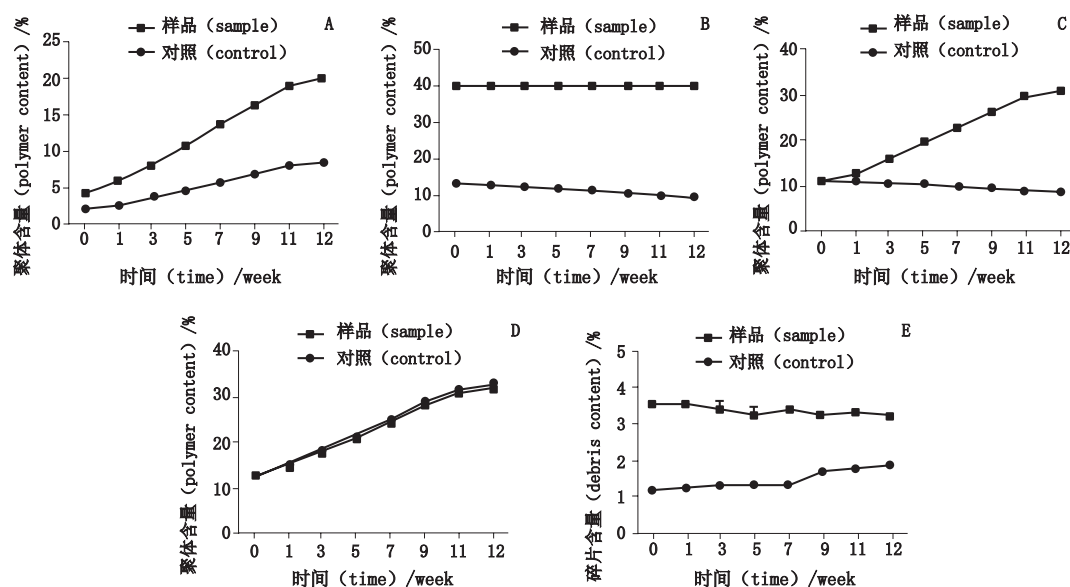
### 3.4 加速试验

不同酶切处理后的样品经 SEC、DSF 和 DSC 检测均发现,糖基化修饰与 CTLA4-Ig 的稳定性有着密切的关系。为了在自然的条件下进一步观察这些修饰与 CTLA4-Ig 的稳定性间的关系,采用加速试验来进一步验证。将不同酶切处理的 CTLA4-Ig 置于 45 °C 条件下,观察多聚体和碎片的含量随加热时间的变化情况。各个条件下的结果变化如图 4 所示。图 4-A 为 *N*-糖苷酶 F 处理样品的加速试验,从第 0 周到第 12 周,样品组的聚体由 4% 上升到 20% 左右,而对照组只上升到 8% 左右;图 4-B 为内切糖苷酶 F2 处理样品的加速试验,从第 0 周到第 12 周,样品组的聚体基本维持在 40% 左右,而对照组却维持于 9%~11%;图 4-C 为唾液酸酶处理样品的加速试验,从第 0 周到第 12 周,样品组的聚体由 11% 上升到 31% 左右,而对照组却维持于 9%~10%;图 4-D、E 为 *O*-糖苷酶处理样品的加速试验,从第 0 周到第 12 周,样品组和对照品组的聚体基本一致,样品组的碎片基本维持在 3.5% 左右,而对照组却只上升到

1.5% 左右。

### 3.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测酶切效果

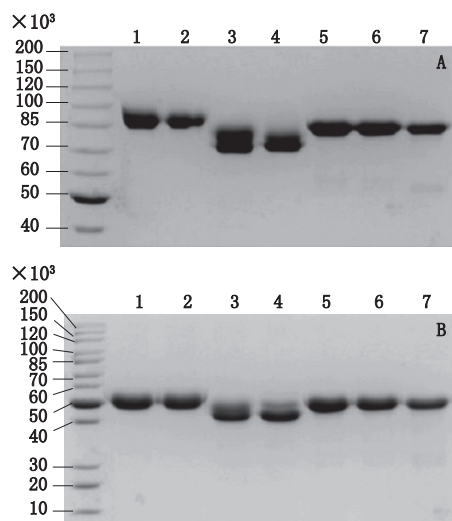
通过非还原型和还原型 SDS-PAGE,可对比酶切前后相对分子质量的变化,借以评估酶切效果。如图 5-A 和 5-B 所示,无论是非还原型,还是还原型 SDS-PAGE,与 *N*-糖苷酶 F 酶切前 (第 1 泳道) 和内切糖苷酶 F2 酶切前 (第 2 泳道) 相比, *N*-糖苷酶 F 酶切后 (第 3 泳道) 和内切糖苷酶 F2 酶切后 (第 4 泳道) 的相对分子质量显著降低,证明此 2 种酶酶切比较充分;与唾液酸酶酶切前 (第 2 泳道) 和 *O*-糖苷酶酶切前 (第 6 泳道) 相比,唾液酸酶酶切后 (第 5 泳道) 和 *O*-糖苷酶酶切后 (第 7 泳道) 的相对分子质量改变较小,因 2 种酶切除基团较小,但也可见相对分子质量的改变,也可体现此 2 种酶酶切效果。本研究也通过毛细管电泳和质谱技术进行了进一步验证,均证明 4 种酶可以有效地将糖基化修饰切除<sup>[15]</sup>。



A. *N*-糖苷酶 F 酶切后聚体变化情况 (the changes of polymers in PNGase F digested group) B. 内切糖苷酶 F2 酶切后聚体变化情况 (the changes of polymers in EndoF2 digested group) C. 唾液酸酶酶切后聚体变化情况 (the changes of polymers in neuraminidase digested group) D. *O*-糖苷酶酶切后聚体变化情况 (the changes of polymers in *O*-glycosidase digested group) E. *O*-糖苷酶酶切后碎片变化情况 (the debris changes in *O*-glycosidase digested group)

图 4 不同酶切样品加速试验分析

Fig. 4 Accelerated experimental analysis of different enzymatic digestion samples



1. *N*-糖苷酶 F 酶切前 (before PNGaseF digestion) 2. 内切糖苷酶 F2 和唾液酸酶酶切前 (before EndoF2 and neuraminidase digestion) 3. *N*-糖苷酶 F 酶切后 (after PNGaseF digestion) 4. 内切糖苷酶 F2EndoF2 酶切后 (after EndoF2 digestion) 5. 唾液酸酶 Neuraminidase 酶切后 (after neuraminidase digestion) 6. *O*-糖苷酶酶切前 (before *O*-glycosidase digestion) 7. *O*-糖苷酶酶切后 (after *O*-glycosidase digestion)

A. 非还原型 SDS-PAGE 测定酶切前后相对分子质量变化情况 (determination of relative molecular mass change before and after enzymatic digestion by non-reductive SDS-PAGE) B. 还原型 SDS-PAGE 测定酶切前后相对分子质量变化情况 (determination of relative molecular mass change before and after enzymatic digestion by reductive SDS-PAGE)

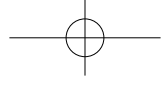
图 5 SDS-PAGE 检测酶切效果

Fig. 5 Detection of the digestion efficiency by SDS-PAGE

#### 4 讨论

SEC-HPLC 方法常常被用来确定蛋白质的单体含量和多聚体含量,因其操作简单,定量准确,在蛋白质药物纯度分析过程中常用。由本实验的结果可以看到,无论是应用 *N*-糖苷酶 F 将 *N*-糖修饰完全切除,还是应用内切糖苷酶 F2 或者唾液酸酶将 *N*-糖修饰部分切除,都可以导致 CTLA4-Ig 的聚体显著增加;而应用 *O*-糖苷酶将 *O*-糖修饰去除以后,虽然 CTLA4-Ig 的聚体没有变化,但是其碎片显著增加,以上结果可以看出糖基化修饰对于 CTLA4-Ig 的稳定性有显著性的影响。

DSF 作为一种分析蛋白质热稳定性的分析手段,其方法简单,效率高。实验过程中研究发现,应用不同的糖苷酶(*N*-糖苷酶 F、内切糖苷酶 F、唾液酸酶和 *O*-糖苷酶)将糖基化修饰破坏以后,CTLA4-Ig 在完整蛋白水平上的  $T_m$  都有所改变,也就是说经过酶切破坏糖基化修饰以后,在更低的温度下就能使 CTLA4-Ig 的结构发生改变,说明糖基化修饰对于 CTLA4-Ig 的稳定性有重要的影响。虽然 DSF 在分析蛋白质热稳定性方面具有显著的优点,但也有缺点,分辨率比较低,只能反映整体蛋白质的  $T_m$  变化,而不能体现是哪些蛋白质结构域发生了改变。后续实验应用 DSC 技术,进一步进行交互验证。



DSC 作为一种分析蛋白质热稳定性的分析手段,分辨率高,效率高,可以高通量地对蛋白质的热稳定进行测定。本实验研究发现,应用糖苷酶将 *N*-糖基化修饰去除以后,CTLA4-Ig 的不同结构域的  $T_m$  改变不同,也就是说经过酶切破坏糖基化修饰以后,在不同的温度下就能使 CTLA4-Ig 的不同结构域发生改变,证实糖基化修饰对于 CTLA4-Ig 的稳定性有重要的影响。通过加速试验研究发现,酶切破坏 *N*-糖基化修饰的样品更容易产生聚体,而破坏 *O*-糖基化修饰以后,聚体基本上一致,但碎片的比例有所增加。加速试验进一步证明了糖基化修饰与 CTLA4-Ig 融合蛋白的稳定性密切相关。

本研究通过多种酶切处理和检测手段探究了糖基化修饰对 CTLA4-Ig 稳定性的影响。后续还需通过基因工程手段,以及晶体结构等研究方法对其机理进行进一步的阐述,以期更加深入地了解糖基化修饰对 CTLA4-Ig 稳定性的影响,为其质量控制提供可靠的参考。

#### 参考文献

- [1] HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ J, MARTÍNEZ-ORTEGA A, SALMERÓN-GARCÍA A, *et al.* Study of aggregation in therapeutic monoclonal antibodies subjected to stress and long-term stability tests by analyzing size exclusion liquid chromatographic profiles[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 118(3): 511
- [2] TANG X, CHEN L, LI A, *et al.* Anti-GPC3 antibody-modified sorafenib-loaded nanoparticles significantly inhibited HepG2 hepatocellular carcinoma[J]. *Drug Deliv*, 2018, 25(1): 1484
- [3] STAMM TA, MACHOLD KP, ALETAHA D, *et al.* Induction of sustained remission in early inflammatory arthritis with the combination of infliximab plus methotrexate: the DINORA trial[J]. *Arthritis Res Ther*, 2018, 20(1): 174
- [4] DING JD, LINCOLN VJ, ROLF H, *et al.* Anti-amyloid therapy protects against retinal pigmented epithelium damage and vision loss in a model of age-related macular degeneration[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(28): 279
- [5] CAO YX, LIU HH, DONG QT, *et al.* Effect of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) monoclonal antibodies on new-onset diabetes mellitus and glucose metabolism: A systematic review and meta-analysis[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2018, 20(6): 1391
- [6] ÇELİK E, OLLIS AA, LASANAJAK Y, *et al.* Glycoarrays with engineered phages displaying structurally diverse oligosaccharides enable high-throughput detection of glycan-protein interactions[J]. *Biotechnol J*, 2015, 10(1): 199
- [7] BUMBACA D, BOSWELL CA, FIELDER PJ, *et al.* Physicochemical and biochemical factors influencing the pharmacokinetics of antibody therapeutics[J]. *AAPS J*, 2012, 14(3): 554
- [8] ANDERSEN DC, BRIDGES T, GAWLITZEK M, *et al.* Multiple cell culture factors can affect the glycosylation of Asn-184 in CHO-produced tissue-type plasminogen activator[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2000, 70(9): 25
- [9] BUTLER M. Optimisation of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by Mammalian cell systems[J]. *Cytotechnology*, 2006, 50(1-3): 57
- [10] NANKE Y, KOTAKE S, AKAMA H, *et al.* Alkaline phosphatase in rheumatoid arthritis patients: possible contribution of bone-type ALP to the raised activities of ALP in rheumatoid arthritis patients[J]. *Clin Rheumatol*, 2002, 21(3): 198
- [11] LEE DM, WEINBLATT ME. Rheumatoid arthritis[J]. *Lancet*, 2001, 358(9285): 903
- [12] HOT A, MIOSSEC P. Effects of interleukin (IL)-17A and IL-17F in human rheumatoid arthritis synoviocytes[J]. *Ann Rheum Dis*, 2011, 70(5): 727
- [13] WOODWORTH TG, DEN BROEDER AA. Treating to target in established rheumatoid arthritis: challenges and opportunities in an era of novel targeted therapies and biosimilars[J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2015, 29(4-5): 543
- [14] BERNETT MJ, CHU SY, LEUNG I, *et al.* Immune suppression in cynomolgus monkeys by XPro9523: an improved CTLA4-Ig fusion with enhanced binding to CD80, CD86 and neonatal Fc receptor FcRn[J]. *MAbs*, 2013, 5(3): 384
- [15] ZHU L, GUO Q, GUO H, *et al.* Versatile characterization of glycosylation modification in CTLA4-Ig fusion proteins by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *MAbs*, 2014, 6(6): 1474

(本文于 2018 年 9 月 18 日收到)