

不同 CHO 工程细胞株表达的 VEGFR-Fc 唾液酸化修饰的研究

刘培¹, 宋礼华^{1,2}, 范清林², 刘道琴², 张伟², 魏利², 赵婷²

摘要 目的 比较中国仓鼠卵巢细胞(CHO)工程细胞株表达的 VEGFR-Fc 的唾液酸化程度的差异,为 CHO 工程细胞株的筛选提供参数依据。方法 从唾液酸单糖、寡糖链这两个层次分析 VEGFR-Fc 的唾液酸化程度。唾液酸单糖的定量:酸水解释放出唾液酸用荧光试剂 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene (DMB) 衍生后,采用荧光-亲水保留液相色谱(HILIC-FLD)检测。寡糖链的结构分析:糖苷酶 PNGase F 释放出的寡糖链经邻氨基苯甲酰胺(2-AB)衍生后,一部分利用阴离子交换色谱原理分析寡糖链上唾液酸的平均数;一部分经 HILIC 原理分析 VEGFR-Fc 寡糖链指纹图谱。结果 6 株工程细胞株表达的 VEGFR-Fc 唾液酸含量在 3~12 mol NANA/mol 蛋白之间,参考品 Afibercept 为 10.46 mol NANA/mol 蛋白;每个寡糖链的唾液酸平均数在 0.28~1.0 之间;寡糖链的特征指纹图谱显示 VEGFR-Fc 有 12 个共有峰,各样品、参考品均有以上共有峰,但各峰的峰高有差异。结论 不同的 CHO 工程细胞株所表达的糖蛋白的唾液酸化程度存在差异。

关键词 唾液酸;唾液酸化;糖基化;HILIC-FLD

中图分类号 R 917.796

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)06-0778-05

糖蛋白是蛋白质在翻译后经过糖基化修饰形成,被广泛应用于治疗各种疾病,占据着较大的市场。糖基化作为蛋白质翻译后的主要修饰之一,调节并稳定蛋白构象,增加其可溶性,介导受体对蛋白的识别作用,影响蛋白类药物的生物学活性^[1-2]。因此,有必要对糖蛋白类生物药物的糖基化修饰进行系统研究,其中唾液酸化程度的监控尤为重要。唾液酸化作为糖基化修饰的一部分,两者密不可分,相互依存。唾液酸是寡糖链最外侧的酸性单糖,带有负电荷起抗蛋白水解的作用,位于寡糖链的最末端,担当着信号使者的角色,故而影响糖蛋白类药物的体内吸收、半衰期以及理化性质^[3]。唾液酸家族

包括多个成员,为人所熟知的是 N-乙酰神经氨酸(N-acetylneuraminic acid, NANA), N-羟乙酰神经氨酸(N-glycolylneuraminic acid, NGNA)。而糖蛋白类抗体药物中主要是 NANA, NGNA 很少。糖蛋白类重组药物多数是由 CHO 等哺乳细胞表达生成,在生产工艺中,糖蛋白类药物的糖基化、唾液酸化受多种因素的影响,包括细胞株、营养成分、pH、温度、细胞生长周期、溶解氧、搅拌速度等^[4],较难控制。因此,筛选工程细胞株则是相对最有效的方法。该研究以人源化融合糖蛋白^[5](vascular endothelial growth factor receptor-IgG Fc, VEGFR-Fc)为例,主要从唾液酸单糖、寡糖链的唾液酸化这两个方面分析比较 6 株不同的 CHO 工程细胞株所表达的目的蛋白的唾液酸化修饰的差异,为生产工艺中工程细胞株的筛选提供理论依据。目前糖基化、唾液酸化修饰的研究方法有很多种,应用较为广泛的是荧光高效液相色谱(fluorescence detector-high performance liquid chromatography, HPLC-FLD)^[6]。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 乙腈(HPLC grade)、NANA($\geq 98\%$)、NGNA($\geq 95\%$)、2-AB、DMB、氰基硼氢化钠购自美国 Sigma 公司;PNGase F(#P0704S)、O-Glycosidase(#P0733S)购自美国 New England Biolabs 公司;RapiGest SF、GlycoWorks 试剂套装、GlycoWorks 亲水保留色谱(hydrophilic interaction chromatography, HILIC) 1cc 小柱购自美国 Waters 公司;所有用水为超纯水,其他试剂均为分析纯类化合物。高效液相色谱系统采用 Waters-1525 型 HPLC 仪, Waters 荧光检测器 2475。色谱柱的型号为 Waters XBridge™ Amide column (3.5 μm , 4.6 mm \times 150 mm), Shodex Asahipak NH2P-50 (5 μm , 2.0 mm \times 150 mm)。真空离心浓缩仪购自美国 Thermo Fisher 公司。DMB 衍生液: 8 mmol/L DMB、1.5 mol/L 冰醋酸、0.8 mol/L β -巯基乙醇、0.25 mol/L 硫代硫酸钠、0.25 mol/L 亚硫酸钠。2-AB 衍生液: 10 mg 2-AB 溶解于 800 μl 醋酸/DMSO (3:7, v:v) 后,加入 12 mg 氰基硼氢化钠。VEGFR-Fc 为安徽安科生

2016-03-04 接收

作者单位: ¹安徽医科大学生物化学与分子生物学教研室,合肥 230032

²安徽安科生物工程(集团)股份有限公司,合肥 230000

作者简介:刘培,女,硕士研究生;

宋礼华,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: Sonlh@ankebio.com

物工程(集团)股份有限公司自主研发的 IgG Fc 融合蛋白,参考品为市售的 Aflibercept。

1.2 方法

1.2.1 唾液酸单糖的定性与定量

样品的处理:取 20 μg 样品蛋白、参考品 Aflibercept,补水至 100 μl ,加入等体积的 0.2 mol/L 三氟乙酸,80 $^{\circ}\text{C}$ 水解 60 min^[7]。取出后离心,冰浴中冷却,精确吸取 90 μl ,加入 10 μl DMB 衍生液,50 $^{\circ}\text{C}$ 避光衍生 150 min,冰浴中放置,在进行 HPLC 分析前加入等体积的乙腈。标准品 NANA,NGNA 采用同样的方法水解、标记。

色谱条件: Waters XBridge™ Amide column(3.5 μm 4.6 mm \times 150 mm),柱温 60 $^{\circ}\text{C}$; 荧光检测器激发波长 373 nm,发射波长 448 nm; 流动相 A 为 100 mmol/L 甲酸胺, B 为纯乙腈; 流速为 0.5 ml/min, A 相在 30 min 由开始的 0% 变为 33.1%。进样量: 20 μl 。

数据处理: 以水配制 0.1 mmol/L NANA 标准品溶液,分别取 10 μl (1.0 nmol)、15 μl (1.50 nmol)、20 μl (2.0 nmol)、30 μl (3.0 nmol)、40 μl (4.0 nmol) 制备标准曲线; 以水作为空白对照,并用水将上述各管体积补至 100 μl 。水解、标记处理操作同样品。然后按下列公式计算每 mol 蛋白分子中唾液酸基团的数目: 唾液酸含量 (mol/mol 蛋白) = (SA/P) Mr; 其中 SA 为根据标准曲线计算的参考品或供试品中唾液酸基团总数 (nmol), P 为蛋白取样量 (μg), Mr 为 VEGFR-Fc 相对分子质量 (97 ku, 不包括寡糖成分)。

1.2.2 唾液酸程度化的分析

1.2.2.1 糖蛋白寡糖链的释放

取 VEGFR-Fc 融合蛋白、标准品 Aflibercept 100 μg 左右,加入 RapiGest SF 使其终浓度为 0.1% RapiGest SF,再分别加入 0.5 mol/L DTT (2 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$, 30 min)、0.5 mol/L IAM (4 μl , 室温避光孵育 30 min) 还原,烷基化后,加入 2 μl PNGaseF 酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。糖蛋白酶切后取适量样品进行 SDS-PAGE 电泳与酶切前比较,检验酶切效率。

1.2.2.2 糖链的提取回收和荧光标记

取酶切后蛋白样品 100 μl 加入 700 μl 乙腈,上样于 90% 乙腈活化的固相萃取柱 1cc 小柱,用 25 mmol/L 碳酸氢铵的 5% 乙腈水溶液洗脱收集酶切下的寡糖链,真空蒸发干燥多聚糖。干燥后的多聚糖加入 20 μl 2-AB 衍生液,65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 3 h。

1.2.2.3 去除过量标记试剂

取标记过的寡糖链 20 μl 加入 200 μl 乙腈后,再次用固相萃取柱 1cc 小

柱洗脱去除多余的标记物,真空蒸发干燥寡糖链后,加入等体积的乙腈,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存待 HPLC 分析。

1.2.2.4 唾液酸程度化的分析^[8]

色谱条件: 采用 Shodex Asahipak NH2P-50 (5 μm , 2.0 mm \times 150 mm) 流动相 A 为 2.5% 醋酸,2.0% 三乙胺,用水配制; 流动相 B 为 1.0% 醋酸,乙腈配制; 流速为 0.2 ml/min。荧光检测器的激发波长 360 nm,发射波长 428 nm。进样量为 20 μl 。洗脱程序: 0 ~ 2 min,10% A; 2 ~ 50 min,10% A-100% A; 50 ~ 67 min,100% A; 67 ~ 72 min,100% A-10% A; 72 ~ 82 min,10% A。

数据处理: 记录色谱图,将每个寡糖基团中所有检测到的峰面积进行积分,计算 Z 值确定糖链的唾液酸化程度,即每个寡糖中唾液酸的平均数。第 1 组峰表示末端不含唾液酸的糖链 (OSA),第 2 组峰表示末端含 1 个唾液酸的糖链 (1SA),第 3 组峰表示末端含 2 个唾液酸的糖链 (2SA),第 4 组峰表示末端含 3 个唾液酸的糖链 (3SA),第 5 组峰表示末端含 4 个唾液酸的糖链 (4SA),计算公式为: Z 值 = (1 \times 1SA 峰面积 + 2 \times 2SA 峰面积 + 3 \times 3SA 峰面积 + 4 \times 4SA 峰面积) / (OSA 峰面积 + 1SA 峰面积 + 2SA 峰面积 + 3SA 峰面积 + 4SA 峰面积)。

1.2.2.5 寡糖链的分析

Waters XBridge™ Amide column (3.5 μm 4.6 mm \times 150 mm),流动相 A 为 100 mmol/L 甲酸胺; 流动相 B 为纯乙腈; 激发波长 360 nm,发射波长 428 nm。梯度洗脱条件见表 1。进样量为 20 μl 。

表 1 梯度洗脱条件

时间 (min)	A%	B%	流速 (ml/min)
0.00	22.0	78.0	0.50
38.50	44.1	55.9	0.50
38.60	44.1	55.9	0.25
40.50	100.0	0.0	0.25
46.50	100.0	0.0	0.25
52.00	22.0	78.0	0.25
52.01	22.0	78.0	0.50
55.00	22.0	78.0	0.50

2 结果

2.1 唾液酸的定性分析

标准品 NANA、NGNA 的色谱图见图 1A,NANA 的保留时间为 21.45 min,NGNA 的保留时间为 23.30 min。样品的唾液酸色谱见图 1B,色谱峰的保留时间为 21.44 min,据保留时间可判定样品蛋白中含有 NANA,未检测到 NG-

NA。

2.2 唾液酸的定量分析 记录色谱图 将色谱图中的 NANA 峰面积进行积分,以 NANA 标准品溶液的峰面积对唾液酸含量作标准曲线回归方程: $Y = 10^8 X + 10^7$ 相关系数 R 的平方为: $R^2 = 0.999$ 。样品唾液酸含量测定的色谱图见图 1B,根据峰面积,按“1.2.1”项中的数据处理方法计算样品的 NANA 含量。6 株不同 CHO 工程细胞株表达的 VEGFR-Fc 的唾液酸含量的测定结果见表 2。

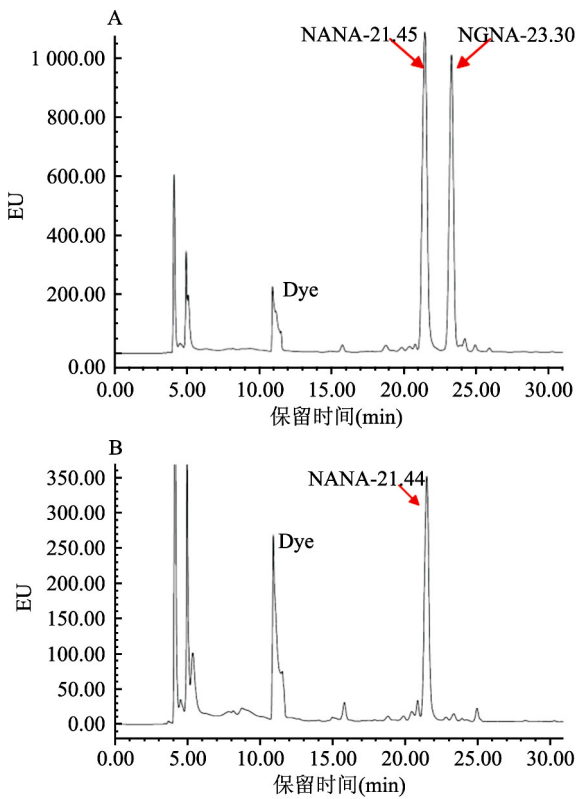


图 1 唾液酸测定色谱图

A: NANA 和 NGNA 标准色谱图; B: 蛋白样品结合唾液酸色谱图

表 2 不同细胞株表达的 VEGFR-Fc 的唾液酸含量和 Z 值

项目	CHO 细胞株						参考品
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	Aflibercept
NANA 的含量 (mol/mol 蛋白)	3.15	5.84	6.30	6.64	6.63	11.90	10.46
Z 值	0.28	0.50	0.54	0.57	0.55	1.00	0.84

Z 值表示每个寡糖中唾液酸的平均数

2.3 SDS-PAGE 分析酶切效果 SDS-PAGE 是分析蛋白质相对分子量的常用方法。本研究采用 SDS-PAGE 比较了唾液酸含量比较高的 A6 细胞株表达的 VEGFR-Fc 与参考品 Aflibercept(图 2),可见分子量没有明显差异。比较 PNGase F 酶、O-Glyco-

sidase 酶酶切后的蛋白分子量,可以看出该融合蛋白主要为 N-糖基化,O 位糖基化很少或者没有。由于 SDS-PAGE 的分辨率不高,所以只能初步判定蛋白分子量的完整性以及糖苷酶酶切效率,并不能用于精确分析糖蛋白修饰的差异。

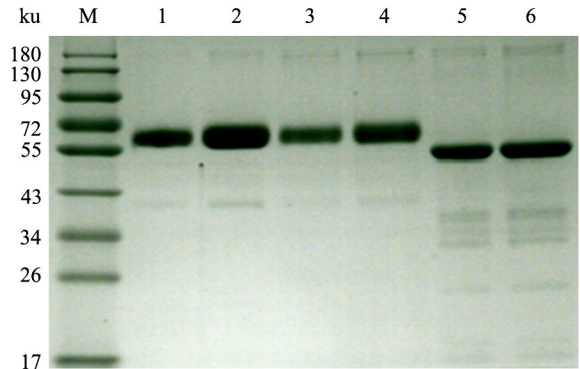


图 2 还原型 SDS-PAGE

M: Marker; 1、3、5 泳道分别为参考品 Aflibercept,切除 O-寡糖链,切除 N-寡糖链; 2、4、6 为 A6 细胞株表达的 VEGFR-Fc 样品,切除 O-寡糖链,切除 N-寡糖链

2.4 唾液酸化的分析 样品的唾液酸化寡糖色谱图见图 3,第 1、2、3、4、5 组峰分别表示 0 个(0SA)、1 个(1SA)、2 个(2SA)、3 个(3SA)和 4 个(4SA)唾液酸的糖链,对所有检测到的峰面积进行积分,根据“1.2.2.4”的数据处理公式计算获得各个细胞株表达的 VEGFR-Fc 的唾液酸化结果见表 2。A6 细胞株表达的 VEGFR-Fc 的唾液酸化程度最高,平均每个寡糖链上携带 1 个唾液酸,而参考品 Aflibercept 的寡糖链上的唾液酸平均数为 0.84。

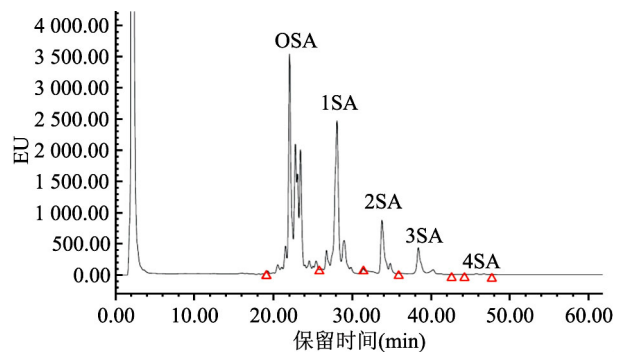


图 3 VEGFR-Fc 含不同唾液酸数的寡糖色谱图

2.5 糖基化的分析 色谱图显示 CHO 工程细胞株表达的 VEGFR-Fc 样品有 12 个共有色谱峰(图 4),A1、A6 细胞株表达的蛋白的寡糖链结构相同,但是各个寡糖链的相对值却稍有差异。从图 5 中可

看出不同工程细胞株表达的 VEGFR-Fc 样品的糖基化修饰结构与参考品 Aflibercept 一致,但各寡糖链所占的比例不同。结合唾液酸化的检测结果显示,唾液酸化与糖基化修饰明显相关,唾液酸化程度越高,亲水保留能力强的寡糖链所占比例明显增加。亲水保留能力强表明寡糖链的结构复杂,其末端更有可能携带唾液酸。这也初步解释了在动物试验中 A1 细胞株表达的 VEGFR-Fc 的半衰期相对较短,而随着唾液酸化程度的提高, A6 细胞株表达的 VEGFR-Fc 的半衰期明显增长。

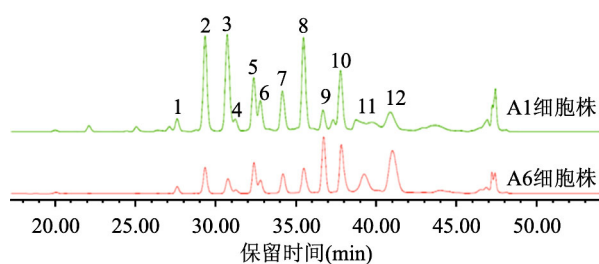


图4 VEGFR-Fc 的寡糖色图谱

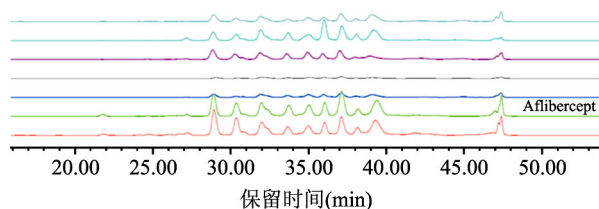


图5 6株 CHO 工程细胞株表达的 VEGFR-Fc 和参考品 Aflibercept 的寡糖色图谱

3 讨论

经典的学说认为 NGNA 是肿瘤细胞的特异性抗原,人源化蛋白寡糖链中的唾液酸主要是 NANA^[9]。为了区分 NANA、NGNA,减少糖蛋白的用量,唾液酸的测定主要用的是反相 C8 或者 C18 色谱柱联合液相色谱系统。Chemmalil et al^[10] 利用亲水保留液相色谱联合纳克激光计数探测器测定了糖蛋白的唾液酸含量,探索了唾液酸测定的新方向。本实验首次利用酰胺基色谱柱的 HILIC 原理,联合荧光液相色谱分析了 6 株 CHO 工程细胞株表达的 VEGFR-Fc 的唾液酸含量,线性关系良好, NANA、NGNA 得到了良好的分离效果,精密度的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD) 为 0.47%,准确度的 RSD 为 0.7%,冰浴中 24 h 内的稳定性 RSD 为 0.2%。通过氨基酸序列初步估计该融合蛋白单链理论上 有 5 个 N-糖基化位点,唾液酸化的结果分

析显示 0~2SA 的寡糖链占 0.95 以上,故该融合蛋白的寡糖链主要以 2 分支存在,最多可能有 20 mol NANA/mol 蛋白,上述计算结果均在理论值范围内。本文所建立的 HILIC-FLD 测定唾液酸含量的方法没有在时间上取得优势,但相对反相柱而言, HILIC 柱对高极性的唾液酸有更好的保留作用,更适用于唾液酸等极性物质的测定。

早期 Beck et al^[11] 发现 CHO 细胞株与 NSO 细胞株表达的糖蛋白的糖基化结构相同,但是相对含量却有差异。唾液酸单糖的分析只能初步了解糖蛋白末端唾液酸的含量。为了更深入了解 CHO 工程细胞株表达的 VEGFR-Fc 的唾液酸化修饰的差异,需要进一步分析其寡糖结构。初步的 SDS-PAGE 电泳结果显示,该融合蛋白主要是 N-糖基化,这也与大多数文献研究^[4] 结果一致,即抗体类蛋白的糖基化修饰类型主要是 N 位糖基化。因此寡糖分析采用 PNGase F 酶切除蛋白骨架中的 N-糖链。这些寡糖链经 2-AB 标记后根据电荷强度通过离子交换色谱法进行分离,然后依据不同数目的唾液酸的寡糖面积计算 Z 值, Z 值越大,表示寡糖链中唾液酸含量越多。同时衍生后的寡糖链通过 HILIC 色谱法分析获得了 VEGFR-Fc 的寡糖链指纹图谱。经过以上分析,唾液酸化程度相对较高的 A6 细胞株表达的 VEGFR-Fc 的每个寡糖链上平均有 1 个唾液酸,寡糖链指纹图谱显示其有 12 个共有峰,故该融合蛋白理论上的唾液酸含量应为 12 mol NANA/mol 蛋白,本文所建立的 HILIC-FLD 的测定结果为 11.9 mol NANA/mol 蛋白,同样计算显示其他细胞株及参考品所得的结果也基本相同,说明该方法准确可靠。

本文相对全面地分析了 CHO 工程细胞株表达的 VEGFR-Fc 的唾液酸化修饰差异,筛选出唾液酸化程度较高的细胞株,为生产工艺中唾液酸化的调控奠定了良好的基础。从 VEGFR-Fc 的唾液酸化的研究结果可以推断其他重组糖蛋白也可用同样的筛选策略进行唾液酸化的调控。

参考文献

- [1] Solá R J, Griebenow K. Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals [J]. J Pharm Sci, 2009, 98(4): 1223-45.
- [2] Sinclair A M, Elliott S. Glycoengineering: the effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins [J]. J Pharm Sci, 2005, 94(8): 1626-35.
- [3] Bork K, Horstkorte R, Weidemann W. Increasing the sialylation of therapeutic glycoproteins: the potential of the sialic acid biosyn-

- thetic pathway [J]. *J Pharm Sci*, 2009, 98(10): 3499–508.
- [4] del Val I J, Kontoravdi C, Nagy J M. Towards the implementation of quality by design to the production of therapeutic monoclonal antibodies with desired glycosylation patterns [J]. *Biotechnol Prog*, 2010, 26(6): 1505–27.
- [5] Semeraro F, Morescalchi F, Duse S, et al. Aflibercept in wet AMD: specific role and optimal use [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2013, 7: 711–22.
- [6] Spichtig V, Michaud J, Austin S. Determination of sialic acids in milks and milk-based products [J]. *Anal Biochem*, 2010, 405(1): 28–40.
- [7] Stanton P G, Shen Z, Kecorius E A, et al. Application of a sensitive HPLC-based fluorometric assay to determine the sialic acid content of human gonadotropin isoforms [J]. *J Biochem Biophys Methods*, 1995, 30(1): 37–48.
- [8] 王 兰, 饶春明, 陶 磊 等. 血管内皮生长因子抑制剂质控方法和质量标准研究 [J]. *药物分析杂志*, 2010, 30(6): 977–82.
- [9] Raju T S, Briggs J B, Borge S M, et al. Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics [J]. *Glycobiology*, 2000, 10(5): 477–86.
- [10] Chemmalil L, Suravajjala S, See K, et al. A novel approach for quantitation of nonderivatized sialic acid in protein therapeutics using hydrophilic interaction chromatographic separation and nano quantity analyte detection [J]. *J Pharm Sci*, 2015, 104(1): 15–24.
- [11] Beck A, Bussat M C, Zorn N, et al. Characterization by liquid chromatography combined with mass spectrometry of monoclonal anti-IGF-1 receptor antibodies produced in CHO and NSO cells [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2005, 819(2): 203–18.

On the sialylation levels of VEGFR-Fc from different CHO cell strains

Liu Pei¹, Song Lihua^{1,2}, Fan Qinglin², et al

(¹*Dept of Biochemistry and Molecular Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032;*

²*Anhui Anke Biotechnology (Group) Co., Ltd, Hefei 230000)*

Abstract Objective To describe the sialylation levels of VEGFR-Fc from different CHO cell strains for screening out the better CHO cell strain. **Methods** The analysis of sialic acid was from two levels: monosaccharide constituent and structural analysis of the glycan chains of glycoconjugates. The sialic acids were liberated by mild acid hydrolysis and then derivatized using 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene (DMB). The derivatives were separated by hydrophilic interaction liquid chromatography on an amide column. The second level was to remove the oligosaccharides from VEGFR-Fc by Peptide N-glycosidase F (PNGase F), and derivatized with 2-aminobenzamide (2-AB). The labels could then be analyzed by anion exchange and hydrophilic interaction chromatography coupled to fluorescence detector. **Results** The sialic acid content of 6 VEGFR-Fc isoforms varied between 3 ~ 12 mol NANA/mol protein, and Aflibercept contained 10.46 mol NANA/mol protein. The average content of sialic acid in each oligosaccharide chain was 0.28 ~ 1.0. The typical finger chromatogram of VEGFR-Fc oligosaccharides was built and 12 characteristic peaks were pointed out. **Conclusion** Combined together, these two levels analysis sufficiently demonstrate there is a difference in the degree of sialic acid acidification of VEGFR-Fc from different CHO cell strains.

Key words sialic acid; sialylation; glycosylation; HILIC-FLD