

重组单抗药物的肽图分析

魏敬双 程立均 刘进怀 贾茜

(华北制药集团新药研究开发有限责任公司,石家庄 050015)

摘要: 建立了重组单抗药物的肽图分析方法。在变性条件下向抗体溶液加入还原剂,打开抗体内部所有交联的二硫键,再加入烷基化试剂封闭所有的自由巯基,使抗体分子在溶液中以游离伸展肽链的形式存在。加入胰蛋白酶,将充分伸展的肽链酶解成小的肽段。用反相高效液相色谱层析分析肽图谱。对连续3批中试产品及理化测定对照品进行肽图分析,各样品均能酶解完全,批间肽图谱一致。该方法实用有效,适于进行重组单抗等结构复杂的大分子蛋白药物的肽图检查分析。

关键词: 重组单抗 肽图 抗狂犬病毒单抗 胰蛋白酶 反相 HPLC

Peptide Mapping of Recombinant Monoclonal Antibody Pharmaceuticals

Wei Jingshuang Cheng Lijun Liu Jinhui Jia Qian

(New Drug R&D Center, North China Pharmaceutical Corporation, Shijiazhuang 050015)

Abstract: A method was established for peptide mapping of recombinant monoclonal antibody pharmaceuticals. In denaturing conditions, reducing reagent was added to recombinant antibody solution, all the crosslinked disulfide bonds were broken, and then alkylation reagent was added to block the free sulfhydryl residues, the resultant antibody molecules stayed in the solution as dissociated and extensively stretched peptide chains. The trypsin was added to the solution and the antibody was digested to small peptide fragments. Reversed phase HPLC was used to separate the peptide fragments. The in-house reference and three consecutive batches of recombinant antibodies manufactured in pilot scale were analysed, all the samples could be digested completely and the peptide map profiles were consistent with each other. The method for peptide mapping was effective in proteins such as recombinant antibodies with complex structure.

Key words: Recombinant monoclonal antibody Peptide mapping Anti-rabies monoclonal antibody Trypsin Reversed phase HPLC

对于重组蛋白质药物的肽图检查,我国药典^[1]中收录了两种方法,分别为胰蛋白酶裂解-反相高效液相色谱法和溴化氰裂解法。其中第一种方法应用更为广泛。但是,对于重组单克隆抗体产品的肽图检查,如果使用药典中的胰酶裂解-反相 HPLC 分析方法,几乎得不到裂解峰(图1)。这是因为抗体分子结构复杂,由四条肽链组成,链间及链内由多对二硫键相联。即使肽链被胰酶切开,但仍被二硫键联在一起,无法分成独立的肽段。

重组人源抗狂犬病毒单抗(recombinant anti-ra-

bies monoclonal antibody, rhRIG)是采用基因工程手段,用 CHO(中国仓鼠卵巢)工程细胞表达的全人源 IgG1 亚型抗体,用于狂犬病毒暴露后预防。在产品研发过程中,对重组抗体的肽图检查法进行了实验摸索,确定了使抗体产品酶解完全的实验方法。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

Trypsin 为 Sigma 公司产品; NH_4HCO_3 , 盐酸胍, 碘乙酰胺, DTT(二硫苏糖醇)均为分析纯试剂。

基金项目:“十一五”863 计划生物和医药技术领域重大项目基金资助(2006AA02A247)

作者简介:魏敬双(1967-),女,高级工程师,从事生物技术药物研究开发工作

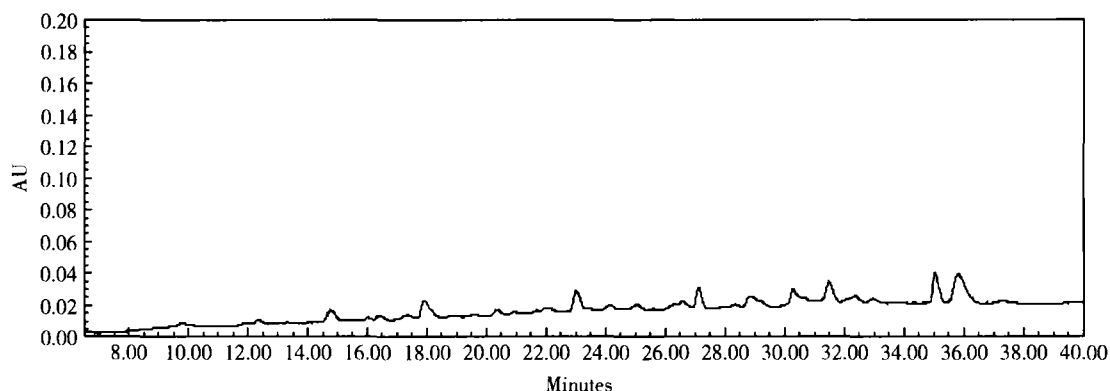


图1 用现行药典方法得到的重组人源抗狂犬病毒单抗原液的肽图

重组人源抗狂犬病毒单抗原液(批号20060501,20060701,20060801)及理化测定对照品(批号20051101),浓度约2.0mg/ml,由华北制药集团新药研究开发有限责任公司试制。

超滤离心管(截流量30kD,Millipore),超滤离心管(截流量10kD,Millipore)。

台式高速冷冻离心机,Beckman GS-15R。

C18 3.5 μ m 4.6 \times 150mm RP-HPLC 柱为 Waters 公司产品。

高压液相色谱仪为 Waters 公司产品(515 泵,2487 检测器,Waters Symmetry 300 工作站)。

1.2 方法

1.2.1 抗体蛋白的充分变性 取重组人源抗狂犬病毒单抗原液或理化测定对照品 100 μ l,移入截流量为30kD的超滤离心管,8 000min 离心 10min,加入含6mol/L 盐酸胍的100mmol/L 碳酸氢铵溶液100 μ l,混匀后移入1.5ml Eppendorf 管中。

1.2.2 二硫键还原及烷基化保护 按文献^[2]介绍的方法进行。大致过程为:向上述样品管中加入450mmol/L 二硫苏糖醇溶液2.5 μ l,混匀后于37℃水浴1h。加入1mol/L 碘乙酰胺溶液2.5 μ l,混匀后于室温避光放置30min。

1.2.3 胰蛋白酶裂解 将上述反应溶液移入截流量为10kD的超滤离心管,8 000min 离心 40min,加入100mmol/L 碳酸氢铵溶液100 μ l,混匀后移入一装有胰蛋白酶溶液(1mg/ml,序列分析纯)5 μ l 的 Eppendorf 管中,于37℃水浴24h,4℃放置30min 以终止反应。

1.2.4 反相 HPLC 分析 将终止反应的样品管10 000r/min离心10min,精密量取上清液50 μ l 注入液相色谱仪。以0.1%TFA(三氟乙酸)的水溶液为流动相A液;以0.1%TFA 的乙腈溶液为流动相B液。流速为1ml/min。梯度洗脱70min(A液从95%至30%,B液从5%至70%),检测波长214nm。

2 结果

对连续3批中试规模制备的重组人源抗狂犬病毒单抗原液样品及理化测定对照品进行肽图分析,各批样品图形一致,结果见图2。

3 讨论

生物工程产品的质量控制是保障产品质量的关键,其中肽图是研究蛋白质一级结构的一种重要的分析方法。对重组蛋白质药物来说,肽图分析可作为与天然产品或参考品作精密比较的手段,可以鉴别蛋白质的翻译后修饰,其次可以用作产品批间同一性的检测手段。

早在1992年,Kroon^[3]等就通过肽图谱分析的手段,鉴别出了第一个获得FDA批准上市的治疗性单抗OKT3的降解位点。

目前,重组单抗药物已经成为生物技术制药的开发热点,我国也已有多个单抗产品获得生产批文。作为重组蛋白质药物质量控制的一项重要内容,关于单抗的肽图分析方法值得我们进行认真的实验摸索。

对于含有多对二硫键的结构复杂的大分子蛋白质,为了得到酶解完全的肽段,首先需要将所有二硫键进行还原处理,使二硫键断裂成为还原状态的自由巯基。为防止自由巯基再次形成二硫键,可采用

烷基化封闭的手段。通过上述处理,蛋白质分子在溶液中成为彼此游离的伸展肽链,适于进行胰蛋白酶裂解。对于含有大量二硫键的蛋白质,溶液中必须有足够的还原剂才能使所有二硫键得到充分还

原。关于所需还原剂和烷基化试剂的用量,Mayes^[4]推荐的剂量是,DTT 的量比二硫键的总量多 2mM,而碘乙酰胺的量则要比溶液中巯基的总摩尔数富余 1.1 倍。

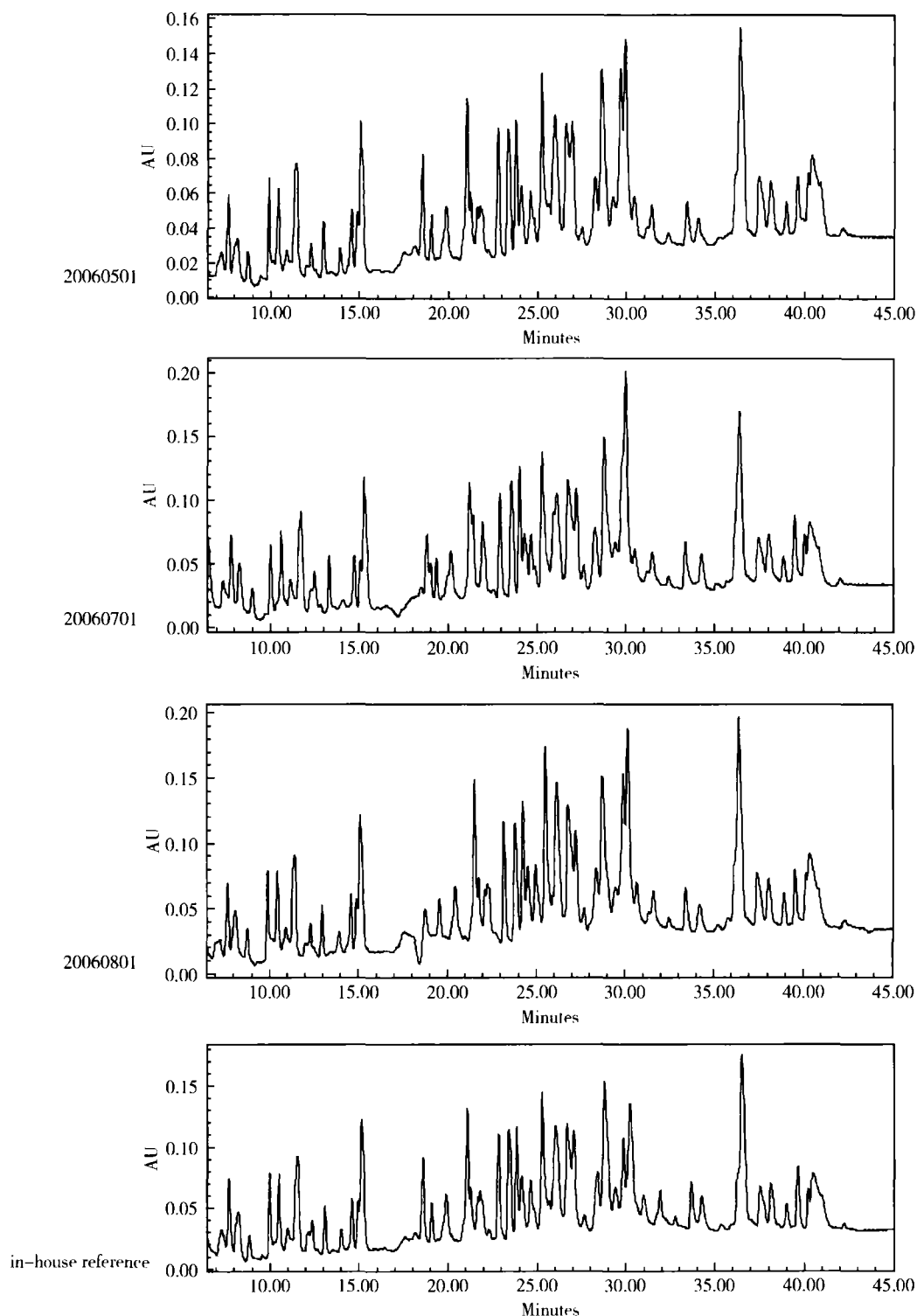


图2 重组人源抗狂犬病毒单抗原液样品及理化测定对照品的肽图

为从重组单抗的肽图谱得到更多的信息,Wan等^[5]还曾尝试过先将重组抗体的轻链、重链分开,分别进行蛋白酶裂解之后进行 RP-HPLC 分析。利用这种方法,鉴别出了一种单抗 CGP56901 的重链发生交联变异的情况。

在对抗体样品进行变性及胰蛋白酶裂解前,均需将抗体样品的缓冲液置换为适于进行下一步操作的环境中,常规的换液方式是采用透析法,透析换液的过程非常耗时,一般需要透析几个小时,而且在透析过程中,常常伴随着样品的稀释,透析换液后样品浓度降低。本试验中,所有的换液操作通过超滤离心完成,使用超滤离心管,可以在很短的时间内完成换液操作,同时,样品还可以很方便地浓缩到所需要的浓度。所以,只要选择好合适的截流量,使用超滤离心管进行换液操作是代替透析法的非常实用的手段。鉴于台式高速离心机在一般的分析检测实验室已经属于常规仪器,所以用超滤离心代替透析法并

不需额外的仪器设备,却可以大大缩短实验的时间,同时也避免了频繁更换透析液的繁琐操作。

除重组单抗药物外,其它一些分子量大、结构复杂、二硫键含量高的重组蛋白药物(如我公司在研的重组人血白蛋白,每分子含 17 对二硫键)的肽图谱分析都可以适用于本研究所建立的方法。

参 考 文 献

- 1 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. (2005 年版 3 部). 北京:化学工业出版社,2005,附录 43 ~ 44.
- 2 John M, Walker. The Protein Protocols Handbook. 2nd edition. Humana Press, 2002, 513 ~ 514.
- 3 Kroon DJ, Baldwin - Ferro A, Lalan P. Pharmaceutical Research, 1992,9(11):1386 ~ 1393.
- 4 John M. Walker. Methods In Molecular Biology, volume 1. Humana Press, 1985, 33 ~ 39.
- 5 Wan M,Shiau FY,Gordon W,et al. Biotechnology and Bioengineering,1999,62(4):485 ~ 488.
- 8 Frisoni GB, et al. JAMA,1994, 114(1):1317.
- 9 苏净,谭兰. 国外医学脑血管疾病分册,2001;9(4):219 ~ 217.
- 10 Lopaciuk S, Bykowska K, Kwiecinski Hetal. Clin Appl Thromb Hemost, 2001,7(4):346 ~ 505.
- 11 张颖冬,等. 中风与神经疾病杂志,2001,18(4):198 ~ 200.
- 12 赵勇,等. 中华老年心血管病杂志,2001,3(4):247 ~ 92.
- 13 WilsonAG, et al. Inflammation,1995,45:1 ~ 12.
- 14 Nassar BA, et al. Am Heart J,2001;142(4):586 ~ 9.
- 15 Tanus Santos JE, Desai M,Flockhart DA. Pharmacogenetics, 2001, 11(8):719 ~ 251.
- 16 Gravestein LA, BorstJ. Immunology,1998,10:423 ~ 434.
- 17 Carter AM, Catto AJ, Bamford JM, Grant PJ. Arterioscler Thromb Vasc Biol,1997,17:589 ~ 94.
- 18 王先梅,等. 国外医学脑血管疾病分册,2001,9(3):154 ~ 6.
- 19 Jiao-Yu Deng, Xian-En Zhang, Yuan Manga, Zhi-Ping Zhang. Biosensors and Bioelectronics, 2004,19:1277 ~ 1283.
- 20 K Yu,n C Charles Gu, M Province, C J Xiong, D C Rao. Genetic Epidemiology, 2004,27:209 ~ 211.
- 21 王忠,刘建勋,王永炎. 中国药理学通报,2002,18(6):605 ~ 8.
- 1 Hassan A, Markus HS. Brain,2000,123:1784 ~ 1812.
- 2 Reyna Favis, et al. Human Mutation,2004,24:63 ~ 75.
- 3 Clemens B, Tempfer, Eva-Katrin Riener, Lukas A, Hefler, et al. Menopause Fertility And Sterility,2004,82:308 ~ 315.
- 4 李瑶 主编. 基因芯片技术-解码生命,北京:化学工业出版社,2004,179 ~ 180, 201 ~ 203.
- 5 张晨,等. 中华老年心血管病杂志,2001,3(3):178 ~ 80.
- 6 Barley J, Markus H, et al. J Hum Hypertens,1995,9:681 ~ 32.
- 7 Coudere R, Mahieux F, et al. Stroke, 1993,25,2296 ~ 78.

参 考 文 献

(上接第 171 页)

选和检测更多中风相关多态性位点是我们研究的下一步目标^[20]。将寡核苷酸芯片用于疾病与 SNP 的关联分析这个思路是可行的,芯片的高通量,平行性的特点,将会对多基因遗传病的分子病理机制的研究和易感基因的检测及个性化治疗起到较大的推动作用^[21]。