

应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 测定曲妥珠单抗的 N- 末端氨基酸序列

PPSQ-005

摘要：本文使用 SDS-PAGE（十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳）将曲妥珠单抗的重链和轻链进行分离后，通过电转印方法将凝胶上的样品转移到 PVDF 膜（聚偏氟乙烯膜）上，应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 分别测定重链和轻链的 N- 末端氨基酸序列，结果与理论序列一致，验证了此方法的准确性。

关键词：蛋白质测序仪 PPSQ-53A 氨基酸序列 抗体药物 曲妥珠单抗 赫赛汀

抗体药物作为一种具有独特优势的生物靶向性治疗药物，因其高度特异性及优越的药代动力学特性，在疾病的诊断和治疗中显示出其他类型药物无可比拟的优势，是目前全球药物研发的热点。作为一种蛋白质类药物，抗体药物一般注射给药，药品在储存过程中可能会发生降解和聚合，需要对其进行质量均一性评价以进行质量控制。ICH-Q6B（人用药品注册技术要求国际协调会三方协调指导原则质量标准：生物技术产品及生物制品的检测方法和验收标准）中明确规定蛋白质类药物申报需要提供 N- 末端氨基酸序列作为质量均一性评价的证据，生

物仿制药相关规定（EMA）也要求生物仿制药需要对 N- 末端氨基酸序列进行确认而且应与原研药相同。Edman 降解法是目前直接进行 N- 末端氨基酸序列分析的主要方法，应用岛津公司的蛋白质测序仪 PPSQ-51A/53A，可以自动化实现 Edman 降解反应，进行蛋白质和多肽 N- 末端的氨基酸序列测定。本文演示了应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 测定国内已经上市的代表性抗体药物 - 曲妥珠单抗（赫赛汀，临床上用于治疗乳腺癌）的 N- 末端氨基酸序列的方法及结果。该方法操作简单、检测灵敏可靠，可作为生物技术药物 N- 末端氨基酸序列分析的应用参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

PPSQ-53A

1.2 试剂和样品

5% phenyl isothiocyanate n-heptane solution (Wako, Code: 161-27341)

12% trimethylamine solution (Wako, Code: 200-20021)

25% trifluoroacetic acid (Wako, Code: 204-20041)

PTH-amino acids mobile phase (Wako, Code: 168-27351)

Trifluoroacetic acid (Wako, Code: 207-20031)

Wakopak Wakosil- II PTH- 4.6 × 250 mm (Wako, Code: 235-63951)

PTH-amino acids mixture standard (Wako, Code: 165-27361)

Ethyl acetate (Wako, Code: 052-09041)

1-chlorobutane (Wako, Code: 033-24371)

37% acetonitrile solution (Wako, Code: 018-26041)

PVDF 膜（碧云天，Code: FFP32）

样品：注射用曲妥珠单抗原液（赫赛汀）

1.3 样品前处理

取 100 pmol 样品进行 SDS-PAGE（十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳）分离后，电转印至 PVDF 膜上，使用丽春红染液进行染色，待自然晾干后分别剪切重链和轻链的条带，依次安装到反应器上进行分析，测试样品 N- 末端前 15 个氨基酸的序列。

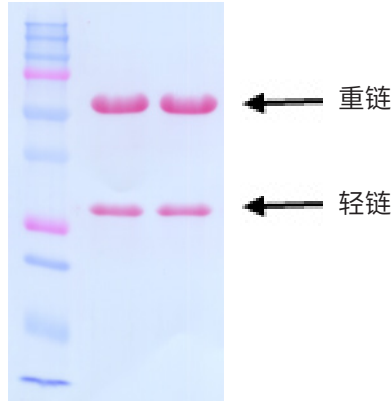


图 1 曲妥珠单抗 SDS-PAGE 电转印结果

1.4 PPSQ 分析条件

PVDF 分析模式，循环数设置为 16（第一个循环不参与反应）

■ 结果讨论

2.1 PTH- 氨基酸混合标准品测试色谱图

为对 19 种 PTH- 氨基酸进行校准，先测试 19 种 PTH 氨基酸的混合标准品，校准测试混合标准品图谱见图 2。

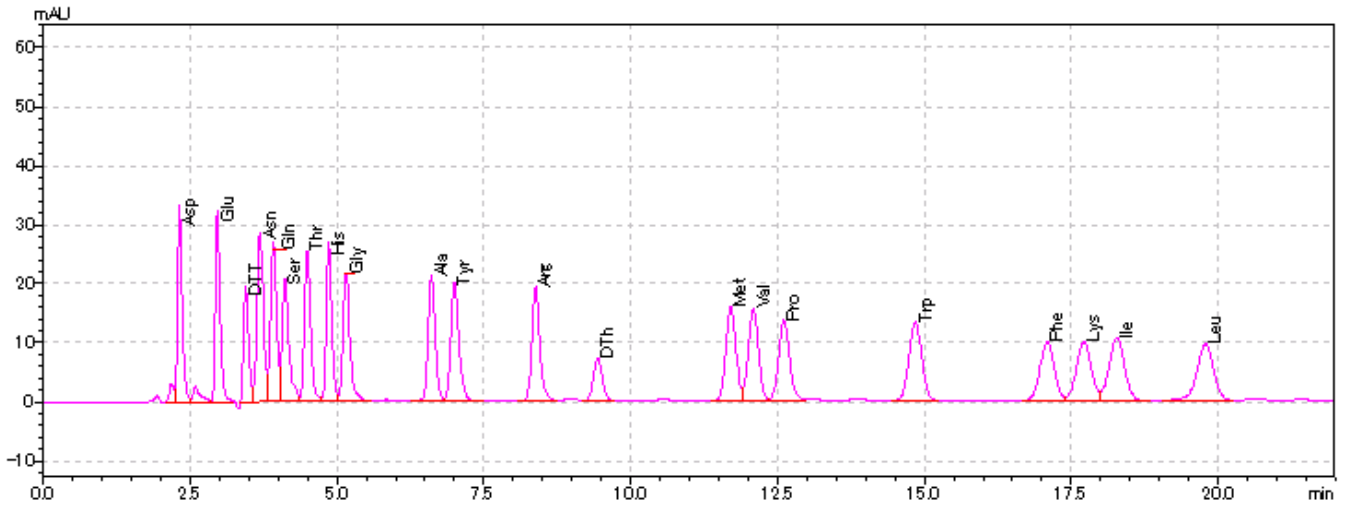
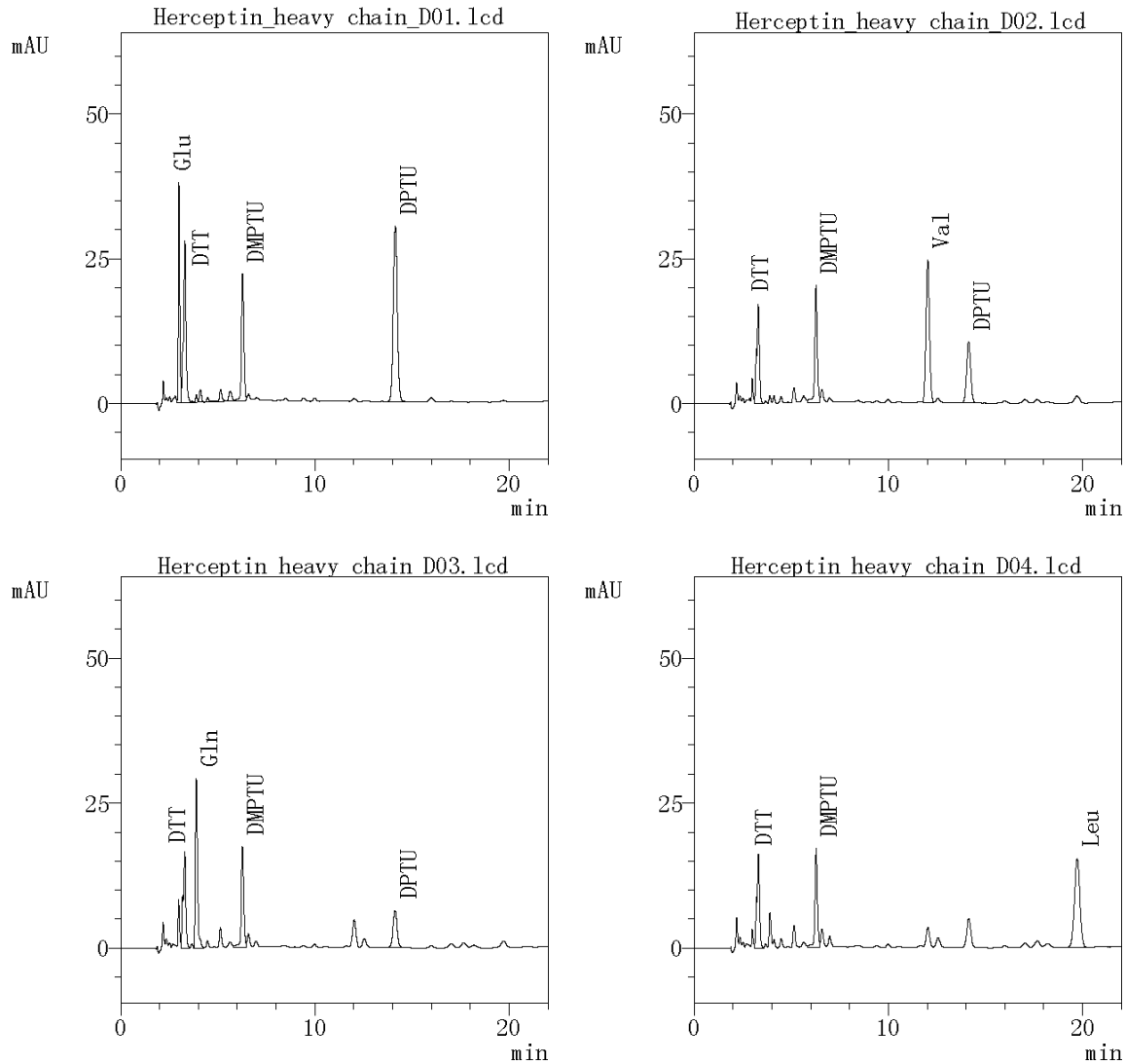
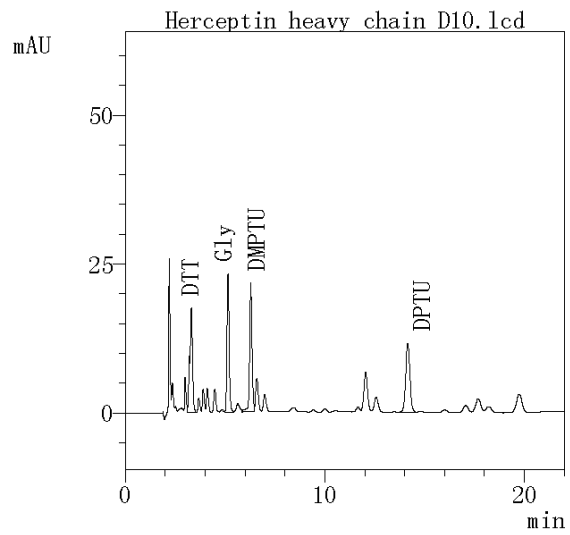
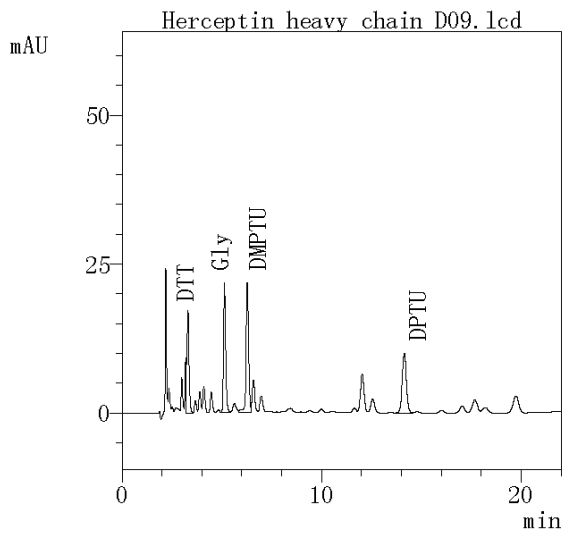
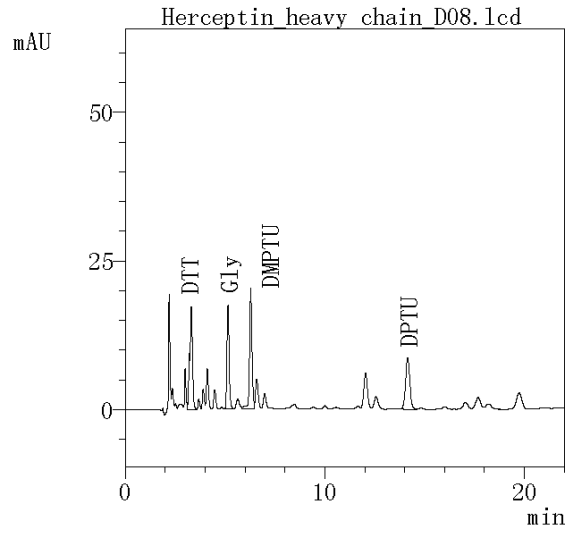
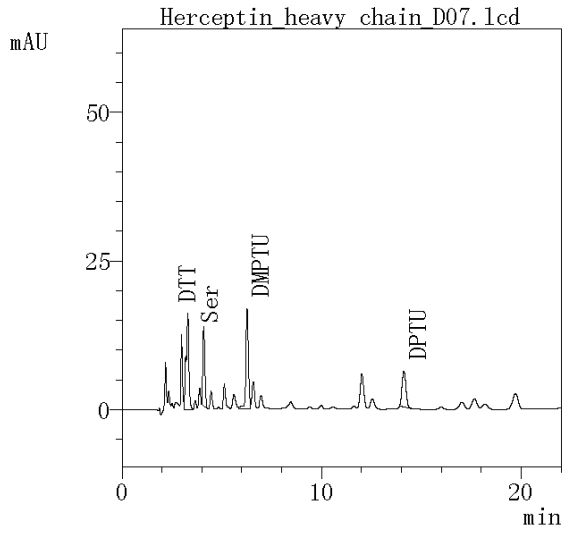
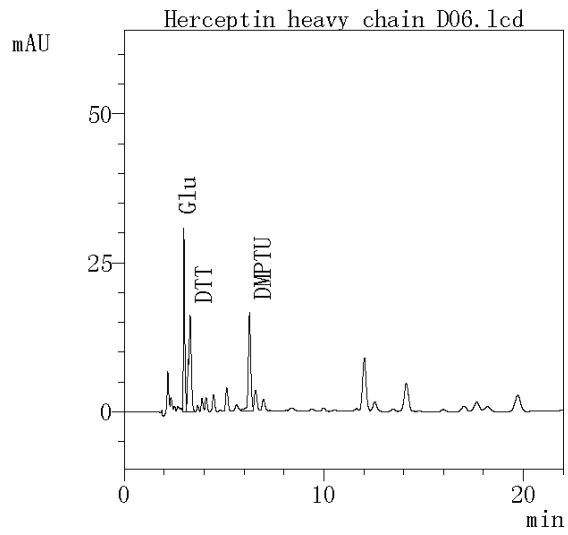
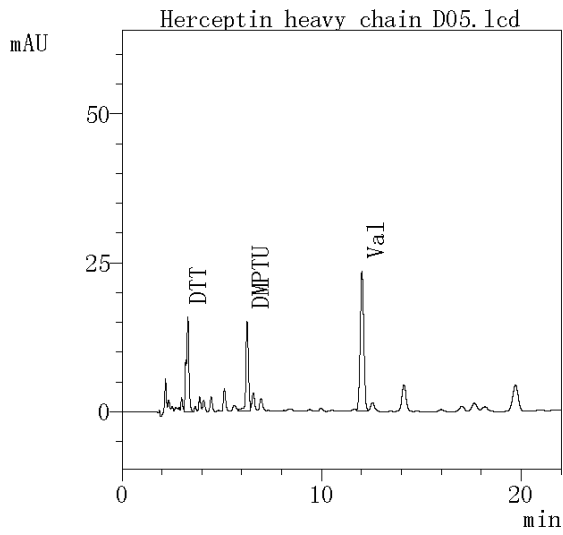


图 2 PTH- 氨基酸混合标准品校准测试图谱

2.2 曲妥珠单抗 N- 末端氨基酸序列分析色谱图

图 3 是曲妥珠单抗重链 N- 末端氨基酸分析的原始色谱图，由图所示，重链 N- 末端第一个循环是 Glu，第二个循环是 Val，以此类推，前 15 个循环氨基酸按顺序依次是 Glu-Val-Gln-Leu-Val-Glu-Ser-Gly-Gly-Gly-Leu-Val-Gln-Pro-Gly，与理论氨基酸序列一致。图 4 是曲妥珠单抗轻链 N- 末端氨基酸分析的原始色谱图。由图 4 所示，轻链 N- 末端第一个循环是 Asp，第二个循环是 Ile，以此类推，前 15 个循环氨基酸按顺序依次是 Asp-Ile-Gln-Met-Thr-Gln-Ser-Pro-Ser-Ser-Leu-Ser-Ala-Ser-Val，与理论氨基酸序列相符合。





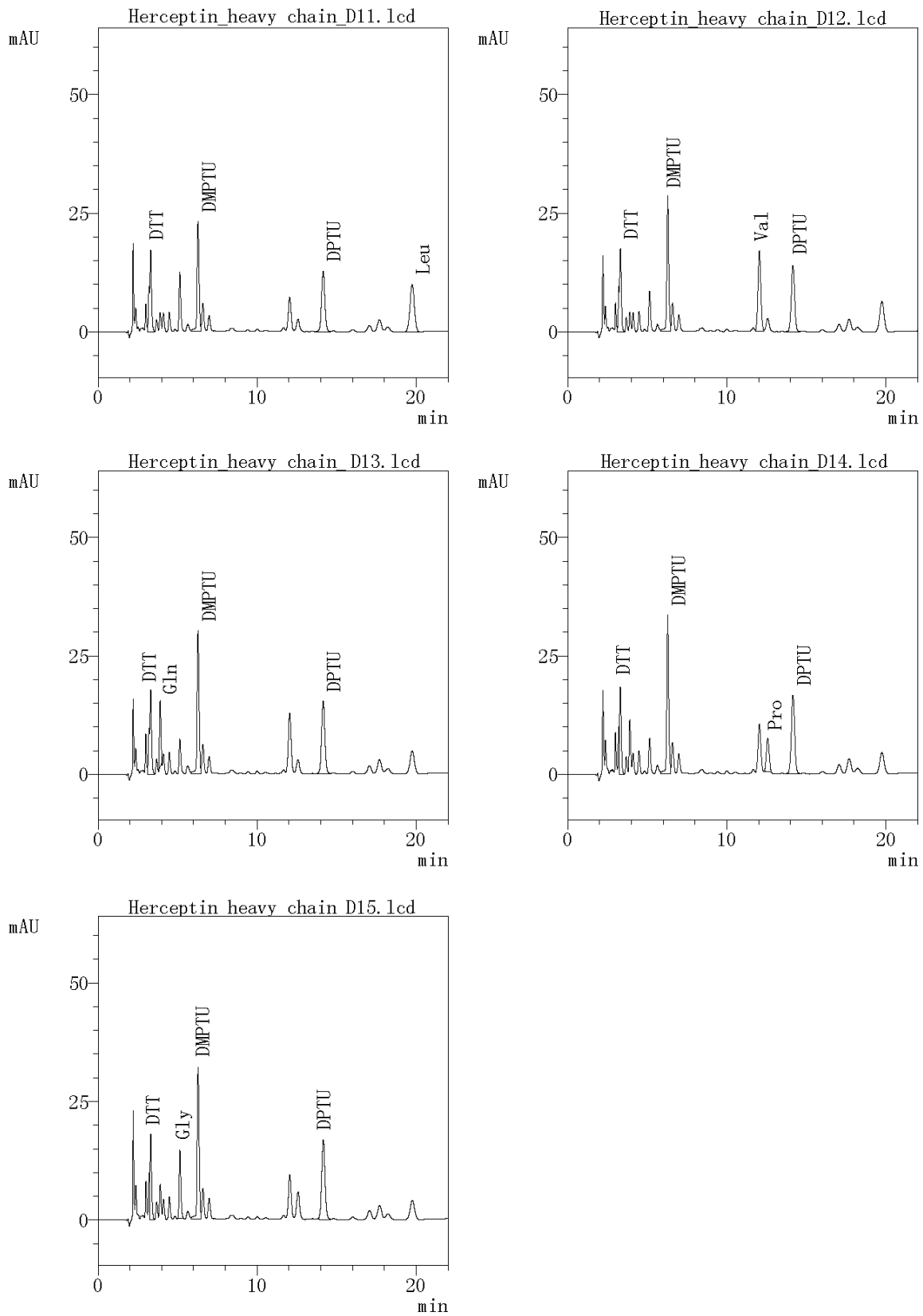
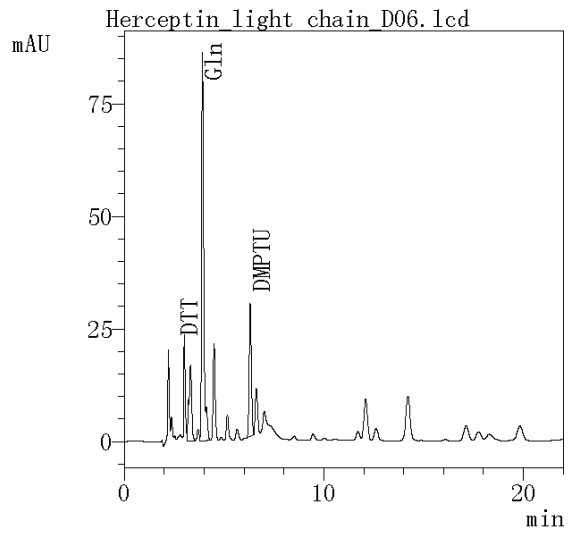
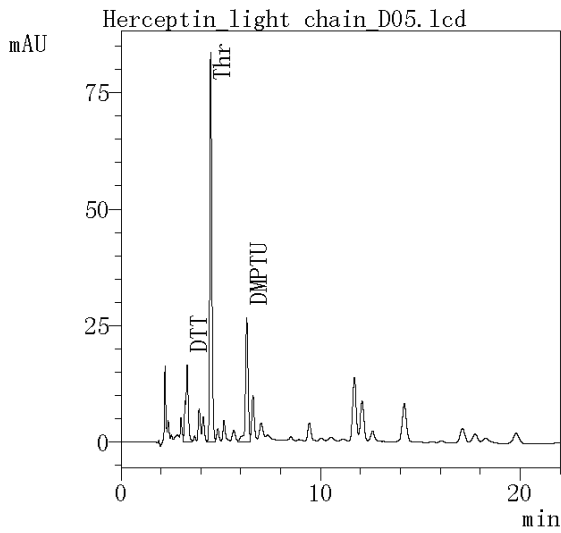
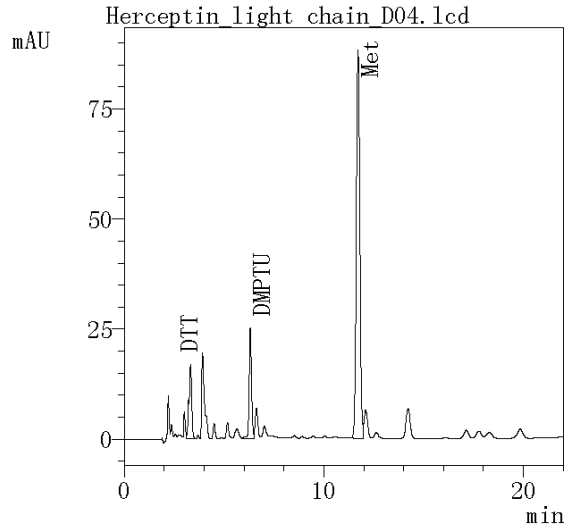
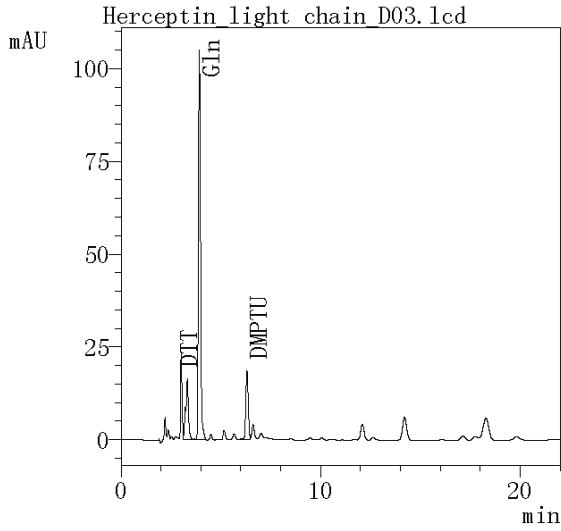
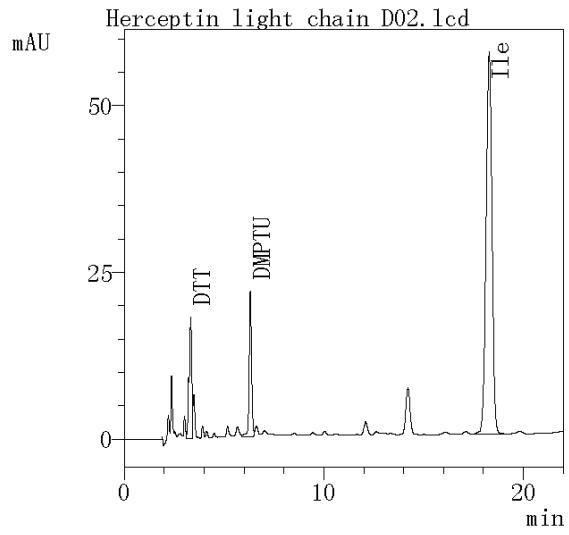
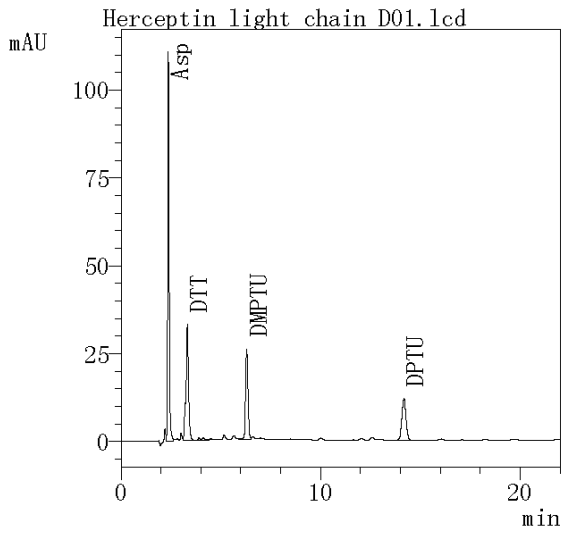
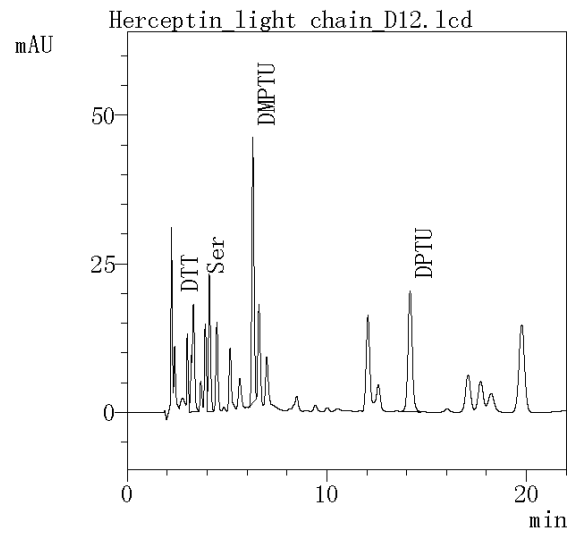
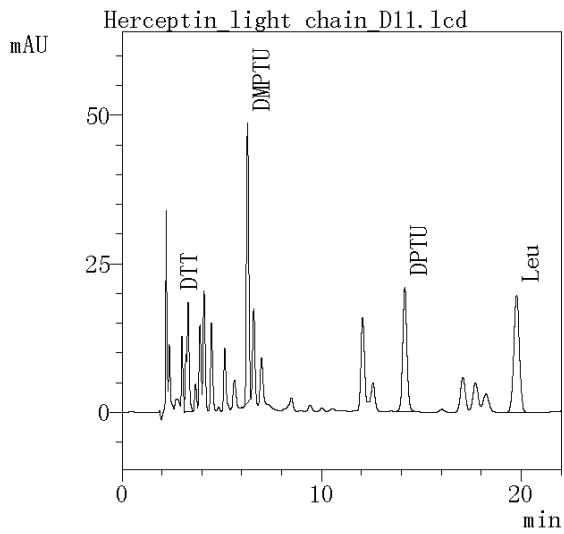
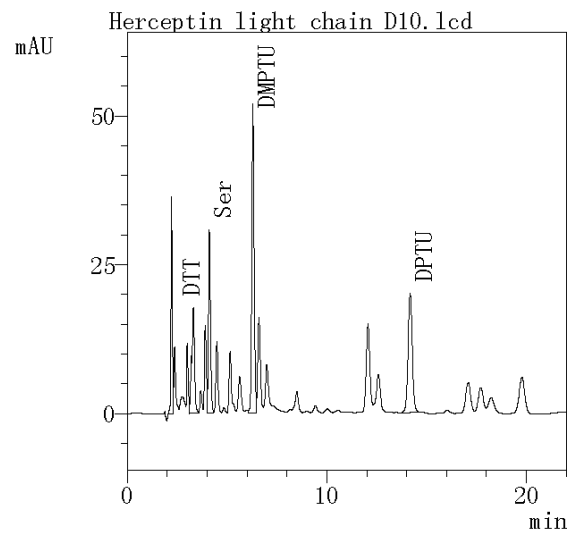
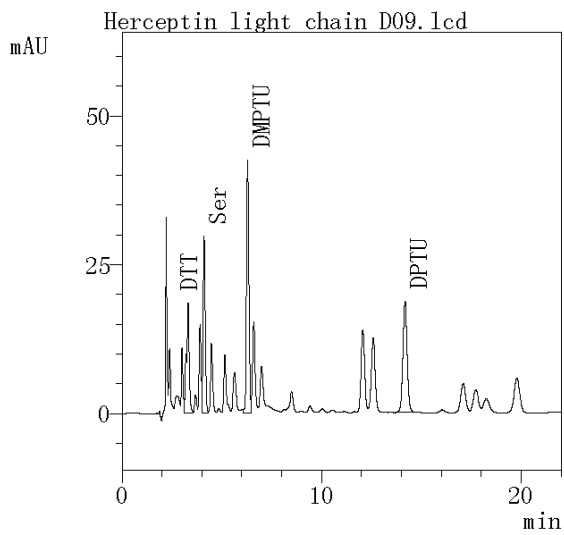
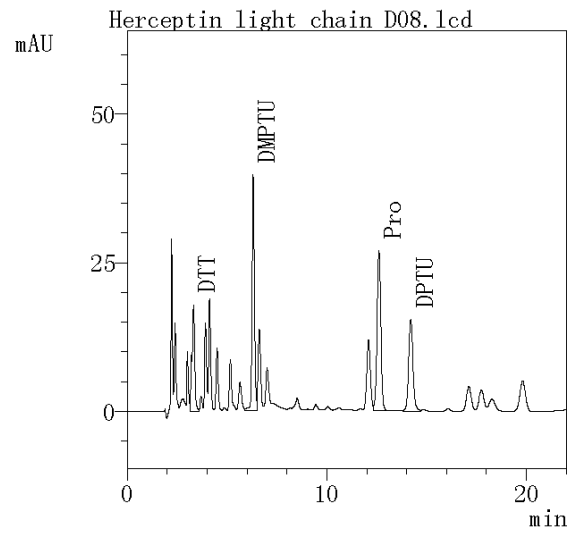
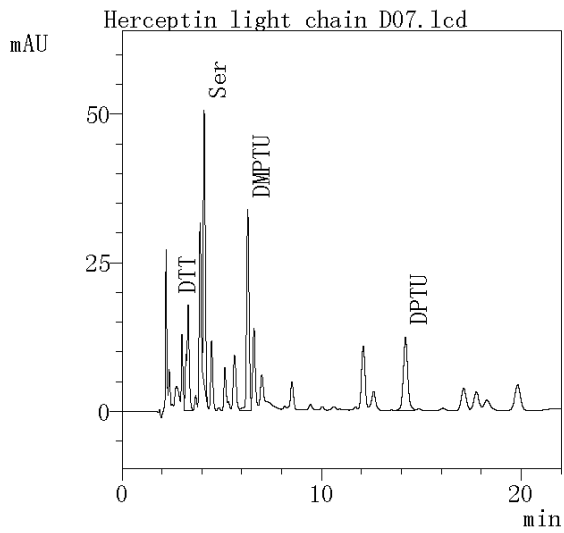


图3 曲妥珠单抗重链 N-末端氨基酸序列分析色谱图





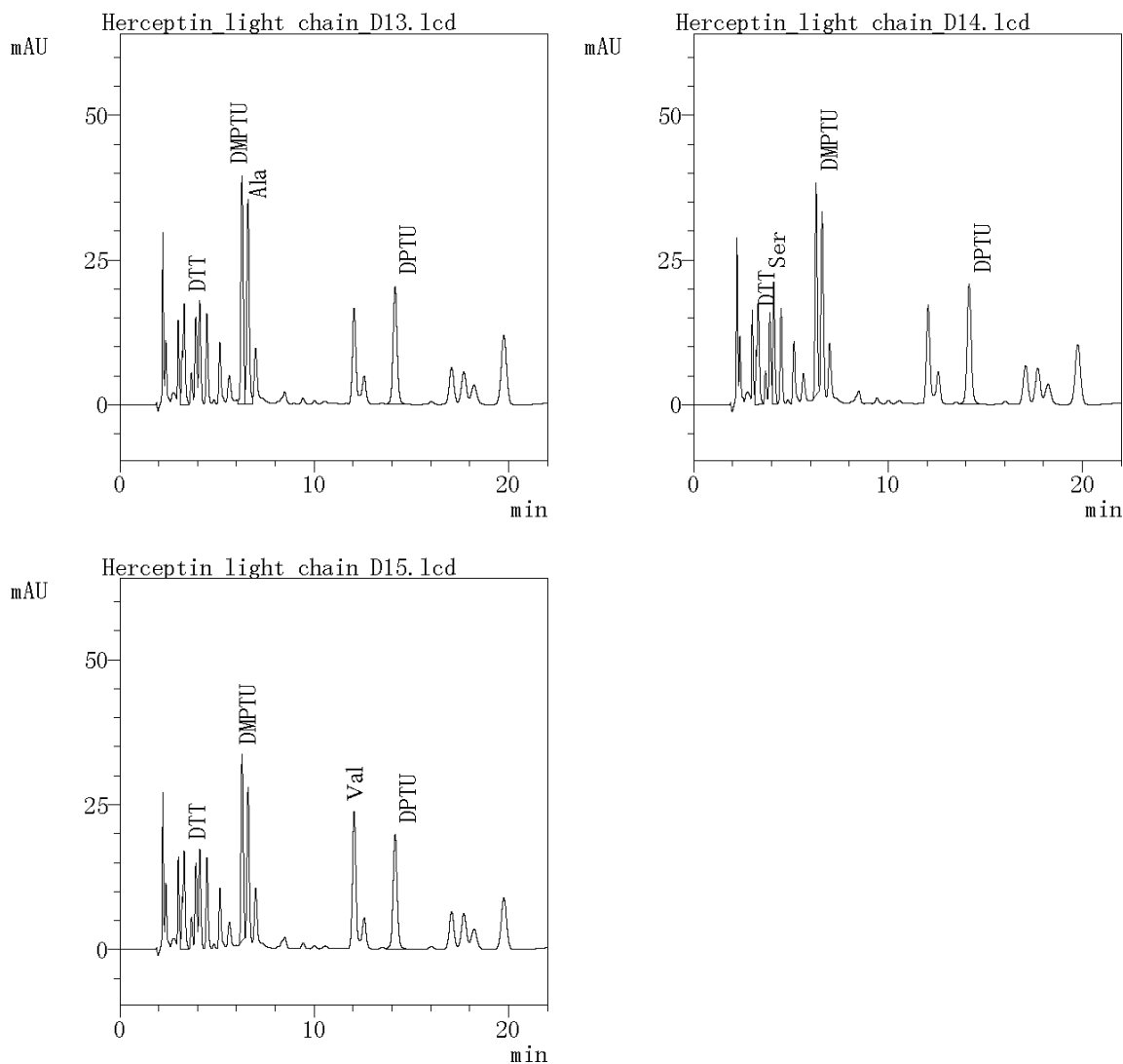


图 4 曲妥珠单抗轻链 N-末端氨基酸序列分析色谱图

■ 结论

本文应用 PPSQ-53A 成功分析了抗体药物曲妥珠单抗（赫赛汀）的重链和轻链的 N-末端前 15 个氨基酸序列，结果与理论一致，表明使用 PPSQ 可以检测蛋白质的 N-末端序列，是生物技术药物研发和质控管理中具有重要作用的分析手段。