

应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 测定 N 端焦谷氨酸环化封闭类单克隆抗体的 N 端序列

PPSQ-009

摘要： N 端焦谷氨酸环化封闭类单克隆抗体药物因 N 端缺乏自由的 α 氨基，不能通过 Edman 降解法直接进行 N 端测序。本文以帕尼单抗为例，加入焦谷氨酸氨肽酶切除环化的焦谷氨酸后，测定重链 N 端前 15 个氨基酸序列，与理论信息一致，表明对 N 端焦谷氨酸环化封闭类样品进行去焦谷氨酸环化处理，应用 PPSQ-53A 可以测定 N 端氨基酸序列。

关键词： 蛋白质测序仪 PPSQ-53A 氨基酸序列 抗体药物 帕尼单抗 焦谷氨酸环化

单克隆抗体药物因其高靶向性、低细胞毒性，是生物制药产业增长最快的领域之一。抗体药物在进行研究开发、临床申报、生产质控时，需要进行 N 端测序以进行质量评价，Edman 降解法是目前生物制品进行 N 端测序的标准方法。在抗体药物中，有些抗体的重、轻链 N 端第一个氨基酸为谷氨酸 (E) 或谷氨酰胺 (Q)，自然状态下会发生脱水或脱氨反应生成焦谷氨酸 (见图 1)。由于 N-末端缺乏自由的 α 氨基，在进行 Edman 降解法测序时，无法与 PITC (异硫氰酸苯酯) 试剂结合，

使得 Edman 降解反应无法进行下去，不能进行 N 端蛋白质序列分析。需要采用特定方法解除 N 端封闭，以进行 N 端氨基酸序列分析。

本文以抗体药物帕尼单抗 (Vectibix) (临床用于治疗结直肠癌) 为例，取样品直接进行 N 端测序，没有获得有效氨基酸信号；将样品应用焦谷氨酸氨肽酶切除环化的焦谷氨酸后再进行 N 端测序，成功测得样品重链的 N 端氨基酸序列。

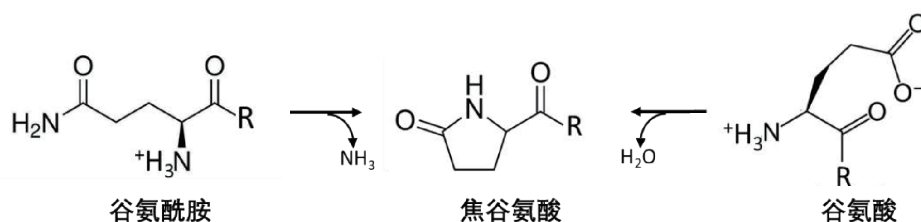


图1 N-末端谷氨酸/谷氨酰胺生成焦谷氨酸反应过程

实验部分

1.1 仪器

蛋白质测序仪 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)
Pfu Pyroglutamate Aminopeptidase (焦谷氨酸氨肽酶) (Takara, code: 7334)
PVDF 膜 (聚偏氟乙烯膜) (碧云天, Code: FFP32)
样品: 帕尼单抗 (Vectibix) 注射液 (20 mg/mL) (重链 N 端环化封闭)

1.3 样品前处理

取 10 μg 帕尼单抗注射液样品进行 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, 待自然晾干后剪切重链条带, 安装到反应器上进行分析, 测试样品 N 端前 5 个氨基酸的序列。

取 20 μg 样品, 加入 1× 消化缓冲液、0.1% Tween-20 (促溶作用)、5 mU 焦谷氨酸氨肽酶, 加水补齐到 100 μL, 75°C 孵育 6 h。取孵育产物进行 SDS-PAGE 电泳和电转印, 剪切重链条带, 安装到反应器上进行分析, 测试样品 N 端前 15 个氨基酸的序列。

1.4 PPSQ 分析条件

分析模式: PVDF

循环数: 未经切焦谷氨酸处理样品循环数为 6, 经去焦谷氨酸环化处理样品循环数为 16, 其中第一个循环不参与反应。

■ 结果与讨论

2.1 PTH- 氨基酸混合标准品测试色谱图

为进行校准, 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。

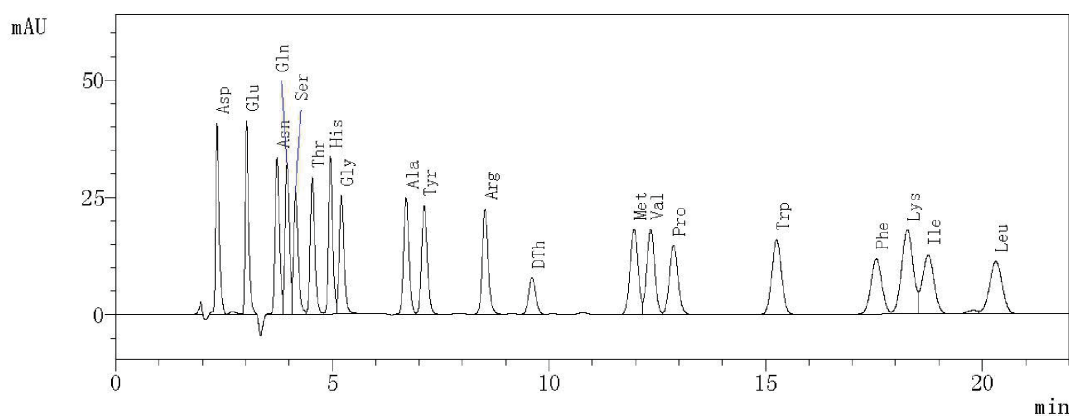


图2 PTH-氨基酸混合标准品校准测试图谱

2.2 样品直接电转印后进行 N 端测序的色谱图

将样品直接电转印至 PVDF 膜上，剪切重链条带安装至 PPSQ-53A 上，测定 N 端前 5 个氨基酸的序列，结果见图 3。由图可知，样品未检测到有效信号峰，这是由于样品重链 N 端焦谷氨酸环化封闭，不能进行 Edman 降解反应，无法直接通过蛋白质测序仪进行 N 端测序。

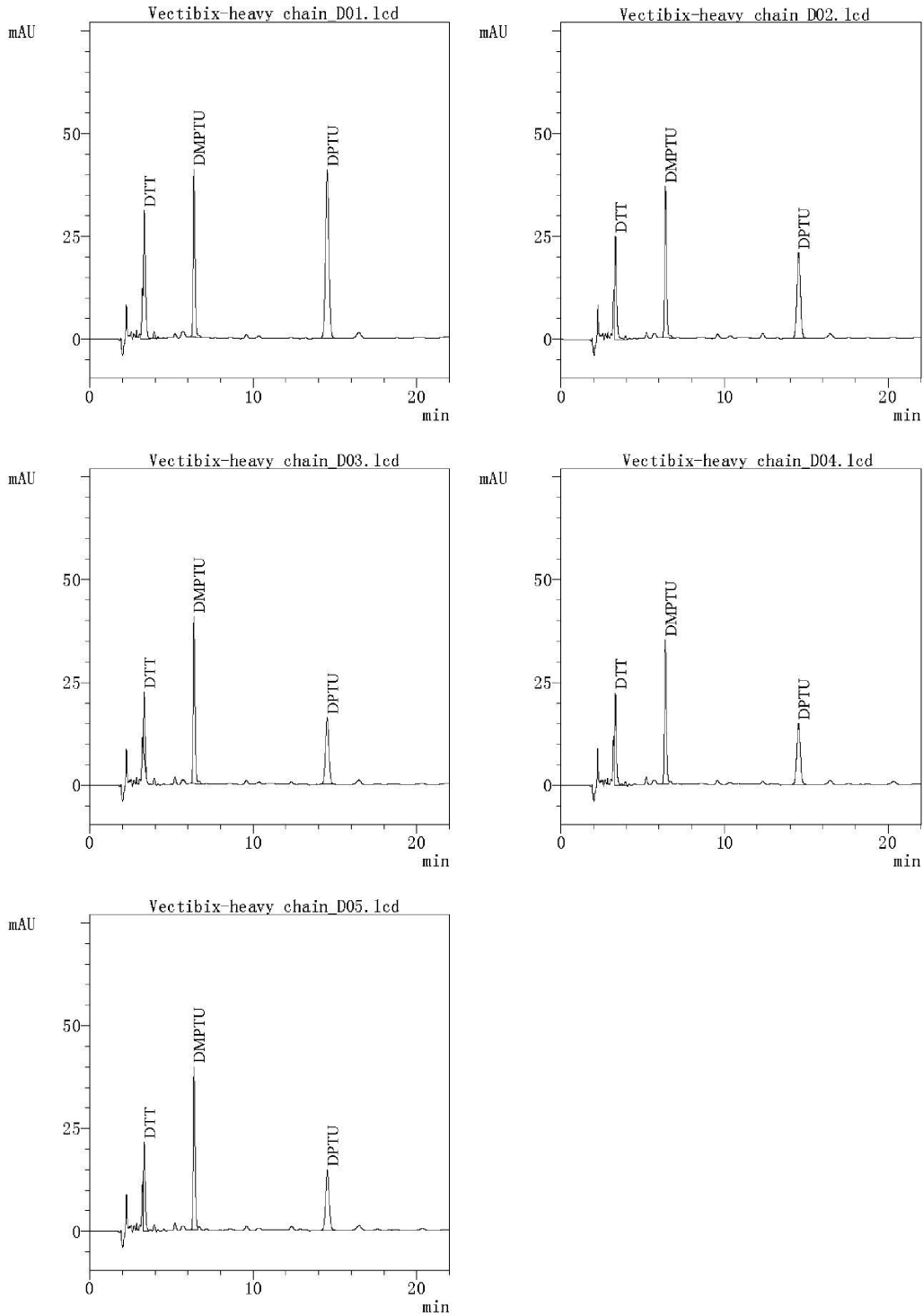


图3 未经切焦谷氨酸处理的帕尼单抗N端氨基酸序列分析色谱图

2.3 样品切焦谷氨酸后 N 端氨基酸序列分析色谱图

将样品应用焦谷氨酸氨肽酶进行去焦谷氨酸环化处理后（见图 4），测定重链 N 端前 15 个氨基酸的序列，结果如图 5 所示。由图可知，样品重链 N 端氨基酸序列为 VQLQESGPGLVKPSE，与理论序列一致 QVQLQESGPGLVKPSE（N 端第一个氨基酸 Q 被焦谷氨酸肽酶切除）。

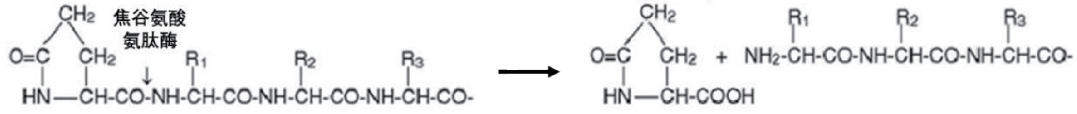
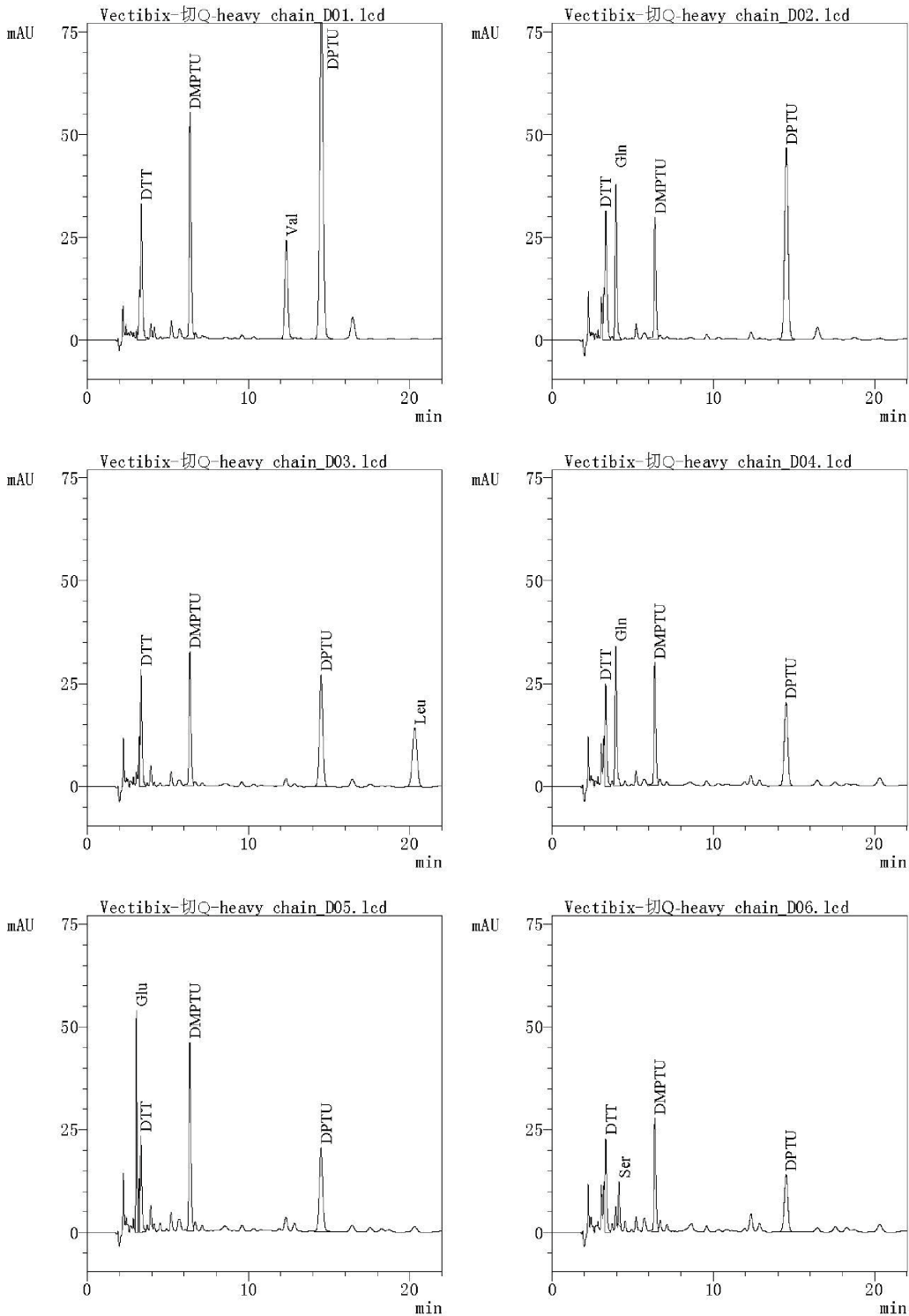
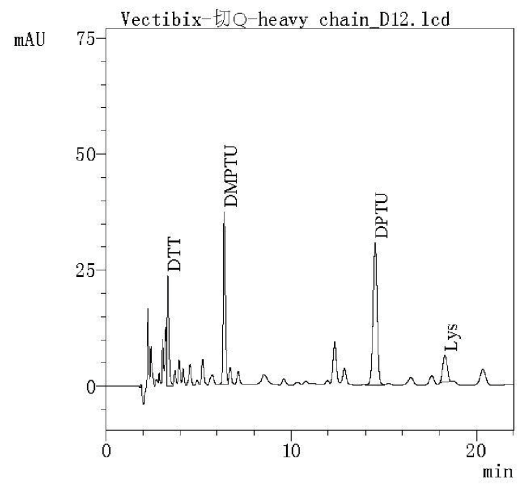
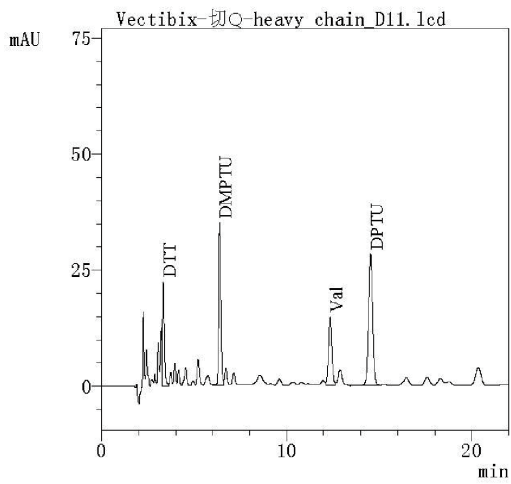
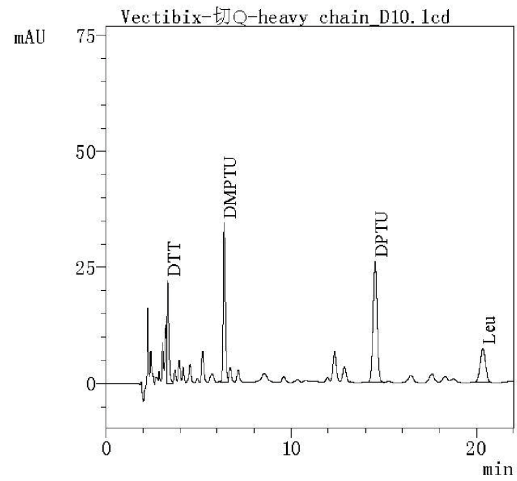
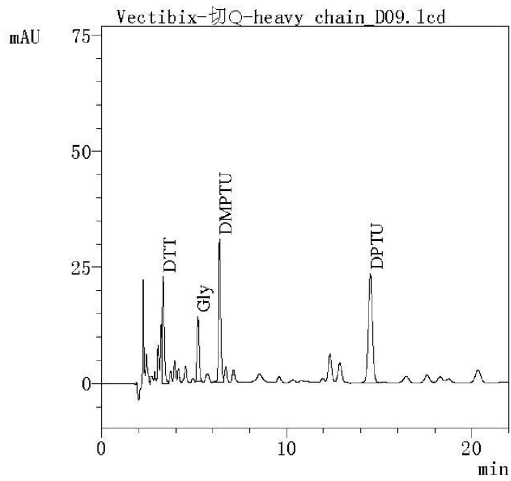
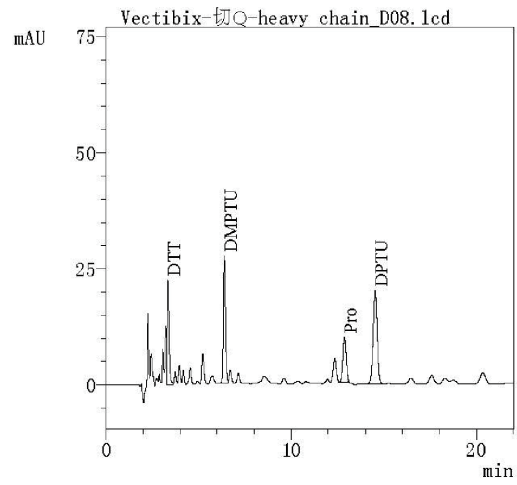
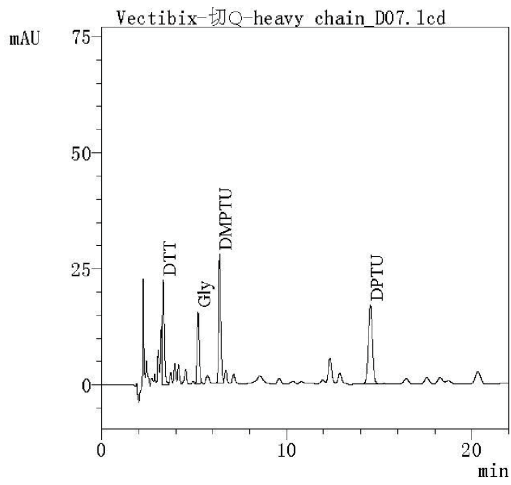


图4 焦谷氨酸氨肽酶切去焦谷氨酸





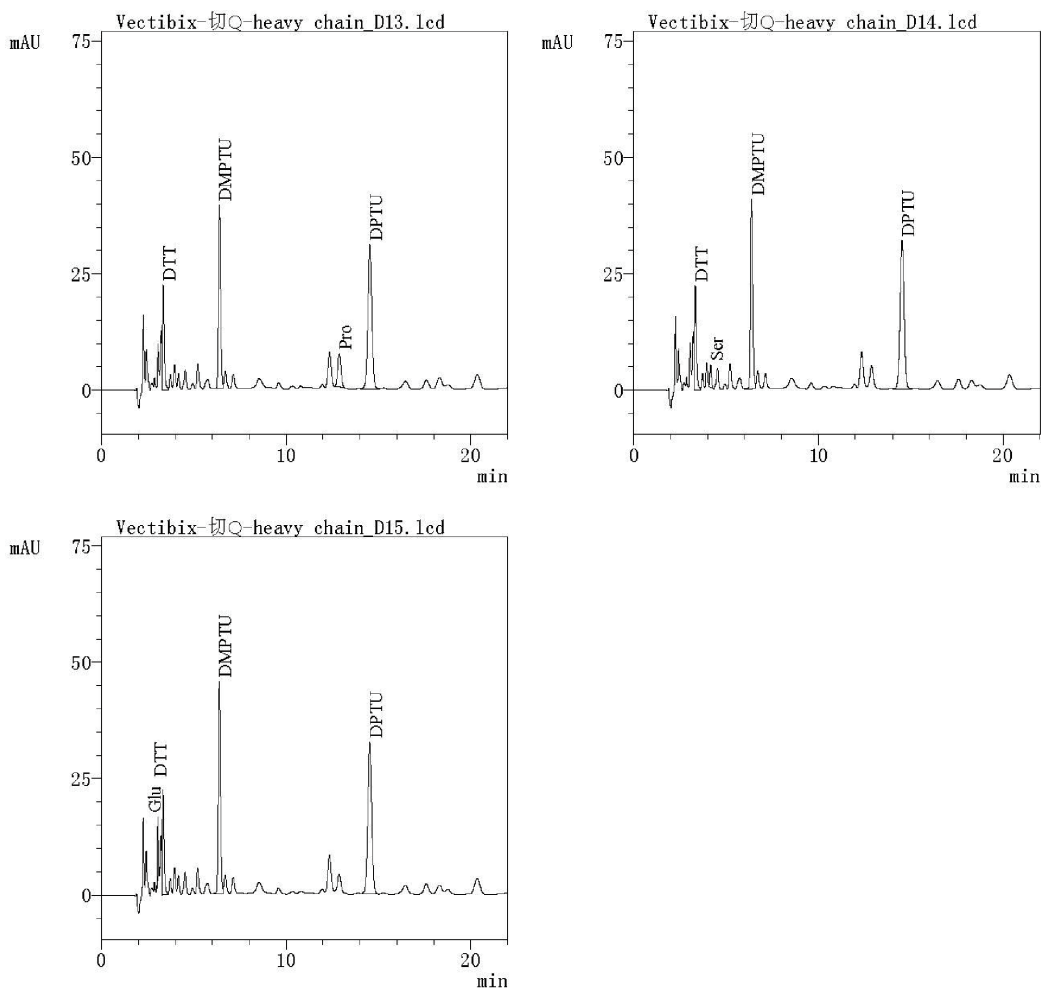


图5 帕尼单抗切焦谷氨酸后的N端氨基酸序列分析色谱图

■ 结论

本文应用焦谷氨酸氨肽酶对 N 端因焦谷氨酸环化而封闭的抗体药物帕尼单抗进行切焦谷氨酸后，使用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 测定 N 端氨基酸序列，结果与理论信息一致，表明 PPSQ-53A 可以检测类似药物的 N 端氨基酸序列，是生物技术药物研发和质控管理中强有力的分析工具。