

重组人 B 淋巴细胞刺激因子受体 - 抗体融合蛋白的肽图分析

姚雪静 李壮林 房健民

(烟台荣昌生物工程有限公司 烟台 264006)

摘要 目的: 建立重组人 B 淋巴细胞刺激因子受体 - 抗体融合蛋白(TACI - Fc)的肽图分析方法。方法: 将 TACI - Fc 蛋白用胰蛋白酶酶解、用尿素将蛋白分子变性、用二硫苏糖醇打断二硫键、用碘乙酰胺封闭巯基、用胰蛋白酶再次酶解等方法处理后, 采用高效液相色谱分析, 色谱柱为 Vydac C₁₈(250 mm × 4.6 mm 5 μm), 流动相 A 液为含 0.1% 三氟乙酸的水溶液, 流动相 B 液为含 0.1% 三氟乙酸的乙腈溶液, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长为 214 nm。结果: TACI - Fc 蛋白被有效酶解, 酶解后的各个片段能够很好的分离。结论: 本法准确性高, 重复性好, 是重组人 B 淋巴细胞刺激因子受体 - 抗体融合蛋白结构确认的有效方法。

关键词: 重组; 淋巴细胞; 刺激因子; 受体; 抗体; 融合蛋白; 肽图

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254 - 1793(2011)06 - 1185 - 03

Peptide mapping analysis of recombinant human B lymphocyte stimulator receptor: IgG Fc fusion protein

YAO Xue - jing, LI Zhuang - lin, FANG Jian - min

(Yantai Rongchang Bioengineering Co., Ltd, Yantai 264006, China)

Abstract Objective: To establish a peptide mapping analysis method in recombinant human B lymphocyte stimulator receptor: IgG Fc fusion protein. **Method:** The TACI - Fc protein was digested with trypsin and then was denatured by urea. Next the disulfide bonds were interrupted by dithiothreitol and the thiol groups were closed with iodoacetamide. Finally, the treated TACI - Fc protein was digested with trypsin again and assayed by HPLC. Vydac C₁₈(250 mm × 4.6 mm 5 μm) was used as analysis column. 0.1% trifluoroacetic acid in water and 0.1% trifluoroacetic acid in acetonitrile were used as mobile phase A and mobile phase B, respectively. The gradient elution process was performed. The detection wavelength was 214 nm and flow rate was 1.0 mL · min⁻¹. **Results:** The fragments of TACI - Fc were well digested and separated. **Conclusion:** This method is accurate, stable and reliable for testing of human B lymphocyte stimulator receptor: IgG Fc fusion protein peptide mapping.

Key words: recombinant; lymphocyte; stimulator; receptor; antibody; fusion protein; peptide mapping

重组人 B 淋巴细胞刺激因子受体 - 抗体融合蛋白是将人 B 淋巴细胞刺激因子(BlyS)的受体 TACI 的胞外特定可溶性部分, 与人 IgG1 的 Fc 部分构建成的融合蛋白, 可以用于类风湿性关节炎和系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病的治疗^[1-3]。

利用特定的方法将 TACI - Fc 蛋白裂解, 然后通过高效液相色谱进行肽图分析, 再与对照品图谱比对, 观察其一致性, 可以判断 TACI - Fc 蛋白一级结构的完整性和准确性。由于 TACI - Fc 蛋白为融合的二聚体蛋白, 分子内部二硫键较多, 结构复杂, 用常规方法对其进行肽图分析, 效果不理想。本研

究通过对 TACI - Fc 蛋白的多步预处理, 使其充分被胰蛋白酶酶解, 建立了一个有效的、稳定的肽图分析方法, 可以应用于 TACI - Fc 蛋白的质量控制。

1 仪器及试剂

Agilent LC 1200 高效液相色谱仪, Beckman Microfuge 18 离心机, DHP - 300 型电热恒温培养箱。胰蛋白酶(质谱级)、碘乙酰胺购自 Sigma 公司, 二巯基苏糖醇(DTT)购自 Bio Basic 公司, 碳酸氢铵、冰乙酸、尿素、三氟乙酸均为分析纯, 乙腈为色谱纯。TACI - Fc 对照品(浓度 5.42 g · L⁻¹, 纯度 > 99.5%)、TACI - Fc 供试品(批号 20091201,

20100101 20100301 浓度均为 $80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 均由烟台荣昌生物工程有限公司生产。

2 方法

2.1 溶液配制 称取胰蛋白酶适量,加入 1% 碳酸氢铵溶液溶解,制成每 1 mL 中含 0.2 mg 的胰蛋白酶溶液,现配现用。100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT 储备液的配制:称取 DTT 154 mg,加入 10 mL 纯化水溶解,置 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

2.2 样品处理

供试品、对照品稀释及初步酶解:将供试品和对照品分别用超纯水稀释至浓度 $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,然后按酶:蛋白(1:200, $\mu\text{g}/\text{mg}$),分别加入胰蛋白酶溶液,置于 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温箱,保温 24 h。

蛋白质变性:称取适量尿素分别加入到对照品溶液和供试品溶液中,使尿素终浓度为 $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,放于 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温箱,保温 1 h。

还原二硫键:适量量取 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT 储备液,分别加入到供试品和对照品溶液中,使 DTT 终浓度为 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,于沸水浴加热 2 min。

封闭巯基:称取适量碘乙酰胺,分别加入到供试品和对照品溶液中,使碘乙酰胺终浓度为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,于 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中放置过夜。

然后将供试品和对照品溶液在 1% 碳酸氢铵溶液中透析 24 h,按照酶-蛋白比例 1:50(mg/mg),分别向供试品和对照品溶液中加入胰蛋白酶溶液,置于 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温箱,保温 24 h。加入 50% 醋酸溶液使其终浓度为 5%,终止反应。将供试品和对照品溶液用 $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,收集上清液,用液相色谱仪分析。

2.3 常规肽图分析方法的样品处理 按照中国药典中的方法,仅将样品用胰蛋白酶处理,然后用液相分析^[4]。

2.4 色谱条件 色谱柱为 Vydac C_{18} (250 mm \times 4.6 mm 5 μm) 蛋白分析柱。以 0.1% 三氟乙酸的水溶液为流动相 A 液,以 0.1% 三氟乙酸的乙腈溶液为流动相 B 液,梯度洗脱 70 min(A 液从 100% ~ 30%, B 液从 0 ~ 70%),流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长为 214 nm,柱温为 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$,进样量 100 μL 。

3 结果

3.1 本方法与常规肽图分析方法的比较 将 TACI-Fc 对照品不进行任何预处理,直接用液相分析,结果见图 1-A,在 39 min 左右有 1 个目标蛋白峰。按照中国药典中收录的常规肽图分析方法, TACI-Fc 对照品肽图结果见图 1-B, 39 min 左右的蛋白

主峰仍然存在,说明胰蛋白酶无法将 TACI-Fc 分子充分裂解,因此产生的肽段数量很少。按照本试验方法将 TACI-Fc 对照品进行肽图分析, TACI-Fc 蛋白被充分裂解,产生的肽段数量较多,结果见图 1-C。

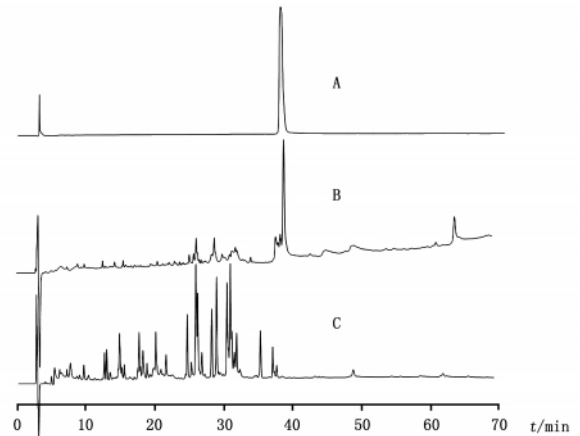


图1 使用常规方法和本试验方法将 TACI-Fc 对照品进行肽图分析

Fig 1 Peptide mapping analysis of TACI-Fc by conventional method and test method

A. 对照品未经酶解,直接进行液相分析(the analysis of un-pretreated reference substance by HPLC) B. 按照常规方法得到的对照品肽图(peptide mapping analysis of reference substance by conventional method) C. 按照本试验方法得到的对照品肽图(peptide mapping analysis of reference substance by test method)

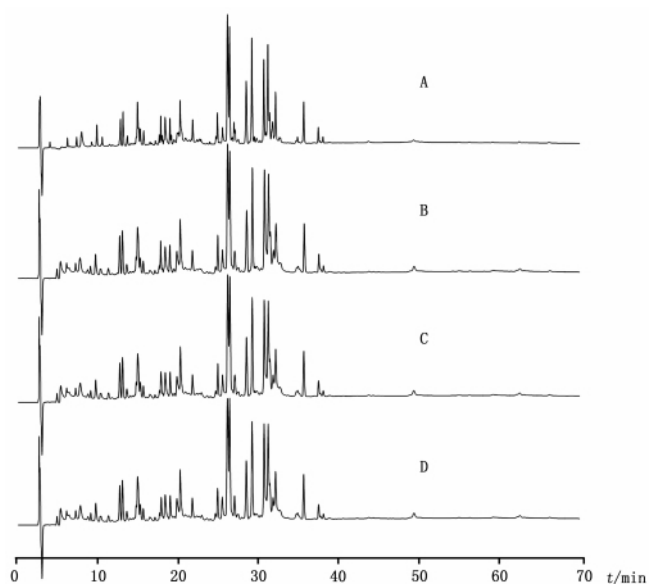


图2 3批 TACI-Fc 供试品肽图分析

Fig 2 The peptide mapping analysis of three batches of TACI-Fc
A. 对照品(reference substance) B. 批号 20091201(batch number 20091201) C. 批号 20100101(batch number 20100101) D. 批号 20100301(batch number 20100301)

3.2 3批 TACI-Fc 供试品的肽图分析 利用本研究中肽图分析方法,进行了3批 TACI-Fc 供试品(批号 20091201, 20100101, 20100301)的分析,结果3批样品的肽图均与对照品一致(见图2)。

4 讨论

重组人 B 淋巴细胞刺激因子受体-抗体融合蛋白是1个二聚体蛋白,单体分子量为 37.7 kD,二聚体分子内含有 18 个半胱氨酸,在二聚体分子间和分子内部形成了复杂的二硫键。利用常规的方法不能有效地对其进行肽图分析。本文将 TACI-Fc 先初步酶解,然后用尿素溶液破坏其三级结构,再用 DTT 打断所有的二硫键,为了让断开的二硫键不再重新配对,采用碘乙酰胺将自由巯基封闭,最后用胰蛋白酶溶液完全将 TACI-Fc 酶解,酶解后的各个片段经高效液相得到了很好的分离。连续3批供试品的分析表明,本法准确性高,重复性好,是重组人

B 淋巴细胞刺激因子受体-抗体融合蛋白结构确认的有效方法,这也为同类蛋白质药物的肽图研究提供了1个切实可行的方法。

参考文献

- 1 Nestorov I, Munafo A, Papisoulitis O, et al. Pharmacokinetics and biological activity of atacicept in patients with rheumatoid arthritis. *J Chin Pharmacol* 2008, 48(4): 406
- 2 Bracewell C, Isaacs JD, Emery P, et al. Atacicept, a novel B cell-targeting biological therapy for the treatment of rheumatoid arthritis. *J* 2009, 9(7): 909
- 3 Dall'Era M, Chakravarty E, Wallace D, et al. Reduced B lymphocyte and immunoglobulin levels after atacicept treatment in patients with systemic lupus erythematosus: results of a multicenter, phase Ib, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating trial. *Arthritis Rheum* 2007, 56(12): 4142
- 4 ChP(中国药典). 2010. Vol III(三部): Appendix(附录): 56

(本文于2010年8月6日收到)

王军志获“卫生部有突出贡献中青年专家”称号

日前,中国食品药品检定研究院副院长、生物制品检定首席专家王军志等80人获得2009~2010年度“卫生部有突出贡献中青年专家”称号。卫生部要求,要大力宣传这些专家的突出业绩,并号召广大医药卫生工作者要以他们为榜样,为实现人人享有基本医疗卫生服务目标做出更大贡献。

据介绍,王军志主要从事药品生物制品检验检测科研管理工作,致力于建立符合国际水准的生物技术药物的质量标准体系。他曾获得国家科技进步二等奖2项,国家技术发明奖1项,北京市科技进步二等奖4项,国家专利3项。他还获得“全国先进工作者”、“中央国家机关五一劳动奖章”等荣誉称号。

卫生部于2001年制定颁发《卫生部有突出贡献中青年专家选拔管理办法》,规定“卫生部有突出贡献中青年专家”的称号授予在卫生行业做出突出贡献和杰出成就的中青年专家;每两年评选一次,每届当选名额不超过80名;对同一个人不重复授予;选拔对象为在医疗、预防、保健、科研、教学等领域工作的专业技术人员和管理人员;被选拔人员的年龄原则上在55周岁(含55岁)以下。

相关链接: http://www.cnpharm.com/site1/zgyyb/html/2011-05/10/content_48426.htm

(转载自中国医药报)