

重组人白细胞介素 2-人血清白蛋白 融合蛋白的液态稳定性

罗 文, 雷健勇, 金 坚*

(江南大学 医药学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 考察了不同 pH、缓冲液成分及不同保存环境下的 IL2-HSA 融合蛋白的稳定性, 以 SDS-PAGE 和 SE-HPLC 作为考察手段并得出结论, 在 pH 为 4~6 的缓冲盐体系中, 蛋白质表现较稳定, 当 pH 为 5 时, 乙酸-乙酸钠缓冲体系较好的保持了蛋白质的稳定性。其后考察了蛋白质的辅料、光稳定性等因素对蛋白质的影响, 在经受光照射后, 蛋白质与对照样品未表现出明显区别。在乙酸盐提供的 pH 5 溶液中, 辅料为氯化钠、贮存条件为 4 ℃、贮存时间 6 个月后, 蛋白质纯度仍保持在 97% 以上。

关键词: IL2-HSA; pH; 稳定性; 液态; HPLC

中图分类号: R 944 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)02—0195—07

Stability of IL2-HSA Solution

LUO Wen, LEI Jian-yong, JIN Jian*

(School of Medicine And Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The stability of interleukin2-HSA fusion protein was examined in different pH and buffer solution environments using SDS-PAGE and SE-HPLC. A pH-5 solution of Acetic acid-Sodium acetate buffer is found to be more suitable for IL2-HSA to preserve stability. Several excipients was tested for the effect to protein stability under elevated storage temperature and photo-stability test was taken, the protein was proven to be stable throughout photo-stability test, after a 6-month-long storage NaCl is considered to be a better excipient for IL2-HSA than its rivals.

Keywords: IL2-HSA, pH, stability, liquid, HPLC

人白细胞介素 2(IL2)是一个糖基化了的相对分子质量为 15 500 的单分子蛋白质^[1], 由达特茅斯医学院的 Kendall Smith 及其团队使用抗体亲和层析纯化所得。IL-2 为 T 细胞的生长和功能实现所必

需, 由机体在免疫应答过程中产生^[2-3], 抗原在结合至 T 细胞受体(TCR)后刺激 IL-2 的分泌和 IL-2 受体 IL-2R 的表达, 之后 IL-2/IL-2R 的相互作用通过激活特定的基因促进了抗原选择的细胞毒 T 细胞

收稿日期: 2012-04-06

基金项目: 江苏省产学研前瞻性联合研究项目(BY2009111)。

* 通信作者: 金 坚(1960—), 男, 江苏苏州人, 医学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事长效蛋白重组药物与肿瘤多药耐药机制方面的研究。E-mail: jinjian31@126.com

的生长、分化及存活^[4-6]。IL-2 具有促进淋巴 T 细胞增殖与分化,诱导及增强杀伤性 T 细胞、单核细胞、巨噬细胞的活力,使细胞毒淋巴细胞活化等作用。在 1992 年重组人白细胞介素 2 经 FDA 批准上市(商品名:Proleukin,普留净),广泛用于肾细胞癌、黑色素瘤、乳腺癌、膀胱癌等恶性肿瘤的治疗。然而 IL2 由于相对分子质量小,仅有 15 500^[7],极易通过肾小球滤过而排出,血浆半衰期短,仅 7 min 左右^[8],患者通常面临要多次重复给药的问题,频繁注射造成了患者的痛苦。国内外也有对其进行 PEG 修饰、糖基化修饰等以期延长药物的血浆驻留时间的研究。而作者所在研究室将其与人血清白蛋白(HSA)进行了融合^[9],融合蛋白(IL2-HSA)相对分子质量增大为 81 000^[10],不易被肾清除,由于延长了血浆半衰期,能有效避免重复给药,减少病患痛苦。为开发适用于 IL2-HSA 的液体注射剂型,作者使用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和分子排阻高效液相法(SE-HPLC)研究了蛋白质在不同 pH 和不同缓冲盐体系的液态稳定性,并初步考察了数种药用辅料以及储存条件对蛋白质稳定性的影响,为后续的制剂工作打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

IL2-HSA:是由携带有 rhIL2-HSA 融合基因表达质粒 pPIL2-HSA 的 GS115 毕赤酵母中表达所得。发酵液经离心后去除菌体,上清液超滤浓缩,使用 GE 公司的 Akta FPLC 系统和相应填料经数步纯化^[7],以双抗体夹心法检测^[11]确定融合蛋白,得到纯度(HPLC 检测)大于 98%的 IL2-HSA。

电泳设备为 PowerPac 3000; BioRad 美国; SDS-PAGE 分离胶:依药典中常用的 15%比例配制; HPLC 及检测系统:安捷伦 1100 系列,美国; SEC 柱为:G3000,7.8 mm×300 mm,日本 TSK;柱温 30 ℃,上样量 20 μL,紫外检测器检测波长 220 nm。其他试剂:均为国药集团出品,除另有说明外均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 pH 和缓冲盐的筛选 选择 3 种缓冲盐,分别为乙酸-乙酸钠体系、磷酸氢二钾-磷酸二氢钾体系和柠檬酸-磷酸氢二钠体系^[12],其浓度均为 10 mmol/L,各自 pH 值及编号见表 1。各 pH 值的选定均在各缓冲盐体系的缓冲能力范围内。

表 1 不同 pH 的缓冲盐编号表

Table 1 Code list of various buffer solutions at different pH

缓冲液	pH 值				
	4	5	6	7	8
乙酸盐缓冲液	1	2	3	—	—
磷酸盐缓冲液	—	—	4	5	6
柠檬酸盐缓冲液	7	8	9	10	11

配制质量浓度为 1 g/L 的 IL2-HSA 溶液,溶液的 pH 值由 10 mmol/L 的各缓冲体系提供,溶液经 0.22 μm 的针式过滤器于无菌环境滤过后,以 1 mL 分装量分装于 2 mL 的硅硼玻璃西林瓶中压盖密封,依成分不同按表 1 所规定序号标号,所得样品分别于 4 ℃和 37 ℃保存并于 15、30、60 d 后取样,以 SDS-PAGE 和 SE-HPLC 检测蛋白质纯度变化。

缓冲液使用了尽量低的浓度,因为已有数篇文献曾报道过蛋白质失活或者脱氨速率加快与缓冲盐浓度升高的正比例关系^[13]。因此本研究中的所有缓冲液浓度均设定为 10 mmol/L。

1.2.2 辅料的筛选 选取几种药典规定的常用于注射剂的辅料和一种可能有助于蛋白质在液态环境下保持稳定的非离子表面活性剂,以药用辅料手册中常用质量浓度^[14]进行考察,见表 2。

表 2 辅料成分及编号表

Table 2 Code list of excipients

成分	编号	英文名/化学式	摩尔质量	浓度
氯化钠	A	NaCl	58.44	0.8 g/dL
葡萄糖	B	Glucose	180.16	5.5 g/dL
甘露醇	C	Mannitol	182.172	5 g/dL
山梨醇	D	Sorbitol	182.17	5.48 g/dL
丙三醇	E	Glycerol	92.094	2.6%
甘氨酸	F	Glycine	75.07	2.3 g/dL
吐温 80	G	Tween-80	1309.5	0.005 g/dL
氯化钠+吐温 80	H	—	—	—

注:此处所列辅料浓度,除丙三醇为体积比外,其余皆为质量体积比;编号为 H 的辅料配方中各组分质量浓度与单组份使用时相同。

配制质量浓度为 1 g/L 的 IL2-HSA、pH 值为 5 的溶液,溶液中含有表 2 中所列的辅料成分,依辅料成分不同标记为 A~H,溶液经 0.22 μm 的针式过滤器于无菌环境滤过后,以 1 mL 分装量分装于 2 mL 的硅硼玻璃西林瓶中压盖密封。所得样品于 37 ℃保存并于 15、30、90 d 后取样,以 SE-HPLC 和

SDS-PAGE 检测蛋白质纯度变化。

1.2.3 长期稳定性实验和光照实验 由于蛋白质药物的特殊性,一般无法通过加速实验数据来推算其可能的货架期。而蛋白质类物质的货架期可能千差万别,因此很难有统一的约束蛋白质剂型货架期的规定。但是一般来讲,蛋白质药物的货架期基本都保持在半年以上。将 IL2-HSA 蛋白质以表 2 中 A~F 的 6 种配方制剂并在 4℃ 下避光保存 6 个月,6 个月后取样,以 SDS-PAGE 和 SE-HPLC 检测考察其稳定性。

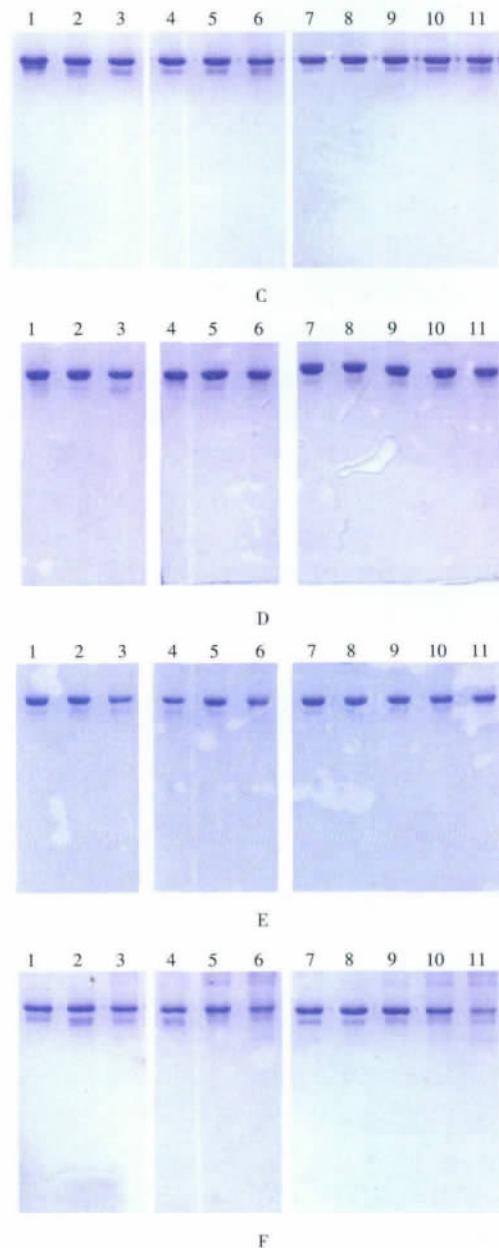
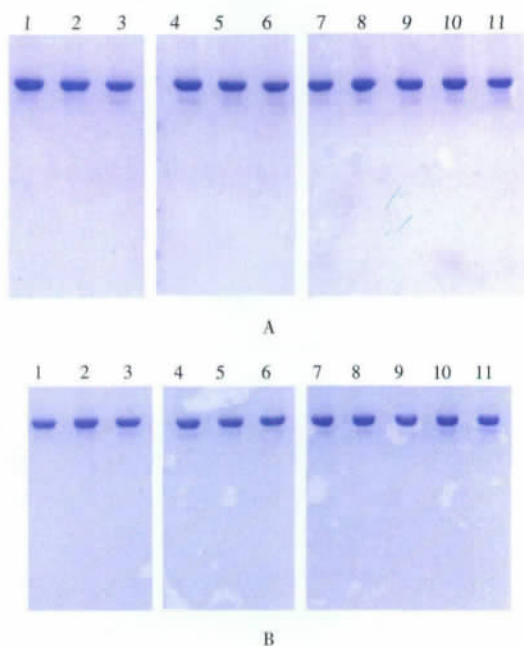
按照 ICH(人用药品注册要求国际协调会)的要求,药物需在经受不小于 1.2×10^6 Lux·h(勒克斯时)光照强度后检测其稳定性。将 IL2-HSA 蛋白质以表 2 中 A~F 的 6 种配方制剂,将样品于 4℃ 环境中接受 $(7\,500 \pm 500)$ Lux 的照度接受照射并维持 7 d,以达到总光照强度 1.2×10^6 Lux·h ($7\,500$ Lux·24 h·7 = 1.26×10^6 Lux·h),并于第 4 天、第 7 天取样,以 SDS-PAGE 和 SE-HPLC 检测蛋白质变化

1.2.4 生物活性检测 在保存半年后将样品委托江苏金丝利药业有限公司,依中华人民共和国药典第三部附录 XD 规定的方法^[16]进行生物活性检测。

2 结果与讨论

2.1 缓冲盐

图 1 是各时间间隔取样的 SDS-PAGE 结果,分离胶质量浓度为 15 g/dL,样品上样量 2 μ L。



A: 4℃ 保存 15 d B: 4℃ 保存 30 d C: 4℃ 保存 60 d
D: 37℃ 保存 15 d E: 37℃ 保存 30 d F: 37℃ 保存 60 d

图 1 不同 pH 值和缓冲液对蛋白质的影响

Fig. 1 Effects of various solution on protein

图 1 中, A 与 D、B 与 E、C 与 F 皆为不同环境温度相同取样间隔的样品, 通过对比发现, 在保存 15 d 后取样的结果并无可观察到的差异, 各样品均有极小程度的降解, 而在保存 30 d 后, 虽然图像仍大致相似, 但差异开始显现, 最具代表性的就是图 1B 和图 1E 中 3 号的对比, 3 号样品较早地表现出了对 37℃ 保存温度的差耐受能力, 而与其相邻的 4

号也表现出了同样的不耐受程度,而6号样品也有着程度略低于3号、4号的浓度降低。

一个明显的现象发生在图1F的7~11号之间,可以看到从7号到11号,目的条带的浓度有降低的趋势,而同时伴随着杂带的增多,甚至在9~11号的主带上方开始逐渐出现新的大分子条带,蛋白质形成了聚合物,而且,随着编号递增而加剧,考虑到7~11号为柠檬酸盐缓冲体系,且pH值为4~8递增,另外,图1F的5号和6号也有大分子的条带产生,而这两个样品对应着的是磷酸盐缓冲体系pH为7和8的样品。在本实验所考察的溶液中,溶液

pH越高,IL2-HSA就越易产生聚合产物和降解片段,当环境pH高于6时,蛋白质变化明显,pH大于7时,蛋白质有明显的聚集体形成,IL2-HSA溶液适合保存于pH在4~6的区间内。乙酸盐缓冲体系对蛋白质的影响最温和。

在保存了60 d后,差异更加明显。对照30 d后的电泳结果,60 d后无论是4℃保存的还是37℃保存的样品都发生了显而易见的变化,而37℃样品发生的变化更加明显。

HPLC的检测结果见表3和图2。这很好的验证了SDS-PAGE的结果。

表3 37℃间隔取样样品的SE-HPLC纯度

Table 3 SE-HPLC purity result from 37℃ preservation

时间/d	编号 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	pH 4	5	6	6	7	8	4	5	6	7	8
15	98.76	98.44	98.21	98.38	98.43	98.41	98.81	98.65	98.18	98.11	98.21
30	97.86	98.90	93.12	94.49	96.95	93.98	95.27	94.97	95.45	95.0	94.83
60	95.21	96.51	88.89	87.36	85.65	82.35	93.67	92.48	88.71	83.71	79.49

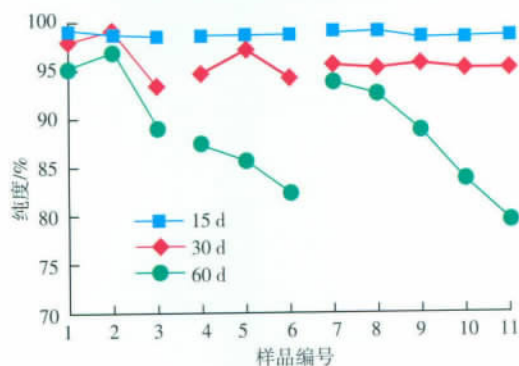


图2 37℃保存, 间隔15、30、60 d取样的样品SE-HPLC纯度趋势图

Fig. 2 Trendgraph of protein in different solution from 37℃ preservation

综合电泳和HPLC的数据,由10 mmol/L的乙酸-乙酸钠缓冲体系提供的pH 5的溶液提供了最利于蛋白质稳定性保留的环境。在后续的实验中,我们选择将pH设定为5。

2.2 辅料

表4是各取样时间段取样的检测结果。

由SE-HPLC和SDS-PAGE的结果可看出,除G(吐温-80组)外,各辅料对蛋白质的影响差异不大,而与预期的结果相去甚远的是,吐温-80存在时,蛋白质相对其他样品反而变得极易降解。相比

于IL2单体,融合了HSA的蛋白质本身的稳定结构使其在溶液中不易降解。但是仍可看出稳定剂进一步增强了蛋白质的稳定性,这一点在图3中可以明显看出:只有吐温-80存在时(图中G泳道),蛋白质发生了程度较重的变性,然而在同时有氯化钠和吐温-80存在时,吐温-80对蛋白质的影响似乎被阻断了(图中H泳道),氯化钠发挥了稳定蛋白质的作用。吐温-80是一种温和的非离子型表面活性剂,相对于离子型表面活性剂,通常不导致蛋白质变性,其作用一般用于降低蛋白质聚合物的生成,并对容器对蛋白质的吸附有一定的缓解作用^[13],然而在我们的实验中其结果是负面的,同时考虑到,吐温-80由于其毒性仍是一种有争议的添加剂,我们在后续的实验之中不再将其列入。

表4 辅料对蛋白质影响实验的SE-HPLC结果

Table 4 SE-HPLC purity of protein with different excipients

时间/d	编号							
	A	B	C	D	E	F	G	H
15	98.76	98.44	98.21	98.38	98.43	98.41	77.41	98.52
30	97.46	96.70	96.62	97.0	96.10	97.48	71.42	96.71
90	96.93	95.15	95.58	96.75	95.13	95.21	69.91	96.82

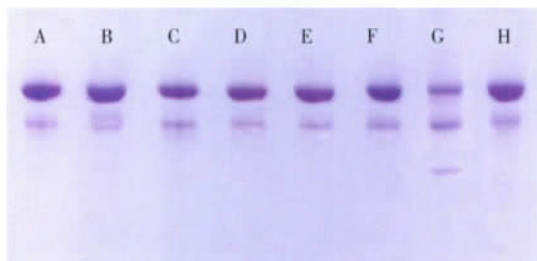


图3 90 d后辅料对蛋白质影响实验的 SDS-PAGE 结果
Fig. 3 SDS-PAGE result of protein with excipients after 90 day

表4中F的数据与图3中SDS-PAGE相应泳道的数据并不符合,我们猜测为F的特有成分甘氨酸导致了紫外的额外吸收,从而在HPLC的结果中降低了蛋白质的纯度。由此,我们进一步进行了只含甘氨酸的SE-HPLC检测以作对照,结果见图4。

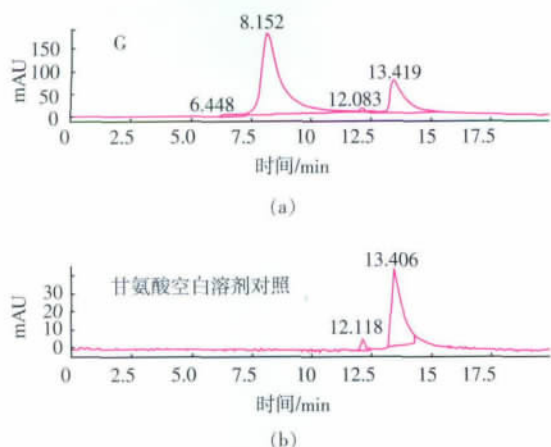


图4 样品G和不含蛋白质的空白溶剂对照 SE-HPLC 图谱
Fig. 4 SE-HPLC result of Glycine solution, with and without protein

由图4可知,甘氨酸溶液在12 min时有一个微小的吸收峰,在13 min时有一个较大的吸收峰,鉴于12 min处的微小杂峰在各样品中均有出现,我们相信这是实验操作步骤引入的其他杂质引起的。在13 min处甘氨酸表现了较强的紫外吸收,这支持了我们的猜测:图6中F在13 min处的杂峰为甘氨酸所致。在剔除甘氨酸的影响后,对F的纯度重新进行计算,其纯度约为97.5%。在以后的检测中,这种影响也被摒除。

2.3 最终剂型的选定

2.3.1 长期稳定性 4℃六个月后避光保存的取样结果见图5,图6和表5。

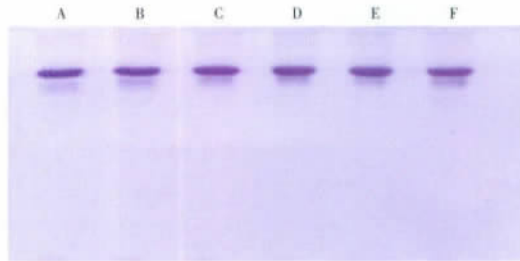
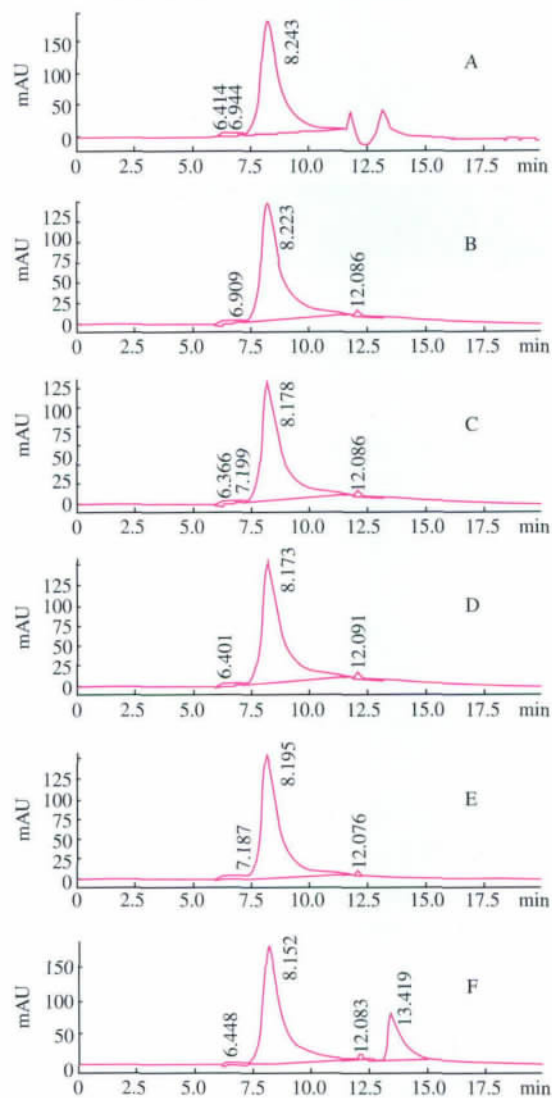


图5 4℃存放半年后各样品的电泳结果
Fig. 5 SDS-PAGE result of protein with excipients after 6 months in 4℃



图中A在12.5 min处的倒峰为分子排阻色谱过程中常遇到的由氯化钠引起的溶剂峰,F在13.4 min处的峰由辅料甘氨酸造成,均不计入结果。

图6 4℃存放半年后各样品的 SE-HPLC 图谱
Fig. 6 SE-HPLC result of protein with excipients after 6 months in 4℃

表 5 4℃存放半年后各样品的 SE-HPLC 纯度

Table 5 SE-HPLC purity of protein after 6 months

编号	纯度/%
A	97.69
B	96.52
C	96.72
D	97.79
E	96.38
F	96.65

2.3.2 光照实验 通过对比表 6 的数据和图 7 的条带,各样品在光照条件下均保持了较高纯度。在本环节实验中,各辅料均有良好的稳定性表现,最后取样的纯度都达到了 96% 以上。通过图 7 的 SDS-PAGE 电泳我们发现,与同条件下避光保存的样品相比,各辅料剂型均对光照表现出了不敏感,其结果不具有明显的差异。IL2-HSA 在光照实验中表现了很好的稳定性。

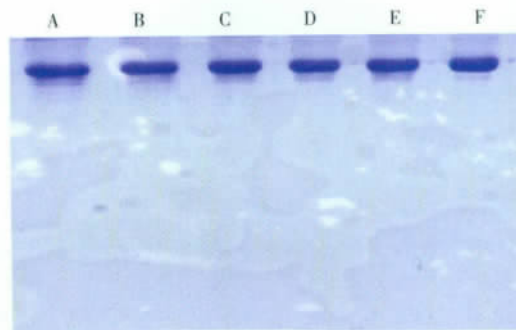
表 6 光照对稳定性的影响实验的 SE-HPLC 结果

Table 6 SE-HPLC purity of protein in photostability test

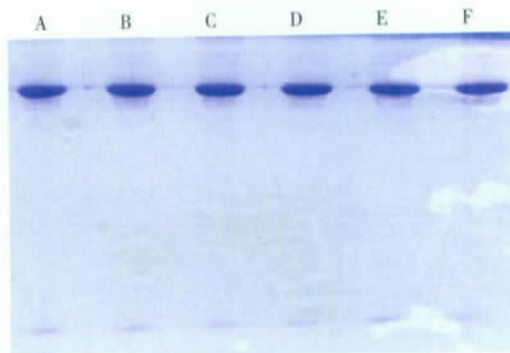
时间/d	编号						纯度 %
	A	B	C	D	E	F	
4	98.66	99.14	98.31	98.51	99.20	98.43	
7	98.00	97.81	97.97	98.10	97.55	98.06	



A: 4 d后取样电泳结果



B: 7 d后取样电泳结果



C: 7 d后避光保存的同批次样品的电泳结果

图 7 光照实验取样的电泳结果

Fig. 7 SDS-PAGE result of protein in photostability test

2.3.3 生物活性 经过江苏金丝利药业有限公司检测后,活性纯度见表 7。编号为 A 的配方中蛋白质保持了较好的活性。

表 7 4℃存放半年后各样品的生物活性

Table 7 Biological activity of protein after 6 months

编号	活性/(10 ⁶ IU/mL)
A	1.2
B	0.8
C	0.6
D	0.8
E	0.7
F	1.0

依照 2010 版中华人民共和国药典对 IL2 注射液的要求,纯度检测需达到 95% 以上。若以同样的要求来衡量 IL2-HSA,那么依照 2.3.1 的实验,在经过半年的贮存后,所有 6 种配方都符合要求。然而结合活性分析,我们选择氯化钠作为 IL2-HSA 液体制剂最优的辅料。除了它保留了最高的活性这一原因外,它是其他各种辅料中结构最简单、最稳定,也与人血浆成分最相容的。

3 结 语

人的血液中 pH 正常值约为 7.35~7.45,注射途径给药的药物其 pH 值应尽可能接近此区间^[13],以避免因 pH 差异过大导致患者接受注射时引发疼痛感或组织发炎,损伤等。而蛋白质为两性分子,其稳定性也和环境 pH 值有着密切的关系,过高或者过低的 pH 对蛋白质的稳定性都有不利的影响。蛋白质含有不稳定的天冬酰胺(Asn)和谷氨酰胺(Gln),它们的酰胺可发生水解和脱氨反应,在较低 pH 的时候,Asn 和 Gln 的脱氨速率会降低^[13],这有利于保

持蛋白质的结构,然而过低的pH又将引发水解或者环化,因此蛋白质总是在一定的pH范围内体现其最大的稳定性;对于IL2-HSA,李波等^[7]探索的发酵最适pH为6,在此pH下发酵液的蛋白质含量较高且降解较少,考虑到这一点,结合人血液生理pH、蛋白质普遍的最适pH范围^[18]等因素我们把考察的pH范围选定在pH 4~8。

辅料的添加是必要的制剂过程,满足剂型稳定性、等渗、保护、抗氧化、赋型(冻干过程)等多方面要求,有些辅料则兼有两种或数种功能,如蔗糖兼有等渗调节剂和防冻剂的作用,甘氨酸兼可做赋形剂和冻干过程中的防失水剂等^[13]。另外,一个更重要的必须添加辅料的原因是,这些辅料兼有等渗调节的作用,如不添加,则仅含1 g/L蛋白质和10 mmol/L缓冲液的药液渗透压将远低于血液渗透压,静脉注

射后极易引起溶血现象。

一系列的实验检测后我们得出,IL2-HSA在10 mmol/L乙酸-乙酸盐提供的pH为5且有相应辅料存在的环境中具有较好的液态稳定性;pH越高,IL2-HSA越趋于不稳定,更易形成聚合和降解产物;高温比低温更易引起蛋白质的结构改变,这和我们认识蛋白质的认识相符。辅料的添加有益于蛋白质保持稳定性。在光照实验中,样品表现了较好的光稳定性,和对照相比没有更明显的降解现象发生,HPLC对纯度检验的结果也比较理想,较优良的液体制剂稳定配方为:NaAc-HAc缓冲液10 mmol/L,pH 5.0,NaCl 8 g/L,IL2-HSA 1 g/L,以此配方无菌过滤后保存的蛋白质在4℃时保存半年以上仍有大于97%的纯度和最高的活性。这些数据为以后的制剂工艺研究工作打下了基础。

参考文献:

- [1] Robb R J, Smith K A. Heterogeneity of human T-cell growth factor(s) due to variable glycosylation[J]. *Mol Immunol*, 1981, 18(12): 1087-1094.
- [2] Gillis S, Ferm M M, OU W, et al. T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity [J]. *J Immunol*, 1978, 120(6): 2027-2032.
- [3] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases [J]. *J Immunol*, 1995, 155(3): 1151-1164.
- [4] Robb R J, Munck A, Smith K A. T cell growth factor receptors. quantitation, specificity, and biological relevance [J]. *J Exp Med*, 1981, 154(5): 1455-1474.
- [5] Beadling C, Smith K A. DNA array analysis of interleukin-2-regulated immediate/early genes [J]. *Med Immunol*, 2002, 1(1): 2.
- [6] Cantrell D A, Smith K A. The interleukin-2 T-cell system: a new cell growth model [J]. *Science*, 1984, 224(4655): 1312-1316.
- [7] 李波. 人白介素-2/人血清白蛋白融合蛋白的发酵与纯化研究 [D]. 江南大学, 2009.
- [8] 郭泽峰, 段作营, 张莲芬, 等. 人白介素-2/人血清白蛋白融合蛋白在毕赤酵母中的表达 [J]. *中国药科大学学报*, 2008(1): 82-86.
GUO Ze-feng, DUAN Zuo-ying, ZHANG Lian-fen, et al. Construction and expression of gene encoding interleukin-2/human serum albumin [J]. *Journal of China Pharmaceutical University*, 2008(1): 82-86. (in Chinese)
- [9] 金光泽, 段作营, 张莲芬, 等. 重组融合人血清白蛋白-人白介素-2 C125A 突变体在毕赤酵母中的表达 [J]. *食品与生物技术学报*, 2010(4): 595-601.
JIN Guang-ze, DUAN Zuo-ying, ZHANG Lian-fen, et al. Expression of the fusion protein human serum albumin/mutant human interleukin 2C125A in *Pichia pastoris* [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2010(4): 595-601. (in Chinese)
- [10] 金光泽. 人血清白蛋白/人白介素-2 融合蛋白的表达与发酵 [D]. 江南大学, 2008.
- [11] 张红梅, 李波, 段作营, 等. 双抗体夹心ELISA 定量检测 IL-2-HSA 融合蛋白 [J]. *中国药科大学学报*, 2010(2): 175-179.
ZHANG Hong-mei, LI Bo, DUAN Zuo-ying, et al. A new sandwich ELISA method for quantitative analysis of fusion protein IL-2-HSA [J]. *Journal of China Pharmaceutical University*, 2010(2): 175-179. (in Chinese)
- [12] 张龙翔. 生化实验方法和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1997: 510-533.
- [13] 纳伊 S L, 埃克斯 M J. 蛋白质药物: 开发与生产 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 10-40.