

中国图书分类号 S852.65 文献标识码 A 文章编号 1004-5503(2009)09-0891-04

【治疗制品】

pH 值对重组人源抗狂犬病病毒单克隆抗体稳定性的影响

李耿 程立均 赵伟 刘进怀 张世雄 魏敬双

【摘要】 目的 研究 pH 值对重组人源抗狂犬病病毒单克隆抗体 NM57 稳定性的影响。方法 将 NM57 原液的 pH 值分别调节为 4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0, 分别置于 4 和 40℃ 保存, 于 0、2、4、6 周取样, 观察其外观的变化, 并检测其 SDS-PAGE 及 SEC-HPLC 纯度。中试规模制备 NM57 制剂(200 IU/ml, pH 6.0) 4℃ 放置 3、6、9、12、18 和 24 个月, 取样观察其外观的变化, SEC-HPLC 检测样品纯度, 快速荧光灶抑制试验(RFFIT)检测样品中和活性。结果 在观察期内, 所有样品的外观均保持澄清透明。不同 pH 值的 NM57 原液 4℃ 放置 6 周, 纯度无明显变化; 40℃ 放置的不同 pH 值的 NM57 原液样品纯度变化有明显差异, NM57(5.0)和 NM57(6.0)样品相对稳定。中试规模制备的 6 批 NM57 制剂 4℃ 放置 24 个月, 其纯度及中和活性均保持稳定。结论 NM57 原液在甘氨酸-组氨酸缓冲系统中, pH 6.0 条件下比较稳定, NM57(pH 6.0)制剂长期稳定性良好。

【关键词】 狂犬病病毒; 单克隆抗体; pH; 稳定性; 中和活性

Effect of pH Value on Stability of Recombinant Human Anti-Rabies Monoclonal Antibody

LI Geng, CHENG Li-jun, ZHAO Wei, et al (New Drug Research and Development Co. Ltd, NCPC, Shijiazhuang 050015, China)

【Abstract】 **Objective** To study the effect of pH value on stability of recombinant human anti-rabies monoclonal antibody (McAb) NM57. **Methods** The pH values of bulk of McAb NM57 was adjusted to 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 and 8.0, and stored at 4 and 40℃ separately. Samples were taken at weeks 0, 2, 4 and 6 after storage, observed for appearance and determined for purities by SDS-PAGE and SEC-HPLC. McAb NM57 (200 IU/ml, pH 6.0) was prepared on a pilot production scale and stored at 4℃ for 3, 6, 9, 12, 18 and 24 months, from which samples were taken and observed for appearance, then determined for purity by SEC-HPLC and for neutralizing activity by RFFIT. **Results** All the samples were clear and transparent during the whole observation period. The purities of bulk of McAb NM57 at various pH values showed no significant change after storage at 4℃ for 6 weeks, while showed significant change after storage at 40℃. The purities of bulk of McAb NM57 at pH values of 5.0 and 6.0 were relatively stable. Both the purities and neutralizing activities of 6 batches of McAb NM57 prepared on a pilot production scale were stable after storage at 4℃ for 24 months. **Conclusion** The bulk McAb NM57 was stable at pH 6.0 in glycine-histidine buffer system, and the final product (pH 6.0) showed good long-term stability.

【Key words】 Rabies virus; Monoclonal antibody (McAb); pH; Stability; Neutralizing activity

重组抗体是由 4 条肽链组成的大分子蛋白质, 在溶液状态下通常不稳定, 易生成二聚体及多聚体, 在条件不适时易产生沉淀, 而且蛋白质一般对氧化、脱酰胺基和水解作用较为敏感。为确保重组抗体药物保持完整的分子结构和有效的生物学活性, 需要对影响免疫球蛋白稳定性的各种因素进行分析, 其中 pH 值为需要考察的重要指标之一。

重组人源抗狂犬病病毒单克隆抗体 NM57 是采用 CHO 细胞表达的全人源 IgG1 亚型抗体, 用于狂犬病暴露后的预防^[1,2]。在产品研发过程中, 需对影响蛋白质稳定性的各种因素进行考察, 包括 pH 值、

离子强度、缓冲液种类、储存温度等, 其中 pH 值是影响产品稳定性的一个重要因素。本文对不同 pH 条件下 NM57 原液及中试规模制备的制剂的稳定性进行了考察, 现将结果报道如下。

1. 材料与方法

1.1 细胞及毒株

表达 NM57 的重组 CHO 工程细胞由本公司构建并保存; 鼠神经细胞瘤(NA, Neuroblastoma)细胞由美国 Thomas Jefferson 大学惠赠; 狂犬病病毒国际标准攻击毒株 CVS 来自武汉生物制品研究所。

1.2 主要试剂及仪器

抗狂犬病病毒抗体标准品(21.4 IU/ml)由中国药品生物制品检定所提供; 抗狂犬病病毒 N 蛋白荧光标记抗体(FITC-anti-rabies globulin)购自 CEN

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

作者单位: 华北制药集团新药研究开发有限责任公司生物技术研究室(石家庄 050015)。

通讯作者: 魏敬双 E-mail: weijsh@hotmail.com

TOCOR. INC 扫描仪 ImageScanner 及 Superdex 200 10/300 GL 色谱柱均为 GE Healthcare 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)。

1.3 不同 pH 值 NM57 原液的制备及其稳定性检测

表达 NM57 的重组 CHO 工程细胞经扩增后,进行无血清大规模培养,培养收液经柱层析纯化后,再经超滤浓缩,制备原液样品,缓冲液系统为浓度 50 mmol/L 的组氨酸-甘氨酸。取该样品,分别调整 pH 值为 4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0,装量 1 ml/支,分别命名为 NM57(pH 4.0)、NM57(pH 5.0)、NM57(pH 6.0)、NM57(pH 7.0)和 NM57(pH 8.0)。将上述样品分别置 4 和 40℃避光保存,于 0、2、4 和 6 周分别取样,考察其外观,并检测 HPLC 纯度及 SDS-PAGE 纯度。

1.4 NM57 制剂的制备及其稳定性检测

中试规模制备 NM57 制剂(200 IU/ml pH 6.0),1 ml/支和 2.5 ml/支两种规格,各连续 3 批,置 4℃避光保存,分别于 3、6、9、12、18 和 24 个月取样,考察其外观,并检测 HPLC 纯度及中和活性。

1.5 还原 SDS-PAGE 检测

将待检样品与还原 SDS-PAGE 供试品缓冲液混匀,进行还原 SDS-PAGE 分析,分离胶浓度 12.5%,加样量 10 μg/孔,150 V 恒压电泳,考马斯亮蓝 R250 染色。对干胶用 ImageScanner 扫描仪进行扫描,用 ImageQuant TL 1D 图像分析软件对凝胶图谱进行纯度计算,以免疫球蛋白轻链、重链条带光密度之和占所有显色条带光密度的比例计算抗体纯度。

1.6 SEC-HPLC 检测

取待检样品 15 μl,用分子筛高效液相色谱柱 Superdex 200 10/300GL 进行分析检测,流动相为 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 pH 7.0,流速 0.5 ml/min,检测波长 280 nm。对样品层析图谱中除溶剂峰以外的各色谱峰面积进行积分,计算抗体主峰面积占总面积的百分比,即为样品的 HPLC 纯度,计算抗体聚

体峰及降解峰面积占总面积的百分比,即为样品聚体含量和降解物含量。

1.7 中和活性检测

采用快速荧光灶抑制试验(Rapid fluorescent focus inhibition test, RFFIT)检测 NM57 制剂的抗狂犬病病毒中和活性。将倍比稀释的待检样品和标准品与狂犬病病毒国际标准攻击毒株 CVS 混合,37℃孵育 1 h;将混合液接种至单层 NA 细胞,34℃培养 48 h,80%冷丙酮固定细胞,用抗狂犬病病毒 N 蛋白荧光标记抗体标记荧光灶,荧光显微镜观察,比较待检样品和标准品产生 50%荧光灶抑制率的稀释度,按下式计算待检样品的中和效价。

$$-\log ED_{50} = 0.477[N + (b - 50\%)/(b - a)]$$

式中, N 表示细胞被病毒感染的比率小于 50% 的孔数; a 表示病毒感染的比率小于 50% 的孔中的最大比率; b 表示病毒感染的比率大于 50% 的孔中的最小比率。

$$\text{样品效价}(E) = E^* \times 10^{(\log ED_{50}^* - \log ED_{50})}$$

式中, E^* 为标准抗体效价, ED_{50}^* 为标准抗体的半数有效剂量。

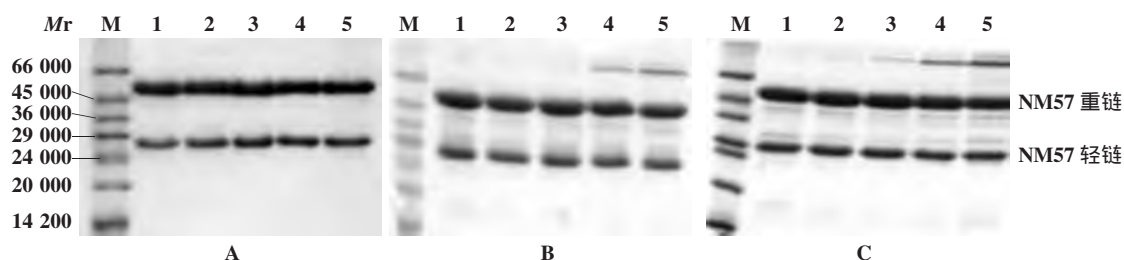
2. 结果

2.1 外观考察

在观察期内,所有样品的外观均保持澄清透明。

2.2 NM57 原液的 SDS-PAGE 纯度

还原 SDS-PAGE 分析显示,刚调节 pH 值的 NM57 原液各样品除轻链、重链外,均未见其他杂带,见图 1A。4℃放置 6 周后,不同 pH 值的样品电泳图谱均无明显改变;40℃放置 2 周后,不同 pH 值的样品电泳图谱变化明显, NM57(pH 7.0)和 NM57(pH 8.0)样品重链上方开始出现少量杂带(电泳图谱未附);放置 4 周后,各样品多处出现杂带,见图 1B;放置 6 周后,杂带数量进一步增加,不同 pH 值样品间的差别更加明显, NM57(pH 7.0)和 NM57(pH 8.0)样品的杂带明显多于另 3 个 pH 值的样品,见图 1C。



A: 放置 0 周的样品; B: 40℃放置 4 周的样品; C: 40℃放置 6 周的样品; M: 蛋白质 marker; 1: NM57(pH 4.0); 2: NM57(pH 5.0); 3: NM57(pH 6.0); 4: NM57(pH 7.0); 5: NM57(pH 8.0)

图 1 不同 pH 值 NM57 原液的还原 SDS-PAGE 分析

Fig 1. Reduced SDS-PAGE profile of bulk of McAb NM57 at various pH values

纯度分析结果显示,不同 pH 值的 NM57 原液 4℃放置 6 周,纯度无明显变化,除 NM57(pH 8.0) 样品自第 4 周起纯度降至低于 99% 外,其余样品的纯度均保持在 99% 以上,见图 2。40℃放置的不同 pH 值的 NM57 原液样品纯度变化有明显差异, NM57(pH 8.0) 样品自第 2 周起纯度降至 90% 以下, NM57(pH 7.0) 样品在第 2 周时纯度也明显下降, NM57(pH 5.0) 和 NM57(pH 6.0) 样品相对稳定,见图 3。

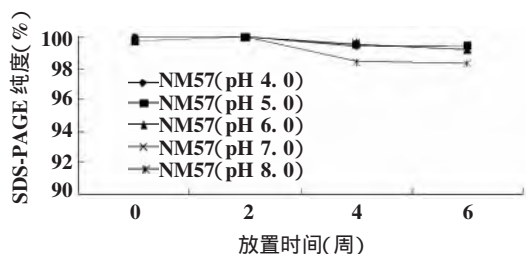


图 2 不同 pH 值 NM57 原液 4℃放置的 SDS-PAGE 纯度变化

Fig 2. SDS-PAGE purity of bulk of McAb NM57 at various pH values after storage at 4℃

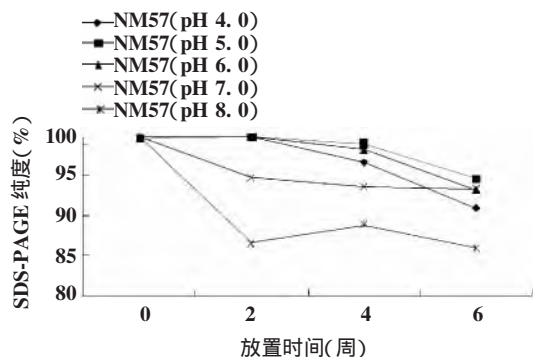


图 3 不同 pH 值 NM57 原液 40℃放置的 SDS-PAGE 纯度变化

Fig 3. SDS-PAGE purity of bulk of McAb NM57 at various pH values after storage at 40℃

2.3 NM57 原液及其制剂的 SEC-HPLC 纯度

4℃放置 6 周, NM57(pH 6.0) 原液样品 SEC-HPLC 纯度基本无变化,而其他 4 个 pH 值的 NM57 原液样品纯度均略有下降,见图 4。40℃放置 2 周后,不同 pH 值的 NM57 原液样品纯度均呈明显下降趋势,但 NM57(pH 5.0) 和 NM57(pH 6.0) 原液样品的纯度始终保持在 98% 以上,见图 5。

4℃放置 6 周,不同 pH 值原液样品的聚体含量均在 1% 以下,且均无降解,其中 NM57(pH 6.0) 样品的聚体含量明显低于其他 pH 值样品。40℃放置的

不同 pH 值原液样品,除聚体含量随放置时间的延长呈不同程度的增加外,降解物含量也呈不同程度的上升趋势,其中 NM57(pH 5.0) 和 NM57(pH 6.0) 原液样品的降解速度明显低于其他 pH 值样品,因此从 NM57 降解情况来看,仍以 NM57(pH 5.0) 和 NM57(pH 6.0) 原液样品较其他样品相对稳定。

中试规模制备的 6 批 NM57 制剂(pH 6.0) 4℃放置 6 个月, SEC-HPLC 纯度略有下降,但仍保持在 99% 以上,放置 6 ~ 24 个月的样品纯度保持稳定,见图 6。

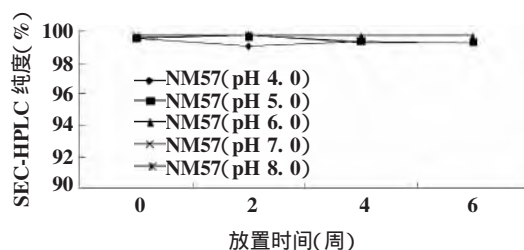


图 4 不同 pH 值 NM57 原液 4℃放置的 SEC-HPLC 纯度变化

Fig 4. SEC-HPLC purity of bulk of McAb NM57 at various pH values after storage at 4℃

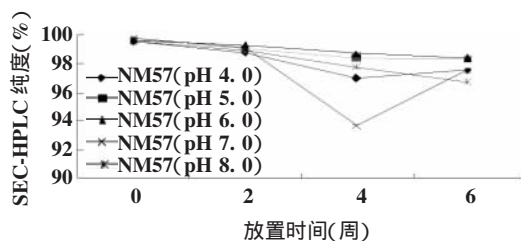


图 5 不同 pH 值 NM57 原液 40℃放置的 SEC-HPLC 纯度变化

Fig 5. SEC-HPLC purity of bulk of McAb NM57 at various pH values after storage at 40℃

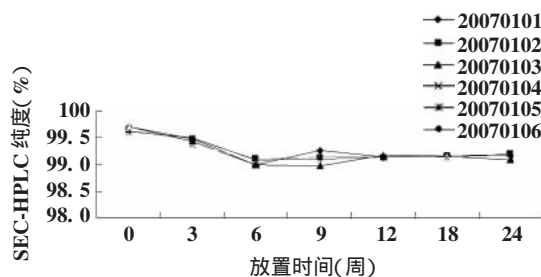


图 6 4℃放置的中试 NM57 制剂的 SEC-HPLC 纯度变化

Fig 6. SEC-HPLC purity of final product of McAb NM57 prepared on a pilot production scale after storage at 4℃

2.4 NM57 制剂的中和活性

检测结果显示, 4℃放置 24 个月内, NM57 制剂的抗体中和效价均保持在 200 IU/ml 以上, 见图 7。

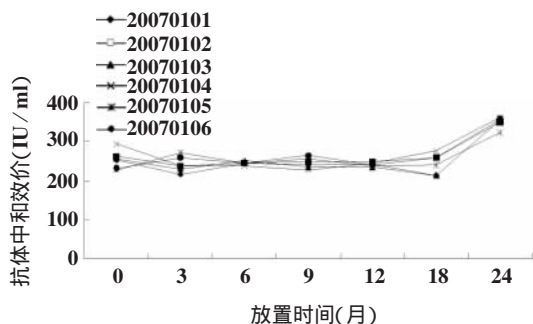


图 7 4℃放置的中试 NM57 制剂的中和活性变化

Fig 7. Neutralization activity of final product of McAb

NM57 prepared on a pilot production scale after storage at 4℃

3. 讨论

在 40℃加速试验中, SDS-PAGE 和 SEC-HPLC 检测结果均表明, 无论是聚体产生情况还是降解情况, pH 5.0 和 pH 6.0 的 NM57 原液样品均优于其他 pH 值的样品。因此, NM57(pH 5.0)和 NM57(pH 6.0)相对稳定, 同时考虑到 NM57 为注射剂, pH 6.0 更接近生理 pH 值, 因此, 制备 NM57 制剂采用 pH 6.0 的条件较为合适。从 NM57(pH 6.0)制剂放置 24 个月的抗体纯度及中和活性检测结果来看, 其具有长期稳定性。

关于 pH 值对免疫球蛋白或重组抗体稳定性的影响已有较多报道^[3-6]。从血液中提取的免疫球蛋白制剂, 即纯 IgG 溶液, 在 pH 4.0 的条件下较稳定, 而在 pH 7.0 时不稳定。这种不稳定性是免疫球蛋白混合物在等电点的特性决定的, 伴随着 IgG 结合

功能的变化, 导致了其对抗原亲和力的损失, 并且出现了与补体的自发结合现象。在以前的 pH 6.8 静脉注射用免疫球蛋白(IGIV)制剂中, 这种不稳定性通过加入麦芽糖稳定剂可以得到改善; 对于 pH 4.0 的制剂, 麦芽糖稳定剂则不再是必需的。本文的 NM57 是组成相对均一的 IgG1 抗体, 其等电点较高 (pI 8.0 ~ 8.5), 稳定的 pH 范围也相对较宽。

有研究指出, 在酸性 pH 条件下, 重组抗体的主要降解途径是肽链断裂和共价交联; 而在碱性 pH 条件下, 主要降解途径是脱酰胺、肽链断裂、共价交联和形成多聚体^[6]。本实验结果表明, 常规检测方法如分子筛高效液相层析及 SDS-PAGE 等可以用来分析单克隆抗体或其他蛋白的降解过程。

参考文献

- [1] 贾茜, 徐葛林, 赵伟, 等. 重组人抗狂犬病病毒单抗 S057、SOJB 对不同狂犬病病毒毒株中和作用的研究. 病毒学报, 2006, 22 (4): 256-261.
- [2] 程立均, 贾茜. 重组人源抗狂犬病病毒单克隆抗体 S057、SOJB 对狂犬病病毒 G 蛋白亲和力的比较研究. 病毒学报, 2006, 22 (3): 230-232.
- [3] Zheng JY, Janis LJ. Influence of pH, buffer species, and storage temperature on physicochemical stability of a humanized monoclonal antibody LA298. Int J Pharm, 2006, 308(1-2): 46-51.
- [4] Ejima D, Tsumoto K, Fukada H, et al. Effect of acid exposure on the conformation, stability, and aggregation of monoclonal antibodies. Proteins, 2007, 66 (4): 954-962.
- [5] McCue JP, Hein RH, Tenold R. Three generations of immunoglobulin G preparations for clinical use. Rev Infect Dis, 1986, 8 (Suppl4): S374-S381.
- [6] Usami A, Ohtsu A, Takahama S, et al. The effect of pH, hydrogen peroxide and temperature on the stability of human monoclonal antibody. J Pharm Biomed Anal, 1996, 14(8-10): 1133-1140.

(收稿日期 2009-04-28)

【消息】

《中国药学大辞典》(2008 年版)征订启事

《中国药学大辞典》收集词汇近 26 000 条, 涉及药用动物、植物、矿物、中药和方剂、药用化学物质、化学药物、药剂学、药物化学、中医学和生药学、微生物药学、生物药学、药物分析、药理学和毒理学、医院药学、临床药学、药学史、药事管理、信息科学、药学相关学科和专业、技术和设备、教育学名词等方面内容。定价 352 元。

联系方式

单位名称: 国家食品药品监督管理局信息中心期刊处

开户名称: 国家食品药品监督管理局信息中心

开户银行: 建设银行北京展览路支行

账号: 11001016700056002517

通讯地址: 北京市西城区北礼士路甲 38 号

邮编: 100810

电话: 010-62214715、62214665、88330061

传真: 010-62214866

电子邮件: zgxyxwz@163.com