HER2 阳性乳腺癌重组免疫毒素 TP25 冻干工艺的研究

彭延杰[1]，张　林[1]，庞　政[2]，仲立军[1]，刘　芳[1]
（1. 山东省妇幼保健院，山东济南 250014；2. 山东中医药大学，山东济南 250300）

摘要：TP25 是一种针对人表皮生长因子受体 2（human epidermal growth factor receptor 2，HER2）阳性乳腺癌的高活性重组免疫毒素。本研究通过冻干制品外观及四唑氮法测得的复溶后 TP25 的半抑制浓度（IC_{50}）筛选并优化了 TP25 的冻干保护剂配方及冻干工艺流程。结果显示，在采用 3.50 μg/ml 人血白蛋白与 40.0 μg/ml 甘露醇为复合冻干保护剂的试验组中，冻干制品外观光滑饱满，产品活性回收率最高。本研究推进了 TP25 产业化制备的开发进程，也为同类生物制品的冻干研究提供了思路。

关键词：乳腺癌；免疫毒素；冷冻干燥；冻干保护剂；冻干程序
中图分类号：R944.9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2022)10-1453-05
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.10.011

Research of Lyophilization for HER2-positive Breast Cancer Recombinant Immunotoxin TP25

PENG Yanjie[1], ZHANG Lin[1], PANG Zheng[2], ZHONG Lijun[1], LIU Fang[1]
(*1. Shandong Provincial Maternal and Child Health Care Hospital, Jinan 250014;*
2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250300)

ABSTRACT: TP25 is a highly active recombinant immunotoxin that targets human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) positive breast cancer. In this study, the lyoprotectant was selected and the lyophilization procedure of TP25 was optimized through the appearance of lyophilized products and half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of reconstituted TP25 determined by tetrazolium method. The results showed that the lyophilized product in the group with 3.5 μg/ml of human albumin and 40 μg/ml of mannitol as lyoprotectant combination had a smooth and full appearance, and the activity recovery rate of the product was the highest. This study promoted the development process of TP25 industrial preparation and also provided ideas for the research of lyophilization of similar biological products.

Key Words: breast cancer; immunotoxin; lyophilization; lyoprotectant; lyophilization procedure

蛋白类药物分散在水体系中时物理和化学稳定性较差，在制备及贮存过程中会发生变性、失活或产生潜在免疫原性物质。冷冻干燥技术通过冷冻后的真空升华除去产品中的水分，且冻干后形成的疏松多孔结构可使药物在复溶后重新恢复活性，因而可有效避免药品以水溶液方式贮存而导致的一系列问题，易于长期稳定保存，是目前应用最广泛的制备稳定固体蛋白质类药物的方法[1]。据统计约60%的疫苗、抗体和血浆等人用生物制品均通过此种方式进行制备与保存，冻干粉末是蛋白类药物的主要剂型[2]。

然而，冻干过程可使蛋白质的天然构象发生改变，影响其生物学活性[3]。因此，在进行冷冻干燥时需加入冻干保护剂，以降低冻干过程中各种应力对蛋白活性的影响，稳定冻干后制品的活性。

冻干保护剂在冻干工艺的预冻和干燥阶段发挥不同的保护作用。预冻阶段，冻干保护剂通过与蛋

收稿日期：2022-09-01
基金项目：山东省医药卫生科技发展计划项目(202002041518)
作者简介：彭延杰(1983—)，男，副研究员，主要从事生物制品开发工作。
E-mail：yanjie423@126.com

白分子发生非特异性结合而维持其表面的水分子，保护其天然构象。干燥阶段的保护作用主要有 2 种假说，即“玻璃化”和“水置换”，后者被广泛认同。“水置换”假说即指冻干保护剂在干燥过程中可与蛋白质形成氢键，从而取代水和蛋白质之间的氢键，通过这种替代的氢键使蛋白质的天然构象得以保持。因此，冻干保护剂在蛋白药物脱水后能否与之生成氢键是保护作用的关键 [4]。冻干保护剂还可以在冻干时支撑蛋白质结构，发挥填充剂作用，使冻干后制品保持良好的外观及复溶效果 [5]。

乳腺癌是威胁女性健康的头号杀手，我国每年乳腺癌新增病例超 20 万，其中 25%～30%为人表皮生长因子受体 2（human epidermal growth factor receptor 2，HER2）阳性乳腺癌 [6]。TP25 是本实验室开发的 HER2 阳性乳腺癌重组免疫毒素，经原核表达可得相对分子质量约 52 000 的融合蛋白，对 HER2 阳性乳腺癌细胞靶向性好，抑制作用显著 [7]。目前，TP25 的表达、纯化及药效验证试验均已完成，冻干研究是其制备工艺开发的最后一步。本研究根据冻干保护剂在制备冻干粉末时作用原理的不同，选择甘露醇、人血白蛋白、丙三醇、甘氨酸和蔗糖的单一及混合成分作为冻干保护剂，设置不同冻干程序，进行了 TP25 冻干工艺的研究，从冻干品外观及其复溶后活性两方面考察了 9 种不同配方的冻干保护剂及 3 个冻干程序对 TP25 冻干效果的影响。最终确立了 TP25 的冻干保护剂配方及冻干工艺流程，为其开发、上市提供数据支持。

1　仪器与试药

Epsilon 60D LSCplus 型冻干机（德国 Christ 公司）；VCX 800 型超声破碎仪（美国 Sonics 公司）；LYNX4000 型高速冷冻离心机和 Heracell 150i 型 CO_2 培养箱（美国 Thermo Fisher 公司）；T10 型匀浆机（德国 IKA 公司）；5810R 型冷冻离心机（德国 Eppendorf 公司）；Mini Pellicon 超滤系统和 SLGV004SL 无菌过滤器（0.22 μm，美国 Merck Millipore 公司）。

二甲基亚砜（DMSO，美国 Sigma 公司，批号 WXBC1590V）；甘露醇（批号 20171211）、蔗糖（批号 20180322）均购自国药集团化学试剂有限公司；DMEM 培养基（美国 Thermo Fisher 公司，批号 8122074）；胎牛血清（美国 Invigentech 公司，批号 F95551243）；噻唑蓝（MTT，上海阿拉丁生化科技股份有限公司，批号 C2025115）；盐酸胍（批号 918O061）和还原型谷胱甘肽（批号 413L0511）均购自北京索莱宝科技有限公司。

HER2 阳性乳腺癌细胞（SK-BR-3 细胞）购自美国典型培养物保藏中心（ATCC）。TP25 种子液由本实验室培养。

2　方法与结果

2.1　制品制备

根据文献方法 [7]，将 TP25 种子液按 1 ∶ 100 放大培养，异丙基硫代 -β-D- 半乳糖苷诱导表达后收集菌体沉淀，超声波破壁进行包涵体变复性试验得到 TP25 粗制品，经阴离子交换色谱获得 TP25 制品。

2.2　制品冻干工艺的建立

2.2.1　冻干保护剂和冻干程序的设置

将甘露醇、丙三醇、蔗糖与甘氨酸分别溶解于磷酸缓冲液（PBS，含 Na_2HPO_4 10 mmol/L，KH_2PO_4 2 mmol/L，NaCl 137 mmol/L，KCl 2.7 mmol/L），配制成质量浓度均为 150 μg/ml 的溶液，经 0.22 μm 滤膜过滤后备用。人血白蛋白为质量分数 20%的成品原液。按表 1 所示配方分别配制含不同单一冻干保护剂或冻干保护剂组合的 10.0 L 体系（各配方中 TP25 含量均为 30.0 μg/ml）。

冻干前西林瓶的装量也会对冻干效果产生不同程度的影响，装样量过大会使样品厚度增加，因传质阻抗会降低初级干燥的升华速度，最终影响冻干效果，因此本研究采用 50 ml 西林瓶装量 10 ml 进行试验。分别取上述不同体系进行冻干试验，即灌装后照表 2 所示的 3 个不同冻干程序进行样品冻干。

2.2.2　冻干保护剂的优化

细胞活力测定：采用 DMEM（含 10%胎牛血清、5%青链霉素双抗）培养 SK-BR-3 细胞。按照每孔 1.5×10^4 个的浓度接种于 96 孔板，在 37 ℃、5% CO_2 的条件下培养过夜后，将不同配方制备的 TP25 冻干粉复溶，加入培养物中进行细胞刺激。其中配方 7、8、9 制备的 TP25，设置 TP25 浓度梯度为 1.00×10^5、3.00×10^4、1.00×10^4、3.00×10^3、1.00×10^3、

表 1 不同冻干保护剂配方

Tab.1 Different Composition Schemes of Lyophilization Protectant

配方编号	冻干保护剂1		冻干保护剂2		冻干保护剂3	
	名称	质量浓度/μg·ml^{-1}	名称	质量浓度/μg·ml^{-1}	名称	质量浓度/μg·ml^{-1}
1	甘露醇	20	—	—	—	—
2	人血白蛋白	2	甘露醇	30	—	—
3	人血白蛋白	2	甘露醇	20	—	—
4	人血白蛋白	3.5	甘露醇	40	蔗糖	20
5	人血白蛋白	3.5	甘露醇	40	—	—
6	人血白蛋白	3.5	—	—	—	—
7	丙三醇	20	—	—	—	—
8	甘氨酸	20	—	—	—	—
9	蔗糖	20	—	—	—	—

表 2 不同冻干程序

Tab.2 Different Procedures of Lyophilization

程序编号	预冻阶段	主干燥阶段	解析干燥阶段
1	－30 ℃，5 h，0.030 kPa	气压维持 0.030 kPa，升温至 －15 ℃维持 12 h，升温速率：7.5 ℃ /h，升温至 0 ℃，维持 10 h，升温速率：4.0 ℃ /h，升温至 15 ℃，维持 4 h，升温速率：3.3 ℃ /h，升温至 30 ℃，维持 6 h，升温速率：4.25 ℃ /h	30 ℃，6 h，0.013 kPa
2	－50 ℃，8 h，0.018 kPa	气压维持 0.018 kPa，升温至 －20 ℃维持 22 h，升温速率：7.5 ℃ /h，升温至 0 ℃，维持 17 h，升温速率：4.0 ℃ /h，升温至 15 ℃，维持 7 h，升温速率：3.3 ℃ /h，升温至 32 ℃，维持 11 h，升温速率：4.25 ℃ /h	32 ℃，13 h，0.013 kPa
3	－50 ℃，12 h，0.018 kPa	气压维持 0.018 kPa，升温至 －20 ℃维持 22 h，升温速率：7.5 ℃ /h，升温至 0 ℃，维持 22 h，升温速率：4.0 ℃ /h，升温至 15 ℃，维持 10 h，升温速率：3.3 ℃ /h，升温至 34 ℃，维持 15 h，升温速率：4.25 ℃ /h	34 ℃，18 h，0.013 kPa

300、100、30.0 和 10.0 ng/ml；冻干配方 1 ～ 6 制备的 TP25，设置 TP25 浓度梯度为 0.010 0、0.020 0、0.040 0 和 0.080 0 μg/ml。培养 72 h 后加入 MTT 溶液继续培养 3 h，离心（300×*g*）5 min，去上清后每孔加入 DMSO 150 μl，在 570 nm 下读取吸光度并记录数据[7]，利用 GraphPad Prism 8 软件绘制细胞活力曲线并计算半抑制浓度（IC_{50}）。

研究先考察单一组分冻干剂对 TP25 活性的保护效果。在各单一冻干保护剂中，人血白蛋白组的 TP25 复溶后对 SK-BR-3 细胞的 IC_{50} 为 40.7 ng/ml，对 TP25 的活性保护作用优于其他组，且有显著性差异（图 1）。此外，采用人血白蛋白作冻干保护剂的冻干粉饼表面光滑，但萎缩现象明显，冻干品体积缩小，四周脱离西林瓶。甘露醇组 IC_{50} 为 70.7 ng/ml，保护作用仅次于人血白蛋白组，冻干品呈饱满饼状，表面有大量点状凸起，呈不规则排布（图 2）。

基于此，选择对 TP25 活性保护效果较好的人血白蛋白与甘露醇作为复合冻干保护剂。使用配方 5 的 TP25 冻干制品无萎缩现象，呈饱满饼型，表面光滑（图 2C），复溶后的 TP25 对 SK-BR-3 细胞的 IC_{50} 为 21.1 ng/ml，优于配方 4（30.4 ng/ml）与配方 6（35.9 ng/ml），如图 3 所示。结果显示配方 5 在冻干过程中对 TP25 活性起到良好的保护作用，且冻干后制品外观优良，故配方 5 是 TP25 的优化冻干保护剂组合。

2.2.3 冻干程序冻干效果对比

选择冻干保护剂配方 5 进行冻干程序试验，冻干程序 1 得到的 TP25 活性最低［(0.217±0.005) μg/ml（n=3）］，推测是因为程序各步骤冷冻温度较高，作用时间短，冷冻与干燥均不充分使蛋白受损。程序 2 与 3 均能有效保留制品活性［分别为（0.033±0.002 μg/ml）和［(0.035±0.004) μg/ml（n=3）］。由于程序 2 各步冷冻维持时间少于程序 3，且解析温度更低，为兼顾生产效率与能耗选择程序 2 作为 TP25 的保护程序。

3 讨论

本研究从冻干保护剂配方和冻干程序两方面优

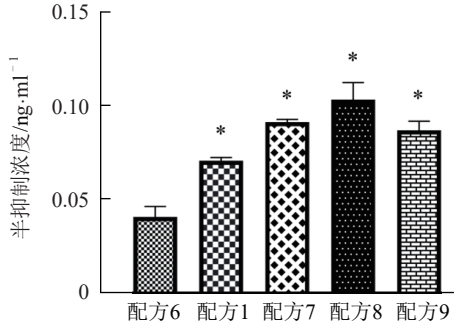


图 1　单一成分冻干保护剂效果

（n=3；*：与配方 6 组比较，P<0.05）

Fig.1　Effect of Single Component Lyoprotectant

（n=3; *: Compared with formula 6, P<0.05）



A　　B　　C

A：甘露醇组，B：0.35%人血白蛋白组，

C：0.35%人血白蛋白与 4.0%甘露醇组。

图 2　冻干制品外观

Fig.2　Appearance of Lyophilized Products

化了 TP25 的冻干工艺，重点研究了 9 种冻干保护剂配方对 TP25 的冻干保护作用。

首先选用丙三醇、甘氨酸、蔗糖、甘露醇与人血白蛋白作为单一组分保护剂探讨其冻干保护效果。甘氨酸是一种常用的冻干保护剂，对蛋白支撑作用良好，具有酸碱两性解离性，可稳定冻干结晶时体系 pH 的变化，且具有较强亲水性，易与蛋白质形成氢键，增强蛋白在冻干过程中的稳定性[8—10]。但结果显示，其对 TP25 活性的保护作用并不理想。丙三醇作为一种稳定的醇类保护剂，在赋形和活性保持方面均发挥一定作用[11—12]。蔗糖因能与蛋白质生成氢键，能取代蛋白上的水分子形成水化膜，使蛋白在冻干过程中的伸展在复溶后完全消失，可稳定蛋白质的高级结构[13—14]。试验结果显示蔗糖对 TP25 的活性保护效果与丙三醇相似，二者均优于甘氨酸组。甘露醇在冻干过程中主要起支撑赋形

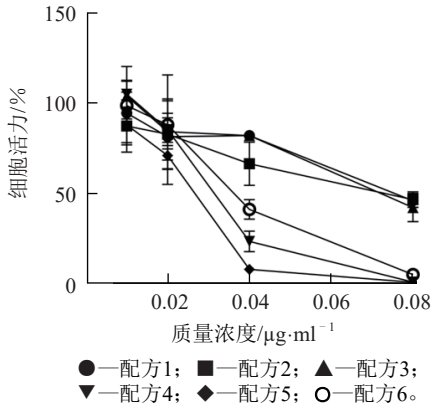


图 3　不同冻干配方制品活性检测（n=3）

Fig.3　Activity Detection of Products with Different Lyophilization Formulas（n=3）

作用，且可与蛋白形成氢键，虽然该作用较弱，但与冰可形成熔点为 －1.5 ℃的混合物，使初级干燥可在较高温度下完成，可维持制品活性并缩短工艺时间，该作用效果与甘露醇用量直接相关[8—9]。甘露醇单一成分组的对 TP25 冻干保护效果较好，冻干制品呈饱满的饼型结构，但在饼状结构表面出现分布不均的点状凸起，已有研究中也报道过类似情况[10—11]。人血白蛋白作为冻干保护剂可降低蛋白的表面吸附，增加体系蛋白浓度，高起始蛋白浓度可促进冻干蛋白复溶后活性的恢复[11,15]，有效保护了 TP25 的活性。在单用人血白蛋白的试验组中，冻干 TP25 复溶后活性高于其他单组分组，冻干制品呈完整的饼状结构，表面光滑，但出现萎缩现象，可能原因是冻干体系物质的量不足造成的，可通过提高浓度解决，但无论是血源白蛋白还是重组白蛋白价格均较高，不利于产业化应用。

冻干保护剂因作用机制与功能不同，在使用时可加入 2 种或 2 种以上成分以维持蛋白在冻干时的稳定性。单一组分试验结果显示，不同保护剂对 TP25 冻干时活性与赋形的保护作用各有侧重和不足。为获得更好的冻干保护效果，本研究又进行了兼顾活性与赋形作用的冻干保护剂组合配方试验，选择保护效果较好的人血白蛋白、甘露醇与蔗糖的不同含量组合进行研究。结果显示配方 5 所得 TP25 复溶后对 SK-BR-3 细胞的 IC_{50} 低于其他各组，

活性损失小，且冻干 B 外形呈完整饼状，结构饱满、表明光滑，说明可通过添加支撑作用良好且成本低廉的甘露醇来解决制品萎缩问题。而配方 4 所得制品活性低于配方 5，推测是在热胁迫下，蔗糖水解成果糖和葡萄糖，葡萄糖最终导致蛋白质发生糖基化，影响了 TP25 的活性[8—9,11]。综上所述，配方 5 在保证 TP25 活性的前提下维持了较好的外观，且兼顾了制备成本，是 TP25 的最佳冻干保护剂配方。

接下来对冻干程序进行了优化，结果显示程序 2 能有效保留制品活性，且解析温度较低、冷冻维持时间较短，选择其作为 TP25 的冻干程序。

本研究确定了 TP25 的最佳冻干工艺为采用 3.50 μg/ml 人血白蛋白与 40.0 μg/ml 甘露醇为复合冻干保护剂，程序 2 为冻干程序，不仅打通了 TP25 产业化制备的最后屏障，推进了其开发进程，也为同类生物制品的冻干研究提供了思路。

参考文献：

[1] 薛 菲, 王凤山. 蛋白质的冻干保护剂及其保护机制研究进展[J]. 中国药学杂志, 2018, **53**(10): 765-770.

[2] 靳 力, 刘春红, 韩 军, 等. 冷冻干燥技术及冻干抗体药物的研究进展[J]. 聊城大学学报(自然科学版), 2019, **32**(5): 80-87.

[3] UBBINK J. Structural and thermodynamic aspects of plasticization and antiplasticization in glassy encapsulation and biostabilization matrices [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, **100**: 10-26.

[4] ASSEGEHEGN G, BRITO-DE LA FUENTE E, FRANCO J M, *et al*. The importance of understanding the freezing step and its impact on freeze-drying process performance [J]. *J Pharm Sci*, 2019, **108**(4): 1378-1395.

[5] GARIDEL P, PEVESTORF B, BAHRENBURG S. Stability of buffer-free freeze-dried formulations: a feasibility study of a monoclonal antibody at high protein concentrations [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2015, **97**(Pt A): 125-139.

[6] 师 金, 梁 迪, 李道娟, 等. 全球女性乳腺癌流行情况研究[J]. 中国肿瘤, 2017, **26**(9): 683-690.

[7] 彭延杰, 丁 艳, 曹强庚. 一种HER2阳性乳腺癌靶向药的制备优化及检测[J]. 生物技术, 2019, **29**(2): 183-187.

[8] JENA S, KRISHNA KUMAR N S, AKSAN A, *et al*. Stability of lyophilized albumin formulations: role of excipient crystallinity and molecular mobility [J]. *Int J Pharm*, 2019, **569**: 118568.

[9] STRICKLEY R G, LAMBERT W J. A review of formulations of commercially available antibodies [J]. *J Pharm Sci*, 2021, **110**(7): 2590-2608.

[10] KADOYA S, FUJII K, IZUTSU K, *et al*. Freeze-drying of proteins with glass-forming oligosaccharide-derived sugar alcohols [J]. *Int J Pharm*, 2010, **389**(1/2): 107-113.

[11] HAEUSER C, GOLDBACH P, HUWYLER J, *et al*. Excipients for room temperature stable freeze-dried monoclonal antibody formulations [J]. *J Pharm Sci*, 2020, **109**(1): 807-817.

[12] HOLM T P, MENG-LUND H, RANTANEN J, *et al*. Screening of novel excipients for freeze-dried protein formulations [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2021, **160**: 55-64.

[13] BODZEN A, JOSSIER A, DUPONT S, *et al*. Design of a new lyoprotectant increasing freeze-dried *Lactobacillus* strain survival to long-term storage [J]. *BMC Biotechnol*, 2021, **21**(1): 66.

[14] RAO V A, KIM J J, PATEL D S, *et al*. A comprehensive scientific survey of excipients used in currently marketed, therapeutic biological drug products [J]. *Pharm Res*, 2020, **37**(10): 200.

[15] FORNEY-STEVENS K M, BOGNER R H, PIKAL M J. Addition of amino acids to further stabilize lyophilized sucrose-based protein formulations: Ⅰ. screening of 15 amino acids in two model proteins [J]. *J Pharm Sci*, 2016, **105**(2): 697-704.