

# 层析法去除重组人血清白蛋白干扰素 $\alpha 2b$ 融合蛋白的内毒素

徐向荣<sup>1</sup>, 马国昌<sup>2,3</sup>, 王昌梅<sup>3</sup>, 单剑峰<sup>3</sup>, 沈玲<sup>3</sup>, 黄岩山<sup>3</sup>, 周金宝<sup>3</sup>

1 浙江大学医学院附属妇产科医院, 杭州 310006

2 浙江大学药学院, 杭州 310031

3 杭州九源基因工程有限公司, 杭州 310018

**摘要:** 用柱层析方法在生产重组人血清白蛋白干扰素  $\alpha 2b$  融合蛋白过程中去除产品中的内毒素。所用柱层析组合为 Blue-sepharose 亲和柱层析、SOURCE 15 ISO 疏水柱层析、Q Sepharose F.F. 离子交换柱层析、Sephadex G25 Coarse 凝胶过滤柱。采用鲎试剂法检测柱层析各阶段得到蛋白中的内毒素含量; 并用 RP-HPLC 方法测定柱层析各阶段得到蛋白的纯度与浓度, 求出每毫克蛋白的内毒素含量。结果为每步柱层析过程式均有去除内毒素的作用, 最终所得蛋白的内毒素含量降为 1 EU/mg, 去除率达到 99.9%。因而生产重组人血清白蛋白干扰素  $\alpha 2b$  融合蛋白所用分离纯化柱层析技术在纯化蛋白的同时能有效的去除产品中内毒素, 所得产品内毒素的含量远低于药典对注射剂的内毒素含量要求。

**关键词:** 人血清白蛋白, 干扰素  $\alpha 2b$ , 柱层析, 内毒素

## Removing Endotoxin from rHSA-IFN $\alpha 2b$ by Chromatography

Xiangrong Xu<sup>1</sup>, Guochang Ma<sup>2,3</sup>, Changmei Wang<sup>3</sup>, Jianfeng Shan<sup>3</sup>, Ling Sheng<sup>3</sup>, Yanshan Huang<sup>3</sup>, and Jinbao Zhou<sup>3</sup>

1 Gynecological Hospital, School of Medicine Zhejiang University, Hangzhou 310006, China

2 College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China

3 Hangzhou Jiuyuan Gene Engineering Co., Ltd, Hangzhou 310018, China

**Abstract:** We used chromatography to remove endotoxin during the purification of rHSA-IFN $\alpha 2b$  (recombinant human serum albumin-Interferon alpha 2b, rHSA-IFN $\alpha 2b$ ). Affinity chromatography of Blue-sepharose, hydrophobic interaction chromatography of SOURCE 15 ISO, ion exchange chromatography of Q Sepharose Fast Flow and gel filtration of sephadex G25 Coarse were applied consequently. The endotoxin levels were measured by Limulus Amebocyte Lysate gel-clot assay. Protein purity and concentration were determined by RP-HPLC. Up to 99.9% endotoxin of rHSA-IFN $\alpha 2b$  was removed and to a concentration of 1 EU/mg. This process was effective to purify rHSA-IFN $\alpha 2b$  and remove exdotoxin simultaneously.

**Key words:** HSA, IFN $\alpha 2b$ , column chromatography, endotoxin

内毒素 (Endotoxin) 是一种脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS), 来源于革兰氏阴性细菌外膜, 细胞死

亡或分解后被释放出来<sup>[1]</sup>。极微量内毒素进入人体就会引起高热, 腹泻, 血管扩张, 甚至昏厥或死亡。因此, 对非胃肠道给药制剂中内毒素的去除一直是一项重要的任务。

内毒素的磷酸基团和二价金属离子螯合, 可进一步稳定内毒素分子间的聚合, 促成更大的内毒素复合体, 内毒素分子量可由几千至数千万不等<sup>[2]</sup>。正是由于内毒素的性质极不均一, 从而难以找到一个简单或通用的去内毒素的方法。更令人头疼的是, 带负电的内毒素还可以和带正电的生物分子, 如碱性蛋白, 形成稳定的复合体。即使内毒素被酶解, 剩下的脂肪 A 部份仍可与某些疏水蛋白结合, 并仍保留热原性质。所以, 下游层析纯化中, 不难遇到同一步层析中, 在穿透峰、洗脱峰都检测到内毒素的情况<sup>[3]</sup>。因此, 在实际应用中往往需要几种层析方法组合才能将内毒素去除。

重组人血清白蛋白干扰素 $\alpha 2b$  融合蛋白(recombinant human serum albumin-Interferon alpha 2b, rHSA-IFN $\alpha 2b$ )是由毕赤酵母表达生产的<sup>[4,5]</sup>一种新的长效干扰素, 用于治疗慢性肝炎和白血病等病毒性疾病和肿瘤<sup>[6,7]</sup>, 临床上采用皮下给药。药典对注射剂的内毒素含量作了严格的限定<sup>[8]</sup>, rHSA-IFN $\alpha 2b$  注射液的内毒素标准为每剂量小于 10 EU(杭州九源基因工程有限公司申报的 rHSA-IFN $\alpha 2b$  注射液的规格中最高蛋白浓度为 2 mg/支, 只要内毒素小于 5 EU/mg 就为合格)。由于毕赤酵母表达的 rHSA-IFN $\alpha 2b$  发酵液的起始内毒素含量高达 100000 EU/mL 以上, 所以在 rHSA-IFN $\alpha 2b$  的生产过程中去除内毒素是一件很困难的工作。目前, 去除内毒素的方法有膜过滤、活性炭吸附、柱层析等多种方法<sup>[9-14]</sup>。我们通过亲和层析、疏水层析、离子交换层析和凝胶过滤层析组合的分离纯化方法, 使内毒素在 rHSA-IFN $\alpha 2b$  的纯化过程中被逐步去除, 最终使内毒素含量达到 rHSA-IFN $\alpha 2b$  注射剂药用标准规定的限量。

## 1 材料与与方法

### 1.1 药品与试剂

rHSA-IFN $\alpha 2b$  发酵液(杭州九源基因工程有限公司提供); 细菌内毒素标准品(中国药品生物制品检定所); 鲎试剂(厦门实验厂有限公司); 其他试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器

层析系统为美国 Pharmacia 公司的 AKTA explorer100。层析介质胶采用美国 Pharmacia 公司的 Blue-Sepharose; SOURCE 15 ISO; Q Sepharose F.F.; Sephadex G25 Coarse。美国安捷伦公司的 1100 高效液相色谱仪; 美国 Grace Vydac 公司的 C<sub>4</sub> 柱。

### 1.3 分析方法

#### 1.3.1 内毒素检测

参照《中国药典 2005 年版第三部》附录中 XI E 中的内毒素的鲎试剂检测方法。

#### 1.3.2 RP-HPLC

RP-HPLC 采用 C<sub>4</sub> 反相柱。色谱条件: 流速 0.8 mL/min; 设定检测波长为 214 nm; 洗脱液: Solvent A: 0.1% TFA; Solvent B: 20% H<sub>2</sub>O-90% ACN-0.1% TFA; 梯度为 0~35min: 0~90% B。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 亲和柱 Blue-Sepharose 层析

取 HSA-IFN $\alpha 2b$  发酵液的离心上清, 将其上样于用 20 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 6)(溶液 I)平衡好的 Blue-Sepharose 柱, 上样后用同样的磷酸缓冲液平衡柱子, 再用 1.5 mol/L NaCl 溶液洗脱得目标峰 A, 具体见图 1。

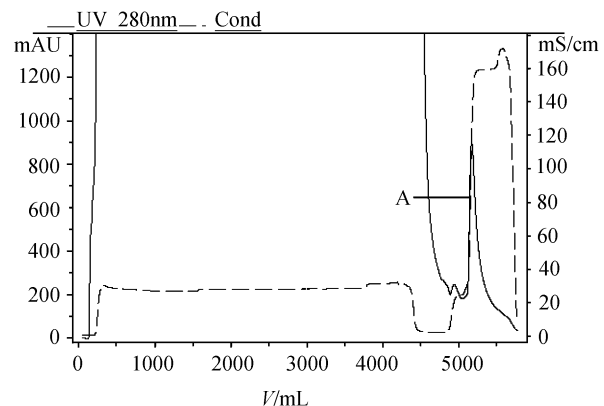


图 1 Blue-sepharose 亲和柱层析图

Fig. 1 Blue-sepharose affinity chromatograph

#### 1.4.2 疏水柱 SOURCE 15 ISO 层析

先将目标峰 A 的电导用(NH)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 调节至 110 ms/cm, 再用电导为 110 ms/cm 的(NH)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液(溶液 II)溶液平衡疏水柱, 然后将目标峰 A 上样于疏水柱, 上完样后用溶液 I 平衡柱子, 再用 10% 溶液 I-90% 溶液 II 洗脱得目标峰 B, 具体见图 2。

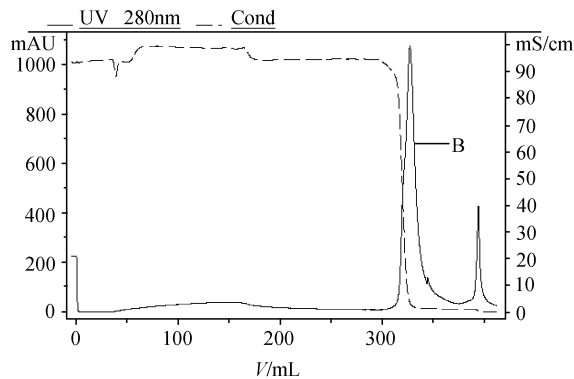


图 2 SOURCE 15 ISO 疏水柱层析图

Fig. 2 SOURCE 15 ISO hydrophobic chromatography

### 1.4.3 离子交换柱 Q Sepharose F.F. 层析

先将目标峰 B 用注射用水稀释至电导小于 5 ms/cm, 上样于用溶液 I 平衡好的 Q Sepharose F.F. 柱, 上样后用溶液 I 平衡柱子, 再用 0.5 mol/L 的 NaCl 溶液阶段梯度洗脱得目标峰 C, 具体见图 3。

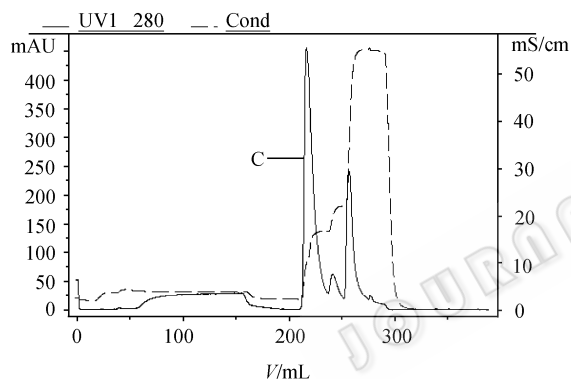


图 3 Q Sepharose F.F. 离子交换柱层析图

Fig. 3 Q Sepharose F.F. ion exchange chromatography

### 1.4.4 Sephadex G25 Coarse 凝胶过滤层析

将样品 C 上样于用 10 mmol/L 的磷酸缓冲液(pH=6)(溶液 III)平衡好的 Sephadex G25 Coarse 凝胶柱, 以溶液 III 作为洗脱液从柱上洗脱得目标峰 D, 具体见图 4。

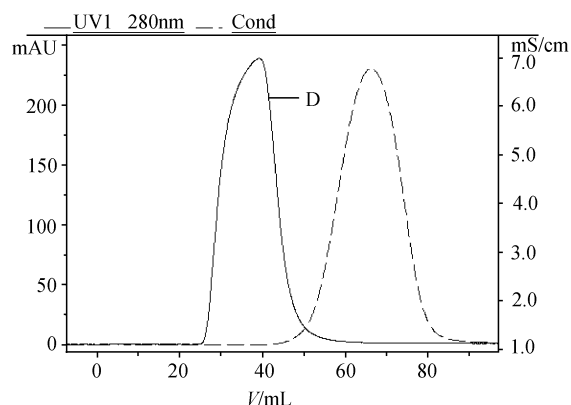


图 4 Sephadex G25 Coarse 凝胶过滤层析图

Fig. 4 Sephadex G25 Coarse gel filtration chromatography

## 2 结果

### 2.1 Blue-Sepharose 亲和层析

从表 1 可见, Blue-Sepharose 亲和柱利用其与 HSA-IFN $\alpha 2b$  有较强的亲和性, 使 HSA-IFN $\alpha 2b$  因与 Blue-Sepharose 亲和胶结合而从发酵液上清中分离出来, 同时使一部分的内毒素直接穿透而被去除。

表 1 Blue-sepharose 亲和柱层析结果

Table 1 The results of Blue-sepharose affinity chromatograph

Detection item	Fermentation broth	Target peak A
Endotoxin/(EU/mg)	86530	10547
Purity/%	62.1	86.2

### 2.2 SOURCE 15 ISO 疏水层析

由于 SOURCE 15 ISO 疏水层析需用高盐缓冲液平衡, 内毒素在高盐下容易凝集, 大都不结合疏水层析介质, 因而大部份内毒素在上样时直接穿透而被去除, 具体结果可从表 2 中见到。

表 2 SOURCE 15 ISO 疏水柱层析结果

Table 2 The results of SOURCE 15 ISO hydrophobic chromatography

Detection item	Target peak A	Target peak B
Endotoxin/(EU/mg)	10547	597
Purity/%	86.2	95.7

### 2.3 Q Sepharose F.F. 离子交换层析

由于内毒素一般带负电荷, 所以内毒素比蛋白质在阴离子交换介质上的结合强很多, 并且分子量越小的内毒素结合得越强, Q Sepharose F.F. 是一种强阴离子交换介质, 其可以在纯化蛋白的同时有效的去除内毒素(去除率可达 100 倍), 这一结果在表 3 中已体现出来。

表 3 Q Sepharose F.F. 离子交换层析结果

Table 3 The results of Q Sepharose F.F. ion exchange chromatography

Detection item	Target peak B	Target peak C
Endotoxin/(EU/mg)	597	5
Purity/%	95.7	97.2

### 2.4 Sephadex G25 Coarse 凝胶过滤层析

从表 4 中可见, Sephadex G25 Coarse 层析柱不但可去除小分子杂质提高蛋白的纯度, 而且可以进一步去除残留的内毒素, 使样品达到药典要求的注射用药标准。

表4 Sephadex G25 Coarse 凝胶过滤层析结果  
Table 4 The results of Sephadex G25 Coarse filtration chromatography

Detection item	Target peak C	Target peak D
Endotoxin/(EU/mg)	5	1
Purity/%	97.2	98.1

### 3 讨论

酵母表达系统虽然本身不产生内毒素,但在生产过程中因原辅材料,生产环境以及个人操作等因素造成产品内毒素污染,这是酵母表达系统产生内毒素的主要来源<sup>[15]</sup>。内毒素是一种性质极不均一的物质,它的分子量可以从几千到几千万,用单一层析方法往往不能彻底去除内毒素,因而本实验采用组合层析的方法(亲和层析-疏水层析-离子交换层析-凝胶过滤层析)在纯化蛋白的同时使内毒素得以去除。

亲和层析是采用目标蛋白与亲和介质能特异结合,内毒素不能与介质结合而直接穿透去除。或者是内毒素与亲和介质能结合,目标蛋白因不能结合直接穿透从而去除内毒素。Blue-Sepharose 亲和介质因与目标蛋白能特异结合而不与内毒素结合,从而可以去除内毒素,但由于介质本身的非特异性吸附作用,使一部分内毒素因与介质结合而没有被去除。另外由于部分内毒素与蛋白结合形成复合物,与蛋白一起被洗脱而没有被去除。

SOURCE 15 ISO 是一种疏水层析介质,需用高盐缓冲液平衡,内毒素在高盐下容易凝集(特别是高分子量的内毒素),大都不结合疏水层析介质,从而一部份内毒素会在上样时直接穿透而被去除,但是由于内毒素是不均一的,由于一些小分子的内毒素在高盐条件下不会凝集可与介质结合,会与蛋白一起被洗脱从而不能被去除。

Q Sepharose F.F.是一种强阴离子交换层析介质,由于内毒素一般带负电荷,内毒素比 rHSA-IFN $\alpha$ 2b 在 Q Sepharose F.F.上的结合强很多,分子量越小的内毒素结合得越强,多数要在柱再生(1M 氯化钠)或在位清洗(1M 氢氧化钠)时才从介质上洗脱下来,因此我们可在低盐条件下,先将蛋白洗脱,再在高盐条件下去除内毒素。但是由于内毒素的不均一性,此方法也并非万无一失。如高分子量,结构近似脂

膜或脂囊的内毒素,则因与阴离子交换介质结合较弱,较易与蛋白一起被洗脱而没有被去除。

Sephadex G25 Coarse 是一种凝胶过滤介质,其利用凝胶的网状结构根据分子大小进行分离的一种方法。用 Sephadex G25 Coarse 可以去除无机盐等小分子杂质,但对于去除内毒素在理论上是没有用的,因为 rHSA-IFN $\alpha$ 2b 和内毒素的分子量都超出了其分离范围。但是在实际过程中, Sephadex G25 Coarse 可以去除一部分内毒素,可能是因为凝胶介质本身对内毒素有一定的吸附作用,从而去除了一部分残留的内毒素。

通过上述几种层析方法的组合,不仅可以纯化酵母表达的 rHSA-IFN $\alpha$ 2b 发酵液得到纯的 rHSA-IFN $\alpha$ 2b 蛋白,并且可以在纯化蛋白的过程中去除内毒素而不需要额外的层析方法来去除内毒素,简化了生产工艺,节约了生产成本。

### REFERENCES

- [1] Hase S, Hofstad T, Rietschel ET. Chemical structure of lipid A component of lipopolysaccharides from *Fusobacterium nucleatum*. *J Bacteriol.* 1977, **129** (1): 9-14.
- [2] Rietschel ET, Brade L, Brandenburg K, et al. Chemical structure and biologic activity of bacterial and synthetic lipid A. *Rev Infect Dis.* 1987, **9** Suppl 5: S527-536.
- [3] Hirayama C, Sakata M. Chromatographic removal of endotoxin from protein solutions by polymer particles. *J Chromatogr Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002, **781** (1-2): 419-432.
- [4] Chang SH, Gong X, Yang ZY, et al. Expression in *Pichia pastoris* and properties of human serum albumin-interferon  $\alpha$ 2b chimera. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2006, **22**(2): 173-178.  
唱韶红, 巩新, 杨志愉, 等. 人血清白蛋白和人干扰素  $\alpha$ 2b 的融合蛋白在毕赤酵母中的表达. *生物工程学报*, 2006, **22**(2): 173-178.
- [5] Huang YS, Chen Z, Yang ZY, et al. Preparation and characterization of a potent, long-lasting recombinant human serum albumin-Interferon- $\alpha$ 2b fusion protein expressed in *Pichia pastoris*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2007), doi: 10.1016/j.ejpb.2007.02.015.
- [6] Gutterman JU. Cytokine therapeutics: lessons from interferon alpha. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994, **91**(4): 1198-1205.
- [7] Garwala SS, Kirkwood JM. Potential uses of interferon alpha 2 as adjuvant therapy in cancer. *Ann Surg Oncol*, 1995, **2** (4): 365-371.
- [8] Nation Pharmacopoeia Committee ed. *Pharmacopoeia of the*

- People's Republic of China(Second Section). *Beijing: Chemical Industry Publishing Company*, 2005, appendix I B.
- 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典(第二部). 北京: 化工出版集团, 2005, appendix I B.
- [9] Petsch D, Anspach FB. Endotoxin removal from protein solutions. *J Biotechnol.* 2000, **76**(2-3): 97-119.
- [10] Liu S, Tobias R, McClure S, *et al.* Removal of endotoxin from recombinant protein preparations. *Clin Biochem.* 1997, **30**(6): 455-463.
- [11] Wilson MJ, Haqqart CL, Gallagher SP, *et al.* Removal of tightly bound endotoxin from biological products. *J Biotechnol.* 2001, **88**(1): 67-75.
- [12] Aida Y, Pabst MJ. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. *J Immunol Methods.* 1990, **132**(2): 191-195.
- [13] Wei Z, Huang W, Li J, Hou G, *et al.* Studies on endotoxin removal mechanism of adsorbents with amino acid ligands. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, **852**: 288-292.
- [14] Finette GM, Mao QM, Hearn MT. Comparative studies on the isothermal characteristics of proteins adsorbed under batch equilibrium conditions to ion-exchange, immobilized metal ion affinity and dye affinity matrices with different ionic strength and temperature conditions. *J Chromatogr A.* 1997, **763**(1-2): 71-90.
- [15] Yu HJ, Zhang L. Endotoxin and gene engineering produce. *Progress in Microbiology and Immunology*, 1997, **25**(3): 62-65.
- 于德强, 张岚. 内毒素与基因工程产品. 微生物学免疫学进展, 1997, **25**(3): 62-65.

## 中国工业生物技术发展高峰论坛•2008

### 《生物工程学报》专刊征文通知

继 2007 年 3 月首次中国工业生物技术发展高峰论坛成功召开之后,中国科学院生命科学与生物技术局将携手科技部中国生物技术发展中心、天津市科委、中国生物工程学会于 2008 年 4 月在天津共同主办“中国工业生物技术发展高峰论坛·2008”。为传播会议成果,促进我国工业生物技术领域的交流和发展,《生物工程学报》将特辟专刊,于会后推出“工业生物技术创新与发展”——中国工业生物技术发展高峰论坛·2008 专集。现面向国内外相关的专家学者和研发人员公开征集稿件,经专家评审后,优秀论文将在专刊上发表。并从中遴选出一定数量的优秀论文,在“中国工业生物技术发展高峰论坛·2008”上作会议报告。

专刊主题: 工业生物技术创新与发展

#### 一、征文范围:

本专刊收录如下研究方向的论文,但不限于此:生物炼制和生物基化学品;微生物基因组学和生物信息学;代谢工程与抗生素创新药物研发;纳米科学与现代工业酶技术;生物炼制细胞工厂的基础与应用;生物催化与生物转化;工业生物过程技术;等等。

#### 二、投稿要求:

1. 投稿方式:采用“生物工程学报在线投稿系统”(http://journals.im.ac.cn/cjbcn)投稿。(注意事项:请在投稿时,在投稿类型中选择“专刊”类型,并在备注栏中注明“工业生物技术”字样。)

2. 稿件格式:参照《生物工程学报》论文格式(学报网站上提供了论文模板,可下载)。

3. 投稿文章应未在正式出版物上发表过,也不在其他刊物或会议的审稿过程中,不存在一稿多投现象;保证投稿文章的合法性(无抄袭、剽窃、侵权等不良行为)。

4. 其他投稿须知请参阅《生物工程学报》投稿须知(http://journals.im.ac.cn/cjbcn)。

5. 专刊投稿文章不收审理费;录用刊发文章将按照《生物工程学报》相关规定收取版面费并提交版权承诺书;发表之后,按照《生物工程学报》相关规定支付作者稿酬,并赠送样刊及单行本。

三、截稿日期:2008 年 3 月 15 日

四、《生物工程学报》编辑部联系方式: E-mail: cjb@im.ac.cn; Tel: 010-64807509