

# 注射用紫杉醇（白蛋白结合型）纳米粒白蛋白聚合状态研究

师帅

（江苏恒瑞医药股份有限公司，江苏 连云港 222000）

**【摘要】**本研究通过 SEC、RI+LS+UV、MALDI-TOF 多方法实现了对注射用紫杉醇（白蛋白结合型）纳米粒中白蛋白各聚体的定性和定量表征。注射用紫杉醇（白蛋白结合型）在形成纳米粒过程中白蛋白多聚体的量并没有发生明显改变，部分单体转化为了二聚体和四聚体，起到紫杉醇载体的作用。

**【关键词】**聚合状态；聚体；纳米粒；白蛋白

## 引言：

紫杉醇是一种广谱抗癌药，对多种恶性肿瘤如乳腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌、头颈部肿瘤等都显示出较肯定的临床疗效。由于其水溶性差，临床常用的紫杉醇注射液均以聚氧乙烯蓖麻油和无水乙醇作为助溶剂。但聚氧乙烯蓖麻油在临床上不良反应比较严重，如过敏反应、神经毒性、血液学毒性等。

## 一、注射用紫杉醇简要概述

注射用紫杉醇（白蛋白结合型）是一种不含聚氧乙烯蓖麻油、以人血白蛋白为辅料的冻干制剂，以生理盐水再分散后可形成 100-200nm 大小的紫杉醇纳米粒，商品名为 Abraxnes<sup>®</sup>。它避免了聚氧乙烯蓖麻油有关的不良反应，可提高紫杉醇化疗时的安全性，改善量效关系，且患者用药前不需接受预处理。肿瘤分泌的功能类似白蛋白受体（SPARC），能专门吸引和黏附白蛋白，因此 SPARC 蛋白能特异性地吸附与白蛋白结合的细胞毒性药物，并把它聚集在肿瘤细胞上，从而提高了局部药物浓度。白蛋白结合型紫杉醇利用了白蛋白天然的独特转运机制（gp60- 窖蛋白 -SPARC），使紫杉醇更多分布于肿瘤组织，增强对肿瘤的杀伤能力。

在纳米粒的形成过程中，白蛋白通过与紫杉醇结合被修饰成寡聚形式来增加它对纳米粒表面的粘附性和稳定性。白蛋白寡聚体与单体在体内有不同的清除率，因此，被修饰的白蛋白与天然的白蛋白可能在体内的分布上有所不同<sup>[1]</sup>。FDA 在该品种的指南中要求对白蛋白辅料以及最终产品的聚合状态

进行表征<sup>[2]</sup>；国家药品监督管理局也要求关注辅料人血白蛋白和终产品终人血白蛋白各聚体比例<sup>[3]</sup>。因此，开发能够对注射用紫杉醇（白蛋白结合型）（以下简称纳米粒）中各聚体定性和定量的表征方法，有利于更充分地研究白蛋白作为载体的作用机理，以保证产品的安全性和有效性。

体积排阻色谱法（SEC）用于分析和定量非共价和不可逆的聚体的一种方法。它是基于溶液中蛋白质的流体动力学尺寸进行分离。SEC 适用于分析 1-50 nm 范围内的聚集体，当该方法不会引起聚集状态的变化，并且与柱填料的非特异性作用消除时，被认为耐用、准确。本研究通过该方法分离各聚体，并且进行定量。

RI（示差）+ LS（光散射）+UV（紫外）是 SEC 与三重检测器联用。它由一台浓度检测器（通常为折光率检测器）、一台在线稀溶液粘度计以及一台分子量敏感型（光散射）检测器组成。采用以上三种检测器就避免了漫长的体积校准过程。折光率检测器能提供分子量分布情况和浓度曲线。粘度计用于测定特性粘度和流体力学半径，而光散射检测器用于测定每种流出组分的绝对分子量以及均方回转半径。这些检测器的组合为进行支化以及构象分析，以及量化聚集体、交联和凝胶的数量提供了一种强大的工具。本研究通过该方法来检测各聚体的分子量。

基质辅助激光解吸离子化飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）是一种强大的质谱分析工具，它具有分析速度快、灵敏度高、分辨率高、准确度高

和极高的质量上限，能够精准地分析高分子聚合物和相对分子质量分布。本研究采用该方法来研究在 RI（示差）+ LS（光散射）+UV（紫外）响应不高的白蛋白寡聚体。

## 二、材料与方法

### （一）材料

人血白蛋白（批号：IBAB6PC001、A4AFD03961, Grifols），注射用紫杉醇（白蛋白结合型）（商品名：Abraxnes<sup>®</sup>，批号：6113377、6113010、6121235, Celgne），所有的化学试剂均为分析纯或色谱级。

### （二）方法

1. 体积排阻色谱法（SEC）测聚体含量。仪器：Agilent 色谱系统；色谱条件：凝胶过滤色谱柱 [TSK gel G3000 SW]，600 × 7.5 mm，10 μm；流速：0.5 mL/min；检测波长：280 nm；流动相：溶解 1.514 g 磷酸二氢钠，3.885 g 磷酸氢二钠，11.688 g 氯化钠 和 50 mg of 叠氮化钠在 1 L 的纯化水中；进样量：25 μL；柱温：4℃。

2. RI（示差）+ LS（光散射）+UV（紫外）多检测器 SEC 系统测聚体分子量。仪器：马尔文 Viscotek GPCmax + RI（示差）+ LS（光散射）+UV（紫外）多检测器 SEC 系统；色谱条件：凝胶过滤色谱柱 [TSK gel G3000 SW]，600 × 7.5 mm，10 μm；流速：0.5 mL/min；检测波长：280 nm；流动相：溶解 1.514 g 磷酸二氢钠，3.885 g 磷酸氢二钠，11.688 g 氯化钠 和 50 mg of 叠氮化钠在 1 L 的纯化水中；进样量：25 μL；柱温：25℃。

3. 寡聚体的制备。采用 2.2.1 方法对 HSA 和纳米粒中的白蛋白寡聚体色谱峰进行定位，并按照以下方法制备。（1）一次制备。仪器：岛津 LC20AP L；色谱柱：凝胶过滤色谱柱 [TSK gel G3000 SW]，600 × 7.5 mm，10 μm；洗脱剂：0.2mol/L 乙酸铵；进样量：1.0 mL；流速：10 mL/min；波长 280 nm；制备方法：注射用紫杉醇（白蛋白结合型）用纯化水溶解稀释至含总白蛋白约 9mg/mL，进样 1mL；HAS 直接进样 1mL。（2）二次制备。仪器：Agilent 1260；色谱柱：凝胶过滤色谱柱 [TSK

gel G3000 SW]，600 × 7.5 mm，10 μm；洗脱剂：0.05mol/L 乙酸铵；进样量：1.0 mL；流速：10 mL/min；波长 280 nm；制备方法：一次制备后的样品进样 1mL。

4. 基质辅助激光解析飞行时间质谱仪（MALDI-TOF）法测寡聚体分子量。仪器：Bruker MALDI-TOF, UltrafleXtreme；扫描模式：线性；极性：正离子；扫描范围：30000~400000 Da；激光器：Smartbeam 固态激光器；激光频率：2000 Hz；透镜电压：8.25 kV；第一离子源电压：20 kV；第二离子源电压：18.3 kV；激光强度：95%；样品靶种类：MTP 384 ground steel；基质：SA（Sinapinic acid，芥子酸）；样品：2.2.3 项下制备的寡聚体；点靶方法：夹心法 / 三明治法。

## 三、结果与讨论

### （一）SEC 测定白蛋白聚体含量

通过 SEC 方法，可以使人血白蛋白中各聚体按照其流体动力学尺寸进行分离，先后得到多聚体、寡聚体、二聚体和单体。结果见表 1。

表 1 HSA 和纳米粒中白蛋白中各聚体含量

| 样品名称     | 多聚体  | 寡聚体  | 二聚体   | 单体    |
|----------|------|------|-------|-------|
| 人血白蛋白    | 3.7% | 0.4% | 2.5%  | 93.5% |
| 纳米粒中的白蛋白 | 3.8% | 3.9% | 12.0% | 80.3% |

表 1 说明与 HSA 相比，纳米粒中的白蛋白主要以单体为主，并有一定量的二聚、寡聚体和多聚体，呈现聚合度越高，含量越低的趋势。两者多聚体的比例基本相似。不同的是，纳米粒中的白蛋白的单体含量较 HSA 有所降低，二聚体和寡聚体有所增加。说明白蛋白在与紫杉醇结合形成纳米粒时，形成了二聚体和寡聚体。被修饰的白蛋白与 HSA 相比，与紫杉醇有更高的亲和性，使它入血后半衰期非常短，没有足够的时间解离，并与血中与内源性白蛋白再结合。因此，这可能让纳米粒中与白蛋白结合的紫杉醇更快地被组织摄取<sup>[4]</sup>。

（二）RI（示差）+LS（光散射）+UV（紫外）测定白蛋白各聚体分子量

通过 RI+LS+UV 方法测定 HSA 和纳米粒中白蛋白的各聚体的分子量，进一步表征与紫杉醇结合后的白蛋白聚合状态。具体结果见表 2。

表 2 HSA 和纳米粒中白蛋白中各聚体分子量 (RI+LS+UV 法)

| 样品名称     | 多聚体                  | 寡聚体     | 二聚体     | 单体     |
|----------|----------------------|---------|---------|--------|
| 人血白蛋白    | 2.910 e <sup>6</sup> | N/A     | 133,462 | 66,645 |
| 纳米粒中的白蛋白 | 2.626 e <sup>6</sup> | 241,556 | 139,220 | 67,473 |

HSA 分子量是 66kDa。由表 2 结果可知, 纳米粒中的白蛋白单体和二聚体分子量基本与 HSA 一致。纳米粒中的白蛋白的寡聚体分子量为 241,556, 推测为四聚体。由于 HSA 中寡聚体含量较小, 响应过低, 在该方法下无法测定分子量, 后续会采用高分辨度的 MALDI-TOF 法对该寡聚体进行研究, 具体见 3.3 项; 纳米粒中的白蛋白多聚体分子量比 HSA 略低, 这可能是由于凝胶过滤色谱柱的排阻限时 10kDa-500kDa, 在分子量接近上限, 多聚体在同一个位置出峰, 因此测得分子量, 是多个多聚体的平均分子量<sup>[5]</sup>。纳米粒中多聚体较 HSA 的分子量偏低, 可能是多聚物中含有相对聚合度更低的聚体。中国药典仅对 HSA 的多聚体进行了控制, 说明白蛋白的主要免疫原性风险来自多聚体; 且据文献报道 HSA 的聚合度越高, 对于人体免疫原性的风险越高<sup>[6]</sup>; 纳米粒中白蛋白多聚体的量与 HSA 基本一致, 而在多聚体中含有更多的聚合度更低的聚体, 因此, 对免疫原性的风险为低。

### (三) MALDI-TOF 法测寡聚体分子量

经过二次制备的方法富集纳米粒中白蛋白和 HSA 的寡聚体, 并采用 MALDI-TOF 分析其分子量。结果见图 2。

由图 2 结果可知, 纳米粒中白蛋白和 HSA 中寡聚体分子量均约为 27000-29000, 推测为四聚体。说明白蛋白与紫杉醇结合形成纳米粒后, 其寡聚体分子量与 HSA 一致。这也与 3.2 项测得的纳米粒中寡聚体的分子量类似。该方法弥补了 HSA 寡聚体在 RI+LS+UV 法下响应低的问题, 进一步说明了纳米粒中的白蛋白寡聚体与 HSA 的一致性。

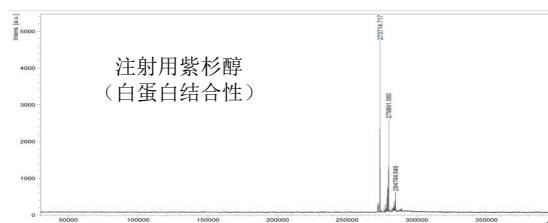
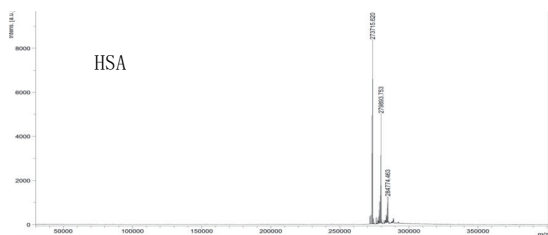


图 2 HSA 和纳米粒中白蛋白寡聚体 MALDI-TOF 图谱对比

### 四、总结

通过 SEC、RI+LS+UV、MALDI-TOF 方法能够对注射用紫杉醇 (白蛋白结合型) 中白蛋白各聚体进行定性和定量。更全面的表征纳米粒中白蛋白的聚合状态。紫杉醇在与白蛋白形成纳米粒后, 白蛋白还是主要以单体形式存在; 多聚体的含量并没有增加, 且控制在很低的范围内; 部分的单体转化为二聚体和寡聚体, 使紫杉醇能够更低的进入组织, 发挥疗效。

### 参考文献:

- [1] Schnitzer J, Sung A, Horvat R, et al. Preferential interaction of albumin-binding proteins, gp30 and gp18, with conformationally modified albumins. Presence in many cells and tissues with a possible role in catabolism[J]. 1993.
- [2] U.S Food & Drug Administration. Draft Guidance on Paclitaxel August 2021. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/psg/PSG\\_021660](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/psg/PSG_021660).
- [3] 国家药品监督管理局药品审评中心. 注射用紫杉醇 (白蛋白结合型) 仿制药研究技术指导原则 (试行), 2020. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/548c025039cadecac94d0a45f96d1b>.
- [4] Anderson C L, Chaudhury C, Kim J, et al. Perspective-- FcRn transports albumin: relevance to immunology and medicine. [J]. Trends in Immunology, 2006, 27(7):343-348.
- [5] Frei E. Albumin binding ligands and albumin conjugate uptake by cancer cells[J]. Diabetology and Metabolic Syndrome, 2011, 3(1):11.
- [6] Ratanji, Kirsty, D, et al. Immunogenicity of therapeutic proteins: Influence of aggregation. [J]. Journal of Immunotoxicology, 2014.