

重组人酸性成纤维细胞生长因子的稳定性研究

姚成灿,郑青,许华,赵文,吴晓萍,苏志坚,黄亚东,李校堃(暨南大学药学院,广州 510632)

摘要:目的 研究重组人酸性成纤维细胞生长因子(rhAFGF)在不同温度下的存放稳定性。方法 rhAFGF冻干粉和溶媒在4、25和37℃分别保存30个月;rhAFGF液体在4℃保存56d,在25和37℃分别保存35d。采用MTT法测定rhAFGF的生物活性,同时进行外观性状、水分含量、pH值的测量和无菌试验。结果 4℃时,rhAFGF冻干粉、液体和溶媒的各项性质在观察期内都无变化。25℃时,rhAFGF冻干粉、液体的生物活性分别在存放18个月和35d有下降趋势。37℃时,rhAFGF冻干粉、液体的生物活性分别在存放12个月和35d有下降趋势。结论 rhAFGF冻干粉在4℃时可有效保存2年;rhAFGF冻干粉溶解后于4℃时保存28d内使用有效;溶媒在4℃时保存2年质量稳定。

关键词:重组人酸性成纤维细胞生长因子;生物活性;稳定性

中图分类号:R915.2 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2006)05-0358-03

The stability of recombinant human acid fibroblast growth factor

YAO Cheng-can, ZHENG Qing, XU Hua, ZHAO Wen, WU Xiao-ping, SU Zhi-jian, HUANG Ya-dong, LI Xiao-kun(College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the stability of recombinant human acid fibroblast growth factor(rhAFGF) deposited at 4℃, 25℃ or 37℃. **METHODS** The freeze-dried powder of rhAFGF and dissolvent were deposited at 4℃, 25℃ and 37℃ for 36 months. The solution of rhAFGF powder was deposited for 56 days at 4℃ and for 35 days at 25℃ and 37℃ respectively. The bioactivity of rhAFGF was determined by MTT method, and the appearance, water content, pH and sterility test were also observed. **RESULTS** All properties of rhAFGF freeze-dried powder, rhAFGF solution and dissolvent were not altered during the observation period at 4℃. However, the bioactivity of rhAFGF freeze-dried powder and its solution decreased after storage for 18 months or 35 days at 25℃ respectively. The bioactivity of rhAFGF freeze-dried powder and its solution decreased after storage for 12 months or 35 days at 37℃ respectively. **CONCLUSION** The freeze-dried powder rhAFGF and dissolvent can be deposited effectively for 2 years at 4℃. The solution of rhAFGF freeze-dried powder can be deposited effectively for 28 days at 4℃.

KEY WORDS: recombinant human acid fibroblast growth factor(rhAFGF); bioactivity; stability

酸性成纤维细胞生长因子(acid fibroblast growth factor, aFGF)是一种能广泛地促进来源于中胚层及神经外胚层细

基金项目:国家863计划创新药物重大专项资助项目(No. 2002AA2Z3318, No. 2004AA2Z3C60);广州市科技计划资助项目(No. 2005J1-C0151)。

胞增殖的生物活性物质,虽然其在体内的含量甚微,但生理功能相当广泛。aFGF在体内参与多种组织的创伤修复过程,是体内重要的创伤愈合因子之一,广泛用于烧伤、创伤、神经损伤及脑移植、脊髓重建、血管损伤的修复等领域^[1-3]。我们采用基因工程方法,在大肠杆菌中得到了高效表达的重组人酸性成纤维细胞生长因子(recombinant human aFGF, rhafGF),并对其进行了分离纯化^[4-5],目前已经成功地解决了rhafGF大批量生产的问题。目前我们生产的rhafGF已经被国家食品药品监督管理局批准进入临床试验。为了更进一步保证产物的性能,我们对其稳定性进行了长达3年多的观察和测定,不但可为制定rhafGF的质量标准提供重要依据,也可其他基因工程产品的开发和生产提供有益参考。

1 材料与方法

1.1 受试药物

1.1.1 重组人酸性成纤维细胞生长因子(冻干粉):重组人酸性成纤维细胞生长因子原液,纯度>95%,比活 $\geq 2.5 \times 10^5$ U/mg。加稳定剂,除菌,按每瓶2 mL分装于12 mL的西林瓶中,冻干,规格为 2.5×10^4 U/瓶,即 1.25×10^4 U/mL。取同时生产的两批样品进行考察,批号分别为a和b。

1.1.2 重组人酸性成纤维细胞生长因子(液体):每瓶重组人酸性成纤维细胞生长因子(冻干粉)加10 mL溶媒溶解,规格为 2.5×10^4 U/瓶,即 2.5×10^3 U/mL。

1.1.3 溶媒:10 mmol/L PBS溶液, pH 7.0用0.22 μ m滤膜过滤除菌,分装于12 mL的西林瓶中,每瓶10 mL。

1.2 保存条件与检测项目

1.2.1 重组人酸性成纤维细胞生长因子(冻干粉):各取一定数量的a b两批重组人酸性成纤维细胞生长因子冻干粉样品,分别置于4 25和37℃进行保存,分别于第3 6 9 12 18 24 30 36个月取若干支,考察以下项目:①外观性状:应为白色或微黄色疏松体,加2 mL灭菌注射用水后应立即溶解为澄清液体,不得含有肉眼可见的不溶物。②水分含量:应不高于3.0%。③pH值:应在6.5~7.5之间。④无菌试验:应符合规定。⑤活性测定:rhafGF的活性测定结果应符合标示量的80%~150%之间,即在 $1.00 \times 10^4 \sim 1.87 \times 10^4$ U/mL之间。

1.2.2 重组人酸性成纤维细胞生长因子(液体):各取一定数量的两批重组人酸性成纤维细胞生长因子冻干粉样品,每瓶加10 mL溶媒溶解。取一定数量液体置于4℃进行保存,分别于第7 14 28 42 56d取若干支;并取一定数量液体分别置于25 37℃进行保存,分别于第3 7 14 28 35d取若干支,考察以下项目:①外观性状:应为无色澄清液体,不得含有肉眼可见的不溶物。②pH值:应在6.5~7.5之间。③无菌试验:应符合规定。④活性测定:rhafGF的活性测定结果应符合标示量的80%~150%之间,即在 $2.00 \times 10^3 \sim 3.75 \times 10^3$ U/mL之间。

1.2.3 溶媒:各取一定数量的两批溶媒,分别置于4 25和37℃进行保存,分别于第3 6 9 12 18 24 30 36个月取若干支,考察以下项目:①外观性状:应为无色澄清液体,不得含

有肉眼可见的不溶物。②pH值:应在6.5~7.5之间。③无菌试验:应符合规定。

1.3 活性测定

重组人酸性成纤维细胞生长因子的生物活性测定采用MTT细胞培养法^[6]。即采用Balb/c 3T3细胞,测定时选用Promega公司的rhafGF为标准品。将对数增殖期的Balb/c 3T3细胞调节细胞浓度,加入96孔板中(每孔7 000细胞/100 μ L)。37℃,5% CO₂条件下培养24 h再用含0.4%胎牛血清的1640培养基换液后使细胞饥饿培养24 h。将rhafGF按一定浓度4倍稀释后加入,每3孔为一平行组,继续培养48~72 h后,加入20 mL MTT(5 mg/mL),培养4 h后弃去培养液,每孔加入150 μ L的DM SO,室温放置40 min后,在570 nm波长下测其A值,作出对应的A值-rhafGF浓度曲线。

2 结果

2.1 重组人酸性成纤维细胞生长因子(冻干粉)

2.1.1 重组人酸性成纤维细胞生长因子(冻干粉) a b两批在4 25和37℃条件下保存30个月,瓶内制剂仍为白色疏松状,易于溶解,溶液澄清,没有肉眼可见的不溶物出现;水分含量一直保持在1.0%~2.0%之间;pH值一直保持在7.0~7.2之间;无菌试验检验结果也都合格。见图1。

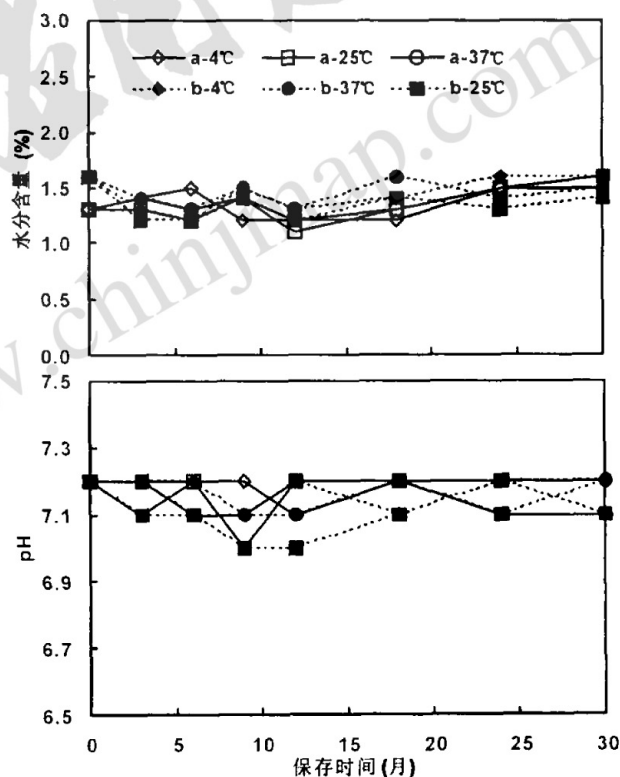


图1 rhafGF冻干粉在保存期间的水份和pH值变化

Fig 1 Variation of water content and pH of rhafGF freeze-dried powder during storage

2.1.2 重组人酸性成纤维细胞生长因子(冻干粉) a b两批,在4℃保存30个月,其生物学活性没有明显变化。而在25℃条件下保存12个月,其生物学活性没有明显变化;保存18个月,其生物学活性有下降的趋势;保存24个月,其生物学活性下降约40%;保存30个月,其生物学活性下降约

70%。在 37℃条件下保存 12 个月,其生物学活性有下降的趋势;保存 18 个月,其生物学活性下降约 40%;保存 24 个月,其生物学活性下降约 60%;保存 30 个月,其生物学活性下降约 85%。见图 2。

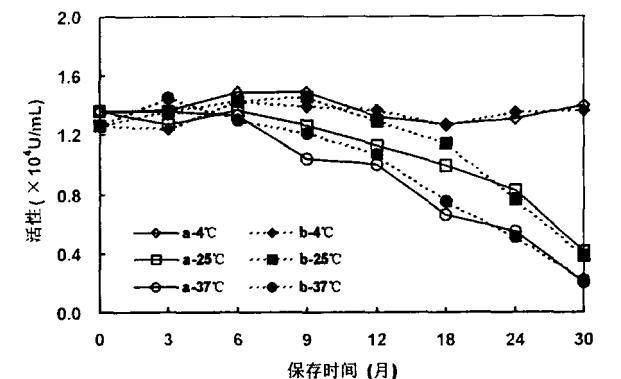


图 2 rhaFGF冻干粉保存期间的生物活性变化
Fig 2 Variation of bioactivity of rhaFGF freeze-dried powder during storage

2.2 重组人酸性成纤维细胞生长因子 (液体)
2.2.1 重组人酸性成纤维细胞生长因子 a, b 两批冻干粉加溶媒溶解后的液体,在 4℃下保存 56d,及在 25 和 37℃条件下保存 35d,瓶内液体仍澄清,没有肉眼可见的不溶物出现; pH 值一直保持在 7.0~7.2 之间,见图 3;无菌试验检验结果也都符合标准。

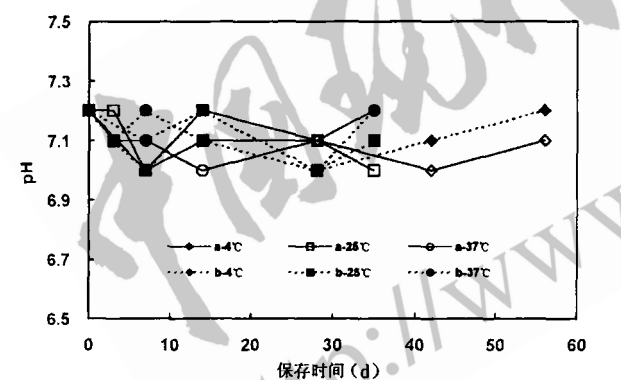


图 3 rhaFGF溶液保存期间 pH 值的变化
Fig 3 Variation of pH of solution of rhaFGF freeze-dried powder during storage

2.2.2 重组人酸性成纤维细胞生长因子 a, b 两批冻干粉加溶媒溶解后的液体,在 4℃保存 56d,其生物学活性没有明显变化。而在 25 和 37℃条件下保存 28d,其生物学活性没有明显变化;保存 35d,其生物学活性有下降的趋势。见图 4。

2.3 溶媒

溶媒在 4, 25 和 37℃条件下保存 30 个月,其瓶内液体仍为无色澄清,没有肉眼可见的不溶物出现; pH 值一直保持在 7.0~7.2 之间见图 5;无菌试验检验结果也都符合标准。

3 结论

重组人酸性成纤维细胞生长因子 (rhaFGF) 冻干粉在

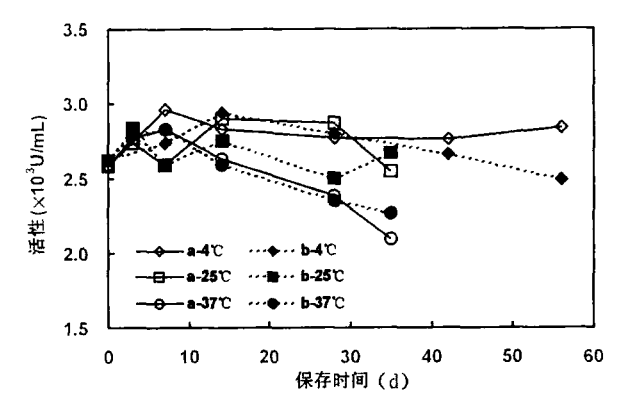


图 4 rhaFGF溶液保存期间生物活性的变化
Fig 4 Variation of bioactivity of solution of rhaFGF freeze-dried powder during storage

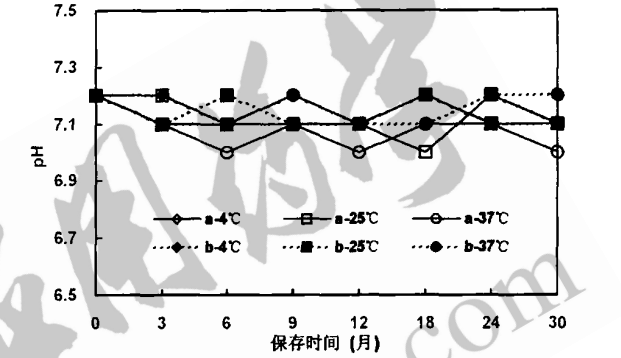


图 5 溶媒在保存期间 pH 值的变化
Fig 5 Variation of pH of dissolvent during storage

4℃时保存 30 个月,各项理化和生物学指标均无明显变化,质量稳定,符合检定标准,其有效期可定为 2 年。而其冻干粉加溶媒溶解后的 rhaFGF 液体,在 4℃时保存 56d,各项指标均无明显变化,质量稳定,符合规定标准,建议冻干粉溶解后于 4℃时保存,28d 内使用。用于溶解 rhaFGF 冻干粉的溶媒在 4℃时保存 2 年质量稳定。

参考文献

[1] Burgess WH. Structure-function studies of acidic fibroblast growth factor[J]. Ann NY Acad Sci, 1991, 638(1): 89-95.
[2] 许华,郑青,姚成灿,等.重组人酸性成纤维细胞生长因子促进大鼠烫伤愈合的研究[J].暨南大学学报(自然科学版), 2003, 24(2): 7-11.
[3] 李校,许华,付小兵,等.重组人酸性成纤维细胞生长因子促进创伤愈合的研究[J].中国药科大学学报(自然科学版), 2002, 33(4): 312-315.
[4] 李校,吴晓萍,郑青,等.人酸性成纤维细胞生长因子的高效表达[J].华南理工大学学报(自然科学版), 2001, 29(12): 61-64.
[5] 郑青,苏志坚,吴晓萍,等.人酸性成纤维细胞生长因子突变体表达与修饰[J].华南理工大学学报(自然科学版). 2005, 33(1): 88-91.
[6] 赵稳兴,赵晶,梁崇礼.多酚类化合物对 MTT 法测定细胞活性的影响[J].中国现代应用药学杂志, 2004, 21(4): 263-265.

收稿日期: 2005-03-14