

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.11.014

重组人干扰素 $\alpha-2b$ 相关蛋白检测和质量分析*

张伶俐¹, 刘冰¹, 杨惠洁¹, 王梦莹¹, 陶磊², 饶春明²

(1. 重庆市食品药品检验检测研究院, 重庆 401121; 2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要:目的 提高我国生物制品标准, 并与国际标准达到一致, 按 9.0 版《欧洲药典》记载建立重组人干扰素 $\alpha-2b$ 原液相关蛋白的检测方法。**方法** 采用 9.0 版《欧洲药典》中反相高效液相色谱法对色谱柱进行验证和方法确认; 质谱解析重组蛋白的主峰和相关蛋白成分; 并对 8 个厂家 23 批次重组人干扰素 $\alpha-2b$ 原液进行相关蛋白检测和质量分析。**结果** 多数色谱柱均能满足系统适用性要求; 氧化型峰保留时间为主峰的 0.9 倍; 供试品不合格率为 30.43%。**结论** 该方法适用于相关蛋白检测, 部分产品不合格, 需进一步优化生产工艺。重组蛋白在生产和储存过程中易发生氧化等化学性改变, 建议将相关蛋白检测作为质量控制和监测指标纳入新版药典。

关键词: 重组人干扰素 $\alpha-2b$; 相关蛋白; 检测; 反相高效液相色谱法

中图分类号: R979.5; R917

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)11-0052-04

Test and Quality Assessment of Related Proteins of Recombinant Human Interferon $\alpha-2b$

ZHANG Lingli¹, LIU Bing¹, YANG Huijie¹, WANG Mengying¹, TAO Lei², RAO Chunming²

(1. Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing, China 401121; 2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing, China 100050)

Abstract: **Objective** To improve the standards of China's biological products to achieve consistency with international standards, and by reference of the 9.0 edition of European Pharmacopoeia (EP), to establish a method for detecting the related proteins of recombinant human interferon $\alpha-2b$. **Methods** Using reverse phase chromatographic method in the current 9.0 edition of EP, the chromatographic columns were used to validate the method. The principle recombinant protein and its oxidized component were analyzed by mass spectrometry. Suitable columns were chosen to measure all 23 batches of recombinant human interferon $\alpha-2b$ from 8 plants. **Results** Most columns met the validation requirements. Peak related to oxidised interferon appeared at a retention time of about 0.9 relative to the principle peak. According to the EP criteria, the unqualified rate was 30.43%. **Conclusion** The method is applicable to detect related proteins in recombinant proteins. Some products are unqualified, and should optimize their processing technology. Oxidation and other chemical modifications often occurred in biological recombinant products and should be included in our new Pharmacopoeia as a monitoring and quality control indicator.

Key words: recombinant human interferon $\alpha-2b$; related protein; test; reverse phase high performance liquid chromatography

重组人干扰素(rhIFN)为全球第二大重组蛋白药物^[1],我国现有 10 多个厂家生产。2015 年版《中国药典(三部)》^[2]采用分子排阻色谱(SEC)和凝胶电泳(SDS-PAGE)来控制原液中的杂质含量,未收载相关蛋白的检

*基金项目:国家药典委员会药品医疗器械审评审批制度改革专项课题[ZG2017-3-02]。

第一作者:张伶俐,女,博士研究生,副主任药师,研究方向为生物制品的质量控制,(电子信箱)247351296@qq.com。

- 中国药房,2016,27(3):372-374.
- [4] 李海池,李菁,张超,等. 复方党参胶囊的质量研究[J]. 天津中医药大学学报,2013,32(4):225-228.
- [5] 赵晶,曹红. HPLC 法同时测定川参通注射液丹参素和原儿茶醛的含量[J]. 解放军药学学报,2013,29(2):141-143.
- [6] 吴永芹,李玉华,王雪云. HPLC 法同时测定参芎葡萄糖注射液中丹参素、原儿茶醛和盐酸川芎嗪的含量[J]. 药学研究,2017,36(7):390-392.
- [7] 胡生俊,徐岳鑫. 丹香冠心注射液 HPLC 指纹图谱及 4 种成分的含量测定[J]. 药学与临床研究,2017,25(2):99-101.
- [8] 顾小燕,卢燕萍,陈敏,等. 二丁二仙合剂质量标准的建立[J]. 中国药师,2018,21(2):331-333.
- [9] 蒋鹏娜,李星,王雪慧,等. 平喘颗粒质量标准研究[J]. 中华中医药杂志,2017,32(5):2132-2136.
- [10] GONG XC, HUANG SC, PAN JY, et al. Modeling of degradation kinetics of Salvianolic acid B at different temperatures and pH values[J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2017, 25(1):68-73.
- [11] 高丽. 原儿茶醛对顺铂引起的急性肾损伤的防治作用及相关机制研究[D]. 合肥:安徽医科大学,2018.
- [12] 任清松,李瑞婷,夏良锋,等. 丹参素对肾小管上皮细胞转分化的影响[J]. 黑龙江医药科学,2016,39(6):70-71.
- [13] 赵士治. 反相高效液相色谱法测定尿毒清颗粒(无糖型)丹参素和原儿茶醛含量[J]. 医药导报,2017,36(12):1402-1403.
- [14] 黄雨婷,沈夕坤,蒋斌,等. 丹参口服液制备工艺优化及稳定性研究[J]. 中南药学,2017,15(6):776-779.
- [15] 姚敏娜,刘德强,马宁,等. 扶正胶囊质量标准的提高[J]. 中国药师,2018,21(6):1086-1089.
- [16] 黄玮,姚强文,包明燕. 反相高效液相色谱法测定五子补肾强身丸中淫羊藿苷含量[J]. 中国药业,2018,27(23):26-28.

(收稿日期:2019-11-09)

测项目,而《欧洲药典》^[3]及《日本药典》^[4]均收载反相高效液相色谱法(RP-HPLC)检测相关蛋白项目,其中以《欧洲药典》使用范围最广。为提高我国生物制品标准,并与国际标准达到一致,本研究中采用9.0版《欧洲药典》中的方法,进行了色谱柱验证和方法确认,并对相关厂家重组人干扰素 $\alpha-2b$ 原液进行了相关蛋白检测和质量分析。为进一步完善该制品的质量标准提供依据,同时为今后该制品的监督管理提供参考。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

仪器:1260型液相色谱仪(包括DAD检测器,Agilent公司);Jupiter-C₁₈柱(Phenomenex公司),Zorbax 300SB-C₁₈柱(Agilent公司),XBridge BEH300-C₁₈柱(Waters公司),以上色谱柱规格均为(250 mm × 4.6 mm, 5 μ m)。液相色谱串联质谱,色谱仪 Waters Acquity UPLC H-Class, 色谱柱 Waters Acquity BEH300 C₄柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μ m), Triple TOF 5600型质谱仪(美国AB Sciex公司),数据分析软件 BioPharma View。

试剂:重组人干扰素 $\alpha-2b$ 原液(A厂家2批,B厂家3批,C厂家3批,D厂家5批,E、F、G厂家各3批,H厂家1批);三氟乙酸、乙腈为色谱纯,水为超纯水。

1.2 溶液制备

供试品溶液:供试品为来自国内8个厂家生产的23批重组人干扰素 $\alpha-2b$ 原液,取适量注射用水稀释至1 mg/mL。

参比品溶液:取供试品溶液适量,加入适量的0.25% (m/m) 过氧化氢溶液,使过氧化氢终浓度为0.05% (m/m),室温放置1 h,每1 mL溶液中加入

L-甲硫氨酸12.5 mg,室温放置1 h。

1.3 试验方法

色谱条件、系统适用性试验及判定标准:流动相为0.2%三氟乙酸30%乙腈溶液(A)-0.2%三氟乙酸80%乙腈溶液(B),线性洗脱程序(0 min时28%B,1 min时28%B,5 min时33%B,20 min时37%B,30 min时43%B,40 min时60%B,42 min时60%B,50 min时28%B);流速为1.0 mL/min;检测波长为210 nm;柱温为室温;进样体积为50 μ L。氧化峰与主峰的分离度不小于1.0,即为系统适用性试验合格。主峰保留时间约为20 min,氧化型峰的保留时间为主峰的0.9倍,在主峰保留时间的0.7~1.4间积分,单个杂质峰面积不得大于总积分面积的3.0%,各杂质峰面积的和不得大于总面积的5.0%。

液相色谱串联质谱:超高效液相色谱柱温:室温;质谱离子源为ESI源;质谱采集模式为TOF MS;扫描范围为700~3 000 m/z;扫描时间为1 s;离子源温度为350 $^{\circ}$ C;喷雾电压为5 500 V;DP电压为200 V。

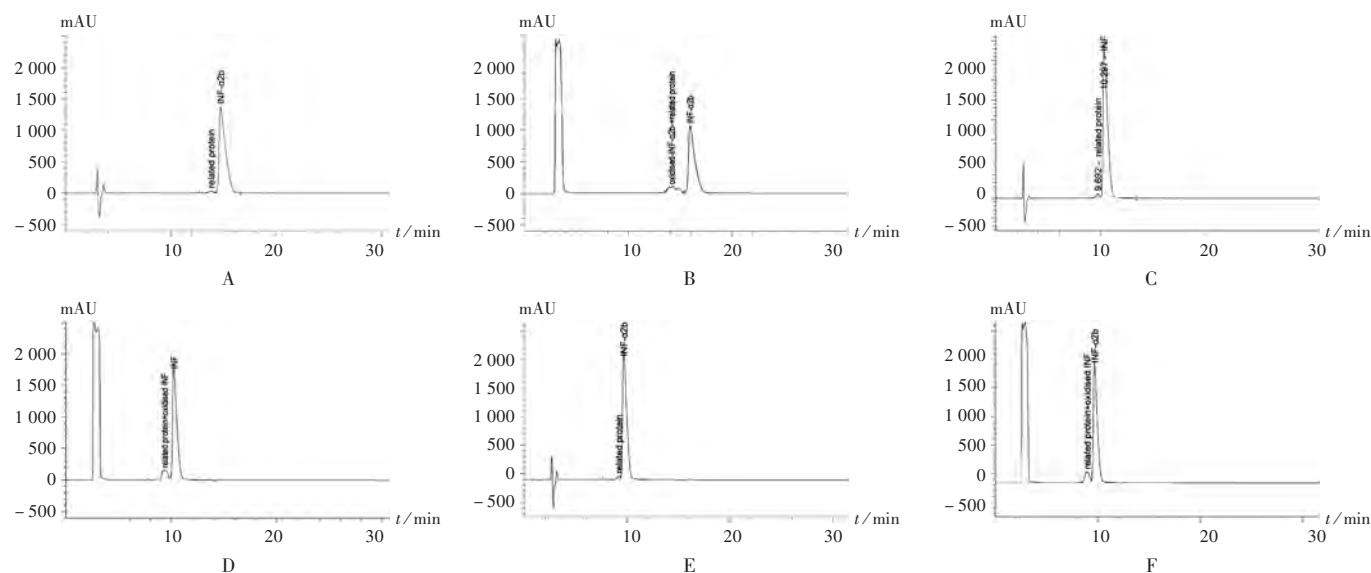
2 结果

2.1 色谱柱验证

采用终浓度为0.05% (m/m)的过氧化氢处理目的蛋白质诱导氧化,制成参比品溶液。3种不同C₁₈柱的色谱图显示,氧化干扰素保留时间与主峰保留时间之比均为0.9,主峰理论板数为2 800~3 000,氧化型峰与主峰的分离度约为1.0,除某公司的1根色谱柱略低(0.97)外,其他均满足系统适用性试验要求(见图1)。

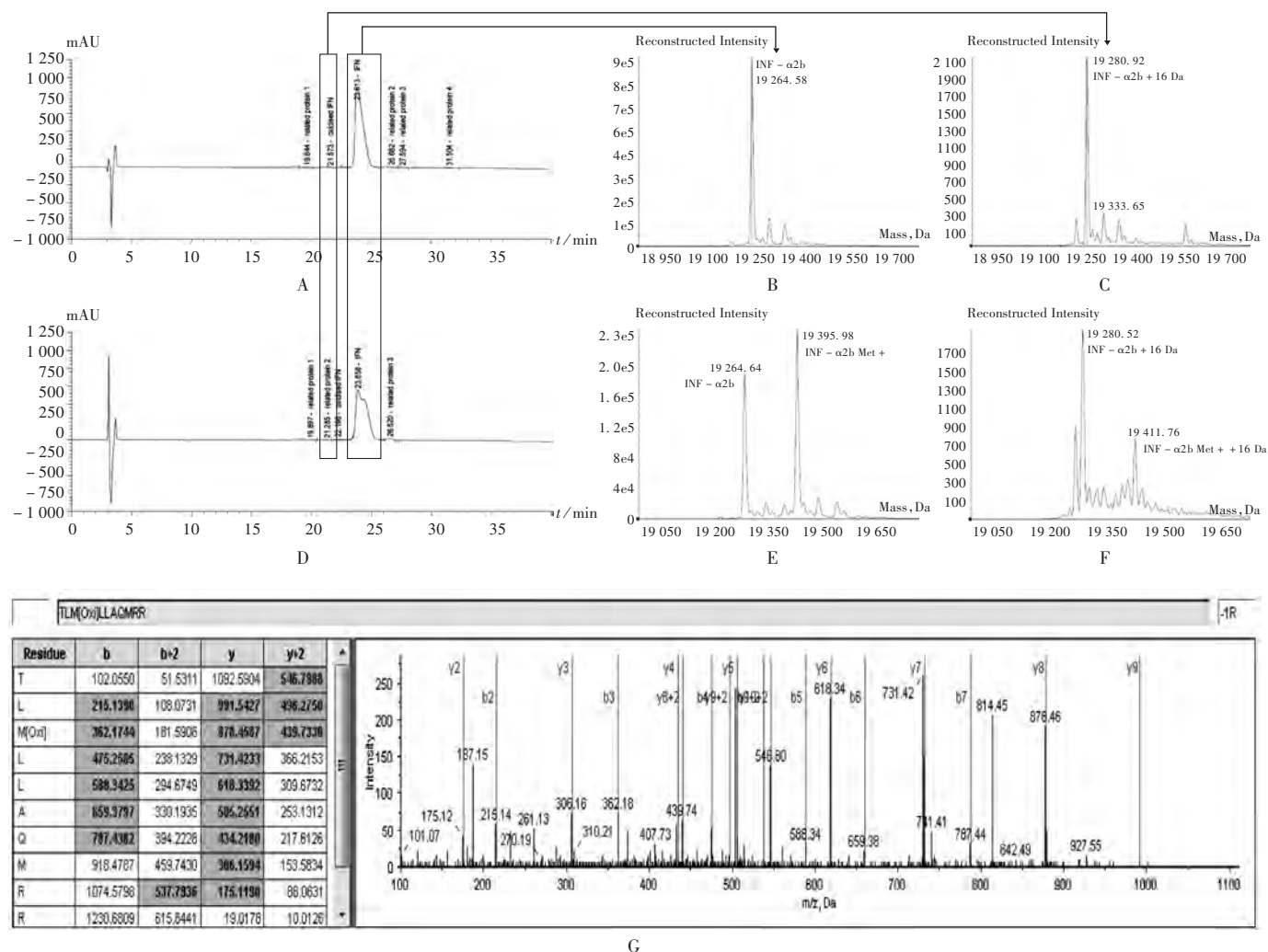
2.2 供试品色谱图及色谱峰成分

选用满足系统适用性试验要求的色谱柱进行供试



A. C. E. 供试品溶液 B. D. F. 参比品溶液(A, B为Phenomenex公司; C, D为Agilent公司; E, F为Waters公司)

图1 不同型号色谱柱高效液相色谱图



G

A, D. 色谱图, 主峰为单峰(A)或双峰(D) B, E. 主峰去卷积化图谱 C, F. 氧化峰去卷积化图谱 G. 第16位甲硫氨酸发生氧化的肽段二级谱图及匹配情况(可信度99%)

图2 重组人干扰素 α -2b相关蛋白反相高效液相色谱图及质谱解析

品溶液的检测。在主峰保留时间0.9处检出氧化型峰(见图2)。根据一级谱图计算得到主峰的相对分子质量为19 265.2, 与理论分子质量偏差在1内。氧化型峰通过去卷积计算得到其完整相对分子量为19 281.7, 比主峰分子量约大16。通过肽图分析, 检测到第16位甲硫氨酸位点发生氧化。色谱图显示, 主峰有单峰和双峰2种形式, 质谱解析单峰为IFN α -2b, 双峰为IFN α -2b和IFN α -2b+Met; 其相应氧化型分别为IFN α -2b+16 Da和IFN α -2b+16 Da, IFN α -2b+Met+16 Da。

2.3 供试品相关蛋白质量分析

结果见表1。按1.3项下判定标准, 8个厂家23批供试品中, 3个厂家的7批供试品不符合规定, 且单个杂质峰面积和各杂质峰面积的和这2个限值同时超标, 未出现仅有1个限值不符合规定的情况。供试品不合格率为30.43%, 不合格厂家数占总数的37.50%。虽然2家公司的C₁₈柱色谱峰分离度有区别, 但实际检测结果相似(见图3)。

表1 重组人干扰素 α -2b相关蛋白检测结果

样品编号	单一最大杂质(≤3.0%)	各杂质总和(≤5.0%)	测定结果	样品编号	单一最大杂质(≤3.0%)	各杂质总和(≤5.0%)	测定结果
A-1	0.2	0.8	合格	D-5	1.6	2.2	合格
A-2	0.7	1.2	合格	E-1	0.8	1.4	合格
B-1	0.9	2.4	合格	E-2	1.5	2.0	合格
B-2	1.3	3.5	合格	E-3	1.2	1.9	合格
B-3	1.0	2.4	合格	F-1	23.0	26.5	不合格
C-1	0.6	1.9	合格	F-2	23.8	25.2	不合格
C-2	0.7	2.3	合格	F-3	21.3	22.9	不合格
C-3	0.6	1.4	合格	G-1	24.5	41.2	不合格
D-1	1.2	1.2	合格	G-2	17.2	31.1	不合格
D-2	1.1	1.7	合格	G-3	26.6	52.0	不合格
D-3	1.3	1.6	合格	H-1	15.16	21.5	不合格
D-4	1.5	2.1	合格				

3 讨论

大部分生物技术类制品是由活的生物体合成, 存在固有程度的结构异质性; 另外, 在生产、原材料和/或产

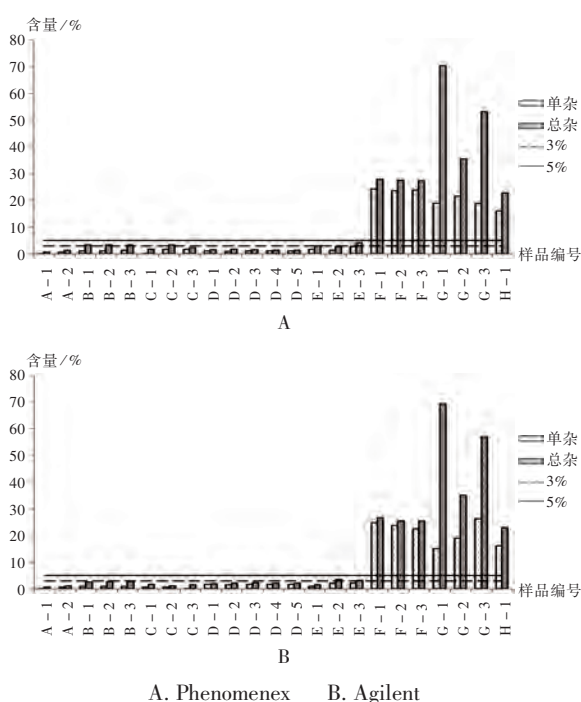


图3 重组人干扰素 α -2b相关蛋白检测结果

品贮存过程中也会产生异质性。生物技术类制品纯度分析理念经从主药成分转变到相关物质和杂质分析,说明分析方法的选择和优化主要应考虑因素为预期产品与产品相关物质和杂质的分离。另外,生物技术产品和生物制品的绝对纯度难以测得,对测定方法有一定的挑战性,且所得结果与所用方法密切相关。因此,国际人用药注册技术协调会(ICH)协调三方指南Q6A和Q6B指导原则中指出,纯度一般应采用多种方法综合评估。应尽量根据蛋白质不同的理化特性,选择原理不同的多种检测方法,相互补充进行分析。

当重组蛋白发生氧化、脱酰胺、异构化、成盐、末端氨基酸降解、二硫键错配等化学性改变时,分子量无或仅有微小的变化,使用分子排阻色谱或凝胶电泳难以分离^[5-7]。本研究中按9.0版《欧洲药典》规定,利用RP-HPLC法检测重组人干扰素 α -2b的相关蛋白,可操作性、重复性和实用性均良好,但需注意色谱柱的系统适用性。

研究证实,我国大部分重组人干扰素 α -2b原液中含有氧化型峰。蛋白质氧化是由活性氧诱导的氨基酸的化学性共价修饰,可能降低蛋白质生物活性,促进蛋白分子聚集,增加免疫原性,促进蛋白水解等^[8-10]。按《欧洲药典》判定标准进行

质量分析,供试品不合格率为30.43%。其中,3个厂家的所有批次均不符合规定,但未出现某个厂家某个别批次不符合规定的情况,表明与供试品的生产工艺密切相关。同时,对同一批样品不同时间的稳定性考察中发现,氧化型峰成分可能随时间的延长而增加。因此,监测蛋白质氧化在生物制药行业中对于制造、表征和质量控制变得至关重要。

本研究中70%的产品符合规定,表明我国重组人干扰素大部分产品的质量均符合国际先进标准要求。建议将重组人干扰素的RP-HPLC法相关蛋白检测纳入下一版《中国药典》。部分厂家应改进生产工艺,提高产品质量。既适合目前我国国情,又可使我国标准与国际标准接轨,以整体提高我国重组人干扰素的质量水平,并对其他重组制品质量标准提高也起到一定导向作用。

参考文献:

- [1] PESTKA S. The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn[J]. J Biol Chem, 2007, 282(28): 20047 - 20051.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(三部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 307 - 308.
- [3] EUROPEAN PHARMACOPOEIA COMMISSION. European Pharmacopoeia 9.0[M]. Strasbourg: European Directorate Health Care, 2015: 2780 - 2782.
- [4] THE MINISTRY OF HEALTH, LABOUR AND WELFARE. The Japanese Pharmacopoeia XVII[M]. 东京: 株式会社じほう, 2016: 1071 - 1074.
- [5] 裴德宁, 丁有学, 郭莹, 等. 重组人干扰素 α 1b注射剂评价性抽验结果与质量分析[J]. 药物评价研究, 2017, 40(3): 341 - 344.
- [6] 裴德宁, 郭莹, 李永红, 等. 重组人干扰素 α 2a注射剂评价性抽验结果与质量分析[J]. 中国药师, 2015, 18(1): 52 - 55.
- [7] 丁有学, 裴德宁, 李永红, 等. 2013年重组人干扰素 α 2b注射剂评价性抽验质量分析[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(36): 7160 - 7164.
- [8] REGL C, WOHLISCHLAGER T, HOLZMANN J, et al. A Generic HPLC Method for Absolute Quantification of Oxidation in Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion Proteins Using UV and MS Detection [J]. Anal Chem, 2017, 89(16): 8391 - 8398.
- [9] WANG W, IGNATIUS AA, THAKKAR SV. Impact of residual impurities and contaminants on protein stability [J]. J Pharm Sci, 2014, 103(5): 1315 - 1330.
- [10] SHAH DD, SINGH SM, MALLELA KMG. Effect of Chemical Oxidation on the Higher Order Structure, Stability, Aggregation, and Biological Function of Interferon Alpha - 2a: Role of Local Structural Changes Detected by 2D NMR [J]. Pharm Res, 2018, 35(12): 232 - 235.

(收稿日期: 2019 - 10 - 29; 修回日期: 2019 - 12 - 25)

本栏目由

国药控股云南有限公司

协办

白分子聚集, 增加免疫原性, 促进蛋白水解等^[8-10]。按《欧洲药典》判定标准进行