

国产重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子原液中制品相关蛋白的定性定量分析*

陶磊, 韩春梅, 刘兰, 史新昌**, 饶春明**

(中国食品药品检定研究院, 卫生部生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室, 北京 100050)

摘要 目的: 分析鉴定国产重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子原液中的制品相关蛋白, 为《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)标准提高提供依据。**方法:** 采用欧洲药典方法测定所征集的样品中制品相关蛋白的含量; 采用液相质谱联用法对制品相关蛋白进行鉴定, 色谱柱为 Waters BEH300 C₄ (2.1 mm × 150 mm, 1.7 μm), 以 0.1% 的三氟乙酸水溶液 (A)-0.1% 的三氟乙酸 90% 乙腈溶液 (B) 为流动相, 梯度洗脱, 流速 0.2 mL · min⁻¹。质谱仪采用 Waters 公司 Xevo G2-S 质谱仪, 正离子电喷雾离子源, 毛细管电压 3.0 kV, Cone 电压 40 V, 去溶剂气体温度 350 °C, 去溶剂气体流速 800 L · h⁻¹, 扫描范围 (*m/z*): 500~3 000。**结果:** 对 4 家生产企业的 7 批原液进行了检测, 其中 3 家企业的 5 批原液符合欧洲药典标准, 2 家企业的 2 批原液不符合欧洲药典标准; 相对分子质量测定结果显示, 样品中普遍存在的制品相关蛋白为氧化形式及乙酰化形式, 个别批次中存在相对分子质量不一的肽段。**结论:** 本次征集的样品有 71% 符合欧洲药典标准, 可以考虑将制品相关蛋白检测纳入新版《中国药典》, 以提高国产重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子的产品质量。

关键词: 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子; 制品相关蛋白; 原液; 欧洲药典; 质量标准

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2018) 11-1875-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.11.04

Identification and quantification of product-related proteins in the bulk of recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor produced in China*

TAO Lei, HAN Chun-mei, LIU Lan, SHI Xin-chang**, RAO Chun-ming**

(National Institutes for Food and Drug Control, Key Laboratory of Ministry of Health for Research on Quality and Standardization of Biotech Products, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To quantify and identify the product-related proteins in the bulk of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (rhGM-CSF) produced in China, and to provide the basis for

* 药品医疗器械审评审批制度改革专项课题 (ZG2017-3-02); 十三五科技重大专项课题“生物类似药质量相似性评价体系建设研究” (2015ZX09501008)

** 通信作者 饶春明 Tel: (010) 67095380; E-mail: raocm@nicpbp.org.cn

史新昌 Tel: (010) 67095604; E-mail: shixc@nifdc.org.cn

第一作者 陶磊 Tel: (010) 67095586; E-mail: taolei01@nifdc.org.cn

韩春梅 Tel: (010) 67095604; E-mail: hanem@nifdc.org.cn

improving the standard of Chinese Pharmacopoeia. **Methods:** The European Pharmacopoeia (EP) method was applied to determine the content of product-related proteins in the collected samples. Mass spectrometry combined with ultra performance liquid chromatography was used for the identification. The chromatographic separation was carried out on a Waters BEH300 C₄ column (2.1 mm × 150 mm, 1.7 μm) with the mobile phase consisting of water containing 0.1% trifluoroacetic acid (A)–water containing 0.1% trifluoroacetic acid and 90% acetonitrile (B) in a gradient mode at the flow rate of 0.2 mL · min⁻¹. The mass spectra were obtained by Waters Xevo G2-S mass spectrometer with electrospray ionization source in positive mode. The capillary voltage was 3 kV; Cone voltage was 40 V; the gas temperature was 350 °C; the gas flow was 800 L · h⁻¹ and mass scan range (*m/z*) was 500~3 000. **Results:** 7 lots of bulk produced by 4 manufacturers were analyzed. 5 lots produced by 3 manufacturers met the EP standard, and the other 2 lots produced by 2 manufacturers were substandard. Results of relative molecular weights showed that the most common product-related proteins were formed by oxidation and acetylation, and peptides with different relative molecular weights were only found in 2 batches. **Conclusion:** As shown in this study, 71% of the collected samples met EP standard. It is reasonable to incorporate the EP method into the new version of Chinese Pharmacopoeia in order to improve the quality of domestic rhGM-CSF.

Keywords: granulocyte-macrophage colony stimulating factor; product-related protein; bulk; European Pharmacopoeia; quality standard

粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) 于 1977 年被发现^[1], 1985 年人 GM-CSF 的 cDNA 克隆成功^[2]。GM-CSF 由 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞等细胞生成, 主要参与粒细胞系和单核细胞系细胞的维持存活、促进生长、诱导分化和增强功能等生物学作用。GM-CSF 由 127 个氨基酸组成, 相对分子质量为 14 474, 含有 2 条二硫键 (Cys54-Cys96, Cys88-Cys121)。1991 年, 酵母表达的重组人 GM-CSF (rhGM-CSF) 被 FDA 批准上市, 用于骨髓移植后的白细胞恢复。国内同类制品于 1998 年被批准上市, 由大肠杆菌表达生产, 疗效与进口产品无显著差别^[3]。

2005 年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)三部已纳入“注射用重组人粒细胞巨噬细胞刺激因子”各论, 检定项目涉及理化性质、纯度、杂质、活性等, 但缺少制品相关蛋白检测^[4]。所谓制品相关蛋白即是在重组蛋白生产和存放过程中发生修饰、降解或聚集等形成的一类物质, 这类物质的形成可影响重组蛋白药物的安全性和有效性。目前现行版《中国药典》仍缺少制品相关蛋白检测^[5], 为促进药典标准提高, 国家药典委员会立项“重组细胞因子类制品质量标准提高研究”课题, 拟将制品相关蛋白检测项目加入该制品各论中, 中国食品药品检定研究

院与重庆市食品药品检验检测研究院共同承担了该课题的研究工作。

通过对比国外主流药典, 发现仅有欧洲药典及英国药典收载该品种的制品相关蛋白检测项目^[6-7], 两者方法一致, 因此本研究按该方法对征集的国产 rhGM-CSF 原液进行了分析, 并用液相质谱联用的方法对分离的制品相关蛋白进行了鉴定, 以期为《中国药典》标准的提高提供依据。

1 材料

1.1 试剂

超纯水为密理博超纯水机制备; 乙腈为色谱纯, 购自 Fisher Scientific 公司; 三氟乙酸、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司; 牛血白蛋白 (BSA) 购自 Calbiochem 公司; rhGM-CSF 原液来自我国 4 家生产企业, 共 7 批 (编号: 1-1/1-2/1-3, 2-1/2-2, 3-1, 4-1); 选取企业 1 的批次 1 (1-1) 作为标准品。

1.2 仪器

Waters Alliance 2690 高效液相色谱仪与 996 紫外检测器 (Waters 公司); Acquity UPLC-Xevo G2-S 液相质谱联用仪 (Waters 公司)。

2 方法

2.1 按欧洲药典方法^[6]进行制品相关蛋白含量分析
样品处理: 待检原液用 0.05 mol · L⁻¹ 磷酸盐缓冲

液 (pH 7.0) 稀释至 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 即为供试品溶液; 标准品用 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 稀释至 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 即为标准品溶液 a; 另将 1 体积的标准品溶液 a 与 4 体积的 $0.125 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ BSA 溶液混匀, 制备标准品溶液 b。

色谱条件: 色谱柱为 Jupiter C_4 300 Å ($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); 以 0.1% 的三氟乙酸水溶液 (A) -0.1% 的三氟乙酸 90% 乙腈溶液 (B) 为流动相, 梯度洗脱 (0~30 min, 64% A \rightarrow 44% A); 流速 $1.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样体积 $100 \mu\text{L}$, 供试品溶液各进样 3 次, 标准品溶液 a 进样 2 次, 标准品溶液 b 进样 4 次; 检测波长: 214 nm 。在 (5~30) min 范围内进行积分, 记录各峰保留时间及峰面积百分比。

2.2 液相质谱联用鉴定制品相关蛋白

色谱柱为 Waters BEH300 C_4 ($2.1 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$, $1.7 \mu\text{m}$); 流速: $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样体积: $30 \mu\text{L}$, 样品处理及其他液相色谱仪参数同“2.1”项, 质谱仪采用 MS 模式采集数据; 毛细管电压: 3.0 kV ; Cone 电压: 40 V ; 去溶剂气体温度: $350 \text{ }^\circ\text{C}$; 源温: $120 \text{ }^\circ\text{C}$; 去溶剂气体流速: $800 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, 扫描范围 (m/z): $500 \sim 3000$; 采用 Unify 操作软件进行数据处理。

3 结果

3.1 系统适用性测定结果

欧洲药典所列方法的系统适用性要求是: 标准品溶液 b 中 rhGM-CSF 的保留时间大约为 22 min; 4 针连续进样的峰面积 RSD 不高于 5.0%; BSA 与 rhGM-CSF 的分离度不小于 2。测定结果: 进样 4 针标准品溶液 b 测得 rhGM-CSF 的保留时间为 (22.5 ± 0.1) min; 峰面积的 RSD 为 0.11%; BSA 与 rhGM-CSF 的分离度为 5.73 ± 0.02 , 标准品溶液 b 的色谱图见图 1。测定结果满足该方法的系统适用性要求。

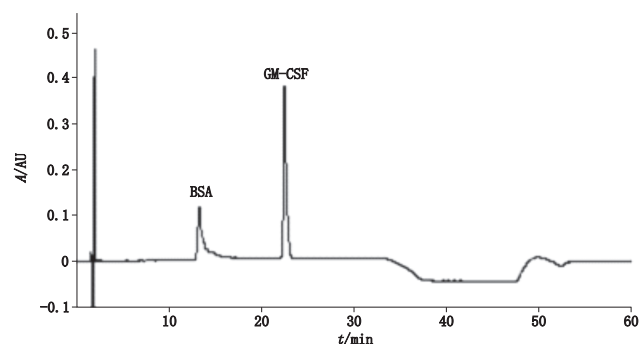


图 1 标准品溶液 b 的色谱图

Fig. 1 Chromatography of standard solution b

3.2 制品相关蛋白含量检测结果

按欧洲药典所列方法, 对国内 4 家生产企业的 7 批 rhGM-CSF 原液进行了检测。根据欧洲药典的判定标准: 供试品溶液中任何杂质不超过 1.5%; 在 (5~30) min 范围内进行积分, 杂质总量不超过 4%, 3 家企业生产的 5 批原液符合规定, 2 家企业生产的 2 批原液不符合规定 (见表 1)。

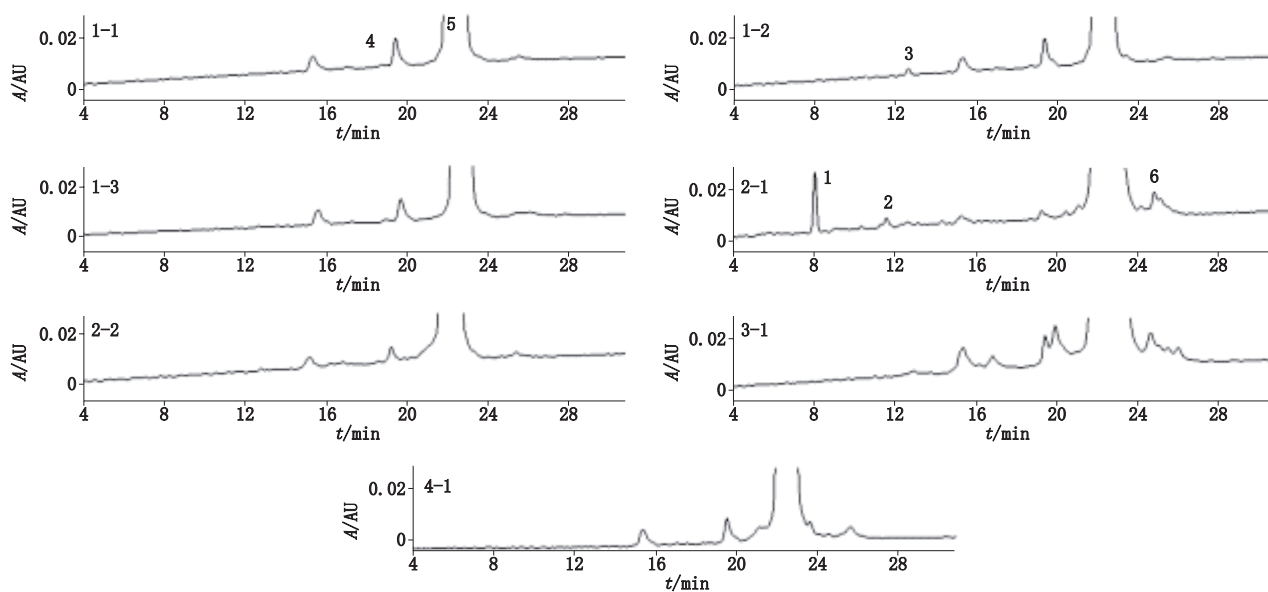
表 1 国产 rhGM-CSF 原液
制品相关蛋白含量测定结果

Tab. 1 Contents of product-related proteins in
rhGM-CSF bulks produced in China

样品 (sample)	总含量 (total content) / %		最大组分含量 (maximum component) %		测定结果 (result)
	平均值 (mean)	SD	平均值 (mean)	SD	
	1-1	1.69	0.03	0.62	
1-2	1.71	0.21	0.61	0.02	合格 (pass)
1-3	1.80	0.65	0.50	0.01	合格 (pass)
2-1	6.40	1.35	1.13	0.02	不合格 (fail)
2-2	1.85	0.32	0.45	0.09	合格 (pass)
3-1	6.80	0.42	1.82	0.10	不合格 (fail)
4-1	2.65	0.08	0.74	0.01	合格 (pass)

3.3 不同样品中制品相关蛋白的组成比较

通过对比各批次原液的制品相关蛋白组成情况, 发现有些制品相关蛋白为某批次原液所特有, 如图 2 中的峰 1~3; 有些在多批原液中普遍存在, 如峰 4~6。通过质谱对以上各峰进行了相对分子质量的测定, 结果显示: 峰 1~3 为相对分子质量不等的肽段; 峰 4 与峰 5 为氧化形式 (氧化后理论相对分子质量为 $14\ 620.75$); 峰 6 为乙酰化形式 (乙酰化后理论相对分子质量为 $14\ 646.79$), 相对分子质量测定结果见图 3。



1. 相对分子质量为 2 385.08 的多肽 (peptide with relative molecular weight of 2 385.08) 2. 相对分子质量为 2 428.10 的多肽 (peptide with relative molecular weight of 2 428.10) 3. 相对分子质量为 845.46 的多肽 (peptide with relative molecular weight of 845.46) 4. 氧化型 GM-CSF (oxidized GM-CSF) 5. 氧化型 GM-CSF (oxidized GM-CSF) 6. 乙酰化型 GM-CSF (acetylated GM-CSF)

图 2 各批次原液的制品相关蛋白组成色谱图

Fig. 2 Chromatograms of constituents of product-related proteins in different lots of bulks

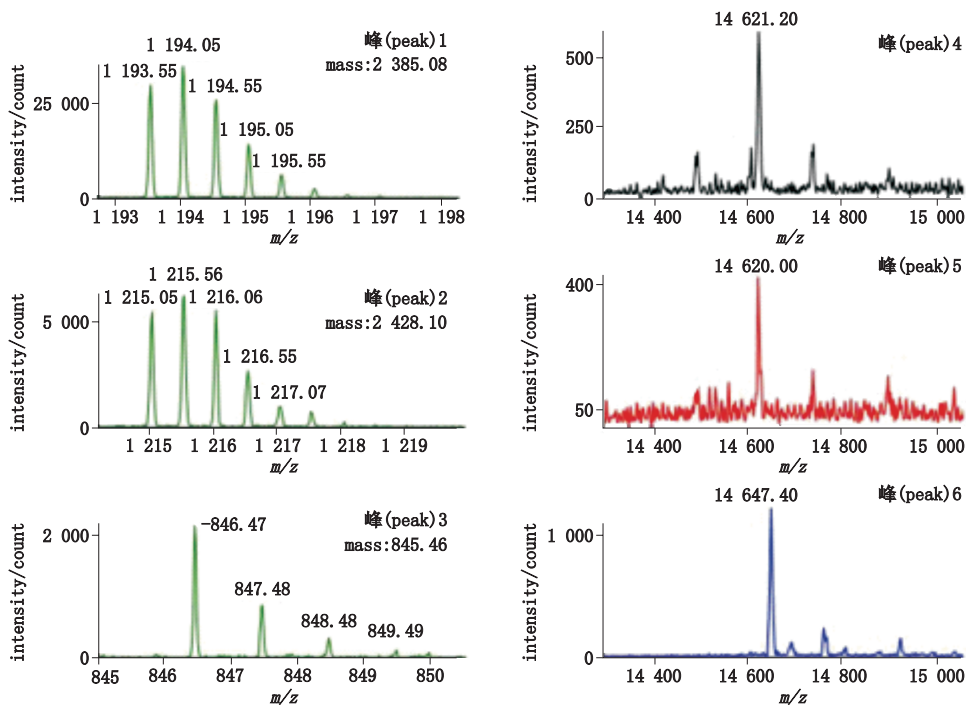


图 3 质谱测定各制品相关蛋白的相对分子质量

Fig. 3 Relative molecular weights of different product-related proteins measured by mass spectrometry

3.4 主峰中蛋白相对分子质量的测定

采用液质联用的方式对主峰中的蛋白相对分子质量进行了测定(图 4),结果发现:主峰中的蛋白成

分并不均一,其中绝大部分为完整的 rhGM-CSF 分子(理论相对分子质量为 14 604.75),还存在部分 N-末端缺少“Met”的蛋白(理论相对分子质量为

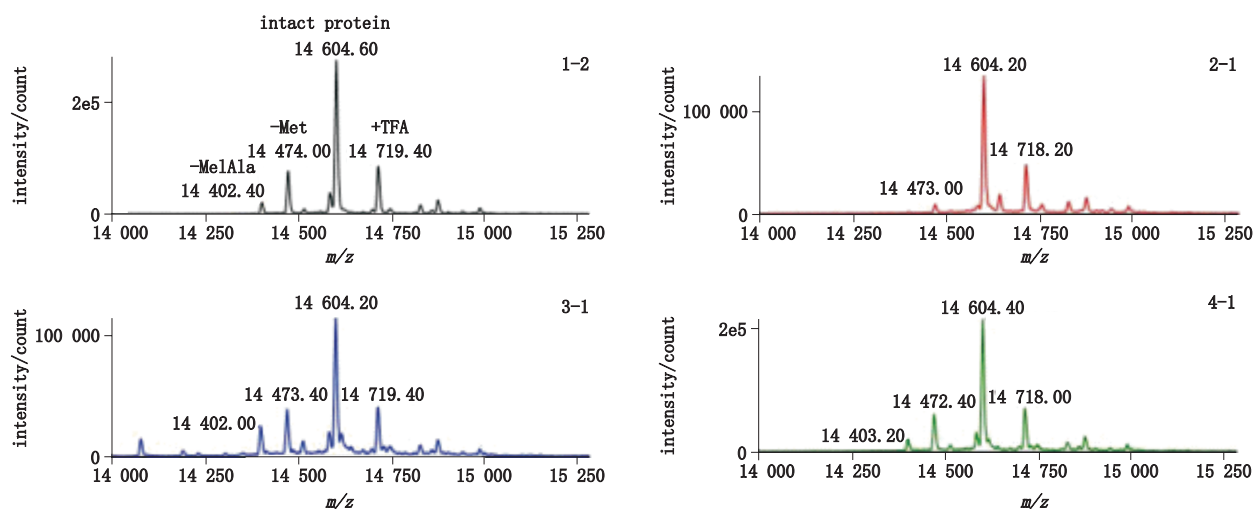


图4 质谱测定主峰中蛋白相对分子质量

Fig. 4 Relative molecular mass of proteins in the main peak measured by mass spectrometry

14 473.56) 以及 N- 末端缺少“MetAla”的蛋白(理论相对分子质量为 14 402.48)。除此之外,还有一定数量的相对分子质量为 14 719 左右的蛋白,经分析为完整蛋白与流动相中的三氟乙酸(TFA)加合形成,该加合物的理论相对分子质量为 14 718.78。

4 讨论

天然 GM-CSF 存在糖基化修饰^[8], FDA 批准的原研药 Sargramostim 采用酵母系统表达,也存在糖基化修饰,其制品是由含不同类型糖基的 rhGM-CSF 组成的混合物^[9]。与原研药不同,国产 rhGM-CSF 一般通过大肠杆菌表达生产,由于该表达系统自身的特点,所生产的蛋白没有糖基化修饰。研究显示,糖基化程度不影响 GM-CSF 的生物学活性^[10-11],甚至有报道证明大肠杆菌表达的非糖基化 GM-CSF 比真核系统表达的糖基化 GM-CSF 有更高的生物学活性^[12]。

大肠杆菌表达的蛋白还有另外一个特点: N- 末端一般带有蛋氨酸^[13-14],所以国产 rhGM-CSF 由 128 个氨基酸组成,理论相对分子质量为 14 604.75。本研究通过对主峰蛋白相对分子质量的测定发现: 各厂家的产品以 N- 末端含有蛋氨酸的 GM-CSF 为主,此外还存在不同比例的 N- 末端缺失 1~2 个氨基酸的 GM-CSF。N- 末端氨基酸的缺失对该蛋白的疏水性影响不大,所以在本研究中未能通过液相分离。有研究显示, GM-CSF N- 末端的 1~13 位氨基酸的去除对活性没有明显影响,而 14~25 位氨基酸,特别是 16~18 位氨基酸残基对保持生物学活性是至关重要

的^[15]。N- 末端缺失 1~2 个氨基酸残基的 GM-CSF 的存在可能跟生产工艺有关,它们可以作为目标产品的一部分而不是制品相关蛋白。

本研究在样品 1-2 及 2-1 中发现有相对分子质量不等的肽段出现,而在同一厂家生产的其他批次里未发现相应肽段。这些肽段的出现可能与生产工艺的细微变化有关,也可能在产品放置过程中形成,具体原因还有待进一步的分析。研究还发现, rhGM-CSF 普遍存在的制品相关蛋白是氧化形式及乙酰化形式,这在其他大肠杆菌表达的蛋白中也比较常见^[16]。不同企业由于生产工艺的差异,相应蛋白的含量也高低不同,为提高产品的质量,生产企业应针对性的优化生产工艺及保存条件,减少相关蛋白的含量。

本研究利用欧洲药典方法,对 4 家企业生产的 7 批 rhGM-CSF 原液进行了制品相关蛋白含量的测定,结果 5 批符合欧洲药典要求,合格率为 71%,可以考虑将制品相关蛋白含量项目纳入新版药典各论中,以提高产品质量。

参考文献

- [1] SHAH RG, CAPORALE LH, MOORE MA. Characterization of colony-stimulating activity produced by human monocytes and phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes [J]. *Blood*, 1977, 50 (5): 811
- [2] WONG GG, WITEK-GIANNOTTI JS, TEMPLE PA, *et al.* Isolation of cDNAs encoding human and gibbon GM-CSF [J]. *Prog Clin Biol Res*, 1985, 191: 351

- [3] 胡善联, 沈志祥, 袁弥满, 等. 国产与进口重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子药物经济学评价比较 [J]. 中国新药与临床杂志, 2000, 19 (4): 309
HU SL, SHEN ZX, YUAN MM, *et al.* Pharmacoeconomic study on domestic and imported rHu GM-CSF product [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem*, 2000, 19 (4): 309
- [4] 中华人民共和国药典 2005 年版. 三部 [S]. 2005: 236
ChP 2005. Vol III [S]. 2005: 236
- [5] 中华人民共和国药典 2015 年版. 三部 [S]. 2015: 343
ChP 2015. Vol III [S]. 2015: 343
- [6] EP 9. 3 [S]. 2017: 5719
- [7] BP 2015. Vol II [S]. 2015: 304
- [8] GRIFFIN JD, CANNISTRA SA, SULLIVAN R, *et al.* The biology of GM-CSF: regulation of production and interaction with its receptor [J]. *Int J Cell Cloning*, 1990, 8 (Suppl 1): 35
- [9] USP 40 [S]. 2016: 6108
- [10] HUSSEIN AM, ROSS M, VREDENBURGH J, *et al.* Effects of granulocyte-macrophage colony stimulating factor produced in Chinese hamster ovary cells (regramostim), *Escherichia coli* (molgramostim) and yeast (sargramostim) on priming peripheral blood progenitor cells for use with autologous bone marrow after high-dose chemotherapy [J]. *Eur J Haematol*, 1995, 55 (5): 348
- [11] KIM J, PARK H, PARK BT, *et al.* O-glycans and O-glycosylation sites of recombinant human GM-CSF derived from suspension-cultured rice cells, and their structural role [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 479 (2): 266
- [12] CEBON J, NICOLA N, WARD M, *et al.* Granulocyte-macrophage colony stimulating factor from human lymphocytes. The effect of glycosylation on receptor binding and biological activity [J]. *J Biol Chem*, 1990, 265 (8): 4483
- [13] AHSAN F, ARIF A, MAHMOOD N, *et al.* Characterization and bioassay of post-translationally modified interferon α -2b expressed in *Escherichia coli* [J]. *J Biotechnol*, 2014, 184: 11
- [14] PIATKOV KI, VU TT, HWANG CS, *et al.* Formyl-methionine as a degradation signal at the N-termini of bacterial proteins [J]. *Microb Cell*, 2015, 2 (10): 376
- [15] CLARK-LEWIS I, LOPEZ AF, TO LB, *et al.* Structure-function studies of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Identification of residues required for activity [J]. *J Immunol*, 1988, 141 (3): 881
- [16] AHSAN F, GARDNER QA, RASHID N, *et al.* Preventing the N-terminal processing of human interferon α -2b and its chimeric derivatives expressed in *Escherichia coli* [J]. *Bioorg Chem*, 2018, 76: 294

(本文于 2018 年 9 月 1 日收到)