

## 重组人 C1 酯酶抑制剂中聚合物含量的测定<sup>\*</sup>

韩春梅, 姚文荣, 丁有学, 于雷, 陶磊, 秦玺<sup>\*\*</sup>, 饶春明<sup>\*\*</sup>

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

**摘要** 目的: 建立分析重组人 C1 酯酶抑制剂 (rhC1INH) 中聚合物含量的分子排阻高效液相色谱 (SEC-HPLC) 方法。方法: rhC1INH 稀释后, 采用 TSK GEL3000SW 色谱柱, 214 nm 检测波长对其聚合物进行检测, 以 250 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液 (pH 6.8) 为流动相, 流速 0.5 mL·min<sup>-1</sup> 进行洗脱。结果: 在 25.0~85.0 μg·mL<sup>-1</sup> 浓度范围内, rhC1INH 标准品的峰面积与浓度的线性关系良好 ( $R^2$  平均值为 0.997)。rhC1INH 样品中分离到 3 个聚合物峰, 采用面积归一法计算 6 次进样的聚合物的平均含量分别为 0.11%、0.15% 和 0.60%, RSD 分别为 10.7%、9.0% 和 3.9%。4 批次 rhC1INH 样品中总聚合物的含量分别为 0.82%、1.01%、0.97% 和 0.92%。结论: SEC-HPLC 方法适用于 rhC1INH 中聚合物的检测, 为其聚合物质量标准的建立和产品评价奠定了基础。  
**关键词:** 重组人 C1 酯酶抑制剂 (rhC1INH); 分子排阻高效液相色谱 (SEC-HPLC); 聚合物含量; 质量控制; 生物技术药物

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2018) 11-1917-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.11.11

## Determination of aggregates protein in recombinant human C1 esterase inhibitor ( rhC1INH )<sup>\*</sup>

HAN Chun-mei, YAO Wen-rong, DING You-xue, YU Lei,

TAO Lei, QIN Xi<sup>\*\*</sup>, RAO Chun-ming<sup>\*\*</sup>

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

**Abstract Objective:** To develop a size-exclusion high performance liquid chromatograph (SEC-HPLC) for determination of the aggregates protein in recombinant human C1 esterase inhibitor (rhC1INH). **Methods:** The rhC1INH samples were diluted with mobile phase and separated on a column of TSK GEL3000SW column. The mobile phase was 250 mmol·L<sup>-1</sup> phosphate buffer (pH 6.8), the flow rate was 0.5 mL·min<sup>-1</sup>, and detection wavelength was 214 nm. **Results:** The peak area of rhC1INH standard showed a good liner relationship with the concentration over the range of 25.0~85.0 μg·mL<sup>-1</sup> (the mean  $R^2=0.997$ ). Three aggregate peaks were isolated from rhC1INH,

\* 药品医疗器械审评审批制度改革专项课题: 重组细胞因子类制品质量标准提高 (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@nifdc.org.cn

秦玺 Tel:(010)67095359; E-mail: qinxi@nifdc.org.cn

第一作者 韩春梅 Tel:(010)67095604; E-mail: hanchunmei@nifdc.org.cn

姚文荣 Tel:(010)67095359; E-mail: yz1322@126.com

and the mean contents of three peaks were 0.11%, 0.15% and 0.60%, with RSD of 10.7%, 9.0% and 3.9%, respectively. The total aggregates in four batches of rhC1INH were 0.82%, 1.01%, 0.97% and 0.92%, respectively.

**Conclusion:** The SEC-HPLC revealed a feasible detection for the rhC1INH aggregates, and provided basis for establishment of aggregates-related quality standards and product evaluation.

**Keywords:** recombinant human C1 esterase inhibitor (rhC1INH); size-exclusion high performance liquid chromatograph (SEC-HPLC); content of aggregates; quality control; biopharmaceuticals

C1 酯酶抑制剂 (C1 esterase inhibitor, C1INH) 是 1957 年在血浆中发现的热敏感物质, 属于丝氨酸蛋白酶抑制剂 (Serpins) 超家族<sup>[1-3]</sup>。人的 C1INH 是由肝脏细胞合成并存在于血浆中的糖蛋白, 在调控血管稳态中具有重要的作用。C1INH 主要抑制补体级联 (C1s、C1r 和 MASP2)、接触激活途径 (激肽释放酶和凝血因子 X II a)、内源性凝血酶 (凝血因子 X I a) 和纤溶蛋白酶 (血纤维蛋白溶酶和组织纤溶酶原激活物) 的活性<sup>[3-7]</sup>。当 C1INH 基因缺陷 / 变异、C1INH 缺乏或功能降低时, 补体和接触激活途径被激活, 不能充分地抑制接触激活途径, 从而引起缓激肽的上调表达, 最终导致皮肤和粘膜部位血管内容物渗出, 形成局部水肿, 这是引起遗传性血管性水肿 (Hereditary Angioedema, HAE) 的直接原因<sup>[4-5]</sup>。HAE 是致命的, 国际上推荐 C1INH 浓缩剂为 HAE 患者急性发作的首选治疗方案<sup>[8-10]</sup>。

目前, 美国或欧洲批准上市的 C1INH 主要是血浆来源的 Berinert、Cetor、Cinryze、Haegarda 浓缩剂和分泌自转基因兔乳汁中的重组人 C1 酯酶抑制剂 (recombinant human C1 esterase inhibitor, rhC1INH) 类似物 Ruconest。Ruconest 于 2010 年和 2014 年分别在欧盟和美国获准上市, 适用于成人和青少年 HAE 患者急性发作的治疗<sup>[9-14]</sup>。家兔乳汁纯化后的 rhC1INH 为单体结构, 相对分子质量 (约 98 k) 和糖基化程度均低于天然 C1INH, 抑制活性与血浆来源的 C1INH 一致<sup>[11, 14-15]</sup>。

2015 年 10 月, 欧洲药典首次收录了人血浆来源 C1INH 的质量控制标准<sup>[11]</sup>。尽管 rhC1INH 已经在欧盟和美国上市, 药典并没有纳入其质量控制标准, 更没有聚合物的检测方法和限度要求。聚合物与药物的结构相同, 其形成可以发生在生产 / 纯化工艺、存储、运输等过程中, 二硫键、疏水性、pH、离子强度、表面活性剂和温度等条件的改变是蛋白质聚合的诱因。聚合物能够影响药物的生物活性、体内药代动力学和免疫原性, 引起机体的免疫反应, 最终可能会影响药物的有效性和安全性<sup>[16-18]</sup>。因此, 在重组蛋白

药物的质量控制中, 研究者要建立合适的分析方法对聚合物进行鉴别, 并确定产品中聚合物的限度, 确保药物的安全性和有效性<sup>[17]</sup>。

本研究建立了 rhC1INH 聚合物含量的分子排阻高效液相色谱 (SEC-HPLC) 测定方法, 并对 4 批次成品进行测定, 为 rhC1INH 聚合物的质量控制提供了重要的依据。

## 1 仪器与试剂

高效液相色谱仪 (Waters, 2659 分离器, 2487/2489 紫外检测器, Empower 工作站); TSK GEL3000SW 色谱柱 (TOSOH, 5  $\mu\text{m}$ , 7.8 mm  $\times$  300 mm)。

rhC1INH 对照品 (科室留存); 凝胶过滤对照品 (Biorad, 151-1901); 流动相 (250 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液, pH 6.8); 超纯水 (Millipore, Mili-Q Advantage 超纯水系统)。

4 批次 rhC1INH 样品 (S1、S2、S3 和 S4, 科室留存, 其中 S1 用于 SEC-HPLC 方法学验证)。

## 2 方法

### 2.1 溶液制备

**2.1.1 rhC1INH 对照品溶液** 取 1 瓶 rhC1INH 对照品, 用流动相稀释至 0.1 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>, 分别制备质量浓度为 25.0、35.0、45.0、55.0、65.0、75.0 和 85.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的对照品溶液。

**2.1.2 系统适用性溶液** 取 1 瓶凝胶过滤对照品, 加入 1.0 mL 超纯水, 充分混匀后, 取 15.0  $\mu\text{L}$  溶液加入至 585.0  $\mu\text{L}$  流动相, 充分混匀后备用。

**2.1.3 rhC1INH 供试品溶液** 取 1 瓶 rhC1INH 样品, 用 14.0 mL 超纯水充分溶解, 再用流动相稀释至 6.0 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>。同时, 以流动相作为空白对照。

### 2.2 色谱条件

TSK GEL3000SW 色谱柱 (TOSOH, 5  $\mu\text{m}$ , 7.8 mm  $\times$  300 mm); 采用 250 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 的磷酸缓冲液 (pH 6.8) 流动相进行等度洗脱, 运行时间为 45 min, 流速 0.5 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>; 检测波长 214 nm; 柱温 20~25  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量 20  $\mu\text{L}$ 。

### 2.3 数据分析

用面积归一化法计算 rhC1INH 中聚合物的含量,即聚合物峰面积占除溶剂峰以外的总色谱峰面积的百分率。

## 3 结果

### 3.1 系统适用性试验

系统适用性试验色谱图见图 1。空白对照样品中出现溶剂峰(图 1-A);图 1-B 中,  $\gamma$  球蛋白(峰 4)和卵清蛋白(峰 5)之间的分离度( $R_s$ )为 2.7(RSD 为 3.1%);肌球蛋白(峰 6)的理论塔板数( $N$ )为 19 367(RSD 为 2.4%),说明柱效和该方法的分离度较好。图 1-D 为 rhC1INH 样品的色谱图,除 rhC1INH 的主峰(峰 4)外,还分离到 3 个聚合物峰(峰 1~3)。峰 5 及其肩峰是 rhC1INH 中低分子量相关蛋白,峰 6 是制剂缓冲液中的柠檬酸盐组分。本研究只对峰 1~3 聚合物进行分析。

### 3.2 线性分析

rhC1INH 对照品的色谱图结果见图 1-C。以对照品浓度为横坐标( $X$ ),主峰的峰面积为纵坐标( $Y$ )进行线性回归分析,回归方程:

$$Y=2.972 \times 10^7 X - 2.11 \times 10^5 \quad R^2=0.998$$

重复 3 次试验的回归系数  $R^2$  分别为 0.998、0.997 和 0.995(均值为 0.997, RSD 为 0.16%),说明在 25.0~85.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内,对照品浓度与峰面积之间呈现良好的线性关系。

### 3.3 精密度分析

取 S1 批 rhC1INH 样品进行 6 次色谱分析,分别计算样品中单组份聚合物(峰 1~3)和总聚合物的面积占总峰面积的百分率。如表 1 所示, S1 样品中总聚合物的平均含量为 0.86%, RSD 为 4.8%;峰 3 聚合物的 RSD 为 3.9%,峰 2 和峰 1 聚合物的 RSD 分别为 9.0% 和 10.7%。同时, S1 样品中主要 C1INH 成分的含量为 98.22%, RSD 为 0.04%。说明该方法的精密度较好。另外, rhC1INH 中聚合物成分(峰 3)的  $R_s$  为 1.8(>1.5),可保证主成分与该聚合物完全有效分离。峰 3 与峰 2、峰 2 与峰 1 相关蛋白成分的  $R_s$  均 <1.0,其中峰 2 和峰 1 的分离效果最差。rhC1INH 主成分含量的 RSD 明显低于峰 3、峰 2 和峰 1 的 RSD。

### 3.4 稳定性验证

取 S1 样品,每 2 h 进样 1 次,共进样 4 次,样品中总聚合物的含量分别为 0.70%、0.77%、0.75% 和 0.76%,平均值为 0.75%, RSD 为 4.2%,表明在检测条件下, S1 样品在 6 h 内的稳定性良好。

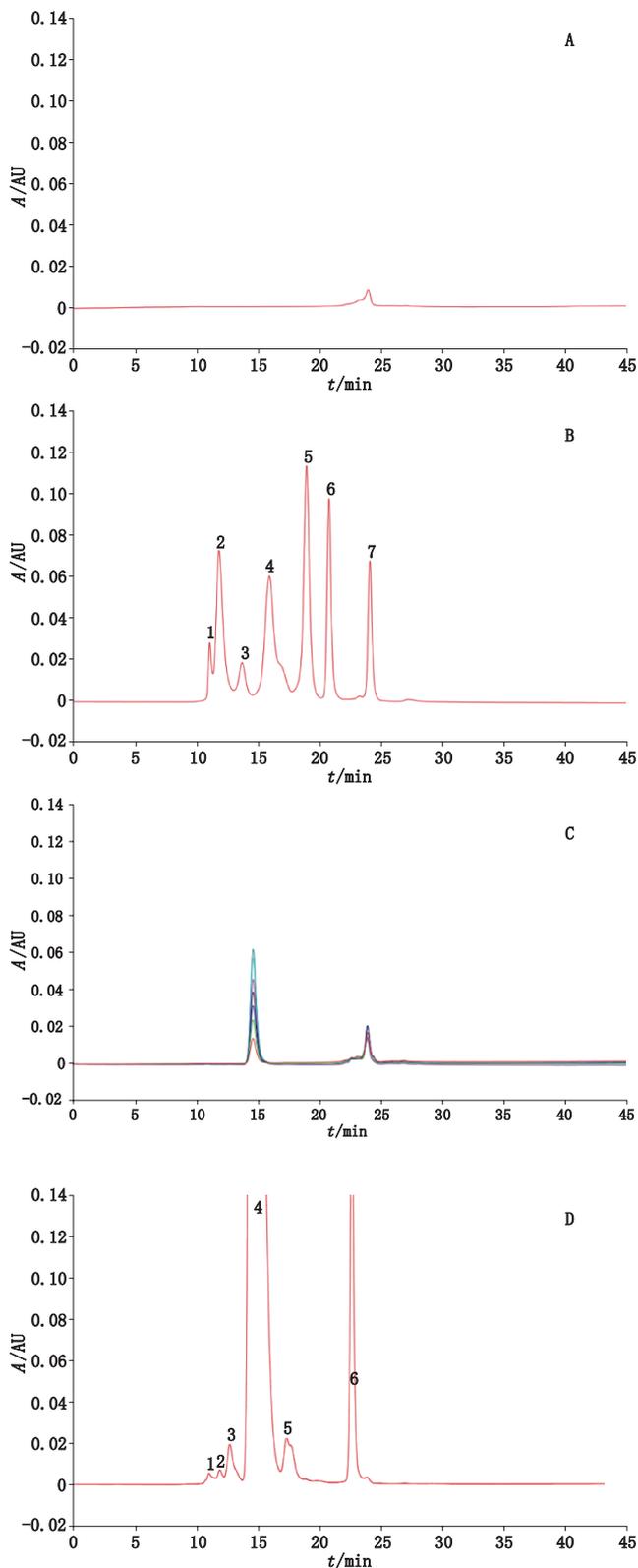


图 1 SEC-HPLC 色谱图

Fig. 1 Chromatograms of SEC-HPLC

A. 空白对照 (blank control) B. 凝胶过滤标准品 (gel filtration standard) C. rhC1INH 对照品 (rhC1INH reference substance) D. rhC1INH 样品 (rhC1INH sample)

表 1 RhC1INH 中聚合物含量及分离度的分析结果

Tab. 1 The results of total aggregates and Rs in rhC1INH

序号 (No.)	峰 4 保留时间 (retention time of peak 4)/min	面积 (AUC)/%					分离度 (separation degree, Rs)		
		峰 4 (peak 4)	峰 3 (peak 3)	峰 2 (peak 2)	峰 1 (peak 1)	总聚合物 (total aggregates)	峰 4 与峰 3 (peak 4 and peak 3)	峰 3 与峰 2 (peak 3 and peak 2)	峰 2 与峰 1 (peak 2 and peak 1)
1	14.83	98.16	0.62	0.16	0.12	0.90	1.78	0.92	—
2	14.83	98.17	0.62	0.16	0.12	0.90	1.78	0.92	—
3	14.83	98.21	0.61	0.16	0.11	0.88	1.80	0.93	—
4	14.83	98.23	0.59	0.14	0.10	0.83	1.81	0.93	—
5	14.89	98.26	0.57	0.13	0.10	0.80	1.80	0.93	—
6	14.84	98.26	0.57	0.14	0.13	0.84	1.81	0.91	0.87
平均值 (mean)	14.84	98.22	0.60	0.15	0.11	0.86	1.80	0.92	0.87
RSD/%	0.16	0.04	3.92	8.96	10.69	4.80	0.76	0.88	—

### 3.5 方法应用

按照“2.2”项色谱条件,对 S1、S2、S3 和 S4 批次成品进行色谱分析(每批样品重复测定 3 次)。4 批 rhC1INH 均检出聚合物,其中总聚合物的含量分别为 0.82%、1.01%、0.97% 和 0.92%(表 2)。

表 2 RhC1INH 中总聚合物含量

Tab. 2 The total aggregates in rhC1INH

序号 (No.)	S1	S2	S3	S4
1	0.76	1.01	0.97	0.92
2	0.82	1.00	0.97	0.91
3	0.89	1.01	0.96	0.92
平均值 (mean)	0.82	1.01	0.97	0.92
RSD/%	7.90	0.50	0.36	0.44

### 4 讨论

在生物技术药物的研发及生产中,质量控制是确保药物安全性和有效性的重要手段,其中工艺相关杂质和产品相关杂质/蛋白的鉴定是必不可少的常规检测项目<sup>[17]</sup>。rhC1INH 来源于转基因家兔的乳汁,产品中的相关杂质/蛋白是在生产、纯化等过程中产生的与主要蛋白结构类似的同系物、异构体、突变物、氧化物、聚合体或降解物,本研究主要对 rhC1INH 产品中的聚合物进行研究。聚合物的产生机制主要是疏水结构域间的相互作用或二硫键的形成等<sup>[19]</sup>。C1INH 的 N 端含有独特的 116 个氨基酸残基,主要通过 2 对二硫键与丝氨酸蛋白酶结构域相连<sup>[2,20]</sup>。

二硫键在稳定 C1INH 结构和保持丝氨酸蛋白酶抑制剂活性中具有重要的作用,破坏二硫键的结构会导致 C1INH 构象的改变、活性的丧失和蛋白的多聚化<sup>[2-3,21]</sup>。因此,合格的 rhC1INH 产品应该保持正确的二硫键构象,并将蛋白聚合物的含量控制在最小范围<sup>[10]</sup>。

目前,重组蛋白药物中聚合物的检测方法主要包括 SDS-PAGE、SEC(包含多种检测器的不同方法)和质谱等方法,其中 SEC-HPLC 是目前用于分析聚合物含量的标准方法<sup>[16-18,22]</sup>。对 rhC1INH 而言,国内外药典中均无聚合物的检测方法及限度要求,本研究针对 rhC1INH 中聚合物建立了 SEC-HPLC 检测方法。从 SEC-HPLC 色谱结果可以看出(图 1-D): rhC1INH 主成分洗脱峰(峰 4)前存在 3 个蛋白峰(峰 1-峰 3),3 个蛋白峰的含量明显低于 rhC1INH 主成分峰;在分离度方面,峰 3 与 rhC1INH 主成分峰能够有效分离;峰 3 和峰 2、峰 2 和峰 1 不能获得较好的分离效果,但能保证峰 2、峰 1 与主成分峰 4 有较好的分离度。本研究对 rhC1INH 中的总聚合物含量进行分析,结果显示:4 批次 rhC1INH 样品中的主要蛋白平均纯度为 98.3%,平均洗脱时间为 14.8 min;总聚合物的含量约为 0.82%~1.01%。在 Feussner 等<sup>[9]</sup>的研究中,13.5 min 洗脱时间之前的蛋白成分认定为聚集体和其他高分子量蛋白,约占 0.6%。本文与 Feussner 研究的差异可能与 SEC-HPLC 条件(流动相成分和 pH 等)和产品批次差异有关;另外,保

存条件和保存时间也会影响 rhC1INH 中聚合物的含量。在下一步的研究中,我们需要分别收集 3 个聚合物成分,采用 SDS-PAGE、动态光散射、粘度计和折射计等多重高效分子排阻色谱方法进行更深入的分析,以鉴定峰 3、峰 2 和峰 1 相关蛋白的聚合物形式。

综上所述,本研究建立了 rhC1INH 产品中聚合物含量的检测方法,鉴于聚合物可能产生的免疫原性和副反应,应尽可能减少 C1INH 制剂中蛋白聚集物的含量,并控制在可接受的限度范围内。

#### 参考文献

- [ 1 ] RATNOFF OD, LEPOW IH. Some properties of an esterase derived from preparations of the first component of complement [ J ]. J Exp Med, 1957, 106 ( 2 ): 327
- [ 2 ] BOCK SC, SKRIVER K, NIELSEN E, *et al.* Human C1 inhibitor: primary structure, cDNA cloning, and chromosomal localization [ J ]. Biochemistry, 1986, 25 ( 15 ): 4292
- [ 3 ] LAMARK T, INGEBRIGTSEN M, BJORNSTAD C, *et al.* Expression of active human C1 inhibitor serpin domain in *Escherichia coli* [ J ]. Protein Expr Purif, 2001, 22 ( 2 ): 349
- [ 4 ] BEINROHR L, HARMAT V, DOBO J, *et al.* C1 inhibitor serpin domain structure reveals the likely mechanism of heparin potentiation and conformational disease [ J ]. J Biol Chem, 2007, 282 ( 29 ): 21100
- [ 5 ] BORK K, STEFFENSEN IMACHNIG T. Treatment with C1-esterase inhibitor concentrate in type I or II hereditary angioedema: a systematic literature review [ J ]. Allergy Asthma Proc, 2013, 34 ( 4 ): 312
- [ 6 ] BERNSTEIN JA, RITCHIE B, LEVY RJ, *et al.* Population pharmacokinetics of plasma-derived C1 esterase inhibitor concentrate used to treat acute hereditary angioedema attacks [ J ]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2010, 105 ( 2 ): 149
- [ 7 ] DAVIS AE, MEJIA PLU F. Biological activities of C1 inhibitor [ J ]. Mol Immunol, 2008, 45 ( 16 ): 4057
- [ 8 ] AZZAM R, BOUTROS J, IRANI C. Hereditary angioedema: a literature review and national management guidelines [ J ]. J Med Liban, 2015, 63 ( 2 ): 97
- [ 9 ] FEUSSNER A, KALINA U, HOFMANN P, *et al.* Biochemical comparison of four commercially available C1 esterase inhibitor concentrates for treatment of hereditary angioedema [ J ]. Transfusion, 2014, 54 ( 10 ): 2566
- [ 10 ] BORK K. Pasteurized and nanofiltered, plasma-derived C1 esterase inhibitor concentrate for the treatment of hereditary angioedema [ J ]. Immunotherapy, 2014, 6 ( 5 ): 533
- [ 11 ] 汪菲菲,李策生. 人 C1 酯酶抑制剂的进展 [ J ]. 中国生物制品学杂志, 2017, 30 ( 11 ): 1227
- [ 12 ] WANG FF, LI CS. Progress in research on C1 esterase inhibitor [ J ]. Chin J Biologicals, 2017, 30 ( 11 ): 1227
- [ 13 ] GUPTA R, BALDUZZI J, DAVIS-LORTON M. C1-esterase inhibitor ( Cinryze® ) use in the treatment of pediatric hereditary angioedema [ J ]. Immunotherapy, 2018, 10 ( 8 ): 635
- [ 14 ] GOLDENBERG MM. Pharmaceutical approval update [ J ]. P&T, 2014, 39 ( 9 ): 619
- [ 15 ] CRUZ MP. Conestat alfa ( ruconest ) : first recombinant c1 esterase inhibitor for the treatment of acute attacks in patients with hereditary angioedema [ J ]. P&T, 2015, 40 ( 2 ): 109
- [ 16 ] KESIK-BRODACKA M. Progress in biopharmaceutical development [ J ]. Biotechnol Appl Biochem, 2017, 65 ( 2 ): 306
- [ 17 ] 韦薇, 罗建辉, 尹红章, 等. 重组单克隆抗体相关物质和相关杂质的研究与评价 [ J ]. 中国新药杂志, 2014, 23 ( 8 ): 906
- [ 18 ] WEI W, LUO JH, YIN HZ, *et al.* Comments on development and assessment of the drug impurities and substances related to recombinant monoclonal antibodies [ J ]. Chin J New Drugs, 2014, 23 ( 8 ): 906
- [ 19 ] 任彬, 潘勇兵, 邹汉武. 重组蛋白质药物相关杂质检测方法的分析与评价 [ J ]. 中国生物制品学杂志, 2016, 29 ( 1 ): 104
- [ 20 ] REN B, PAN YB, ZOU HW. Analysis and evaluation of method for determination of impurities in recombinant protein drugs [ J ]. Chin J Biologicals, 2016, 29 ( 1 ): 104
- [ 21 ] KHODABANDEHLOO A, CHEN DD. Particle sizing methods for the detection of protein aggregates in biopharmaceuticals [ J ]. Bioanalysis, 2017, 9 ( 3 ): 313
- [ 22 ] JENKINS N, MURPHY L, TYTHER R. Post-translational modifications of recombinant proteins: significance for biopharmaceuticals [ J ]. Mol Biotechnol, 2008, 39 ( 2 ): 113
- [ 23 ] WAGENAAR-BOS IG, HACK CE. Structure and function of C1-inhibitor [ J ]. Immunol Allergy Clin North Am, 2006, 26 ( 4 ): 615
- [ 24 ] BOS IG, LUBBERS YT, ROEM D, *et al.* The functional integrity of the serpin domain of C1-inhibitor depends on the unique N-terminal domain, as revealed by a pathological mutant [ J ]. J Biol Chem, 2003, 278 ( 32 ): 29463
- [ 25 ] FEKETE S, BECK A, VEUTHEY JL, *et al.* Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates [ J ]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 101: 161

( 本文于 2018 年 9 月 1 日收到 )