

重组人干扰素 $\beta 1b$ 中 ox-IFN $\beta 1b$ 含量测定*

于雷, 韩春梅, 李永红, 陶磊, 裴德宁**, 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及其标准化重点实验室, 北京 100050)

摘要 目的: 建立重组人干扰素 $\beta 1b$ (IFN $\beta 1b$) 中氧化型干扰素 (ox-IFN $\beta 1b$) 的测定方法。方法: RP-HPLC 色谱条件: RP-C₈ 色谱柱 (Grace Vydac, 4.6 mm × 250 mm, 5 μ m), 柱温 40 $^{\circ}$ C, 0.1% TFA-10% 乙腈-水溶液为流动相 A, 0.1% TFA-乙腈溶液为流动相 B, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 214 nm。结果: ox-IFN $\beta 1b$ 峰与峰 3 的分离度约为 4.0, 理论塔板数大于 20 000; 6 次进样的 RSD 小于 5.0%; 2 个厂家共 6 批 IFN $\beta 1b$ 原液中均检出 ox-IFN $\beta 1b$, 用面积归一化法计算百分含量为 0.47%~0.96%。结论: 新建方法可有效分离和测定不同厂家 IFN $\beta 1b$ 原液中的 ox-IFN $\beta 1b$, 对 IFN $\beta 1b$ 质量标准的提高具有重要意义。
关键词: 相关蛋白; 重组人干扰素 $\beta 1b$; 氧化型干扰素 $\beta 1b$; 反相高效液相色谱法; 质量控制

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2018) 11-1881-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.11.05

Determination of ox-IFN $\beta 1b$ in recombinant human interferon $\beta 1b$ *

YU Lei, HAN Chun-mei, LI Yong-hong, TAO Lei,
PEI De-ning**, RAO Chun-ming**

(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 method for determination of ox-IFN $\beta 1b$ in recombinant human interferon $\beta 1b$ (IFN $\beta 1b$). **Methods:** The RP-HPLC was carried out on an RP-C₈ column (Grace Vydac, 4.6 mm × 250 mm, 5 μ m), at the temperature of 40 $^{\circ}$ C. The mobile phase consisting of solution A (0.1% TFA-10% ACN-ddH₂O) and solution B (0.1% TFA-ACN as solution B) was applied with a gradient elution at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The detection wavelength was 214 nm. **Results:** The resolution of the ox-IFN $\beta 1b$ peak relative to peak 3 was about 4.0 and theoretical plate number was more than 20 000. RSD of 6 injections was below 5.0%. ox-IFN $\beta 1b$ was detected in 6 batches of IFN $\beta 1b$ bulks from two different manufacturers, and percentage contents were between 0.47%

* 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@nifdc.org.cn
裴德宁 Tel:(010)67095886; E-mail: peidening@nifdc.org.cn
第一作者 于雷 Tel:(010)67095886; E-mail: yulei@nifdc.org.cn
韩春梅 Tel:(010)67095684; E-mail: hanem@nifdc.org.cn

and 0.96%, which were determined by area normalization. **Conclusion:** The developed method could effectively separate and determine ox-IFN β 1b in IFN β 1b bulks from different manufacturers, which was of great significance to the improvement of quality control of IFN β 1b.

Keywords: related proteins; recombinant interferon β 1b (IFN β 1b); ox-IFN β 1b; RP-HPLC; quality control

重组人干扰素 β 1b (IFN β 1b) 是 1 种大肠杆菌表达的基因工程药物, 由 165 个氨基酸组成, 相对分子质量约为 18 k, 与天然形式的干扰素 β 相比, 其第 17 位半胱氨酸突变为丝氨酸, 无 N 端甲硫氨酸, 无糖基化修饰, 但仍可折叠成正确的干扰素 β 分子, 并与受体结合, 具有表达量高、稳定性好的优点^[1-2]。1993 年被美国 FDA 批准上市, 用于多发性硬化症的治疗, 2010 年获准在中国上市^[3-6]。作为 1 种重组蛋白药物, IFN β 1b 容易在生产或储存阶段发生蛋白质修饰反应, 如氨基酸的氧化、脱酰胺、肽链断裂、聚集和错误折叠等, 产生蛋白变异体, 即相关蛋白, 相关蛋白可以使重组蛋白药物的生物学活性下降, 药代动力学特性发生改变, 易诱生中和抗体或导致过敏等严重副作用, 增加患者的用药风险^[7-9]。氧化产物是一种非常重要的制品相关蛋白, 由于其对重组蛋白免疫原性及生物学活性的潜在影响, 在产品质控方面需要密切关注^[10-11]。重组蛋白中容易发生氧化的氨基酸主要是蛋氨酸和半胱氨酸, 蛋氨酸通过氧化可转变为蛋氨酸亚砷甚至蛋氨酸砷, 对蛋白的结构和功能会产生一定的影响, 进而影响药物的安全性、有效性和稳定性。IFN β 1b 分子中含有 3 个蛋氨酸, 理论上都可以被氧化, 且氧化后 IFN β 1b 的生物学活性降低, 免疫原性增加, 因此需要对氧化型干扰素 (ox-IFN β 1b) 进行控制^[12-13]。目前欧洲药典中已收录了 ox-IFN α 2, ox-IFN β 1a 和 ox-IFN γ 1b 的测定方法, 但 ox-IFN β 1b 的质控尚无相关报道^[14-15]。因此, ox-IFN β 1b 检测方法的建立对于 IFN β 1b 产品质量标准的提高具有重要意义。

欧洲药典中 ox-IFN α 2 的测定采用 C₁₈ 反相高效液相色谱法 (RP-HPLC) 法, ox-IFN β 1a 采用肽图法, ox-IFN γ 1b 采用阳离子交换色谱法 (CEC)。本研究采用 C₈ RP-HPLC 技术, 建立了针对 IFN β 1b 原液中 ox-IFN β 1b 质量控制的方法, 并用该法对 2 个厂家 6 个批次的 IFN β 1b 原液进行了检测。

1 仪器与试剂

HPLC 色谱仪 (Waters 2659 分离器, 2487 紫外检测器, Empower 工作站); RP-C₈ 色谱柱 (Grace Vydac, 4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m)。

3 批 A 厂家 IFN β 1b 原液 (MA) 和 3 批 B 厂家 IFN β 1b 原液 (MB) 均为本实验室留存样品; 三氟乙酸 (TFA) (分析纯, Aladdin); 乙腈 (色谱纯, Merck); H₂O₂、L- 甲硫氨酸均为分析纯。

2 方法

2.1 样品制备

2.1.1 IFN β 1b 样品 将 IFN β 1b 原液用超纯水稀释至 0.7 mg \cdot mL⁻¹, 10 000 r \cdot min⁻¹ 离心 1 min, 取上清液, 即得。

2.1.2 ox-IFN β 1b 样品 从 3 批 A 厂家 IFN β 1b (MA) 原液和 3 批 B 厂家 IFN β 1b (MB) 原液中各选取 1 批, 用超纯水稀释至 0.7 mg \cdot mL⁻¹, 分别加入不同体积的 2.0% H₂O₂ 溶液, 使 H₂O₂ 终浓度分别为 0.01%、0.05% 和 0.25%, 室温放置 1 h 进行氧化反应, 然后加入 L- 甲硫氨酸使其终浓度为 12.5 mg \cdot mL⁻¹, 室温放置 1 h 以终止氧化反应, 10 000 r \cdot min⁻¹ 离心 1 min, 取上清液, 即得。

2.2 色谱条件

柱温 40 $^{\circ}$ C; 检测波长 214 nm; 进样量 20 μ L; 流速 1.0 mL \cdot min⁻¹; 用流动相 A (0.1% TFA-10% 乙腈-水溶液) 和 B (0.1% TFA- 乙腈溶液) 进行梯度洗脱, 具体洗脱过程按表 1 所示进行。

表 1 梯度洗脱条件

Tab. 1 Gradient elution conditions

时间 (time)/min	流动相 A (mobile phase A)/%	流动相 B (mobile phase B)/%
0	70	30
10	50	50
20	40	60
21	70	30
27	70	30

3 结果

3.1 方法建立

通过比较不同色谱柱 (C₄ 和 C₈ 反相柱), 调整梯

度洗脱条件, 优化建立了适用于检测 ox-IFN β1b 的 C₈ RP-HPLC 法, 用该法测试 A 和 B 厂家的 IFN β1b 原液 (MA 和 MB), 色谱图见图 1。

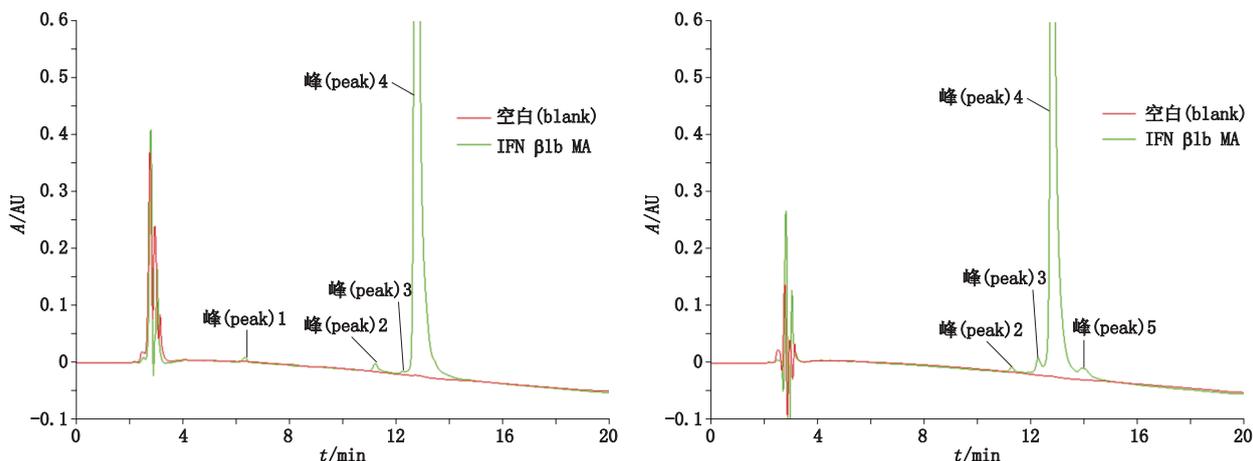


图 1 RP-HPLC 法分析 A 和 B 厂家的 IFN β1b 原液 (IFN β1b MA 和 MB)

Fig. 1 Analysis of IFN β1b bulks from A and B manufacturers (IFN β1b MA 和 MB) by RP-HPLC

除 IFN β1b 主峰 (峰 4) 和溶剂峰外, 均分离到 3 个杂质蛋白峰, 各峰的保留时间、峰面积、峰面积

百分比 (% 面积)、USP 分离度和 USP 理论塔板数见表 2。

表 2 IFN β1b MA 和 MB 样品的色谱峰参数

Tab. 2 Parameters of chromatographic peaks of IFN β1b MA and MB samples

样品 (sample)	峰号 (peak No.)	保留时间 (retention time) /min	峰面积 (peak area)	面积百分比 (area percent) / %	USP 分离度 (USP resolution)	USP 理论塔板数 (USP theoretical plate number)
IFN β1b MA	1	6.341	94 820	0.43	—	9 407
	2	11.226	163 900	0.75	16.7	21 921
	3	12.258	13 365	0.06	4.0	64 542
	4	12.755	21 724 121	98.76	1.8	22 231
IFN β1b MB	2	11.245	77 241	0.41	—	35 437
	3	12.235	187 752	1.01	3.9	35 959
	4	12.767	18 239 036	97.72	1.8	26 100
	5	13.967	161 215	0.86	3.1	15 817

3.2 ox-IFN β1b 峰的鉴定

为鉴定 ox-IFN β1b 峰, 采用不同浓度 H₂O₂ 处理 IFN β1b 样品 1 h 后进行测试。如图 2 所示, IFN β1b MA 和 IFN β1b MB 的峰 2 随着 H₂O₂ 浓度升高而增加, 且两者的保留时间基本一致, 说明此峰为

ox-IFN β1b 峰。图 3 为不同浓度 H₂O₂ 处理 1 h 后 ox-IFN β1b 峰面积百分比, 随着 H₂O₂ 浓度增加, ox-IFN β1b 峰明显增加, 且 MA 样品的增加趋势较 MB 样品明显, 当 H₂O₂ 浓度为 0.25% 时, ox-IFN β1b 峰面积百分比可增至 30% 左右。

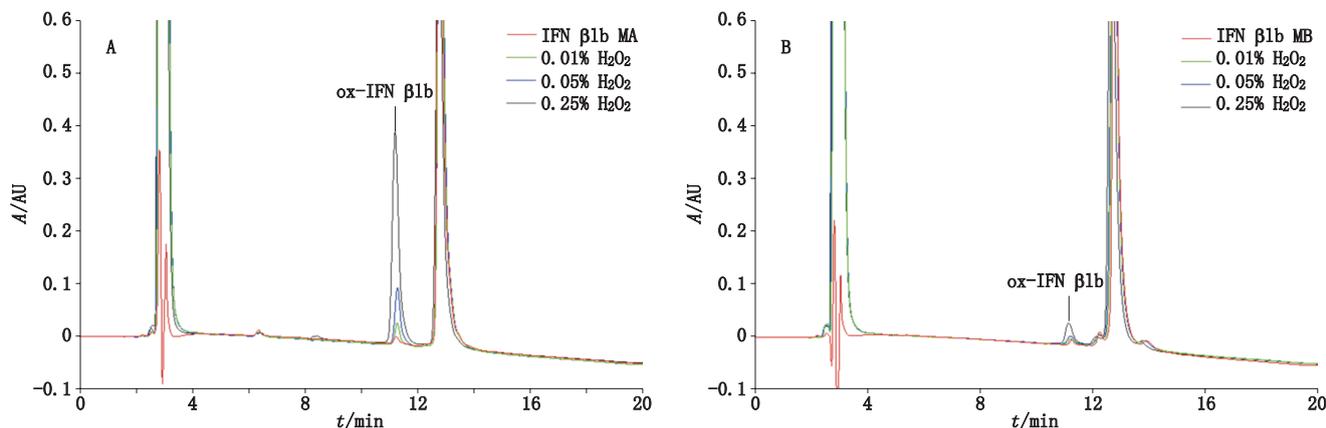


图2 IFN β 1b MA 和 MB 中 ox-IFN β 1b 峰的鉴定

Fig. 2 Identification of ox-IFN β 1b peak in IFN β 1b MA and MB bulks

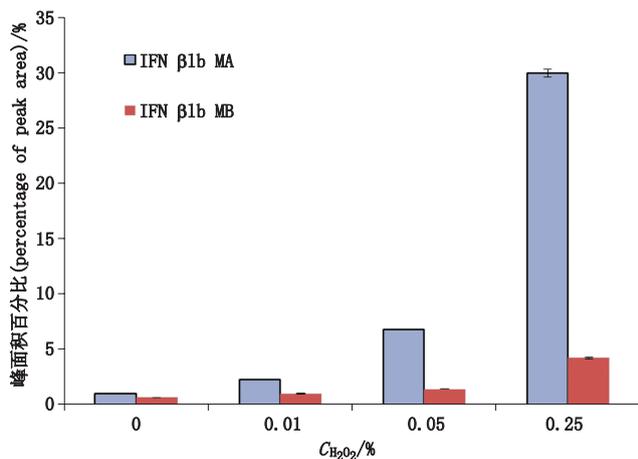


图3 不同浓度 H_2O_2 处理 1 h 后 ox-IFN β 1b 峰面积百分比

Fig. 3 The peak area percentages of ox-IFN β 1b after incubation with different concentration of H_2O_2 for 1 h

3.3 精密度

用 RP-HPLC 法对 A 和 B 厂家的 IFN β 1b 样品进行测试,分别重复进样 6 次,计算 RSD。6 次进样的色谱图见图 4。

6 次重复进样的 ox-IFN β 1b 峰保留时间、峰面积、峰面积百分比及相应 RSD 计算结果见表 3。保留时间的 RSD 仅为 0.1%,峰面积和峰面积百分比的 RSD 均小于 5%。说明该法的精密度较好。

3.4 方法的初步应用

用 RP-HPLC 法测试 A 和 B 厂家共 6 批 IFN β 1b 原液各 3 次。所有样品中均检出 ox-IFN β 1b,用面积归一化法计算百分含量,结果见表 4。

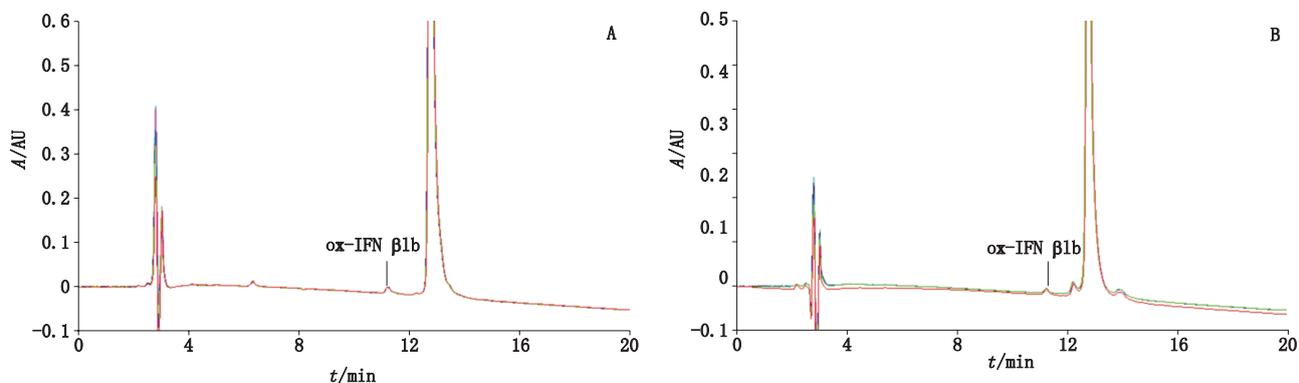


图4 IFN β 1b MA (A) 和 MB (B) 6 次进样的色谱图

Fig. 4 Chromatograms of 6 injections of IFN β 1b MA (A) and MB (B)

表 3 6次进样的 ox-IFN β1b 峰结果

Tab. 3 Ox-IFN β1b peak results of 6 injections

样品 (sample)	进样 (injection)	保留时间 (retention time)/min	峰面积 (peak area)	面积百分比 (area percent)/%
IFN β1b MA	1	11.241	130287	0.61
	2	11.233	135616	0.62
	3	11.233	120824	0.55
	4	11.225	133777	0.61
	5	11.234	131052	0.60
	6	11.232	138241	0.63
	均值 (mean)		11.231	131633
	RSD/%	0.1	4.6	4.6
IFN β1b MB	1	11.275	131629	0.63
	2	11.245	129234	0.62
	3	11.245	125706	0.61
	4	11.246	127578	0.62
	5	11.262	128219	0.62
	6	11.263	127254	0.62
	均值 (mean)		11.256	128270
	RSD/%	0.1	1.6	1.0

表 4 IFN β1b 原液中 ox-IFN β1b 百分含量计算结果

Tab. 4 Results of ox-IFN β1 percentage contents in IFN β1b bulks

样品 (sample)	序号 (No.)	1%			均值 (mean) 1%	RSD 1%
		1%	2%	3%		
IFN β1b MA	01	1.01	0.95	0.92	0.96	4.8
	02	0.64	0.68	0.64	0.65	3.5
	03	0.67	0.64	0.63	0.65	3.2
IFN β1b-MB	01	0.67	0.68	0.65	0.67	2.3
	02	0.7	0.69	0.7	0.70	0.8
	03	0.48	0.48	0.45	0.47	3.7

4 讨论

目前对于氧化型相关蛋白的检测方法主要分为肽段水平检测及完整蛋白水平检测。肽段水平检测是先将待测蛋白酶解成肽段,液相色谱分离氧化及未氧化的相关肽段,再通过紫外检测器或质谱进行测定,该法仅能测定特定位点的修饰比例,不能区分多位点氧化变异体并进行定量,且酶解过

程可能引入新的修饰,使测定结果不准确^[16]。目前欧洲药典中 ox-IFN β1a 的测定方法即为肽图法。完整蛋白水平的检测可以避免这些问题,但对分离方法进行优化,以使氧化产物与预期制品可有效分离^[17-18]。目前欧洲药典中 ox-IFN α 2 和 ox-IFN γ 1b 的测定方法均为完整蛋白水平的检测。本研究中所建立的 RP-HPLC 法也是在完整蛋白水平上检测 ox-IFN β1b。前期研究比较了 C₄ 和 C₈ 色谱柱,发现两者均可有效分离 ox-IFN β1b 峰,但是 C₈ 柱的基线更平滑,因此选择 C₈ 柱。通过调整流动相 A 和 B 的比例,优化梯度洗脱条件,使各峰在短时间(20 min)内达到最佳分离。采用优化的 RP-HPLC 法将 IFN β1b 样品中的主峰和杂质蛋白峰进行有效分离,通过 H₂O₂ 处理来定位 ox-IFN β1b 峰。进一步的结构鉴定还需分离纯化 ox-IFN β1b 组分,用质谱技术进行分析。从检测结果来看,尽管 A 厂家和 B 厂家的相关蛋白分布有所不同,但所建方法均可将 ox-IFN β1b 进行有效分离,ox-IFN β1b 峰保留时间为 11.2 min,与峰 3 的分度为 4.0 左右,理论塔板数大于 20,000。通过 6 次重复进样计算,ox-IFN β1b 峰面积百分比的 RSD 小于 5%,说明该法的精密度较高。目前尚无 ox-IFN β1b 参考品,只能采用峰面积归一化法计算 ox-IFN β1b 峰面积百分比进行定量。2 个厂家 6 批 IFN β1b 原液测定结果显示,所有样品中均检出 ox-IFN β1b,说明 ox-IFN β1b 的测定是非常必要的,应作为关键质量属性纳入 IFN β1b 质量控制体系,该法的建立对 IFN β1b 质量控制体系的完善具有重要的促进作用。

参考文献

- [1] HAJI AM, MOFRAD MR, SCHELLEKENS H. Interferon beta: from molecular level to therapeutic effects [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2016, 326: 343
- [2] GARTNER J, BRUCK W, WEDDIGE A, et al. Interferon beta-1b in treatment-naïve paediatric patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: two-year results from the BETAPAEDIC study [J]. *Mult Scler J Exp Transl Clin*, 2017, 3(4): 1842799705
- [3] DOSHI A, CHATAWAY J. Multiple sclerosis, a treatable disease [J]. *Clin Med (Lond)*, 2017, 17(6): 530
- [4] 杨云凯, 马昱, 刘明, 等. 注射用重组人干扰素 β1b 规模化分离纯化工艺的建立及其产品质量的检定 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2017, 30(12): 1321
YANG YK, MA Y, LIU M, et al. Establishment of process for large-

- scale purification of recombinant human interferon β 1b for injection and quality control of products [J]. *Chin J Biol*, 2017, 30(12): 1321
- [5] 张书艳, 柳文科, 陈忠义. 不同剂量的干扰素- β 对多发性硬化(MS)的疗效探讨 [J]. *中外医疗*, 2015(23): 94
ZHANG SY, LIU WK, CHEN ZY. Observe the curative effect of different doses of interferon- β on multiple sclerosis [J]. *Chin Foreign Med Treat*, 2015(23): 94
- [6] ZETTL U, BAUERSTEINHUSEN U, GLASER T, *et al.* Adherence to long-term interferon beta-1b injection therapy in patients with multiple sclerosis using an electronic diary [J]. *Adv Ther*, 2016, 33(5): 834
- [7] 陶磊, 丁有学, 刘兰, 等. 应用串联质谱技术分析几种重组蛋白药物的翻译后修饰 [J]. *中国药学杂志*, 2015, 50(19): 1726
TAO L, DING YX, LIU L, *et al.* Identification of several kinds of post-translational modifications in recombinant protein pharmaceuticals using MS/MS [J]. *Chin Pharm J*, 2015, 50(19): 1726
- [8] MAHJOUBI N, FAZELI MR, DINARVAND R, *et al.* Preventing aggregation of recombinant interferon beta-1b in solution by additives: approach to an albumin-free formulation [J]. *Adv Pharm Bull*, 2015, 5(4): 497
- [9] DEEHAN M, GARCES S, KRAMER D, *et al.* Managing unwanted immunogenicity of biologicals [J]. *Autoimmun Rev*, 2015, 14(7): 569
- [10] LAROCQUE L, BLIU A, XU R, *et al.* Bioactivity determination of native and variant forms of therapeutic interferons [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 2011: 174615
- [11] SKRLIN A, KOSOR K, GOSAK D, *et al.* Correlation of liquid chromatographic and biological assay for potency assessment of filgrastim and related impurities [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 53(3): 262
- [12] Van BEERS MMC, SAUERBORN M, GILLI F, *et al.* Oxidized and aggregated recombinant human interferon beta is immunogenic in human interferon beta transgenic mice [J]. *Pharm Res*, 2011, 28(10): 2393
- [13] ABDOLVAHAB MH, FAZELI A, HALIM A, *et al.* Immunogenicity of recombinant human interferon beta-1b in immune-tolerant transgenic mice corresponds with the biophysical characteristics of aggregates [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2016, 36(4): 247
- [14] 杨云凯, 马昱, 孙玉杰, 等. 反相高效液相色谱法测定注射用重组人干扰素 β 1b 中干扰素 β 1b 的含量 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2015, 28(10): 1053.
YANG YK, MA Y, SUN YJ, *et al.* Determination of interferon β 1b content in recombinant human interferon β 1b for injection by reversed phase high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Biol*, 2015, 28(10): 1053
- [15] TOROSANTUCCI R, SHAROV VS, Van BEERS M, *et al.* Identification of oxidation sites and covalent cross-links in metal catalyzed oxidized interferon beta-1a; potential implications for protein aggregation and immunogenicity [J]. *Mol Pharm*, 2013, 10(6): 2311
- [16] LIU H, NEILL A, PONNIAH G, *et al.* Accurate determination of protein methionine oxidation by stable isotope labeling and LC-MS analysis [J]. *Anal Chem*, 2013, 85(24): 11705
- [17] FORSTENLEHNER IC, HOLZMANN J, TOLL H, *et al.* Site-specific characterization and absolute quantification of pegfilgrastim oxidation by top-down high-performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2015, 87(18): 9336
- [18] HAUSBERGER A, LAMANNA WC, HARTINGER M, *et al.* Identification of low-level product-related variants in filgrastim products presently available in highly regulated markets [J]. *BioDrugs*, 2016, 30(3): 233

(本文于 2018 年 9 月 1 日收到)