

利用欧洲药典方法评价国产重组人干扰素 $\alpha-2$ 原液的制品相关蛋白含量*

李永红, 韩春梅, 裴德宁, 陶磊**, 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: 对不同企业生产的重组人干扰素 $\alpha-2$ 原液的制品相关蛋白含量情况进行调查分析, 为新版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)提高该品种质量标准提供数据支持。方法: 采用欧洲药典收载的标准和方法, 对全国 7 家企业生产的 20 批重组人干扰素 $\alpha-2$ 原液产品进行相关蛋白含量的检测, 分析不同企业产品的质量情况。结果: 经过检测分析, 其中 5 家企业的 16 批产品符合欧洲药典规定, 2 家企业的 4 批产品不符合规定。20 批产品的相关蛋白总含量最低为 0.9%, 最高为 58.2%, 其中含量大于 3% 的相关蛋白峰的数量最高为 5 个, 单个相关蛋白峰的含量最高为 19.9%。结论: 建议在下一版《中国药典》的重组人干扰素 $\alpha-2$ 原液质量标准中, 增加制品相关蛋白含量检测项目, 全面提高产品质量。
关键词: 重组人干扰素 $\alpha-2$; 高效液相色谱; 制品相关蛋白; 欧洲药典; 质量标准; 质量控制

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2018)11-1865-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.11.02

Analysis of product related protein in the bulk of recombinant human interferon $\alpha-2$ produced in China using the method in European Pharmacopoeia

LI Yong-hong, HAN Chun-mei, PEI De-ning, TAO Lei**, 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 provide data support for improving the quality standard in the new edition of Chinese Pharmacopoeia by investigating and analyzing the product related protein content in recombinant human interferon $\alpha-2$ drug substances produced by different manufacturers. **Methods:** Twenty batches of recombinant human interferon $\alpha-2$ drug substances produced by seven domestic manufacturers were tested for related protein content using the methods in European Pharmacopoeia (EP) to analyze the quality of products from different

* 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
陶磊 Tel:(010)67095586; E-mail: taolei01@nifdc.org.cn
第一作者 李永红 Tel:(010)67095684; E-mail: schjlyh@sohu.com
韩春梅 Tel:(010)67095604; E-mail: hanem@nifdc.org.cn

manufacturers. **Results:** After testing and analysis, 16 batches of products from 5 companies met the requirements of EP, and 4 batches of products from 2 companies did not meet the requirements. The lowest total product related protein content of the 20 batches of products was 0.9% and the highest was 58.2%. The highest number of product related protein peaks with content greater than 3% was 5, and the highest content of single product related protein peak was 19.9%. **Conclusion:** It is recommended to add the detection items of product related protein content to the quality standard of recombinant human interferon alpha-2 in the next edition of Chinese Pharmacopoeia to improve the quality of the products.

Keywords: recombinant human interferon α -2; HPLC; product related protein; European Pharmacopoeia (EP); quality standard; quality control

重组人干扰素 α -2 是一种通过工程化大肠杆菌表达系统表达后,经纯化制备的产品,用于治疗恶性肿瘤、亚急性重症肝炎、肝纤维化(早期肝硬化)、感染与损伤性疾病、骨髓增生异常综合症、病毒性疾病、系统性硬皮病、异位性皮炎、风湿性关节炎等症^[1-3]。人干扰素 α -2 包括 α -2a 和 α -2b,两者氨基酸序列相似,只是在第 23 位,人干扰素 α -2a 为赖氨酸残基,而 α -2b 为精氨酸残基。重组人干扰素 α -2 作为重组蛋白药物,很容易在生产或储存阶段由于某些氨基酸的氧化、脱酰胺、肽链断裂、蛋白水解、聚集和错误折叠等原因,产生多种蛋白变体,即重组人干扰素 α -2 的制品相关蛋白^[4-6]。这些相关蛋白与天然蛋白相比,结构已发生变化,并可能带来一些不良后果:生物活性下降;药代动力学特性发生改变;免疫原性改变从而产生不希望的免疫反应等^[7-10]。因此,制品相关蛋白的产生可能导致产品质量下降,对其进行分析和控制是重组蛋白药物质量控制的重要项目^[11-13]。欧洲药典(EP)采用反相 HPLC 方法对干扰素 α -2 产品相关蛋白进行分析^[14-15]。但是在现行版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)中,重组人干扰素 α -2a/2b 的质量标准不包含该项目的检测^[16]。本研究拟采用 EP 的干扰素 α -2 相关蛋白分析方法,对国内不同厂家生产的产品进行检测,为提高干扰素产品的药典标准,即增加制品相关蛋白检测项目提供实验数据支持,从而为进一步提高国内干扰素的产品质量奠定基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

仪器: Waters 2695 型液相色谱仪; Waters 2489 型紫外检测器; Waters Empower 数据分析软件。三氟

乙酸、乙腈为色谱纯,水为超纯水。20 批重组人干扰素 α -2 原液获自 7 家生产企业(A~G)。

1.2 溶液的制备

1.2.1 供试品溶液 分别取适量来源于 7 家生产企业的 20 批重组人干扰素 α -2 原液,用注射用水稀释至 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,混匀,作为供试品溶液。

1.2.2 参比溶液 取一定量的其中 1 份供试品溶液(D 厂家),加入适量的 0.25% 过氧化氢溶液,使过氧化氢终浓度为 0.05%,室温放置 1 h 或能够生成 5% 氧化干扰素的时间。每 1 mL 溶液中加入 L- 甲硫氨酸 12.5 mg,室温放置 1 h,在 2~8 °C 储存不超过 24 h。

1.3 分析方法

1.3.1 色谱系统 色谱柱: Agilent Zorbax 300SB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温: 室温,进样体积: 50 μL ; 检测波长: 210 nm。流动相: 流动相 A 为 0.2% 三氟醋酸 + 30% 乙腈溶液,流动相 B 为 0.2% 三氟醋酸 + 80% 乙腈溶液。线性洗脱梯度程序: 0 min, 28%B; 1 min, 28%B; 5 min, 33%B; 20 min, 37%B; 30 min, 43%B; 40 min, 60%B; 42 min, 60%B; 50 min, 28%B。供试品溶液和参比溶液各进样 1 次。采集 60 min 数据,并处理色谱信息,打印报告。

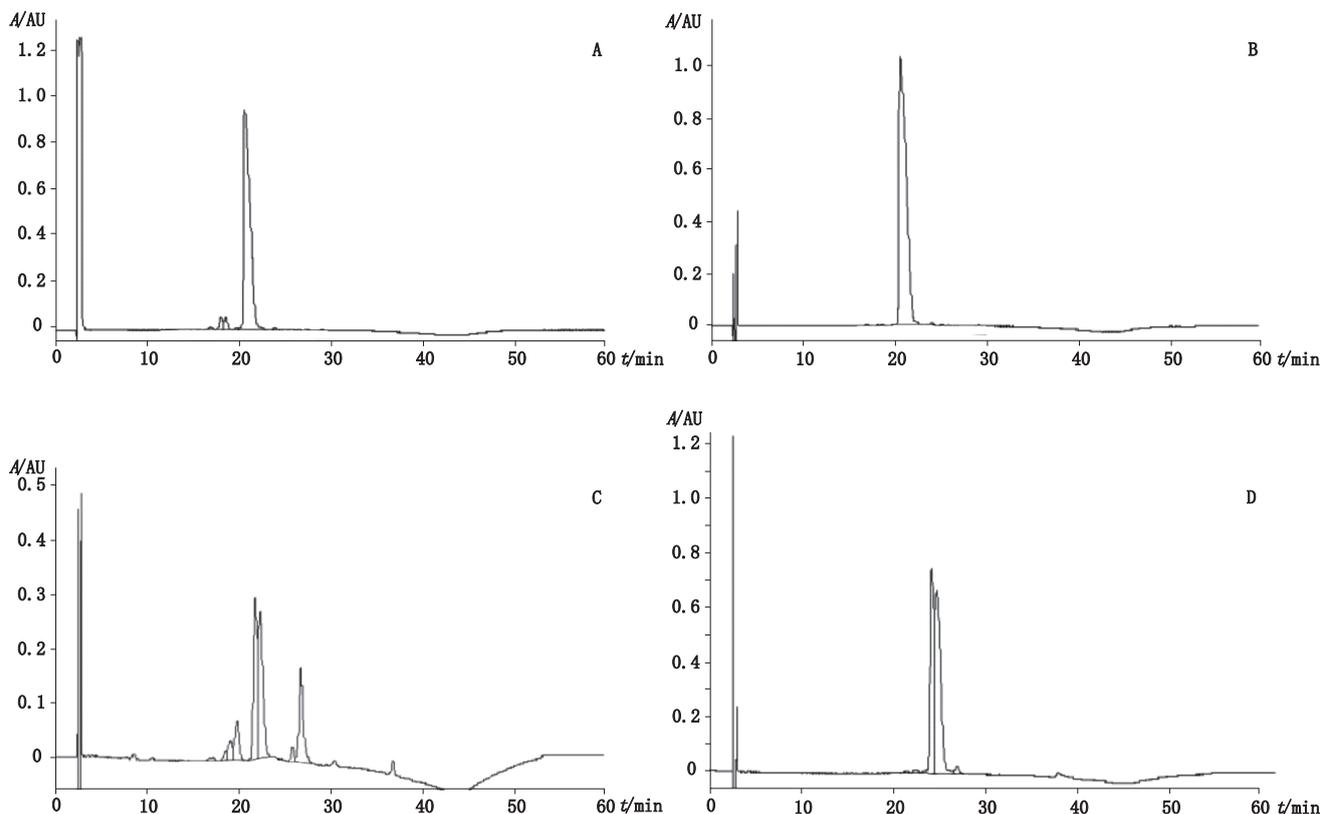
1.3.2 判定标准 供试品图谱中干扰素 α -2 的保留时间约 20 min; 参比溶液图谱中氧化干扰素 α -2 的保留时间为主峰的 0.9 倍,氧化干扰素 α -2 与主峰的分度应不小于 1.0。按面积归一化法计算,在主峰保留时间的 0.7 至 1.4 之间积分,供试品单个相关蛋白洗脱峰积分面积应不高于总积分面积的 3.0%,总的相关蛋白洗脱峰积分面积应不高于总积分面积的 5.0%。

2 结果与讨论

2.1 参比品溶液的分析结果

在对参比品溶液的分析中,干扰素 α -2 的保留时间为 20.7 min,参比溶液图谱中氧化干扰素

α -2 的保留时间为主峰的 0.9 倍,干扰素峰和氧化干扰素峰的分辨率为 2.4,系统适用性符合要求(见图 1)。



A. 参比溶液(D企业)(reference solution, manufacturer D) B. A企业(manufacturer A) C. E企业(manufacturer E) D. G企业(manufacturer G)

图1 重组人干扰素 α -2b 产品色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of interferon- α -2b produced

2.2 各企业重组人干扰素 α -2 原液的分析结果

对 7 家企业生产的 20 批重组人干扰素 α -2 原液进行制品相关蛋白的含量分析,结果见表 1。经过检测分析,其中 A、B、C、D 和 G 5 家企业的 16 批产品符合规定,E 和 F 2 家企业的 4 批产品不符合规定。20 批产品的制品相关蛋白总含量最低为 0.9%,最高为 58.2%,不同企业产品的制品相关蛋白含量存在较大的差异。得到含量大于 3.0% 的相关蛋白峰的数量最高为 5 个,含量大于 3.0% 的单个相关蛋白峰的含量最高为 19.9%。从结果看,本次检测 A 企业的产品相关蛋白含量最低(典型色谱图见图 1-B),E 企业的制品相关蛋白含量最高(典型色谱图见图

1-C),7 家企业的制品相关蛋白符合要求的为 5 家,不符合要求的为 2 家,同一厂家不同批次产品的结果较为相似。对于不符合要求的产品,其制品相关蛋白产生的具体原因有待各厂家予以分析调查,并可能需要改进生产工艺,以提高产品的质量。另外,需要指出的是,D、E、F 和 G 4 家企业的产品在干扰素 α -2 主峰后紧随有较大的未得到有效分离的肩峰,特别是 E、F 和 G 3 家企业的产品,该峰的高度几乎与主峰接近(见图 1-C、D)。参考以往的研究^[5-6],该峰很有可能是 N 端甲硫氨酸化的干扰素 α -2,而在本次检测中未把该峰作为相关蛋白计算,这有待以后采用质谱分析等手段予以证明。

表 1 EP 方法测定 20 批重组人干扰素 α -2 原液相关蛋白含量的结果Tab. 1 Results of related protein content from 20 batches rhIFN α -2b bulk substances analyzed by the EP method

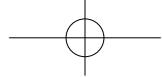
生产厂家 (manufacturer)	批号 (batch number)	相关蛋白的总含量 (total content of related protein) /%	含量大于 3% 的相关蛋白峰的数量 (number of related protein peak which content is more than 3%)	各个大于 3% 的相关蛋白峰的含量 (content of related protein peak whose content is more than 3%)
A	CS2017E01	0.9	0	不适用 (not applicable)
	CS2017E02	1.6	0	不适用 (not applicable)
B	20180330	2.4	0	不适用 (not applicable)
	20180413	3.5	0	不适用 (not applicable)
	20180421	3.0	0	不适用 (not applicable)
C	14API116002	2.3	0	不适用 (not applicable)
	14API116004	2.7	0	不适用 (not applicable)
	14API116007	2.6	0	不适用 (not applicable)
D	Yy20180106IFN	2.1	0	不适用 (not applicable)
	Yy20180207IFN	1.9	0	不适用 (not applicable)
	Yy20180104IFN	2.1	0	不适用 (not applicable)
	Yy20180105IFN	2.0	0	不适用 (not applicable)
	Yy20180208IFN	2.2	0	不适用 (not applicable)
E	B201802005	58.1	5	8.1, 13.5, 15.2, 4.0, 15.8
	B201802006	36.6	3	3.8, 8.4, 19.9
	B201803007	58.2	5	5.1, 12.4, 15.2, 5.7, 17.6
F	20170801	23.9	2	4.0, 17.0
G	GY18302	2.7	0	不适用 (not applicable)
	GY18303	3.1	0	不适用 (not applicable)
	GY18402	2.8	0	不适用 (not applicable)

3 结论

采用 EP 的标准和方法对 7 家企业生产的 20 批重组人干扰素 α -2 原液进行制品相关蛋白含量的分析, 其中 2 家企业的产品不符合规定, 且相关蛋白含量严重超标。从本次调查性检测的结果看, 一方面部分企业产品的质量离国际药品标准的要求还有较大差距, 另一方面也有多家企业的产品达到相关质量要求来满足市场需求, 目前已具备提高药典标准、淘汰质量较差产品的条件。因此, 为了提高干扰素产品的质量使其达到国际标准, 建议在下一版《中国药典》的重组人干扰素 α -2 原液质量标准中, 增加制品相关蛋白含量检测项目。

参考文献

- [1] GEORGE PM, BADIGER R, ALAZAWI W, *et al.* Mitchell, pharmacology and therapeutic potential of interferons [J]. *Pharmacol Ther*, 2012, 135 (1): 44
- [2] 王军志. 生物技术药物研究开发和质量控制 [M]. 第三版. 北京: 科学出版社, 2018: 467
WANG JZ. Research, Development and Quality Control of Biopharmaceuticals [M]. 3th ed. Beijing: Science Publishers, 2018: 467
- [3] PLATANIAS LC. Interferons and their antitumor properties [J]. *Interferon Cytokine Res*, 2013, 33 (4): 143
- [4] 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
- [5] LI Y, RAO C, TAO L, *et al.* Improved detection of variants in recombinant human interferon alpha-2a products by reverse-phase high-performance liquid chromatography on a core-shell stationary phase [J]. J Pharm Biomed Anal, 2013, 88C: 123
- [6] 李永红, 韩春梅, 裴德宁, 等. 2 种重组人干扰素 α -2b 相关蛋白分析方法的应用比较 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34 (7): 1204
- LI YH, HAN CM, PEI DN. *et al.* Comparison of two methods in analyzing recombinant human interferon α -2b related proteins [J]. Chin J Pharm Anal, 2014, 34 (7): 1204
- [7] JENKINS N, MURPHY L, TYTHER R. Post-translational modifications of recombinant proteins: significance for biopharmaceuticals [J]. Mol Biotechnol, 2008, 39 (2): 113
- [8] JENKINS N. Modifications of therapeutic proteins: challenges and prospects [J]. Cytotechnology, 2007, 53 (1-3): 121
- [9] SINGH SK. Impact of product-related factors on immunogenicity of biotherapeutics [J]. J Pharm Sci, 2011, 100 (2): 354
- [10] AHRER K, JUNGBAUER A. Chromatographic and electrophoretic characterization of protein variants [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2006, 841 (1-2): 110
- [11] BRACEWELL DG, SMALES CM. The challenges of product- and process-related impurities to an evolving biopharmaceutical industry [J]. Bioanalysis, 2013, 5 (2): 123
- [12] ALDINI G. Advanced analytical strategies for recombinant therapeutic proteins [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2011, 12 (10): 1507
- [13] DUVAL E, BROLY H, GLEIXNER R. Quality attributes of recombinant therapeutic proteins: an assessment of impact on safety and efficacy as part of a quality by design development approach [J]. Biotechnol Prog, 2012, 28 (3): 608
- [14] EP. 9. 5 [S]. 2016: 2780
- [15] MARK JK, DIONNE S, CYR TD, *et al.* Utility of standard pharmacopeial and nonpharmacopeial methods in distinguishing folded, unfolded, and process variant forms of interferon α -2 [J]. J Pharm Sci, 2012, 101 (10): 3672
- [16] 中华人民共和国药典 2015 年版. 三部 [S]: 2015: 297
ChP 2015. Vol III [S]: 2015: 297

(本文于 2018 年 9 月 1 日收到)

《药物分析杂志》编辑部声明

本刊采用在线投稿系统, 作者稿件一经本刊审核通过, 确定录用, 可优先数字出版, 同时被中国学术期刊网络出版总库等数据库收录, 进入因特网提供信息服务, 并通过本刊在线系统等实现全文查询。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬, 不再另付。

本刊未委托其他任何机构或个人代理征收稿件, 所有稿件须登录本刊网站 (<http://www.ywfxzz.cn>) 在线投稿, 并须提交加盖公章的单位介绍信。

本刊未委托其他任何机构或个人代收任何费用, 所有收费按本刊缴费通知办理。