

利用欧洲药典方法评价国产重组人粒细胞集落刺激因子原液中的制品相关蛋白含量*

韩春梅, 刘兰, 史新昌, 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: 分析评价国产重组人粒细胞集落刺激因子原液中的制品相关蛋白含量, 为《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)标准提高提供依据。**方法:** 对比国际主流药典, 选择其中最为通用的制品相关蛋白含量分析方法; 用该方法对征集的国产重组人粒细胞集落刺激因子原液进行分析检测及结果判定。**结果:** 欧洲药典(EP)所列方法最为通用, 用该方法对 12 家生产企业的 33 批原液进行了检测; 结果显示, 5 家企业的 13 批原液符合 EP 标准, 其余厂家及批次不符合 EP 标准。**结论:** 我国已有相当数量的重组人粒细胞集落刺激因子产品符合 EP 的制品相关蛋白含量标准, 可以考虑将该方法纳入新版《中国药典》, 以促进该制品质量的提高并与国际接轨。

关键词: 粒细胞集落刺激因子; 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)11-1870-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.11.03

Analysis of product related proteins in the bulk of recombinant granulocyte-colony stimulating factor produced in China using European Pharmacopoeia method*

HAN Chun-mei, LIU Lan, SHI Xin-chang, TAO Lei**, 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 analyze and evaluate the content of product related proteins in the bulk of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor produced in China, and also to provide the basis for improving the standard of Chinese Pharmacopoeia. **Methods:** After a comparison of the international primary pharmacopoeias, the most commonly used method was selected to analyze the content of product related proteins in the collected samples. **Results:** The method in European Pharmacopoeia (EP) is the most general method, and it was used to

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

刘兰 Tel:(010)67095604; E-mail: liulan@nifdc.org.cn

analyze the 33 lots of bulk produced by 12 manufacturers. Results showed that 13 lots of bulk produced by five manufacturers met the EP standard, and the rest of samples were not in conformity with it. **Conclusion:** In China, there are a considerable number of recombinant human granulocyte colony stimulating factor products that meet the EP standard. It is reasonable to incorporate the EP method into the new version of Chinese Pharmacopoeia in order to improve the quality of the products and to integrate with international standard.

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

粒细胞集落刺激因子 (granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF) 由活化的单核细胞、巨噬细胞、成纤维细胞等细胞分泌, 主要生物学作用是促进中性粒细胞的增值和分化^[1]。重组人 G-CSF (rhG-CSF) 由 175 个氨基酸组成, 相对分子质量为 18 799, 其中含有 5 个半胱氨酸, 形成两条二硫键 (Cys37-Cys43, Cys65-Cys75), 二硫键的形成对于维持 G-CSF 的生物学功能是必需的^[2]。1996 年, 国产 rhG-CSF 批准上市, 用于治疗放疗后的中性粒细胞减少症^[3-4]。

作为重组蛋白, rhG-CSF 在生产和储存过程中可能会发生氧化^[5-6]、还原等反应, 导致理化特性甚至生物学活性改变, 这类新形成的物质称为制品相关蛋白^[7]。2005 年版《中华人民共和国药典》三部已将“重组人粒细胞刺激因子注射液”纳入各论, 限于当时的技术条件, 检定内容无制品相关蛋白检测项目^[8]。2010 年版在 2005 年版的基础上稍作改动^[9], 2015 年版与 2010 年版一致^[10]。经过 10 多年的发展, “重组人粒细胞刺激因子注射液”各论仍缺少“制品相关蛋白”检测项目。

在以上背景下, 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, 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。本研究通过对比国外主流药典^[11-13], 选择最通用的欧洲药典 (EP) 中所列方法, 对国内 rhG-CSF 原液的制品相关蛋白含量进行了分析检测, 以期为该制品药典标准的提高提供数据支持。

1 材料

超纯水为密理博超纯水机制备; 乙腈为色谱纯; 三氟乙酸、甲酸、L- 甲硫氨酸、双氧水均为分析纯; 二硫苏糖醇 (DTT, 纯度 $\geq 99\%$) 购自 Sigma Aldrich 公司; rhG-CSF 原液从国内 12 家生产企业征集, 共 33 批; rhG-CSF 对照品来自于中国食品药品检定研究院

蛋白含量测定国家标准品, 批号 270023-200801。

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 液质联用仪 (Waters 公司)。

2 方法

2.1 国外主流药典所列方法的对比

本研究参考 EP 9.3、美国药典 (USP 41)、日本药典 (JP 17) 等国外主流药典, 比较其中收录的 rhG-CSF 的制品相关蛋白检测方法, 选择通用性最好的 EP 方法, 对国内 rhG-CSF 原液进行分析测定。

2.2 按 EP 9.3 方法进行制品相关蛋白含量分析

样品处理: 待检 rhG-CSF 原液用超纯水稀释至 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 取 rhG-CSF 对照品用超纯水稀释至 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 即为对照品溶液 A; 取 $250 \mu\text{L}$ 对照品溶液 A, 加入 $4.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的双氧水 $2.5 \mu\text{L}$, 混匀后于 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 放置 30 min, 再加入甲硫氨酸 1.9 mg , 即为对照品溶液 B; 取 $250 \mu\text{L}$ 对照品溶液 A, 加入 DTT 0.25 mg , 混匀后于 $(35 \pm 2)^\circ\text{C}$ 温浴 60 min, 即为对照品溶液 C。

色谱条件: 色谱柱为 TSKgel Protein C₄-300 ($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$); 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 ($0 \sim 30 \text{ min}$, $60\% \text{A} \rightarrow 20\% \text{A}$); 流速: $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温: 60°C ; 进样体积: $50 \mu\text{L}$; 检测波长: 215 nm 。

数据处理: rhG-CSF 保留时间约 23 min; 氧化 rhG-CSF (1) 与 rhG-CSF 保留时间的比约为 0.84; 氧化 rhG-CSF (2) 与 rhG-CSF 保留时间的比约为 0.98; 还原型 rhG-CSF 与 rhG-CSF 保留时间的比约为 1.04。

系统适用性要求: 供试品与对照品主峰的保留时间应基本一致; 供试品主峰的峰形应与对照品一致; 对照品溶液 B 主峰 (rhG-CSF) 的对称因子最大不超过 1.8; 峰谷比不小于 2.0 (H_p 指氧化峰 2 在基

线以上的峰高; H_v 指氧化峰 2 与主峰之间最低点的高度); 对照品溶液 C 主峰和还原产物的分离度应不低于 1.5, 主峰 (rhG-CSF) 的对称因子最大不超过 1.8。

判定标准: 用归一化法计算供试品溶液图谱中各峰的含量, 任何杂质不超过 1.0%, 杂质总量不超过 2.0%。

2.3 液质联用鉴定未知制品相关蛋白

样品处理及液相色谱仪参数同“2.2”, 质谱仪采用 MS 模式采集数据; 毛细管电压: 3 000 V; Cone 电压: 40 V; 去溶剂气体温度: 350 °C; 源温: 120 °C;

去溶剂气体流速: 800 L·h⁻¹, 扫描范围 (m/z): 500~3 000; 采用 Unify 操作软件进行数据处理。

3 结果

3.1 国外药典检测方法对比结果

通过对比 EP 9.3、USP 41、JP 17 所列方法, 发现 USP 41 与 EP 9.3 检测方法一致, 仅在系统适应性要求、数据处理及结果判定方面稍有差别 (见表 1); JP 17 虽收录了 rhG-CSF, 但无制品相关蛋白检测项目。可见 EP 9.3 所列方法最为通用, 因此本研究以该方法对国产 rhG-CSF 原液进行制品相关蛋白含量测定。

表 1 EP 9.3 与 USP 41 中制品相关蛋白检测方法的比较

Tab. 1 Comparison of methods for detecting product related proteins in EP 9.3 and USP 41

项目 (item)	EP 9.3	USP 41
流动相 (mobile phase)	A: 0.1% TFA B: 0.1%, 90% ACN	/
色谱柱 (column)	C ₄ (4.6 mm × 150 mm, 3 μm)	/
柱温 (column temperature)/°C	60	/
流速 (flow rate)/(mL·min ⁻¹)	0.8	/
进样量 (inject volume)/μL	50 (0.5 mg·mL ⁻¹)	33 (0.75 mg·mL ⁻¹)
检测波长 (wavelength)/nm	215	/
系统适用性 (system suitability)	对称因子 (symmetry factor) ≤ 1.8 峰谷比 (peak-to-valley ratio) ≥ 2.0 分离度 (resolution) ≥ 1.5	总面积及保留时间的 RSD ≤ 5% (RSD of total area and retention time ≤ 5%)
保留时间 (retention time)/min	≈ 23	
相对保留时间 (relative retention time)	氧化型 (oxidized) 1 ≈ 0.84 氧化型 (oxidized) 2 ≈ 0.98 还原型 (reduced) ≈ 1.04	氧化型 (oxidized) 1 ≈ 0.91 氧化型 (oxidized) 2 ≈ 0.98 还原型 (reduced) ≈ 1.04
判定标准 (standard)/%	任一杂质 (any) ≤ 1.0 杂质总量 (sum) ≤ 2.0	还原型 (reduced) ≤ 1.0 杂质总量 (sum) ≤ 2.0

注 (note): “/” 表示与 EP 9.3 一致 (“/” indicates consistency with EP 9.3)

3.2 制品相关蛋白含量检测结果

按 EP 9.3 所列的 rhG-CSF 制品相关蛋白检测方法, 对国内 12 家生产企业的 33 批原液进行检测, 结果显示, 4 家企业的原液达到了 EP 9.3 的标准, 1 家企业的部分批次达到了 EP 9.3 标准, 其余 7 家企业的产品不符合 EP 9.3 标准 (见表 2)。

另外, 由于 EP 9.3 与 USP 41 在结果判定方面存在少许差异 (见表 1), 样品 8-1 中最大组分为氧化峰 2 (见图 1), 含量为 1.1%, 按 EP 9.3 标准不合格, 但是按 USP 41 标准合格。33 批原液中仅 1 批存在该情况, 其余样品按 EP 9.3 与 USP 41 判定结果一致。

3.3 部分样品的制品相关蛋白分析

欧洲药典所列的方法通过对对照品溶液的氧化及还原处理得到了 G-CSF 的氧化峰及还原峰, 可以指示样品中的相应制品相关蛋白。但是, 有些样品中除氧化峰及还原峰外, 还存在其他种类的制品相关蛋白, 如样品 9, 在主峰与还原峰之间存在含量较高的未知峰 (图 1 中样品 9-1), 经质谱鉴定为乙酰化峰, 实测相对分子质量为 18 841.20 (见图 2, G-CSF 乙酰化后理论相对分子质量为 18 840.92)。检测发现, 有 2 家企业生产的原液存在此种情况, 乙酰化峰的出现可能与生产工艺有关, 乙酰化对制品的影响以及对该类结果如何判定, 还需要后续的研究讨论。

表 2 国产 rhG-CSF 原液制品相关蛋白含量测定结果

Tab. 2 Contents of product related proteins in rhG-CSF bulk produced in China

样品 (sample)	总含量 (total sum)/%	最大组分含量 (maximum component)/%	是否符合 欧洲药典 (Does it meet EP standard?)	是否符合 美国药典 (Does it meet USP standard?)	样品 (sample)	总含量 (total sum)/%	最大组分含量 (maximum component)/%	是否符合 欧洲药典 (Does it meet EP standard?)	是否符合 美国药典 (Does it meet USP standard?)
1-1	0.9	0.6	✓	✓	6-3	2.5	0.7	×	×
1-2	0.8	0.4	✓	✓	7-1	3.4	1.3	×	×
1-3	0.8	0.4	✓	✓	7-2	2.5	0.8	×	×
2-1	1.9	0.5	✓	✓	7-3	2.6	0.9	×	×
2-2	1.4	0.5	✓	✓	8-1	1.7	1.1	×	✓
2-3	1.5	0.5	✓	✓	8-2	2.2	1.0	×	×
3-1	0.4	0.3	✓	✓	8-3	1.3	0.8	✓	✓
3-2	0.6	0.4	✓	✓	9-1	6.8	4.5	×	×
3-3	0.6	0.4	✓	✓	9-2	7.8	6.5	×	×
4-1	0.5	0.4	✓	✓	9-3	9.1	8.1	×	×
4-2	0.4	0.4	✓	✓	10-1	10.4	6.5	×	×
4-3	0.6	0.5	✓	✓	11-1	6.2	4.3	×	×
5-1	2.1	1.4	×	×	11-2	6.2	4.2	×	×
5-2	2.1	1.3	×	×	11-3	6.2	4.2	×	×
5-3	1.8	1.1	×	×	12-1	2.9	2.4	×	×
6-1	3.1	1.0	×	×	12-2	2.7	1.8	×	×
6-2	2.6	0.8	×	×					

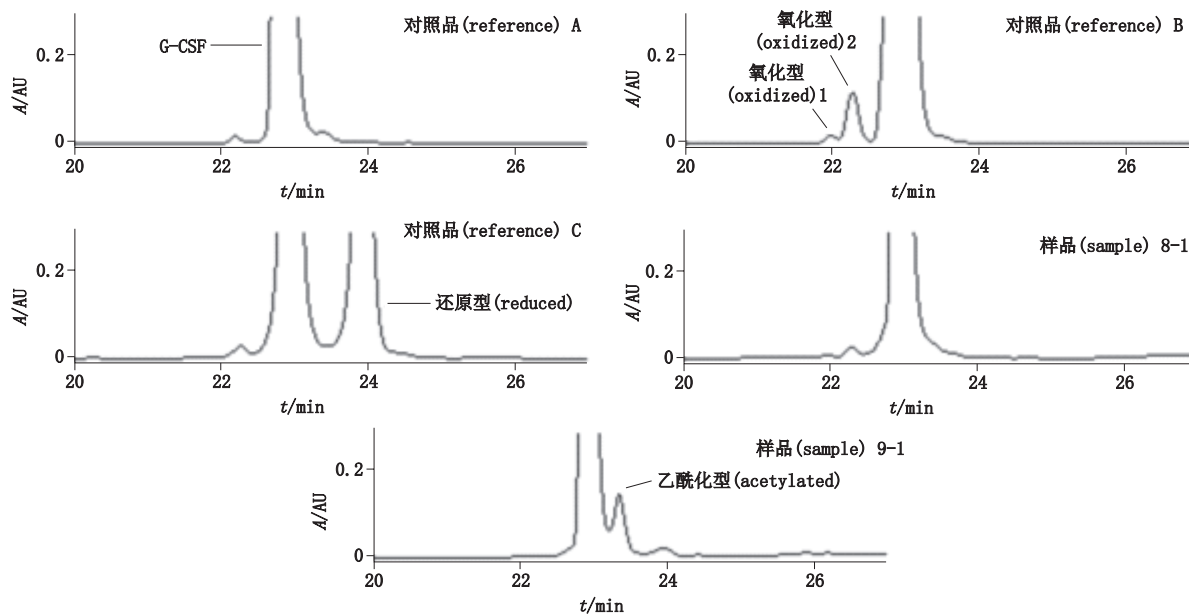


图 1 部分样品的制品相关蛋白测定图谱

Fig. 1 Chromatograms of some samples for detecting product related proteins

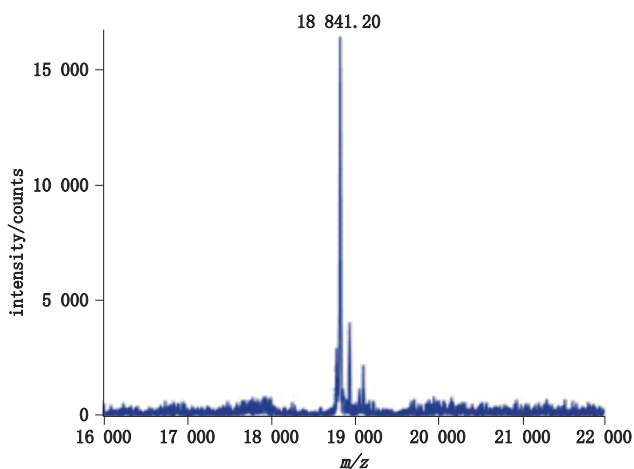


图 2 样品 9-1 中乙酰化峰的质谱图

Fig. 2 The mass spectrum of acetylated peak in sample 9-1

4 讨论

国产 G-CSF 从 1996 年批准上市至今,经历了 20 余年的发展,共有 16 家企业获得批准文号。本次研究对其中 12 家生产企业的 33 批原液进行了测定,结果具有一定的代表性。测定结果显示,4 家企业达到了欧洲药典的标准,1 家企业的部分批次达到了欧洲药典标准,其余 7 家企业的产品不符合欧洲药典标准。从厂家数量来说,符合欧洲药典标准的占少数;但是从市场占有率看,4 家合格企业及原研厂家的产品占比接近 70%。以上情况说明,经过 20 多年的发展进步,我国市场上的大部分 G-CSF 制品的对应原液已符合欧洲药典的制品相关蛋白的标准,目前已经具备了提高药典标准、淘汰质量较差产品的条件。

另一方面,国外 G-CSF 药物的发展趋势显示,长效 G-CSF 以显著的治疗优势逐渐成为市场主流^[14-16],占据约 70% 的全球市场份额。目前,国内有 3 家企业生产的长效 G-CSF 上市,虽然国内市场还是以短效 G-CSF 占据主导地位,但是,随着 2017 年医保目录调整,长效 G-CSF 进入国家医保乙类目录,国内长效 G-CSF 将进入快速发展期。在此节点,提高 G-CSF 的药典标准,淘汰落后产品,促进国内 G-CSF 药物市场的升级换代变得十分必要。

综上所述,本研究利用欧洲药典方法对国产 rhG-CSF 原液进行了制品相关蛋白含量的测定,测定结果支持提高药典标准,将制品相关蛋白含量项目纳入新版药典。

参考文献

- [1] NAGATA S. Gene structure and function of granulocyte colony-stimulating factor [J]. *Bioessays*, 1989, 10(4): 113
- [2] LU HS, CLOGSTON CL, NARHI LO, *et al.* Folding and oxidation of recombinant human granulocyte colony stimulating factor produced in *Escherichia coli*. Characterization of the disulfide-reduced intermediates and cysteine-serine analogs [J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(13): 8770
- [3] KOLOC G, SCHARNWEBER K. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: an overview [J]. *J Intraven Nurs*, 1993, 16(4): 234
- [4] CARULLI G. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor and neutrophil phenotype [J]. *Br J Haematol*, 1995, 91(2): 513
- [5] 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
- [6] KRYNDUSHKIN D, WU WW, VENNA R, *et al.* Complex nature of protein carbonylation specificity after metal-catalyzed oxidation [J]. *Pharm Res*, 2017, 34(4): 765
- [7] 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
- [8] 中华人民共和国药典 2005 年版. 三部 [S]. 2005: 236
ChP 2005. Vol III [S]. 2005: 236
- [9] 中华人民共和国药典 2010 年版. 三部 [S]. 2010: 296
ChP 2010. Vol III [S]. 2010: 296
- [10] 中华人民共和国药典 2015 年版. 三部 [S]. 2015: 341
ChP 2015. Vol III [S]. 2015: 341
- [11] EP 9.3 [S]. 2017: 4899
- [12] USP 41 [S]. 2017: 1739
- [13] JP 17. Vol XVII [S]. 2016: 929
- [14] MORISHITA M, LEONARD RC. Pegfilgrastim; a neutrophil mediated granulocyte colony stimulating factor-expanding uses in cancer chemotherapy [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2008, 8(7): 993
- [15] AAPRO M, BOCCIA R, LEONARD R, *et al.* Refining the role of pegfilgrastim (a long-acting G-CSF) for prevention of chemotherapy-induced febrile neutropenia: consensus guidance recommendations [J]. *Support Care Cancer*, 2017, 25(11): 3295
- [16] KUAN JW, SU AT, LEONG CF, *et al.* Pegylated granulocyte-colony stimulating factor versus non-pegylated granulocyte-colony stimulating factor for peripheral blood stem cell mobilization: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Clin Apher*, 2017, 32(6): 517

(本文于 2018 年 9 月 1 日收到)