



## 重组人 C1 酯酶抑制剂中 rcc-rhC1INH 和 ox-rhC1INH 含量检测\*

秦玺, 姚文荣, 丁有学, 史新昌, 韩春梅, 陶磊, 李永红\*\*, 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: 分析重组人 C1 酯酶抑制剂 (rhC1INH) 中相关蛋白 rcc-rhC1INH 和 ox-rhC1INH 的含量。方法: 采用反相高效液相色谱法进行测定, 对该方法进行专属性、准确性和精密度检验, 并用该方法对 4 批样品中的相关蛋白进行检测。结果: 低浓度下, rhC1INH 对照品、rcc-rhC1INH 对照品和 ox-rhC1INH 对照品能够较好分离。rcc-rhC1INH 和 ox-rhC1INH 2 种对照品质量浓度为 0.2、1 和 1.4 mg·mL<sup>-1</sup> 时的回收率均在 85%~115% 的范围内。对同 1 批 3 个待测样品进行测定, rcc-rhC1INH 含量为 (0.082±0.008)%, RSD 为 9.8%; ox-rhC1INH 含量为 (0.35±0.05)%, RSD 为 14.3%, 显示该方法具有较好的专属性、准确性和精密度。4 批测试样品中, rcc-rhC1INH 的含量分别为 0.083%、0.021%、0.033%、0.042%, ox-rhC1INH 的含量分别为 0.34%、0、0、0。结论: 经方法学验证, RP-HPLC 方法可用于 rhC1INH 中 rcc-rhC1INH 和 ox-rhC1INH 的含量检测。

**关键词:** 重组人 C1 酯酶抑制剂 (rhC1INH); 反相高效液相色谱; rcc-rhC1INH; ox-rhC1INH; 含量检测

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2018)11-1911-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.11.10

## Determination of rcc-rhC1INH and ox-rhC1INH in the recombinant human C1 esterase inhibitor\*

QIN Xi, YAO Wen-rong, DING You-xue, SHI Xin-chang, HAN Chun-mei, TAO Lei, LI Yong-hong\*\*, 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 analyze the contents of related proteins rcc-C1INH and ox-C1INH in the recombinant human C1 esterase inhibitor (rhC1INH). **Methods:** The reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) was used to determine the relative proteins, the test was verified in specificity, accuracy and

\* 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

李永红 Tel:(010)67095684; E-mail: liyh@nifdc.org.cn

第一作者 秦玺 Tel:(010)67095359; E-mail: qinxi@nifdc.org.cn

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

precision, and was used to detect the rcc-C1INH and ox-C1INH in 4 batches of samples. **Results:** RhC1INH reference, rcc-rhC1INH reference and ox-rhC1INH reference could be well separated under the low concentrations. The recovery rates for the reference substances of rcc-C1INH and ox-C1INH at three concentrations (0.2, 1 and 1.4 mg · mL<sup>-1</sup>) were all in the range of 85%~115%. Three groups from one batch were determined separately, the contents of rcc-C1INH were (0.082 ± 0.008)%, and the contents of ox-C1INH were (0.35 ± 0.05)%, with RSDs of 9.8% and 14.3%, respectively. This method showed good results in specificity, accuracy and precision. Four batches of rhC1INH were determined, the contents of rcc-C1INH were 0.083%, 0.021%, 0.033% and 0.042% for each, and ox-C1INH were 0.34%, 0, 0, and 0, respectively. **Conclusion:** RP-HPLC can be used for the content determination of rcc-rhC1INH and ox-rhC1INH in rhC1INH.

**Keywords:** recombinant human C1 esterase inhibitor (rhC1INH); reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC); rcc-C1INH; ox-C1INH; content detection

C1 酯酶抑制剂 (C1 esterase inhibitor, C1INH) 于 1957 年由 Ratnoff 等发现并首次报道<sup>[1]</sup>。C1INH 是 serpin 超家族中的 1 种丝氨酸蛋白酶抑制剂, 是 1 种血浆单链糖蛋白, 包含 478 个氨基酸<sup>[2]</sup>。人的 C1INH 相对分子质量约为 104 k, 重组人 C1INH (rhC1INH) 糖基化程度较低, 相对分子质量约为 98 k<sup>[3]</sup>。C1INH 有 2 个结构域: 1 个是由 366 个氨基酸组成的 C- 端丝氨酸蛋白酶抑制剂结构域, 含有 1 个由 20 个氨基酸组成的外露的活性中心环 (RCL); 另 1 个是由 112 个氨基酸组成的 N- 端非蛋白酶抑制剂结构域<sup>[4-5]</sup>。C1INH 是四大血浆级联系统的中心调节物质, 在补体系统、缓激肽释放系统、凝血系统和纤溶系统中, 均发挥重要的功能<sup>[4, 6-7]</sup>。在缓激肽释放系统中, C1INH 可抑制激肽释放酶与活化的凝血因子 XII (FXIIa) 的活性, 进而抑制缓激肽的形成<sup>[5]</sup>, 而缓激肽可通过引起毛细血管扩张和渗透压提高, 导致血管内容物渗出, 形成局部水肿, 诱发遗传性血管水肿 (hereditary angioedema, HAE)<sup>[8]</sup>, 严重的可导致窒息死亡。

在该系统中, C1INH 与靶蛋白酶结合后, RCL 插入靶蛋白的 b 折叠区域中心, 然后水解抑制剂与靶蛋白结合形成的乙酰键。在这一相互作用中, 靶蛋白的丝氨酸活性中心和 C1INH 的 RCL 的 P1 残基 (决定蛋白酶特异性的主要残基) 间形成 1 个共价键, 导致 P1 和 P1' 残基间的肽键被切断, 形成了 C1INH 与靶蛋白的 1:1 复合物, 并伴随靶蛋白活性的丧失, 由此发挥 C1INH 的抑制活性。C1INH 在发挥蛋白酶抑

制剂的作用后, RCL 裂解, 丧失蛋白酶抑制剂功能, 成为失活的 C1INH (inactivated C1INH, iC1INH), 也称为反应中心断裂的 C1INH (reactive center cleaved C1INH, rcc-C1INH)。

而 rhC1INH 在生产及储存过程中, 某些特定氨基酸 (如甲硫氨酸等) 可能会被氧化, 形成氧化 rhC1INH (oxidized C1INH, ox-rhC1INH), 虽然氧化不能导致蛋白完全失活, 但可显著降低蛋白的生物学活性。rcc-rhC1INH 和 ox-rhC1INH 的形成与 rhC1INH 制品的有效性和稳定性密切相关, 因此需要对 rcc-rhC1INH 和 ox-rhC1INH 进行质量控制。

本研究采用反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 技术, 建立了针对 rhC1INH 制品中 rcc-rhC1INH 和 ox-rhC1INH 质量控制的方法, 并用该方法对 4 批 rhC1INH 制品中的 rcc-rhC1INH 和 ox-rhC1INH 进行了检测。

## 1 仪器与试剂

HPLC 色谱仪 (Waters 2659 分离器, 2487/2489 紫外检测器, Empower 工作站); RP-C4 蛋白保护柱 (Grace Vydac, 2.1 mm × 7.5 mm, 5 μm); RP-C4 蛋白分析柱 (Grace Vydac, 3.0 mm × 250 mm, 5 μm)。

三氟乙酸 (TFA) (分析纯, Aladdin); 乙腈 (色谱纯, Merck); 核糖核酸酶 A、溶菌酶均为分析纯。

rhC1INH (S1, S2, S3 和 S4 共计 4 批供试品, 科室留存); rhC1INH 对照品 (40 mg · mL<sup>-1</sup>)、rcc-rhC1INH 对照品 (40 mg · mL<sup>-1</sup>) 和 ox-rhC1INH 对照品 (40 mg · mL<sup>-1</sup>) (科室留存)。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的配制

**2.1.1 空白对照溶液** 采用 PBS 溶液 (pH 7.0) 作为空白对照溶液。

**2.1.2 对照品混合溶液** 取 rhC11NH、rcc-rhC11NH 及 ox-rhC11NH 对照品, 分别用 PBS 溶液溶解并稀释成  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 将  $500 \mu\text{L}$  rhC11NH 对照品溶液和  $500 \mu\text{L}$  rcc-rhC11NH 对照品溶液涡旋混合均匀。

**2.1.3 系统适用性溶液** 用 PBS 配制质量浓度分别为  $0.03 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的核糖核酸酶 A 和溶菌酶的混合溶液。

**2.1.4 供试品溶液的预处理** 用 PBS 溶液将供试品稀释至  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

### 2.2 色谱条件

采用带 Grace Vydac RP-C4 蛋白保护柱的 Grace Vydac RP-C4 蛋白分析柱; 柱温  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ; 检测波长  $214 \text{ nm}$ ; 进样量  $15 \mu\text{L}$ ; 流速  $0.29 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 用流动相 A (0.1% TFA 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	80	20
10	44	56
23	44	56
25	5	95
30	5	95
35	80	20
55	80	20

### 2.3 系统适用性

取系统适用性溶液和空白溶液, 按“2.2”项色谱

条件, 分别检测核糖核酸酶 A 和溶菌酶含量。如图 1 所示, 核糖核酸酶 A 的保留时间为  $10.07 \text{ min}$ , 峰面积为  $3.21 \times 10^5 \mu\text{V} \times \text{s}$ , 塔板数为  $1.72 \times 10^4$ ; 溶菌酶的保留时间为  $12.36 \text{ min}$ , 峰面积为  $1.46 \times 10^6 \mu\text{V} \times \text{s}$ , 塔板数为  $4.61 \times 10^4$ 。各项数据表明, 适合用于该试验中相关物质的分离。

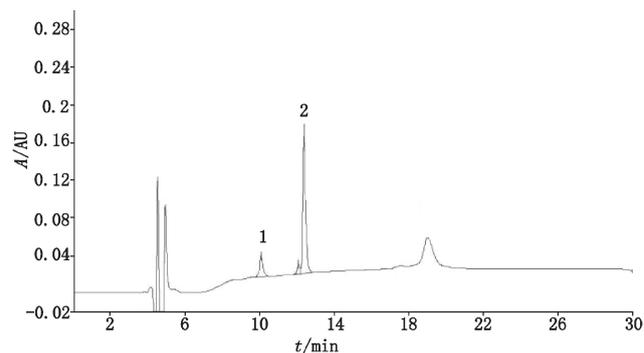


图 1 核糖核酸酶 A (1) 和溶菌酶 (2) 的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of ribonuclease A (1) and lysozyme (2)

### 2.4 专属性验证

取 rhC11NH 对照品溶液、rcc-rhC11NH 对照品溶液、ox-rhC11NH 对照品溶液和对照品混合溶液, 按“2.2”项色谱条件, 分别检测 rhC11NH、rcc-rhC11NH、ox-rhC11NH 含量以及 rhC11NH 与 rcc-rhC11NH 的分离度。结果显示 (见图 2), 三者单独色谱的峰面积分别为  $6.45 \times 10^7$ 、 $8.79 \times 10^6$  和  $9.05 \times 10^6$ , 塔板数分别为  $5.85 \times 10^3$ 、 $2.78 \times 10^4$ 、 $1.34 \times 10^4$ 。在对照品混合溶液的色谱图中, rhC11NH 与 rcc-rhC11NH 2 个主峰之间的分离度为 3.19 (图 2-D)。在 rhC11NH 与 rcc-rhC11NH 浓度较低时 (图 2-A、B), ox-rhC11NH 均能与较低浓度的 rhC11NH 或 rcc-rhC11NH 较好分离; 而 rhC11NH 或 rcc-rhC11NH 浓度较高时, ox-rhC11NH 对照品峰形有稍许拖尾或前伸。

### 2.5 精密度验证

取 1 批供试品 (供试品 S1), 按“2.2”项色谱条件测定 6 次, 对试验的精密度进行验证, 结果如表 2 所示。该批供试品中, rcc-rhC11NH 含量占总量的比例为  $(0.082 \pm 0.010)\%$ , RSD 为 12.2%; ox-rhC11NH 含量占总量的比例为  $(0.35 \pm 0.05)\%$ , RSD 为 14.3%。

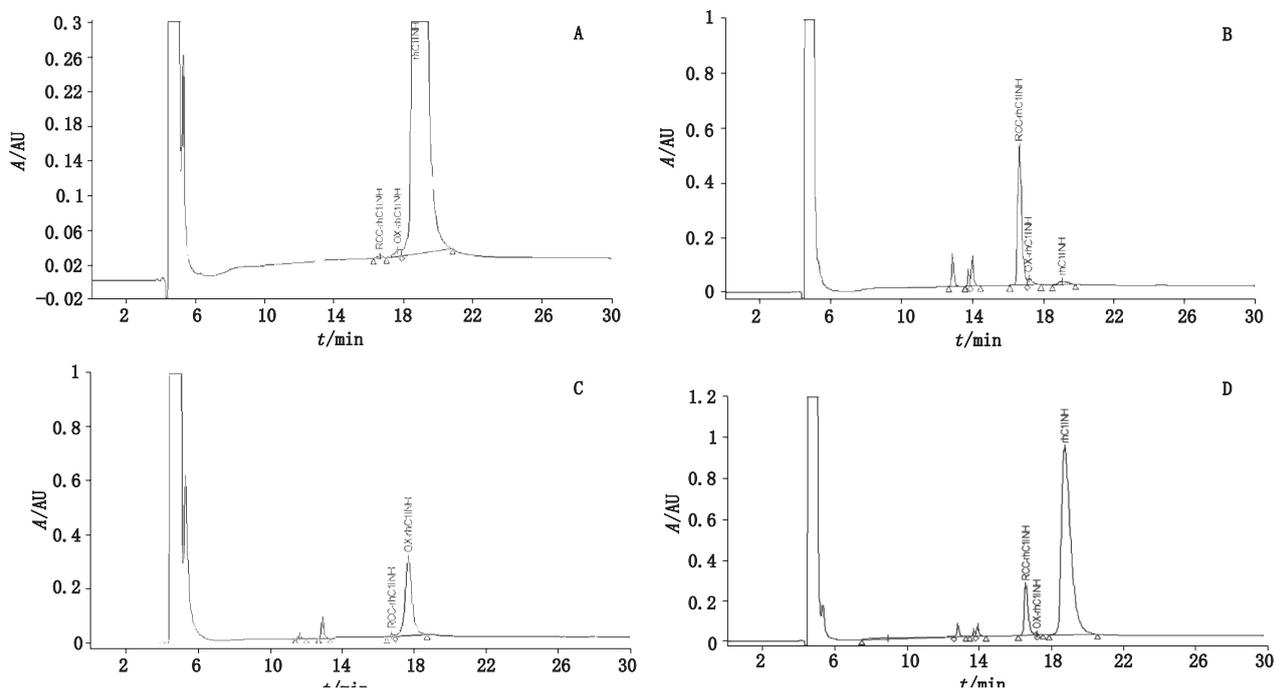


图 2 rhC11NH 对照品 (A), rcc-rhC11NH 对照品 (B), ox-rhC11NH 对照品 (C) 及 rhC11NH 对照品和 rcc-rhC11NH 对照品混合溶液 (D) 色谱图  
 Fig. 2 The chromatograms of rhC11NH reference substance (A), rcc-rhC11NH reference substance (B), ox-rhC11NH reference substance (C) and the mixture of rhC11NH reference substance and rcc-rhC11NH reference substance (D)

表 2 精密度试验结果

Tab. 2 The result of precision

试验次数 (test time)	rcc-rhC11NH 含量 (content of rcc-rhC11NH) (%)	ox-rhC11NH 含量 (content of ox-rhC11NH) (%)
1	0.067	0.29
2	0.077	0.31
3	0.080	0.34
4	0.085	0.33
5	0.088	0.41
6	0.095	0.39
$\bar{X} \pm SD$	$0.082 \pm 0.010$	$0.35 \pm 0.05$
RSD/%	12.2	14.3

## 2.6 回收率试验

**2.6.1 rcc-rhC11NH 回收率** 将 1 批供试品 (供试品 S1) 分为高、中、低剂量 (900、500、300  $\mu\text{L}$ ) 组,

再分别加入 rcc-rhC11NH 对照品 100、500、700  $\mu\text{L}$ , 得到 rcc-rhC11NH 对照品浓度分别为 0.2、1 和 1.4  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的高、中、低 3 种浓度的加标供试溶液, 按“2.2”项色谱条件进行检测, 每组重复测定 3 次, 计算最终 rcc-rhC11NH 含量, 均值减去各剂量组初始所含 rcc-rhC11NH ( $0.00166 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 后, 除以所加 rcc-rhC11NH 对照品的含量, 计算 rcc-rhC11NH 回收率。

**2.6.2 ox-rhC11NH 回收率** 同时, 在该批供试品高、中、低剂量组中分别加入 ox-rhC11NH 对照品 100、500、700  $\mu\text{L}$ , 得到 ox-rhC11NH 对照品浓度分别为 0.2、1 和 1.4  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的高、中、低 3 种浓度的加标供试溶液, 按“2.2”项色谱条件进行检测, 每组重复测定 3 次, 计算最终 ox-rhC11NH 含量, 均值减去各剂量组初始所含 ox-rhC11NH ( $0.0068 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 后, 除以所加 ox-rhC11NH 对照品的含量, 计算 ox-rhC11NH 回收率。

结果 (表 3) 显示, rcc-rhC11NH 和 ox-rhC11NH 3 种浓度下的回收率均在 85%~115% 之间, 表明试验体系无干扰, 试验结果有较高的准确性。

表 3 1 批供试品不同加标浓度的回收率结果

Tab. 3 Recovery rates of one batch of test samples at three added standard concentrations

加标浓度 (spiked content)/ (mg · mL <sup>-1</sup> )	rcc-rhC1INH			ox-rhC1INH		
	检测值 (detection value)/(mg · mL <sup>-1</sup> )	回收率 (recovery)/%	RSD/%	检测值 (detection value)/(mg · mL <sup>-1</sup> )	回收率 (recovery)/%	RSD/%
0.2	0.193	95.7	1.8	0.182	87.6	7.1
1	0.963	96.1	0.84	0.994	98.7	6.4
1.4	1.575	112.4	6.2	1.522	108.2	4.8

### 2.7 方法的初步应用

取 rhC1INH 对照品溶液、rcc-rhC1INH 对照品溶液、ox-rhC1INH 对照品溶液和 4 批供试品,分别按“2.2”项色谱条件进行检测,供试品重复测定 2 次,计算 4 批供试品中 rcc-rhC1INH 和 ox-rhC1INH 的百分含量。结果见表 4。

表 4 3 批供试品中 rcc-rhC1INH 和 ox-rhC1INH 的含量测定

Tab. 4 Content determination for rcc-rhC1INH and ox-rhC1INH of 3 batches of test samples

供试品 (sample)	rcc-rhC1INH		ox-rhC1INH	
	平均峰面积值 (average of peak area)	含量 (content)/%	平均峰面积值 (average of peak area)	含量 (content)/%
S1	50220	0.083	203439	0.34
S2	16906	0.021	—	0
S3	19561	0.033	—	0
S4	25783	0.042	—	0

注 (note): “—” 表示未检出 (“—” means not detected)

### 3 讨论

rhC1INH 的反应中心断裂后,丧失了蛋白酶抑制活性<sup>[9]</sup>,导致无法用于 HAE 的治疗。此外,蛋白质中许多氨基酸残基侧链可被包括氧自由基的氧化剂氧化,即使在温和的条件下,半胱氨酸和蛋氨酸也有可能被氧化,是影响蛋白制品稳定的主要因素之一<sup>[10]</sup>。因此,出于稳定性和有效性的考虑,在 rhC1INH 制品中,rcc-rhC1INH 和 ox-rhC1INH 的定量分析是必不可缺少的指标。

生物制品的杂质主要分为产品相关杂质和工艺相关杂质<sup>[11]</sup>。产品相关杂质(蛋白)主要源于生物技术产品异质性和降解产物,会严重影响产品的有效性、稳定性以及安全性,因此要加以检测控制。末端氨基酸异质性、电荷异质性、分子大小变异体以及各类翻译后修饰等异质性可能导致产品中存在几种分子或变异体,如变异体的活性与目标产品不一致时,可用多种方法对其进行检测控制<sup>[12-15]</sup>;而来自于生产和储存过程的降解产物,一般采用高效液相色谱等方法进行检测<sup>[16]</sup>。本实验建立了检测 rhC1INH 制品中相关蛋白 rcc-rhC1INH 和 ox-rhC1INH 的 RP-HPLC 方法,该方法重复性好,精密度较高,符合对 rhC1INH 产品中 rcc-rhC1INH 和 ox-rhC1INH 的质量控制要求。实验过程中,rcc-rhC1INH 和 ox-rhC1INH 在样品 S1 中的含量均高于其在样品 S2、S3 和 S4 中的含量,可能与后 3 批样品和 S1 的储存时间不同有关。供试品 S1 生产后的储存时间比后 3 批供试品多出近 1 年时间,而后 3 批供试品的储存时间大体相同,因此,rcc-rhC1INH 和 ox-rhC1INH 的形成速度也影响了供试品有效期的长短。

### 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] ZEERLEDER S. C1-inhibitor: more than a serine protease inhibitor [J]. Semin Thromb Hemost, 2011, 37(4): 362
- [3] 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
- [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] WAGENAAR-BOS IG, HACK CE. Structure and function of C1-inhibitor [J]. *Immunol Allergy Clin North Am*, 2006, 26(4): 615
- [6] JOSEPH K, THOLANIKUNNEL BG, KAPLAN AP, *et al.* Factor XII-independent cleavage of high-molecular-weight kininogen by prekallikrein and inhibition by C1 inhibitor [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 124(1): 143
- [7] CALIEZI C, WUILLEMIN WA, ZEERLEDER S, *et al.* C1-esterase inhibitor: an anti-inflammatory agent and its potential use in the treatment of diseases other than hereditary angioedema [J]. *Pharmacol Rev*, 2000, 52(1): 91
- [8] BORK K, STEFFENSEN I, MACHNIG 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
- [9] 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  
WANG FF, LI CS. Progress in research on C1 esterase inhibitor [J]. *Chin J Biologicals*, 2017, 30(11): 1227
- [10] 陶蔚孙, 李惟, 姜涌明. 蛋白质的分子基础 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 276  
TAO YS, LI W, JIANG YM. *The Molecular Basis of Protein* [M]. Beijing: Higher Education Press, 2002: 276
- [11] 中华人民共和国药典 2015 年版. 三部 [S]. 2015: 37, 41  
ChP 2015. Vol III [S]. 2015: 37, 41
- [12] 史新昌, 杨靖清, 韩春梅, 等. N-末端氨基酸测序数据估计 N-末端不均一的单链重组蛋白制品主肽链比例方法的建立 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2016, 29(10): 1073  
SHI XC, YANG JQ, HAN CM, *et al.* Estimation of most-peptide-chain-component-ratio of heterogeneous N-terminal single chain recombinant protein by N-terminal sequencer data [J]. *Chin J Biol*, 2016, 29(10): 1073
- [13] 陶磊, 李响, 周勇, 等. 我国已上市重组人促红细胞生成素的一级结构比较 [J]. *中国药学杂志*, 2016, 51(13): 1071  
TAO L, LI X, ZHOU Y, *et al.* Comparison of primary structure of recombinant human erythropoietin marketed in China [J]. *Chin Pharm J*, 2016, 51(13): 1071
- [14] 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
- [15] 丁有学, 韩春梅, 毕华, 等. SEC-HPLC 法测定 rhTNK-tPA 单链含量 [J]. *药物分析杂志*, 2014, 34(7): 1208  
DING YX, HAN CM, BI H, *et al.* SEC-HPLC chromatography method for determination of rhTNK-tPA's single-chain content [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2014, 34(7): 1208
- [16] 毕华, 韩春梅, 丁有学, 等. 重组人血管内皮生长因子抑制剂中异天门冬氨酸含量检测 [J]. *药物分析杂志*, 2015, 35(5): 879  
BI H, HAN CM, DING YX, *et al.* Determination of isoaspartic acid in the recombinant human vascular endothelial growth factor inhibitor [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2015, 35(5): 879

(本文于 2017 年 9 月 1 日收到)