

标准研讨

重组人促红素理化对照品的质量评价*

李响,陶磊,韩春梅,范文红,秦玺,周勇**,饶春明**

(中国食品药品检定研究院,北京 100050)

摘要 目的: 建立重组人促红细胞生成素的理化对照品的质量标准,对8家企业的促红素理化对照品进行质量评价。**方法:** 用正常小鼠网织红细胞计数法测定体内生物学活性,使用LC-MS绘制质量肽图谱。色谱条件:采用BEH300 C₄色谱柱(2.1 mm×50 mm, 3.5 μm),流动相为水(A)-乙腈(B)-1%甲酸水溶液(C),梯度洗脱(0~60 min, 1%B→60%B, 10%C; 60~61 min, 60%B→90%B, 10%C; 61~75 min, 90%B→1%B, 10%C),流速0.2 mL·min⁻¹,柱温为40℃,样品保存温度为10℃,上样量5 μL;质谱条件:MS^E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℃,源温120℃,去溶剂气流速800 L·h⁻¹,扫描范围m/z 50~2 000。确证一级结构,二硫键连接方式及糖基化位点;绘制N糖图谱,分析寡糖结构;用毛细管区带电泳分析异构体。采用压力进样3.45 kPa;进样时间10 s,分离电压15.4 kV,分离时间80 min,检测波长214 nm。其余检测项目按中国药典2015年版三部方法进行。**结果:** 建立的方法适合促红素理化对照品的检测,各样品的氨基酸序列均与理论一致;二硫键连接方式均为Cys7-Cys161、Cys29-Cys33;O-糖基化位点均为Ser126, N-糖基化位点均为Asn24、Asn38、Asn83;各样品的糖基修饰方式存在差异,不同糖型的相对比例不一致。等电聚焦结果为5~8条电荷异构体条带,不同样品的电荷异构体的组成比例有所差异,蛋白质含量、体内比活性、电泳纯度、液相纯度、等电聚焦、唾液酸含量、N端氨基酸序列、肽图结果均符合拟定的理化对照品质量标准。**结论:** 建立了理化对照品的质量标准,不同企业的理化对照品质量总体稳定一致,但糖基化水平存在一定差异,分析比较了不同企业的促红素理化对照品在生物比活性,糖基化,异构体分布、电荷异质性等方面的差异。

关键词: 重组人促红素;理化对照品;一级结构确证;异构体分析;质量标准;质量评价

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2017)06-1117-10

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.06.26

Quality evaluation of physicochemical reference for recombinant human erythropoietin*

LI Xiang, TAO Lei, HAN Chun-mei, FAN Wen-hong, QIN Xi, ZHOU Yong**, RAO Chun-ming**

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To establish the quality standard of physicochemical reference for recombinant human erythropoietin (rhEPO), and to evaluate the quality of rhEPO physicochemical references from eight

* 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)”资助项目。

** 通信作者 周勇 Tel: (010)67095684; E-mail: zhouy@nicpbp.org.cn

饶春明 Tel: (010)67095380; E-mail: raoem@nicpbp.org.cn

第一作者 Tel: (010)67095586; E-mail: lix@nicpbp.org.cn

pharmaceutical companies. **Methods:** The biological activity *in vivo* was measured by normal mouse reticulocyte count method, and the peptide map was drawn by LC-MS. Chromatographic conditions: BEH300 C4 column (2.1 mm × 50 mm, 3.5 μm) was adopted, the mobile phase was water (A)-acetonitrile (B)-1% formic acid (C) with gradient elution (0-60 min, 1%B → 60%B, 10%C; 60-61 min, 60%B → 90%B, 10%C; 61-75 min, 90%B → 1%B, 10%C) at the flow rate of 0.2 mL · min⁻¹, the column temperature was 40 °C, the sample storage temperature was 10 °C, the sample volume was 5 μL; Mass spectrometry conditions: The data were collected by MS^F model, the capillary voltage was 3000 V, the cone voltage was 40 V, the solvent gas temperature was 350 °C, the source temperature was 120 °C, the solvent gas flow rate was 800 L · h⁻¹, the scan range was *m/z* 500-2 000. The primary structure, the disulfide bond linkage and glycosylation sites were confirmed. N-linked glycosylation maps were drawn and the oligosaccharide structures were analyzed by LC-MS, and the isomers were analyzed by capillary zone electrophoresis. The sample inject pressure was 3.45 kPa, the inject time was 10 s, the separate voltage was 15.4 kV, the separate time was 80 min and the detection wavelength was 214 nm. The rest of the test items were in accordance with the 2015 (3) edition of Chinese Pharmacopoeia. **Results:** The established methods were compared and applied to the tests of rhEPO physicochemical references, and the results met the proposed quality standard for rhEPO physicochemical references. All the samples had consistent amino acid sequence, disulfide bonds (Cys7-Cys161, Cys29-Cys33), O-glycosylation site (Ser126) and N-glycosylation sites (Asn24, Asn38, Asn83), glycosylation patterns of the samples were different, and the relative proportions of the different glycoforms were not consistent. Isoelectric focusing results showed 5-8 charge isomers bands, composition charge isomers of different samples were different. The content of protein, specific activity *in vivo*, electrophoresis purity, liquid phase purity, isoelectric focusing, sialic acid content, N terminal amino acid sequence and peptide mapping results were in line with the physicochemical quality control standard. **Conclusion:** The quality standard for rhEPO physicochemical reference is established, and the qualities of physicochemical references from different companies are generally stable and consistent, but there are some differences in the glycosylation level. Analysis and comparison of differences between rhEPO physicochemical reference from different companies in biological activity.

Keywords: recombinant human erythropoietin; physicochemical reference; prime structure confirm; isoforms analysis; specification; quality evaluation

重组人促红素 (recombinant humanerythropoietin, rhEPO) 是一种应用基因工程技术, 将人 EPO 基因转入哺乳动物细胞内, 高效表达的糖蛋白。其相对分子质量为 18 235 Da (含 165 氨基酸); 糖基化程度高, 具有 3 个 N 糖位点、1 个 O 糖位点, 糖链末端唾液酸化程度高, 糖型较为复杂。促红素能有效增加人体血液中红细胞数量, 提高血液含氧量, 维持和促进正常的红细胞代谢, 主要治疗肾功能不全所致贫血, 包括慢性肾功能衰竭行血液透析、腹膜透析治疗及非透析病人^[1-3]。促红素是目前治疗肾性贫血最有效的药物, 随着市场需求量不断扩大, 必须严格控制药品质量。

完善的质量标准是药品安全有效的重要保障, 在药品质控标准中经常要用到对照品。对照品是确定

药品真伪优劣的对照, 是控制药品质量必不可少的工具。如何对理化对照品进行质量评价是首要解决的问题, 本文按照中国药典 2015 年版三部中人用重组 DNA 蛋白制品质量控制总论指导原则, 从重组人促红素原液的质控标准为基础, 结合理化对照品的特殊性, 拟定了重组人促红素理化对照品评价项目。本次评价所用样品, 来自 8 家国内外企业。文中以 A~H 为这 8 家企业样品编号。本文就理化对照品的理化特性, 糖基化修饰, 异构体比例含量等进行了分析比较, 并按照质量标准对 8 家企业的理化对照品进行质量评价。

1 材料和方法

1.1 仪器及设备

PPSQ-21A 蛋白质 N 末端序列分析仪 (岛津公

司); UV-1601PC 紫外-可见光分光光度计(Beckman 公司); Mini-protein3 电泳仪(GE 公司); Spectra MAX250 酶标仪(MD 公司); 离心机(Beckman 公司); Waters Alliance 2695 高效液相色谱系统(Waters 公司); Waters 2996 二极管阵列检测器(Waters 公司); Waters ACQUITY H-Class 超高效液相色谱系统(Waters 公司); Symmetry 300 C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 150 mm, 3.5 μm; 填料: 十八烷基硅烷键合硅胶; Waters 公司); BEH300 C₄ 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 3.5 mm; 填料: 丁烷基硅烷键合硅胶; Waters 公司); ACQUITY UPLC BEH Glycan 色谱柱(2.1 mm × 150 mm, 1.7 μm; 填料: 亚乙基桥杂化颗粒; Waters 公司); PA800 plus 毛细管电泳仪(Beckman 公司); Xevo G2 QTof 质谱仪(Waters 公司); Masslynx4.2 操作软件(Waters 公司); Biopharmalynx 数据处理软件(Waters 公司); 32 Karat™ 系列软件(Beckman 公司)。

1.2 试验试剂

Trypsin 试剂盒(Calbiochem 公司); 糖苷酶 PNGase F(NewEngland 公司); 透析膜(Milli-Q); 试验用水为 Milli-Q 超纯水, 乙腈为色谱纯, 甲酸、碳酸氢铵、二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺(IAM)均为分析纯。A~H 号样品为 8 批 EPO 理化对照品, 分别来自哈药集团有限公司、华北制药股份有限公司、成都地奥集团、山东昂德生物药业有限公司、沈阳三生制药有限责任公司、山东科兴生物制品有限公司、上海凯茂生物医药有限公司及上海罗氏制药有限公司 8 家企业。

1.3 方法

1.3.1 相对分子质量测定 通过超滤将样品溶剂置换为 100 mmol·L⁻¹ 的碳酸氢铵溶液, 并调节蛋白浓度至约 1 mg·mL⁻¹, 取 20 μL 加入糖苷酶 2 μL, 37℃ 孵育 3 h。用 Waters ACQUITY H-Class 液相色谱仪及 Xevo G2 QTof 质谱仪进行测定。色谱条件: 采用 Waters BEH300 C₄(2.1 mm × 50 mm, 3.5 μm) 色谱柱, 流动相为水(A)-乙腈(B)-1% 甲酸水溶液(C), 梯度洗脱(0~4.5 min, 85%B → 5%B, 10%C; 4.5~5.5 min, 5%B → 85%B, 10%C), 流速 0.4 mL·min⁻¹ 柱温为 80℃; 样品保存温度为 10℃; 上样量 1 μL; 质谱条件: MS^E 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℃, 源温 120℃, 去溶剂气体流速 800 L·h⁻¹, 扫描范围 *m/z* 500~4 000。

1.3.2 液质肽图绘制 取 0.4 mL 样品加入超滤管

中, 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 弃去滤过液, 加入 50 mmol·L⁻¹ 的碳酸氢铵溶液 0.4 mL, 重复离心步骤; 上述超滤步骤操作 3 次, 测定超滤后样品的紫外吸收以计算其蛋白浓度, 并用 50 mmol·L⁻¹ 的碳酸氢铵溶液将蛋白浓度调节至 2 mg·mL⁻¹, 此为待用样。取待用样 25 μL, 加入 V8 蛋白酶(50 μg·mL⁻¹) 45 μL, 37℃ 孵育过夜, 加入糖苷酶 2 μL, 37℃ 孵育 2 h, 再加入 0.1 mol·L⁻¹ 的 DTT 溶液 1 μL, 37℃ 孵育 1 h。用 Waters ACQUITY H-Class 液相色谱仪及 Xevo G2 QTof 质谱仪进行测定。色谱条件: 采用 BEH300 C₄(2.1 mm × 50 mm, 3.5 μm) 色谱柱, 流动相为水(A)-乙腈(B)-1% 甲酸水溶液(C), 梯度洗脱(0~60 min, 1%B → 60%B, 10%C; 60~61 min, 60%B → 90%B, 10%C; 61~75 min, 90%B → 1%B, 10%C); 流速 0.2 mL·min⁻¹, 柱温为 40℃, 样品保存温度为 10℃, 上样量 5 μL; 质谱条件: MS^E 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℃, 源温 120℃, 去溶剂气体流速 800 L·h⁻¹, 扫描范围 *m/z* 50~2 000。

1.3.3 二硫键分析 取待用样 25 μL, 加入 V8 蛋白酶(50 μg·mL⁻¹) 45 μL, 37℃ 孵育过夜, 加入糖苷酶 2 μL, 37℃ 孵育 2 h 备用。色谱条件与质谱条件同“1.3.2”项测定。

1.3.4 N 寡糖分析 用 100 mmol·L⁻¹ 的碳酸氢铵溶液调节待用样浓度至 1 mg·mL⁻¹, 取 20 μL, 加入 0.2 mL 离心管中, 再加入 PNGase F 酶 2 μL 混合后, 置于金属浴中 37℃ 酶切过夜(约 17 h); 向 0.2 mL 离心管中加入 3 倍体积的冷乙醇(-20℃), 混合均匀后于 -20℃ 静置 1 h, 4℃, 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 吸取上清, 冻干备用。称取 2-氨基苯甲酰胺(2-AB) 5.5 mg, 加入 DMSO-冰醋酸混合物(取 DMSO 350 μL, 加入冰乙酸 150 μL, 混合均匀) 100 μL, 震荡至 2-AB 溶解; 加入硼氢化钠 100 μL, 加入所有 DMSO/醋酸/2-AB 混合物中, 充分震荡后, 放入 65℃ 金属浴中保温 3 min, 使硼氢化钠固体完全溶解, 此为标记试剂。向冻干样品中加入标记试剂 10 μL, 置于金属浴中 65℃ 反应共 3 h。加入体积分数为 80% 的乙腈 50 μL, 混合均匀后, 4℃, 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 即获得用于色谱分离的供试溶液。用 Waters ACQUITY H-Class 超高效液相色谱仪及 Waters XevoG2 QTof 质谱仪检测。色谱条件: 采

用 ACQUITY UPLC BEH Glycan (2.1 mm × 150 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 以 100 mmol · L⁻¹ 甲酸铵为流动相 A, 乙腈为流动相 B, 梯度洗脱 (0~35 min, 65%B → 50%B; 35~45 min, 50%B → 65%B), 流速 0.4 mL · min⁻¹, 荧光检测 (激发波长 330 nm, 发射波长 420 nm), 柱温 (60 ± 5) °C, 进样 2 μL; 质谱条件: MS^E 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 1 000~3 000。结合质谱及荧光检测结果, 对各 N-糖进行定性定量。

1.3.5 异构体分析 准确称取氯化钠 0.584 g, 三羟甲基甘氨酸 1.792 g, 无水乙酸钠 0.820 g, 加入超纯水定容至 100.0 mL, 为电泳缓冲液储备液。准确称取尿素 21.0 g, 用 25 mL 超纯水溶解, 加入电泳缓冲液储备液 5.0 mL, 加入 1 mol · L⁻¹ 脲胺溶液 0.125 mL, 混匀后用超纯水定容至 50.0 mL, 用乙酸调 pH 至 5.55, 为电泳缓冲液。0.1 mol · mL⁻¹ 氢氧化钠为冲洗液。采用

毛细管区带电泳法检测, 毛细管电泳条件: 进样压力 3.45 kPa, 进样时间 10 s, 分离电压 15.4 kV, 分离时间 80 min, 检测波长 214 nm, 样品池温度 10 °C, 毛细管温度 35 °C。

1.3.6 其他项目检测 蛋白质含量、体内比活性、电泳纯度、液相纯度、等电聚焦、唾液酸含量、N 端氨基酸序列、肽图均按照中国药典 2015 年版三部相关要求检测完成。

2 结果

2.1 相对分子质量测定结果

重组人促红素糖基化程度高, 需去除 N 糖后测定相对分子质量, 8 批样品的相对分子质量均与理论一致。具体结果见表 1。O 糖虽无法去除, 但结构较为简单, 不均一是由于 O 糖差异产生的, 见图 1。不同企业的 EPO 制品存在不同类型的 O-糖基修饰, 根据质谱信号的丰度, 可以得到 8 家企业生产的 EPO 理化对照品中不同类型 O-糖基修饰所占比例, 见表 2。

表 1 8 家企业的重组人促红素理化对照品相对分子质量 (M_r) 测定结果比较

Tab. 1 Comparison of relative molecular mass (M_r) results of physicochemical reference for recombinant human EPO from eight companies

企业 (companies)	无 O 糖修饰 (none) (18 238.91 Da)		O 糖修饰无唾液酸 (Hex-HexNAc) (18 604.24 Da)		O 糖修饰单唾液酸 (monosialylated Hex-HexNAc) (18 895.50 Da)		O 糖修饰双唾液酸 (disialylated Hex-HexNAc) (19 186.76 Da)	
	M_r /Da	误差 (error)	M_r /Da	误差 (error)	M_r /Da	误差 (error)	M_r /Da	误差 (error)
A	18 238.40	0.51	18 604.70	0.46	18 895.10	0.40	19 186.70	0.06
B	18 238.40	0.51	18 604.10	0.14	18 895.10	0.40	19 186.10	0.66
C	18 239.00	0.09	18 604.40	0.16	18 895.40	0.10	19 186.70	0.06
D	18 238.70	0.21	18 603.80	0.44	18 895.10	0.40	19 186.40	0.36
E	/	/	18 604.40	0.16	18 895.40	0.10	19 186.40	0.36
F	18 239.00	0.09	18 604.40	0.16	18 895.40	0.10	19 186.40	0.36
G	18 238.70	0.21	18 604.40	0.16	18 895.10	0.40	19 186.10	0.66
H	18 239.00	0.09	18 604.10	-0.14	18 895.70	0.20	19 186.40	-0.36

2.2 液质肽图及糖基化位点分析结果

运用液质联用、串联质谱法完成 8 批样品的质量肽图绘制, 氨基酸全序列测定。氨基酸序列与理论一致。所测的 N 糖位点为 Asn24 Asn38

Asn83, O 糖位点为 Ser126。二硫键连接方式为 Cys7-Cys161; Cys29-Cys33, 与理论一致。图 2 为 rhEPO 理化对照品部分肽段串联质谱解析图。

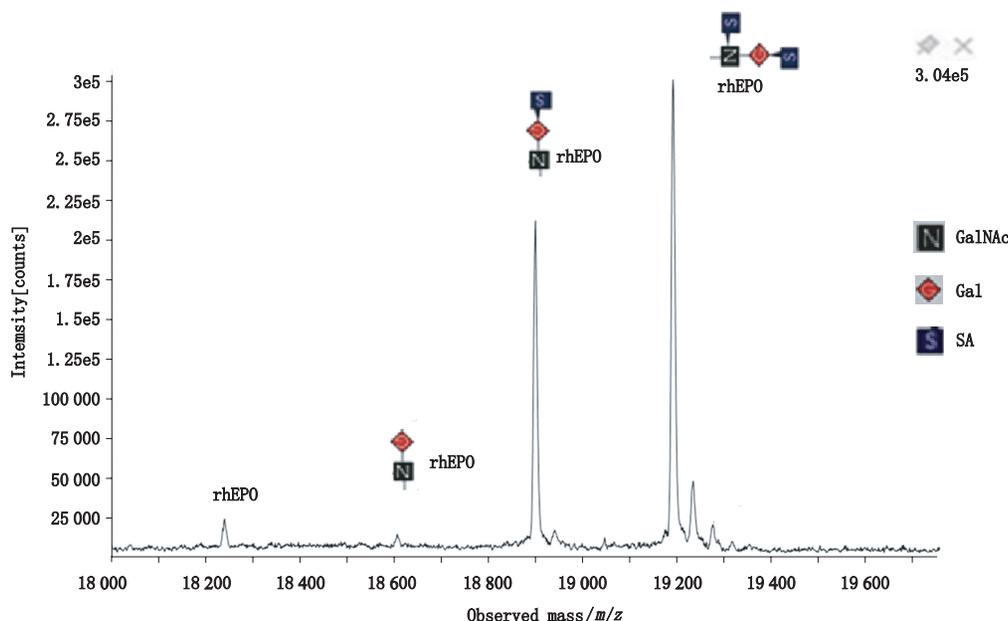


图 1 A 企业重组人促红素理化对照品质谱图谱

Fig. 1 MSspectrometry of physicochemical reference for recombinant human EPO from company A

表 2 8 家企业重组人促红素理化对照品 O-糖基修饰所占比例汇总 (%)

Tab. 2 Ratio of different patterns of O-glycosylation of physicochemical reference for recombinant human EPO from eight companies

O-糖基修饰 (O-Glycan)	企业 (company)							
	A	B	C	D	E	F	G	H
无 O 糖修饰 (none)	/	7.5	3.4	5.5	4.6	8.8	9.7	4.5
O 糖修饰无唾液酸 (Hex-HexNAc)	3.2	/	1.4	1.3	1.2	3.5	1.5	3.8
O 糖修饰单唾液酸 (monosialylated Hex-HexNAc)	28.5	41.5	39.0	54.4	33.7	41.3	38.3	33.2
O 糖修饰双唾液酸 (disialylated Hex-HexNAc)	68.4	50.9	56.2	38.8	60.5	46.4	50.5	58.5

2.3 N 寡糖分析结果

重组人促红素糖基化位点较多,其末端唾液酸化程度高,寡糖类型繁多,通过糖苷酶切下 N 糖链后,2-AB 做荧光标记,通过液质联用,综合 8 家企业样品绘制出 N 糖图谱,根据质谱相对分子质量分析寡糖组成进行糖型分析,并根据丰度对各个寡糖比例含量进行评价。N 寡糖图谱也是一种重要的质量特征。8 批样品中的 N 寡糖比例比较分析,统计结果见表 3。

2.4 等电聚焦结果

重组人促红素是复杂的糖蛋白,糖链的差异决定

其电荷异质性,等电聚焦结果为 5~8 条电荷异构体条带,这是重组人促红素的显著特征之一。采用优化的等电聚焦方法^[4]对 8 批理化对照品分析结果见图 3。均符合规定。

2.5 异构体分析

重组人促红素是混合不同的异构体构成的,这种异构体的差异主要是由于寡糖链末端的唾液酸的比例不同造成的,而唾液酸对重组人促红素活性的影响尤其重要,采用毛细管区带电泳分析异构体可以对各个不同的异构体比例进行量化分析,结果表明 8 批样品的异构体组成是不同的,异构体毛细管电泳图谱是重组人促红

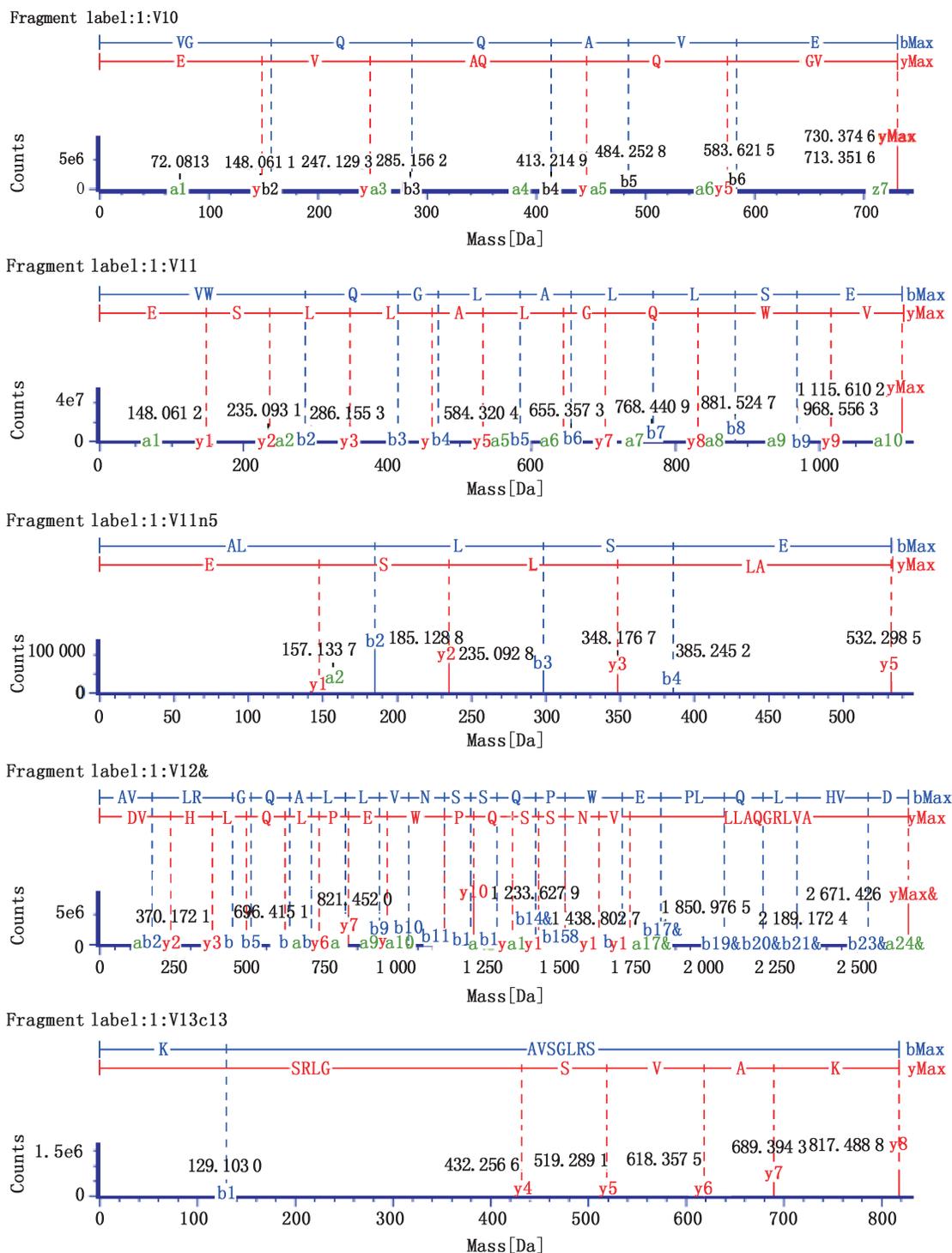


图2 rhEPO 理化对照品部分肽段串联质谱解析图

Fig. 2 Tandem mass spectra for parts of peptides of physicochemical reference for recombinant human EPO

素的又一显著质量特征。图4是A、H样品的毛细管电泳图谱,由图可以看出,不同样品的电荷异构体的组

成有较为明显的差别。8批样品异构体比例组成结果见表4。

表 3 8 家企业重组人促红素理化对照品 N 寡糖比例组成比较 (%)
Tab. 3 Comparison of N-linked oligosaccharide composition of physicochemical reference for rh EPO from eight companies

N 寡糖 (N-linked oligosaccharide)	企业 (companies)						
	A	B	C	D	E	F	G
(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)1 (Deoxyhexose) 1+(Man)3 (GlcNAc)2	0.44	1.99	0.7	2.21	0.44	0.55	0.49
(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)2 (Deoxyhexose) 1+(Man)3 (GlcNAc)2	2.11	3	4.11	3.3	2.11	1.91	2.61
(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)3 (Deoxyhexose) 1+(Man)3 (GlcNAc)2	11.01	2.36	3.79	13.86	11.01	5.56	10.59
(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)2 (Deoxyhexose) 1+(Man)3 (GlcNAc)2	2.86	1.31	0.75	1.68	2.86	0.81	1.32
(Hex)4 (HexNAc)4 (NeuAc)2 (Deoxyhexose) 1+(Man)3 (GlcNAc)2	11.09	5.18	6.62	11.9	11.09	5.07	10.06
(Hex)4 (HexNAc)4 (NeuAc)4 (Deoxyhexose) 1+(Man)3 (GlcNAc)2	23.08	16.6	38.03	19.06	23.08	15.15	26.14
(Hex)4 (HexNAc)4 (NeuAc)3 (Deoxyhexose) 1+(Man)3 (GlcNAc)2	19.85	10.53	14.26	12.41	19.85	9.56	15.92
(Hex)5 (HexNAc)5 (NeuAc)2 (Deoxyhexose) 1+(Man)3 (GlcNAc)2	4.74	2.74	2.96	5.53	4.74	2.93	2.4
(Hex)5 (HexNAc)5 (NeuAc)3 (Deoxyhexose) 1+(Man)3 (GlcNAc)2	4.74	12.23	7.86	10.07	7.2	11.81	8.85
(Hex)5 (HexNAc)5 (NeuAc)4 (Deoxyhexose) 1+(Man)3 (GlcNAc)2	10.27	14.39	14.75	8.49	10.27	15.1	12.3
(Hex)6 (HexNAc)6 (NeuAc)3 (Deoxyhexose) 1+(Man)3 (GlcNAc)2	3.19	10.13	1.35	4.85	3.19	9.73	3.25
(Hex)6 (HexNAc)6 (NeuAc)4 (Deoxyhexose) 1+(Man)3 (GlcNAc)2	3.18	10.34	3.84	3.98	3.18	12.23	4.67
(Hex)7 (HexNAc)7 (NeuAc)3 (Deoxyhexose) 1+(Man)3 (GlcNAc)2	0.59	4.84	0.56	1.46	0.59	4.24	0.61
(Hex)7 (HexNAc)7 (NeuAc)4 (Deoxyhexose) 1+(Man)3 (GlcNAc)2	0.32	3.17	0.42	0.95	0.32	4.26	0.69
(Hex)8 (HexNAc)8 (NeuAc)4 (Deoxyhexose) 1+(Man)3 (GlcNAc)2	0.08	1.2	—	0.25	0.08	1.11	0.11

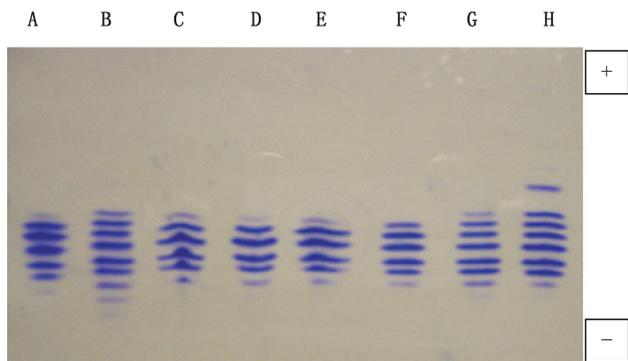


图3 8家企业重组人促红素理化对照品等电聚焦图谱
Fig. 3 IEF maps of physicochemical reference for recombinant human EPO from eight companies.

2.6 纯度测定结果

纯度测定分为电泳纯度(非还原 SDS-PAGE 法)及液相纯度(SEC-HPLC 法)2种,按照 2015 年版中国药典三部方法检定,拟定的标准均不低于 98.0%。

8 家企业的理化对照品纯度测定结果均符合规定,图 5 为 D 样品纯度测定液相色谱图,具体结果见表 5。

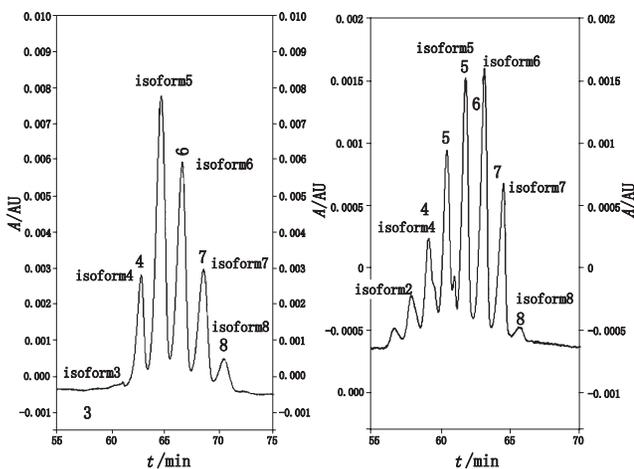


图4 A 和 H 企业重组人促红素理化对照品的 CZE 电泳谱图
Fig. 4 CZE maps of physicochemical references for recombinant human EPO from company A and H

表 4 8 家企业重组人促红素理化对照品异构体比例结果 (%)

Tab. 4 Isoform proportions of physicochemical reference for recombinant human EPO from eight companies

异构体 (isoform)	企业 (company)							
	A	B	C	D	E	F	G	H
异构体 1 (isoform 1)	0	4	0	0	0	0	0	2
异构体 2 (isoform 2)	0	14	0	0	0	0	1	4
异构体 3 (isoform 3)	1	17	1	1	1	2	7	9
异构体 4 (isoform 4)	12	23	9	13	27	26	14	16
异构体 5 (isoform 5)	40	23	34	43	37	32	22	24
异构体 6 (isoform 6)	28	13	34	28	24	28	29	27
异构体 7 (isoform 7)	16	5	20	12	10	11	23	16
异构体 8 (isoform 8)	4	2	2	3	2	1	4	1

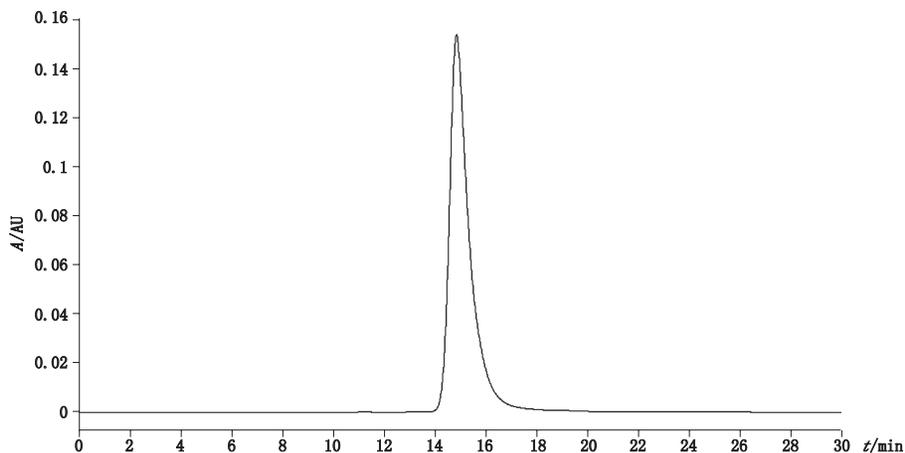


图5 A 企业重组人促红素理化对照品的 HPLC 色谱图
Fig. 5 HPLC map of physicochemical reference for recombinant human EPO from company A

表 5 8 家企业重组人促红素理化对照品部分项目检定结果

Tab. 5 Parts of test results of physical and chemical reference substances for recombinant human EPO from eight companies

检定项目 (test items)	企业 (company)							
	A	B	C	D	E	F	G	H
蛋白含量 (protein content) / (mg · mL ⁻¹)	2.14	1.03	2.51	1.07	2.09	2.17	0.98	1.72
体内生物学活性 (activity <i>in vivo</i>) / (IU · mL ⁻¹)	2.60	1.19	2.61	1.18	2.64	2.28	1.15	2.66
体内比活性 (vivo specific activity) / (× 10 ⁵ IU · mg ⁻¹)	1.2	1.2	1.0	1.1	1.3	1.1	1.2	1.5
电泳纯度 (SDS-PAGE) / %	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
液相纯度 (SEC-HPLC) / %	100.0	99.7	99.3	100.0	100.0	99.9	99.6	99.3
EPO 中唾液酸含量 (content of sialic acid in EPO) / (mmol · mol ⁻¹)	12.0	13.9	11.3	11.8	11.9	13.4	10.7	13.5

2.7 其他项目检定结果

8 批理化对照品的活性测定采用网织红细胞计数法, 蛋白含量采用紫外消光系数法, 所计算的比活

性结果见表 5。其他项目如唾液酸含量, N 端氨基酸序列均符合规定。部分检定项目结果见表 5。拟定的重组人促红素理化对照品质量标准见表 6。

表 6 重组人促红素理化对照品质量标准

Tab. 6 Summary of quality specifications of physicochemical reference for recombinant human EPO

项目 (subjects)	方法 (methods)	标准 (specifications)
蛋白质含量 (protein content) / (mg · mL ⁻¹)	紫外分光光度法 (UV)	应符合比活性项下规定 (meet the specific activity)
生物学比活性 (specific activity)	体内法 (vivo)	≥ 1.0 × 10 ⁵
纯度 (purity) / %	SEC-HPLC	≥ 98.0
	SDS-PAGE	≥ 98.0
等电点 (isoelectric point)	等电聚焦电泳 (Isoelectric focusing electrophoresis)	5~8 条区带 (zone)
EPO 中唾液酸含量 (content of sialic acid in EPO) / (mmol · mol ⁻¹)	间苯二酚法 (resorcinol colorimetry)	≥ 10.0
N-末端氨基酸序列 (N-terminal amino acid sequence)	Edman 降解法 (Edman degradation)	APPRLICDSRVLRVLY
相对分子质量 (relative molecular mass) / kD	液质联用 (LC-MS)	应与理论相对分子质量相符 (correspond to theoretical relative molecular mass) (± 0.5 Da)
液质肽图 (peptide mass fingerprinting)	液质联用 (LC-MS)	应与理论肽段相对分子质量相符 (correspond to theoretical relative molecular mass) (± 0.5 Da)
二硫键分析 (disulfidebond confirmation)	液质联用 (LC-MS)	链接方式应与理论一致 (correspond to theory)
糖基化位点分析 (glycosylation analysis)	液质联用 (LC-MS)	/
N 寡糖糖型及比例分析 (N-linked oligosaccharide composition) / %	液质联用 (LC-MS)	/
肽图 (peptide mapping)	胰蛋白酶裂解法 (trypsin cleavage RP-HPLC)	/
异构体分析 (distribution of isoforms) / %	毛细管区带电泳法 (CZE)	/

3 讨论

理化对照品一级结构的确证是进行质量评价的基础。在拟定理化对照品的质量标准时, 增加了结构确证的检测^[5-6], 研究建立了一系列重组人促红素的质谱分析方法, 如相对分子质量测定, 液质肽图绘制, 糖基化位点确证, 二硫键链接方式确证^[7-8]。研究表

明, O-糖链对 EPO 的体内和体外活性均无明显的影响^[9], 而 N-糖链对活性影响非常重要, 尤其是 N 寡糖链末端的唾液酸对维持结构稳定有重要作用^[10-14], 本文针对寡糖结构和含量, 增加了寡糖图谱的绘制, 寡糖比例含量的测定; 异构体的定量分析。

经检验, 8 家企业理化对照品一级结构得到确

证,二硫键链接与理论一致。各企业的寡糖类型基本一致,但是在比例含量上差别明显。这种差别主要是糖基化水平不一致,跟宿主细胞,生理环境,发酵环境,生产工艺有关,形成每个企业特有的质量表征。这种糖基化的差异同样出现,在异构体检测中,8家企业对照品的异构体分布也有明显差别,形成特有质量表征。目前市场上称为 α 型和 β 型重组人促红素的氨基酸序列完全一致,区别主要是糖基化水平及异构体差异较为明显,其中 β 型的酸性异构体占比更多一些,在临床疗效上也有比较研究^[12]。各异构体含量的变化是保证该药品质量稳定性和均一性的关键质控指标,注意到国内企业的对照品比活性较国外企业的总体略低,如何评价各异构体与含量和活性的关系需要进一步研究。本次理化对照品均为原液直接分装制得,稳定性还需进一步研究。

本次理化对照品来自国外企业的为 β 型,来自国内企业的尚未明确分型,但是通过毛细管区带电泳谱图可以比较容易找到两者差异,主要是各型异构体个数及比例分布。是否能作为分型的依据还需进一步确证。通过此次质量评价,国内外8家主要的重组人促红素生产企业的理化对照品均符合标准。国内企业的产品质量与国外企业相比较总体差距不大,但仍有提高的空间。

理化对照品的质量评价是产品质量控制的前提。中国药典2015年版三部也明确指出对理化对照品的质量评价要求,本文针对重组人促红素理化对照品,拟定了质量标准,期望能对其他理化对照品的质量评价提供有益的参考。

参考文献

- [1] ESCHBACH JW, EGRIE JC, DOWING MR, *et al.* Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trial [J]. *N Engl J Med*, 1987, 316(2): 73
- [2] ABELS RI. Use of recombinant human erythropoietin in the treatment of anemia in patients who have cancer [J]. *Semin Oncol*, 1992, 19(3 Suppl8): 29
- [3] STEBBING RJ, FINDLAY L, EDWARDS C, *et al.* 'Cytokine storm' in the Phase I trial of monoclonal antibody TGN1412: better understanding the causes to improve preclinical testing of immunotherapeutics [J]. *J Immunol*, 2007, 179(5): 3325
- [4] 周勇,王军志,黄培堂,等. 优化等电聚焦电泳方法评价重组人红细胞生成素质量 [J]. *中国生化药物杂志*, 2007, 28(6): 397
- ZHOU Y, WANG JZ, HUANG PT, *et al.* Quality evaluation of recombinant human erythropoietin by optimized isoelectric focusing assay [J]. *Chin Biochem Pharm*, 2007, 28(6): 397
- [5] 蔡耘,王红霞,魏开华,等. 重组人促红细胞生成素(rhEPO)一级结构的质谱分析 [J]. *分析测试学报*, 2001, 20(增刊): 14
- CHAI Y, WANG HX, WUI KH, *et al.* Analysis of the primary structure of rhEPO by MALDI-TOF-MS [J]. *J Instrum Anal*, 2001, 20(Suppl): 14
- [6] 陶磊,饶春明,高凯,等. 重组嵌合抗CD20 IgG1型单克隆抗体的结构验证 [J]. *药学报*, 2010, 45(6): 752
- TAO L, RAO CM, GAO K, *et al.* Structure verification of a recombinant chimeric anti-CD20 IgG1 monoclonal antibody [J]. *Acta Pharm Sin*, 2010, 45(6): 752
- [7] STORRING PL, GAINES DAS RE. The international standard for recombinant DNA-derived erythropoietin: collaborative study of four recombinant DNA-derived erythropoietins and two highly purified human urinary erythropoietins [J]. *J Endocrinol*, 1992, 134(3): 459
- [8] CHOI D, KIM M, PARK J. Erythropoietin: physico- and biochemical analysis [J]. *J Chromatogr B*, 1996, 687(1): 189
- [9] DELORME E, LORENZINI T, GIFFIN J, *et al.* Role of glycosylation on the secretion and biological activity of erythropoietin [J]. *Biochemistry*, 1992, 31(41): 9871
- [10] 周勇,黄培堂,杨鹏云,等. 长效人红细胞生长刺激蛋白质量控制标准研究 [J]. *药物分析杂志*, 2008, 28(10): 1597
- ZHOU Y, HUANG PT, YANG PY, *et al.* Study on the specification for control of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP) [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2008, 28(10): 1597
- [11] TOYODA T, ITAI T, ARAKAWA T, *et al.* Stabilization of human recombinant erythropoietin through interactions with the highly branched N-glycans [J]. *J Biochem*, 2000, 128(5): 731
- [12] TOYODA T, ARAKAWA T, YAMAGUCHI H. N-glycans stabilize human erythropoietin through hydrophobic interactions with the hydrophobic protein surface: studies by surface plasmon resonance analysis [J]. *J Biochem*, 2002, 131(4): 511
- [13] SU D, ZHAO H, XIA H. Glycosylation-modified erythropoietin with improved half-life and biological activity [J]. *Int J Hematol*, 2010, 91(2): 238
- [14] ELLIOTT S, EGRIE J, BROWNE J, *et al.* Control of rHuEPO biological activity: the role of carbohydrate [J]. *Exp Hematol*, 2004, 32(12): 1146
- [15] 司莉莉,金珊. 重组人促红细胞生成素 β 和重组人促红细胞生成素 α 治疗肾性贫血的疗效比较 [J]. *中国实用医刊*, 2014, 41(14): 5
- SI LL, JIN S. Curative effect comparison of rHuEPO- β and rHuEPO- α in the treatment of renal anemia [J]. *Chin J Pract Med*, 2014, 41(14): 5

(本文于2016年7月1日收到)