

错位双链聚核苷酸注射液的质控方法研究*

李永红, 饶春明, 王兰, 范文红, 毕华, 王军志**

(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

摘要 目的: 研究建立错位双链聚核苷酸(polyI: C₁₂U) 注射液的质控方法。方法: 采用反相高效液相色谱(RP-HPLC) 法测定碱基比例; 采用紫外吸收光谱法测定样品的增色效应、最大吸收波长、 OD_{250}/OD_{260} 和 OD_{280}/OD_{260} ; 采用琼脂糖电泳法测定相对分子质量范围; 其余项目按中国药典三部进行测定。结果: 建立了该产品的质量检测方法, 测得样品的碱基比例 C/U 为 15.8, I/C 为 1.11; 增色效应为 63.5%, 最大吸收波长为 263 nm, OD_{250}/OD_{260} 为 0.98, OD_{280}/OD_{260} 为 0.60; 相对分子质量分布在 100~1000bp 范围内。其余各项指标均符合规定。结论: 建立的检验方法和质量标准为有效地控制错位双链聚核苷酸注射液的质量奠定良好基础。

关键词: 错位双链聚核苷酸; 质量标准; 碱基比例; 增色效应; 紫外吸收光谱; 相对分子质量范围

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)08-1537-04

Quality control methods for mismatched double-stranded polynucleotide injection*

LI Yong-hong, RAO Chun-ming, WANG Lan, FAN Wen-hong, BI Hua, WANG Jun-zhi**

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To establish the quality control methods for mismatched double-stranded polynucleotide (poly I: C₁₂U) injection. **Methods:** The base ratio of poly I: C₁₂U was determined by a reverse phase HPLC (RP-HPLC) method. The hyperchromicity, maximum absorption wavelength, OD_{250}/OD_{260} ratio and OD_{280}/OD_{260} ratio was analyzed by ultraviolet absorption spectrometry. The molecular weight range was determined using agarose gel electrophoresis method. Other tests were done according to the ChP. **Results:** Quality test methods of the product were established. When base ratio of the sample was tested, C/U ratio was 15.8 and I/C ratio was 1.11. The hyperchromicity was 63.5%, maximum absorption wavelength was 263 nm, OD_{250}/OD_{260} was 0.98, and OD_{280}/OD_{260} was 0.60. The molecular weight range distributed in 100-1000 bp. The remaining tests all conformed to its specification. **Conclusion:** The established test methods and quality standard lay a good foundation to effectively control the quality of poly I: C₁₂U.

Key words: poly I: C₁₂U; quality standard; base ratio; hyperchromicity; ultraviolet absorption spectrometry; range of relative molecular mass

错位双链聚核苷酸(polyI: C₁₂U) 是 1 种人工合成的双链核糖核酸(dsRNA), 是由等摩尔浓度的聚肌苷酸(poly I) 和聚胞苷酸尿苷酸(poly C₁₂U) 经碱基配对制成, 是对现有的抗病毒药物聚肌胞(polyI: C) 进行修饰改进后的新型药物, 具有与聚肌胞同样的诱生干扰素、抗病毒的作用和明显抑制肿瘤生长的作用, 同时毒性与聚肌胞相比显著降低^[1-3]。目

前该品种在我国进入申报临床研究阶段, 为控制其产品质量, 本文在参照聚肌胞的国家药品标准(WS1-XG-050-2000)^[4] 基础上, 按照现行中国药典要求并结合该制品的特点对碱基比例、含量测定、相对分子质量范围、紫外吸收光谱分析等质控方法进行了研究、建立和初步验证的工作。

* 国家 863 计划资助项目(2007 AA021601); 国家科技重大专项资助项目(2009ZX09307-001)

** 通讯作者 Tel: (010) 67095782; E-mail: wangjz@nicpbp.org.cn

1 材料和方法

1.1 仪器

2695 高效液相色谱仪, 2487 紫外检测器、Empowers 色谱工作站(美国 Waters 公司); UV-1601 型紫外可见分光光度计(日本 Shimadzu 公司); Power PAC300 型电源(美国 Bio-Rad 公司); JY-SPCT 型电泳槽(北京君意东方电泳设备公司); Image Master VDS 凝胶成像系统(瑞典 Amersham pharmacia biotech 公司)。

错位双链聚核苷酸注射液为国内生产企业提供。肌苷、胞苷、尿苷和溴化乙锭购自美国 Sigma 公司, DNA 分子量标准(100bp DNA Ladder)、碱性磷酸酶试剂盒购自美国 Promega 公司。水为超纯水, 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 碱基比例的测定^[5] 分别精密称取肌苷 1.74 g、胞苷 1.46 g 和尿苷 0.12 g, 溶于 50 mL 水, 配制成摩尔分子比例肌苷-胞苷-尿苷(13:12:1)的混合核苷对照品溶液。分别取样品和核苷对照品溶液 0.75 mL, 加同体积的 0.6 mol·L⁻¹ 氢氧化钾溶液, 置 65~70 °C 水浴碱水解 2 h 后取出。用 10% 的高氯酸约 0.29 mL 中和至 pH 7.0, 3000 r·min⁻¹ 离心 15 min。取上清液 0.16 mL 至 1.5 mL 的离心管中, 加碱性磷酸酶缓冲液及碱性磷酸酶各 20 μL, 充分混合后置 37 °C 水浴中保温 6 h。酶解完毕后, 取出离心管, 煮沸 3~5 min 终止反应, 3500 r·min⁻¹ 离心 15 min。取上清 0.16 mL, 加 3.4 mL 水稀释后, 进样 20 μL 进行 RP-HPLC 分析。色谱条件为: 色谱柱为 BDS Hypersil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm 5 μm); 流动相为乙酸铵液(0.1 mol·L⁻¹, pH 5.0)-甲醇(96:4), 流速 0.8 mL·min⁻¹, 柱温 40 °C, 检测波长为 254 nm, 进样体积 20 μL。根据供试品溶液和核苷对照品溶液色谱图中肌苷、胞苷、尿苷各峰的峰面积及标准核苷对照品溶液的已知摩尔分子比例计算 I/C 和 C/U 的碱基比例。

1.2.2 增色效应的测定 取供试品, 用氯化钠-磷酸盐缓冲液(pH 7.2)制成 0.04 mg·mL⁻¹ 的溶液, 用紫外分光光度计在 248 nm 处测定吸收值 A₁, 然后精确量取该溶液 10 mL 置另一试管中, 加 6 mol·L⁻¹ NaOH 溶液 20 μL, 摇匀, 立即在同一波长处测定吸收值 A₂, 按下式计算

$$\text{增色效应}(\%) = \frac{A_2 - A_1}{A_1} \times 100\%$$

1.2.3 紫外光谱扫描 取本品, 加氯化钠-磷酸盐缓冲液(取十二水磷酸氢二钠 1.546 g, 二水磷酸二氢钠 0.262 g, 氯化钠 8.768 g, 加水溶解并稀释至 1000 mL, pH 7.2)制成 0.04 mg·mL⁻¹ 的溶液, 用紫外分光光度计在 220~350 nm 范围内进行扫描, 测定最大吸收波长以及 OD₂₅₀/OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀/OD₂₆₀ 比值。

1.2.4 相对分子质量范围的测定 取 0.6 g 琼脂糖加入 30 mL 的 1×TAE 缓冲液, 煮沸加热溶解, 取出冷却至约 60 °C, 加溴化乙锭至终浓度为 0.5 μg·mL⁻¹, 倒入电泳槽, 室温放置 0.5 h, 配制成 2.0% 的琼脂糖凝胶。取 1 mg·mL⁻¹ 的错位双链聚核苷酸注射液 45 μL, 加水 205 μL, 凝胶加样缓冲液 50 μL 混匀, 配制成 0.15 g·L⁻¹ 的溶液。取 20 μL 点于电泳胶中。取 DNA 分子量标准(100 bp DNA Ladder) 25 μL, 载样缓冲液 5 μL 混匀, 取 20 μL 点于电泳胶中。以点样端为负极, 5 V·cm⁻¹ 电压电泳约 1.5 h。切断电源, 将凝胶置紫外下观察并进行照相。

2 结果

2.1 碱基比例测定 将样品碱水解成核苷酸后, 用碱性磷酸酶进行脱磷变成核苷, 然后进行反相高效液相色谱法(RP-HPLC)分析并计算碱基组成。碱水解和脱磷处理后的样品的色谱图与核苷对照品相一致(图 1), 3 种核苷出峰顺序分别为胞苷、尿苷和肌苷, 相互之间得到完全的基线分离。测得的碱基比例 C/U 比值为 15.8, 日内 RSD 平均为 0.3% (n=3), 日间 RSD 为 0.4% (n=3); I/C 为 1.11, 日内 RSD 平均为 0.5% (n=3), 日间 RSD 为 1.1% (n=3)。

2.2 增色效应和紫外吸收光谱特性 将未加碱和加碱处理后的样品, 测定 248 nm 处紫外吸收值, 计算得到增色效应为 63.5%, 测定的日内 RSD 平均为 1.1% (n=3), 日间 RSD 为 3.6% (n=3)。样品的紫外光谱扫描图见图 2, 最大吸收波长为 263 nm, 日内 RSD 平均为 0.1% (n=3), 日间 RSD 为 0.2% (n=3); OD₂₅₀/OD₂₆₀ 为 0.98, 日内 RSD 平均为 0.4% (n=3), 日间 RSD 为 0.5% (n=3); OD₂₈₀/OD₂₆₀ 为 0.60, 日内 RSD 平均为 0.1% (n=3), 日间 RSD 为 0.1% (n=3)。

相对分子质量范围测定 将样品和 DNA 分子量标准在含溴化乙锭的 2.0% 琼脂糖凝胶中进行电

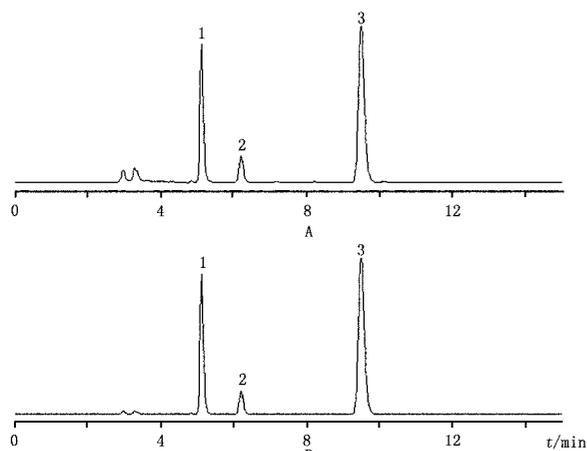


图1 供试品(A)和核苷对照品(B)的高效液相色谱图
Fig 1 HPLC chromatograms of sample(A) and nucleotide control(B)
1. 胞苷(cytidine) 2. 尿苷(uridine) 3. 肌苷(inosine)

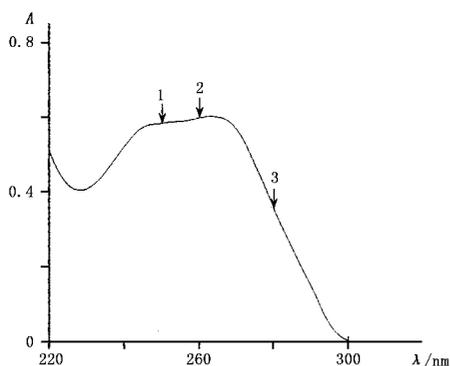


图2 供试品溶液的紫外吸收光谱
Fig 2 Ultraviolet absorption spectra of sample solution
1. 250 nm 2. 260 nm 3. 280 nm

泳后,在紫外灯下显色并照相,得到的电泳图见图3。样品呈现较弥散的连续条带,相对分子质量分布在100~1000 bp的较宽范围内。

2.4 其他项目 含量测定按 poly I: C 标准(WS1-XG-050-2000)用定磷法进行测定,其它项目如外观、pH、装量、可见异物、细菌内毒素、无菌试验和小鼠异常毒性试验按照现行中国药典三部进行,测定结果均符合相应规定。

3 讨论

3.1 关于碱基比例测定 由于 poly I: C 的毒副作用很大程度上限制了其开发利用,通过在 poly C 链中使用尿苷酸(U)按比例替代胞苷酸(C),从而实现在 poly C 链中插入 U,使双链中肌苷酸(I)和 U 不能配对。这种结构保留了 poly I: C 原有的激活生物学反应的能力,同时在体内能被快速降解,从而使得毒副作用大大降低。插入 U 使得 C/U 值在 7 ~

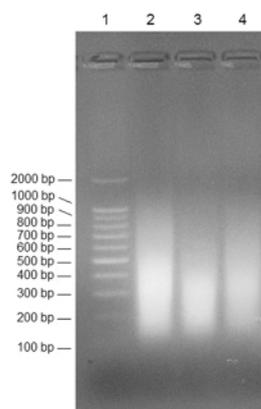


图3 供试品溶液的琼脂糖电泳图谱
Fig 3 Agarose gel electrophoresis pattern of sample solution
1. DNA 相对分子质量标准(DNA relative molecular mas standard) 2
~4. 供试品溶液(sample solution)

39 范围内均能有很好的生物学效应,其中对 poly I: C₁₂U (C/U 为 12 左右)研究的最多,效果也最为理想^[6]。这里采用化学水解后进行反相高效液相色谱(RP-HPLC)分析的方法测定碱基组成,控制 I-C-U (13:12:1)左右。poly I: C₁₂U 可经碱水解为核苷酸,由于碱水解过程产生 2'-、3'-位的核苷酸同分异构体,核苷酸成分复杂,不利于测定,因此要将核苷酸组分用碱性磷酸酶进一步脱磷处理,使核苷酸变成肌苷、胞苷和尿苷,通过 RP-HPLC 法分离,在 254 nm 处测定出 3 种核苷的峰面积,将样品峰面积与核苷标准品峰面积比较,计算出样品中 3 种碱基的比值。由于 poly I: C₁₂U 的制备过程中可能会产生一定的偏差,并考虑到检测的误差,目前将 I/C 的标准规定为 1.08 ± 0.20, C/U 的标准规定为 10 ~ 18。

3.2 关于增色效应和紫外吸收特性测定 将双链核酸加热、加酸或加碱处理后,碱基间的氢键会断开,双链结构解链,单链的碱基外露,使溶液的紫外吸收突然增加,这种现象叫双链核酸的增色效应。增色效应的数值能很好地反映双链配对的程度,可作为判断双链核酸质量的依据。在 poly I: C 标准(WS1-XG-050-2000)中使用增色效应数值判断 poly I: C 的质量,并规定增色相应不低于 55.0%。按照同样的方法,对 poly I: C₁₂U 的增色效应特性进行了研究,发现其变化规律同 poly I: C 一致。poly I 和 poly C₁₂U 等摩尔浓度进行配对时,增色效应值最大,当摩尔浓度不一致时,增色效应值降低,制备的 poly I: C₁₂U 制剂的增色效应数值一般在 55% ~

65% 之间变化,因此将 poly I: C₁₂U 的增色效应数值定为大于 55.0%。通过对紫外吸收特性如最大吸收波长、OD₂₅₀/OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀/OD₂₆₀ 值的测定,一方面起到对产品进行结构鉴定的作用;另一方面由于 poly I: C₁₂U 在受到污染或破坏的情况下,紫外吸收特性将发生变化,因此该指标也在一定程度上反映了产品的纯度和相关物质。目前最大吸收波长规定为(264 ± 3) nm,OD₂₅₀/OD₂₆₀ 规定为 0.96 ± 0.03,OD₂₈₀/OD₂₆₀ 规定为 0.60 ± 0.03 规定为 0.96 ± 0.03。

3.3 关于相对分子质量范围测定 在 poly I: C 的质量标准中,使用聚丙烯酰胺凝胶电泳方法测定分子量,结果用沉降系数 S 表示。为了能更好反应分子量的大小,这里使用了琼脂糖凝胶电泳法进行分析,用 DNA 分子量标准为对照测定相对分子质量,结果以碱基对(bp)表示,可更准确、快捷地测定出分子量的范围。由于单链聚核苷酸的合成为酶催化的反应,所以分子量大小分布在一个较宽的范围内。poly I: C₁₂U 药物由于进行了修饰,大分子易于水解,毒性得到了控制,但分子量大会影响制剂的制备工艺,而分子量过小可能会影响药物效果,所以分子量范围目前定在 100 ~ 1000 bp。

参考文献

- 1 Jasani B, Navabi H, Adams M. Ampligen: A potential toll-like 3 receptor adjuvant for immunotherapy of cancer. *Vaccine*, 2009, 26; 27 (25-26): 3401
- 2 NIE Shi-jian(聂实践), HU Dong-qing(胡冬琴). Research development of new antitumor and antiviral material with low toxic side effect - mismatched double stranded RNAs(低毒性、抗病毒、抗肿瘤失配双链核糖核酸的研究发展). *Prog Biotechnol*(生物工程进展), 1997, 17(3): 10
- 3 CHENG Hong-shan(陈泓珊). Pharmacological and pharmacodynamic study of mismatched double-stranded RNA, Ampligen(错位聚核苷酸 Ampligen 的药理药效研究). *Chin J Clin Pharmacol*(中国临床药理学杂志), 1989, 5(3): 175
- 4 Drug Specifications Promulgated by SDA - Chemical medicine of district drug specification promoted to National Drug Standard (国家食品药品监督管理局国家药品标准化学药品地方标准上升国家标准). Vol 16(第十六册). WS1-XG-050-2000. 2003. 138
- 5 NIE Shi-jian(聂实践), HU Dong-qing(胡冬琴), WANG Meng(王蒙). HPLC method for analysis of base ratio in synthetic oligonucleotides(错位双链寡核苷酸中碱基比例的测定研究). *China Biotechnol*(中国生物工程杂志), 2004, 24(4): 77
- 6 Carter WA, Ventura D, Shapiro DE et al. Mismatched double-stranded RNA, Ampligen (poly(I): poly(C12U)), demonstrates antiviral and immunostimulatory activities in HIV disease. *Int J Immunopharmacol*, 1991, 13(Suppl 1): 69

(本文于 2010 年 9 月 10 日收到)

《周海钧论文集》已出版

中国食品药品检定研究院李云龙院长组织编辑的《周海钧论文集》由中国人口出版社于 2010 年 9 月出版。2010 年中国药品生物制品检定所(中检所)迎来了 60 华诞。在中检所 60 华诞之际,编辑出版老一代中检人的论著文集,让人们了解中国药检人的奋斗历程,从对历史的回顾中看看中检人在药检领域的发展过程的拼搏与付出。中检所涉及多学科的药品检验检测及相关专业,前辈们在各个专业领域的成绩均是中检所的宝贵财富。收集整理这些财富,系统而忠实地记录中检人在各专业的成就和历程。论著集的收集编辑工作,以体现专业性为主线,反映团队成就为宗旨,并以年代代表人物冠以书名编辑成册。《周海钧论文集》以周海钧先生本人独著为主,也收集了部分周海钧先生与其他作者合著论文和书籍。论文以全文刊载,著作刊载前言或序、著者、目录或摘要等。对论文有贡献的中检所其他老专家作者还有张银如、田颂九、金少鸿、朱燕、夏迺华、夏振民、赵雅灵、杨正时等。对专著有贡献的中检所老专家还有汪开敏、李九丹、杨兆起、王宝乘、陈德昌、桑国卫、孙曾培、唐秋瑾、徐康森、陈香元、王利生等。本论文集的编辑出版蕴涵了对以他们为代表的老一代专家们为中检所发展所作贡献的由衷敬重。

本书定价 158.00 元。联系人:刘小帅;电话:010-67095201;地址:100050 北京市东城区天坛西里 2 号 中国食品药品检定研究院《药物分析杂志》编辑部