

重组人血清白蛋白 - 干扰素 $\alpha 2a$ 融合蛋白质控方法与质量标准的建立

裴德宁, 李响, 韩春梅, 饶春明*

(中国药品生物制品检定所重组技术产品室 卫生部生物技术产品检定及标准化重点实验室 北京 100050)

摘要 目的: 建立重组人血清白蛋白 - 干扰素 $\alpha 2a$ 融合蛋白(rHSA - IFN $\alpha 2a$) 的质控方法和质量标准。 **方法:** 分别使用抗 HSA 抗体和抗 IFN $\alpha 2a$ 抗体, 采用免疫印迹法对成品进行鉴别试验, 采用 WISH 细胞病变抑制法测定成品和原液的生物学活性, 原液以胰蛋白酶酶切后, 用 HPLC 分析肽图, 其余项目按 2010 年版中国药典(三部) 的规定进行检测。 **结果:** 样品与抗 HSA 抗体和抗 IFN $\alpha 2a$ 抗体均呈阳性反应, 比活性 $>1.5 \times 10^5$ IU \cdot mg $^{-1}$, 其肽图与参考品的一致, 其余项目均符合 2010 年版中国药典(三部) 的规定。 **根据检测结果建立了 rHSA - IFN $\alpha 2a$ 的质量标准。 结论:** 建立的质控方法和质量标准可以保证 rHSA - IFN $\alpha 2a$ 的安全、有效和质量可控, 可以用于 rHSA - IFN $\alpha 2a$ 的常规检定。

关键词: 重组人血清白蛋白; 干扰素 $\alpha 2a$; 融合蛋白; 质控方法; 质量标准

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793(2011) 09 - 1750 - 04

Study on methods and requirements for quality control of recombinant human serum albumin - interferon $\alpha 2a$ fusion protein

PEI De - ning , LI Xiang , HAN Chun - mei , RAO Chun - ming*

(Department of Recombinant Product , National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products , Key Laboratory of the Ministry of Health for Research on Quality and Standardization of Biotech Products , Beijing 100050 , China)

Abstract Objective: To establish methods and requirements for quality control of recombinant human serum albumin - interferon $\alpha 2a$ fusion protein(rHSA - IFN $\alpha 2a$) . **Methods:** Western blotting was carried out using anti - HSA antibody and anti - IFN $\alpha 2a$ antibody. Biological activity was assayed by WISH - VSV system. The peptide map was obtained by trypsin digestion and HPLC assay. Other routine tests were all fulfilled according to the ChP (2010) . **Results:** Western blotting was positive. Biological activities were more than 1.5×10^5 IU \cdot mg $^{-1}$. HPLC peptide maps paralleled that of reference. Results of other routine tests all complied with the standard requirements. The quality control methods and standards for rHSA - IFN $\alpha 2a$ were established accordingly. **Conclusion:** The established quality control methods and standards for rHSA - IFN $\alpha 2a$ are safe and effective , which can be used for routine quality control of rHSA - IFN $\alpha 2a$.

Key words: recombinant human serum albumin; interferon $\alpha 2a$; fusion protein; quality control methods; requirements

干扰素(interferon ,IFN) 是由多种细胞产生的具有广泛的抗病毒、抗肿瘤和免疫调节作用的可溶性糖蛋白, 在临床上主要用于肿瘤、病毒性感染的治疗。虽然干扰素制品具有明确的临床疗效, 但是在体内的半衰期很短, 临床上只能以提高用药频率和用量来解决, 造成血药浓度波动大, 影响了疗效, 增加了毒副作用。rHSA - IFN $\alpha 2a$ 是在重组人干扰素 $\alpha 2a$ 分子的 N 端连接大分子量的重组人血清白

蛋白(rHSA) , 保护 rhIFN $\alpha 2a$ 分子免受血液中蛋白酶的消化破坏, 并且能降低肾小球滤过率, 延长半衰期, 从而降低临床使用剂量和频率^[1, 2]。目前, 一些公司的 rHSA - IFN $\alpha 2b$ 已经完成 III 期临床试验, 或已进入临床试验阶段, 另一些公司正在进行 rHSA - IFN 的临床前研究。为了保证 rHSA - IFN 制品的安全有效, 本文对 rHSA - IFN $\alpha 2a$ 产品的质控方法和质量标准进行了研究。

* 通讯作者 Tel: (010) 67095380; E - mail: raoem@ nicbp. org. cn

1 材料和方法

1.1 试剂 rHSA - IFN α 2a 原液(批号:20090601)和成品(批号:20090703),为本室留样,IFN - α 2a 活性测定国家标准品(批号:07/01,效价:11000 IU \cdot 支 $^{-1}$)、人羊膜细胞(WISH)和水泡性口炎病毒(VSV)为本室保存。胎牛血清为四季青公司产品, MEM 培养基为 GIBCO 公司产品。兔抗人 HSA 抗体和兔抗人 IFN α 2a 抗体、结晶紫、二硫苏糖醇(DTT)、甲苯磺酰苯丙氨酸酰甲酮(TPCK)处理的胰蛋白酶为 Sigma 公司产品。

1.2 仪器和设备 半干胶转移仪(型号:80 - 6211 - 86)为 Amersham Pharmacia 公司产品,多功能酶标仪 SpectraMax Plus 和 SoftMax Pro 分析软件为 Molecular Devices 公司产品,Waters 2690 HPLC 系统、2487 紫外检测器、Waters 2010 数据管理系统为 Waters 公司产品,ZORBAX 300SB - C $_8$ 柱(250 mm \times 4.6 mm 5 μ m)为 Agilent 公司产品。

1.3 免疫印迹试验 按 2010 年版中国药典(三部附录 VIII A)免疫印迹法进行^[3]。

1.4 生物学活性测定 按 2010 年版中国药典(三部附录 X C)干扰素生物学活性测定法进行^[3]。

1.5 肽图测定 先将样品和参考品的蛋白浓度调整为约 1 mg \cdot mL $^{-1}$,以 0.1 mol \cdot L $^{-1}$ 碳酸氢铵溶液透析样品 4 h,加入 DTT 溶液使终浓度为 0.01 mol \cdot L $^{-1}$,置 56 $^{\circ}$ C 水浴还原 60 min,加入碘乙酰胺溶液使终浓度为 0.055 mol \cdot L $^{-1}$,室温下避光烷基化 30 min,按 1: 50(*w/w*)的比例加入 TPCK 处理的胰蛋白酶,37 $^{\circ}$ C 保温 24 h,按 1: 5(*v/v*)的比例加入终止液(取冰醋酸 10 mL,加超纯水至 20 mL 即得)终止反应,10000 r \cdot min $^{-1}$ 离心 5 min,收集上清液为肽图测定样品(参考品)。以 RP - HPLC 对肽

图测定样品(参考品)进行分析,色谱柱为 ZORBAX 300SB - C $_8$ 柱(250 mm \times 4.6 mm 5 μ m),流动相 A 液为 0.1% 三氟乙酸 - 水溶液,B 液为 0.1% 三氟乙酸 - 乙腈溶液,使用 65 min 的连续梯度(A 液从 95% 至 30%,B 液从 5% 至 70%),上样量 100 μ L,流速为 1 mL \cdot min $^{-1}$ 检测波长为 214 nm。

1.6 其他指标的检测 蛋白质含量、纯度、相对分子质量、等电点、安全性等指标根据 2010 年版中国药典(三部)进行检测。

2 结果

2.1 免疫印迹 分别使用兔抗人 HSA 抗体和兔抗人 IFN α 2a 抗体,对成品进行免疫印迹试验,成品对两种抗体均呈阳性反应^[4],见图 1。

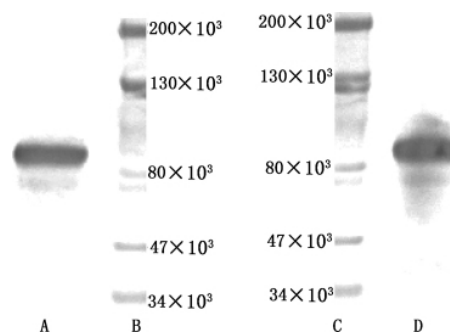


图 1 成品的免疫印迹结果

Fig 1 Western blotting of final product

A. 成品与抗 HSA 抗体的免疫印迹(Western blotting with anti - HSA antibody) B, C. 相对分子质量 marker(relative molecular mass marker) D. 成品与抗 IFN α 2a 抗体的免疫印迹(Western blotting with anti - IFN α 2a antibody)

2.2 生物学活性测定 用 WISH 细胞病变抑制法测定原液和成品的抗病毒生物学活性,所测数据用 SoftMax Pro 分析软件分析后符合 4 参数方程,见图 2。原液和成品的比活性结果见表 1。

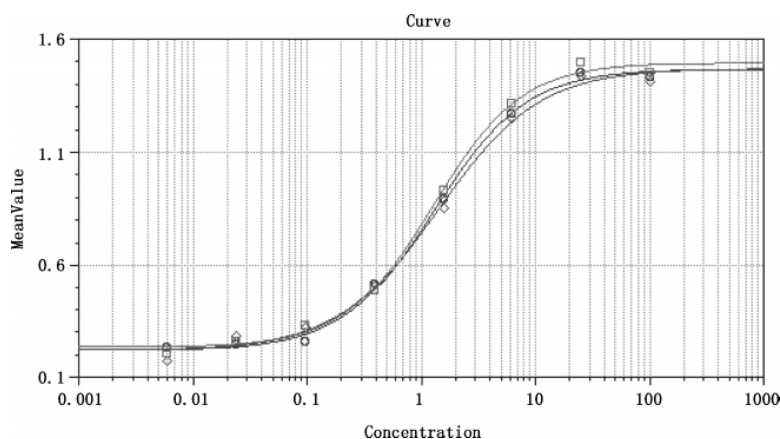


图 2 原液和成品生物学活性的剂量 - 反应曲线

Fig 2 Dose - response curves of bulk and final product in inhibiting VSV

○ 标准品(standard) □ 原液(bulk) ◇ 成品(final product)

表 1 原液和成品的比活性测定结果
Tab 1 Specific activity of rHSA - IFN α 2a

| | 原液(bulk) | 成品(final product) |
|--|-------------------|-------------------------------|
| 比活性 (specific activity) / IU \cdot mg ⁻¹ | 1st | 2.28 \times 10 ⁵ |
| | 2nd | 1.98 \times 10 ⁵ |
| | 3rd | 2.11 \times 10 ⁵ |
| | 平均值(mean) | 2.12 \times 10 ⁵ |
| | RSD /% | 7.09 |
| | 回收率(recovery) /% | 112 |
| | | 90 |

2.3 肽图测定 原液经胰蛋白酶消化后,进行 HPLC 分析, HPLC 图谱与参考品的图谱一致,见图 3。

2.4 其他指标的检测结果 根据 2010 年版中国药典(三部) 的要求,对原液还进行了纯度、相对分子质量、N - 末端氨基酸序列等项目的检测,对成品还进行了无菌、异常毒性、聚山梨酯 80 含量等项目的检测,结果均符合规定。

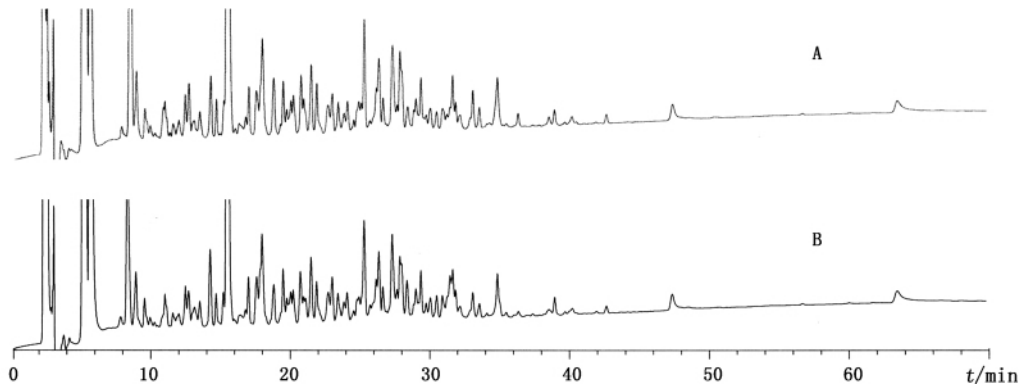


图 3 原液的肽图

Fig 3 Peptide maps of bulk

A. 参考品(reference) B. 原液(bulk)

2.5 rHSA - IFN α 2a 的质量控制标准 在参考重组产品质量控制要点及 ICH(人用药品注册技术要求

国际协调会) 有关质量标准制定原则的基础上,制订了 rHSA - IFN α 2a 的质量标准,见表 2。

表 2 rHSA - IFN α 2a 原液质量控制标准

Tab 2 Requirements for quality control of the bulk of rHSA - IFN α 2a

| 检测项目(subject) | 检测方法(method) | 标准(specification) |
|--|-----------------------------------|--|
| 比活性(specific activity) | WISH/VSV | $\geq 1.5 \times 10^5$ IU \cdot mg ⁻¹ |
| 纯度(purify) | SDS - PAGE(非还原, un-reduced) HPLC | $\geq 95.0\%$ $\geq 95.0\%$ |
| 相对分子质量(relative molecular mass) | SDS - PAGE(还原, reduced) | $8.57 \times 10^4 \pm 8.6 \times 10^3$ |
| 外源性 DNA 残留量(residual extraneous DNA content) | 点杂交(dot hybridization) | ≤ 10 ng/dose |
| 宿主菌蛋白残留量(residual host bacterial protein content) | ELISA | $\leq 0.10\%$ |
| 细菌内毒素检查(bacterial endotoxin) | LAL | < 10 EU/dose |
| 等电点(isoelectric point) | 等电聚焦法(isoelectrofocusing) | 4.5 - 6.5 |
| 紫外光谱(UV maximum) | 紫外扫描(UV scan) | (278 \pm 3) nm |
| 肽图(peptide map) | 胰蛋白酶消化(tryptic digestion) | 与参考品一致(conformed to reference) |
| N 端氨基酸序列(N - terminal amino acid sequence) | Edman 降解(Edman degradation) | DAHKSEVAHRFKDLG |

3 讨论

用 WISH 细胞/VSV 病毒测定系统比较干扰素 α - 2a 活性测定国家标准品和 rHSA - IFN α 2a 的剂

量反应曲线。所测数据用 SOFT MAX 分析软件分析后,均符合四参数方程式: $Y = ((A - D) / (1 + (X / C)^B)) + D$, 即在半对数图上呈典型的 S 型曲线,其

相关系数值均大于 0.99^[5],见图 2。将剂量反应曲线中直线部分的稀释度和相应的吸光度值作直线回归,求出两回归线的斜率,经 *t* 检验分析,国家标准品与 rHSA-IFN α 2a 的回归线斜率之间无显著性差别($P > 0.05$),表明 IFN α 2a 活性测定国家标准品与 rHSA-IFN α 2a 的剂量反应曲线相同,因此可以使用 WISH 细胞/VSV 病毒测定系统和 IFN α 2a 活性测定国家标准品对 rHSA-IFN α 2a 进行抗病毒活性测定^[6]。

与 IFN α 2a 相比,rHSA-IFN α 2a 的比活性降低了 100 倍以上,造成比活性降低的原因一方面是因为连接的 HAS 相对分子质量高达 6.6×10^4 ,是 IFN α 2a 相对分子质量的 3 倍以上,另一方面可能是因为连接 HSA 分子后 IFN α 2a 分子的空间结构发生了变化,与 IFN 受体的结合受到了影响^[7,8]。

本研究制定的 rHSA-IFN α 2a 质量标准能有效控制产品的安全性、有效性,其中的检验方法稳定可靠、操作简便,适用于该产品的常规检定,对其他细胞因子与血清白蛋白融合蛋白制品的检定也具有借鉴意义。

参考文献

- 1 Bingfa X, Qinglin F, Hui H *et al.* Anti-hepatitis B virus activity and mechanisms of recombinant human serum albumin-interferon-alpha-2b fusion protein in vitro and in vivo. *Pharmacology* 2009, 83

- (6): 323
- 2 Chemmanur AT, Wu GY. Drug evaluation: Albuferon-alpha--an antiviral interferon-alpha/albumin fusion protein. *Curr Opin Investig Drugs* 2006, 7(8): 750
- 3 ChP(中国药典). 2010. Vol III(三部): Appendix(附录) VIII A
- 4 YUAN Li-yong(袁立勇), RAO Chun-ming(饶春明), LI Xiang(李响). Study of the requirements and methods for quality control of recombinant GM-CSF/IL-3 fusion protein(GM-CSF-IL-3 融合蛋白质量标准的研究和建立-CHKD 期刊全文数据库). *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)* 2008, 28(10): 1605
- 5 WANG Jun-zhi(王军志). The Research Development and Quality Control of Biotechnology Pharmaceuticals(生物技术药物研究开发和质量控制). 2nd Ed(第 2 版). Beijing(北京): Science Press(科学出版社) 2007. 120
- 6 WANG Lan(王兰), RAO Chung-ming(饶春明), TAO Lei(陶磊) *et al.* Study on methods and requirements for quality control of vascular endothelial growth factor inhibitor(血管内皮生长因子抑制剂质控方法和质量标准研究). *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)* 2010, 30(6): 977
- 7 Zhao HL, Yao XQ, Xue C *et al.* Increasing the homogeneity, stability and activity of human serum albumin and interferon-alpha2b fusion protein by linker engineering. *Protein Expr Purif* 2008, 61(1): 73
- 8 Balan V, Nelson DR, Sulkowski MS *et al.* A Phase I/II study evaluating escalating doses of recombinant human albumin-interferon-alpha fusion protein in chronic hepatitis C patients who have failed previous interferon-alpha-based therapy. *Antivir Ther*, 2006, 11(1): 35

(本文于 2010 年 9 月 13 日收到)

《药物分析杂志》编辑部声明

本刊已开通在线投稿编辑系统,并入网“中国学术期刊网络出版总库”,作者稿件一经本刊录用,将同时被“中国学术期刊网络出版总库”收录,进入因特网提供信息服务,并通过本刊在线系统实现文摘查询(非营利性)。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬,不再另付。作者如不同意,请在投稿时向本刊书面声明,否则将视为同意本刊网络传播权。