

## 聚乙二醇干扰素质量控制要点的探讨

裴德宁, 郭莹, 饶春明

中国食品药品检定研究院 重组药物室, 北京 100050

**摘要:**与普通干扰素相比,聚乙二醇干扰素具有半衰期长、给药次数少、血药浓度波动低等优势,上市产品日益增多。与普通干扰素结构上的差异决定了聚乙二醇干扰素具有独特的理化、生物学特性以及生产工艺,也决定了聚乙二醇干扰素质量控制的特殊性。重点探讨聚乙二醇干扰素质量控制中的主要难点,包括修饰度、修饰位点、相对分子质量等,为该品种的研发、生产及监管提供参考。

**关键词:**干扰素;聚乙二醇;聚乙二醇干扰素;修饰度;质量控制

**中图分类号:** R954.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2017) 09-1361-04

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.09.033

## Discussion on main points of quality control of PEGlated interferons

PEI De-ning, GUO Ying, RAO Chun-ming

Division of Recombinant Biological Products, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

**Abstract:** PEGlated interferons have many advantages compared with native interferons including longer half-life, fewer intervals, higher stability of blood concentration and so on, and more and more related products are coming into the market. The difference with native interferons in structure gives PEGlated interferons unique physicochemical and biological characteristics and production processes, as well as its specificity in quality control. Here we focus on discussing the main difficulties in quality control of PEGlated interferons, including modification degree, modified site, molecular weight, and so on, providing reference for the research and development, manufacture, and supervision of related products.

**Key words:** interferon; polyethylene glycol; PEGlated interferon; modification degree; quality control

聚乙二醇干扰素是将干扰素分子与聚乙二醇(PEG)分子通过共价键连接形成的化学修饰蛋白药物,干扰素与聚乙二醇连接后,相对分子质量显著增加,从肾脏排泄减少,在肝脏中暴露时间延长,聚乙二醇在干扰素周围产生空间屏障,减少蛋白酶的酶解作用,半衰期显著延长;聚乙二醇还能掩蔽干扰素上的抗原决定簇,降低免疫原性。以上机制使得聚乙二醇干扰素在临床上给药次数减少,血药浓度波动降低,治疗效果提高,不良反应减轻<sup>[1-3]</sup>。已在中国上市的这类产品有罗氏公司的聚乙二醇干扰素 $\alpha 2a$ 注射液,默沙东公司的聚乙二醇干扰素 $\alpha 2b$ 注射剂,厦门特宝公司的聚乙二醇干扰素 $\alpha 2b$ 注射液,用于慢性乙型肝炎、慢性丙型肝炎的治疗<sup>[4-5]</sup>,另外还有数家企业正在进行聚乙二醇干扰素

$\alpha 1b$ 、聚乙二醇干扰素 $\alpha 2a$ 、聚乙二醇干扰素 $\alpha 2b$ 、聚乙二醇集成干扰素等的临床或临床前研究。聚乙二醇干扰素与普通干扰素结构上的差异决定了其独特的理化、生物学特性和质量控制指标<sup>[6-7]</sup>。目前已上市或处于临床研究阶段的聚乙二醇干扰素(原液)的质量标准一般包括:生物学活性、蛋白质含量、纯度、游离干扰素、残留聚乙二醇、相对分子质量、细菌内毒素检查、紫外扫描、肽图等项目,但是普遍没有对聚乙二醇修饰的准确性进行控制,如修饰度、修饰位点等指标,本文将对与聚乙二醇修饰密切相关的检测指标及检测方法进行讨论。

### 1 修饰度

干扰素理论上可被聚乙二醇修饰的位点可能有多,但并不是每个位点都会被修饰,修饰度是

收稿日期: 2017-04-26

作者简介: 裴德宁, 副研究员, 研究方向为生物制品的质量控制。E-mail: peidening@nifdc.org.cn

\*通信作者 饶春明, 研究员, 研究方向为生物制品的质量控制。E-mail: raocm@nifdc.org.cn

实际被修饰位点个数与所有可被修饰位点个数的比值,是一个平均值。修饰度的高低与修饰反应条件、纯化条件等因素有关;修饰度是否与预期一致,关系到聚乙二醇干扰素半衰期的长短、生物学活性的高低,必须对其进行考察。

常用的修饰度测定方法有两类:一类是通过测定干扰素修饰前后相对分子质量的变化得到偶联到干扰素上的聚乙二醇的总相对分子质量,再根据单个聚乙二醇的相对分子质量计算出偶联到干扰素上的聚乙二醇的个数,测定相对分子质量的常用方法有十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、毛细管电泳、高效液相色谱(HPLC)等,这些方法操作比较简单,但是测定误差较大<sup>[8-9]</sup>;基质辅助激光解吸离子化飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)测定相对分子质量准确度较高,但由于仪器昂贵,使其应用受到了一定的限制,一般只在研发阶段使用<sup>[10-11]</sup>。另一类是通过测定未被修饰的氨基酸残基的量来计算修饰度,未修饰氨基的测定一般用三硝基苯磺酸(TNBS)法,该法简单易行,但干扰因素较多,灵敏度较低,也可以荧光胺代替TNBS来进行测定,优点是不受溶液中的mPEG-2分子的干扰,仅需纳克级的蛋白质就可完成测定<sup>[12-15]</sup>;未修饰巯基的测定一般采用2-硝基苯甲酸(DTNB)法<sup>[16]</sup>;还可以用一端连有正亮氨酸或荧光素等标记物的聚乙二醇分子修饰蛋白质,将其水解后,通过测定这些标记物的含量来计算蛋白质偶联的聚乙二醇个数,优点是准确度较高,但是操作繁琐,成本较高<sup>[17-18]</sup>。常规质量控制中一般使用TNBS、荧光胺、DTNB等方法测定修饰度,以监测生产工艺及产品的稳定性。

## 2 修饰位点

修饰位点的位置是影响聚乙二醇干扰素空间结构及生物活性的关键因素,以罗氏公司的聚乙二醇干扰素 $\alpha 2a$ 为例,其修饰位点为赖氨酸残基上的氨基,当被修饰的赖氨酸的位置不同时,生物学活性就会产生显著的差异,最大相差约2倍<sup>[19]</sup>。鉴定修饰位点的基本原则是用蛋白酶(如胰蛋白酶)将聚乙二醇干扰素和普通干扰素(作为对照)水解为肽段,分离肽段后用不同的方法进行比对分析。一种方法是对干扰素修饰前后质谱肽图变化情况,根据相邻肽段峰面积变化情况判断可能被聚乙二醇修饰的位点<sup>[20-23]</sup>;另一种方法是进行氨基酸测序,由于聚乙二醇空间位阻的屏蔽作用,被聚乙二

醇修饰后的氨基酸吸收峰消失或较小,通过比较两者图谱确定缺失的氨基酸,从而确定修饰位点<sup>[14,24]</sup>。

聚乙二醇蛋白质用蛋白酶水解时存在水解不完全的问题,一种新的分析方法是含有蛋氨酸基团的特殊的聚乙二醇衍生物修饰蛋白质,用溴化氰(CNBr)将聚乙二醇从蛋白质分子上去除后,再将蛋白质酶解,通过质谱分析、氨基酸测序等检测修饰位点<sup>[25]</sup>。当干扰素分子可修饰的位点有多个,而又难于实现定点修饰时,不同分子修饰位点的位置存在差异,从而形成同分异构体,这时需要先将同分异构体分离,再分别鉴定其修饰位点。在常规质量控制中,为了保证生产工艺稳定及产品的有效性,可以使用离子色谱等方法对这些已经鉴定出修饰位点的同分异构体的含量进行测定<sup>[26-27]</sup>。

## 3 相对分子质量

聚乙二醇分子存在一定的相对分子质量分布,因此修饰后的干扰素也没有均一的相对分子质量。聚乙二醇修饰蛋白质体积的增加及聚乙二醇长链之间的相互缠结,使电泳行为异常、迁移率降低,用SDS-PAGE测定的表观相对分子质量比实际的相对分子质量要高得多。根据所修饰的聚乙二醇类型的不同,表观相对分子质量的大小可以达到实际相对分子质量的1.5~2.5倍,因此宜采用质谱法确定聚乙二醇干扰素真实的相对分子质量。

目前,检测聚乙二醇修饰蛋白质相对分子质量分布指数的最佳方法是基质辅助激光解吸离子化飞行时间质谱,该法抗杂质干扰强,可降低样品预处理的难度,并且聚乙二醇化蛋白质经基质辅助激光解吸离子化后所得单电荷离子居多,质谱图易解析<sup>[28-29]</sup>,适合在研发阶段分析药物理化特性时使用。常规质量控制中,可以使用SDS-PAGE测定样品的表观相对分子质量,但是应同步上样经过质谱法确定了相对分子质量的同质参考品,样品与同质参考品的迁移率应一致。

## 4 生物学活性

聚乙二醇干扰素通过延长体内半衰期提高治疗效果,但是干扰素经聚乙二醇修饰后,其构象、空间位阻、静电结合性质、疏水性均发生改变,不可避免地影响其与受体的结合,从而引起体外生物学活性的降低,聚乙二醇修饰反应的过程、反应的副产物等也可造成聚乙二醇干扰素生物学活性的降低<sup>[30]</sup>。生物学活性降低的幅度与聚乙二醇的结构、大小、修饰度、修饰位点等因素有关,聚乙二

醇干扰素的比活性一般为普通干扰素的1%~10%，甚至更低，如果游离干扰素在纯化过程中没有完全去除或保存过程中聚乙二醇脱落产生新的游离干扰素，产品的比活性会异常升高<sup>[19,31]</sup>。因此，生物学活性测定可反映生产工艺的稳定性和产品的稳定性，为了控制游离干扰素的含量，比活性除了规定下限外，还应规定上限。

聚乙二醇干扰素生物学活性测定方法与普通干扰素相同，可以使用细胞病变抑制法或报告基因法。由于聚乙二醇干扰素与普通干扰素结构不同，两者的剂量反应曲线不一致，如果使用普通干扰素作为生物学活性测定标准品，测定结果的变异度较大，因此应使用同质标准品。由于各企业聚乙二醇干扰素的结构各不相同，目前尚未建立聚乙二醇干扰素生物学活性测定国际标准品或国家标准品，这就要求各企业建立自己的生物学活性测定同质标准品。

## 5 游离干扰素

干扰素经聚乙二醇修饰、纯化后，会有一些量的游离干扰素残留；聚乙二醇干扰素在保存过程中，聚乙二醇脱落也会产生游离干扰素，游离干扰素在人体内不但没有长效作用，而且因其比活性远大于聚乙二醇干扰素，少量游离干扰素的存在就能明显影响产品生物学活性测定的准确性，所以必须对游离干扰素的量进行控制。常用的检测方法包括 SDS-PAGE 法和 HPLC 法，由于游离干扰素与聚乙二醇干扰素相对分子质量不同，可以使用分子排阻高效液相色谱（SEC-HPLC）法或 SDS-PAGE 法测定，另外两者的疏水性也不同，也可以使用反相高效液相色谱（RP-HPLC）法检测<sup>[32-33]</sup>，游离干扰素的量一般应不超过总蛋白质量分数的1.0%。

## 6 残留聚乙二醇

干扰素修饰过程中使用过量的聚乙二醇，纯化之后可能会产生残留，聚乙二醇干扰素保存过程中，聚乙二醇还可能发生脱落，因此可以通过测定残留聚乙二醇含量来评价纯化工艺的有效性以及产品的稳定性。一般使用高效液相色谱-蒸发光散射检测器检测，样品经过 RP-HPLC 分离后，使用蒸发光检测器检测残留的聚乙二醇。蒸发光散射检测器工作原理是柱流出物经惰性气体雾化并在加热管中将流动相蒸发掉，留下的聚乙二醇颗粒进入光管，在光散射池中，聚乙二醇颗粒散射光源发出的光，记录此光强度的变化即得到聚乙二醇的残留

量<sup>[34-35]</sup>。也可以使用 SDS-PAGE 分离后，用碘染色的方法进行测定，但只能用于限度检查。聚乙二醇残留量一般应不超过蛋白质质量分数的5.0%。

## 7 其他项目

鉴别试验使用免疫印迹或免疫斑点法时，除了考虑蛋白质成分的鉴别，还要考虑聚乙二醇成分的鉴别，可以使用碘染色法，或者在鉴别试验中增加 HPLC 或 SDS-PAGE 法，通过供试品与对照品保留时间的一致性进行鉴别。进行纯度检查时，应对多修饰干扰素和聚乙二醇干扰素多聚体的量进行控制。多修饰干扰素是指偶联的聚乙二醇分子多于预期的修饰产物，其活性一般要低于正常修饰干扰素，多聚体是聚乙二醇干扰素分子之间聚集形成的，由于两者的相对分子质量明显都大于正常的聚乙二醇干扰素，可以使用 SEC-HPLC 法或 SDS-PAGE 法测定。

## 8 结语

聚乙二醇修饰技术可以显著延长蛋白药物的半衰期并有效降低其不良反应，已有数十种聚乙二醇化蛋白和多肽药物被批准用于临床，更多的该类药物正处于研发阶段。由于各生产企业所使用的聚乙二醇的种类、修饰位点的位置和数量、修饰反应的条件等各不相同，使得修饰产物的标准规定无法统一，因此《中国药典》各论中没有收录聚乙二醇蛋白和多肽药物，而是由各企业自行制定产品质量标准。

本文所提出的检测指标及检测方法具有较高的可操作性，如荧光胺法测定修饰度、离子色谱法测定不同修饰位点同分异构体的含量，简单易行，可以在常规质量控制中使用，对聚乙二醇干扰素及其他聚乙二醇蛋白药物的质量控制都具有一定的参考意义。

## 参考文献

- [1] Milla P, Dosio F, Cattel L. PEGylation of Proteins and Liposomes: a Powerful and Flexible Strategy to Improve the drug delivery [J]. *Curr Drug Metab*, 2012, 13(1): 105-119.
- [2] Perry C M, Jarvis B. Peginterferon- $\alpha$ -2a (40kD): A review of its use in the management of chronic hepatitis C [J]. *Drugs*, 2001, 61(15): 2263-2288.
- [3] Harris T M. Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2001, 40(7): 539-551.
- [4] Bailon P, Palleroni A, Schaffer C A, et al. Rational design of a potent, long-lasting form of interferon: a 40 kDa branched polyethylene glycol-conjugated Interferon  $\alpha$ 2a

- for the treatment of hepatitis C [J]. *Bioconjug Chem*, 2001, 12(2): 195-202.
- [5] Linday K L, Trepo C, Heintges T, et al. A randomized, double-blind trial comparing pegylated interferon alfa-2b to interferon alfa-2b as initial treatment for chronic hepatitis C [J]. *Hepatology*, 2001, 34(2): 395-403.
- [6] 中国药典 [S]. 三部. 2015. 38-40.
- [7] WHO Guidelines on the Quality, Safety, and Efficacy of Biological Medicinal Products Prepared by Recombinant DNA Technology [S]. 2013, 91-92.
- [8] Bullock J, chowdhury S, severdia A, et al. comparison of results of various methods used to determine the extent of modification of methoxy polyethylene glycol 5000-modified bovine cupri-zinc superoxide dismutase [J]. *Anal Biochem*, 1997, 254(2): 254-262.
- [9] Pettit D K, Bonnert T P, Eisenman J, et al. Structure-function studies of Interleukin 15 using site-specific mutagenesis, polyethylene glycol conjugation, and homology modeling [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(4): 2312-2318.
- [10] 李晶, 王永利, 杨化新, 等. 三硝基苯磺酸法测定聚乙二醇化重组人生长激素的平均修饰度 [J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(9): 1609-1612.
- [11] 蔡耘. 基质辅助激光解吸飞行时间质谱 (MALDI-TOFMS) 在生物工程产品质量控制中的应用 [J]. *生物工程进展*, 1996, 14(4): 23-25.
- [12] Habeeb A F. Determination of free amino groups in protein by trinitrobenzene sulfonic acid [J]. *Anal Biochem*, 1966, 14(3): 328-336.
- [13] Snyder S L, Sobocinski P Z. An improved 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid method for determination of amines [J]. *Anal Biochem*, 1975, 64(1): 28-288.
- [14] Veronese F M. Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions [J]. *Biomaterials*, 2001, 22(5): 405-417.
- [15] Stocks S J, Jones A J, Ramey C W, et al. A fluorometric assay of the degree of modification of protein primary amines with polyethylene glycol [J]. *Anal Biochem*, 1986, 154(1): 232-234.
- [16] Habeeb A F. Reaction of protein groups with Ellman's reagent methods [J]. *Enzymol*, 1972, 25(4): 457-464.
- [17] Veronese F M, Sartore L, Schiavon O, et al. A comparative study of enzymatic, structural, and pharmacokinetic properties of superoxide dismutase isolated from two sources and modified by monomethoxy-polyethylene glycol using different methods of coupling [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1990, 613(4): 468-474.
- [18] Sartore L, Caliceti P, Schiavon O, et al. Accurate evaluation method of the polymer content in monomethoxy (polyethyleneglycol) modified proteins based on amino acid analysis [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 1991, 31(3): 213-221.
- [19] Foser S, Schacher A, Weyer K A, et al. Isolation, structural characterization, and antiviral activity of positional isomers of monopegylated interferon  $\alpha$ -2a (PEGASYS) [J]. *Prot Exp Purif*, 2003, 30(1): 78-87.
- [20] Vestling M M, Murphy C M, Keller D A, et al. A strategy for characterization of polyethylene glycol-derivatized proteins [J]. *Drug Metab Dispos*, 1993, 21(5): 911-917.
- [21] Clark R, Olson K, Fuh G, et al. Long-acting growth hormones produced by conjugation with polyethylene glycol [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(36): 21969-21977.
- [22] Kinstler O B, Brems D N, Lauren S L, et al. Characterization and stability of N-terminally PEGylated rhG-CSF [J]. *Pharm Res*, 1996, 13(7): 996-1002.
- [23] 李晶, 何辉, 程速远, 等. 液相肽图法推断聚乙二醇化重组人生长激素的聚乙二醇修饰位点研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2012, 47(8): 626-630.
- [24] Qian X, Dong H, Tian H. Characterization of a site-specific PEGylated analog of exendin-4 and determination of the PEGylation site [J]. *Int J Pharm*, 2013, 454(1): 553-558.
- [25] Veronese F M, Sacc Q B, Laureto P P, et al. New PEGs for protein modification, suitable for identification of the PEGylation site [J]. *Bioconjug Chem*, 2001, 12(1): 62-70.
- [26] 周敏毅, 刘金毅, 程永庆. 聚乙二醇修饰蛋白质的修饰位点分析方法 [P]. 中国: CN102507824B, 2013-10-09.
- [27] Monkarash S P, Ma Y, Aglione A, et al. Positional isomers of monopegylated interferon $\alpha$ -2b: isolation, characterization, and biological activity [J]. *Anal Biochem*, 1997, 247(2): 434-440.
- [28] 刘长暖, 刘兰, 张翊, 等. 长效干扰素质控方法的研究 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2000, 13(4): 234-236.
- [29] 谭和平, 王彧婕, 邹燕, 等. 蛋白质分子量测试方法概述 [J]. *中国测试*, 2011, 37(2): 34-37.
- [30] Wang Y S, Youngster S, Grace M, et al. Structural and biological characterization of peglated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implication [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54(4): 547-570.
- [31] Huang Y S, Wen X F, Wu Y L, et al. Engineering a pharmacologically superior form of granulocyte colony-stimulating factor by fusion with gelatin-like-protein polymer [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2010, 74(3): 435-441.
- [32] Gaertner H F, Offord R E. Site-specific attachment of functionalized poly (ethylene glycol) to the amino terminus of proteins [J]. *Bioconjugate Chem*, 1996, 7(1): 38-44.
- [33] 唐微, 常远, 邱雪珍, 等. PEG 蛋白质分离纯化的新方法 [J]. *生物化学杂志*, 1996, 12(1): 73-77.
- [34] 李永红, 李响, 韩春梅, 等. 高效液相色谱蒸发光散射检测法测定聚乙二醇干扰素  $\alpha$ -2a 注射液中游离聚乙二醇的含量 [J]. *药物生物技术*, 2014, 21(4): 353-354.
- [35] 苑方圆, 李晶, 梁成罡, 等. 聚乙二醇 (PEG) 化尿酸氧化酶中游离 PEG 的含量测定 [J]. *药物分析杂志*, 2014, 34(3): 461-464.