



2015年中国药品质量安全年会

三种药用酶的质量研究

湖北省食品药品监督检验研究院

2015年11月 广州



目 录

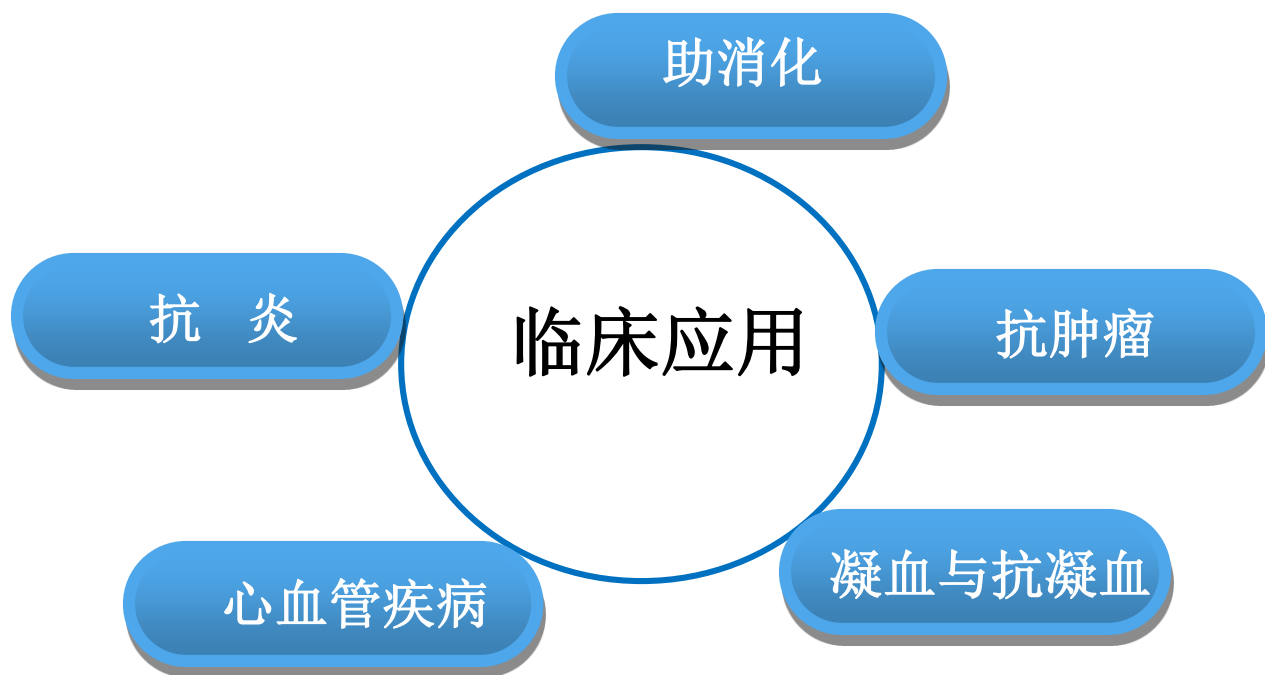
- 1 基本概述
- 2 案例分析
- 3 总结建议



概 述

【定义】 是从人、动物、植物或微生物中提取、分离、纯化获得的具有催化活性的酶类药物。

【特点】 专一性强、疗效高、应用广。





药用酶标准现状

【**中国药典**】制法要求、性状、鉴别、溶液的澄清度与颜色、安全性项目、效价、（高分子物质、有关物质、纯度）

【**其他标准**】性状、鉴别、溶液的澄清度与颜色、效价

标准收载	药用酶
《中国药典》2015年版	胰酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶、糜蛋白酶、玻璃酸酶、尿激酶、抑肽酶、凝血酶、门冬酰胺酶(埃希)、门冬酰胺酶(欧文)、胰激肽原酶
《国家药品标准》化学药品地方标准上升国家标准(第九、十六册)	淀粉酶、木瓜酶、中性蛋白酶、菠萝蛋白酶、纤溶酶、降纤酶
《卫生部药品标准》二部第六册-生化药品第一分册	溶菌酶、弹性酶
新药转正标准	巴曲酶、蚓激酶、胶原酶



存在的问题



原材料
控制不足

生产工艺
简单、粗放

质量标准不高



目 录

1	基本概述	凝血酶冻干粉
2	案例分析 ⇄	注射用门冬酰胺酶
3	总结建议	蚓激酶及肠溶制剂



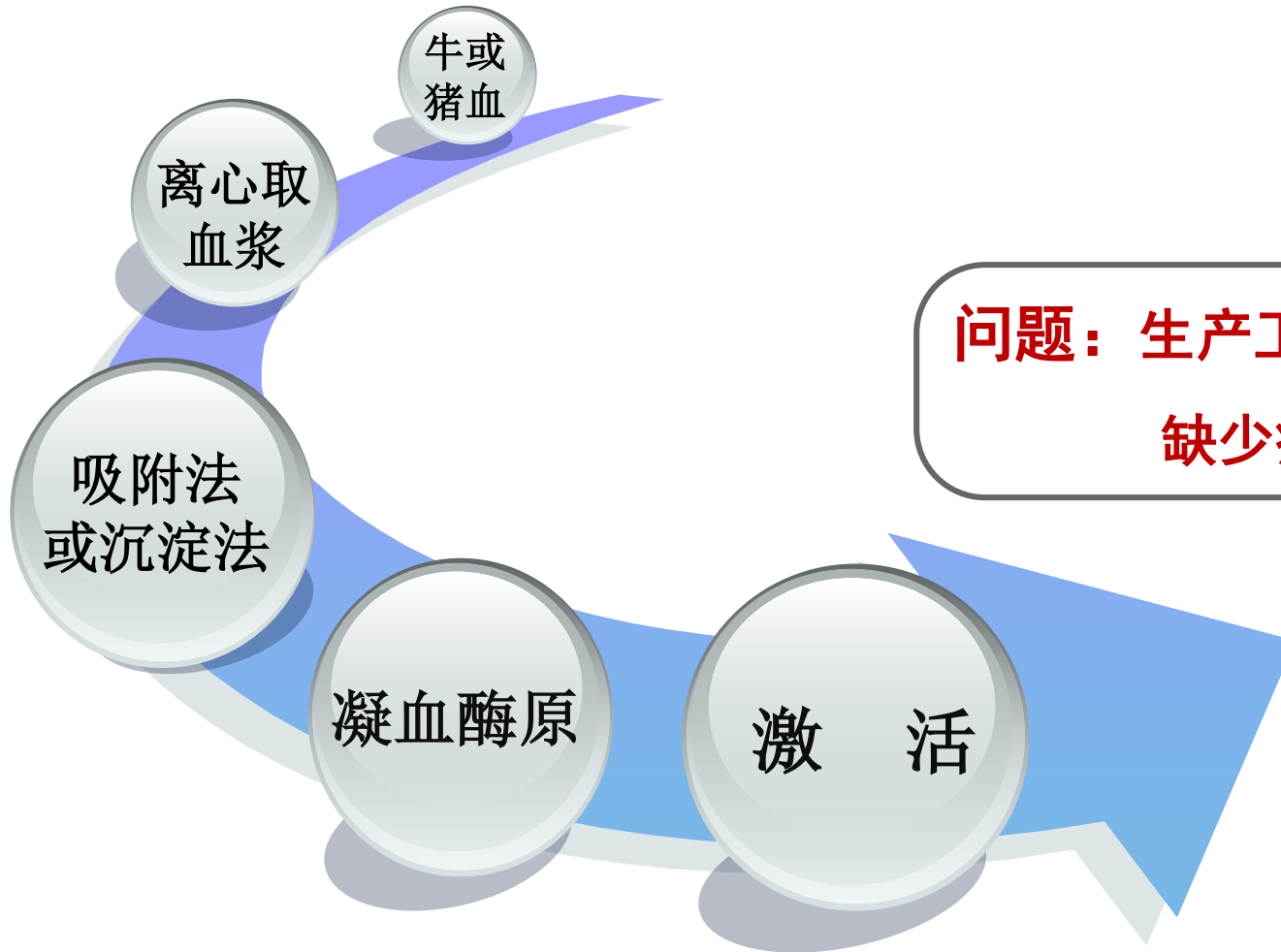
凝血酶冻干粉

生产工艺陈旧、落后导致产品组成成分复杂，有效成分含量低，存在病毒污染风险。





生产工艺-原料



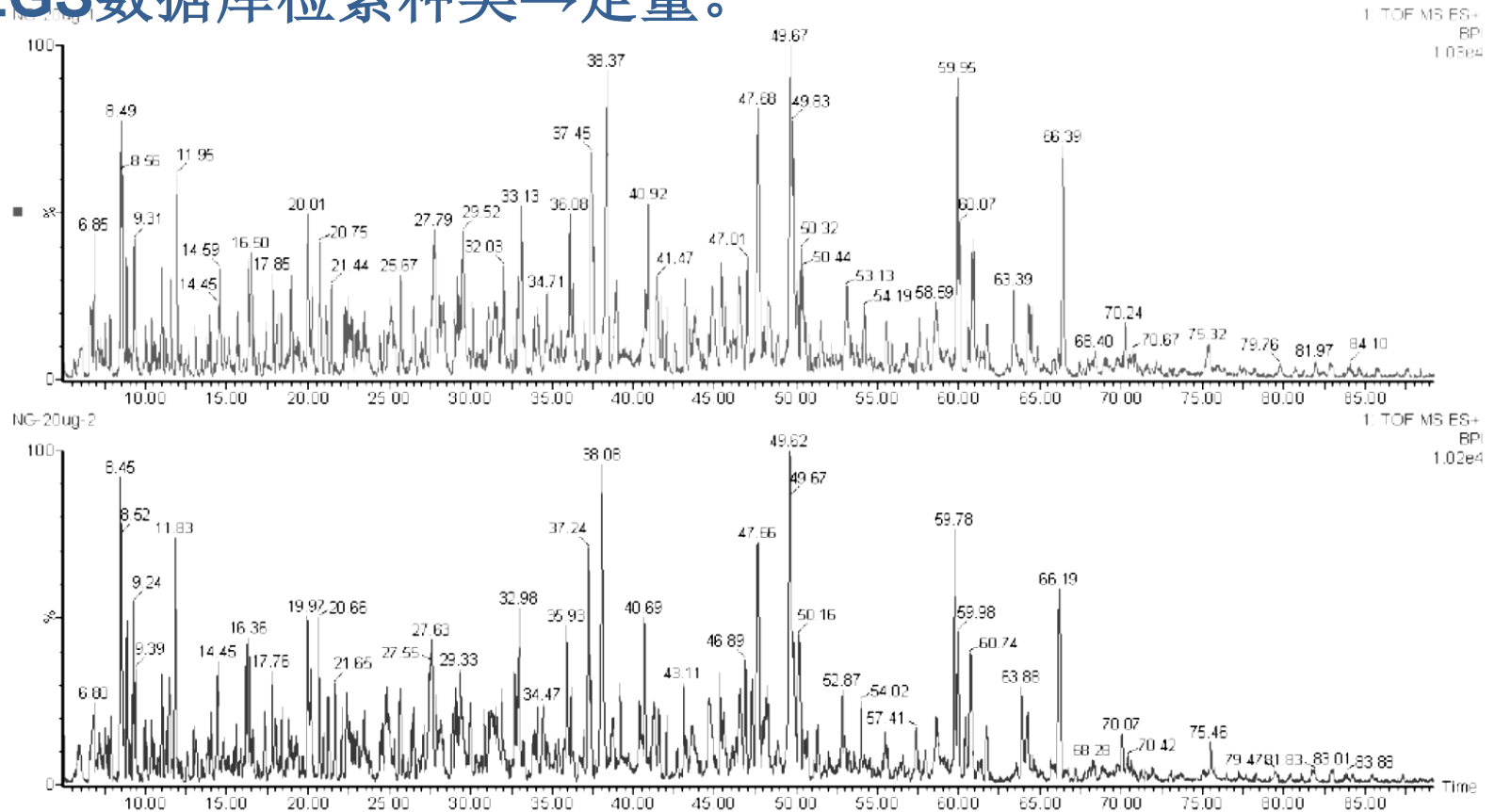
**问题：生产工艺陈旧、落后
缺少病毒灭活工艺**



组成成分分析

探索性研究

方法：蛋白质组学技术，酶解→UPLC分离→MS分析
→PLGS数据库检索种类→定量。

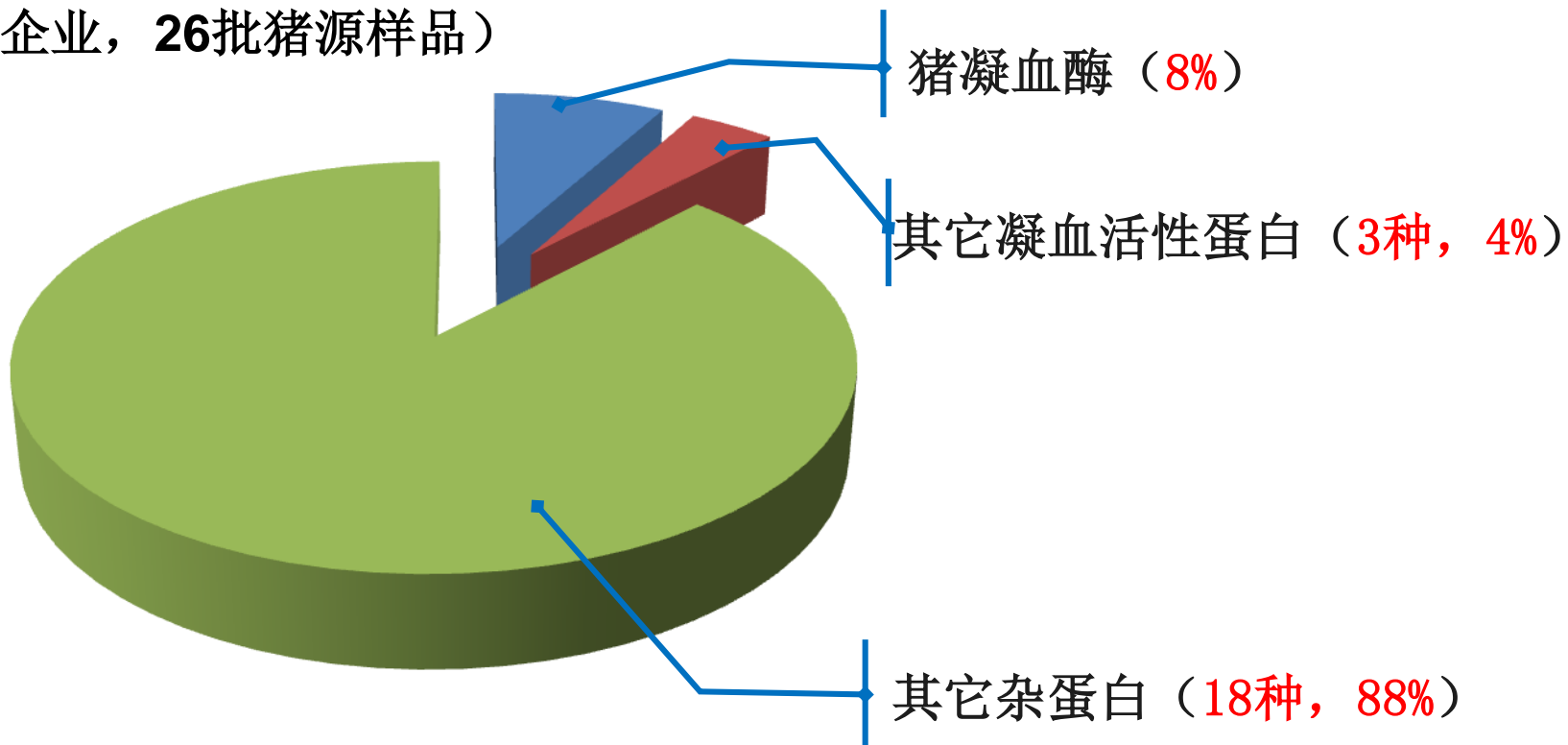


凝血酶冻干粉酶解物的典型总离子流图



组成成分分析

22种蛋白组分
(11家企业, 26批猪源样品)



➤ 提示：提取纯化工艺分离效果差。



病毒残留考察

人畜共患疾病

◆ 检测病毒的选择

口蹄疫

由小核糖核酸病毒科的一种口蹄疫病毒属的病毒引起，在猪和牛中传播速度快、死亡率、对人畜危害严重。

猪瘟

一种急性、热性、高度接触性传染病，只危害猪和野猪，其他动物不发病。

猪蓝耳

猪蓝耳病是由猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）引起的猪的一种高度接触性传染病。在我国广泛存在，是我国流行的主要猪病之一。



病毒残留考察

病毒核酸残留考察

方法：实时荧光定量PCR

过程：样品RNA提取→采用病毒RNA引物与探针进行扩增→采集荧光信号，据Ct值判定结果

结果：

18批制品 猪蓝耳：**18批阳性，100%**
 猪 瘟：**3批阳性，16%**
 口蹄疫：**4批阳性，20%**

2批制品 均呈阴性

提示：本品病毒核酸残留较普遍，潜在风险不容忽视。



病毒残留考察

2. 活病毒筛查

方法：病毒敏感细胞培养。

选用对猪蓝耳病病毒敏感的猴肾细胞(Marc-145)和对口蹄疫病毒敏感的地鼠肾细胞(BHK-21)作为宿主细胞，通过待检样品感染宿主细胞，连续传代(5代)培养观察，以病毒致细胞病变(CPE)程度评估病毒活性。

结果： 均呈阴性。

提示：本品病毒核酸残留较普遍。但现阶段风险一般，潜在风险不容忽视。



注射用门冬酰胺酶

检测方法的准确性差导致部分企业问题产品流入市场。





注射用门冬酰胺酶

基本信息

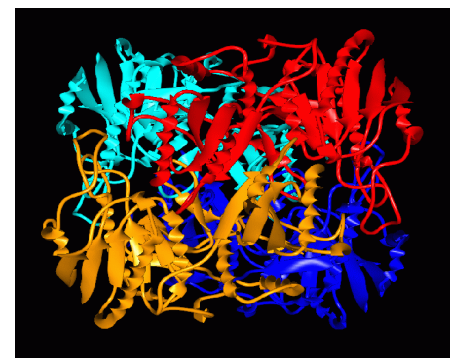
基本药物目录品种。

【定义】 门冬酰胺酶系从大肠埃希菌或欧文菌中提取制备的具有酰氨基水解活性的酶。

【适应症】 急性淋巴性白血病和非霍杰金淋巴瘤等

【历史沿革】 1994年美国上市→2009年我国生产上市→中国药典2010年版二部。目前国内有4家企业生产。

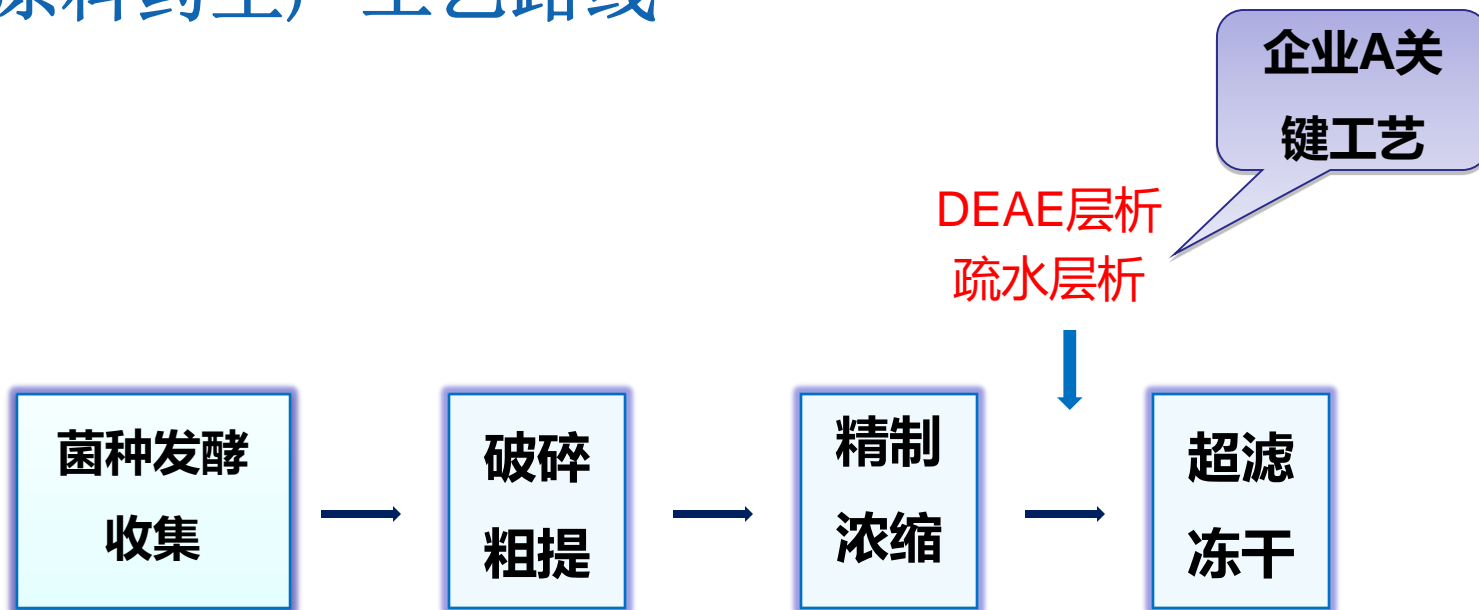
【不良反应】 主要为过敏及超敏反应





注射用门冬酰胺酶

◆原料药生产工艺路线



不同的生产工艺对产品质量的影响？



质量标准及结果

检验结果差异不大。
产品质量无差异？

项目	ChP.2010	企业A	企业B
性状	白色冻干块或粉末	符合规定	符合规定
鉴别 (1)	化学鉴别	符合规定	符合规定
鉴别 (2)	HPLC法, 与对照品保留时间一致	符合规定	符合规定
酸碱度	6.5-7.5	6.7	7.2
纯度	分子排阻色谱法 (不得低于95%)	96.2%	98.3%
干燥失重	5.0%	2.9%	3.8%
效价	酶活力 (酶/底物)	95.3%	100.1%

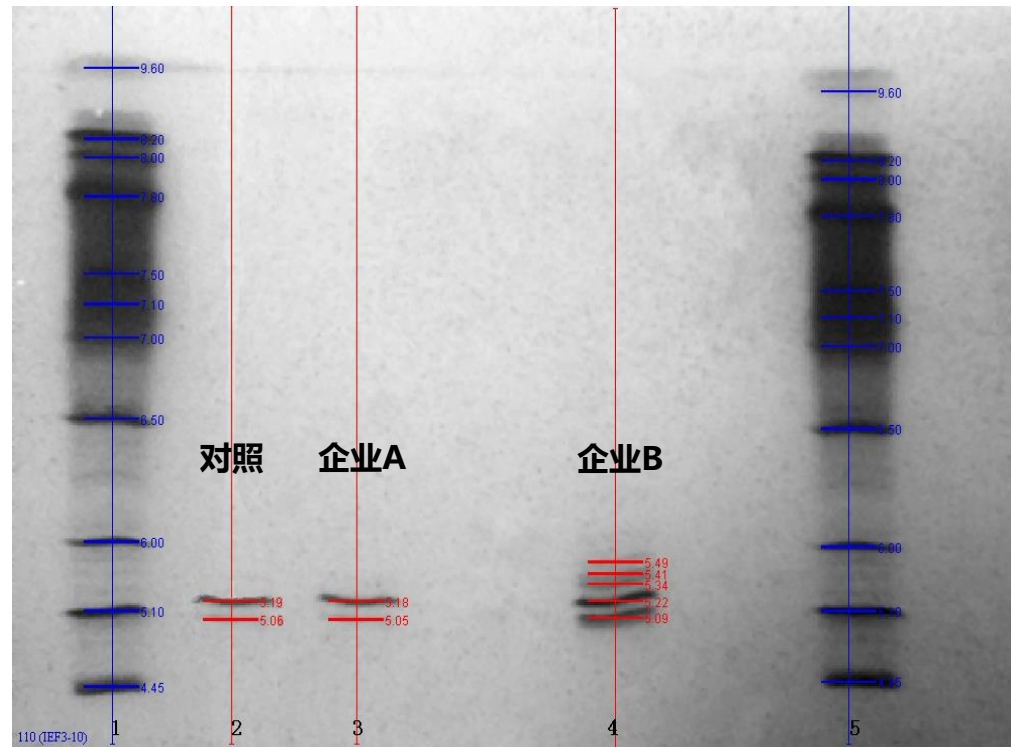


不同企业产品差异

1. **方法**：等电聚焦方法考察样品蛋白组分

结果：企业B产品杂条带较多

生产企业	主条带pI	杂质1 pI	杂质2 pI	杂质3 pI	杂质4 pI
企业A	5.18	5.05	/	/	/
企业B	5.22	5.49	5.41	5.34	5.09

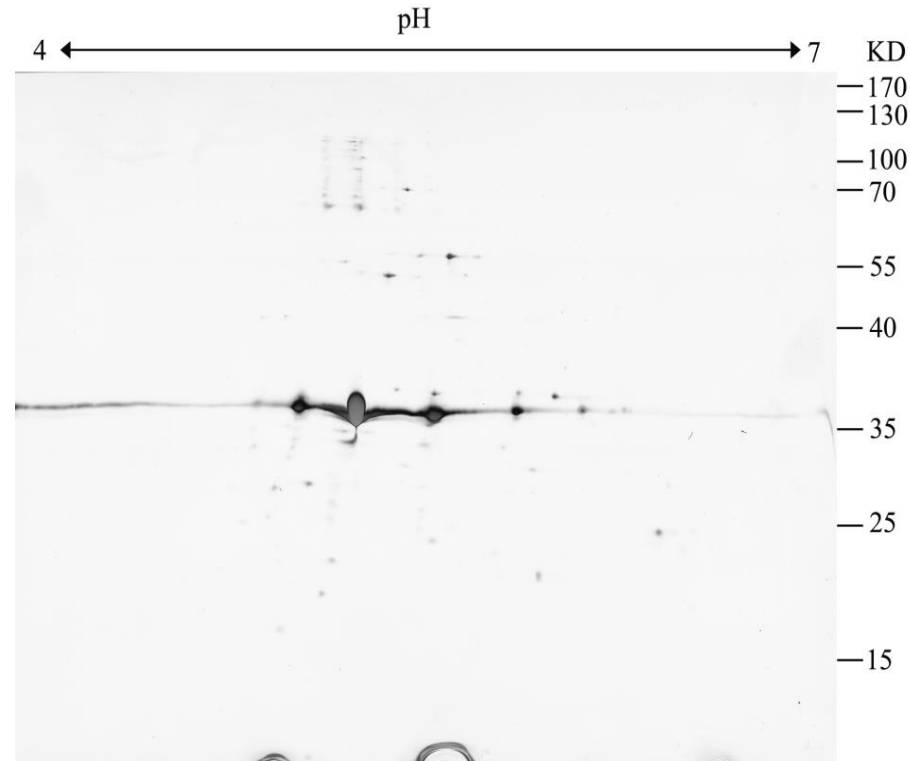
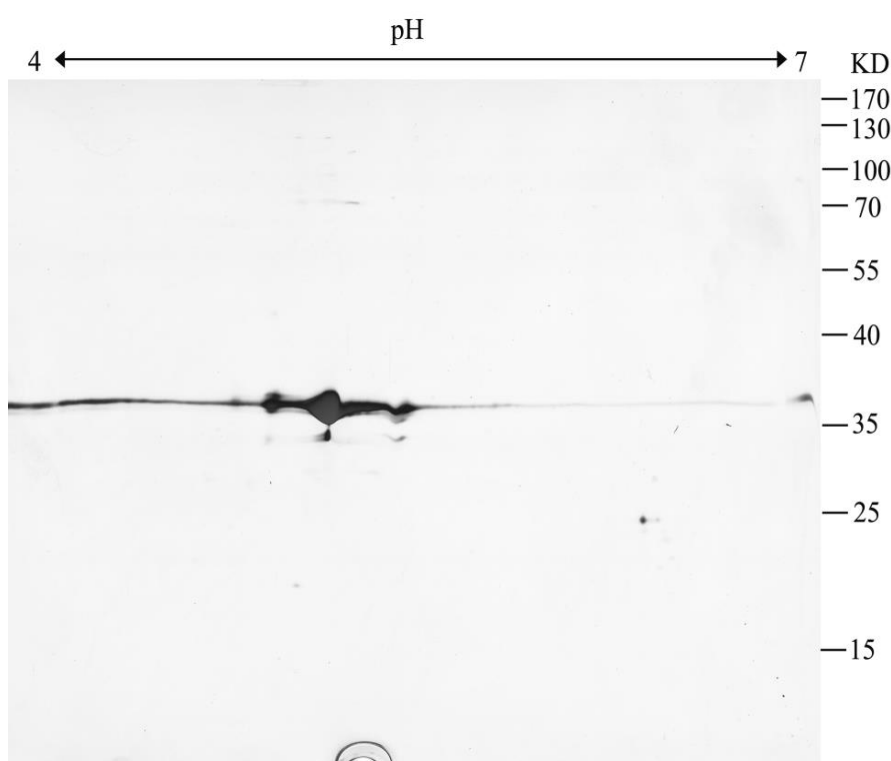




不同企业产品差异

2. 方法：双向电泳法

结果：除主斑点外，企业B产品有19个杂斑点，企业A产品有2个杂斑点。



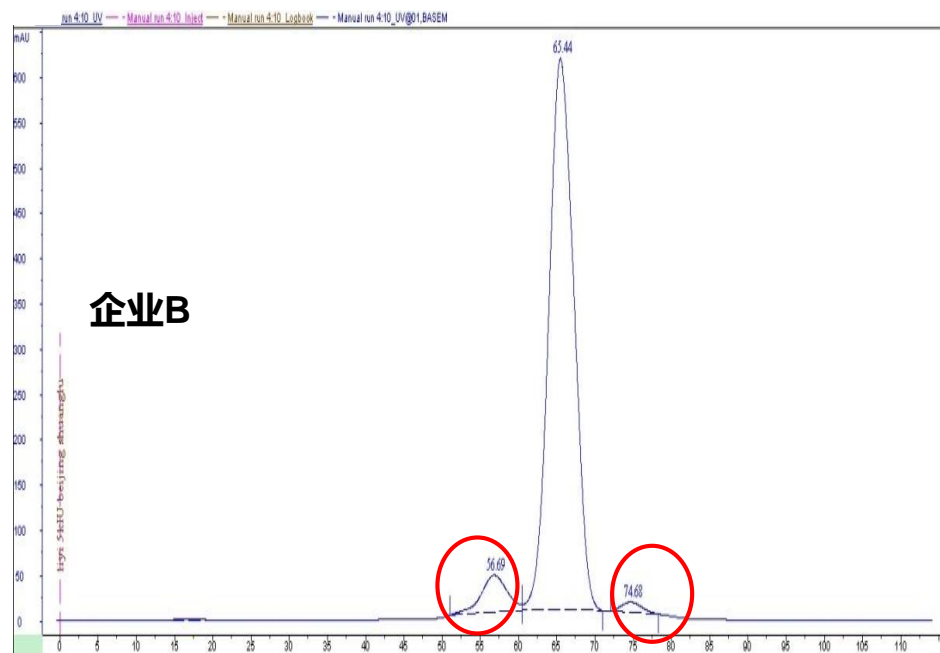
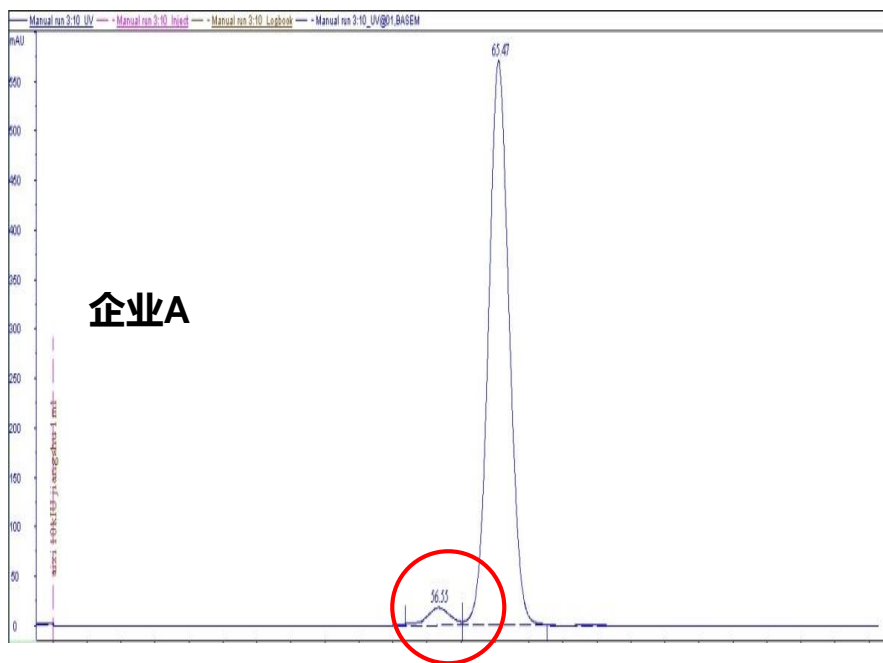
结论：企业B产品杂蛋白明显较多。



杂蛋白研究

蛋白纯化仪分离产品中各蛋白组份

实验方法：采用AKTA蛋白质纯化仪，选用合适的分子筛填料（chromdex 200 prep grade），磷酸盐缓冲液为洗脱液，对产品中蛋白质各组分进行分离和收集。





杂蛋白研究

生产企业	序号	蛋白编码	杂蛋白名称
企业A	1	P76096	Regulatory protein MokB (调节蛋白 MokB)
	2	P75704	Putative uncharacterized protein YkiA (非典型蛋白YkiA)
企业B	1	P0ADS6	Uncharacterized protein YagE (非典型蛋白YagE)
	2	P61889	Malate dehydrogenase (苹果酸脱氢酶)
	3	P23843	Periplasmic chaperone (周质伴侣蛋白)
	4	P0AF93	2-iminobutyrate aminotransferase (2-氨基丁酸转氨酶)
	5	P0ABZ6	Chaperone (伴侣蛋白)
	6	P0AFH8	Osmotically induced protein OmpR (渗透压诱导蛋白OmpR)
	7	P23847	Periplasmic chaperone (周质伴侣蛋白)
	8	P62617	2-C-methylmalate dehydrogenase (2-羧甲基苹果酸脱氢酶)
	9	P0A867	Transaldolase (转醛缩酶)
	10	P00448	Superoxide dismutase [Fe] (超氧化物歧化酶[Fe])
	11	P36649	Blue copper oxidase CueO (蓝铜氧化酶 CueO)
	12	P0AEL6	Ferrienterobactin-binding periplasmic protein(Ferrienterobactin连接周质蛋白)
	13	P23827	Ecotin (大肠杆菌素)
	14	P0AEG6	Thiol:disulfide interchange protein DsbC (硫醇：二硫交换蛋白DsbC)
	15	Q46845	Disulfide-bond oxidoreductaseYghU (二硫键氧化还原酶YghU)
	16	P0ACI6	Regulatory protein AsnC (调节蛋白AsnC)
	17	P76122	Uncharacterized protein YddJ (非典型蛋白 YddJ)
	18	P0AF45	Uncharacterized protein YjbE (非典型蛋白 YjbE)
	19	P0A7G2	Ribosome-binding factor A (核糖体连接因子 A)

注射用门冬酰胺酶中杂蛋白的分析研究

结果显示：企业A共检出并确证2个杂蛋白，企业B共检出并确证19个杂蛋白。所有杂蛋白均来源于大肠埃希菌。

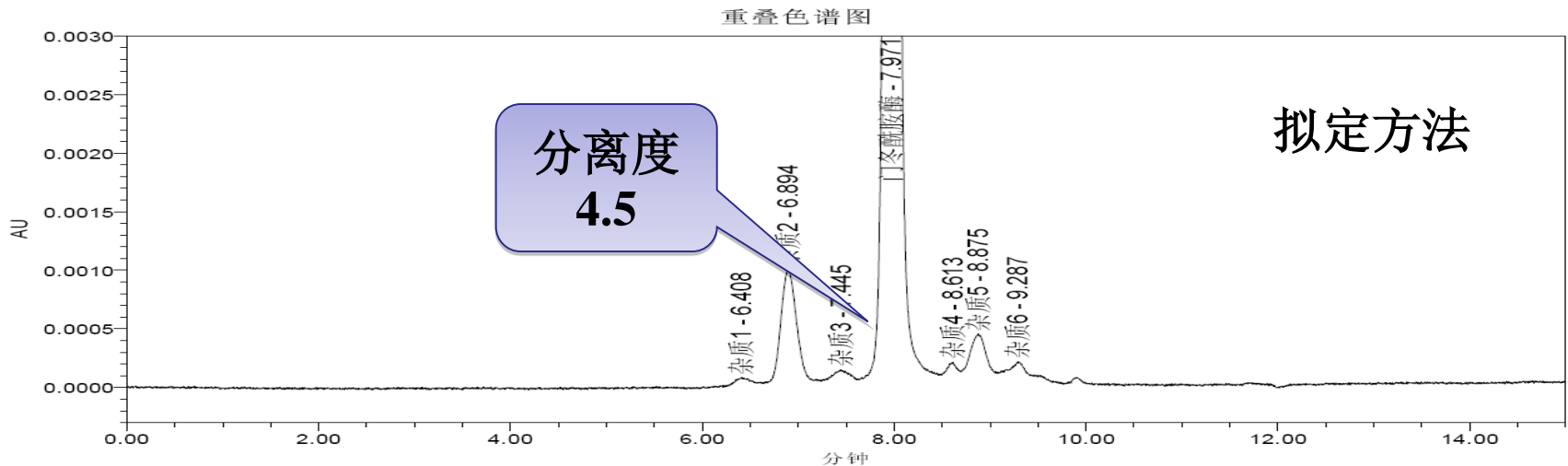
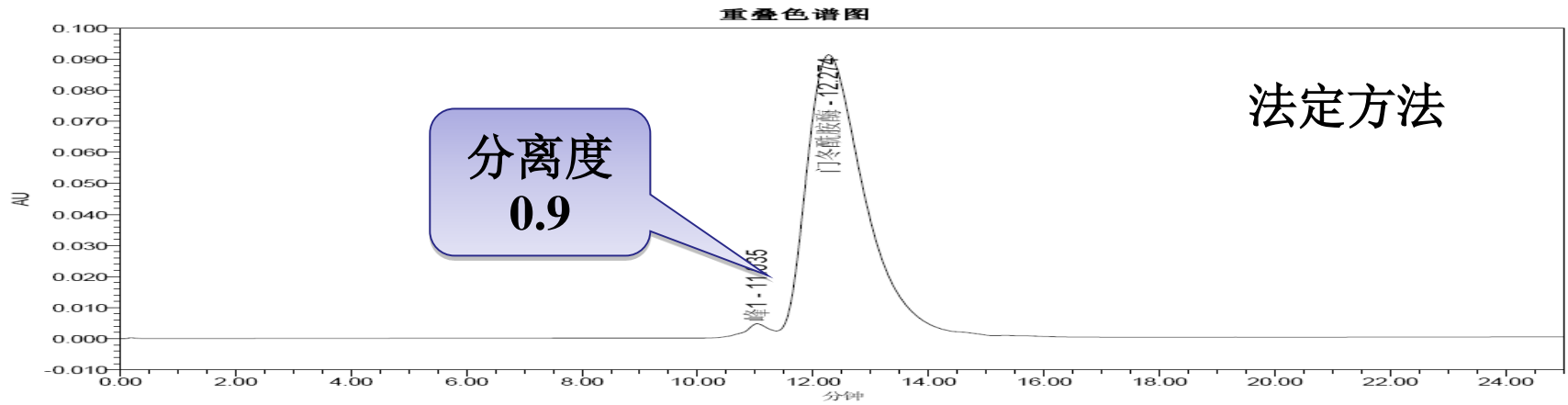
酶)



纯度方法研究

法定方法: HPLC法, SEC色谱柱, 磷酸盐缓冲液为流动相。(无系统适用性要求)

探索性研究方法: UPLC仪、ACQUITY UPLC SEC色谱柱 (1.7 μ m, 4.6 \times 300mm)。





纯度方法研究

结果：按拟定方法，企业A纯度变化不大，企业B结果**不符合规定**（限度为**95%**）。

方法	企业A		企业B	
	纯度 (%)	最大杂质与主峰分离度	纯度 (%)	最大杂质与主峰分离度
HPLC(法定)	96.2	0.8	98.3	0.9
UPLC (研究)	97.8	5.1	92.8	4.5

➤ 结论：纯度方法灵敏度准确度差，标准无法区分质量。



蚓激酶及肠溶制剂

原材料控制不足导致产品中有重金属残留。
效价测定方法仅反应部分酶活性，有待改进。





蚓激酶

【定义】又称蚯蚓纤溶酶，系人工养殖的**赤子爱胜蚓**中提取制备的一组具有降解纤维蛋白的水解酶。**18-42kD**、等电点为**3-5**。

【适应症】适用于纤维蛋白原增高和血小板凝集率增高的缺血性脑血管病患者

【历史沿革】**1982**年，日本**Mihara**首次提取分离→**1992**年，我国生产上市→新药转正标准

蚯蚓的重金属
吸附与富集





重金属残留

◆ 检验方法：2010年版《中国药典》附录方法

重金属(ppm)	限度 (参照中药材)	企业1	企业5	企业3	企业4	企业5
铅 (Pb)	5	0.41	0.39	0.51	0.6	0.02
砷 (As)	2	4.41	6.2	4.21	6.47	0.55
铜 (Cu)	20	15.16	7.84	5.15	7.09	6.95
汞 (Hg)	0.2	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
镉 (Cd)	0.3	3.82	6.18	1.12	4.99	1.1

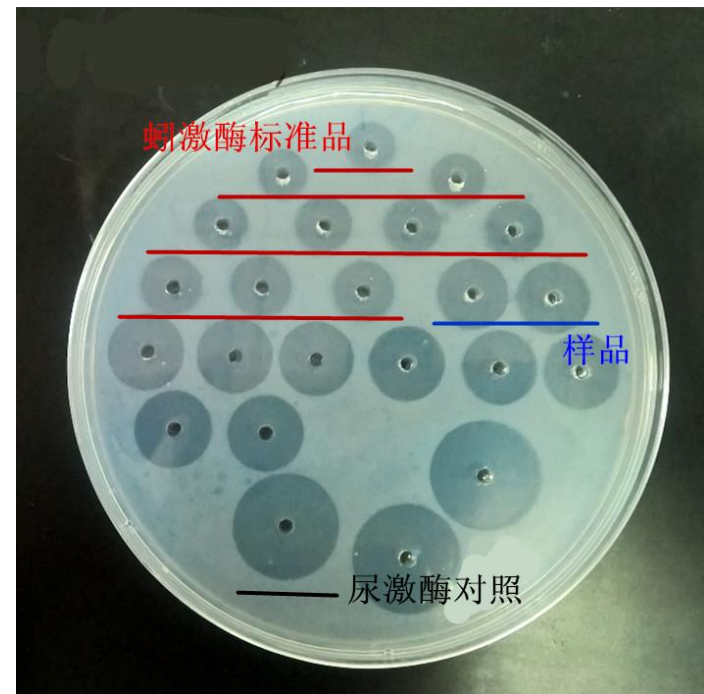
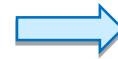
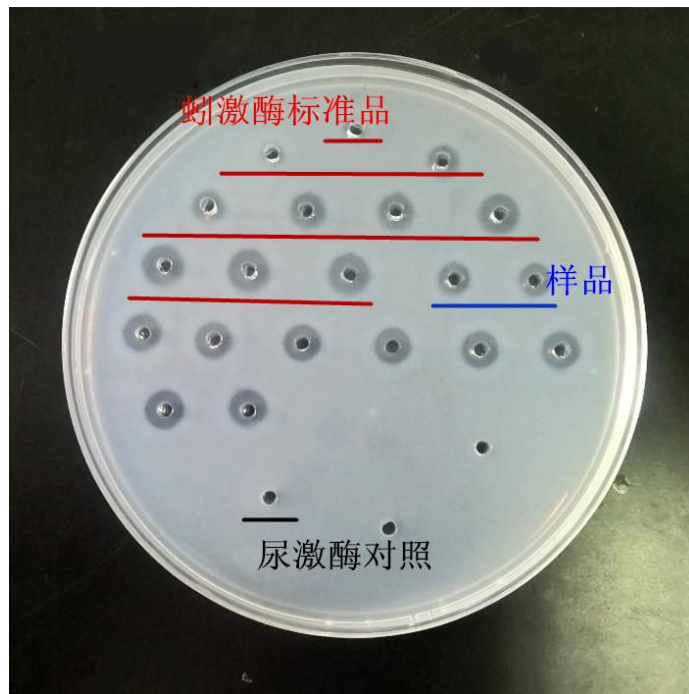


蚓激酶酶学性质

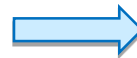
【生物活性】 ①纤维蛋白**溶酶**活性（直接溶解纤维蛋白）

② 纤维蛋白溶酶原**激酶**活性（激活溶酶原，间接溶解纤维蛋白）

【效价测定】 →利用和反映**溶酶**活性。



现行标准：平板中加入纤维蛋白原与凝血酶



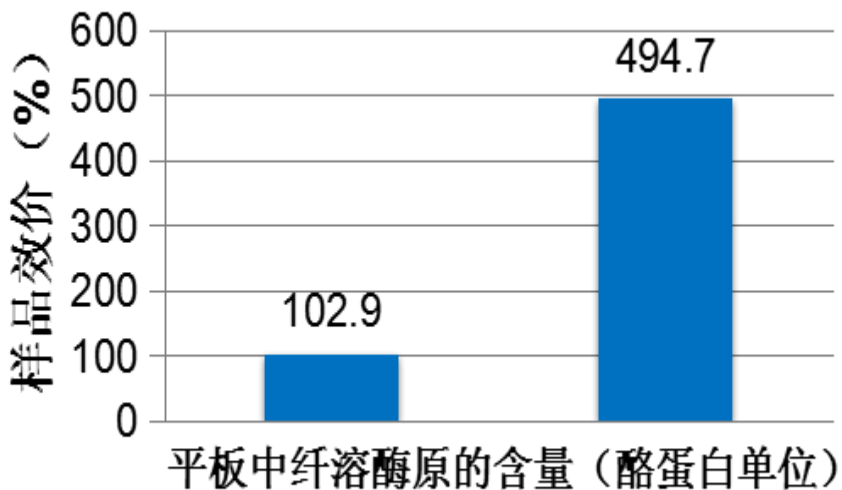
加入纤维蛋白溶酶原



酶学性质研究

纤维蛋白溶酶原含量 (酪蛋白单位/平板)	标准品 (5000IU) 溶圈大小 (垂直两直径 (μm) 乘积对数)	样品 (按标示量计算 约5000IU) 溶圈大小	样品按标准品标曲计 算效价 (%)
0 (法定检验方法)	5.9799	6.0089	102.9
9单位	6.3716	6.5485	494.7

样品效价 (按标准品计算)





目 录

- 1 基本概述
- 2 案例分析
- 3 总结建议



小结

药用酶 存在问题

- 原材料控制不足
- 生产工艺陈旧、粗放
- 质量标准可控性差
- 检测方法不专属



- 安全性风险(病毒残留、重金属残留)
- 蛋白组成成分复杂,有效成分少
- 同品种质量差异大
- 产品的生物活性不确定



建 议

- **建立技术平台，加强基础研究。** 如蛋白质组学技术平台、同工酶研究平台等，整合利用好资源，为企业提供技术支持。
- **应用现代技术，提升质量标准。** 注重安全性指标，方法的专属性。
- **借鉴生物制品，注重全程控制。** 加强生物原材料的质量控制，加强生产工艺的控制。



谢谢!

