

[文章编号] 1007-385X(2005)02-0138-05

重组腺病毒人内皮抑素的质量标准研究

李永红, 饶春明, 赵 阳, 高 凯, 袁力勇, 韩春梅, 李 响, 王军志(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

[摘 要] **目的:** 建立重组腺病毒人内皮抑素的质量标准和检测方法。**方法:** PCR 法鉴定腺病毒载体的 E2B 区和插入基因, 琼脂糖凝胶电泳检查重组病毒 DNA 酶切图谱。分光光度法测定病毒颗粒数, TCID₅₀ 法测定病毒感染滴度。感染人肝癌细胞 HepG2 测定插入基因的表达量, 感染人血管内皮细胞 HM2 测定表达产物的生物学活性。病毒的纯度分析采用 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值和 HPLC 法进行。采用 A549 细胞进行复制型腺病毒的检测。**结果:** 腺病毒载体 E2B 区和插入基因 PCR 扩增结果与理论相符, 重组病毒 DNA 的酶切图谱与标准品一致。原液病毒颗粒数为 2.4×10^{12} VP/ml, 滴度为 1.53×10^{11} IU/ml, 比滴度为 6.4% IU/VP; 成品病毒颗粒数为 1.0×10^{12} VP/ml, 滴度为 3.75×10^{10} IU/ml, 比滴度为 3.8% IU/VP。以 50 MOI 重组腺病毒感染 HepG2 细胞 48 h 后培养上清人内皮抑素表达量为 332 ng/ml。50 MOI 重组腺病毒对血管内皮细胞生长的抑制率为 55%。A₂₆₀/A₂₈₀ 为 1.29, HPLC 纯度为 99.7%。复制型腺病毒为 $\leq 1 \text{RCA}/3 \times 10^{10}$ VP。其他各项检测指标均符合规定。**结论:** 建立了重组腺病毒人内皮抑素的质量标准及其检测方法, 并用于该产品的质量控制。

[关键词] 腺病毒载体; 内皮抑素; 质量控制; 基因治疗

[中图分类号] R917 [文献标识码] A

Study of Requirements for Quality Control of Recombinant Adenovirus-Mediated Human Endostatin

LI Yong-hong, RAO Chun-ming, ZHAO Yan, GAO Kai, YUAN Li-yong, HAN Chun-mei, LI Xiang, WANG Jun-zhi (National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the quality control methods and requirements for recombinant adenovirus-human endostatin products. **Methods:** E2B region on the adenovirus vector and inserted endostatin gene were identified by PCR. The restricted enzyme digestive map of recombinant virus DNA was analysed by agarose gel electrophoresis. The number of virus particle and infectious titer were determined by UV and TCID₅₀ method respectively. The expression level of inserted gene was analysed by infection of human HepG2 cell. The potency of expression products was determined by its inhibition effects on the proliferation of human HM2 endothelial cell. The purity of Adv-endostatin was analysed by UV and IE-HPLC. The replication competent virus was detected by A549 cell method. **Results:** The PCR results of E2B region and endostatin gene on the vector were conformed to theoretics. The restricted enzyme digestive map of detected recombinant virus DNA was identical to that of the reference. The number of virus particle, the infectious titer and the ratio of infectious titer to virus particle for the bulk were 2.4×10^{12} VP/ml, 1.53×10^{11} IU/ml, and 6.4% IU/VP respectively. The number of virus particle, the infectious titer and the ratio of infectious titer to virus particle for the finished product were 1.0×10^{12} VP/ml, 3.75×10^{11} IU/ml and 3.8% IU/VP respectively. After the HepG2 cell was infected by recombinant virus for 48 hours, the concentration of endostatin in the culture was 332 ng/ml. The inhibition rate of 50 MOI recombinant adenovirus to endothelial cell was 55%. The A_{260nm}/A_{280nm} ratio was 1.29. The purity determined by IE-HPLC was 99.7%. There were less than one replication competent virus within 3×10^{10} VP recombinant adenovirus products. Other items complied with its corresponding requirements. **Conclusion:** The methods and requirements had been established for quality control of Adv-human endostatin.

[Key words] adenovirus vector; endostatin; quality control; gene therapy

内皮抑素(endostatin)是一种血管生成抑制剂,可以通过特异性抑制血管内皮细胞的迁移和增殖,从而抑制肿瘤的生长和转移^[1]。重组腺病毒人内皮抑素(rAd-hEndo)以腺病毒为载体将内皮抑素基因导入局

[基金项目] 国家 863"十五"计划重大专项(2003 AA223480)

[作者简介] 李永红(1972-),男,四川人,助理研究员,硕士,主要从事生物技术药物的质量控制研究

[通讯作者] 王军志, E-mail: wangjz@nicpbp.org.cn

部肿瘤组织直接表达内皮抑素从而抑制肿瘤新生血管的形成^[2,3]。该类产品目前在国内外均处于临床前研究阶段,其质量标准和检测方法尚没有文献报道。为了能够有效地控制这类产品的质量,保证其安全性和有效性,我们根据《人基因治疗研究和制剂质量控制技术指导原则》^[4]及《中国生物制品规程》(2000版)^[5]的要求,同时参照FDA有关文件,结合该产品的特点,建立了一套完整的质量标准,并对其质量进行了研究。

1 材料与方法

1.1 试剂、实验材料和仪器

重组腺病毒人内皮抑素,人胚肾293细胞和HM2人皮肤微血管内皮细胞由广州达博生物制品有效公司提供;DMEM和RPMI-1640培养基及胎牛血清为美国Gibco公司产品;PCR相关试剂为美国Promega公司产品;地高辛DNA标记检测试剂盒为瑞士罗氏公司产品。人内皮抑素ELISA测定试剂盒为美国R&D Systems产品。日本Astec PC-801 PCR仪,Waters 2695色谱仪,Waters 2487 UV检测器,Spectra MAX 250型自动酶标仪,Amersham pharmacia biotech Image Master VDS凝胶成像系统,NIKON ECLIPSE TE 300倒置显微镜。其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 腺病毒载体特征基因E2B区^[6]和内皮抑素基因的鉴定

提取重组病毒DNA进行PCR反应。E2B区PCR扩增的上游引物为5'-TCGTTTCTCAGCAGCTGTTG-3';下游引物为5'-CATCTGAAGCTCAAAGCGTGG-3'。内皮抑素基因扩增的上游引物为5'-CGACTTCCAGTGCTTCCAG-3';下游引物为5'-ACGATGTAGCGTGATGGC-3'。PCR循环参数均为:94℃变性5 min;94℃变性50 s,55℃复性50 s,72℃延伸60 s,循环30次;72℃延伸7 min。PCR产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳。

1.3 重组病毒DNA的限制性酶切图谱分析

提取重组病毒DNA,取DNA 0.1 μg,加入10 U/μl EcoRV酶1 μl,EcoRV酶的10×缓冲液2 μl,补足水至终体积为20 μl。37℃反应2 h。将酶切产物进行0.7%琼脂糖凝胶电泳。

1.4 病毒颗粒数测定^[6]

取供试品用其保存液进行2倍稀释,再加入等体积裂解液(0.2% SDS,2 mmol/L EDTA,20 mmol/L tris-HCl pH7.5)混合。以产品保存液与裂解液的等体积混合液作为空白对照。置56℃温育10 min,降至室温后于260 nm波长处测定吸光度(A_{260})。病毒颗粒数按下面的公式计算:病毒颗粒数(VP/ml) = $A_{260} \times 1.1 \times 10^{12} \times 4$ 。

1.5 病毒滴度测定^[7]

用半数组织培养感染量(tissue culture infectious dose 50, TCID₅₀)方法测定重组腺病毒的滴度,具体方法如下:①用含10% BCS的RPMI-1640培养基制备 4×10^5 /ml的293细胞悬液,在4个96孔平板中每孔加入100 μl,于37℃,5% CO₂培养18~22 h。②感染样品:将各板孔内培养液吸出,分别将不同稀释倍数的病毒液每孔加样200 μl,其中第1板各排样品浓度为:A:无病毒的培养液;B:1:6.4 × 10⁹;C:1:4.53 × 10⁹;D:1:3.20 × 10⁹;E:1:2.26 × 10⁹;F:1:1.60 × 10⁹;G:1:1.13 × 10⁹;H:1:8.00 × 10⁸。第2板各排样品浓度为:A:无病毒的培养液;B:1:5.66 × 10⁸;C:1:4.00 × 10⁸;D:1:2.83 × 10⁸;E:1:2.00 × 10⁸;F:1:1.00 × 10⁸;G:1:5.00 × 10⁷;H:1:2.5 × 10⁷。第3,4板分别与第1,2板相同加样。③37℃,5% CO₂培养60 min,吸出感染液,每孔加入200 μl新鲜含10% BCS的RPMI-1640培养基。④将96孔板置于CO₂孵箱内37℃培养10 d。其中第6,8天每孔换液100 μl。⑤第10天在显微镜下观察细胞病变,判断并记录每排中产生CPE情况的孔数。⑥根据Karber法计算病毒滴度。

1.6 插入基因表达量测定

将HepG2人肝癌细胞按 1×10^5 /孔接种于24孔板,37℃,5% CO₂条件下培养24 h后弃培养液,接种50 MOI(感染分子比率)的rAd-hEndo(设置空白对照,3个复孔)感染2 h后弃病毒液,每孔加入含5%新生牛血清的培养液1 ml,37℃,5% CO₂条件下培养48 h收集细胞培养上清液。用内皮抑素的ELISA试剂盒测定上清中内皮抑素的含量。

1.7 血管内皮细胞抑制试验

将用含10%胎牛血清的M199培养液培养的HM2人皮肤微血管内皮细胞按 1×10^4 /孔(100 μl/孔)接种于96孔板中。20 h后,rAd-hEndo组以50 MOI的rAd-hEndo按100 μl/孔感染细胞。同时设无病毒M199空白对照,50 MOI的rAd-LacZ组。各试验组设5个平行孔。72 h后,每孔加入0.5% MTT 20 μl,孵育4 h后,吸弃培养液,每孔加入100 μl DMSO,稍加震荡,终止反应。置温箱10 min后,在微板读数仪上测定各孔570 nm,630 nm双波长的吸光度值差(OD值)。按下式求出各组的细胞活力抑制率:抑制率(%) = (1 - 用药组平均OD值/空白对照组平均OD值) × 100%。

1.8 HPLC纯度检查

系统适应性试验通过改变色谱条件,如流动相组成、离子条件、pH和流速等因素,使杂质与主峰得到有

效分离。选定的色谱条件为:SOURCE™15Q(4.6 × 100 mm)色谱柱,流动相 A 液:20 mmol/L Tris-HCl (pH8.0); B 液:1 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl (pH8.0)。梯度洗脱:A 液→B 液,0→25 min,流速 0.5 ml/min,检测波长为 260 nm。取本品 100 μl 注入液相色谱仪,记录色谱图,按面积归一化法计算纯度。

1.9 复制型腺病毒(replication competent adenovirus, RCA)检测

用 DMEM(10% FBS)培养液制备 A549 细胞悬液(细胞浓度为 4×10^5 /ml),接种 12 个 12 孔板,每孔加 1 ml 细胞悬液。37℃,5% CO₂ 培养过夜。取其中 10 个板进行感染,1 个板做阴性对照,1 个板做阳性对照。无菌操作下取 3×10^{10} VP 待检品于 120 ml DMEM 内稀释。感染病毒:取 10 个板,将 1 个板内各孔培养基吸去,再加入 1 ml 病毒稀释液。其他 9 个 12 孔板重复上述操作。阴性对照:取另 1 板用 DMEM 培养,作为阴性对照。阳性对照:取 1 板同上方方法用 Ad5 wt 感染,作为阳性对照。阳性对照感染液制备 12 ml 病毒稀释液,浓度为 1×10^5 IU/ml。37℃,5% CO₂ 持续培养 2 周,观察每板是否存在 CPE 现象。

1.10 腺相关病毒检测^[8]

提取基因组 DNA 进行 PCR 反应。上游引物为 5'-AACTGGACCAATGAAAACCTTTCC-3';下游引物为 5'-AAAAAGTCTTTGACTTCCTGCTT-3'。PCR 循环参数:94℃ 变性 5 min;94℃ 变性 50 s,55℃ 复性 50 s,72℃ 延伸 60 s,循环 30 次;72℃ 延伸 7 min。PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。

1.11 其他检定项目

外观、pH 值、装量、内毒素、无菌试验、支原体检查、异常毒性、牛血清蛋白残留量、外源性 DNA 残留量、残留庆大霉素等项目按照《中国生物制品规程》(2000 版)^[5]的要求进行检定。氯化铯残留量用原子吸收法进行检测。残留 293 细胞蛋白的含量采用美国 Cygnus Technologies 公司 293 细胞蛋白残留量检测试剂盒进行 ELISA 测定。

2 结果

2.1 病毒 DNA 结构验证

用 PCR 法扩增腺病毒载体中 5 型腺病毒的 E2B 区,得到了约 880 bp 的扩增片段,与理论值相符(图 1)。对插入的内皮抑素基因进行 PCR 法检测,扩增出一条 426 bp 的条带,与理论一致(图 2)。用限制性内切酶 EcoRV 对供试品和标准品的重组腺病毒基因组进行酶切,二者的限制性酶切图谱完全一致并与理论相符(图 3)。

2.2 病毒颗粒数及感染滴度

腺病毒的颗粒数以其基因组 DNA 的含量为依据,即提取腺病毒的基因组 DNA,测定其在 260 nm 处的吸光度,以 1 个 A₂₆₀ 单位作为 1.1×10^{12} 颗粒数(VP)计算。待测原液的病毒颗粒数为 2.4×10^{12} VP/ml,成品为 1.0×10^{12} VP/ml。

图 1 腺病毒载体 E2B 区的 PCR 分析

Fig. 1 PCR analysis of E2B region on adenovirus vector

1: Negative control; 2: Positive control (wt-adv DNA);
3: rAd-hEndo; 4: DL2000 marker

图 2 插入内皮抑素基因的 PCR 分析

Fig. 2 PCR analysis of inserted endostatin gene

1: Negative control; 2: rAd-hEndo; 3: Positive control (pGEM-endostatin); 4: DL2000 marker

腺病毒的感染滴度采用 TCID₅₀ 的方法进行测定。用不同稀释倍数的病毒液感染 293 细胞,每个稀释倍数下作 12 个复孔(即 96 孔板中的 1 排),感染后第 10 天在显微镜下观察细胞病变(CPE),判断并记录每排中产生 CPE 情况的孔数,再根据 Karber 法计算病毒的滴度。待测原液的滴度为 1.53×10^{11} IU/ml(IU 为 infectious unit 的缩写),成品为 3.75×10^{10} IU/ml。病毒比滴度为病毒滴度与病毒颗粒数之比,表示活病毒的相对含量,原液为 6.4% IU/VP,成品为 3.8% IU/VP。

2.3 效力试验

效力试验包括插入基因的表达量和表达产物生物学活性测定 2 个项目。将 50 MOI 待测重组病毒感染

人肝癌 HepG2 细胞, 48 h 后取细胞培养上清液用 ELISA 的方法测定插入基因所表达的内皮抑素的含量为 332 ng/ml。将 50 MOI 待测重组病毒感染人皮肤微血管内皮细胞 HM2, 72 h 后进行 MTT 染色, 并用酶标仪测定各孔在 570 nm, 630 nm 处双波长的吸光度差值, 通过与空白对照组(只接种无病毒的培养基)进行比较计算对 HM2 细胞的抑制率 55%, 而以连接半乳糖苷酶 LacZ 基因的 rAd-LacZ 腺病毒对该细胞的抑制率为 5%。

RCA, 即 $< 1\text{RCA}/3 \times 10^{10}\text{VP}$ 。用 PCR 法测定腺相关病毒的污染, 结果为阴性(图 5)。采用直接培养法检测支原体为阴性。

图 3 重组腺病毒 DNA 的限制性酶切图谱

Fig. 3 Restrict-enzyme digestive map of recombinant adenovirus DNA

1: Standard; 2: rAd-hEndo; 3: DL 15000 marker

2.4 纯度和杂质检查

纯度测定包括 A_{260}/A_{280} 比值和 HPLC 纯度 2 项。 A_{260}/A_{280} 比值采用紫外吸收法测定, 结果为 1.29。用 Source 15Q 阴离子色谱柱对制品进行 HPLC 纯度检查。用选定的色谱条件进行 HPLC 分析得到的色谱图见图 4。样品主峰保留时间为 14.3 min, 按面积归一化法计算, 样品纯度为 99.7%。采用 ELISA 法测定残留 293 细胞蛋白结果小于 100 ng/ml。采用地高辛标记法进行 DNA 杂交试验测定残留 293 细胞 DNA 结果小于 10 ng/ml。采用原子吸收法测定氯化铯残留量结果小于 0.05 mg/L。用抑菌圈法测定残留庆大霉素结果为阴性。采用血凝抑制法测定牛血清蛋白残留量结果为 25 ng/ml。

2.5 外源因子检查

复制型腺病毒的检测采用 A549 细胞法。将 A549 细胞悬液 ($4 \times 10^5/\text{ml}$) 每孔 1 ml 接种 12 个 12 孔板, 取 3×10^{10} VP 待检重组病毒感染其中 10 个 12 孔板中的细胞, 另 1 个板做阴性对照, 1 个板做阳性对照。观察感染 2 周细胞病变情况, 其中待测组的 10 个板和阴性对照组中无细胞病变形, 而阳性对照组呈细胞病变的外观, 说明在 3×10^{10} VP 待检重组病毒中不含 1 个

图 4 重组腺病毒内皮抑素的 HPLC 图谱

Fig. 4 HPLC chromatogram of recombinant adenovirus-human endostatin

图 5 PCR 扩增检测腺相关病毒

Fig. 5 Detection of AAV by PCR analysis

1: Positive control; 2: DL 2000 marker
3: Negative control; 4: rAd-hEndo

2.6 其它项目

外观、装量、pH 值、无菌试验、内毒素检测和异常毒性试验等均符合《中国生物制品规程》(2000 版)^[5] 的相关规定。

3 讨论

病毒颗粒数的测定是一种理化测定的方法, 比滴度测定准确、重复性好; 另外腺病毒制品对人体的毒性主要来自载体病毒包膜蛋白引起的免疫反应。因此, 腺病毒产品的临床用剂量通常用病毒颗粒数来表示。但病毒颗粒数测定的是总的腺病毒数量, 而具有感染活性的腺病毒才能起到治疗作用, 病毒滴度则用来表示具有感染活性的病毒数量。根据《人基因治疗研究和制剂质量控制技术指导原则》^[4] 的要求, 病毒比滴度

即病毒感染滴度与病毒颗粒数的比值(IU/VP)应高于3.3%。病毒滴度测定的方法最早是用测定空斑形成单位(PFU)的方法,主要测定单层细胞培养中病毒裂解空斑的形成。空斑形成需要许多个感染周期,得到最终结果通常需要3个星期。一般来说,这种方法得到的结果在不同的实验室内难以重复,即使在同一实验室不同技术员操作也很少能得到相同的结果。TCID₅₀已用于许多病毒的滴度测定,用来测定腺病毒滴度比PFU的方法需要的时间相对少,并且我们在每个病毒稀释度设了12个平行对照,使测定结果相对稳定。但由于影响滴度测定的因素较多,比如细胞的来源和状态、培养的时间、培养液的成分以及操作的不同均影响测定结果,所以一般滴度测定的误差在30%左右。为了不同实验室间的数据能进行相互比较,有必要建立腺病毒的参考标准品,因此美国成立了一个腺病毒参考物质工作组(adenovirus reference material working group)在进行这项工作。

腺病毒载体制品中RCA的存在可引起一系列潜在的安全性问题,包括可能的腺病毒感染、野生型辅助功能引起的不确定载体复制以及宿主免疫反应的加强等。由于这些问题和其他潜在的不良反应,需要对RCA引起的用药安全性风险进行控制。对复制缺陷型腺病毒载体制品进行RCA的检测,目前我国《人基因治疗研究和制剂质量控制技术指导原则》^[4]中规定每 3.0×10^{10} VP中应不高于1RCA(即 $\leq 1RCA/3.0 \times 10^{10}$ VP)。对RCA的测定我们采用的是细胞培养/细胞病变效应试验的原理进行,这也是美国FDA的《人体细胞治疗和基因治疗指导原则》中所建议的方法。这里需要慎重选择感染分子比率(MOI),因为高剂量接种对细胞造成的毒性与RCA的存在无关,MOI过高也可能抑制RCA过量生长。

插入基因的表达量和表达产物生物学活性代表重组腺病毒制品的效力。在腺病毒载体上插入的内皮抑素基因,其表达量通过在体外进行细胞转染测定。在感染人肝癌HepG2细胞48h后,取培养上清液用ELISA的方法测定表达的内皮抑素的含量,通过规定表达产物含量的限值(不少于200 ng/ml),对该基因在进入人体后可能的表达量提出了要求。表达产物即内皮抑素的生物学活性对肿瘤的治疗效果至关重要,最好是能分离出表达产物,并对其生物学活性进行定量测定。但内皮抑素生物学活性测定的方法不成熟,重复性、稳定性较差,并且对内皮抑素的浓度要求较大^[9],因此我们直接将重组腺病毒人内皮抑素加入HM2人内皮细胞,观察重组病毒的表

达产物对内皮细胞增殖的抑制作用,同时以连接半乳糖苷酶LacZ基因的rAd-LacZ腺病毒做为阴性对照,排除病毒本身对内皮细胞的抑制作用。试验结果表明重组病毒对HM2细胞的抑制率为55%,而rAd-LacZ腺病毒的抑制率仅为5%,因此该方法在一定程度上可以起到检测重组病毒表达产物生物学活性的作用。

我们根据我国《人基因治疗研究和制剂质量控制技术指导原则》^[4]的要求,结合本研究结果建立了重组腺病毒人内皮抑素的质量标准,并用于我国首次申报该产品临床试验的质量检定,各项指标均符合相关规定,为保证该产品安全、有效和质量可控打下了坚实的基础。

致谢:感谢中山大学肿瘤防治中心黄文林教授、黄嘉凌博士后等在实验方法上提供的帮助;感谢本室张翊、丁有学、史新昌、裴德宁等在具体实验中进行协助。

[参考文献]

- [1] O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, *et al.* Endostatin an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth [J]. *Cell*, 1997, 88(2): 277-285.
- [2] Feldman AL, Restifo NP, Alexander HR, *et al.* Antiangiogenic gene therapy of cancer utilizing a recombinant adenovirus to elevate systemic endostatin levels in mice [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(6): 1503-1506.
- [3] Sauter BV, Martinet O, Zhang WJ, *et al.* Adenovirus-mediated gene transfer of endostatin *in vivo* results in high level of transgene expression and inhibition of tumor growth and metastases [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(9): 4802-4807.
- [4] 中国生物标准化委员会. 人基因治疗研究和制剂质量控制技术指导原则 [M]. 北京: 国家食品药品监督管理局, 2003. 2-6.
- [5] 中国生物制品标准化委员会. 中国生物制品规程(2000年版) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2000. 3-49.
- [6] 林建伟, 王军志, 饶春明. 重组腺病毒人白细胞介素2的质量分析 [J]. *药学报*, 2002, 37(8): 639-643
- [7] Nyberg-Hoffman C, Shabram P, Li W, *et al.* Sensitivity and reproducibility in adenoviral infectious titer determination [J]. *Nat Med*, 1997, 3(7): 808-811.
- [8] 高凯, 王军志, 饶春明, 等. 重组腺相关病毒2型/人凝血因子IX的质量研究 [J]. *药学报*, 2003, 38(9): 684-689.
- [9] 李永红, 王军志, 韩春梅, 等. 重组人内皮抑素的质控方法研究 [J]. *药学报*, 2002, 37(10): 807-811.

[收稿日期] 2004-09-27

[修回日期] 2005-04-22

[本文编辑] 王莹