

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.04.009

## 重组抗肿瘤抗病毒蛋白乐复能质控方法与质量标准的建立

裴德宁<sup>1</sup>, 饶春明<sup>1\*</sup>, 李永红<sup>1</sup>, 韩春梅<sup>1</sup>, 任跃明<sup>2</sup>, 王军志<sup>1</sup> (1. 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; 2. 国家药典委员会, 北京 100050)

[摘要] 目的: 建立重组抗肿瘤抗病毒蛋白乐复能(novaferon)的质控方法和质量标准。方法: 以 WST-1 染色法检测 Daudi 细胞增殖, 测定乐复能的抗肿瘤细胞增殖活性; 以 WISH 细胞病变抑制法测定乐复能抗病毒活性; 乐复能以胰蛋白酶酶切后, 用 HPLC 分析肽图; 其余检测项目按《中华人民共和国药典》(三部)2005 年版的规定进行。结果: 3 批乐复能原液和成品的抗肿瘤比活性均  $\geq 2.0 \times 10^6$  U/mg, 抗病毒比活性均  $\geq 1.0 \times 10^9$  IU/mg。3 批乐复原液的 HPLC 肽图与参考品一致, 乐复原液的蛋白含量、纯度、分子质量、等电点、末端氨基酸序列等指标及成品的细菌内毒素、苯甲酸含量、乙腈残留量等指标均符合规定。根据检定结果建立了乐复能的质量标准。结论: 建立的质控方法和质量标准可以保证乐复能的安全、有效和质量可控, 可用于乐复能的常规检定。

[关键词] 抗肿瘤抗病毒蛋白; 乐复能; 质量标准; 生物学活性

[中图分类号] R979.1; R978.1 [文献标志码] A [文章编号] 1007-385X(2009)04-0364-05

## Establishment of quality control methods and standards for recombinant antitumor-antivirus-protein novaferon

PEI De-ning<sup>1</sup>, RAO Chun-ming<sup>1\*</sup>, LI Yong-hong<sup>1</sup>, HAN Chun-mei<sup>1</sup>, REN Yue-ming<sup>2</sup>, WANG Jun-zhi<sup>1</sup> (1. 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; 2. Pharmacopoeia Committee of the People's Republic of China, Beijing 100050, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the quality control methods and standards for recombinant antitumor-antivirus-protein novaferon. **Methods:** Antitumor activity of novaferon was evaluated by determining its inhibitory effect on the proliferation of Daudi cells using WST-1 staining. The antiviral activity of novaferon was examined by cytopathic inhibition assay on WISH cells. The peptide map of novaferon was obtained by trypsin digestion and HPLC assay. Other routine tests were all performed according to the pharmacopoeia of the People's Republic of China. **Results:** The antitumor and antiviral activities of three batches of novaferon bulk and final products were  $\geq 2.0 \times 10^6$  U/mg and  $\geq 1.0 \times 10^9$  IU/mg, respectively. HPLC peptide maps of three batches of novaferon paralleled with that of standard product. Quantity, purity, molecular mass, isoelectric point and N-terminal amino acid sequence of three batches of novaferon bulk products and bacterial endotoxin content, benzyl alcohol content, acetonitrile of three final products were consistent with the quality standards. Results of other routine tests all complied with the standard requirements. The quality control methods and standards for recombinant antitumor-antivirus-protein novaferon were established accordingly. **Conclusion:** The established quality control methods and standards for novaferon are safe and effective, which can be used for routine quality control of novaferon.

[Key words] antitumor-antivirus-protein; novaferon; quality standard; biological activity

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(4): 364-368]

采用 DNA 改组(DNA shuffling)方法, 将 12 种人  $\alpha$  干扰素(IFN- $\alpha$ )基因通过酶切等方法产生切点不同、长短不一的核苷酸小片段, 再将这些小片段混合, 经多轮 PCR 扩增, 不同基因的同源片段就会互相替换, 随机组合, 从而得到大量的同源基因间相互杂交的新基因<sup>[1]</sup>。采用高通量筛选技术<sup>[2]</sup>, 对十多万个克隆株进行抗病毒和抗肿瘤活性鉴定, 筛选出

了重组抗肿瘤抗病毒蛋白。该蛋白由 498 个核苷酸编码的 166 个氨基酸组成, 理论分子质量为

[作者简介] 裴德宁(1978-), 男, 山东省潍坊市人, 硕士, 助理研究员, 主要从事生物制品质量控制方面的研究。E-mail: peidening@126.com

\* 通信作者(Corresponding author)。E-mail: raoem@nicpbp.org.cn

19 314.28。分子内含4个半胱氨酸,形成2对二硫键,无糖基化,等电点为6.60。

将带有该重组蛋白基因序列的质粒 pnovaferon 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,得到 DH5 $\alpha$ -509 工程菌株;经发酵、分离纯化,得到乐复能原液;再经稀释分装,得到乐复能成品。本研究根据《人用重组 DNA 制品质量控制技术指导原则》和《中华人民共和国药典》(三部)2005年版的要求,对该产品的生物学活性以及理化特性进行了研究,建立了乐复能的质控方法与质量标准。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

乐复能原液(批号:F20080513、F20080516、F20080519)和乐复能成品(批号:20080601、20080602、20080603)由杰华生物技术(北京)有限公司提供。IFN- $\alpha$  活性测定国家标准品用于抗病毒活性的测定(批号:97/04;效价:7 500 IU/支)。WISH 细胞(人羊膜细胞)和 VSV(水泡性口炎病毒)为本室保存。抗肿瘤活性参考品(批号:A20070607,效价: $1.3 \times 10^7$  U/ml)作为抗肿瘤活性测定的参考品,IFN- $\alpha$ 2b 原液(批号:20070913)作为抗肿瘤活性测定的对照品、Daudi 细胞(人 B 淋巴细胞瘤细胞,ATCC CCL-213)由杰华生物技术(北京)有限公司提供。胎牛血清为四季青公司产品, MEM 培养基和 RPMI 1640 培养基为 Gibco 公司产品, WST-1 染色试剂为 Roche 公司产品,结晶紫和 TPCK 处理的胰蛋白酶为 Sigma 公司产品。

### 1.2 仪 器 和 设 备

多功能酶标仪 SPECTR MAX250 和 SOFT MAX 分析软件为美国分子设备公司产品, Waters 2695 HPLC 系统为美国 Waters 公司产品, Vydac C18 柱(4.6 mm  $\times$  256 mm)为美国 GRACE 公司产品。

### 1.3 WST-1 染色法检测样品的抗肿瘤活性

离心收集培养的 Daudi 细胞,用完全培养液(含 RPMI 1640 培养基 450 ml、胎牛血清 50 ml、1 mol/L 的 HEPES 5 ml、100 mmol/L 的丙酮酸钠 5 ml、450 g/L 的葡萄糖 5 ml)制备成  $4.0 \times 10^3$  /ml 的细胞悬液,接种于 96 孔细胞培养板中,每孔 100  $\mu$ l,于 36.5  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养约 2 h。将抗肿瘤活性测定参考品用培养液稀释至每 1 ml 含 15 000 U。根据待测品的标示量,用培养液稀释至每 1 ml 约含 15 000 U。于 96 孔细胞培养板中每孔加入 180  $\mu$ l 完全培养液,在 B 行相应的孔中加入 20  $\mu$ l 预稀释好的参考品或待测品,自 B 行取 20  $\mu$ l 至 C 行做 10

倍稀释;同理,由 C 行取 20  $\mu$ l 至 D 行依次做 10 倍稀释,共 6 个稀释度,每个稀释度做 2 个复孔。将不同稀释度的参考品和待测品加入接种了细胞的培养板中,每孔 100  $\mu$ l,于 36.5  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 6 d。在细胞中加入染色液 WST-1,每孔 20  $\mu$ l,于 36.5  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下放置 4 h。以 690 nm 为参比波长,于波长 450nm 处用多功能酶标仪测定光密度( $D$ ),用 SOFT MAX 软件分析结果。

### 1.4 细胞病变抑制法测定样品的抗病毒活性<sup>[3]</sup>

收集对数生长期 WISH 细胞,用完全培养液(含 10% 胎牛血清的 MEM 培养液)配制成  $(2.5 \sim 3.5) \times 10^5$  /ml 的细胞悬液,接种于 96 孔板中,每孔 100  $\mu$ l,37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 4 ~ 6 h。将 IFN- $\alpha$  标准品用测定培养液(含 7% 胎牛血清的 MEM 培养液)预稀释成每 1 ml 含 1 000 IU。根据待测品的标示量,用测定培养液将待测品预稀释成每 1 ml 约含 1 000 IU。取上述接种过 WISH 细胞的 96 孔板,从 A 排起始加入用测定培养液 4 倍系列稀释的标准品(250 IU/ml 起始,共 8 个稀释度)和待测品(约 250 IU/ml 起始,共 8 个稀释度)各 100  $\mu$ l,每个稀释度 2 个复孔,于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 18 ~ 24 h。将 VSV 病毒用攻毒培养液(含 3% 胎牛血清的 MEM 培养液)稀释至 100 TCID<sub>50</sub>。取上述 96 孔板,弃上清,加入病毒液,每孔 100  $\mu$ l,将培养板置 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养约 24 h。当标准品溶液 E 排发生约 50% 病变时,弃去 96 孔板中的上清,每孔加入 50  $\mu$ l 染色液(结晶紫 50 mg,加无水乙醇 20 ml,溶解后加水稀释至 100 ml),室温放置 30 min。弃去染色液,流水小心冲洗,吸干残留水分。每孔加入 100  $\mu$ l 脱色液(无水乙醇 50 ml,乙酸 0.1 ml,用水稀释至 100 ml),室温放置 3 ~ 5 min,混匀。以 630 nm 为参比波长,于波长 570 nm 处用多功能酶标仪测定光密度值( $D$ ),用 SOFT MAX 软件分析结果。

### 1.5 HPLC 测定样品的肽图

将待测品用胰蛋白酶消化,然后以 RP-HPLC 对待测品进行肽图分析,流动相 A 液为 0.1% 三氟乙酸的水溶液,B 液为 0.1% 三氟乙酸的乙腈溶液,使用 70 min 的连续梯度(A 液从 98% 至 30%,B 液从 2% 至 70%),上样量 100  $\mu$ l,流速 1.0 ml/min,检测波长 214 nm。

### 1.6 其他指标的检测

蛋白质含量、纯度、分子量、等电点、安全性等指标根据《中华人民共和国药典》2005 年版进行检测。

## 2 结果

### 2.1 乐复能的抗肿瘤细胞增殖活性

用 Daudi 细胞增殖抑制实验检测乐复能的抗肿瘤细胞增殖活性, 所测数据用 SOFT MAX 分析软件, 分析后符合 4 参数方程, 见图 1。3 批原液的测定结果见表 1。

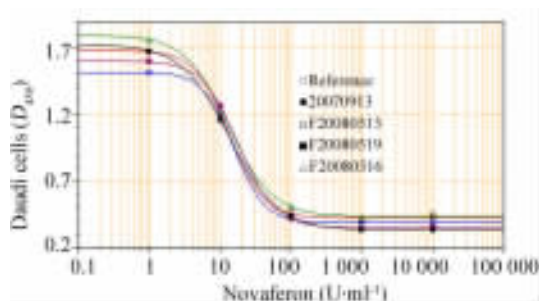


图 1 3 批乐复能原液抗 Daudi 细胞增殖的剂量-反应曲线  
Fig. 1 Dose-response curves of three batches of novaferon in inhibiting proliferation of Daudi cells

### 2.2 抗病毒活性

用 WISH 细胞病变抑制法测定乐复能的抗病毒活性, 所测数据用 SOFT MAX 分析软件分析后符合 4 参数方程, 见图 2。3 批原液的测定结果见表 1。

### 2.3 肽图

样品经胰蛋白酶裂解后, 进行 HPLC 分析, 3 批乐复能原液的 HPLC 图谱均与参考品一致(图 3)。

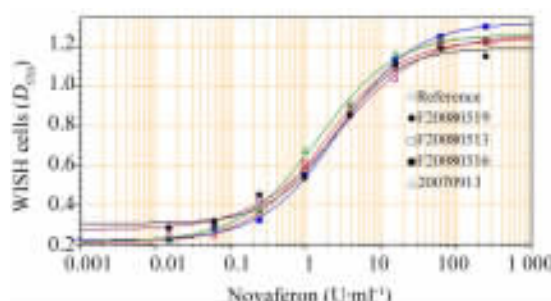


图 2 3 批乐复能原液抗病毒效应的剂量-反应曲线  
Fig. 2 Dose-response curves of three batches of novaferon in inhibiting proliferation of VSV virus

表 1 3 批乐复能原液的生物学活性测定结果

Tab. 1 Biological activities of three batches of novaferon

novaferon	Anti-tumor activity( U · ml <sup>-1</sup> )	Anti-virus activity( IU · ml <sup>-1</sup> )	Mass concentration ( ρ <sub>B</sub> /mg · ml <sup>-1</sup> )	Specific anti-tumor activity( U · mg <sup>-1</sup> )	Specific anti-virus activity( IU · mg <sup>-1</sup> )
F20080513	1.35 × 10 <sup>7</sup>	1.28 × 10 <sup>9</sup>	1.10	1.2 × 10 <sup>7</sup>	1.2 × 10 <sup>9</sup>
F20080516	1.17 × 10 <sup>7</sup>	1.20 × 10 <sup>9</sup>	1.02	1.1 × 10 <sup>7</sup>	1.2 × 10 <sup>9</sup>
F20080519	1.12 × 10 <sup>7</sup>	1.30 × 10 <sup>9</sup>	1.14	1.0 × 10 <sup>7</sup>	1.1 × 10 <sup>9</sup>
IFN-α2b (20070913)	5.12 × 10 <sup>4</sup>	1.63 × 10 <sup>8</sup>	1.22	4.2 × 10 <sup>4</sup>	1.34 × 10 <sup>8</sup>

### 2.4 其他指标的检测结果

根据《中华人民共和国药典》(三部)2005 年版的要求, 对乐复能原液还进行了纯度、分子量、N-末端氨基酸序列等项目的检测, 对成品进行了抗病毒活性、抗肿瘤细胞增殖活性、苯甲醇含量、聚山梨酯 80 含量、乙腈残留量等项目的检测, 均符合规定。

### 2.5 乐复能的质量控制标准

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, 制订了乐复能的质量标准(表 2)。

## 3 讨论

抗肿瘤细胞增殖是乐复能的主要活性之一, 但对不同肿瘤细胞其抗增殖活性有一定差异。目前没

有统一的细胞系用于检测干扰素的抗肿瘤增殖活性, 国际上通常采用 Daudi 细胞检测人 I 型干扰素的抗肿瘤细胞增殖活性。因本品与 I 型干扰素有同源性, 故选用 Daudi 细胞检测本品的抗肿瘤细胞增殖活性<sup>[4-7]</sup>。通常有 3 种检测 Daudi 细胞增殖的方法<sup>[8-9]</sup>: 细胞直接计数法, 核素掺入法及 WST-1 染色法。细胞直接计数法费时, 人为误差较大; 核素掺入法因 Daudi 细胞经长期传代, 部分细胞贴壁生长, 核素计数时不易洗脱, 结果波动较大, 且核素难于处理; WST-1 染色法原理与 MTT 染色相似, 但比 MTT 法更安全、准确、灵敏、迅速, 不需溶解显色物, 对细胞无明显毒性, 显色后可反复读板, 便于找到最佳测定时间。因此本实验选用 WST-1 染色法<sup>[10-11]</sup>。实验表明, 乐复能对 Daudi 细胞的生长抑制作用是重

组人 IFN- $\alpha$ 2b 的 200 倍以上(表 1),对于其他肿瘤细胞的抑制作用有待于进一步研究。

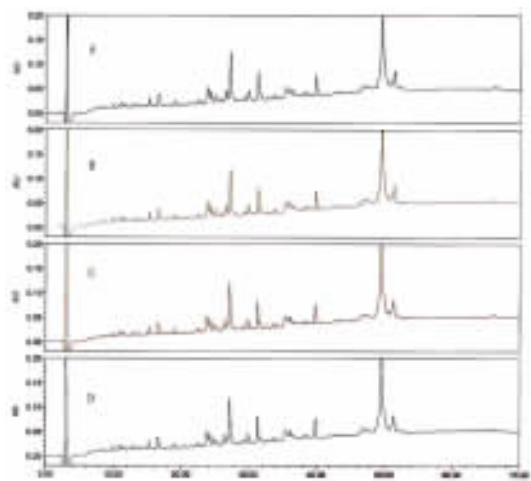


图 3 3 批乐复能原液的肽图

Fig. 3 Peptide maps of three batches of novaferon  
A: Reference; B: F20080513; C: F20080516; D: F20080519

用 WISH 细胞/VSV 病毒测定系统比较 IFN- $\alpha$  标准品和 3 批乐复能原液的剂量反应曲线。所测数据用 SOFT MAX 软件分析后,均符合 4 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,其相关系数均大于 0.99<sup>[12]</sup>(图 2)。将剂量反应曲线中直线部分的稀释度和相应的 D 值作直线回归,求出回归系数,经 t 检验分析,标准品与 3 批原液的回归系数之间无显著性差别 ( $P > 0.05$ ),表明 IFN- $\alpha$  标准品与乐复能的剂量反应曲线相同,即 WISH 细胞/VSV 病毒系统可用于乐复能抗病毒活性的测定。

本研究制定的乐复能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,并且在国内首次使用 Daudi 细胞增殖抑制法来检测重组生物产品的抗肿瘤活性,对其他抗肿瘤生物制品的检定也具有借鉴意义。

表 2 乐复能原液的质量控制标准及检定结果

Tab. 2 Quality control standards of novaferon bulk product

Subject	Method	Specified standard	F20080513
Specific anti-virus activity( IU · mg <sup>-1</sup> )	WISH/VSV	≥1.0 × 10 <sup>9</sup>	1.28 × 10 <sup>9</sup>
Specific anti-tumor activity( U · mg <sup>-1</sup> )	WST-1 stain	≥2.0 × 10 <sup>6</sup>	1.35 × 10 <sup>7</sup>
Purify	SDS-PAGE( unreduced )	≥95.0%	> 99.9
	HPLC	≥95.0%	96.0
Molecular mass( × 10 <sup>3</sup> )	SDS-PAGE ( reduced )	19.3 ± 1.93	19.6
Residual extraneous DNA content	Dot hybridization	≤1 ng/dose	Passed
Residual host bacterial protein content	ELISA	≤0.10%	Passed
Bacterial endotoxin	LAL	<10 EU/100 μg	Passed
Isoelectric point	Isoelectrofocusing	5.6 ~ 7.6	6.9
UV maximum( nm )	UV scan	278 ± 3	280
Peptide map	Tryptic digestion	Conformed to reference	Passed
N-terminal amino acid sequence	Edman degradation	CNLSQTHSLGSKRTL	Passed

表3 乐复能成品的质量控制标准及检定结果  
**Tab.3 Quality control standards of novaferon final product**

Subject	Method	Specified standard	F20080601
Identity test	Wastern blotting	Positive	Passed
pH	Potential determination	6.5 ~ 8.0	7.3
Protein content( $\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	Lowry	16 ~ 24	22
Anti-virus activity( $\text{IU} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	WISH/VSV	$1.3 \times 10^7 \sim 2.7 \times 10^7$	$1.6 \times 10^7$
Anti-tumor activity( $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	WST-1 stain	$\geq 4.0 \times 10^4$	$2.3 \times 10^5$
Benzyl alcohol content( $\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	HPLC	7 ~ 11	9
Tween-80 content( $\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	Spectrophotometry	140 ~ 200	186
Acetonitrile content	Gas chromatograph	$\leq 0.0004\%$	Passed
Sterility test	Direct inoculation method	Sterile	Passed
Abnormal toxicity	Mouse test	Animal survived, weight increased, no abnormal reactions	Passed
Bacterial endotoxin test	LAL	$< 10 \text{ EU/dose}$	Passed

[ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] Locher CP, Paidhungat M, Whalen RG, *et al.* DNA shuffling and screening strategies for improving vaccine efficacy [ J ]. DNA Cell Biol, 2005, 24( 4 ): 256-263.

[ 2 ] 韩 闯, 杨胜昌. 高通量筛选技术及其应用 [ J ]. 生物技术通报, 2005, 2( 1 ): 22-25.

[ 3 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典( 三部 ) [ M ]. 2005 年版. 北京: 化学工业出版社, 2005, 附录 56-57.

[ 4 ] Blaire LO, Henrik SO, Bernardetta N, *et al.* Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of a human serum albumin-interferon- $\alpha$  fusion protein in cynomolgus monkeys [ J ]. Pharmacol, 2002, 303( 2 ): 540-548.

[ 5 ] Yanase N, Takada E, Yoshihama I, *et al.* Participation of Bax- $\alpha$  in IFN- $\alpha$ -mediated apoptosis in Daudi B lymphoma cells [ J ]. Interferon Cytokine Res, 1998, 18( 10 ): 855-862.

[ 6 ] Qu Q, Ge Y, Chen Y, *et al.* Preparation and characterization of a novel chimeric antibody against human CD40 with the potential to inhibit Daudi cell proliferation [ J ]. Hybridoma ( Larchmt ), 2009, 28( 2 ): 121-128.

[ 7 ] Chen Q, Yan C, Liu F, *et al.* Overexpression of the PDCD2-like gene results in inhibited TNF-alpha production in activated Daudi cells [ J ]. Hum Immunol, 2008, 69( 4-5 ): 259-265.

[ 8 ] 刘红利, 陈 燕, 吴秋玲, 等. 鱼藤素对淋巴瘤 Daudi 细胞株细胞增殖细胞凋亡的影响及其机制 [ J ]. 中华肿瘤杂志, 2007, 29( 3 ): 176-180.

[ 9 ] Thomadaki H, Tsiapalis CM, Scorilas A, The effect of the polyadenylation inhibitor cordycepin on human Molt-4 and Daudi leukaemia and lymphoma cell lines [ J ]. Cancer Chemother Pharmacol, 2008, 61( 4 ): 703-711.

[ 10 ] Ngamwongsatit P, Banada PP, Panbangred W, *et al.* WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic Bacillus species using CHO cell line [ J ]. Microbiol Methods, 2008, 73( 3 ): 211-215.

[ 11 ] Jomha NM, Elliott JA, Law GK, *et al.* Evaluation of chondrocyte survival *in situ* using WST-1 and membrane integrity stains [ J ]. Cell Tissue Bank, 2007, 8( 3 ): 179-186.

[ 12 ] 王军志. 生物技术药物研究开发和质量控制 [ M ]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2007: 120-121.

[ 收稿日期 ] 2009-04-18                      [ 修回日期 ] 2009-06-15  
 [ 本文编辑 ] 徐红梅