

腺病毒 CNHK200-hEndostatin 质量控制方法的研究

薛惠斌,施军霞,朱文川,陈敏,钱其军*

(第二军医大学东方肝胆外科医院基因病毒治疗实验室,上海 200438)

[摘要] **目的:**建立基因-病毒治疗系统 CNHK200-hEndostatin 的质量控制方法。**方法:**分别建立腺病毒蛋白鉴定、腺病毒基因组鉴定、人内皮抑素(hEndostatin)基因鉴定、人内皮抑素表达量检测、腺病毒颗粒数测定、腺病毒滴度和比滴度测定、纯度测定、野生型腺病毒(AdWT)检测、残余宿主 DNA 含量检测和牛血清蛋白残余量检测等腺病毒质量控制项目的方法,并对纯化的腺病毒样品进行初步检测。**结果:**建立用 SDS-PAGE 方法对腺病毒进行蛋白鉴定,用限制性内切酶图谱分析的方法对腺病毒进行基因组鉴定,用 PCR 方法鉴定人内皮抑素基因,用 ELISA 方法检测人内皮抑素表达量,用 D_{260} 法和 HPLC 方法进行腺病毒颗粒数测定,用 D_{260}/D_{280} 方法和 HPLC 方法进行纯度检测,用 PCR 方法进行野生型腺病毒检测,用杂交方法进行残余宿主 DNA 含量检测,用反向间接血凝实验测定牛血清蛋白残余量。结果表明建立的方法可有效应用于腺病毒样品检测,并且我们制备的纯化腺病毒样品均符合要求。**结论:**基本建立了腺病毒 CNHK200-hEndostatin 的质量控制方法,改良的应用 HPLC 对腺病毒颗粒数进行定量检测的方法准确迅速,优于传统方法。应用建立的方法对纯化的腺病毒样品进行检测,基本符合临床应用要求。

[关键词] 腺病毒科;内皮抑素类;基因疗法;质量控制

[中图分类号] Q 782 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)09-1011-04

Quality control methods for adenovirus CNHK200-hEndostatin

XUE Hui-bin, SHI Jun-xia, ZHU Wen-chuan, CHEN Min, QIAN Qi-jun* (Laboratory of Gene-Viral Therapy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To establish a quality control method for Gene-Viral Therapy system CNHK200-hEndostatin. **Methods:** According to "The Guideline on Quality Control Methods of Human Gene Therapy Products", a quality control method for adenovirus was set up, which consisted of adenovirus protein identification, genomic identification, hEndostatin gene identification, hEndostatin protein quantitation, adenovirus particle quantitation, virus titer quantitation, determination of particle to PFU ratio, purity detection, AdWT detection, host cell DNA residue detection, bovine serum protein residue detection, etc. The purified adenovirus product of CNHK200-hEndostatin was subjected to the above process. **Results:** We set up a SDS-PAGE method to identify the adenovirus protein and identified adenovirus genomic DNA by restriction endonuclease enzyme analysis. Human endostatin gene was identified by PCR method and its expression product was quantitated by ELISA. The number of adenovirus particle was quantitated by D_{260} method and HPLC method. The purity of adenovirus was determined by D_{260}/D_{280} method and HPLC method. A PCR reaction was introduced to detect AdWT and hybridization method was used in host cell DNA residue detection. Bovine serum protein residue was detected by reverse indirect hemagglutination assay. All these methods were confirmed feasible in adenovirus quality control and our purified adenovirus sample was eligible in all test items. **Conclusion:** A series of basic methods have been successfully established for quality control of gene-viral therapy system CNHK200-hEndostatin. Our modified method for adenovirus particle quantitation by HPLC is more rapid and accurate than traditional method. The established methods have been approved in testing the purified adenovirus samples.

[KEY WORDS] adenoviridae; endostatins; gene therapy; quality control

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(9): 1011-1014]

随着我国第一个基因治疗药物重组人 p53 腺病毒注射液 (gencicine) 开发成功并推向市场^[1], 基因治疗药物再度成为公众媒体和专业人员关注的焦点, 而其质量控制则成为影响其临床应用的关键因素。但是目前对于基因治疗药物的质量控制还没有非常明确、细致和统一的标准。我国在 2003 年颁布了《人基因治疗研究和制剂质量控制技术指导原则》^[2], 对重组腺病毒产品的质量控制方法进行了简单的描述。我们依据该指导原则并参考国外相关文献, 对基因-病

[基金项目] 国家自然科学基金国际合作重大项目(30120160823), 国家高新技术发展规划(863)重点项目(2001AA217031)。Supported by the International Cooperation Project of National Natural Science Foundation(30120160823), Key Project of National High Technology R&D Plan(2001AA217031)。

[作者简介] 薛惠斌, 博士生, 助理研究员。

E-mail: huibinx@yahoo.com

* Corresponding author. E-mail: qjqian@sino-gene.com

毒治疗产品 CNHK200-hEndostatin 进行了质量控制方法的研究。

1 材料和方法

1.1 载体、病毒和细胞系 载体 pXC1 购自加拿大 Microbix Biosystem 公司, pXC7C-hEndo 为本室构建。腺病毒 CNHK200-hEndostatin 由本室构建, 构建方法见参考文献^[3]。293 细胞购自 ATCC。

1.2 试剂和设备 各种常规生化试剂购自上海生工生物工程有限公司, 各种限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、DNA 和蛋白分子量标准品等分别购于 NEB 和 Promega 公司, 病毒 DNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司, 人内皮抑素 ELISA 试剂盒购自 Chemicon International 公司。探针标记试剂盒购自 Roche 公司。细胞培养液 DMEM 购自 Gibco BRL 公司, 胎牛血清 (FBS) 购自 Hyclone 公司。HPLC 系统为 Waters 1525 泵和 2487 检测器, 控制和分析软件为 Waters Breeze, 阴离子交换色谱分析柱 Resource Q 购自 Amersham 公司。

1.3 腺病毒蛋白鉴定 采用 SDS-PAGE 蛋白电泳进行鉴定^[4]。制备分离胶和浓缩胶, 将待检样品与样品缓冲液按 3:1 的比例混匀, 100℃ 水浴 3~5 min, 待浓缩胶聚合后进行加样。以恒流 10 mA 开始电泳, 至待检样品进入分离胶后将电流调至 20 mA, 直至电泳结束。凝胶用考马斯亮蓝染色法染色过夜, 浸入脱色液中脱色, 将染色完毕的凝胶放入成像系统中摄像。

1.4 腺病毒基因组鉴别 采用 Qiagen DNA Blood Mini Kit 抽提腺病毒 DNA, 分别用内切酶 *EcoR* I、*Hind* III、*Xba* I 和 *Xho* I 进行酶切, 并与理论值比较。

1.5 表达基因鉴别 应用 PCR 方法扩增基因 hEndostatin, 上游引物 5'-TCC ACC TGG TTG CGC TCA ACA G-3', 下游引物 5'-AGC ACG ATG TAG GCG TGA TGG C-3'。PCR 扩增条件: 95℃ 2 min; 94℃ 15 s, 45℃ 30 s, 72℃ 1 min 扩增 30 个循环; 72℃ 10 min。扩增后以质粒 pXC7C-hEndo 为阳性对照进行电泳鉴定。

1.6 腺病毒颗粒数测定 腺病毒颗粒数测定的传统方法为根据 D_{260} 进行计算^[5], 用 0.1% SDS 溶液裂解病毒后测定 D_{260} 值, 根据公式 [病毒颗粒数 (vp/ml) = $D_{260} \times$ 稀释倍数 $\times 1.1 \times 10^{12}$] 计算病毒颗粒数。此外我们参考文献^[6] 建立了 HPLC 测定腺病毒颗粒的方法。色谱条件为: Resource Q 色谱柱, 样品量 20 μ l, 检测波长为 260 nm, 梯度洗脱条件为: 流动相 A 液 (0.02 mol/L Tris · HCl, pH 8.0) \rightarrow 70% B 液 (0.02 mol/L Tris · HCl, 0.1 mol/L NaCl, pH 8.0), 3 \rightarrow 21 min, 流速 1 ml/min。取已经通过 D_{260} 法定量的一个腺病毒纯化样品, 按照 1:1, 1:5, 1:10, 1:25, 1:125 用 A 液进行稀释配制 5 个不同浓度梯度, 分别进样重复测定 3 次, 以病毒颗粒数对峰面积和峰高分别作线性回归。

1.7 腺病毒滴度和比滴度测定 按照文献^[4] 采用 TCID₅₀

法测定腺病毒滴度, 腺病毒比滴度 = 滴度 / 颗粒数。

1.8 纯度检测 纯度检测的常用方法是 D_{260}/D_{280} 法^[5], 按照测定腺病毒颗粒数的方法同样检测腺病毒的 D_{280} , 然后计算 D_{260}/D_{280} 比值。HPLC 检测纯度的操作和方法与检测病毒量的步骤相同, 在得到图谱后应用 Breeze 软件对色谱图进行分析, 分别计算腺病毒的峰面积和总峰面积, 按面积归一化法计算样品纯度, 计算公式为: 纯度 = 腺病毒峰面积 / 总峰面积 $\times 100\%$ 。

1.9 内皮抑素表达量测定 采用 ELISA 法。在 2 ml DMEM 培养液中, 用 5×10^6 pfu 病毒感染 5×10^5 个 293 细胞, 培养 72 h 后测定上清液中内皮抑素浓度。ELISA 操作按照试剂盒说明书进行。

1.10 野生型腺病毒 (AdWT) 检测^[7] 采用 Qiagen 试剂盒抽提腺病毒 DNA, 以腺病毒 E1B 区两端序列为引物, 应用 PCR 方法扩增腺病毒 E1B 区。E1B 上游引物为 5'-TAA GCT TCT ATG GGT TTA -3', 下游引物为 5'-TCC AGA TCT TCA TGG TCA TG -3'。PCR 反应条件: 95℃ 2 min; 94℃ 15 s, 45℃ 30 s, 72℃ 1 min 扩增 30 个循环; 72℃ 10 min。反应完成后电泳检测。

1.11 残余宿主 DNA 含量检测 采用 Roche 公司 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Kit II 进行探针标记, 将标记探针与待测样品中的 DNA 分子进行杂交, 点膜后通过免疫反应与抗体复合物结合进行显色检测。

1.12 牛血清蛋白残余量检测 采用中国药品生物制品检定所的残余牛血清蛋白含量检测试剂盒进行反向间接免疫凝集实验, 按照试剂盒说明书进行操作。

2 结果

2.1 腺病毒蛋白鉴定 见图 1。在 15 μ g CNHK200-hEndostatin 电泳图上可以清晰地看到腺病毒的 8 个蛋白条带, 和相关文献^[4] 的报道一致, 并且也与对照病毒 CNHK200 一致。

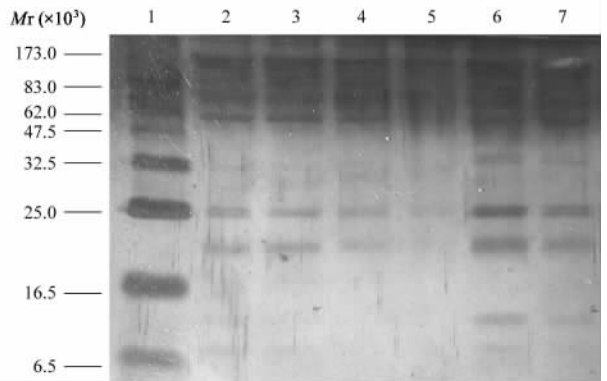


图 1 腺病毒 SDS-PAGE 图

Fig 1 SDS-PAGE analysis of adenoviral protein

1: Marker; 2-6: CNHK200-hEndostatin samples (10, 5, 2, 1, 15 μ g); 7: CNHK200 sample (10 μ g)

2.2 腺病毒基因组鉴别 CNHK200-hEndostatin 经分别酶切后, 酶切分析与理论值基本一致, 而且没有出现其他杂质 DNA 条带(图 2), 说明腺病毒样品完全符合鉴定要求。

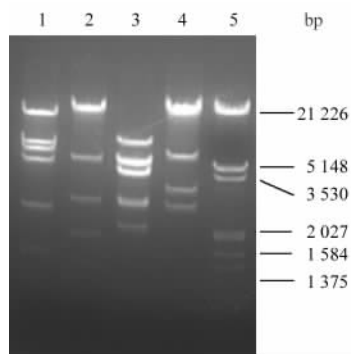


图 2 腺病毒基因组电泳鉴定图

Fig 2 Electrophoresis analysis of adenoviral genomic DNA

1-4: CNHK200-hEndostatin genomic DNA digested by *Xho* I, *Xba* I, *Hind* III and *Eco*R I, respectively; 5: λ DNA/(*Eco*R I + *Hind* III)

2.3 表达基因鉴别 人内皮抑素基因的长度为 487 bp, 图 3 中所示表明在腺病毒 CNHK200-hEndostatin 中含有人内皮抑素基因。

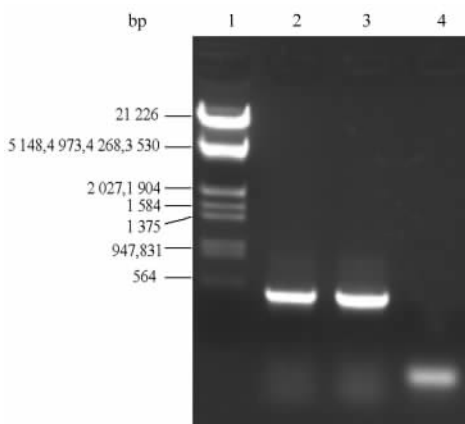


图 3 人内皮抑素基因 PCR 鉴定结果

Fig 3 PCR analysis of hEndostatin gene in CNHK200-Endostatin

1: λ DNA/(*Eco*R I + *Hind* III); 2: CNHK200-hEndostatin sample; 3: Plasmid pXC7C-hEndo as positive control; 4: Negative control

2.4 腺病毒颗粒数测定 D_{260} 法测得的腺病毒颗粒数为 1.38×10^{12} vp/ml, 对 5 个浓度梯度的腺病毒样品每个均取 20 μ l 进行 HPLC 检测, 重复测定 3 次, 将 3 次测定值的平均值作为最终值。经 Excel 统计处理, 分别获得峰高定量和峰面积定量的回归方程式和回归系数: y (病毒颗粒数) = $272\ 174 x$ (峰高) + 5×10^8 , 相关系数 0.999 6; y (病毒颗粒数) = $13\ 508 x$ (峰面积) + 6×10^8 , 相关系数 0.999 5。这两种定量方法在病毒浓度为 $1.44 \times 10^{10} \sim 1.8 \times 10^{12}$ vp/ml 范围内均有非常好的线性关系。

2.5 腺病毒滴度和比滴度测定 腺病毒滴度为 4.5×10^{10}

pfu/ml, 比滴度为 3.26%, 基本达到 FDA 关于腺病毒比滴度 < 3.3% 的要求^[8]。

2.6 纯度检测 测得 D_{260} 为 0.614、 D_{280} 为 0.502, D_{260}/D_{280} 比值为 1.22。一般要求腺病毒样品的 D_{260}/D_{280} 为 1.2~1.3 之间^[8], 表明我们得到的腺病毒样品的纯度符合要求。我们用 HPLC 方法对腺病毒样品进行检测, 按照面积归一法计算纯度, 结果为 99.63%, 完全达到实验和临床应用的需

要。

2.7 人内皮抑素表达量 经检测, 293 细胞上清中人内皮抑素表达量为 1 206 ng/ml。

2.8 野生型腺病毒(AdWT)检测 野生型腺病毒阳性对照为含有整个 E1 区序列的腺病毒质粒 pXC1, PCR 结果(图 4) 阳性对照为 534 bp 大小, 样品为阴性, 表明在样品中未检测到野生型腺病毒污染。

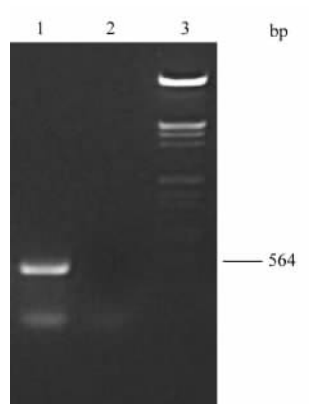


图 4 野生型腺病毒 PCR 检测图

Fig 4 Detection on AdWT by PCR

1: Plasmid pXC1 as positive control; 2: CNHK200-hEndostatin; 3: λ DNA/(*Eco*R I + *Hind* III)

2.9 残余宿主 DNA 含量检测 结果见图 5, 阳性对照可检测到 1 μ g 杂交标记物, 而样品中检测到的宿主细胞 DNA 含量为 1 μ g/ml, 甚至低于 1 μ g/ml, 远远低于国家相关标准中不得高于 10 ng/ml 的规定^[9], 完全符合临床实验的要求。

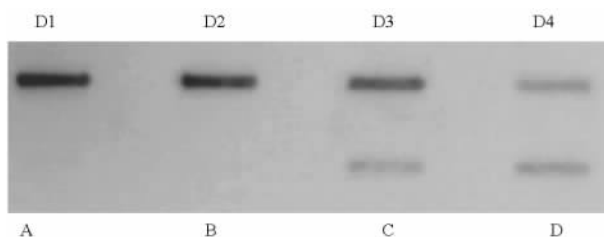


图 5 残余宿主 DNA 杂交图

Fig 5 Detection on residual genomic DNA of host cell by slot blot

D1-D4: 1 ng, 100 pg, 10 pg, and 1 pg genomic DNA of 293 cell. A, B, Negative control; C, D: CNHK200-hEndostatin

2.10 牛血清蛋白残余量 应用制备的腺病毒 CNHK200-hEndostatin 进行检测, 测得样品中牛血清蛋白含量为 12.5 ng/ml, 低于国家对于生物制品的规定^[9]。

3 讨论

CNHK200-hEndostatin 是应用肿瘤特异性增殖腺病毒 CNHK200 携带了可抑制肿瘤新生血管生长的内皮抑素构建而成。我们的实验证实,它可以特异性靶向肿瘤细胞并大量复制,一方面直接导致了被感染肿瘤细胞的裂解、死亡,另一个重要的意义是使人内皮抑素基因可以随着病毒的大量复制在肿瘤组织内得到高水平的表达。增殖型腺病毒载体介导的基因治疗具有肿瘤病毒治疗和基因治疗的双重优势,通过病毒和基因协同作用可进一步提高对肿瘤的治疗效果^[8]。正因为如此,该病毒具有良好的临床应用前景。

重组腺病毒产品 CNHK200-hEndostatin 由载体 DNA 和治疗基因所构成,其基本质量指标包括鉴别实验和效力实验。在本研究中,我们用 SDS-PAGE 方法对腺病毒进行蛋白鉴定,用限制性内切图谱分析的方法对腺病毒进行 DNA 鉴定,结果表明样品均符合腺病毒要求。用限制性酶切图谱分析法进行病毒基因组鉴定时,以往较多使用 *Hind* III 单个酶切进行,由于 *Hind* III 酶切后产生的 DNA 条带较多,而且有些条带十分接近,无法真正区分开来,因此我们又引入了 *Eco*R I、*Xba* I、*Xho* I 三个酶,通过对多个酶切图谱的分析比较,更能确定腺病毒基因组的正确性,这样的处理大大提高了该方法的准确度。应用 PCR 的方法来鉴定内皮抑素基因是否存在于该腺病毒 DNA 中,对于其表达情况和生物活性则使用 ELISA 的方法,结果表明该基因存在于该腺病毒 DNA 中并在细胞中能够成功表达,具有生物活性。

除了进行病毒和基因的鉴定,还必须对病毒质量和病毒数量以及纯度进行质量监测。传统的病毒颗粒数检测仍然存在技术上的缺陷,要求病毒有较高的浓度和纯度,否则计算出来的结果是不准确的。我们建立了用 HPLC 检测病毒颗粒数的方法,不仅对于样品的要求低,而且即使样品中混有蛋白和 DNA 杂质也能得到有效的区分,使病毒颗粒数的计算更为准确和稳定。虽然这种方法仍需要进一步严格的方法验证,但此方法相对传统方法来说无疑具有更大优越性。病毒感染性活性的检测是用生物学的方法,目前应用最多的是 TCID₅₀测定法。由于生物学方法受到许多可变因素的影响,因而结果往往稳定性和重复性都较差。我们对 TCID₅₀测定法进行改良,规定每个样品由 2 名技术人员分别测定 2 次,取其平均值作为最终结果,这样的处理方法使得我们的腺病毒滴度测定结果更为稳定。纯度检测常用 D_{260}/D_{280} 比值分析,但属于相对定量,无法准确获知纯度情况。我们建立的 HPLC 分析法能直接计算腺病毒的纯度,测定准确而迅速。用 HPLC 方法对纯化的腺病毒 CNHK200-hEndostatin 进行纯度检测,结果达到 99%,完全达到临床应用的要求。

腺病毒产品通常需要进行 RCA(复制型腺病毒)检测,但由于我们应用的是能在肿瘤细胞中特异性增殖的腺病毒,因而常规 RCA 检测方法并不适用。我们建立 PCR 方法对野生型腺病毒进行检测,扩增腺病毒 CNHK200-hEndostatin 中部分缺失而野生型腺病毒中仍然保存的 E1B 区。结果表明,这种方法完全可以用于检测野生型腺病毒基因组

的存在,而进行检测的腺病毒产品 CNHK200-hEndostatin 并未检测到野生型腺病毒。虽然这种方法简单易行,但其灵敏度仍需要进一步确认。

残余宿主 DNA 含量和残余牛血清蛋白含量是腺病毒杂质检测中重要的两项,对于未来临床应用的安全性具有重要意义。在本研究中应用地高辛标记的探针对腺病毒样品进行杂交检测,这种方法的灵敏度高,可以检测到 1 pg/ml 的 DNA。由于细胞、病毒培养液中均含有胎牛血清,所以经纯化过程中得到的腺病毒原液可能含有微量的牛血清存在,牛血清属于异体蛋白注入人体后会产生过敏反应,所以应对原液的牛血清残余量进行检测,杂质限度为 ≤ 50 ng/ml。残余牛血清蛋白含量测定应用中国药品生物制品检定所提供的常规检测试剂和方法,方法简单,易于掌握,结果稳定,可用于腺病毒的质量控制。

基因治疗产品的质量控制原则与一般生物制品基本相同,但由于其本身种类、组成和性质的复杂性和特殊性,有些项目是传统的质量控制方法所无法适用的,需要研究者参考相关标准进行探索和确立。腺病毒作为应用最为广泛的基因治疗载体,其质量控制方法的研究将会对其临床应用起到很好的推动作用^[10]。同时,建立良好的质量控制方法对于腺病毒生产、纯化方法的改良也会起到很好的促进作用。

[参考文献]

- [1] Peng Z. Current status of gene therapy in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers[J]. Hum Gene Ther, 2005, 16: 1016-1027.
- [2] 人基因治疗研究和制剂质量控制技术指导原则[EB/OL]. 国家食品药品监督管理局. http://www.sfda.gov.cn/cm_sweb/webportal/w4278/A25922665.html[2005-05-30].
- [3] 徐建国,钱其军,薛惠斌,等. 在结肠癌细胞内高效表达内皮抑素的增殖型腺病毒载体的构建与鉴定[J]. 第二军医大学学报, 2004, 25: 280-283.
- [4] Lehmborg E, Traina J A, Chakel J A, et al. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay for the adenovirus type 5 proteome[J]. J Chromatogr B, 1999, 732: 411-423.
- [5] Roitsch C, Achstetter T, Benchaibi M, et al. Characterization and quality control of recombinant adenovirus vectors for gene therapy[J]. J Chromatogr B, 2001, 752: 263-280.
- [6] Klyushnichenko V, Bernier A, Kamen A, et al. Improved high-performance liquid chromatographic method in the analysis of adenovirus particles[J]. J Chromatogr B, 2001, 755: 27-36.
- [7] Zhang W W, Koch P E, Roth J A. Detection of wild-type contamination in a recombinant adenoviral preparation by PCR[J]. Biotechniques, 1995, 18: 444-447.
- [8] Working P K, Lin A, Borellini F. Meeting product development challenges in manufacturing clinical grade oncolytic adenoviruses[J]. Oncogene, 2005, 24: 7792-7801.
- [9] 中国生物制品标准化委员会. 中国药品生物制品规程[S]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- [10] Lusky M. Good manufacturing practice production of adenoviral vectors for clinical trials[J]. Hum Gene Ther, 2005, 16: 281-291.

[收稿日期] 2007-03-19

[修回日期] 2007-05-10

[本文编辑] 尹 茶