

重组复制型溶瘤腺病毒 p53 的质量控制方法

高 凯, 毕 华, 丁有学, 李永红, 韩春梅, 郭 莹, 饶春明*

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要: 建立重组复制型溶瘤腺病毒 p53 (SG600-P53) 的质控检测方法与质量标准。采用限制性内切酶酶切、PCR 法对端粒酶启动子、低压缺氧调控元件融合的巨细胞病毒 (cytomegalovirus, CMV) 启动子、p53 基因等重组病毒载体结构进行分析, 鉴定结果均与理论值相符。经紫外吸收法 (A_{260}) 检测, 病毒颗粒数为 2.0×10^{11} VP·mL⁻¹; TCID₅₀ 法测定感染活性为 5.0×10^{10} IU·mL⁻¹。p53 蛋白 ELISA 检测结果表明, 重组病毒体外感染人肺癌细胞 H1299 后, 感染组核蛋白和空白对照组 A_{450} 吸收度之比为 5.2。该基因治疗制剂对人肺癌细胞 A549 体外杀伤的 MOI_{IC50} 为 1.0。以相同 MOI 感染并经 TCID₅₀ 法检测, 重组病毒在人肺癌细胞 A549 与人表皮成纤维二倍体细胞 BJ 的增殖比值为 398。经阴离子高效液相色谱分析, 病毒载体颗粒纯度为 99.5%。定量 PCR 检测表明在 1×10^7 VP 的病毒颗粒中, 野生型腺病毒基因片段少于 1 个拷贝。本研究建立的重组复制型溶瘤腺病毒的质量标准与检测方法, 可用于该制品的质量控制, 同时也为其他溶瘤基因治疗病毒载体质控研究提供参考。

关键词: 腺病毒载体; 肿瘤溶瘤基因治疗; p53 基因; 质量控制

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 12-1476-07

Quality control of recombinant oncolytic adenovirus/p53

GAO Kai, BI Hua, DING You-xue, LI Yong-hong, HAN Chun-mei, GUO Ying, RAO Chun-ming*

(National Institutes of Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract: To establish a detection method of oncolytic adenovirus/p53 and standard of quality control, human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter, CMV fusion promoter containing hypoxia reaction element (HRE) and p53 gene were identified by vector DNA restriction enzyme digestion and PCR analysis. The result conformed that all modified regions were in consistent with theoretical ones. Particle number was 2.0×10^{11} mL⁻¹ determined by UV (A_{260}). Infectious titer was 5.0×10^{10} IU·mL⁻¹ analyzed by TCID₅₀. *In vitro* p53 gene expression in human lung cancer cell H1299 was determined by ELISA, and A_{450} ratio of nucleoprotein in virus infection group to control group was 5.2. Antitumor potency was evaluated by cytotoxicity assay using human lung cancer cell A549, and the MOI_{IC50} of this gene therapy preparation was 1.0. The tumor cells targeted replication ability of recombinant virus was determined by TCID₅₀ titer ratio of filial generation virus between human lung cancer cell A549 and human diploid epidermal fibroblast BJ cells after infected by virus with same MOI. TCID₅₀ titer ratio of tumor cell infection group to normal cell infection control group was 398. The IE-HPLC purity of virus was 99.5%. There was less than 1 copy of wild type adenovirus within 1×10^7 VP recombinant virus. Other quality control items were complied with corresponding requirements in the guidance for human somatic cell therapy and gene therapy and Chinese pharmacopeia volume III. The detection method of oncolytic adenovirus/p53 was successfully established for quality control standard. The study also provided reference for quality control of other oncolytic viral vector products.

Key words: adneovirus vector; oncolytic gene therapy; p53 gene; quality control

收稿日期: 2011-04-25.

*通讯作者 Tel: 86-10-67095684, E-mail: raoem@nicpbp.org.cn

腺病毒载体是继逆转录病毒后在基因治疗中开发应用较早的病毒载体, 由于其宿主范围广、表达水平高、易于操作和制备等优势, 腺病毒作为重要的基因治疗载体系统迅速发展起来。截止 2011 年 6 月, 在全球开展的 1714 项基因治疗临床方案中, 针对肿瘤基因治疗的方案占 64.6% ($n = 1107$), 而腺病毒是临床中基因治疗最常用病毒载体, 占全部临床方案总数的 24.2% ($n = 414$)^[1]。大量临床试验工作表明腺病毒载体的应用是安全有效的。

近年来随着肿瘤基因治疗研究的不断深入, 出现了肿瘤溶瘤基因治疗 (oncolytic gene therapy) 的方式。腺病毒载体因此也可分为复制缺陷型和溶瘤复制型 (oncolytic adenovirus) 两类。我国 SFDA 于 2004 年批准的“重组人 p53 腺病毒注射液”采用的即为复制缺陷型腺病毒载体。而溶瘤复制型腺病毒是将其 E1 区突变缺失, 或将 E1 区置于肿瘤相关的特异启动子的调控下, 使重组病毒可选择性的在肿瘤细胞内增殖以达到杀灭肿瘤细胞的目的。基于这一原理, 我国研发单位构建了以人端粒酶启动子 (hTERT) 和缺氧启动子 (HRE) 分别调控腺病毒 E1A 和 E1B 区, 并同时携带 p53 基因的重组复制型溶瘤腺病毒。在该治疗方式中, 溶瘤复制型腺病毒不仅作为 p53 治疗基因的载体, 而且可通过在肿瘤细胞中的复制增殖, 在肿瘤治疗中发挥更为积极主动的作用^[2-4]。目前此类产品在国外多处于临床研究阶段, 为了能有效控制这类产品的质量, 本研究根据《人基因治疗研究和制剂质量控制技术指导原则》^[5]及 2005 版《中国药典》(三部)^[6]的要求, 结合该产品的特点建立了质控标准和检定方法, 并对其开展了质量研究。

材料与方 法

细胞及主要试剂 重组复制型溶瘤腺病毒 p53 (SG600-P53)、人胚肾 293 细胞、人肺癌 A549 细胞、人肺癌 H1299 细胞、人表皮成纤维二倍体细胞 BJ 由本元正阳基因技术有限公司提供; DMEM 和 RPMI 1640 培养基及胎牛血清为 Gibco 公司产品; PCR 相关试剂购自 Takara 公司; 人 p53 ELISA 试剂盒为 Bender Med Systems 公司产品, 残留 293 细胞蛋白、残留牛血清检测试剂盒购自 Cygnus 公司; 地高辛 DNA 标记检测试剂盒为 Roche 公司产品; 残留 Benzonase 为 Merck 公司产品; HIV、HBV、HCV 试剂盒购自华美公司, 其他试剂均为国产分析纯。

仪器设备 美国 Molecular Devices 公司 Spectra

MAX 250 型酶标仪及分析软件; 日本岛津 1601PC 分光光度计; Waters 2695 色谱仪及 2487 UV 检测器; ABI 9700 PCR 仪; ROTOR-GENE 3000 Advanced 荧光定量 PCR 仪; Amersham pharmacia biotech Image Master VDS 凝胶成像系统; NIKON ECLIPSE TE 300 倒置显微镜。

重组病毒基因结构鉴别

限制性内切酶酶切法 提取重组病毒 DNA 后采用 Mlu I、EcoRV 和 Sal I 等 3 种限制性内切酶分别对其结构进行酶切分析。各内切酶反应体系均含有 DNA 0.2 μg , 限制性内切酶 15 U, 内切酶 10 $\times$ 缓冲液 3 μL (100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, 10 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二硫苏糖醇, pH 7.9), 补水至终体积为 30 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 h 后将酶切产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳。

PCR 法 采用 2 对特异性引物来分别鉴定 hTERT 启动子和 p53 基因区。hTERT 启动子区 (含 ITR 和 hTERT) 扩增的上游引物为: 5'-GGCGTAACCGAGT AAGATTTG-3', 下游引物为: 5'-CTCGTCGTCCTG GGTGGATC-3'; PCR 扩增参数为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 复性 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。p53 基因区 (含 p53 和 HRE) 扩增的上游引物为: 5'-CAG CCAAGTCTGTGACTT GCACGTAC-3', 下游引物为: 5'-GGCCAGAAAATC CAGCAGGTA-3'。PCR 扩增参数为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 复性 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 3 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。PCR 产物均进行 1.0% 琼脂糖凝胶检测。

重组病毒颗粒数测定^[7, 8] 病毒颗粒数按下面的公式计算: 病毒颗粒数 ($\text{VP}\cdot\text{mL}^{-1}$) = $A_{260} \times 1.1 \times 10^{12} \times$ 稀释倍数。

重组病毒感染单位测定 用半数组织培养感染量 (TCID_{50}) 方法测定重组腺病毒的滴度, 具体方法如下: ① 以含 10% FBS 的 DMEM 培养液制备 293 细胞悬液, 按 1×10^5 /孔接种于 4 个 96 孔板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养 18~22 h。② 感染样品: 以无血清 DMEM 制备以 $1 : 5.12 \times 10^9$ 为起始浓度的 2 倍系列稀释度的病毒稀释液 ($1 : 5.12 \times 10^9$ 至 6.25×10^5 , 共 14 个稀释度), 将各细胞培养板内液体吸出, 每一稀释度病毒分别加入 12 孔, 每孔 200 μL ; 1、2 板一组, 3、4 板为重复加样。③ 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养 60 min, 吸出感染液, 每孔加入含 5% FBS 的 DMEM 培养基 300 μL 。④ 将 96 孔板置于 CO_2 孵箱内于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 10 天。⑤ 第 10 天在显微镜下观察细胞病变, 判断并记录每排中

产生细胞病变情况的孔数。根据泊松模型拟合的公式计算病毒的感染活性^[9, 10]。感染单位 $V(\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}) = -([\ln(1-(P_w/n))] \times D) / [A_w \times C_w \times I \times t]$, 其中 P_w 为出现细胞病变的孔数; n 为供试品每个稀释度感染的总孔数; D 为稀释因数; A_w 为细胞培养孔底面积 (cm^2); C_w 为在感染时细胞汇合度; I 为腺病毒结合传播系数 $2.38 \times 10^{-4} (\text{cm} \cdot \text{s}^{-1/2})$, t 为感染时间 (s)。

重组病毒载体纯度分析 采用 SOURCE 15Q (100 mm $\times$ 4.6 mm) 离子交换色谱柱; 流动相 A 液含 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 和 $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, pH 8.0; 流动相 B 液含 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 和 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, pH 8.0。A 液充分进行柱平衡, 洗脱梯度为: 0~33 min, B 为 0~100%; 34~37 min, B 为 100%; 38~43 min, B 为 100%~0; 流速 $0.75 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 供试品上样量 $100 \mu\text{L}$; 柱温 25°C ; 检测波长 260 nm ; 记录色谱图按面积归一化法计算纯度。

重组病毒 p53 基因表达量检测 以含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液制备人肺癌 H1299 细胞悬液, 按 5×10^5 /孔接种于 6 孔板, 37°C 、5% CO_2 条件下培养 24 h, 弃上清液, 以无血清 RPMI 1640 稀释病毒并按 5 MOI 接种 3 个复孔, 设空白对照。感染 2 h 后弃上清液, 每孔加入含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液 2 mL , 于 37°C 、5% CO_2 条件下培养 48 h 收集细胞, 提取核蛋白后以 ELISA 法检测 p53 表达量。

重组病毒肿瘤细胞杀伤活性测定 以含 10% FBS 的 DMEM 培养液制备人肺癌 A549 细胞悬液, 按 2×10^3 /孔接种于 96 孔板, 于 37°C 、5% CO_2 条件下培养 24 h, 弃上清液, 以含 5% FBS 的 DMEM 培养基制备 2 倍梯度系列病毒稀释液, 起始 MOI 为 20, 共计 9 个浓度。病毒各感染梯度均设 4 个复孔; 阴性对照、空白组 (不含细胞) 均加入含 5% FBS 的 DMEM 培养基, 于 37°C 、5% CO_2 继续培养 7 天后, 每孔加入 0.5% MTT $20 \mu\text{L}$, 37°C 孵育 4 h, 每孔加入 DMSO $100 \mu\text{L}$, 稍加振荡后在酶标仪上测定 570 nm 吸收度。杀伤率 (%) = $[1 - (\text{测试孔平均 OD 值} - \text{空白组平均 OD 值}) / (\text{阴性孔平均 OD 值} - \text{空白组平均 OD 值})] \times 100\%$ 。根据计算结果以杀伤率为纵坐标, 以 MOI 的对数值为横坐标, 以 Curve Expert 1.3 软件计算杀伤率为 50% 时对应的 MOI。

重组病毒增殖活性检测 分别以含 10% FBS 的 DMEM 培养液、10% FBS 的 MEM 培养液制备人肺癌 A549、人表皮成纤维二倍体 BJ 的细胞悬液, 按 5×10^5 /孔分别接种至 6 孔板, 于 37°C 、5% CO_2 培养

过夜。分别以无血清 DMEM 和 MEM 培养液润洗细胞、稀释病毒供试品后, 以每孔 1 MOI 加入病毒悬液, 并以无血清培养液设立阴性对照。48 h 增殖复制样品制备: 感染 2 h 后弃上清液, 以含 10% FBS 的 DMEM 或 10% FBS 的 MEM 培养液 2 mL 分别加入相应细胞, 每种细胞均为 3 个复孔, 继续于 37°C 、5% CO_2 条件下培养 48 h。增殖复制起始样品则于感染 2 h 后弃上清液, 以无血清培养液洗涤细胞 3 次后备用。分别刮取各组细胞, 以无血清培养基将终体积定为 2 mL /孔, 于 -70°C 、 37°C 反复冻融 3 次, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 取上清液, 分别合并各组上清液, 用 TCID_{50} 法测定各组样本的病毒感染单位。以下式计算供试品增殖活性。增殖活性 = (A549 细胞 48 h 组感染单位 / A549 细胞起始组感染单位) / (BJ 细胞 48 h 组感染单位 / BJ 细胞起始组感染单位)。

野生型腺病毒检测 上游引物为: 5'-CCGAGCAGCCGAGCAGAGA-3'; 下游引物为: 5'-AGCCTCGTGCGAGGTAAGATCGA-3'; TaqMan 探针: 5' FAM-TGGGTCCGGTTTCTATGCCAAACCTTG-TAMRA 3'。取供试品 1 支提取 DNA, 定量后按下式计算 DNA 回收率, $\text{DNA 回收率} \% = [(\text{DNA 浓度} \times \text{稀释倍数} \times \text{提取 DNA 复溶总体积} \times 6.02 \times 10^{23}) / (\text{病毒双链 DNA 碱基数} \times \text{碱基平均分子量})] / \text{供试品颗粒数} \times 100\%$ 。将含有野生型腺病毒序列的阳性对照 pXC1 质粒进行系列稀释, 制备 10 倍梯度稀释的标准曲线 (1×10^6 至 $10 \text{ VP} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 共 6 个点)。反应体系为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 上、下游引物、探针各 $1.0 \mu\text{L}$, $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Mg}^{2+}$ $0.5 \mu\text{L}$, $5 \times \text{PCR buffer}$ $5 \mu\text{L}$, dNTP $0.7 \mu\text{L}$, DNA 聚合酶 $0.3 \mu\text{L}$, 模板 $1 \mu\text{L}$, 去离子水 $14.5 \mu\text{L}$ 。经过优化的反应条件为: 94°C 变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 60°C 退火和延伸 1 min, 40 个循环。野生型腺病毒拷贝数 = (实测拷贝数 $\times$ 稀释倍数) / (供试品颗粒数 $\times$ DNA 回收率)。

腺相关病毒检测 提取供试品 DNA 进行 PCR 反应。上游引物为 5'-TGCCACCTACAACAACCACCTCT-3'; 下游引物为 5'-CGGAATCCCCAGTTGTTGTTGA-3'。PCR 参数: 94°C 变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 56°C 复性 30 s, 72°C 延伸 30 s, 30 次循环; 72°C 延伸 10 min。PCR 产物进行 3.0% 琼脂糖凝胶电泳。

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、残留 293 细胞蛋白、残留 DNA、残留牛血清蛋白、残留 Benzonase、HIV、HBV、HCV 等其他检项均按 2005 版《中国药典》(三部)^[11]或相关试剂盒要求进行。

结果

1 重组基因结构鉴别

3 种限制性内切酶分别对供试品基因组进行酶切后, Mlu I 酶切获得分别约为 10 605、5 845、4 305 和 1 797 bp 的条带; EcoRV 酶切获得分别约为 12 070、7 637、5 523、4 546、2 623 和 2 177 bp 的条带; Sal I 酶切获得分别约为 18 250、6 903 和 4 150 bp 的条带; 以该 3 种内切酶酶切后, 所获图谱均与预期 DNA 酶切片段长度吻合 (图 1A, B)。PCR 扩增 ITR、hTERT 启动子区域获得约 941 bp 的片段; p53 基因、HRE 区域扩增获得约为 1637 bp 的片段, 均与扩增片段的预期长度相符 (图 1C)。

2 病毒颗粒数及感染单位测定

腺病毒的颗粒数是通过提取其基因组 DNA, 测定其在 260 nm 处的吸光度, 1 个 A_{260} 单位作为 1.1×10^{12} VP 计算^[7]。供试品病毒颗粒数为 2.0×10^{11} VP·mL⁻¹。腺病毒感染单位 (infectious unit, IU) 采用 TCID₅₀ 的方法测定。将系列稀释的重组病毒分别感染 293 细胞, 每个稀释度数作 12 个复孔, 感染后第 10 天观察记录每排中产生细胞病变 (CPE) 的情况和孔数, 经计算供试品病毒滴度为 5.0×10^{10} IU·mL⁻¹。病毒比活性为病毒感染单位与病毒颗粒数之比 (IU/VP), 表示重组病毒的相对感染能力, 经检测供试品比活性为 25%。

3 生物学活性测定

重组复制型溶瘤腺病毒 p53 的生物学活性测定包括 p53 基因表达量、肿瘤细胞杀伤活性和增殖活性

检测。以 5 MOI 供试品感染人肺癌 H1299 细胞 48 h 后, 经 ELISA 检测细胞核蛋白的结果表明, SG600 感染组和空白对照组 A_{450} 之比为 5.2。将 SG600 供试品以系列稀释后的 MOI 梯度体外感染人肺癌细胞 A549, 培养 72 h 后染色计算其对肿瘤细胞的杀伤率, 并以 MOI 的对数值为横坐标, 杀伤率为纵坐标, 采用 CurveExpert 1.3 软件计算杀伤率为 50% 的 MOI (即 MOI_{IC50}), 经计算该批供试品的 MOI_{IC50} 为 1.0。肿瘤增殖活性检测即以相同 MOI 感染靶细胞后, 经 TCID₅₀ 法检测各细胞株于感染起始、48 h 的重组病毒感染单位。结果表明, 重组病毒在人肺癌细胞 A549 与人表皮成纤维二倍体细胞 BJ 的增殖比值为 398, 即感染 48 h 后, 相对于其在正常细胞中的扩增, SG600 在肿瘤细胞中具有近 400 倍的更加显著的增殖复制效果。

4 病毒载体纯度和相关杂质分析

Source 15Q 色谱柱对供试品进行 HPLC 纯度分析, 主峰保留时间为 12 min, 按面积归一化法计算, 供试品纯度为 99.5%。采用 ELISA 法测定残留 293 细胞蛋白结果小于 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; 残留 293 细胞 DNA 结果小于 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; ELISA 法测定残留牛血清蛋白、残留 Benzonase 分别小于 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

5 外源因子检查

采用荧光定量 PCR 方法检测野生型腺病毒残留, 标准曲线相关系数为 0.993, 供试品 DNA 提取的回收率为 90.2%, 纳入回收率校正后经计算, 供试品野生型腺病毒残留结果为在 1×10^7 VP 重组病毒供

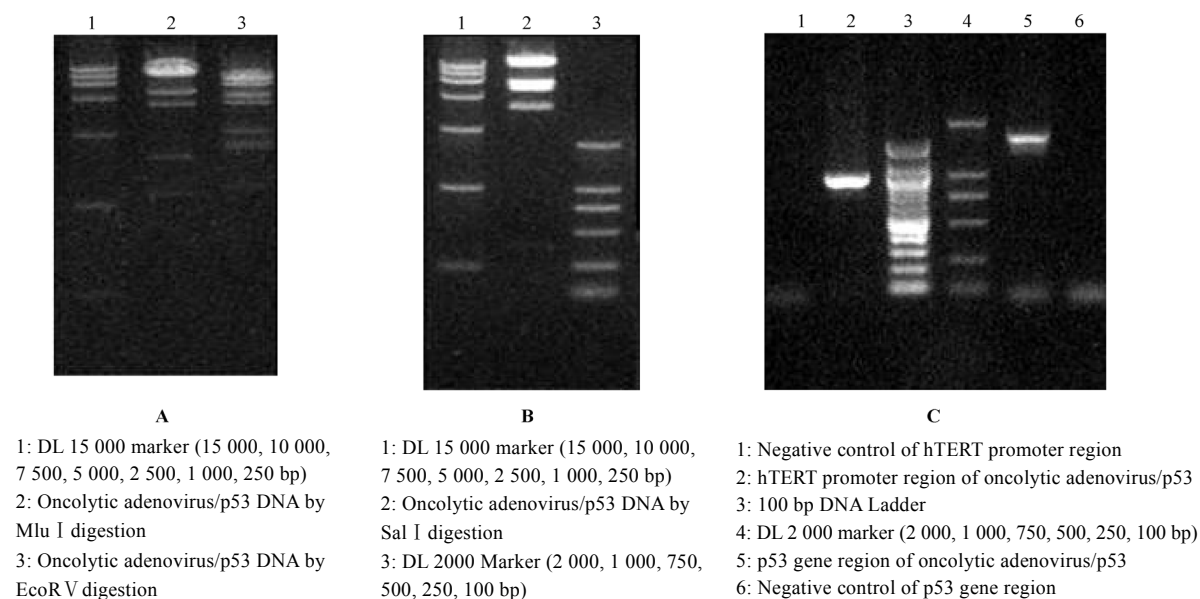


Figure 1 Restriction enzyme digestive map of recombinant oncolytic adenovirus/p53 DNA by Mlu I and EcoRV (A), and by Sal I (B), and PCR analysis of hTERT promoter region and p53 gene region in recombinant oncolytic adenovirus/p53 DNA (C)

试品中, 野生型腺病毒 (wtAdv) 拷贝数不高于 1 个, 即 $\leq 1/(1 \times 10^7 \text{ VP})$ 。PCR 法测定腺相关病毒、HIV、HBV 和 HCV 的结果均为阴性, 培养法检测支原体为阴性。

6 其他项目

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 2005 版《中国药典》(三部) 要求^[11]的相关规定, 该批产品的检测结果汇总见表 1。

讨论

在鉴别实验中, 分别采用 3 种限制性内切酶酶切法以及 2 组 PCR 引物, 以不同方法与不同基因区段的角度对复制型溶瘤腺病毒 p53 的重组基因结构进行分析, 结果确证了该重组病毒基因结构与预期吻合。

病毒载体类基因治疗产品有效性和安全性评价

与给药病毒载体的感染活性、病毒颗粒总量密切相关。因此病毒比活性 (IU/VP, %) 是评价病毒载体类基因治疗产品质量的关键指标之一^[5, 9]。如比活性偏低, 则无法有效在体内表达所携带的治疗基因, 不仅将导致治疗效果不佳, 而且过多的空壳病毒载体也会影响具有感染活性病毒载体与受体的结合, 在降低感染效率的同时激发更强的免疫反应。因此 FDA 和我国颁布的《人基因治疗研究和制剂质量控制技术指导原则》均对其有明确规定。采用 Maziel 等^[7]确定的 1 个 A_{260} 单位等于 1.1×10^{12} 个腺病毒颗粒的理论计算其颗粒数的方法, 操作简便、重现性好, 已被作为腺病毒颗粒数定量的经典方法被广泛采用。目前腺病毒载体的感染活性测定主要采用 TCID₅₀ 法, 该法相对于早期的 PFU 法一定程度上已提高了测定结果的准确性和重现性。但由于病毒感染细胞的过程相

Table 1 Quality control summary of oncolytic recombinant adenovirus p53 (SG600-P53)

Test	Specification	Result
Inspection on final containers	The preparation shall be a colorless or milk-white liquid, free of insoluble matters or impurities	Conform
Filling quantity /mL	≥ 1.0	Conform
pH	8.0 – 9.0	8.3
Identity test (restriction enzyme map)	The results of restriction enzyme (MluI, EcoRV, Sall) digestion map were conformed to theoretic.	Conform
Identity test (PCR)	PCR analysis for modified promoter region (hTERT) and p53 gene were conformed to theoretic.	Conform
Virus particle number /VP·mL ⁻¹	$(1.8 - 2.2) \times 10^{11}$	2.0×10^{11}
Infectious titer /IU·mL ⁻¹	$\geq 1.6 \times 10^{10}$	5.0×10^{10}
Virus specific activity /IU·VP ⁻¹	$\geq 7.0\%$	25
HPLC purity /%	≥ 95.0	> 99.0
A_{260} / A_{280}	1.2 – 1.4	1.24
P53 <i>in vitro</i> expression	H1299 cells were extracted nucleoprotein after infected with 5 MOI SG600-P53 and incubated for 48 h, sample A_{450} /blank $A_{450} \geq 3.0$	5.2
A549 cytotoxicity assay	MOI _{IC50} < 15.0	1.0
Tumor cells targeted replication ability	The test was determined through filial generation virus TCID ₅₀ titer ratio between A549 cell and BJ cells infected by recombinant virus respectively with 1MOI, TCID ₅₀ titer ratio of tumor cell infection group to normal cell infection control group was more than 100.	398
Wild type adenovirus (1×10^6 VP)	≤ 1	Conform
Adeno-associated virus	Negative	Conform
Content of residual BSA /ng·mL ⁻¹	≤ 50	Conform
Content of residual 293cell proteins/ng·mL ⁻¹	≤ 100	Conform
Content of residual 293cell DNA/ng·mL ⁻¹	≤ 10	Conform
Content of residual benzonase /ng·mL ⁻¹	≤ 1	Conform
Exogenous virus	HBV, HCV, HIV Negative	Conform
Sterility test	Negative	Conform
Mycoplasma (culture method)	Negative	Conform
Abnormal toxicity test (mouse)	All the mice remain healthy and survive the observation period, without any abnormal reactions, and with increase of body weight by the end of observation period.	Conform
Bacterial endotoxin /EU·mL ⁻¹	< 10	Conform

对比较复杂, 不仅与细胞状态、培养时间、培养液成分以及操作相关, 而且还涉及感染过程中细胞与病毒的碰撞接触过程、病毒在感染液的分布、感染液总体积、感染过程时间长度等因素, 传统的 Spearman-Kärber 和 Reed-Muench 算法仍有待进一步优化。在 Nyberg-Hoffman 等^[9]的工作以及美国 ATCC 在野生型腺病毒载体参考品研究的过程中逐步建立了以泊松模型拟合的腺病毒感染活性计算公式^[10], 该公式将病毒感染过程涉及的细胞培养孔面积、感染时细胞汇合度、载体扩散系数、感染时间等因素纳入计算, 进一步完善了腺病毒感染活性的测定方法, 经验证后本研究采用该方法进行了多次测定并取得了较好的重现性, 并将 SG600 的比活性标准设定为 $\geq 7.0\%$, 高于规定^[5]的 3.3%。

在生物学活性测定中, 首先采用 ELISA 法对所携带 p53 基因的体外表达量进行测定。Bender Med Systems 的 P53 ELISA 试剂盒的标准品与其他 ELISA 定量标准品不同, 即采用“U”为单位而不是以 P53 蛋白浓度为标示, 同时其资料中也未阐述“U”的定义及其与蛋白含量的关系。为了避免因标准赋值溯源背景不清, 以及试剂盒、标准品批次不同造成的定量差异, 因此将判定标准设定为“供试品和空白细胞 A_{450} 的比值应大于 3.0”, 以客观表述该制品的体外表达量的测定结果。在确认 SG600 对人肺癌细胞 A549 的杀伤活性后, 本研究又设立了增殖活性检测。作为复制型溶瘤腺病毒, SG600 在结构改造中引入了端粒酶和缺氧启动子以求实现其在肿瘤细胞内相对的特异性增殖。复制型溶瘤病毒进入肿瘤细胞后, 肿瘤细胞特殊的微环境可高效激发端粒酶和缺氧启动子的功能, 通过在肿瘤细胞内的快速复制增殖, 介导肿瘤细胞裂解, 释放出的子代病毒继续以类似链式反应的过程, 不断扩散并继续感染其他肿瘤细胞, 从而选择性的杀灭肿瘤细胞, 并尽可能降低对正常细胞的非靶向性杀伤。由于腺病毒的受体为柯萨奇腺病毒受体 (Coxsackie adenovirus receptor, CAR), 在众多细胞表面均有不同程度表达^[12, 13], 因此为了控制其对肿瘤细胞的相对特异复制溶瘤能力, 减少对正常细胞的毒性, 本研究采用 SG600 分别以相同 MOI 感染人肺癌细胞 A549 与正常人表皮成纤维二倍体细胞 BJ 后, 以 TCID₅₀ 法分别检测各细胞株于感染起始、48 h 的重组病毒感染活性, 并以其在肿瘤细胞相对于其在正常细胞中的扩增倍数作为增殖活性检测指标, 并将判定标准设定为其比值应大于 100, 结果

表明 SG600 在肿瘤细胞中具有更加显著的增殖复制效果。

在复制缺陷型腺病毒载体的质控中, 由于其结构改造中缺失了 E1 区, 因此无法在不含 E1 的细胞株 (如 A549 细胞) 中增殖并形成细胞病变, 因此可采用该原理检测系列稀释度下细胞病变情况并计算野生型腺病毒的含量。而 SG600P53 采用 hTERT 端粒酶启动子和缺氧启动子 HRE 分别调控 E1A 和 E1B, 该溶瘤复制型腺病毒可在 A549 等肿瘤细胞中复制扩增, 因此无法采用细胞病变法检测野生型腺病毒。同时由于溶瘤复制型腺病毒载体的研究起步相对较晚, 目前尚无公开推荐的检测方法, 本研究尝试以荧光定量 PCR 和 TaqMan 探针法, 在野生型腺病毒 E1A 启动子区域设计上下游引物和探针, 检测溶瘤复制型腺病毒 SG600P53 产品中的野生型腺病毒。该方法扩增阳性对照质粒的回收率为 115%~136%, 灵敏度可达 10 VP, 标准曲线在 $10 \sim 1 \times 10^6$ VP 内线性良好, 曲线相关系数大于 0.99, 并暂定质控标准为野生型腺病毒在 1×10^6 VP 供试品中不高于 1 个, 即 ≤ 1 wtAdv/10⁶ VP。

综上所述, 本研究建立了重组复制型溶瘤腺病毒 p53 的质控方法和质量标准, 并成功应用于该产品首次申报临床试验的质量复核, 各项指标均符合《人基因治疗研究和制剂质量控制技术指导原则》^[5]和 2005 版《中国药典》三部^[6, 11]的有关要求, 为保证该产品安全有效、质量可控奠定了基础。

References

- [1] The Journal of Gene Medicine. Vectors used in gene therapy clinical trials [EB/OL]. The Journal of Gene Medicine Wiley, 2011 [2011-04-05]. <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>.
- [2] Xie M, Niu JH, Chang Y, et al. A novel triple-regulated oncolytic adenovirus carrying PDCD5 gene exerts potent antitumor efficacy on common human leukemic cell lines [J]. Apoptosis, 2009, 14: 1086-1094.
- [3] Li YM, Song ST, Jiang ZF, et al. Telomerase-specific oncolytic virotherapy for human hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14: 1274-1279.
- [4] Su CQ, Wang XH, Chen J, et al. Antitumor activity of an hTERT promoter-regulated tumor-selective oncolytic adenovirus in human hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12: 7613-7620.

- [5] State Food and Drug Administration. Guidance for human gene therapy and product quality control [EB/OL]. State Food and Drug Administration, 2003 [2011-04-05]. <http://www.sfda.gov.cn/WS01/CL0237/15708.html>.
- [6] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2005 ed. Vol III. Beijing: Chemistry Industry Press, 2005: 3-10.
- [7] Maizel JV Jr, White DO, Scharff MD. The polypeptides of adenovirus. I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12 [J]. Virology, 1968, 36: 115-125.
- [8] Li YH, Rao CM, Zhao Y, et al. Quality control for recombinant adenovirus human endostatin [J]. Chin J Cancer Biother (中国肿瘤生物治疗杂志), 2005, 12: 138-142.
- [9] Nyberg-Hoffman C, Shabram P, Li W, et al. Sensitivity and reproducibility in adenoviral infectious titer determination [J]. Nat Med, 1997, 3: 808-811.
- [10] International Society for Bioprocess Technology. Adenovirus reference material standard operating procedure for determination of infectious titer in 293 cells in a 96-well format [EB/OL]. International Society for Bioprocess Technology. 2001 [2011-04-05]. <http://www.isbiotech.org/ReferenceMaterials/pdfs/CharacterizationSopWorksheets002.pdf>
- [11] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2005 ed. Vol III. Beijing: Chemistry Industry Press, 2005: Appendices 73-81.
- [12] Wang JZ. Development and Quality Control of Biopharmaceuticals (生物技术药物研究开发和质量控制) [M]. Beijing: Science Press, 2007: 862-872.
- [13] Gao JQ, Chen HL, Nakagawa S, et al. Gene expression of tumor cells both *in vitro* and *in vivo* enhanced by integrin-targeting adenovirus vector [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2006, 41: 1116-1120.

《国际药学研究杂志》2012 年征订启事

《国际药学研究杂志》(原刊名: 国外医学药学分册) 是中国科技论文统计源期刊 (中国科技核心期刊), 是以评述性论文为主的综合性药学期刊, 由军事医学科学院主管、军事医学科学院毒物药物研究所主办。设置栏目有综述、专家论坛、研究论著、医药信息等。本刊根据国内药学科、教学、临床和生产的需要, 追踪报道世界各国药学领域的新进展、新动向、新技术和新成果, 包括药物化学、药剂学、药理学和毒理学、药物分析、生化药理学和临床药理学等基础研究和应用研究方面的内容。刊登内容既有新颖的基础理论, 又有应用研究和临床实践, 适合于从事药学研究的科技人员、临床医师和药师、制药工程技术人员, 以及医药院校师生阅读和参考。被美国《化学文摘》、美国《剑桥科学文摘》、波兰《哥白尼索引》、荷兰《医学文摘》等多个国外著名检索机构收录。

本刊为双月刊, 大 16 开本, 80 页, 国内外公开发行, 每期定价 12.00 元。国内邮发代号: 82-135; 国外代号: BM6568, 国外发行: 中国国际图书贸易总公司 (北京 399 信箱)。欢迎广大读者在当地邮局订阅, 也可直接与编辑部联系补订。地址: 北京市海淀区太平路 27 号六所《国际药学研究杂志》编辑部; 邮编: 100850; 电话: 010-66931618, 010-66931637; 期刊网址: <http://www.pharmacy.ac.cn>; E-mail: guol@nic.bmi.ac.cn