

SEC-HPLC 法测定溶瘤腺病毒注射液的纯度^{*}李永红, 韩春梅, 毕华, 陶磊, 李响, 饶春明^{**}

(中国食品药品检定研究院 卫生部生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室, 北京 100050)

摘要 目的: 建立检测溶瘤腺病毒注射液纯度的分子排阻高效液相色谱法(SEC-HPLC法)。方法: 采用 XBridge BEH SEC 分析柱和 Waters 2695/2489 高效液相色谱系统, 以含 150 mol·L⁻¹ 氯化钠的磷酸盐缓冲溶液(pH 7.0)为流动相进行等度洗脱, 流速 0.5 mL·min⁻¹, 检测波长 260 nm, 采用峰面积归一法检测溶瘤腺病毒注射液纯度, 并对方法的专属性、线性、重复性、中间精密度、检测下限和定量下限等指标进行考察。结果: 空白溶剂无干扰峰出现; 未经纯化和热处理的溶瘤腺病毒溶液中溶瘤腺病毒峰与其他杂质峰分离度均大于 2.0; 溶瘤腺病毒的进样量在 2×10⁸~2×10¹⁰ 病毒颗粒(VP)范围内, 浓度与吸收峰的线性关系良好($R^2=0.9985$); 6 次进样测得的峰面积的 RSD 为 0.78%; 中间精密度试验的 RSD 为 4.7%; 检测下限为 2.3×10⁶ VP, 定量下限为 6.7×10⁶ VP。3 批溶瘤腺病毒注射液的纯度分析结果分别为 99.84%、99.80%、99.64%。结论: SEC-HPLC 法可用于检测溶瘤腺病毒注射液的纯度。

关键词: 溶瘤腺病毒; 基因治疗产品; 质量控制; 纯度; 分子排阻高效液相色谱法

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2020)01-0048-04

doi: 10.16155/j.0254-1793.2020.01.07

Purity determination of oncolytic adenovirus injection by SEC-HPLC^{*}LI Yong-hong, HAN Chun-mei, BI Hua, TAO Lei, LI Xiang, RAO Chun-ming^{**}

(National Institutes of Food and Drug Control, Key Laboratory of the Ministry of Health for Research on Quality and Standardization of Biotech Products, Beijing 100050, China)

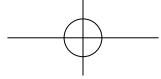
Abstract **Objective:** To develop an assay for the purity determination of oncolytic adenovirus injection by SEC-HPLC. **Methods:** An SEC-HPLC method was used to determine the purity of oncolytic adenovirus injection with XBridge BEH SEC column and HPLC system(Waters 2695/2489). The phosphate buffer solution(pH 7.0) containing 150 mol·L⁻¹ sodium chloride was used as mobile phase for isocratic elution. The flow rate was 0.5 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was 260 nm. The purity of oncolytic adenovirus injection was determined by peak area normalization method. The assay was subsequently validated for its specificity, linearity, repeatability, intermediate precision, limit of detection(LOD) and limit of quantitation(LOQ). **Results:** There was no interference peak in the blank solvent; the resolution between the peak of oncolytic adenovirus and other

* 国家科技重大专项课题资助项目(2018ZX09733002-005)

** 通信作者 Tel:(010)67095380; E-mail: raoem@nifdc.org.cn

第一作者 李永红 Tel:(010)67095684; E-mail: scbjlyh@sohu.com

韩春梅 Tel:(010)67095604; E-mail: hanem@nifdc.org.cn



impurities in the unpurified and heat-treated oncolytic adenovirus solution was greater than 2.0; the linear relationship between the concentration and the absorption peak was good in the range of 2×10^8 – 2×10^{10} viral particle (VP), with R^2 being 0.998 5; peak area RSD of six injections was 0.78%; RSD of intermediate precision was 4.7%; the LOD was 2.3×10^6 VP, and the LOQ was 6.7×10^6 VP. The purity analysis results of three batches of oncolytic adenovirus injections were 99.84%, 99.80%, and 99.64%, respectively. **Conclusion:** The SEC-HPLC assay can be applied to determine the purity of oncolytic adenovirus injection.

Keywords: oncolytic adenovirus; gene therapy products; quality control; purity; SEC-HPLC

人腺病毒 (human adenovirus, HAdV) 属于哺乳动物腺病毒属, 是一种直径为 70~90 nm 的无包膜病毒, 具有二十面体衣壳, 由 3 种主要和 4 种次要衣壳蛋白组成, 衣壳内包含约 4.7 kb 的线状双链 DNA 分子^[1]。溶瘤腺病毒是对腺病毒的基因组进行工程化改造后, 使其在癌组织中选择性复制, 导致癌细胞裂解和子代病毒的释放^[2-3]。2005 年, 第 1 种转基因溶瘤腺病毒 Oncorine (H101) 被国家食品药品监督管理局批准用于治疗头颈部鳞状细胞癌^[4-5]。目前国内外有众多研发单位正在对腺病毒基因组进行更多方式的改造, 未来将推动更多的溶瘤腺病毒产品从实验室研究进入到临床应用, 以治疗胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌、胶质母细胞瘤、膀胱癌、黑色素瘤和肺癌等多种恶性肿瘤^[6-7]。溶瘤腺病毒在作为药品进行生产和研发的过程中, 需要采用纯度检测方法对产品质量进行分析和控制^[8-9]。分子排阻高效液相色谱法 (SEC-HPLC 法) 作为测定生物大分子纯度的方法, 具有操作简单, 重复性好, 灵敏度高等特点, 目前已用于重组肠道病毒 71 型疫苗^[10]、重组戊型肝炎疫苗类病毒颗粒^[11]等病毒或病毒样颗粒产品的纯度分析。本文拟建立一种 SEC-HPLC 方法来检测溶瘤腺病毒注射液的纯度, 并进行初步方法学考察。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Alliance 2695 型高效液相色谱仪 (2489 紫外检测器, Empower 3 工作站软件; Waters 公司), XBridge BEH SEC 色谱柱 (7.8 mm × 300 mm, 3.5 μ m, 450 Å; Waters 公司), AL104 型电子天平 (Mettler Toledo 公司), S220 型 pH 计 (Mettler Toledo 公司)。

1.2 试剂

溶瘤腺病毒注射液为中国食品药品检定研究院重组药物室留存, 3 批样品批号分别为 201808003、201171120 和 201171208, 浓度 1.0×10^{12} VP · mL⁻¹,

保存条件为 -70 °C。Tris 碱为超纯级, 购自 Ameresco 公司; 磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化钠、甘油为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司; 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Waters XBridge BEH SEC (7.8 mm × 300 mm, 3.5 μ m, 450 Å); 流动相: 磷酸盐缓冲液 1 (精密称取十二水磷酸氢二钠 7.16 g、二水磷酸二氢钠 3.12 g、氯化钠 8.76 g, 加适量水溶解后用 0.1 mol · L⁻¹ 盐酸或 0.1 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液调 pH 至 7.0, 加水定容至 1 L); 流速: 0.5 mL · min⁻¹; 柱温: 25 °C; 样品池温度: 4 °C; 检测波长: 260 nm; 进样量: 20 μ L。

2.2 溶液制备

2.2.1 供试品溶液 取冻存的溶瘤腺病毒注射液室温融化, 即得。

2.2.2 空白对照溶液 以溶瘤腺病毒的保存液 (精密称取 Tris 碱 2.422 g, 氯化钠 1.461 g, 甘油 25 g, 加适量水溶解后用 0.1 mol · L⁻¹ 盐酸或 0.1 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液调 pH 至 8.0, 加水定容至 1 L) 作为空白对照溶液。

2.2.3 未纯化供试品溶液 生产过程中未经纯化的溶瘤腺病毒溶液 (由企业提供)。

2.2.4 热处理供试品溶液 将供试品溶液经 65 °C 加热 20 min。

2.3 专属性和系统适用性

分别取空白对照溶液、供试品溶液、未纯化供试品溶液各 20 μ L 和热处理供试品溶液 2 μ L, 注入液相色谱仪, 记录色谱图。结果见图 1, 供试品中溶瘤腺病毒峰保留时间在 10.50 min, 理论塔板数为 21 872; 空白对照品溶液无干扰峰出现; 未纯化供试品和热处理供试品的色谱图中, 溶瘤腺病毒峰与其他杂质峰分离度均大于 2.0。结果表明本方法的专属性和系统适用性良好。

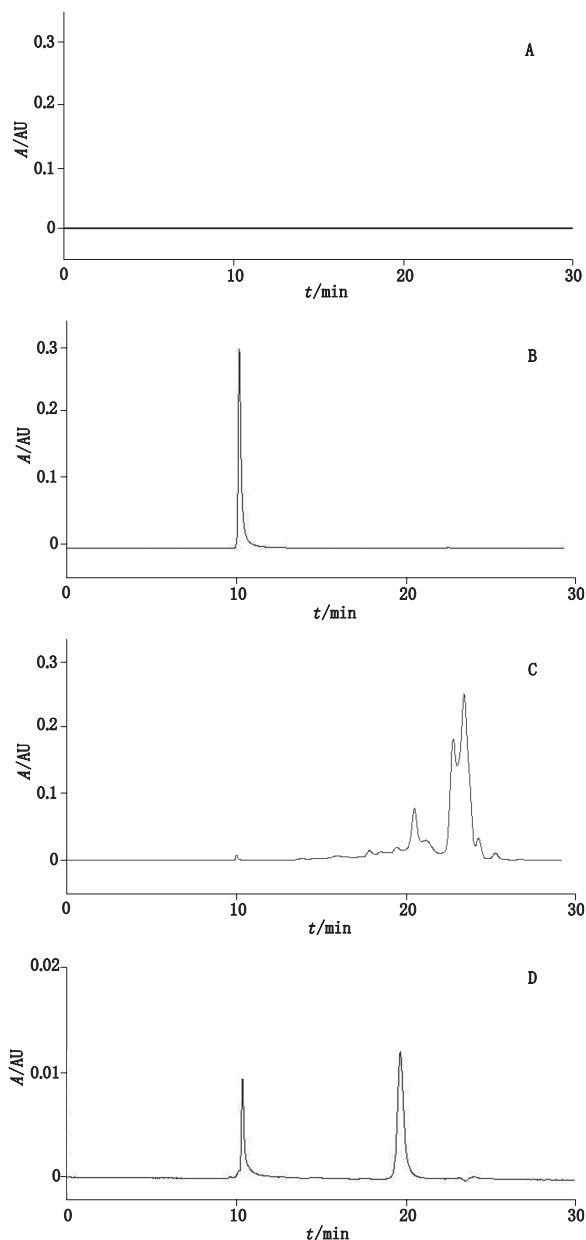


图1 空白对照溶液(A)、供试品溶液(B)、未纯化供试品溶液(C)和热处理供试品溶液(D)色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of blank control (A), sample solution (B), unpurified sample solution (C), and heat-treated sample solution (D)

2.4 线性关系考察

将溶瘤腺病毒注射液分别用空白对照溶液稀释至 1.02×10^{10} 、 2.56×10^{10} 、 6.40×10^{10} 、 1.60×10^{11} 、 4.00×10^{11} 、 1.00×10^{12} VP·mL⁻¹, 混匀, 分别进样 20 μL, 测得各浓度相应的峰面积(表1), 对目标峰面积进行线性评估。以浓度(X)为横坐标, 峰面积平均值(Y)为纵坐标作回归分析, 得回归方程:

$$Y = 4.82 \times 10^6 X - 91\,743 \quad R^2 = 0.998\,5$$

表1 线性试验各浓度样品的峰面积

Tab. 1 Peak area of sample at each concentration in linearity test

浓度 (concentration) / (VP · mL ⁻¹)	峰面积 (peak area) / (μV · s)
1.02×10^{10}	32 442
2.56×10^{10}	79 560
6.40×10^{10}	208 006
1.60×10^{11}	623 559
4.00×10^{11}	1 727 533
1.00×10^{12}	4 780 238

结果表明溶瘤腺病毒的进样量在 $2 \times 10^8 \sim 2 \times 10^{10}$ VP 范围内, 线性关系良好(图2)。

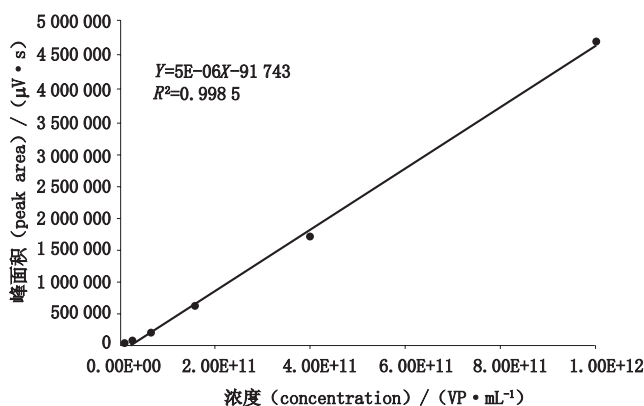


图2 溶瘤腺病毒的标准曲线

Fig. 2 Standard curve of oncolytic adenovirus

2.5 进样精密度及中间精密度试验

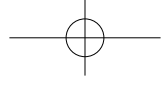
取供试品溶液, 连续进样 6 次, 测定溶瘤腺病毒的峰面积, 结果峰面积的 RSD 为 0.78%, 表明本方法的进样精密度良好。连续 3 d 取供试品溶液, 每天分别进样 3 次, 测定溶瘤腺病毒的峰面积, 结果峰面积的 RSD 为 4.7%, 表明本方法的中间精密度良好。

2.6 检测下限和定量下限

取供试品溶液适量, 用空白对照溶液逐步稀释成不同浓度, 在上述色谱条件下, 分别进样 20 μL, 按信噪比 S/N=3 测定其检测下限, 按信噪比 S/N=10 测定其定量下限。结果溶瘤腺病毒的检测下限为 2.3×10^6 VP, 定量下限为 6.7×10^6 VP, 可以满足测定要求。

2.7 样品测定

取 3 批溶瘤腺病毒注射液, 在上述色谱条件下, 分别进样 20 μL, 每批样品重复进样 2 次, 采用峰面积归一法分析样品纯度, 结果批号为 201808003、



201171120 和 201171208 的样品纯度 ($n=2$) 分别为 99.84%、99.80%、99.64%。

3 讨论

SEC-HPLC 是测定重组蛋白药物纯度常用的方法,但对于溶瘤腺病毒产品来说,由于腺病毒颗粒含有共约 2 500 个蛋白质分子和约 36 000 个碱基对的双链 DNA 分子^[12],其相对分子质量远大于单个蛋白质分子,因此给其液相色谱分析带来了挑战。目前通常采用基于电荷分离的阴离子交换 HPLC 法^[13-15]分析腺病毒,尚未见到基于分子大小原理分离的分子 SEC-HPLC 分析方法的报道。由于产品纯度的检测结果通常是依赖于方法的,采用不同原理的方法互补进行纯度分析将能更好地控制产品的质量。本文采用的 XBridge Protein BEH SEC 色谱柱以 450 Å 孔径和 3.5 μm 大小的颗粒填充,采用亚乙基桥杂化颗粒 (BEH) 和稳定的二醇基键合技术,与传统 100% 硅胶基质 SEC 产品相比性能更佳。建立的 SEC-HPLC 法在分析未纯化和 65 °C 热处理的溶瘤腺病毒时,溶瘤腺病毒峰与杂质峰实现了良好的分离。未纯化样品中杂质峰的保留时间约在 18~26 min 范围内,而 65 °C 热处理的溶瘤腺病毒样品中杂质峰保留时间为 19.5 min,均远大于与溶瘤腺病毒峰 10.5 min 的保留时间。未纯化样品中的杂质主要是来源于病毒宿主细胞的蛋白质和核酸等成分,而 65 °C 热处理后病毒样品的杂质主要是病毒因高温裂解释放出的病毒成分,这些杂质的相对分子质量均远小于完整病毒颗粒的相对分子质量,因而得到良好分离。因此,该方法能较好地分析溶瘤腺病毒注射液在生产过程或高温条件下可能产生的这些杂质,可用于测定产品的纯度。需要指出的是,样品在 37 °C 温育不同时间处理后形成的聚集体很快结成更大的微米级团块,由于体积过大,难以在 SEC-HPLC 中检出,可以改用动态光散射法检测。

方法学考察结果表明,线性、进样精密度和中间精密度良好,检测下限和定量下限满足检测要求。总之,建立的 SEC-HPLC 法可用于检测溶瘤腺病毒注射液的纯度。

参考文献

- [1] BAKER AT, AGUIRRE-HERNÁNDEZ C, HALLDÉN G, *et al.* Designer oncolytic adenovirus: coming of age [J]. *Cancers*, 2018, 10(6): 201
- [2] GORADEL NH, MOHAJEL N, MALEKSHAHI ZV, *et al.* Oncolytic

- adenovirus: a tool for cancer therapy in combination with other therapeutic approaches [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6): 8636
- [3] CERVERA-CARRASCON V, HAVUNEN R, HEMMINKI A. Oncolytic adenoviruses: a game changer approach in the battle between cancer and the immune system [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2019, 19(5): 443
- [4] GARBER K. China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2006, 98(5): 298
- [5] LIANG M. Oncorine, the world first oncolytic virus medicine and its update in China [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2018, 18(2): 171
- [6] ROSEWELL SHAW A, SUZUKI M. Recent advances in oncolytic adenovirus therapies for cancer [J]. *Curr Opin Virol*, 2016, 21: 9
- [7] NIEMANN J, KÜHNEL F. Oncolytic viruses: adenoviruses [J]. *Virus Genes*, 2017, 53(5): 700
- [8] 李永红, 毕华, 史新昌, 等. 人用基因治疗制品生产和质量控制的通用性技术要求 [J]. *中国新药杂志*, 2018, 27(21): 2482
- LI YH, BI H, SHI XC, *et al.* General technical requirements for production and quality control of human gene therapy products [J]. *Chin J New Drugs*, 2018, 27(21): 2482
- [9] 王军志. 生物技术药物研究开发和质量控制 [M]. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2018
- WANG JZ. Research, Development and Quality Control of Biopharmaceuticals [M]. 3rd Ed. Beijing: Science Press, 2018
- [10] 张改梅, 陈磊, 李国顺, 等. 测定重组肠道病毒 71 型疫苗 (汉逊酵母) 原液纯度的高效分子排阻色谱法的建立及方法的验证 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2019, 32(2): 207
- ZHANG GM, CHEN L, LI GS, *et al.* Development and validation of high performance size exclusion chromatography for determination of purity of bulk of recombinant enterovirus 71 vaccine (Hansenula) [J]. *Chin J Biol*, 2019, 32(2): 207
- [11] 吴清胜, 李媛媛. 重组戊型肝炎疫苗类病毒颗粒纯度高效分子排阻色谱检测方法的建立、验证及应用 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2018, 31(12): 1367
- WU QS, LI YY. Validation and application of purity test method for recombinant hepatitis E vaccine virus particles by SEC-HPLC [J]. *Chin J Biol*, 2018, 31(12): 1367
- [12] CHELIUS D, HÜHMER AF, SHIEH CH, *et al.* Analysis of the adenovirus type 5 proteome by liquid chromatography and tandem mass spectrometry methods [J]. *J Proteome Res*, 2002, 1(6): 501
- [13] BLANCHE F, CAMERON B, BARBOT A, *et al.* An improved anion-exchange HPLC method for the detection and purification of adenoviral particles [J]. *Gene Ther*, 2000, 7(12): 1055
- [14] WHITFIELD RJ, BATTOM SE, BARUT M, *et al.* Rapid high-performance liquid chromatographic analysis of adenovirus type 5 particles with a prototype anion-exchange analytical monolith column [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(13): 2725
- [15] KUHN I, LARSEN B, GROSS C, *et al.* High-performance liquid chromatography method for rapid assessment of viral particle number in crude adenoviral lysates of mixed serotype [J]. *Gene Ther*, 2007, 14(2): 180

(本文于 2019 年 11 月 19 日收到)