

首批 1 型单纯疱疹病毒溶瘤活性测定国家候选标准品的研制*

秦玺¹, 胡金盼², 李永红¹, 史新昌¹, 丁有学¹,
毕华¹, 韩春梅¹, 郑红梅¹, 饶春明¹, 梁成罡^{1**}

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 2. 厦门大学公共卫生和生命科学学院, 厦门 361005)

摘要 目的: 研制首批 1 型单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus 1, HSV-1) 溶瘤活性测定国家标准品。方法: 按 2020 年版《中华人民共和国药典》三部相关要求, 分别进行 HSV-1 溶瘤活性测定液体标准品和冻干标准品的制备和质量检测, 并使用热加速试验进行稳定性考察, 以 U-2 OS 细胞/CCK-8 法分别在 3 家实验室对标准品的溶瘤活性进行协作标定。对比研究液体标准品和冻干标准品, 选择其中更为适用的 1 种作为国家标准品。结果: 制备的 2 种 HSV-1 溶瘤活性测定标准品的质量检测结果均符合要求, 其中冻干标准品水分含量为 1.09%, 分装精度为 0.15%。稳定性试验结果用阿伦尼乌斯公式计算, 初步预测液体标准品溶瘤活性在 -70 °C 下降低 10% 需 7.7 年; 冻干标准品溶瘤活性在 -70 °C 下降低 10% 需 6.1×10^5 年, 其稳定性得到很大提高。3 个实验室协作标定进行了共 21 次测定, 液体标准品的溶瘤活性值几何均数为 $7.08 \times 10^4 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 冻干标准品的溶瘤活性值几何均数为 $1.82 \times 10^4 \text{ U} \cdot \text{支}^{-1}$ 。HSV-1 标准品原液在冻干后溶瘤活性由 $7.08 \times 10^4 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 下降至 $3.03 \times 10^4 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 但因其溶瘤活性在预稀释 100 倍后仍然出现良好的 S 型量效关系曲线, 并不影响它作为标准品使用的要求。将液体标准品作为样品, 用冻干标准品作为标准品进行校准后, 3 家实验室结果的几何变异系数 (GCV) 由 64.4% 下降到 29.2%, 实验的精密度得到较大提高。结论: 该批 HSV-1 溶瘤活性测定冻干标准品各项指标均符合相关要求, 与液体标准品相比更适合作为国家标准品使用, 其溶瘤活性赋值为 $1.82 \times 10^4 \text{ U} \cdot \text{支}^{-1}$ 。

关键词: 1 型单纯疱疹病毒 (HSV-1); U-2 OS 细胞/CCK-8 法; 溶瘤活性; 标准品; 冻干; 稳定性

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)04-0663-8

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024.04.13

Preparation of the candidate first Chinese national standard for oncolytic activity assay of herpes simplex virus type 1*

QIN Xi¹, HU Jin-pan², LI Yong-hong¹, SHI Xin-chang¹,
DING You-xue¹, BI Hua¹, HAN Chun-mei¹, ZHENG Hong-mei¹,
RAO Chun-ming¹, LIANG Cheng-gang^{1**}

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China;

2. School of Public Health and School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract Objective: To establish the first national standard for oncolytic activity assay of herpes simplex virus

* 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: liangchenggang@nifdc.org.cn

第一作者 秦玺 Tel: (010)67095684; E-mail: qinxi@nifdc.org.cn

胡金盼 Tel: (010)67095359; E-mail: hujinpan93@163.com

type 1(HSV-1). **Methods:** According to the requirements in Chinese Pharmacopoeia (Volume III, 2020 edition), the liquid and freeze-dried standard for oncolytic activity of HSV-1 were prepared and tested, of which the stability were evaluated by thermal acceleration test. The oncolytic activity of the standard was calibrated collaboratively by U-2 OS cells/CCK-8 method in 3 laboratories. The liquid standard was compared with the freeze-dried standard, and the more suitable one was selected as the national standard. **Results:** The prepared standard substance was all qualified, among which the moisture content of the freeze-dried standard was 1.09% and the dispensing accuracy was 0.15%. The results of stability test were calculated by Arrhenius formula. It was preliminarily predicted that it would take 7.7 years for the oncolytic activity of liquid standard to decrease by 10% at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, and it would take 6.1×10^5 years for the oncolytic activity of lyophilized standard to decrease by 10% at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Compared with liquid standard, the stability of lyophilized standard was greatly improved. Twenty-one times of collaborative calibration tests by 3 laboratories showed that the oncolytic activity liquid standard was $7.08 \times 10^4\text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ and the oncolytic activity liquid standard was $1.82 \times 10^4\text{ U} \cdot \text{vial}^{-1}$. After lyophilized, the oncolytic activity of the bulk of HSV-1 standard decreased from $7.08 \times 10^4\text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ to $3.03 \times 10^4\text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$. However, the good S-shaped dose-response curve still appeared after 100 times of pre-dilution, which did not affect the requirements of its use as a standard. When the liquid standard was used as the sample and the freeze-dried standard was used as the standard for calibration, the geometric coefficient of variation (GCV) of the results of the 3 laboratories decreased from 64.4% to 29.2%, and the precision of the experiment was greatly improved. **Conclusion:** The batch of freeze-dried HSV-1 standards for oncolytic activity assay meets the relevant requirements, and is more suitable for use as a national standard than liquid standards. Its oncolytic activity is assigned a value of $1.82 \times 10^4\text{ U} \cdot \text{vial}^{-1}$.

Keywords: herpes simplex virus type 1(HSV-1); U-2 OS cells/CCK-8 method; oncolytic activity; standard substance; freeze-drying; stability

1型单纯疱疹病毒(herpes simplex virus 1, HSV-1)属于疱疹病毒科中的 α 疱疹病毒亚科的单纯疱疹病毒属1型血清型^[1]。该病毒具有感染宿主范围广,病毒复制周期短,基因组容量大,较高的安全性等优势^[2-4]。目前对HSV-1作为溶瘤病毒的研发较多,取得的进展较大^[5-8]。2015年10月27日, FDA批准了首个溶瘤病毒类治疗药物 talimogene laherparepvec (T-Vec, Imlygic, Amgen公司)。该产品以HSV-1为溶瘤病毒,同时作为载体携带人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)基因,用于首次手术后复发的黑色素瘤患者不可切除的皮肤、皮下和淋巴结病灶的局部治疗^[9]。目前,国内也有多家单位正在开展以HSV-1溶瘤病毒为载体的基因治疗产品研发,并已有3个产品获批进入临床试验。在HSV-1载体药物开发的过程中,为保证产品的质量,质量控制方法和质量标准的研究尤为重要,而溶瘤活性测定是其关键的质量属性之一和重要的质量控制指标^[10]。

在前期研究中建立了U-2 OS细胞/CCK-8法

对HSV-1的溶瘤活性进行检测^[11],同时初步证实了引入标准品进行校准可以有效提高分析方法的精密度。目前基因治疗领域还没有建立国际统一的活性测定用标准品或参考品,仅在美国典型菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)有5型腺病毒参考品 Adv5RSM^[12](ATCC; VR1516)、2型腺相关病毒参考品 AAV2RSM^[13](ATCC; VR1616)和8型腺相关病毒参考品 AAV8RSM^[14](ATCC; VR1816)3种病毒标准物质可用于相应病毒的检测分析。这3种病毒参考品均为液体的状态,由于病毒本身易失活,采用液体状态保存极易造成稳定性不足,影响以此为标准品进行检测分析的可靠性。由于在前期研究中采用的临时活性测定标准品也是液体制剂,存在同样问题。为了进一步提高HSV-1溶瘤活性检测方法的可靠性,本研究开展了HSV-1溶瘤活性测定冻干标准品(HSV-1溶瘤活性测定国家候选标准品)的研制,进行了溶瘤活性的协作标定和初步的稳定性研究,并同时制备的HSV-1液体标准品进行了溶瘤活性及稳

定性的对比研究。

1 仪器与试剂

1.1 实验耗材及仪器

BIOSTAR 生物安全柜购自 TELSTAR 公司;二氧化碳培养箱购自 Thermo Fisher 公司;M5 酶标仪购自 Molecular Devices 公司;TE300 倒置显微镜购自 NIKON 公司;AP-0650030 细胞计数板购自 MARIENFELD 公司等。

1.2 试剂及细胞

DMEM/F12 培养基(货号 11320082)、新生牛血清(NBCS,货号 16010159)、L-谷氨酰胺(L-glutamine, 100 mL, 货号 25030-081)、青链霉素双抗(100 mL, 货号 15140-122)、0.25% 胰酶(100 mL, 货号 25200056)、DPBS(1 L, 货号 A1285601)均购自 Thermo Fisher 公司;CCK-8(货号 CK04)购自北仁化学科技有限公司;人骨肉瘤细胞 U-2 OS 为中国食品药品检定研究院重组药物室留存。HSV-1 标准品原液(批号 201907001),按照我国生物制品的 GMP 相关要求生产,由北京万泰生物药业股份有限公司提供,总量为 1 527 mL。

2 方法与结果

2.1 标准品制备

取 HSV-1 标准品原液 309 mL,按每支 0.3 mL

分装,共分装 1 030 支。取 HSV-1 标准品原液 1 218 mL,按每支 0.6 mL 分装,分装结束后迅速送入冻干机冻干,共 2 030 支,作为候选冻干国家标准品。

2.2 标准品质量分析

对 HSV-1 标准品原液的关键质量属性进行了分析,包括无菌检查[参照 2020 年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)三部进行]、鉴别试验(包括限制性酶切:提取 HSV-1 病毒基因组后,用 SmaI 进行酶切鉴定;QPCR 法:设计特异引物对目标序列进行扩增;细胞中和法:用 HSV-1 中和抗体将 HSV-1 中和后,感染 U-2 OS 细胞,观察细胞是否病变)、感染滴度(将 HSV-1 病毒原液适当稀释后,感染 Vero 细胞,计数噬斑数在 10~100 左右的感染孔的噬斑数,并乘以稀释倍数)、溶瘤活性和选择性增殖活性[用特定感染滴度的病毒分别感染正常细胞 MRC-5 和肿瘤细胞 U-2 OS,分别取样 2 种细胞感染 48 h 的样品,进行感染滴度检测,之后按公式计算增殖倍数比,选择性增殖活性=(U-2 OS 细胞 48 h 组织感染液滴度/U-2 OS 起始组织感染液滴度)/(MRC-5 细胞 48 h 组织感染液滴度/MRC-5 起始组织感染液滴度)]等项目的检测分析,结果如表 1 所示,均符合《中国药典》三部对国家标准品的制备要求。

表 1 1 型单纯疱疹病毒原液相关检测结果

Tab. 1 Testing results of HSV-1 bulk

检验项目 (test item)	检验方法 (test method)	标准规定 (standard code)	检验结果 (test result)
鉴别试验(identification)	限制性酶切图谱法(restriction enzyme digestion atlas method)	与对照品一致(corresponding to reference substance)	符合规定(meet the requirement)
	QPCR	ICP 0、ICP 34.5 无扩增,APDI 扩增(ICP 0、ICP 34.5 were not amplified, APDI was amplified)	符合规定(meet the requirement)
无菌检查(sterility test)	细胞中和法(cell neutralization)	无细胞病变(acellular lesion)	符合规定(meet the requirement)
	薄膜过滤法(membrane-filter procedure)	14 d 内无菌生长(sterile growth within 14 d)	符合规定(meet the requirement)
感染滴度(infection titer)	噬斑法(plaque methods)	$\geq 1.0 \times 10^7$ PFU · mL ⁻¹	1.88×10^7 PFU · mL ⁻¹
溶瘤活性(oncolytic activity)	U-2 OS 细胞/CCK-8 法(U-2 OS cells/CCK-8 method)	$\geq 1.0 \times 10^4$ U · mL ⁻¹	5.86×10^4 U · mL ⁻¹
选择性增殖活性(selective proliferative activity)	细胞培养法(cell culture method)	≥ 100	2.14×10^5

对 HSV-1 溶瘤活性冻干标准品进行了溶瘤活性、分装精度(参照 2020 年版《中国药典》三部进行)、水分(参照 2020 年版《中国药典》三部进行)、无

菌检查和感染滴度等关键质量属性检测,结果如表 2 所示,均符合《中国药典》三部对国家标准品的制备要求。

表 2 1 型单纯疱疹病毒冻干标准品相关检测结果

Tab. 2 Testing results of HSV - 1 freeze - dried standard

检验项目 (test item)	检验方法 (test method)	标准规定 (standard code)	检验结果 (test result)
溶瘤活性(oncolytic activity)	U - 2 OS 细胞/CCK - 8 法(U - 2 OS cells/CCK - 8 method)	$\geq 1.0 \times 10^4 \text{ U} \cdot \text{支}^{-1}$ ($\geq 1.0 \times 10^4 \text{ U} \cdot \text{vial}^{-1}$)	$1.5 \times 10^4 \text{ U} \cdot \text{支}^{-1}$ ($1.5 \times 10^4 \text{ U} \cdot \text{vial}^{-1}$)
分装精度(dispensing accuracy)	抽样称重法(sampling weighting method)	$\leq 1\%$	0.15%
水分(moisture content)	库伦滴定法(coulomb titration)	$\leq 1.5\%$	1.09%
无菌检查(sterility test)	薄膜过滤(membrane - filter method)	14 d 内无菌生长(sterile growth within 14 d)	符合规定(meet the requirement)
感染滴度(infection titer)	噬斑法(plaque methods)	$\geq 2.0 \times 10^6 \text{ PFU} \cdot \text{mL}^{-1}$	$1.55 \times 10^7 \text{ PFU} \cdot \text{mL}^{-1}$

2.3 稳定性试验

将标准品在不同温度(冻干标准品: -80、-20、4、25、37 °C,液体标准品: -80、-40、-20、4、25 °C)下放置不同时间(1、3 和 9 个月)后,进行溶瘤活性测定,以评估其稳定性。使用 U - 2 OS 细胞/CCK - 8 法在同一块 96 孔板上检测在不同温度下的溶瘤活性。分别将不同温度下的标准品接种到 96 孔板第 2 ~ 11 列的 A 行,每个温度 2 个复孔,然后用完全培养基(DMEM/F12 培养基 + 10% NBCS + 1% L - Glutamine + 1% 青链霉素双抗)4 倍系列稀释,共 10 个稀释度,细胞板的第 1 列、第 12 列加入相同体积的完全培养基,以减轻边孔效应对溶瘤活性测定的影响。

在 5 种温度下放置冻干标准品至 9 个月,溶瘤活性在各个时间点与 -80 °C 溶瘤活性比的测定结果见表 3。根据表中的数据及简化的阿伦尼乌斯公式: $\ln \{k(t)\} = A + B/T + \ln(T)$ (A: 截距; B: 斜率; k: 温度函数; T: 绝对温度),初步预测在 -70 °C 下,冻干标准品溶瘤活性降低 10% 需 6.1×10^5 年。

表 3 1 型单纯疱疹病毒冻干标准品稳定性检测结果

Tab. 3 Stability testing results of lyophilized standard

温度 (temperature)/ °C	与 -80 °C 溶瘤活性比 (oncolytic activity ratio compared with -80 °C)/%		
	1 个月 (1 month)	3 个月 (3 months)	9 个月 (9 months)
-20	92.7	110.9	93.6
4	91.7	92.2	74.1
25	46.4	18.9	14.5
37	6.5	1.8	1.3

对于液体标准品,与冻干标准品相比,稳定性研究时去掉 37 °C,增加 -40 °C。表 4 中数据为其热稳定性 1、3、9 个月与 -80 °C 溶瘤活性比的结果,根据阿伦尼乌斯公式: $\ln \{k(t)\} = A + B/T + \ln(T)$,选用 -80、-40 和 -20 °C 相对溶瘤活性值,初步预测在 -70 °C 下,HSV - 1 液体标准品溶瘤活性在 -70 °C 下降低 10% 需 7.7 年。

表 4 1 型单纯疱疹病毒液体标准品稳定性检测结果

Tab. 4 Stability testing results of HSV - 1 liquid standard

温度 (temperature)/ °C	与 -80 °C 溶瘤活性比 (oncolytic activity ratio compared with -80 °C)/%		
	1 个月 (1 month)	3 个月 (3 months)	9 个月 (9 months)
-40	98.2	91.4	78.1
-20	72.8	70.0	21.4
4	60.2	34	4.9
25	5.9	0	0

冻干标准品与液体标准品热稳定实验中有 3 个相同的温度条件 -20、4 和 25 °C,对其相对溶瘤活性进行对比,如图 1,结果显示冻干后 HSV - 1 标准品更稳定,因此,可优先选择冻干后的 HSV - 1 标准品作为国家标准品申报。

2.4 标准品协作标定

2.4.1 HSV - 1 溶瘤活性标准品协作标定方法^[11] 将细胞 U - 2 OS 用完全培养基稀释成 2.5×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$,每孔 100 μL 接种至 96 孔板。于 37 °C、5% CO_2 的培养箱中,培养 18 ~ 20 h。用完全培养基分别将液体标准品和冻干标准品预稀释 100 倍后,再 4 倍比系列稀释,共 10 个稀释度,每个稀释度 3 个复孔,

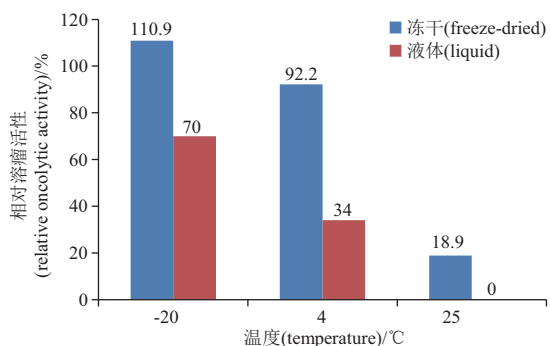


图 1 1 型单纯疱疹病毒冻干标准和液体标准品 3 个月热稳定性比较
Fig.1 Comparison of three - month thermal stability between freeze - dried standard and liquid standard of HSV - 1

每孔 160 μL 转至 U - 2 OS 细胞培养板中,然后将 96 孔板放置于湿饭盒中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中连续培养 72 h 后,每孔加入 CCK - 8 溶液 10 μL ,轻轻振荡培养板。继续 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4 ~ 4.5 h,取出后,在酶标仪上终点法读取吸收值 A_{450} 。

2.4.2 协作标定及统计分析 协作标定由厦门大学、北京万泰生物药业股份有限公司和中国食品药品检定研究院 3 个相互独立的实验室按上述方法分别进行,通过 EC_{50} 给标准品赋值,每个实验室须取得 7 次独立有效的实验结果(每次实验仅需做 1 块 96 板)。结果用几何均数法进行统计分析,得出每支标准品的效价单位。

HSV - 1 溶瘤活性测定液体标准品的协作标定结果如表 5 所示,共测 21 次,经计算,各次测定结果的 \lg 值呈正态分布,使用几何均数进行计算。实验次数 $n = 21$,自由度 $f = n - 1 = 20$, $t_{(20)0.05} = 2.086$,各次测定结果 \lg 值的均数为 4.85,标准差为 0.22,故溶瘤活性的几何均数为 $10^{4.85} = 70\ 795\ \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$,为了方便计算,将标准品溶瘤活性值定为 $7.08 \times 10^4\ \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。平均溶瘤活性的 95% 可信区间为 $56\ 234 \sim 89\ 125\ \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$,单次测定的 95% 参考值范围为 $25\ 118 \sim 199\ 526\ \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

表 5 1 型单纯疱疹病毒液体标准品协作标定结果

Tab.5 Collaborative calibration results of HSV - 1 liquid standard

试验次数 (number of test)	实验室 1 (lab 1)		实验室 2 (lab 2)		实验室 3 (lab 3)	
	实测值 (measured value) / ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	\lg 转换值 (lg conversion value)	实测值 (measured value) / ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	\lg 转换值 (lg conversion value)	实测值 (measured value) / ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	\lg 转换值 (lg conversion value)
1	93 900	4.97	51 034	4.71	49 300	4.69
2	164 000	5.21	50 557	4.70	70 100	4.85
3	176 000	5.25	45 220	4.66	54 400	4.74
4	152 000	5.18	64 115	4.81	56 000	4.75
5	130 000	5.11	51 376	4.71	37 300	4.57
6	137 000	5.14	56 084	4.75	55 400	4.74
7	114 000	5.06	46 225	4.66	44 300	4.65
均值 (mean value)	138 129	5.13	52 087	4.71	52 400	4.71
SD	28 582	0.09	6 405	0.05	10 348	0.09
RSD/%	20.7	1.8	12.3	1.1	19.8	1.8

HSV - 1 溶瘤活性测定冻干标准品具体测定结果如表 6 所示。每个实验进行 7 次独立的测定,共测 21 次,经计算,各次测定结果的 \lg 值呈正态分布,所以认为使用几何均数进行计算较为合理。实验次数 $n = 21$,自由度 $f = n - 1 = 20$, $t_{(20)0.05} = 2.086$,各次测定结果 \lg 值的均数为 4.26,标准差为 0.18,故溶瘤活性的几何均数为 $10^{4.26} = 18\ 197\ \text{U} \cdot \text{支}^{-1}$,为了方便计算,将标准品溶瘤活性值定为 $1.82 \times 10^4\ \text{U} \cdot \text{支}^{-1}$ 。平均溶瘤活性的 95% 可信区间为 $15\ 135 \sim$

$21\ 877\ \text{U} \cdot \text{支}^{-1}$,单次测定的 95% 参考值范围为 $7\ 762 \sim 42\ 658\ \text{U} \cdot \text{支}^{-1}$ 。

冻干标准品是由 0.6 mL 液体标准品冻干而成,所以协作标定的结果为 $1.82 \times 10^4\ \text{U} \cdot \text{支}^{-1}$ 可换算为 $3.03 \times 10^4\ \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$,与冻干前的液体标准品溶瘤活性 ($7.08 \times 10^4\ \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的比值为 42.8%,说明在冻干后 HSV - 1 的溶瘤活性下降了 57.2%。但在溶瘤活性测定中,预稀释 100 倍后仍然出现良好的 S 型量效关系曲线,并不影响其可作为标准品使用的要求。

表 6 1 型单纯疱疹病毒冻干标准品协作标定结果
Tab. 6 Collaborative calibration results of HSV-1 freeze-dried standard

试验次数 (number of test)	实验室 1 (lab 1)		实验室 2 (lab 2)		实验室 3 (lab 3)	
	实测值 (measured value)/ (U · vial ⁻¹)	lg 转换值 (lg conversion value)	实测值 (measured value)/ (U · vial ⁻¹)	lg 转换值 (lg conversion value)	实测值 (measured value)/ (U · vial ⁻¹)	lg 转换值 (lg conversion value)
1	28 700	4.46	16 732	4.22	13 800	4.14
2	38 600	4.59	13 205	4.12	15 600	4.19
3	19 900	4.30	14 711	4.17	12 000	4.08
4	30 000	4.48	22 924	4.36	15 500	4.19
5	39 800	4.60	16 525	4.22	12 400	4.09
6	20 500	4.31	17 098	4.23	8 830	3.95
7	31 200	4.49	18 179	4.26	12 700	4.10
均值(mean value)	29 814	4.46	17 053	4.22	12 976	4.14
SD	7 801	0.12	3 066	0.09	2 327	0.05
RSD/%	26.2	2.7	18.0	2.1	17.9	1.3

另外,由于在冻干标准品和液体标准品的协作标定的过程中,实验是在同一块 96 孔板上同步进行。将冻干标准品作为校准用标准品,赋值为上述 3 家实验室的协作标定结果 $1.82 \times 10^4 \text{ U} \cdot \text{支}^{-1}$,液体标准品作为样品进行测定,将 3 家实验室共计 21 次的实验结果进行统计学分析(表 7),其测定结果与未使用标准品校准的结果进行比较。发现在使用标准品校准后,3 家实验室结果的 GCV 由 64.4% 下降到 29.2%,实验的精密度大幅提升,这也说明在 HSV-1 溶瘤活性检测中引入标准品校准很有必要。

3 讨论

按照 2020 年版《中国药典》中《人用基因治疗制品总论》的要求,对于效价、感染性滴度等活性检测方法,应建立具有长期稳定性的活性标准品。溶瘤活性是重组人 HSV-1 基因治疗制品一项重要的质控项目,其与药物的肿瘤杀伤效果直接相关^[15],若能准确定量,对于指导临床用药具有重要的指导意义。由于目前 HSV-1 溶瘤活性测定中未采用统一的活性测定标准品,造成该项目常出现检测结果不稳定,实验室间检测结果不一致等情况。

为了建立稳定的 HSV-1 溶瘤活性测定国家标准品,本实验采用冻干和液体 2 种剂型进行对比研究,首先选取了 1 批 HSV-1 标准品原液经检验合格后,一部分作为液体标准品,一部分进行冻干制备成

冻干标准品。本实验按照 2020 年版《中国药典》三部国家标准品的制备要求,进行 HSV-1 国家标准品原液和成品的全面检定,结果表明,各项指标达到了标准品的相关要求。

标准品配方中含有人血白蛋白、二糖、氨基酸等,能够保证标准品具有较好的稳定性。通过热加速试验,可以评价标准品的稳定性。从现有的稳定性结果来看,冻干剂型稳定性更好,预期保存效期远长于液体剂型。另一方面,HSV-1 标准品原液在冻干后溶瘤活性虽然下降了 57.2%,但其溶瘤活性在预稀释 100 倍后仍然出现良好的 S 型量效关系曲线,并不影响它作为标准品使用的要求。因此,综合考虑标准品的稳定性和活性,以及保存、运输的影响,拟选用冻干标准品进行国家标准品的申报,同时也提示其他企业在病毒类基因治疗产品的内部标准品研制过程中应更多考虑采用冻干的方式。经 3 家不同实验室的协作标定,通过四参数曲线:

$$y = \left\{ \left[\frac{(A - D)}{1 + \left(\frac{X}{C}\right)^B} \right] + D \right\}$$

A: 上渐近线; D: 下渐近线; C: 半效浓度; B: 曲线斜率的 EC_{50} (半效浓度) 给标准品赋值。经计算,冻干标准品的几何平均溶瘤活性为 $1.82 \times 10^4 \text{ U} \cdot \text{支}^{-1}$,平均溶瘤活性的 95% 可信区间为 15 135 ~ 21 877 $\text{U} \cdot \text{支}^{-1}$ 。

表 7 1 型单纯疱疹病毒液体标准品的检测结果
Tab. 7 Testing results of HSV-1 liquid standard

实验室 (lab)	试验次数 (number of test)	未校准(no calibration)		校准后(after calibration)	
		实测值 (measured value)/ (U · mL ⁻¹)	lg 转化值 (lg conversion value)	实测值 (measured value)/ (U · mL ⁻¹)	lg 转化值 (lg conversion value)
1	1	93 900	4.97	87 210	4.94
	2	164 000	5.21	90 767	4.96
	3	176 000	5.25	120 480	5.08
	4	130 000	5.11	79 363	4.90
	5	152 000	5.18	67 277	4.83
	6	137 000	5.14	109 900	5.04
	7	114 000	5.06	90 226	4.96
2	8	51 034	4.71	56 788	4.75
	9	50 557	4.70	83 945	4.92
	10	45 220	4.66	72 123	4.86
	11	64 115	4.81	66 321	4.82
	12	51 376	4.71	55 021	4.74
	13	56 084	4.75	111 837	5.05
	14	46 225	4.66	50 049	4.70
3	15	49 300	4.69	69 319	4.84
	16	70 100	4.85	83 945	4.92
	17	54 400	4.74	72 123	4.86
	18	56 000	4.75	66 321	4.82
	19	37 300	4.57	55 021	4.74
	20	55 400	4.74	111 837	5.05
	21	44 300	4.65	64 065	4.81
统计学分析 (statistical analysis)	均值(mean value)	80 872	4.85	79 235	4.89
	SD	44 840	20 692		
	RSD/%	55.45	26.12		
	几何平均数(geometric mean)	70 795	77 625		
	GSD	0.22	0.11		
	GCV/%	64.43	29.16		

在液体标准品溶瘤活性测定中,经过统计学分析发现,不同实验室间采用标准品校准后的数值和未采用标准品校准的数值差异较大。将 3 家实验室共计 21 次的实验结果进行分析,发现在使用标准品校准后,3 家实验室结果的 GCV 由 64.4% 下降到 29.2%,实验的精密度大幅提升,这也说明在 HSV-1 活性检测中引入标准品校准很有必要。

总之,该批 HSV-1 溶瘤活性测定冻干标准品各

项指标均符合要求,与液体标准品相比更适合作为国家标准品使用,其溶瘤活性赋值为 1.82×10^4 U · 支⁻¹。本候选标准品的研制为 HSV-1 溶瘤活性测定的标准化,获得更稳定、可靠的检测结果奠定了良好的基础。

参考文献

- [1] 王军志. 生物技术药物研究开发和质量控制[M]. 第三版. 北京: 科学出版社, 2017: 908

- WANG JZ. Research, Development and Quality Control of Biopharmaceuticals[M]. 3rd Ed. Beijing: Science Press, 2017: 908
- [2] ZEYULLAH M, PATRO M, AHMAD I, *et al.* Oncolytic viruses in the treatment of cancer: a review of current strategies [J]. *Pathol Oncol Res*, 2012, 18(4):771
- [3] DAI MH, ZAMARIN D, GAO SP, *et al.* Synergistic action of oncolytic herpes simplex virus and radiotherapy in pancreatic cancer cell lines[J]. *Br J Surg*, 2010, 97(9):1385
- [4] WATANABE D. Medical application of herpes simplex virus[J]. *J Dermatol Sci*, 2010, 57(2):75
- [5] COFFIN R. Interview with Robert Coffin, inventor of T-VEC: the first oncolytic immunotherapy approved for the treatment of cancer[J]. *Immunotherapy*, 2016, 8(2):103
- [6] MATTILA RK, HARILA K, KANGAS SM, *et al.* An investigation of herpes simplex virus type 1 latency in a novel mouse dorsal root ganglion model suggests a role for ICP34.5 in reactivation [J]. *J Gen Virol*, 2015, 96(8):2304
- [7] LIPSON EJ, SHARFMAN WH, CHEN S, *et al.* Safety and immunologic correlates of Melanoma GVAX, a GM-CSF secreting allogeneic melanoma cell vaccine administered in the adjuvant setting[J]. *J Transl Med*, 2015, 13(1):214
- [8] KOHLHAPP FJ, KAUFMAN HL. Molecular pathway: mechanism of action for talimogene laherparepvec, a new oncolytic virus immunotherapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(5):1048
- [9] SHERIDAN C. First oncolytic virus edges towards approval in surprise vote[J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(6):569
- [10] 李永红. 基因治疗药物的质量控制[G]//2016年生物技术药物理化特性分析与质量研究技术研讨会资料汇编. 北京: 中国药学会, 2016: 1
- LI YH. Quality control of gene therapy drugs[G]//Data Collection of 2016 Technical Seminar on Analysis of Physical and Chemical Properties and Quality Research of Biotechnology Drugs. Beijing: Chinese Pharmaceutical Association, 2016: 1
- [11] 胡金盼, 李永红, 史新昌, 等. U-2 OS 细胞/CCK-8 法测定 1 型单纯疱疹病毒溶瘤活性[J]. *药物分析杂志*, 2020, 40(1):31
- HU JP, LI YH, SHI XC, *et al.* An U-2 OS cells/CCK-8 method for oncolytic activity determination of herpes simplex virus type 1[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2020, 40(1):31
- [12] PALMER DJ, NG P. Physical and infectious titers of helper-dependent adenoviral vectors: a method of direct comparison to the adenovirus reference material[J]. *Mol Ther*, 2004, 10(4):792
- [13] LOCK M, MCGORRAY S, AURICCHIO A, *et al.* Characterization of a recombinant adeno-associated virus type 2 reference standard material[J]. *Hum Gene Ther*, 2010, 21(10):1273
- [14] AYUSO E, BLOUIN V, LOCK M, *et al.* Manufacturing and characterization of a recombinant adeno-associated virus type 8 reference standard material[J]. *Hum Gene Ther*, 2014, 25(11):977
- [15] KOGANTI S, CLARK C, ZHI J, *et al.* Cellular STAT3 functions via PCBP2 to restrain Epstein-Barr Virus lytic activation in B lymphocytes[J]. *J Virol*, 2015, 89(9):5002

(本文于2024年1月31日收到)