

· 基础论著 ·

PEG 修饰长效干扰素血清定量检测方法的建立及评价

陈曦 盛艾娟 贾敏 王美霞 茹莉莉 李星 牛春 刘金毅

【摘要】目的 建立 PEG-IIFNm 血清定量检测方法,用于人体药代动力学研究。**方法** 采用鼠单抗为包被抗体,生物素标记兔多抗为捕获抗体,辣根酶标记亲和素显色,检测血清中不同浓度的 PEG-IIFNm,评价该方法的特异性、灵敏度、准确度和精密度。**结果** 建立双抗体夹心定量检测方法,血清中药物浓度的定量检测范围为 0.25 ~ 10 ng/ml,相关系数 $R^2 = 0.999$,检测准确度为 80.0% ~ 92.0%,批内和批间差均 < 10%,与市售其他 PEG 修饰干扰素无交叉反应。**结论** 已建立血清 PEG-IIFNm 药物浓度双抗体夹心定量检测方法,灵敏度、特异性、精密度以及准确性符合临床药代动力学研究要求。

【关键词】 PEG 修饰; 干扰素; 药代动力学; 双抗体夹心 ELISA

Establishment and evaluation of quantitative detection method for long-acting pegylated interferon in serum CHEN Xi*, SHENG Aijuan, JIA Min, WANG Meixia, RU Lili, LI Xing, NIU Chun, LIU Jinyi.
*National Drug Clinical Trial Agency, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Corresponding author: WANG Meixia, Email: wangmeixiad@163.com

【Abstract】Objective To establish a quantitative detection method for PEG-IIFNm pharmacokinetic studies in human serum. **Methods** The different concentrations of PEG-IIFNm in serum were detected by murine monoclonal antibody as the coating antibody, biotin-labeled rabbit polyclonal antibody as the capturing antibody, horseradish peroxidase-labeled avidin to color, and the specificity, sensitivity, accuracy and precision of the method were evaluated, respectively. **Results** Double antibody sandwich ELISA for drug concentration in serum was established. The quantitation range was 0.25-10 ng/ml, the correlation coefficient $R^2 = 0.999$, detection accuracy was 80.0%-92.0%, intra-assay and inter-assay differences were less than 10%, and there was no cross-reaction with other pegylated-interferon on the market. **Conclusions** The double-antibody sandwich ELISA for PEG-IIFNm concentration in serum was established. The sensitivity, specificity, precision and accuracy of the method could meet the requirements of clinical pharmacokinetic study.

【Key words】 Pegylated; Interferon; Pharmacokinetic; Double-antibody sandwich ELISA

新药的临床药代动力学研究旨在阐明药物在人体内的吸收、分布、代谢和排泄的动态变化规律,是全面认识人体与药物间相互作用不可或缺的重要组成部分,也是临床制定合理用药方案的依据。由于生物样品具有取样量少、药物浓度低、干扰物质多以及个体差异大等特点,因此,必须根据待测物的结构、生物介质和预期的浓度范围,建立灵敏、专一、精确、可靠的生物样品定量分析方法,并对方法进行确证^[1]。聚乙二醇化新型集成干扰素突变体

(PEG-IIFNm)是北京三元基因工程有限公司开发的治疗慢性肝炎新药物。与已上市的进口长效干扰素相比,PEG-IIFNm 兼具半衰期长、比活性高和毒副反应低等优点,已进入临床研究阶段。目前常用干扰素定量检测方法为生物活性法(WISH/VSV 系统),虽可反映药物生物活性,但是存在以下缺点:①灵敏度低,难以满足微量的药代检测要求;②缺乏结构特异性,无法区分不同厂家的同类药物(对照药物);③检测周期长,影响因素多,导致批间变异度大^[2-3]。因此,需建立一种灵敏、特异、稳定和便捷的药物代谢检测新方法,对血清中 PEG-IIFNm 浓度进行测定。本研究采用鼠抗 PEG-IIFNm 单抗和兔抗 PEG-IIFNm 多抗建立双抗体夹心定量 ELISA 法,检测血清中 PEG-IIFNm 浓度并根据药代动力学研究和质量评价要求进行了方法学验证^[1,4-6]。

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2014.06.001

基金项目:“十一五”重大新药创制专项课题(No. 2008ZX09203-007);北京市科委科技计划项目“创新药研究专项”课题(No. D08080200290808)

作者单位:100069 北京,首都医科大学附属北京佑安医院(陈曦、盛艾娟、贾敏、王美霞);北京三元基因工程有限公司(北京市长效干扰素工程技术研究中心)(茹莉莉、李星、牛春、刘金毅)

通讯作者:王美霞,Email: wangmeixiad@163.com

材料与方法

一、试剂

包被抗体鼠抗 PEG-IIFNm 单抗、检测抗体生物素标记兔抗 PEG-IIFNm 多抗均由北京三元基因工程有限公司提供。辣根酶标记亲和素购自 KPL 公司。TMB 底物购自天根生化科技(北京)有限公司。牛血清白蛋白(BSA)购自欣经科生物技术有限公司。

二、PEG-IIFNm 标准品的制备

PEG-IIFNm 标准品由北京三元基因工程有限公司制备,经Lowry定氮法测定蛋白含量为0.3 mg/ml(批号:201303),分装-20℃保存作为同质标准品。

三、配伍抗体的筛选

以不同稀释度鼠抗 PEG-IIFNm 单克隆抗体包被酶标板,加入不同稀释度兔多抗检测抗体,辣根酶标记亲和素为显色系统。通过棋盘法选择阳性样品吸光度值高而阴性样品吸光度值低的一对包被检测抗体浓度,作为最适检测条件。

四、双抗体夹心定量 ELISA 检测方法

鼠抗PEG-IIFNm抗体用0.1 mmol/L pH 9.6的碳酸盐缓冲液稀释至包被浓度,0.1 ml/孔包被96孔酶标板,4℃孵育过夜;洗板后加含2% BSA的PBST封闭液0.12 ml/孔,37℃封闭1 h;PBST洗板后,分别加入标准品和预稀释的待检样品,0.1 ml/孔,37℃孵育2 h;PBST洗板后,加入生物素标记抗PEG-IIFNm兔多抗0.1 ml/孔,37℃孵育1 h;PBST洗板后,加入HRP标记亲和素0.1 ml/孔,37℃孵育1 h;PBST洗板后,加入TMB底物,室温避光显色20 min,加2 mmol/L H₂SO₄ 0.1 ml/孔终止反应,于酶标仪450 nm处测定吸光度(A)值。每次检测每孔均设复孔,用Origin 8.0软件进行曲线拟合和数据计算。

五、标准曲线和定量范围

用基质血清将 PEG-IIFNm 标准品倍比稀释为0.156、0.3125、0.625、1.25、2.5、5 和 10 ng/ml 共

7 个浓度,利用优化好的双抗夹心 ELISA 法条件对系列稀释的标准品进行检测,对 PEG-IIFNm 浓度和吸光度值进行一元二次方程回归,回归方程的相关系数应大于 0.99。

六、灵敏度

最低可检测限(分析灵敏度)通过对空白基质进行多次检测,以检测值(A_{450nm})的均数加3倍标准差所对应的药物浓度做为最低可检测限。

最低定量限(功能灵敏度)通过对检测限附近样品进行分析,以批间精密度的 CV 值≤20%时,对应检测样品具有的最低浓度,作为可定量分析的最低药物浓度。

七、准确度和精密度

制备1.250、2.500、6.250和9.375 ng/ml共4个浓度,每浓度各5批标准品,按建立的方法同时进行5批次样品的检测,计算检测浓度,并计算检测值占真实值的百分比(回收率%)分析方法的准确性。同批实验中每浓度每个样品均检测3次,不同日期连续检测3次,计算批内和批间相对标准差(RSD)表示方法的精密度。

八、特异性

用建立的方法分别检测 PEG-IIFNm 成品配互液、血清基质及两种与 PEG-IIFNm 结构类似的市售 PEG 修饰干扰素(临床对照药),根据交叉反应分析该方法的特异性。

结 果

一、最佳配对抗体浓度

根据棋盘检测结果,最佳鼠抗人单克隆抗体包被液浓度为16 μg/ml,兔多抗检测抗体最佳稀释比例为1:200,见表1~2。

二、标准曲线和定量范围

0、0.156、0.3125、0.625、1.25、2.5、5 和

表1 不同包被浓度检测结果(A值)

抗体浓度(μg/ml)	标准品浓度(ng/ml)					
	0	6.25	12.5	25	50	100
0	0.089	0.089	0.087	0.087	0.085	0.085
8	0.166	0.216	0.253	0.281	0.322	0.355
16	0.180	0.374	0.427	0.539	0.625	0.682

表2 不同稀释倍数生物素标记抗体检测结果(A值)

抗体稀释倍数	标准品浓度(ng/ml)					
	0	6.25	12.5	25	50	100
1:200	0.095	0.661	0.923	1.107	1.220	1.279
1:400	0.082	0.408	0.547	0.648	0.725	0.742
1:800	0.076	0.256	0.346	0.390	0.447	0.454
1:1600	0.076	0.191	0.222	0.253	0.276	0.283

表3 PEG-IIFNm 检测最低定量限的结果

指标	浓度 (ng/ml)							
	1	0.875	0.75	0.625	0.5	0.375	0.25	0.125
AVR	0.800	0.664	0.539	0.423	0.322	0.238	0.181	0.103
STD	0.052	0.035	0.031	0.022	0.039	0.048	0.03	0.046
CV (%)	7	5	6	5	12	20	16	44

注: AVR: 均数, STD: 标准差, CV: 变异系数

表4 PEG-IIFNm 检测精密度结果

理论值 (ng/ml)	实测值 (批内)		实测值 (批间)	
	$\bar{x} \pm s$ (ng/ml)	CV (%)	$\bar{x} \pm s$ (ng/ml)	CV (%)
9.375	8.4 ± 0.04	0.5	8.4 ± 0.12	1.4
6.25	5.8 ± 0.15	2.5	5.7 ± 0.13	2.2
2.5	2.3 ± 0.07	2.9	2.3 ± 0.17	7.6
1.25	1.0 ± 0.08	8.0	1.0 ± 0.05	5.9

10 ng/ml 共 8 个浓度的标准品, 重复检测 3 次, 以标准品浓度为横坐标, A_{450nm} 为纵坐标, 做拟合曲线如图 1, $R^2 = 0.999$ 。

三、灵敏度

空白基质 (标准曲线 0 点) 3 次检测的 A_{450nm} 值均数加 3 倍标准差, 所对应的浓度分别为 0.171、0.158 和 0.165 ng/ml, 平均值为 0.165 ng/ml。因此, 最低可检测限为 0.165 ng/ml。

对 0.125 ~ 1 ng/ml 范围内系列低浓度样品进行检测, 计算批间变异系数 CV ($STD/AVR \times 100\%$), $CV \leq 20\%$ 时所对应的最小浓度为 0.25 ng/ml, 即最低定量限, 见表 3。

四、准确度和精密度

对 9.375、6.25、2.5 和 1.25 ng/ml 4 个浓度的 PEG-IIFNm 样品进行检测, 回收率分别为 85.9% ~ 95.1%、91.8% ~ 98.0%、92.8% ~ 99.7% 和 84.0% ~ 90.3%, 平均为 88.5%。批间和批内检测的变异系数均小于 10%, 见表 4。

五、特异性

用建立的方法测定 PEG-IIFNm 的结构类似物佩乐能和派罗欣, 检测结果显示在 0.977 ~ 500 ng/ml 浓度范围内, 上述两制品的检测值均低于该方法的最低检测限, 即与结构类似物不存在交叉反应。

讨 论

药代研究的常用方法有: ①色谱法: 气相色谱法 (gas chromatography, GC)、高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC)、色谱-质谱联用法 (LC-MS、LC-MS-MS、GC-MS 和 GC-MS-MS) 等, 可用于大多数小分子药物的检测, 应用最广; ②免疫学方法: 放射免疫分析法、酶免疫分析法和荧光免疫分析法等,

多用于蛋白质多肽类物质检测; ③微生物学方法, 用于抗菌药物的测定^[1]。干扰素具有广谱抗病毒、免疫调节作用, 属于蛋白质多肽类药物, 已广泛应用于病毒性肝炎、肿瘤和其他病毒感染性疾病的治疗中。由于蛋白质多肽类药物循环半衰期短, 易被肾脏清除, 故临床中需频繁给药, 不良反应较多, 患者耐受性及依从性较差。研究表明, 聚乙二醇 (PEG) 修饰后的干扰素 (PEG化干扰素) 在体内半衰期大大延长, 药物注射频率可由每周 3 次减少至每周 1 次, 同时人体中和抗体产生率降低, 治疗效果可望显著提高^[7-9]。但 PEG 修饰在保护干扰素延缓酶解过程的同时, 也遮蔽了药物表面抗原决定簇, 导致修饰后药物与抗体的免疫结合能力下降^[10-12]。研究者前期也尝试了包括抗-PEG 等多种商品化的干扰素免疫检测试剂盒和抗体对, 均难以满足本研究中 PEG 修饰干扰素的药代检测灵敏度的要求。

本实验采用特异性针对 PEG-IIFNm 制备、筛选的抗体对, 建立了双抗体夹心定量检测方法, 用于临床试验受试者血清中 PEG-IIFNm 浓度检测, 并参照临床药代动力学研究技术指导原则对新建的检测方法进行了验证, 证明该方法精密度、准确度、特异性均符合临床生物样本测定的要求。与传统干扰素定量检测方法——生物活性检测方法相比, 两者的检测结果高度一致, 相关系数达到 0.9 以上, 而 ELISA 方法操作简便, 结果重复性好, 灵敏度和检测效率均提高 10 倍以上, 为进行临床药物代谢评价提供了更有力的检测技术支持。

(本文图 1 见光盘)

参 考 文 献

- 1 国家食品药品监督管理局药品审评中心. 化学药物临床药代动力学研究技术指导原则[S]. 2005.
- 2 张水华, 李云富, 张雪涛, 等. 酶标法测定干扰素脂质体的包封率[J]. 中国生物制品学杂志, 2007, 20(7): 525-528.
- 3 赵鸿. 干扰素生物活性两种测定方法的比较研究[J]. 中国医药

- 导报,2010,7(10):36-38.
- 4 贾卉,蔡芳,高强,等. EV71抗原ELISA定量检测方法的建立[J]. 中国生物制品学杂志,2010,23(1):87-90.
- 5 国家食品药品监督管理局药品审评中心. 生物制品质量控制分析方法验证技术审评一般原则[S]. 2007.
- 6 冯仁丰. 分析灵敏度(检测限)[J]. 上海医学检验杂志,2002,17(3):133-136.
- 7 Alexopoulou A, Papatheodoridis GV. Current progress in the treatment of chronic hepatitis C[J]. World J Gastroenterol,2012,18(42):6060-6069.
- 8 Shi Y, Wu YH, Shu ZY, et al. Interferon and lamivudine combination therapy versus lamivudine monotherapy for hepatitis B e antigen-negative hepatitis B treatment: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int,2010,9(5): 462-472.
- 9 Sirohi B, Powles R, Lawrence D, et al. An open, randomized, controlled, phase II, single centre, two-period cross-over study to compare the quality of life and toxicity experienced on PEG-interferon with interferon-alpha 2b in patients with multiple myeloma maintained on a steady dose of interferon-alpha2b[J]. Ann Oncol,2007,18(8):1388-1394.
- 10 杨宇峰,路煜,石玮,等. 聚乙二醇修饰重组人干扰素-1b的制备及其性质[J]. 中国生物制品学杂志,2010,23(6):615-618.
- 11 才蕾,高向东,朱姝,等. 聚乙二醇修饰尿酸酶的研究[J]. 中国药科大学学报,2008,39(6):557-562.
- 12 侯继锋,叶苗. 聚乙二醇修饰的牛血红蛋白血液代用品抗原性和免疫原性的研究[J]. 中国生化药物杂志,2005,26(1):29-31.
- 13 曹进,田泓,高向东. 聚乙二醇修饰对蛋白质类药物药代动力学的影响及相关的药动学研究方法[J]. 药学进展,2008,32(9):407-411.
- (收稿日期: 2014-04-23)
(本文编辑: 孙荣华)

陈曦,盛艾娟,贾敏,等. PEG修饰长效干扰素血清定量检测方法的建立及评价[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2014, 8 (6): 747-750.

· 会议纪要 ·

2014 年医学电子出版物编辑业务培训班纪要

2014 年 10 月 17 ~ 23 日, 中华医学会电子版系列杂志的总编、编辑部主任及编辑同行共 70 余人来到美丽的山城重庆, 参加中华医学电子音像出版社举办的“2014 年度医学电子出版物编辑业务培训班”, 学习编辑出版业务知识, 交流医学电子杂志的办刊特点和经验, 探讨新形势下发展和经营面临的问题及应对策略。

培训班开幕式由中华医学电子音像出版社史红社长主持。中华医学会罗玲副秘书长致开幕辞, 中华医学会电子版系列杂志发展迅速, 经过 10 余年努力, 已成为中华医学会系列杂志的重要组成部分, 现有 41 种电子版杂志, 其中 14 种被收录为中国科技论文统计源期刊, 成绩喜人。电子版杂志代表了未来期刊编辑出版的发展方向, 中华医学会对电子版系列杂志寄望甚高, 希望大家不仅要做好编辑本职工作, 还要始终把握数字出版的前沿和方向, 与时俱进、勇于创新、凝聚共识、共同努力, 开创中华医学会电子版系列杂志的新局面。此次编辑业务培训班得到第三军医大学附属新桥医院的大力支持, 徐剑铖副院长到会并致欢迎辞。

中国高校精品科技期刊《第三军医大学学报》编辑部主任冷怀明编审作了《学术期刊健康发展与科技期刊学术影响力提升》的报告, 从国家新闻出版广电总局对学术期刊的要求出发, 对学术期刊的健康发展进行了思考和梳理, 并结合《第三军医大学学报》的实际情况和经验, 对提升学术影响力提出一些建议。他指出, 编辑的努力不等于读者的认可, 建议编辑工作重心从编辑加工为主向策划编辑为主转型, 重视组稿约稿工作; 当前大环境下, 数字化出版和移动端阅读高速发展, 编辑要具有危机意识, 不断思考、学习和实践, 力争成为复合型编辑人才; 学术界存在“以刊论文, 以刊论人”的现象, 不仅使大量优秀论文外流, 国内期刊有价值的论文越来越少, 而且导致编辑整天围着数据库转, 只盯影响因子, 在一定程度上放松了对内容的把控, 学术不端防不胜防。要想提升科技期刊学术影响力, 必须关注学科前沿热点, 明确办刊定位, 严格执行同行评议, 吸引优质稿件; 为读者提供增值服务, 扩大期刊影响, 培养优秀团队, 提高办刊水平。

针对期刊编辑工作的核心能力, 即策划、组稿和审稿问题, 《中华乳腺病杂志(电子版)》总编辑, 也是第三军医大学西南医院乳腺外科主任姜军教授作了精彩的专题报告——《选题策划、组稿与审稿》。姜军教授是知名的乳腺病学专家, 他从一名学者的角度讲述了《中华乳腺病杂志(电子版)》的实践经验, 以及他对审稿组稿的独到见解, 向我们展示了独特的办刊理念。《中华乳腺病杂志(电子版)》通过历年重点选题打造学科理论体系, 紧跟国际学术前沿和热点, 对本学科领域的核心问题、重大研究成果、学术创新、临床新技术、临床争议、学术争鸣做重点策划, 经过几年的组稿约稿, 刊登稿件基本涵盖了本学科各领域的各类研究。他还总结了在审稿中的常见问题, 以丰富的医学知识和严谨的科学态度, 高屋建瓴地分析了学术文章中的普遍问题, 用详实的例子告诉大家, 如何在审稿中去伪存真、去粗取精, 如何鼓励作者、关

下转第 9 页