

定量 PCR 法和 DNA 杂交法检测聚乙二醇修饰尿酸酶原液中 DNA 残留量的比较

霍晶晶, 武小琪, 郭勇, 姚继鹏, 张淳* (临沂大学药学院, 山东 临沂 276000)

摘要: 目的 建立快速准确的聚乙二醇修饰重组尿酸酶(PEGylated uricase, PEG-UHC)原液 DNA 残留量测定法, 为其他多位点 PEG 修饰蛋白药物的 DNA 残留量检测提供参考。方法 参照中国药典 2020 年版三部“外源性 DNA 残留量检测法”第一法 DNA 探针杂交法和第三法定量 PCR 法, 检测 PEG-UHC 原液 DNA 残留量; 对定量 PCR 法进行检测限度、线性范围、准确度和精密度等方法学验证; 进行 3 批次 PEG-UHC 原液 DNA 残留量测定。结果 探针杂交法 DNA 残留量测定线性范围为 1×10^{-4} ~ $0.1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 3 批次 PEG-UHC 原液未见明显显色, DNA 残留量均低于每剂 10 ng。PCR 法检测限度为 $1 \times 10^{-5} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, DNA 浓度在 1×10^{-4} ~ $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 内线性关系良好($R^2=0.999$)。不同浓度的标准 DNA 在 PEG-UHC 原液中的回收率范围为 92.57%~114.17%, 表明 PEG 偶联物对定量 PCR 影响较小。3 批次 PEG-UHC 原液中 DNA 残留量分别为每剂 0.143, 0.187, 0.154 ng, 符合国家药品监督管理局限量要求。结论 DNA 探针杂交法为传统定性检测, 耗时较长, 准确度较低。定量 PCR 法操作简便快速、灵敏度高, 且可定量分析, 适于 PEG-UHC 等多位点 PEG 修饰蛋白药物 DNA 残留量测定。

关键词: DNA 残留量; 定量 PCR 法; 探针杂交法; PEG 修饰尿酸酶

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2022)14-1868-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.14.012

引用本文: 霍晶晶, 武小琪, 郭勇, 等. 定量 PCR 法和 DNA 杂交法检测聚乙二醇修饰尿酸酶原液中 DNA 残留量的比较[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(14): 1868-1873.

Comparison of Quantitative PCR and DNA Hybridization for Detection of Residual DNA in PEGylated Uricase Stock Solution

HUO Jingjing, WU Xiaoqi, GUO Yong, YAO Jipeng, ZHANG Chun* (School of Pharmacy, Linyi University, Linyi 276000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop fast and accurate method for determining the residual DNA in PEGylated uricase (PEG-UHC) stock solution, and provide reference values for residual DNA quantification in other multiple-sites PEGylated protein drugs. **METHODS** The Quantitative PCR and DNA hybridization methods were used to determine the residual DNA based on “Exogenous residual DNA testing methods” in Chinese Pharmacopoeia 2020 edition Vol III. The detection limit, linearity, range, accuracy and precision of the quantitative PCR method were further evaluated. The residual DNA in three batches of PEG-UHC stock solution were determined by the above two methods. **RESULTS** The concentration ranges of DNA hybridization assay were 1×10^{-4} ~ $0.1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, and there were no coloration upon the addition of PEG-UHC stock solution, indicating the quantities of residual DNA were below 10 ng per does in the three batches. The developed quantitative PCR had high detection limit up to $1 \times 10^{-5} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ of DNA with good linearity($R^2=0.999$) in the concentration range of 1×10^{-4} ~ $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. The recoveries by adding different concentrations of standard DNA to PEG-UHC solution were 92.57%~114.17%, indicating no interference with PEG-UHC. The residual DNA of three batches of PEG-UHC stock solution was 0.143, 0.187, 0.154 ng per dose, respectively. All the contents met the National Medical Products Administration requirements for residual DNA. **CONCLUSION** The DNA hybridization assay is traditional qualitative methods, suffering from drawbacks of long time-consuming and low accuracy. The quantitative PCR assay has advantages of simple operation, high sensitivity, and can be used for quantitative analysis of residual DNA in multiple-sites PEGylated protein drugs.

KEYWORDS: residual DNA; quantitative PCR; DNA hybridization; PEGylated uricase

高尿酸血症和痛风是严重危害人类健康的重大疾病^[1]。现有治疗药物仅能从消炎止痛和抑制尿酸生成等方面来控制此类疾病的发作及病情恶

化, 无法达到根治的目的。尿酸酶(EC 1.7.3.3)可将微溶性尿酸氧化为易溶性尿囊素, 已用于治疗高尿酸血症及痛风^[2]。目前国内无任何尿酸酶类药

基金项目: 山东省重点研发计划(2018GSF121017); 日照市科技创新专项(2019CXZX1205); 大学生创新创业训练计划项目(X202110452211)

作者简介: 霍晶晶, 女, 硕士生 E-mail: huojingjing3566@163.com

*通信作者: 张淳, 男, 博士, 教授 E-mail: zhangchun@lyu.edu.cn

物上市,国际上已上市的尿酸酶类药物有2002年美国食品药品监督管理局(FDA)批准的重组黄曲霉源尿酸酶^[3]和2010年批准的聚乙二醇(PEG)修饰重组猪源尿酸酶^[4]。前者因免疫原性高、半衰期短等原因,只能用于急性高尿酸血症的短期治疗;后者为长效蛋白药物,具有快速消融痛风石的独特功效,被誉为顽固性痛风的突破性治疗药物。

PEG是一种惰性多聚物,经特异性活化后可与蛋白多肽共价偶联,具有提高蛋白稳定性、延长体内半衰期和降低免疫原性等作用^[5]。截至2020年,FDA已批准上市24个PEG修饰蛋白药物^[6],市场规模超过80亿美元^[7],其中代表性药物包括PEG修饰重组人粒细胞集落刺激因子、PEG修饰重组人红细胞生成素(PEG-epoetin beta)等。截至2020年,国家药品监督管理局已批准6种PEG修饰药物上市,现有约30家医药企业申报PEG修饰药物临床试验。

本课题组已开展PEG修饰重组尿酸酶(PEGylated uricase, PEG-UHC)的临床前研究^[8-11],前期研究表明每个尿酸酶蛋白平均偶联9~11个5 kDa的PEG分子^[12]。PEG修饰不仅掩盖了蛋白多肽的抗原决定簇,还封闭、改变了其电荷性质和疏水性,使其由结构单一的生物分子转变为含化学多聚物的生物偶联物,增加了药物质量研究的难度。Gong等^[13]发现PEG会干扰Lowry法测定蛋白含量;Zheng等^[14]发现PEG会与SDS反应,干扰SDS-PAGE法测定蛋白纯度;本课题组发现PEG会干扰毛细管泳动,利用常规区带毛细管电泳法无法准确测定PEG-UHC蛋白的PEG修饰度^[15]。

DNA残留量是生物制品常规质量检测指标,中国药典2020年版规定DNA残留量不得超过每剂10 ng^[16]。常规测定法包括DNA探针杂交法^[17]和荧光染色法^[18]。前者步骤繁琐、实验周期较长;后者特异性差、检测灵敏度较低,且2种方法均无法进行DNA残留量定量测定。定量PCR技术是新发展的DNA定量检测技术,已被中国药典2020年版三部收录,具有快速、灵敏、可定量等优点^[19]。目前尚未有对PEG偶联物干扰DNA残留量测定的研究。

本研究基于定量PCR技术开发快速、准确的DNA残留量测定法,进行PEG偶联物干扰分析,并与前期已建立的DNA探针杂交法进行比较研究,更新PEG-UHC原液DNA残留量检测法,对

3批次原液进行DNA残留量测定,为其他多位点PEG修饰蛋白药物的DNA残留量检测提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Slot Blot Manifold 印迹系统(美国GE公司); 荧光定量PCR仪(德国Eppendorf公司)。

1.2 试剂与试剂

供试品:3批次PEG-UHC原液(临沂大学药学院,批号:200307,200404,200423);大肠杆菌重组菌种[临沂大学药学院,编号:pET3c-UHC/BL₂₁Star(DE₃)pLysS]。

Genomic DNA Purification Kit(美国Promega公司,批号:0000319398);DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I(瑞士Roche公司,批号:11745832910);Real Master Mix (SYBR Green)[天根生化科技(北京)有限公司,批号:O0415]。

2 方法与结果

2.1 DNA探针杂交法

2.1.1 阳性对照DNA制备 取菌种pET3c-UHC/BL₂₁Star(DE₃)pLysS接种于5 mL LB培养基中,37℃振荡培养过夜。离心收集菌体,用Genomic DNA Purification Kit提取宿主基因组DNA,利用紫外分光光度法测定浓度。将基因组DNA用灭菌水稀释成浓度为100,10,1,1×10⁻¹,1×10⁻²,1×10⁻³,1×10⁻⁴,1×10⁻⁵ ng·μL⁻¹的定量标准品,于-20℃保存。

2.1.2 探针标记及标记效率检测 按DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I试剂盒使用说明书进行探针标记。取1 μg阳性对照DNA至PCR扩增管中,加超纯水至16 μL,超声处理30 min,沸水浴10 min后,立即冰浴10 min变性。取DIG-High Prime (viaL1) 4 μL加入变性DNA中,混匀,于37℃保温过夜。混合液分别加入EDTA溶液(0.2 mol·L⁻¹,pH 8.0)2 μL,氯化锂溶液(4 mol·L⁻¹)2.5 μL,再加入75 μL冰乙醇,于-20℃孵育2 h。13 000 r·min⁻¹离心15 min,弃去上清,取100 μL 70%乙醇清洗沉淀,风干。加入50 μL TE(Tris+EDTA缓冲液)溶解上述沉淀,即得纯化的探针。

将标记的探针和阳性对照DIG-labeled control DNA(ViaL2)分别以注射用水稀释,制成浓度为10³,10²,10¹,1,10⁻¹,10⁻² ng·mL⁻¹的溶液,阴

性对照为注射用水。分别取各浓度溶液 1 μL 点膜, 120 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤 30 min。经孵化, 封闭, 免疫, 洗膜和平衡后, 将膜放入 NBT/BCIP 碱性磷酸酶显色试剂中, 静置, 避光显色, 1~2 h 后观察结果, 用无菌超纯水洗膜 5 min 来终止反应。比较各样品显色的深浅, 判别标记效率。自制探针标记效率与试剂盒自带阳性探针标记效率基本一致, 可用于后续 PEG-UHC 原液中的宿主菌 DNA 残留量测定, 结果见图 1。

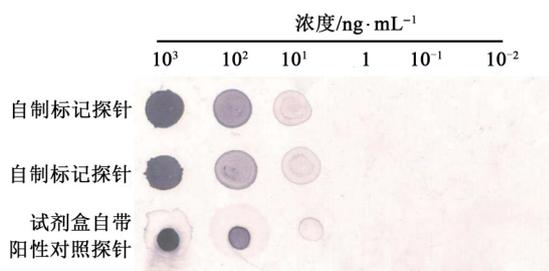


图 1 探针标记效率检测图

Fig. 1 Detection of probe labeling efficiency

2.1.3 PEG-UHC 原液 DNA 残留量测定 用注射用水分别将 3 批次 PEG-UHC 原液稀释至 4.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 此时每 100 μL 含 1/10 人份剂量(人拟用剂量为 4.0 mg)。阳性 DNA 对照以注射用水稀释, 制成浓度分别为 100, 10, 1, 0.1 $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的溶液, 阴性对照为注射用水。经蛋白酶 K 预处理后, 用 DNA 纯化试剂盒重新回收 DNA。将回收后的原液、阴性对照、阳性对照分别进行点膜, 杂交及显色后, 通过比对阳性对照与样品的显色深浅, 从而判定样品中外源性 DNA 的含量。不同浓度阳性 DNA 标准液的显色程度随着浓度的降低而降低, 阴性对照不显色。3 批 PEG-UHC 原液均未见明显显色, 表明 3 批 PEG-UHC 原液中宿主菌 DNA 残留量均 $<10 \text{ ng}\cdot(4.0 \text{ mg})^{-1}$, 批间一致, 符合生物制品的限量要求, 结果见图 2。

2.2 定量 PCR 法

2.2.1 定量 PCR 检测方法 根据大肠杆菌 23S 核糖体 RNA 基因(GenBank accession number V00331, GI42756)设计大肠杆菌基因组特异性引物, 引物序列如下 Prime23S-sense (5'-GTCTGGAAAGGCGCGCGA-3') 和 Prime23S-antisense(5'-GTGTCCCGCCCTACTCA-3'), 引物序列由宝生物工程(大连)有限公司合成。

取 1 μL 基因组 DNA 标准品为模板, 以 Prime23S-sense 和 Prime23S-antisense 为引物, 在

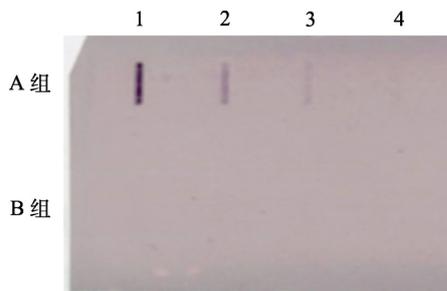


图 2 PEG-UHC 原液 DNA 残留量探针杂交法测定结果

A 组: 1-100 $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; 2-10 $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; 3-1 $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; 4-0.1 $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。B 组: 1-空白对照; 2-200307 批; 3-200404 批; 4-200423 批。

Fig. 2 Detection of residual DNA in PEG-UHC stock solution by hybridization probe assays

Group A: 1-100 $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; 2-10 $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; 3-1 $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; 4-0.1 $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。Group B: 1-blank control; 2-batche of 200307; 3-batche of 200404; 4-batche of 200423.

定量 PCR 仪中进行扩增, 实时检测荧光强度。定量 PCR 反应体系: Power SYBR Green PCR Master Mix(2 \times)12.5 μL , 引物(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各 0.4 μL , 基因组 DNA 标准品 1 μL , ddH₂O(sterilized) 10.7 μL 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 激活 Taq 聚合酶; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火和 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 循环 40 次。检测器在每次退火-延伸步骤(60 $^{\circ}\text{C}$)时被激活, 进行荧光检测。

2.2.2 引物特异性验证 按“2.1.1”项下方法配制不同浓度的标准 DNA, 根据“2.2.1”项下方法进行标准 DNA 定量曲线的 PCR 反应体系扩增, 扩增完毕后做熔解曲线, 若无杂峰则说明设计的引物特异性较好。不同浓度 DNA 标准品均显示明显的特异峰值, 且无非特异性扩增的杂峰及引物二聚体的低矮小峰, 证明了本引物的特异性良好, 结果见图 3。

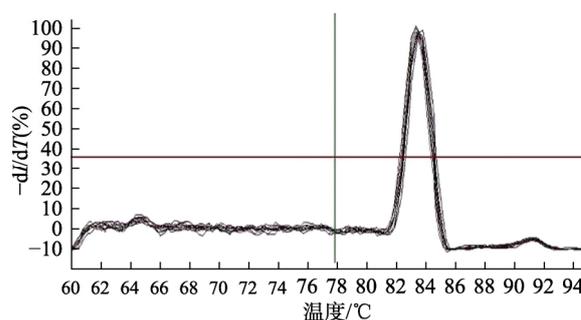


图 3 熔解曲线

Fig. 3 Melting curve

2.2.3 检测限验证 按“2.2.1”项下方法进行标准 DNA 的 PCR 反应体系的扩增, 制备实时定量 PCR 扩增曲线, 测定标准 DNA 最低定量浓度。扩增曲线光滑平稳, 峰值较高, 且指数增长期、线

性增长期及平台期明显, 扩增效率较高, 符合定量检测要求。在 $1 \times 10^{-5} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 浓度下曲线完好, 表明本方法检测大肠杆菌 BL₂₁Star (DE₃) pLysS 基因组 DNA 曲线检测限度可达到 $1 \times 10^{-5} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 结果见图 4。

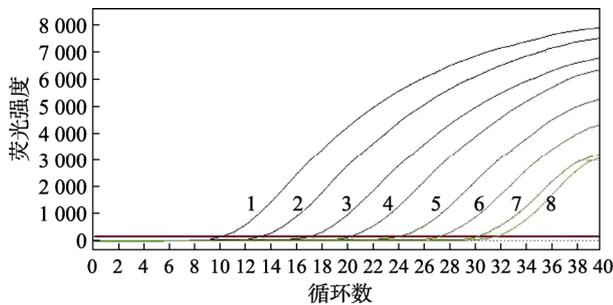


图 4 定量 PCR 标准品扩增曲线

1~8-DNA 标准品浓度分别为 100, 10, 1, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , $10^{-5} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

Fig. 4 Amplification curve of quantity PCR standard

1~8-DNA standard concentrations were 100, 10, 1, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , $10^{-5} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

2.2.4 定量检测范围测定 将 $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的标准 DNA 用灭菌水 10 倍系列稀释至 $1 \times 10^{-4} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 浓度范围 $1 \times 10^{-4} \sim 100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 以不同浓度标准 DNA 为 PCR 反应模板按“2.2.1”项下方法进行定量 PCR 扩增, 实验重复 3 次, 检测精密度。进行数据分析, 确定标准 DNA 的线性范围。标准 DNA 浓度在 $1 \times 10^{-4} \sim 100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 内精密度和线性关系良好。标准曲线斜率为 -3.475, 截距为 16.93, 相关系数为 0.999。循环阈值(*C_t*)与标准 DNA 浓度(*C*)之间的线性关系曲线表达式为 $C_t = -3.475 \times \text{Log}C + 16.93$, 结果见表 1。

表 1 标准 DNA 精密度(*n*=3)

Tab. 1 Precision of standard DNA (*n*=3)

标准 DNA/ $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	循环阈值(<i>C_t</i>)				RSD/%
	1	2	3	$\bar{x} \pm s$	
100	10.21	9.89	10.05	10.05 ± 0.16	1.59
10	13.19	13.31	13.15	13.22 ± 0.08	0.63
1	17.04	16.89	16.95	16.96 ± 0.08	0.45
0.1	20.32	20.41	20.45	20.40 ± 0.07	0.33
0.01	24.20	24.35	24.26	24.27 ± 0.08	0.31
0.001	27.14	27.08	27.33	27.18 ± 0.13	0.48
1×10^{-4}	31.02	30.29	30.91	30.74 ± 0.39	1.28

2.2.5 准确度与精密度 取 PEG-UHC 原液(批号: 200307) $1 \mu\text{L}$ 用灭菌水稀释至 $6.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 将其作为 PCR 反应模板, 平行实验 3 孔。将标准 DNA 从 $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 以 10 倍系列稀释至 $1 \times 10^{-4} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,

分别取 $1 \mu\text{L}$ 标准 DNA, 加 $1 \mu\text{L}$ $6.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 样品作为 PCR 反应模板, 每个浓度平行加样 3 孔, 按“2.2.1”项下方法进行定量 PCR 扩增。用公式“回收率=(加标样品测定值-样品测定值)/标准 DNA 理论值 $\times 100\%$ ”计算 DNA 回收率, 验证方法的准确性。不同浓度加标样品均测定 3 次, 计算相对标准偏差(RSD), 验证方法的精密度。PEG-UHC 原液中 DNA 残留量为 $(0.215 \pm 0.027) \times 10^{-3} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, RSD 为 12.59%。不同浓度标准 DNA 在 PEG-UHC 原液中的回收率在 92.57%~114.17%内, RSD 均 <15%, 表明准确度与精密度良好, 结果见表 2。

表 2 不同加标量样品的回收率(*n*=3)

Tab. 2 Recovery of adding different amount of samples (*n*=3)

DNA 加标浓度/ $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	测得值/ $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
100	87.300	87.30	92.57	5.14
	93.861	93.86		
	96.539	96.54		
10	11.396	114.07	107.63	8.69
	11.202	96.91		
	9.690	111.91		
1	1.007	100.68	97.21	8.45
	1.031	103.08		
	0.879	87.88		
0.1	0.097	96.79	103.12	9.74
	0.114	113.79		
	0.099	98.79		
0.01	9.763×10^{-3}	95.48	93.82	2.14
	9.367×10^{-3}	91.52		
	9.660×10^{-3}	94.45		
0.001	1.386×10^{-3}	117.10	114.17	1.85
	1.340×10^{-3}	112.68		
	1.346×10^{-3}	112.72		
1×10^{-4}	0.365×10^{-3}	150.00	113.67	9.83
	0.313×10^{-3}	98.00		
	0.308×10^{-3}	93.00		

2.2.6 PEG-UHC 原液 DNA 残留量测定 将 3 批次 PEG-UHC 原液用灭菌水分别稀释至 $6.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 将其作为 PCR 反应模板, 平行实验 3 孔, 按“2.2.1”项下方法进行定量 PCR 扩增, 分析结果。根据其人用最大量使用剂量, 利用公式“外源 DNA 残留量=DNA 含量 \times 成品最大剂量/原液蛋白含量”计算 PEG-UHC 原液 DNA 残留量, 结果见表 3。

表 3 PEG-UHC 原液 DNA 含量测定结果($n=3$)Tab. 3 DNA content determination results of PEG-UHC stock solution($n=3$)

样品批号	每剂成品剂量/mg	原液蛋白含量/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	样品		每剂 DNA 残留量/ng
			DNA 含量/ $\times 10^{-3}\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	RSD/%	
200307	4.0	6.0	0.215 \pm 0.027	12.59	0.143
200404	4.0	6.0	0.280 \pm 0.042	14.86	0.187
200423	4.0	6.0	0.230 \pm 0.017	7.22	0.154

3 讨论

各种生物制品均提纯自微生物、细胞及各种动物的组织和液体等生物材料。生物材料残余 DNA 是生物制品主要杂质之一,存在潜在的传染性或致癌风险,是生物制品必检残留物之一。世界卫生组织、欧洲药物评审组织和国家药品监督管理局规定 DNA 残留量不得超过每剂 10 ng,美国 FDA 规定 DNA 残留量不得超过每剂 100 pg^[20]。随着科技进步,生物制品 DNA 残留量标准将越来越高,对相应检测技术提出更高要求。中国药典 2015 年版“外源性 DNA 残留量检测法”仅收录了 DNA 探针杂交法和荧光染色法,此两法均无法进行 DNA 残留量快速、精准、定量测定。中国药典 2020 年版新收录了定量 PCR 法,为生物制品 DNA 残留量快速定量检测提供了新的指导方案。

本研究首先按照传统 DNA 探针杂交法对 PEG-UHC 原液中的 DNA 残留量进行检测,4 个不同浓度阳性 DNA 标准液的显色程度随着浓度的降低而降低,且阴性空白对照不显色,表明 DNA 探针杂交法特异性良好,检测范围在 $1\times 10^{-4}\sim 0.1\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。然而,探针杂交法为半定量检测法,无法准确确定检测限度及线性范围。本研究参考中国药典 2020 年版,对定量 PCR 法的引物特异性、检测限度、线性、准确度和精密度进行了方法学验证。定量 PCR 法检测限度为 $1\times 10^{-5}\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,DNA 浓度在 $1\times 10^{-4}\sim 100\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 内线性良好($R^2=0.999$)。定量 PCR 法线性定量限度($1\times 10^{-4}\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)与探针杂交法检测范围最低值相近,且可进行定量检测,为制备工艺优化及产品质量标准的提高奠定了基础。

未修饰 UHC 蛋白单体分子量约 34 kDa,偶联 9~11 个分子量为 5 kDa 的 PEG 分子后,PEG-UHC 单体总分子量可达 80~90 kDa,PEG 分子质量占比已超过 UHC 蛋白,其质量研究难度远高于常规生物蛋白药物。本研究将多个不同浓度标准 DNA 加

入 PEG-UHC 原液中进行定量 PCR 检测,不同浓度的标准 DNA 在 PEG-UHC 原液中的回收率范围为 92.57%~114.17%,表明 PEG 偶联物对定量 PCR 影响较小。定量 PCR 法可用于多位点 PEG 修饰蛋白药物的 DNA 残留量检测。

利用定量 PCR 法检测,3 批次 PEG-UHC 蛋白原液中的 DNA 残留量介于每剂 0.143~0.187 ng,远低于国家药品监督管理局规定的 DNA 残留量不得超过每剂 10 ng 标准要求,但尚未达到美国 FDA 规定的 DNA 残留量不得超过每剂 100 pg 要求。本研究 PEG-UHC 蛋白为具有独立知识产权的生物制品 I 类新药,目前处于临床前研究阶段,已申请国际专利 2 项^[21-22],获中国发明专利授权 2 项^[23-24],美国发明专利授权 1 项^[25]。基于定量 PCR 检测优化 PEG-UHC 蛋白制备工艺,达到不同国家药监部门质量要求,为打开国际市场奠定基础。

REFERENCES

- [1] BUTLER F, ALGHUBAYSHI A, ROMAN Y. The epidemiology and genetics of hyperuricemia and gout across major racial groups: A literature review and population genetics secondary database analysis[J]. *J Pers Med*, 2021, 11(3): 231.
- [2] PILLINGER M H, MANDELL B F. Therapeutic approaches in the treatment of gout[J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2020, 50(3): S24-S30.
- [3] ALAKEL N, MIDDEKE J M, SCHETELIG J, et al. Prevention and treatment of tumor *Lysis* syndrome, and the efficacy and role of rasburicase[J]. *Onco Targets Ther*, 2017(10): 597-605.
- [4] CUNHA R N, AGUIAR R, FARINHA F. Impact of pegloticase on patient outcomes in refractory gout: Current perspectives[J]. *Open Access Rheumatol*, 2018(10): 141-149.
- [5] TORRES-OBREQUE K M, MENEGUETTI G P, MUSO-CACHUMBA J J, et al. Building better biobetters: From fundamentals to industrial application[J]. *Drug Discov Today*, 2021. Doi: 10.1016/j.drudis.2021.08.009.
- [6] FDA Approved PEGylated Drugs Up To 2021[EB/OL]. 2019-08-20. <https://www.biochempeg.com/article/58.html>.
- [7] SANTOS J H P M, TORRES-OBREQUE K M, MENEGUETTI G P, et al. Protein PEGylation for the design of biobetters: From reaction to purification processes[J]. *Braz J Pharm Sci*, 2018, 54(spe). Doi: 10.1590/s2175-97902018000001009.
- [8] LI H G, HUO J J, SUN D, et al. Pharmacokinetics of polyethylene glycol-modified canine uricase following single and multiple intravenous injections in cynomolgus monkeys[J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2020, 45(4): 445-451.
- [9] ZHANG C, FAN K, LUO H, et al. Species and sex differences in the blood clearance and immunogenicity of PEGylated

- uricase: A comparative 26-week toxicity study in rats and monkeys[J]. *Life Sci*, 2020(255): 116892. Doi: 10.1016/j.lfs.2019.116892.
- [10] ZHANG C, FAN K, MA X F, et al. Impact of large aggregated uricases and PEG diol on accelerated blood clearance of PEGylated canine uricase[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39659. Doi: 10.1371/journal.pone.0039659.
- [11] ZHANG C, FAN K, ZHANG W T, et al. Structure-based characterization of canine-human chimeric uricases and its evolutionary implications[J]. *Biochimie*, 2012, 94(6): 1412-1420.
- [12] ZHANG C, FAN K, LUO H, et al. Characterization, efficacy, pharmacokinetics, and biodistribution of 5kDa mPEG modified tetrameric canine uricase variant[J]. *Int J Pharm*, 2012, 430(1/2): 307-317.
- [13] GONG X W, WEI D Z, HE M L, et al. Lowry method for the determination of pegylated proteins: The error, its reason, and a method for eliminating it[J]. *Anal Biochem*, 2006, 354(1): 157-158.
- [14] ZHENG C Y, MA G, SU Z. Native PAGE eliminates the problem of PEG-SDS interaction in SDS-PAGE and provides an alternative to HPLC in characterization of protein PEGylation[J]. *Electrophoresis*, 2007, 28(16): 2801-2807.
- [15] LI H G, HUO J J, SUN D, et al. Determination of PEGylation homogeneity of polyethylene glycol-modified canine uricase[J]. *Electrophoresis*, 2021, 42(6): 693-699.
- [16] 中国药典. 三部[S]. 2020: 555-558.
- [17] LIU Y, ZHANG C Q, LIU Y L, et al. Comparison of QPCR and DNA probe hybridization in determination of residual DNA in recombinant human growth hormone[J]. *Chin J Biol(中国生物制品学杂志)*, 2019, 32(2): 199-202.
- [18] WANG Y, SCHELLENBERG H, WALHORN V, et al. Binding mechanism of PicoGreen to DNA characterized by magnetic tweezers and fluorescence spectroscopy[J]. *Eur Biophys J*, 2017, 46(6): 561-566.
- [19] GEETHA D K N, SIVARAMAN B, RAMMOHAN R, et al. A SYBR Green based multiplex Real-Time PCR assay for rapid detection and differentiation of ocular bacterial pathogens[J]. *J Microbiol Methods*, 2020(171): 105875. Doi: 10.1016/j.mimet.2020.105875.
- [20] ZAMANIAN S, MOHAMMADI-YEGANEH S, KIA V, et al. Design and validation of a new method to detect and quantify residual host cell DNA in human recombinant erythropoietin (rEPO)[J]. *Prep Biochem Biotechnol*, 2017, 47(9): 847-851.
- [21] FAN K, ZHANG C, MA X F, et al. Humanized recombinant uricase and mutants thereof: WO 2011/050599A1[P]. 2011-05-05.
- [22] ZHANG C, FAN K, MA X F, et al. Pegylated analogue protein or canine urate oxidase, preparation method and use thereof: WO 2012/109975A1[P]. 2012-08-23.
- [23] 范开, 张淳, 马雪丰, 等. 人源化重组尿酸酶及其突变体: ZL200910191240.3[P]. 2009-10-27.
- [24] 张淳, 范开, 马雪丰, 等. 聚乙二醇化犬源尿酸氧化酶类似物及其制备方法和应用: ZL201110037301.8[P]. 2015-06-10.
- [25] FAN K, ZHANG C, MA X F, et al. Humanized recombinant uricase and mutants thereof: US8586535[P]. 2013-11-19.

收稿日期: 2021-04-19
(本文责编: 蔡珊珊)