

• 论著 •

冻干重组结核杆菌融合蛋白(EC)原液效力评价
用国家参考品的初步建立

都伟欣 韦芬 卢锦标 赵爱华 蒲江 王国治 徐苗

【摘要】 目的 以冻干重组结核杆菌融合蛋白(EC)[该制品名称是国家药典委员会确定的药品中文通用名称,“EC”为重组融合蛋白“结核分枝杆菌早期分泌性抗原靶 6(ESAT-6)和培养滤液蛋白 10(CFP-10)”](以下简称“EC”)原液为原材料,研制 EC 变态反应原液效力评价用国家参考品。**方法** 以电泳法、高效液相色谱法分别测定备选 EC 原液纯度,纯度合格后经精密称量、分装、冻干制成候选国家参考品,再测定其蛋白质和水分含量。将候选国家参考品稀释成不同稀释度后,皮内注射结核分枝杆菌活菌致敏的豚鼠,根据皮肤试验硬结或红晕反应平均直径大小(简称“反应平均直径大小”)结果探索原液效价测定的适宜稀释度。在此基础上,将候选国家参考品用于 EC 原液的效价测定并进行方法验证,初步评价其适用性能。研究还初步观察了候选品在-20℃放置 24 个月的稳定性。**结果** EC 原液电泳法纯度为 100.00%,高效液相色谱法纯度为 95.33%,候选国家参考品蛋白质含量为 508 μg/瓶,水分含量为 1.57%,分装精度控制在±1%以内。稀释度探索结果显示:候选品稀释度为 2.5 μg/ml (12.5 U/ml)、5 μg/ml (25 U/ml) 和 10 μg/ml (50 U/ml) 时剂量对数反应平均直径大小曲线有良好的线性关系($R^2=0.9944$),可作为后续研究的适宜稀释度。将候选国家参考品用于 EC 原液效价测定,两者剂量对数反应平均直径大小曲线趋势基本一致($R^2=0.9878$, $R^2=0.9643$),且每个稀释度 EC 原液与相应稀释度候选国家参考品反应平均直径大小的比值均满足 1.0 ± 0.2 。方法验证结果显示:候选国家参考品和 EC 原液的剂量对数反应平均直径大小曲线趋势基本一致($R^2=0.9999$, $R^2=0.9815$),且两者相应稀释度反应平均直径大小的比值均满足 1.0 ± 0.2 ,方法可行。初步稳定性研究结果显示:-20℃放置 24 个月的候选国家参考品效价测定性能稳定。**结论** 候选国家参考品的纯度、蛋白质含量、水分含量及均匀性检测均符合国家参考品质量要求,将其稀释到适宜稀释度后可用于 EC 原液的效价测定;经方法验证与稳定性观察,显示其性能良好,为国家参考品申报提供了基础。

【关键词】 分枝杆菌, 结核; 重组融合蛋白质类; 冷冻干燥法; 参考标准; 国家参考品; 效价

Preliminary establishment of national reference of the freeze-dried recombinant *Mycobacterium tuberculosis* allergen for the bulk potency evaluation DU Wei-xin, WEI Fen, LU Jin-biao, ZHAO Ai-hua, PU Jiang, WANG Guo-zhi, XU Miao. Division of Tuberculosis Vaccine and Allergen, National Institutes for Food and Drug Control, Key Laboratory of the Ministry of Health for Research on Quality and Standardization of Biotech Products, Beijing 102629, China
Corresponding author: XU Miao, Email: xumiaobj@126.com

【Abstract】 Objective To develop a national reference of the freeze-dried recombinant *Mycobacterium tuberculosis* allergen for the bulk potency evaluation, in which the recombinant *Mycobacterium tuberculosis* fusion protein (EC) (Which is the Chinese generic name of the drug determined by the National Pharmacopoeia Committee, EC stands for recombinant fusion protein 6 kDa early secretory antigenic target (ESAT-6) and 10 kDa culture filtrate protein (CFP-10)) bulk was used as the material. **Methods** The EC bulk with qualified purity determined by electrophoresis and HPLC was weighed, packaged and freeze-dried accurately to make as national reference candidate, and the content of protein and moisture was further verified. The candidate of different dilution was injected into guinea pig infected with live *Mycobacterium tuberculosis*, a proper dilution was designated according to the reaction of skin test. And then the applicability of national reference candidate was evaluated preliminarily



开放科学(资源服务)标识码(OSID)的开放科学计划以二维码为入口,提供丰富的线上扩展功能,包括作者对论文背景的语音介绍、该研究的附加说明、与读者的交互问答、拓展学术圈等。读者“扫一扫”此二维码即可获得上述增值服务。

doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2020.08.009

基金项目:中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务(2019PT310024)

作者单位:102629 北京,中国食品药品检定研究院结核病疫苗和过敏原产品室 中国医学科学院生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室(都伟欣、卢锦标、赵爱华、王国治),生物制品检定所(徐苗);安徽智飞龙科马生物制药有限公司(韦芬、蒲江)

通信作者:徐苗,Email: xumiaobj@126.com

注:都伟欣与韦芬对本研究具有同等贡献,为并列第一作者

through the potency testing of the recombinant EC bulk. Stability of candidate storing in -20°C for 24 months was also evaluated. **Results** The purity of EC stock was 100.00% by electrophoresis, and 95.33% by HPLC. The protein content of national reference candidate was 508 $\mu\text{g}/\text{bottle}$, moisture content was 1.57%, and sub-packaging precision was controlled within $\pm 1\%$. There was a good linear relationship in the dose response curve ($R^2 = 0.9944$) when the dilution of reference candidate was 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (12.5 U/ml), 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (25 U/ml), and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (50 U/ml). Assaying the national reference candidate by EC stock, the trend of both logarithmic reaction curve was corresponding ($R^2 = 0.9878, R^2 = 0.9643$), and ratio met 1.0 ± 0.2 . Method validation showed that the trend of logarithmic reaction curve of national reference candidate and EC bulk was corresponding ($R^2 = 0.9999, R^2 = 0.9815$), and ratio met 1.0 ± 0.2 . The result of stability study showed that national reference candidates were stable when they were kept at -20°C for 24 months. **Conclusion** The candidate meets the demand of national reference in terms of purity, protein content, moisture content and uniformity. It will be possible to be used in the standization of potency assay of the freeze-dried recombinant *Mycobacterium tuberculosis* allergen, in a proper dilution. After method validation and stability evaluation, the candidate shows good performance, which will provide a good basis for the application of national reference

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Recombinant fusion proteins; Freeze drying; Reference standards; National reference panel; Potency assay

重组结核杆菌融合蛋白(EC)[该制品名称是国家药典委员会确定的药品中文通用名称,“EC”为重组融合蛋白“结核分枝杆菌早期分泌性抗原靶 6 (ESAT-6)和培养滤液蛋白 10(CFP-10)”](以下简称“EC”)是由 ESAT-6 和 CFP-10 的基因经融合表达、系列纯化后制备而成的皮肤试验试剂,具有结核分枝杆菌复合群抗原特异性,可将其作为变态反应原用于结核感染筛查^[1-5];或与结核菌素纯蛋白衍生物(PPD)联用,用于鉴别卡介苗接种与结核感染,区分卡介苗接种后阴转或无结核感染、卡介苗接种后维持阳性、结核感染这三类人群;也可用于结核病的临床辅助诊断。因此,该类产品在临床使用中的效价非常关键,但目前 EC 作为新上市的产品,并无相应的国家或国际参考品以评估其原液效价、监测其产品质量。为此,中国食品药品检定研究院开展了冻干 EC 原液效力评价用国家参考品的研制工作,以期规范此类产品效价的检测、促进检定结果的标准化提供支持。

材料和方法

一、原材料

1. 冻干 EC 原液:批号 M20170901;规格为 508 $\mu\text{g}/\text{瓶}$, 1 ml 安瓿瓶;委托安徽智飞龙科马生物制药有限公司制备。该冻干品作为本研究的候选国家参考品。

2. EC 原液:批号 M20101202 和 M20170901,均为液体剂型,由安徽智飞龙科马生物制药有限公司提供。

3. 动物致敏用菌株:结核分枝杆菌 CMCC(B) 93020(H37Ra)活菌菌液,浓度 2 mg/ml,本室制备。

4. 动物:(1)无特定病原体(specific pathogen

free, SPF)级 Hartley 豚鼠:性别不限,由中国食品药品检定研究院实验动物中心提供;实验动物生产许可证号:SCXK(京)2014-0013。在中国食品药品检定研究院分枝杆菌专业实验室的负压动物房饲养。(2)稳定性评价用 SPF 级 Hartley 豚鼠:雌性,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供;实验动物生产许可证号:SCXK(京)2016-0011。在上海复旦大学三级动物生物安全实验室(ABSL-3C)的负压区饲养。每只豚鼠大腿腹股沟皮下注射 0.5 ml H37Ra 活菌菌液。

二、主要试剂和仪器

牛血清白蛋白(21.8 mg/支)由本院提供;丙酰胺、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、溴酚蓝、Tween 80、考马斯亮蓝 R250 均为 VER Life Science Amresco 公司产品;十二烷基硫酸钠(SDS)、N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)、N,N-亚甲基双丙烯酰胺均为西格玛奥德里奇(Sigma-Aldrich)(上海)贸易有限公司产品;蛋白 Marker 为宝生物工程(大连)有限公司产品; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (色谱级)、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (色谱级)、NaCl(色谱级)为天津市光复精细化工研究所产品。卡尔费休试剂为上海凌峰化学试剂有限公司生产;无水甲醇为国药集团化学试剂有限公司产品。

紫外-可见分光光度计(UV-2450)为岛津仪器(苏州)有限公司产品;电子天平(BSA623S-CW)、(SECURA225D-1CN)为赛多利斯科学仪器(北京)有限公司产品;旋涡混合器为上海琪特分析仪器有限公司产品;电泳仪电源、垂直电泳仪、凝胶成像系统(Gel DOCTM EZ)为伯乐(Bio-Rad)生命医学产品(上海)有限公司产品;高效液相色谱仪(LC1260)为安捷伦科技(中国)有限公司产品;卡尔费休滴定

仪(DL38)为梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司产品。

三、候选国家参考品的制备及质量控制

按照 EC 原液质量标准对备选冻干 EC 原液(批号:M20170901)进行纯度检定,合格后以 0.5 ml/安瓿瓶每支均精确称量进行分装,同时也完成了候选国家参考品的均匀性检测。分装后冻干成为 EC 变态反应原液效力评价用国家参考品的候选品。按照《中国药典(2015 年版 三部)》^[6]对候选国家参考品进行蛋白质含量和水分等质量检测。

1. 纯度测定及质量要求:对 EC 原液采用电泳法和高效液相色谱法(HPLC)两种方法进行纯度检验,确证纯度符合要求。电泳法:采用非还原型十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法,分离胶浓度为 12.5%,加样量应 $\geq 10 \mu\text{g}$ (考马斯亮蓝 R250 染色法),经扫描仪扫描,纯度 $\geq 95.0\%$ 为合格。高效液相色谱法:色谱柱为 Phenomenex BioSep-SEC-S2000(7.8 mm $\times$ 300 mm),流动相为 pH=7.0 的 0.1 mol/L 磷酸盐-氯化钠缓冲液(磷酸氢二钠和磷酸二氢钠按比例进行配制,磷酸根浓度为 0.1 mol/L);上样量 $\geq 10 \mu\text{g}$,于波长 280 nm 处检测,认为 EC 原液蛋白主峰计算的理论板数应不低于 1000 时,分离效果未受影响。按面积归一化法计算,以 EC 原液蛋白主峰面积 $\geq 95.0\%$ 总面积为合格。

2. 蛋白质含量测定及质量要求:采用福林酚检验方法对候选国家参考品进行蛋白含量检定,结果应不低于 450 μg /瓶。

3. 水分测定及质量要求:以卡尔费休滴定法对候选国家参考品进行检定,水分含量应不高于 3.0%。

四、均匀性检测

取 1 ml EC 原液进行称重,根据质量体积比求得密度,再计算出每支分装量为 0.5 ml 候选国家参考品的理论装量,且每支均在分装时进行精密称量,以保证装量范围控制在“(1 $\pm$ 1%)每支理论装量(g/支)”之间。

五、候选国家参考品的初步性能评价

1. 确定候选国家参考品效价测定用的适宜稀释度:将候选国家参考品复溶后,分别稀释至 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (5 U/ml)、2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (12.5 U/ml)、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (25 U/ml)、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (50 U/ml)和 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (100 U/ml)。取 6 只已经被 H37Ra 活菌致敏的豚鼠,去毛后于背部脊柱两侧分别于皮内注射上述稀释度样品各 0.1 ml,注射后 24 h 观察并测量局部硬

结或红晕的纵径和横径(取硬结或红晕反应大者),计算硬结或红晕反应平均直径(纵径与横径相加除以 2),绘制皮肤试验硬结或红晕反应平均直径大小(简称“反应平均直径大小”)与不同稀释浓度所对应的剂量对数反应平均直径大小曲线。选择注射后 24 h 所产生的局部硬结或红晕反应直径 $\geq 8 \text{ mm}$ 、具有剂量对数反应平均直径大小曲线有良好线性关系($R^2 \geq 0.9$ 为线性良好)的 3 个稀释度作为候选国家参考品进行效价测定用的适宜稀释度。

2. 候选国家参考品用于 EC 原液的效价测定标定:将候选国家参考品与企业申报临床用 EC 原液(批号:M20101202)分别稀释至确定好的不同稀释度,以轮圈法皮内注射 0.2 ml 以上样品于 6 只去毛的已经被 H37Ra 活菌致敏豚鼠的背部脊柱两侧,注射后 24 h 观察并测量局部硬结或红晕的纵径和横径(以硬结或红晕反应大者为准),计算平均硬结或红晕反应(纵径与横径相加除以 2)。不同稀释度候选国家参考品注射后产生的局部硬结或红晕反应直径应不小于 8 mm,且能使不同稀释度 EC 原液的反应平均直径大小均值与相应稀释度国家参考品相应均值的比值满足 1.0 ± 0.2 ,并且两者的剂量对数反应平均直径大小曲线趋势应相似或一致。

3. 效价测定的方法验证:本研究对候选国家参考品用于 EC 原液效价测定进行了方法验证,该试验所用 EC 原液批号为 M20170901。

4. 初步稳定性观察:将-20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 24 个月的候选国家参考品用于 EC 原液(批号 M20170901)的效价测定。并在后期的使用过程中,将定期对该候选国家参考品进行期间核查及长期稳定性研究。

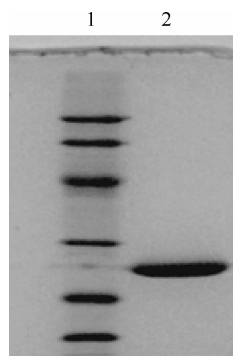
六、统计学处理

采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行数据处理,组间比较采用配对 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、EC 原液及候选国家参考品的检验结果

EC 原液采用非还原型 SDS-PAGE 法测定的蛋白纯度为 100.00%(图 1,仅有一条色带,无其他杂带)。高效液相色谱法结果显示,目的蛋白出峰时间为 10.823 min,主峰面积占总面积的 95.33%,蛋白纯度为 95.33%(图 2);水分含量 4 次测定结果分别为 1.30%、1.71%、1.63%、1.64%,平均为 1.57%;福林酚法测得候选参考品蛋白质含量为 508 $\mu\text{g}/\text{瓶}$ 。



1 为蛋白 Marker[从上至下:97.2 kDa、66.4 kDa、44.3 kDa、29.0 kDa、20.1 kDa、14.3 kDa(1 kDa 的相对分子质量为 1000)];2 为通过 SDS-PAGE 检测的 EC 原液蛋白纯度

图 1 SDS-PAGE 电泳法备选 EC 原液蛋白纯度检测结果

二、均匀性检测结果

取 1 ml EC 原液称重,根据质量体积比求得 EC 原液密度为 1.037 g/ml,根据密度求出每支 0.5 ml 的理论装量应为 0.519 g。分装阶段均进行精密称量,每支候选国家参考品分装量范围在 0.514~0.524 g 之间,因此,分装精度控制在±1%以内,均匀性检测符合国家参考品制备要求。

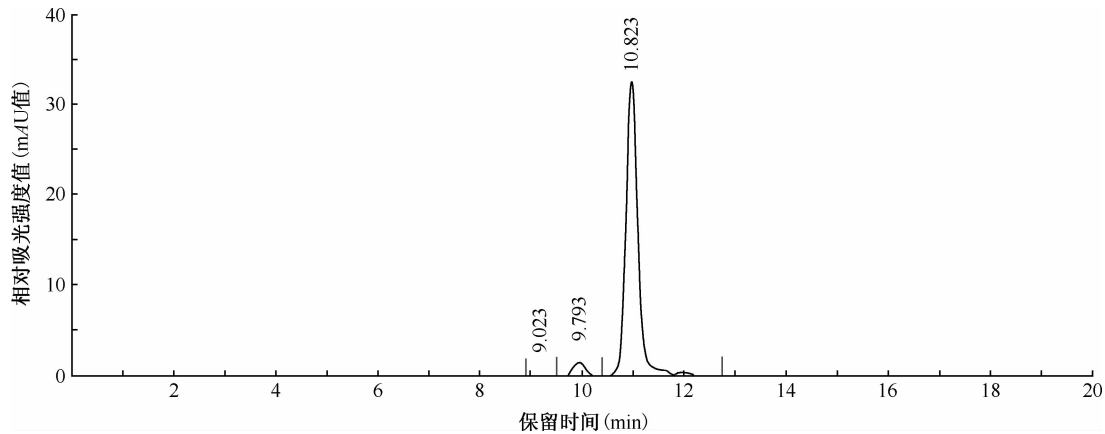
三、确定候选国家参考品原液效价测定用适宜稀释度

将进行豚鼠皮肤试验的候选国家参考品不同稀

释度的剂量对数值与相应的反应平均直径大小绘制剂量对数反应平均直径大小曲线(图 3),经四参数拟合曲线方程为 $Y = 9.922 + (20.43 - 9.922) / [1 + 10^{(0.7786 - X) \times 3.257}]$ (Y 为反应平均直径大小, X 为剂量对数),得出 $R^2 = 0.8140$ 。其中,1.0 μg/ml 和 2.5 μg/ml 所对应的反应平均直径大小(均值分别为 10.3 mm 和 10.1 mm),经配对 t 检验,差异无统计学意义 ($t = 0.124, P = 0.906$),处于平台反应期,剂量所对应的反应平均直径大小无差异;10 μg/ml 和 20 μg/ml 所对应的反应平均直径大小(均值分别为 18.6 mm 和 20.3 mm),经配对 t 检验,差异也无统计学意义 ($t = 2.236, P = 0.076$),处于平台反应期;而在 2.5 μg/ml、5 μg/ml 和 10 μg/ml 稀释度时线性关系最好 ($R^2 = 0.9944$),可将这 3 个候选国家参考品的稀释度确定为效价测定用适宜稀释度。

四、候选国家参考品用于 EC 原液的效价测定及验证结果

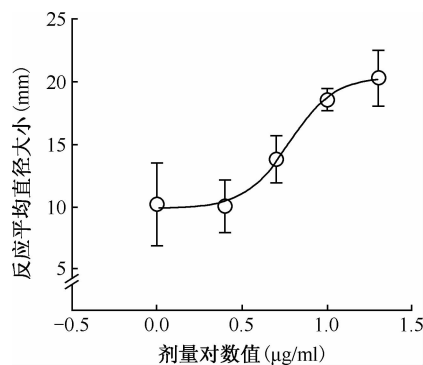
将候选国家参考品用于 EC 原液的效价测定,其豚鼠皮试反应结果显示,不同稀释度(2.5 μg/ml、5 μg/ml 和 10 μg/ml)的 EC 原液和相应稀释度候选国家参考品皮肤试验反应平均直径大小均>8 mm,每个稀释度 EC 原液和相应稀释度候选国家参考品反应平均直径大小均值的比值均在 1.0±0.2 范围



峰编号	保留时间(min)	面积(mAU×min)	面积构 成比(%)	峰高(mAU)	理论塔板数 (USP 标准)	分离度 (USP 标准)	不对称性	S/N (6σ 标准)
1	9.023	42 319	0.46	2 606	6 737	0.00000	1.13945	9.652999
2	9.793	390 701	4.21	24 206	8 266	1.76891	1.09433	89.662509
3	10.823	8 838 048	95.33	548 632	11 450	2.46571	1.13806	2 032.211921

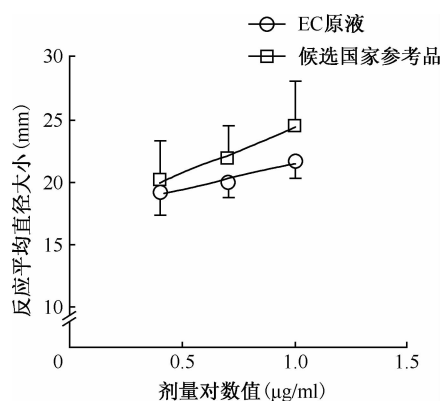
注 在波长为 280 nm 时检测。保留时间为组分峰达到最大值的时间。相对吸光强度值:1 mAU 值=0.001 A 值。峰高=相对吸光强度值(mAU)/(5.69×10⁻⁵)。USP 为美国药典委员会标准。理论塔板数是定量表示色谱柱的分离效率指标,数值越大色谱柱效率越高,在 USP 标准下应不低于 1000;分离度表示相邻两峰的分离程度,数值越大表明相邻两组分分离越好,在 USP 标准下,当数值为 1.5 时,称为 6σ 分离,分离度(裸露峰面积)可达 99.7%,以≥1.5 为完全分离。不对称性又称拖尾因子,可检验色谱峰是否对称,预设<2.0 为结果可靠,可以采用;S/N(6σ)为 6σ 质量标准下的检验微量物质的能力,不应该低于 10

图 2 高效液相色谱法对备选 EC 原液纯度的检测结果



剂量对数值为不同稀释浓度的对数值

图 3 候选国家参考品梯度稀释后不同剂量所对应的皮肤试验反应结果



剂量对数值为不同稀释浓度的对数值

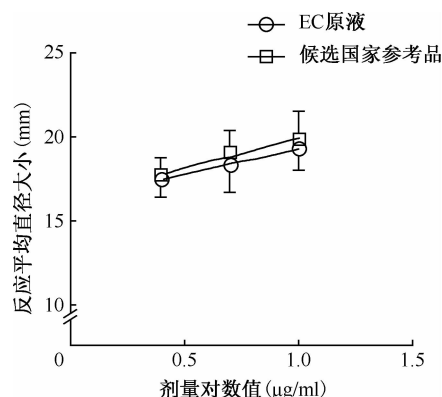
图 4 候选国家参考品用于 EC 原液效价测定的皮肤试验反应结果

内,且两者剂量对数反应平均直径大小曲线趋势基本一致,线性方程分别为 $Y=4.152X+17.38$ ($R^2=0.9643$)和 $Y=7.198X+17.16$ ($R^2=0.9878$) (Y 为反应平均直径大小, X 为剂量对数)(图 4)。

效价测定的方法验证结果显示,候选国家参考品剂量对数反应平均直径大小曲线有良好的线性关系($Y=5.813X+13.05$, $R^2=0.9999$; Y 为反应平均直径大小, X 为剂量对数),与 EC 原液剂量对数反应平均直径大小曲线趋势一致($Y=6.782X+12.73$, $R^2=0.9815$; Y 为反应平均直径大小, X 为剂量对数)。且两者相应稀释度对应的反应平均直径大小均值的比值也在 1.0 ± 0.2 范围内(图 5)。

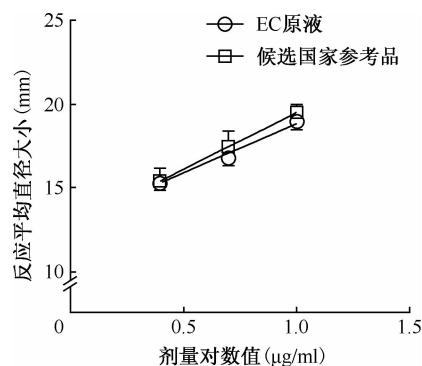
五、初步稳定性检验结果

-20℃放置 24 个月的候选国家参考品用于 EC 原液的效价测定,结果显示候选国家参考品剂量对数反应平均直径大小曲线仍有良好的线性关系($Y=3.599X+16.35$, $R^2=0.9694$; Y 为反应平均直径大小, X 为剂量对数),同时与 EC 原液剂量对数反应平均直径大小曲线趋势一致($Y=3.045X+16.26$, $R^2=0.9973$; Y 为反应平均直径大小, X 为剂量对数)。



剂量对数值为不同稀释浓度的对数值

图 5 候选国家参考品效价测定的验证试验的结果



剂量对数值为不同稀释浓度的对数值

图 6 候选国家参考品效价测定的皮肤试验反应结果(稳定性研究)

每个稀释度 EC 原液与相应稀释度候选国家参考品反应平均直径大小均值的比值均在 1.0 ± 0.2 范围内(图 6)。

讨 论

EC 作为结核感染筛查的体内诊断试剂,其效价测定是该产品质量稳定和有效的重要指标。此类产品效价测定要求是应不低于参考品的效价,因此参考品对产品的质量控制至关重要。为便于产品的质量检查,企业会建立相应的企业参考品,但随着不同企业对此类产品的相续研发,将来应不断会有同类产品上市^[10-15]。这时国家参考品的研制变得极为重要,研制成功可对目前和将来此类产品的研发和上市生产所制备产品中的效价测定提供可控可评的参考指标。尤其是新研发产品可应用国家参考品来测定产品的效价,评价产品性能。

制备国家参考品时,质量标准检测指标一般会高于企业参考品。此类产品一般为大肠埃希菌表达的重组蛋白,因此纯度指标较为关键。备选 EC 原液经检测,其电泳法和高效液相色谱法的纯度均在

95%以上,尤其是电泳法的纯度高达 100.00%。企业参考品一般为液体剂型,考虑到国家参考品长期保存和使用的稳定性,本研究在候选国家参考品制备时加入冻干保护剂进行冷冻干燥,制成冻干剂型。冻干制剂的水分含量会是参考品的重要质量控制指标。经测定,候选国家参考品的水分含量为 1.57%,远高于标准要求的不高于 3.0%;其蛋白质含量检测结果为 508 $\mu\text{g}/\text{瓶}$ 。为了满足国家参考品的均一性要求,该候选品在分装阶段即对每支进行精确称重,保证了分装精度。最终分装精度控制在 $\pm 1\%$ 范围内,均一性评价完全符合国家参考品的要求。

EC 原液效价测定采用的是豚鼠皮肤试验。一般随着皮肤试验试剂剂量的增加,所对应的皮肤试验反应平均直径大小也相应增加。但应该会有一个合适的剂量区间,皮肤试验反应是呈正相关的,低于或者高于一个剂量范围,皮肤试验反应平均直径大小会处于一个平台期。本研究发现冻干国家参考品在 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (12.5 U/ml)以下和 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (50 U/ml)以上剂量时皮肤试验反应会呈平台期反应,而在 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (12.5 U/ml)、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (25 U/ml)和 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (50 U/ml)3 个不同稀释度时剂量效应反应平均直径大小曲线的线性关系最好,故认为 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (12.5 U/ml)、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (25 U/ml)和 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (50 U/ml)3 个不同稀释度是候选国家参考品进行 EC 原液效价测定时的适宜稀释度。

该次研究选用的 EC 原液是企业申报临床时所用的原液,结果显示,不同稀释度 EC 原液和相应稀释度候选国家参考品的反应平均直径大小均 $> 8 \text{ mm}$,相应稀释度反应平均直径大小均值的比值在 1.0 ± 0.2 范围内,且两者剂量对数反应平均直径大小曲线趋势基本一致。说明候选国家参考品适用于 EC 原液的效价测定。同时,对候选国家参考品用于 EC 原液的效价测定进行了方法验证,结果显示候选国家参考品的剂量对数反应平均直径大小曲线有良好的线性关系($Y=5.813X+13.05, R^2=0.9999$),与 EC 原液的剂量对数反应平均直径大小曲线趋势一致($Y=6.782X+12.73, R^2=0.9815$)。每个稀释度 EC 原液与相应稀释度候选国家参考品反应平均直径大小均值的比值均在 1.0 ± 0.2 范围内,说明候选国家参考品用于 EC 原液效价测定方法可行,检测结果可靠。稳定性研究结果显示: -20°C 放置 24 个月的候选国家参考品用于 EC 原液效价测定时,其剂量对数反应平均直径大小曲线与 EC 原液的曲线趋势一致,各稀释度 EC 原液与相应稀释度

候选国家参考品反应平均直径大小均值的比值均在 1.0 ± 0.2 范围内,说明候选国家参考品性能非常稳定。

本研究制备的候选国家参考品目前只完成了初步评价工作,后续将进一步完善多家协作标定和加速破坏稳定性评价等研究工作。该国家参考品完全研制成功后可用于 EC 蛋白或者同类产品的质量的控制,能促进此类产品效价检测的标准化。

参 考 文 献

- [1] 都伟欣,陈保文,沈小兵,等. 结核分枝杆菌 CFP10-ESAT6 融合蛋白的克隆表达及效价测定. 中国防痨杂志, 2006, 28 (4): 221-223.
- [2] 都伟欣,陈保文,徐苗,等. 结核分枝杆菌 CFP10-ESAT6 融合蛋白对不同分枝杆菌致敏动物的鉴别作用. 中国生物制品学杂志, 2009, 28 (4): 807-808, 814.
- [3] 蒲江,陶立峰,邓海清,等. 重组结核分枝杆菌 ESAT6-CFP10 蛋白对不同分枝杆菌致敏豚鼠的皮试反应研究. 中国防痨杂志, 2012, 34 (10): 675-679.
- [4] Li F, Xu M, Zhou L, et al. Safety of Recombinant Fusion Protein ESAT6-CFP10 as a Skin Test Reagent for Tuberculosis Diagnosis: an Open-Label, Randomized, Single-Center Phase I Clinical Trial. Clin Vaccine Immunol, 2016, 23 (9): 767-773. doi: 10.1128/CVI.00154-16.
- [5] Li F, Xu M, Qin C, et al. Recombinant fusion ESAT6-CFP10 immunogen as a skin test reagent for tuberculosis diagnosis: an open-label, randomized, two-centre phase 2a clinical trial. Clin Microbiol Infect, 2016, 22 (10): 889. e9-889. e16. doi: 10.1016/j.cmi.2016.07.015.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2015 年版 三部). 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [7] Hoff ST, Peter JG, Theron G, et al. Sensitivity of C-Tb: a novel RD-1-specific skin test for the diagnosis of tuberculosis infection. Eur Respir J, 2016, 47: 919-928. doi: 10.1183/13993003.01464-2015.
- [8] Ruhwald M, Aggerbeck H, Vázquez Gallardo R, et al. Safety and efficacy of the C-Tb skin test to diagnose *Mycobacterium tuberculosis* infection, compared with an interferon γ release assay and the tuberculin skin test: a phase 3, double-blind, randomised, controlled trial. Lancet Respir Med, 2017, 5: 259-268. doi: 10.1016/S2213-2600(16)30436-2.
- [9] 徐苗,罗永艾,黎友伦,等. 重组结核分枝杆菌 11 kDa 蛋白对结核分枝杆菌感染的鉴别作用. 中华结核和呼吸杂志, 2006, 29 (11): 762-765. doi: 10.3760/j.issn:1001-0939.2006.11.012.
- [10] Sun Q, Xu M, Wu J, et al. Efficacy and safety of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 protein for diagnosis of pulmonary tuberculosis: A phase II trial. Med Sci Monit, 2013, 19: 969-977. doi: 10.12659/MSM.889425.
- [11] Du W, Chen B, Lu J, et al. Preclinical study and phase I clinical safety evaluation of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* ESAT6 protein. Med Sci Monit Basic Res, 2013, 19: 146-152. doi: 10.12659/MSMBR.883912.
- [12] 赵淑娟,李春,关永春,等. 重组结核分枝杆菌 11 kDa 蛋白皮肤试验与结核菌素皮肤试验的比较研究. 医学综述, 2017, 23 (20): 4146-4149. doi: 10.3969/j.issn.1006-2084.2017.20.038.

(收稿日期: 2020-06-10)

(本文编辑: 孟莉 薛爱华)