

# 血管内皮生长因子抑制剂结合活性试验两种结果分析方法比较

毕华, 李永红, 范文红, 陶磊, 裴德宁, 丁有学\*, 饶春明\* (中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

**摘要** 目的: 对血管内皮生长因子抑制剂 (VEGF Trap) 结合活性试验两种结果分析方法进行比较, 以考察两者的差异。方法: 采用固定剂量的 VEGF 与系列稀释的 VEGF Trap 处理之后, 检测未结合的 VEGF 的量, 分别以未结合的 VEGF 量对 VEGF Trap 浓度梯度和未结合的 VEGF 检测板的 OD 值对 VEGF Trap 浓度梯度进行四参数方程拟合, 两种方法计算该产品的结合活性。结果: 两种方法均满足试验有效性条件, 且血管内皮生长因子抑制剂供试品和标准品的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 均分别为  $3.68$  和  $3.6$   $pmol \cdot L^{-1}$ , 供试品的结合活性为 102%。结论: 证明了两种分析方法得到的结果完全一致。为同类产品结合活性计算方法的选择提供借鉴。

**关键词:** 血管内皮生长因子抑制剂; 结合活性; 半数抑制浓度; 四参数方程

中图分类号: R917; R95 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2019)07-0813-06

doi:10.16153/j.1002-7777.2019.07.015

## Comparison of Two Methods for Analyzing the Results of Vascular Endothelial Growth Factor Inhibitors Binding Activity Assays

Bi Hua, Li Yonghong, Fan Wenhong, Tao Lei, Pei Dening, Ding Youxue\*, Rao Chunming\* (National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

**Abstract Objective:** To compare the two methods for analyzing the results of vascular endothelial growth factor inhibitors binding activity assays. **Methods:** After a fixed amount of VEGF was applied to serially dilute VEGF Trap, the amount of unbound VEGF was detected. The two methods were used to calculate the binding activity of the products. One was the four-parameter equation fitting of the concentration gradient of VEGF Trap with the unbound VEGF amount, and the other was the four-parameter equation fitting of the concentration gradient of VEGF Trap with the OD value of the unbound VEGF detection plate. **Results:** Both methods met the test validity conditions, and the half inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of the vascular endothelial growth factor inhibitors' tested samples and the standard substance was  $3.68$  and  $3.6$   $pmol \cdot L^{-1}$  respectively. The binding activity of the tested samples was 102%. **Conclusion:** The results obtained by the two methods are identical, which provide references for selecting methods for calculating the binding activity of similar products.

**Keywords:** vascular endothelial growth factor inhibitors; binding activity; half inhibitory concentration; four-parameter equation

作者简介: 毕华, 副研究员; 研究方向: 生物技术药物质量控制; Tel: (010) 67095684; E-mail: bihua9418@126.com

通信作者: 饶春明, 研究员; E-mail: raocm@nifdc.org.cn

丁有学; E-mail: dingyouxue@nifdc.org.cn

血管内皮生长因子抑制剂 (VEGF Trap) 是具有 VEGF 阻断作用的重组蛋白, 由两种不同的人 VEGF 受体 VEGFR1 和 VEGFR2 的细胞外区域融合到人免疫球蛋白 IgG<sub>1</sub> 的 Fc 部分组成。对 VEGF-A、VEGF-B 和 PlGF 等因子有较好的亲和力。血管内皮生长因子抑制剂通过与上述因子的紧密结合, 降低血管通透性, 进一步抑制新生血管的生成。目前, 该产品已经在美国、欧盟、日本及中国上市, 主要用于治疗年龄相关性黄斑变性 (Age Related Macular Degeneration, AMD)、视网膜静脉阻塞 (Retinal Vein Occlusion, RVO) 继发黄斑水肿, 以及糖尿病黄斑水肿 (Diabetic Macular Edema, DME) 等<sup>[1-4]</sup>。

前期已建立了 VEGF Trap 的质控方法和质控标准用于其质量控制<sup>[5-6]</sup>。其中结合力是 VEGF Trap 性能参数中一个重要的指标, 是质量控制的关键<sup>[7-9]</sup>, 采用的方法是将固定量的 VEGF 与系列稀释的 VEGF Trap 处理之后, 再检测未结合的 VEGF 的量, 该法虽增加了预先结合的步骤, 但下一步检测时采用商业化的试剂盒, 干扰因素少, 商业化抗体与被检抗体相互验证, 结果更加真实、客观<sup>[10-11]</sup>。

本研究比较了 VEGF Trap 结合活性试验中两种结果的分析方法, 以考察两者之间的差异, 为同类产品结合活性试验结果分析方法的选择提供借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料及仪器

VEGF Trap 标准品和一个批次的 1 支 VEGF Trap 供试品均为本科室留样; 重组人 VEGF<sub>165</sub> (货号 293-VE) 和 Quantikine Human VEGF ELISA 试剂盒 (编号 DVE00) 均购自美国 R&D Systems 公司; BSA (编号 12659) 购自德国默克公司; 脱脂奶粉 (编号 232100) 购自美国 BD 公司; SpectraMax Gemini XS 酶标仪及 SOFT MAX 分析软件为美国 Molecular Devices 公司产品。

### 1.2 结合试验酶标板的包被

在 96 孔酶标板每孔加入 300  $\mu\text{L}$  封闭剂 (含 0.1% BSA 和 5% 脱脂奶粉的 PBS 溶液), 于室温放置至少 2 h, 使用前用 PBS 洗涤 4 次。

### 1.3 供试品的制备

用稀释液 (含 0.1% BSA 的 PBS 溶液) 将 VEGF Trap 标准品和 VEGF Trap 供试品稀释至 1  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (其相对分子质量为 97000); 将 VEGF<sub>165</sub> 稀释至

0.2  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (其相对分子质量为 42000), 在结合试验中作为固定量的 VEGF<sub>165</sub>; 将 VEGF<sub>165</sub> 稀释至 1  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 用于绘制标准曲线。另配制 320  $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$  和 48  $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 VEGF<sub>165</sub> 溶液, 用于质控。另取一块新的 96 孔酶标板作为稀释板, 在该板中加入用稀释液制备好的 1  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  VEGF Trap 供试品和标准品进行 2 倍系列稀释, 共 10 个稀释度, 同时设置空白对照孔, 每个供试品做 3 个重复孔。

### 1.4 结合板的制备

取包被好的 96 孔酶标板作为结合板, 将稀释好的 VEGF Trap 供试品和标准品 25  $\mu\text{L}$  加至该板的孔中, 每孔再加入 165  $\mu\text{L}$  稀释液和 10  $\mu\text{L}$  的 0.2  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 VEGF<sub>165</sub> 溶液。混匀, 室温下孵育 12 ~ 20 h。

### 1.5 VEGF<sub>165</sub> 标准曲线及质控孔的制备

用稀释液对 1  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的重组人 VEGF<sub>165</sub> 进行 2 倍系列稀释, 共 7 个稀释度, 同时设空白对照孔。取稀释好的上述溶液 10  $\mu\text{L}$ , 加至结合板的孔中, 每孔加入 190  $\mu\text{L}$  稀释液, 用作 VEGF<sub>165</sub> 标准曲线制备。在结合板的新孔中再分别加入 320 和 48  $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 VEGF<sub>165</sub> 溶液 25  $\mu\text{L}$ , 再向各孔中加入 175  $\mu\text{L}$  稀释液, 制得 40 和 6  $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 VEGF<sub>165</sub> 溶液, 作为试验中 VEGF<sub>165</sub> 溶液高浓度和低浓度质控孔。混匀, 室温下孵育 12 ~ 20 h。

### 1.6 游离 VEGF<sub>165</sub> 的检测

从结合板中取出 100  $\mu\text{L}$  结合液, 加入 Quantikine<sup>®</sup> Human VEGF 检测板中, 采用双抗体夹心 ELISA 法, 按试剂盒说明书检测结合后游离 VEGF<sub>165</sub>。

### 1.7 结果分析方法

#### 1.7.1 方法一

使用 Molecular Devices 酶标仪, 在 450 nm 处测定 VEGF<sub>165</sub> 检测板各孔的 A 值。根据 VEGF<sub>165</sub> 的标准曲线计算 VEGF Trap 供试品和标准品各浓度梯度下未结合的 VEGF<sub>165</sub> 的量。然后以 VEGF Trap 供试品及标准品浓度的对数值为横坐标, 对应的 VEGF<sub>165</sub> 含量值为纵坐标, 进行四参数方程曲线拟合。计算供试品和标准品的半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>), 按照公式: 结合活性 (%) = 供试品的 IC<sub>50</sub> / 标准品的 IC<sub>50</sub> × 100%, 计算出供试品的结合活性。

#### 1.7.2 方法二

使用Molecular Devices 酶标仪, 在450 nm 处测定VEGF<sub>165</sub>检测板各孔的OD 值。以VEGF Trap 标准品及供试品浓度的对数值为横坐标, OD<sub>450</sub> 值为纵坐标, 进行四参数方程曲线拟合。计算标准品和供试品的半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>), 按照公式:  
 相对结合力 (%) = 供试品的IC<sub>50</sub>/标准品的IC<sub>50</sub> × 100%, 计算出供试品的结合活性。

1.8 试验有效性

VEGF 标准曲线线性回归分析R<sup>2</sup>值必须不低于0.98; 40 pmol · L<sup>-1</sup>VEGF<sub>165</sub>质控的3个重复孔中, 应有2个在28 ~ 52 pmol · L<sup>-1</sup>; 6 pmol · L<sup>-1</sup>VEGF<sub>165</sub>质控的3个重复孔中, 应有2个4 ~ 9 pmol · L<sup>-1</sup>。标准品与供试品结合曲线的非线性回归分析R<sup>2</sup>值必须不低于0.98; 标准品的IC<sub>50</sub>值必须在2 ~ 5 pmol · L<sup>-1</sup>。只有同时满足上述条件时, 才视为试验有效。按下式计算VEGF Trap 的相对结合力, 65% ~ 135%为合格。

2 结果

2.1 方法一

在450 nm下测定结合板每一个孔的吸光度

值。根据VEGF<sub>165</sub>标准品的浓度值及吸光度值绘制VEGF<sub>165</sub>标准曲线, 分别计算出质控点VEGF Trap 供试品和标准品各浓度梯度下未结合的VEGF<sub>165</sub>的量, 结果如表1及表2所示。

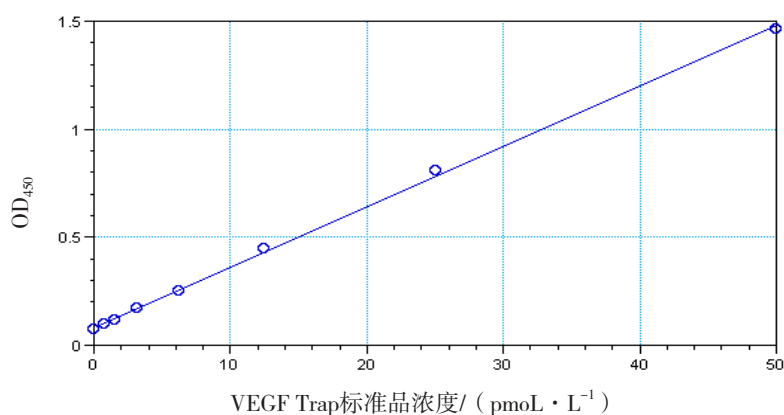
VEGF<sub>165</sub>标准曲线线性回归方程:  $Y=0.081+0.028x$ , R<sup>2</sup>值为0.999, 曲线如图1所示; VEGF<sub>165</sub>标准品各个浓度与吸光度值的对应关系如表3所示; 40 pmol · L<sup>-1</sup>VEGF<sub>165</sub>质控的3个重复孔值分别为46.12、46.31、43.66 pmol · L<sup>-1</sup>; 6 pmol · L<sup>-1</sup>VEGF<sub>165</sub>质控的3个重复孔值分别为5.32、5.69、6.10 pmol · L<sup>-1</sup>。以VEGF Trap 供试品及标准品浓度的对数值为横坐标, 对应的VEGF<sub>165</sub>含量值为纵坐标, 进行四参数方程曲线拟合, 分别绘制供试品和标准品的曲线, 求出供试品和标准品的半数抑制浓度分别为3.68和3.6 pmol · L<sup>-1</sup>, 标准品与供试品结合曲线的非线性回归分析方程:  $Y=9.961/(1+x/3.68)^{2.11}+0.639$ , R<sup>2</sup>值为0.997, 如图2所示。以上均满足该试验的有效性条件, 所以试验有效。计算供试品的结合活性为102%。

表 1 VEGF Trap 标准品各浓度梯度下未结合的 VEGF<sub>165</sub> 的量

VEGF Trap/ ( pmol · L <sup>-1</sup> )	吸光度均值 /OD <sub>450</sub>	VEGF <sub>165</sub> 均值 / ( pmol · L <sup>-1</sup> )
125.00	0.099	0.640
62.50	0.102	0.743
31.25	0.105	0.872
15.63	0.112	1.125
7.81	0.138	2.026
3.91	0.236	5.549
1.95	0.324	8.677
0.98	0.351	9.664
0.49	0.381	10.711
0.24	0.392	11.125

表2 VEGF Trap 供试品各浓度梯度下未结合的 VEGF<sub>165</sub> 的量

VEGF Trap/ (pmol · L <sup>-1</sup> )	吸光度均值 /OD <sub>450</sub>	VEGF <sub>165</sub> 均值 / (pmol · L <sup>-1</sup> )
125.00	0.099	0.647
62.50	0.098	0.596
31.25	0.106	0.889
15.63	0.114	1.186
7.81	0.137	1.989
3.91	0.236	5.540
1.95	0.318	8.480
0.98	0.347	9.498
0.49	0.386	10.897
0.24	0.373	10.447

图1 VEGF<sub>165</sub>标准曲线表3 VEGF<sub>165</sub> 标准品浓度及吸光度值

VEGF <sub>165</sub> 标准品 / (pmol · L <sup>-1</sup> )	吸光度均值 /OD <sub>450</sub>
50.00	1.464
25.50	0.806
12.50	0.450
6.25	0.249
3.125	0.170
1.563	0.117
0.781	0.096
0.000	0.072

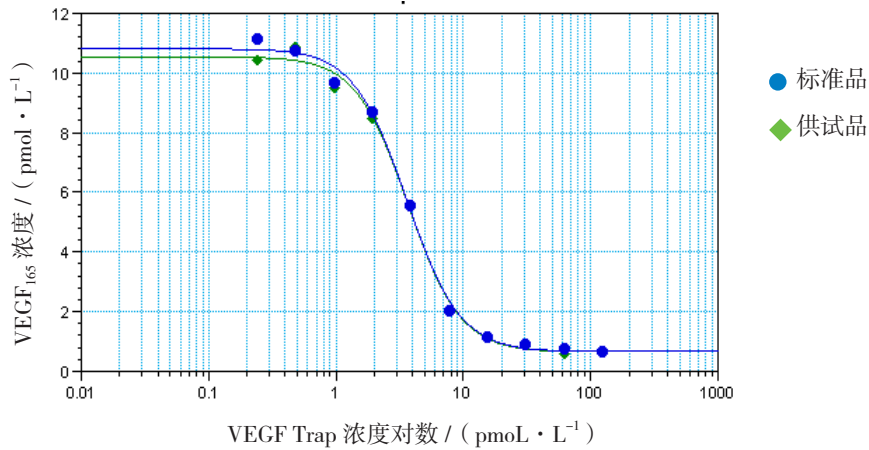


图2 未结合的 VEGF<sub>165</sub> 与 VEGF Trap 浓度对应关系曲线

### 2.2 方法二

在450 nm直接测定VEGF<sub>165</sub>检测板各孔的吸光度值。直接以VEGF Trap 标准品及供试品浓度的对数值为横坐标，OD<sub>450</sub> 值为纵坐标，进行四参数方程曲线拟合，曲线如图3所示。标准品与供试品结合曲线的非线性回归分析的R<sup>2</sup>值分别为0.997。回

归方程： $y=0.2771/(1+x/3.68)^{2.11}+0.0989$ 。计算供试品和标准品的半数抑制浓度（IC<sub>50</sub>）分别为3.68和3.6 pmol · L<sup>-1</sup>，VEGF<sub>165</sub>标准曲线和各个质控孔的值同上。均满足试验有效性条件，计算供试品的结合活性为102%。

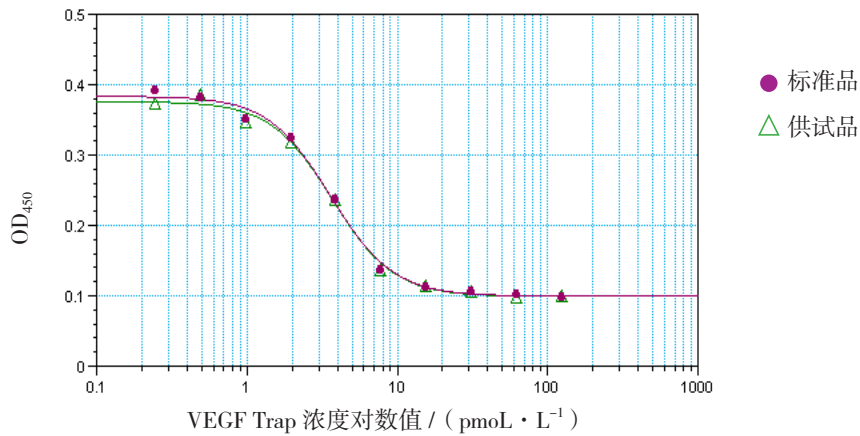


图3 未结合的 VEGF<sub>165</sub> 吸光度值与 VEGF Trap 浓度对应关系

### 3 讨论

经过两种方法的对比表明，以VEGF Trap 标准品及供试品浓度的对数值为横坐标，以未结合的VEGF<sub>165</sub>的量值或直接以未结合的VEGF<sub>165</sub>的吸光度值为纵坐标，计算得到的VEGF Trap的结合活性一致。

结合活性的计算方法为待测供试品与标准品IC<sub>50</sub>（半数抑制浓度）之比，而半数抑制浓度为纵坐标是S形曲线上上下渐近线差值中点时，横坐标所表示的值，即其所对应的VEGF Trap浓度；理

论上，无论以未结合的VEGF<sub>165</sub>的量值或直接以未结合的VEGF<sub>165</sub>的吸光度值为纵坐标，两者所得到的横坐标即对应的VEGF Trap浓度一致，纵坐标VEGF<sub>165</sub>的量值或未结合的VEGF<sub>165</sub>的吸光度值本身存在着一定的 $y=kx+b$ 的直线关系，计算半数抑制浓度时，利用了上下渐近线的差值，使得b值被消除，所以方法一和方法二得到的曲线实际上只是纵坐标被放大了k倍，而对应的横坐标相同，这是两种方法得到相同的结合活性的理论依据。

本研究中，方法二计算上操作简便，不用再

将VEGF<sub>165</sub>的OD值转换成VEGF<sub>165</sub>的含量值；方法一，虽然要经过计算未结合的VEGF<sub>165</sub>这一步骤，但转换后四参数的图形的纵坐标变大，且直接以未结合的VEGF<sub>165</sub>的量来表示更加直观。目前，SoftMax公司有专门的软件GXP，能够通过OD值直接转换成VEGF<sub>165</sub>的含量值，并绘制VEGF<sub>165</sub>的含量值对VEGF Trap浓度的四参数曲线，十分方便，但需单独购买该软件，需要一定的成本。

本研究比较了用于VEGF Trap结合力试验的两种计算方法，结果表明，两种方法结果一致，在实践中具体采用哪种方法，可根据实际情况而定。

#### 参考文献：

- [1] Mitchell P, Liew G, Gopinath B, et al. Age-related Macular Degeneration[J]. Lancet, 2018, 392 (10153): 1147-1159.
- [2] Curry B, Bylsma G, Hewitt AW, et al. The VEGF Treatment of AMD Switch Study (The vTAS Study) [J]. Asia Pac J Ophthalmol, 2017, 6 (6): 481-487.
- [3] Mylonas G, Prager F, Wetzel B, et al. Anti-vascular Endothelial Growth Factor for Unilateral Acute Idiopathic Maculopathy[J]. Eur Ophthalmol, 2018, 28 (2): 256-258.
- [4] Budzinskaya MV, Plyukhova AA, Sorokin PA, et al. Anti-VEGF Therapy Resistance in Neovascular Age-related Macular Degeneration[J]. Vestn Oftalmol, 2017, 133 (4): 103-108.
- [5] 王兰, 饶春明, 陶磊, 等. 血管内皮生长因子抑制剂质量控制方法和质量标准研究[J]. 药物分析杂志, 2010, 30 (6): 977-982.
- [6] 毕华, 丁有学, 王兰, 等. ELISA 法间接检测血管内皮生长因子抑制剂的相对结合力[J]. 中国生物制品学杂志, 2010, 23 (6): 657-659.
- [7] 中国药典: 三部[S]. 2015.
- [8] 王军志. 生物技术药物研究开发与质量控制[M]. 第三版. 北京: 科学出版社, 2018: 133-135.
- [9] 饶春明, 王军志. 2015年版《中国药典》生物技术药质量控制相关内容介绍[J]. 中国药学杂志, 2015, 50 (20): 1776-1781.
- [10] 杜向瑞, 韩月然, 陈妍, 等. 前蛋白转化酶枯草溶菌9单克隆抗体抗原结合活性间接ELISA 测定方法的建立[J]. 中国生物制品学杂志, 2018, 3 (3): 311-314.
- [11] 席欧彦, 贾二珂, 赵婷, 等. 抗CD47 单链抗体制备及抗原结合活性分析[J]. 生物技术, 27 (4): 370-377.

(收稿日期 2019年1月14日 编辑 范玉明)