报告基因法测定重组人促卵泡激素-CTP融合蛋白生物学活性

许凯心[1,2#], 王绿音[1#], 白璧炜[3], 孙铭健[1], 吕 萍[1], 李 晶[1*], 高向东[2*], 梁成罡[1*]

(1. 中国食品药品检定研究院 药品监管科学全国重点实验室 国家卫生健康委生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室 国家药品监督管理局生物制品质量研究与评价重点实验室, 北京 102629; 2. 中国药科大学, 江苏 南京 211198; 3. 黑龙江省药品检验研究院, 黑龙江 哈尔滨 150088)

摘要: 本研究以CHO-K1-FSHR-CRE-Luc转基因细胞作为靶细胞, 通过荧光素酶检测系统测定rhFSH-CTP的生物学活性。对该方法的关键参数进行优化, 根据2020年版《中华人民共和国药典》四部对该方法的相对准确度、中间精密度、线性和范围、可靠性结果等进行验证。结果表明, rhFSH-CTP在本方法中符合四参数方程: $y = (A-D)/[1+(x/C)^B]+D$, 有良好的剂量−效应曲线。5个效价水平 (50%、80%、100%、125%及200%) 的相对生物学活性 ($n = 8$) 的几何平均值分别为 (53.87 ± 2.47)%、(81.58 ± 1.66)%、(96.76 ± 4.64)%、(127.03 ± 8.19)%、(207.62 ± 15.52)%。相对偏倚 (RB) 及其90%置信区间分别为7.7% (4.2%, 10.8%)、2.0% (0.6%, 3.3%)、−3.2% (−6.4%, −0.3%)、1.6% (−2.9%, 5.8%)、3.8% (−1.6%, 8.9%), 相对偏倚及置信区间的绝对值均小于11%。5个效价水平的几何变异系数 (GCV) 及其置信区间的上限均小于20%。线性范围为50%～200%, 斜率为0.974 2, $R^2 = 0.994\ 8$, 均符合2020年版《中华人民共和国药典》四部通则9401的要求。上述结果的偏离平行项、回归项均符合2020年版《中华人民共和国药典》四部通则1431生物检定统计法可靠性检验的要求。本研究成功建立了一种rhFSH-CTP生物学活性检测方法, 该方法具有良好的有效性和可靠性。

关键词: 生物学活性; 报告基因法; 重组人促卵泡激素-CTP融合蛋白; 方法学验证; 方法优化; 可靠性检验

中图分类号: R917 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2025)11-3476-07

The biological activity of recombinant human follicle-stimulating hormone-CTP fusion protein was determined by reporter gene method

XU Kai-xin[1,2#], WANG Lü-yin[1#], BAI Bi-wei[3], SUN Ming-jian[1], LÜ Ping[1], LI Jing[1*], GAO Xiang-dong[2*], LIANG Cheng-gang[1*]

(*1. National Institutes for Food and Drug Control, State Key Laboratory of Drug Regulatory Science, NHC Key Laboratory of Research on Quality and Standardization of Biotech Products, NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Biological Products, Beijing 102629, China; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China; 3. Heilongjiang Institute for Drug Control, Harbin 150088, China*)

Abstract: This study employed CHO-K1-FSHR-CRE-Luc transgenic cells as target cells to detect the biological activity of rhFSH-CTP using a luciferase detection system. Key parameters of the method were optimized, and its performance was validated according to the requirements of the 2020 Edition of Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Vol IV), including relative accuracy, intermediate precision, linearity and range, and reliability results. The results showed that rhFSH-CTP conformed to the four-parameter equation: $y = (A-D)/[1+(x/C)^B]+D$,

收稿日期: 2025-01-07; 修回日期: 2025-08-28.

基金项目: 中国食品药品检定研究院药品监管全国重点实验室第一批课题 (2023SKLDRS0108).

#共同第一作者.

*通讯作者 E-mail: xdgao@cpu.edu.cn; liangchenggang@nifdc.org.cn; li_jing@nifdc.org.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0018

exhibiting an excellent dose-effect curve. The geometric means of relative biological activities (n = 8) at five titer levels (50%, 80%, 100%, 125%, and 200%) were (53.87 ± 2.47)%, (81.58 ± 1.66)%, (96.76 ± 4.64)%, (127.03 ± 8.19)%, and (207.62 ± 15.52)%, respectively. The relative bias (RB) and its 90% confidence intervals were 7.7% (4.2%, 10.8%), 2.0% (0.6%, 3.3%), −3.2% (−6.4%, −0.3%), 1.6% (−2.9%, 5.8%), and 3.8% (−1.6%, 8.9%), with absolute values of RB and confidence intervals all less than 11%. The upper limits of geometric coefficients of variation (GCV) and their confidence intervals for five titer levels were less than 20%. The linear range spanned 50%−200%, with a slope of 0.974 2 and R^2 = 0.994 8, meeting the criteria of General Chapter 9401 in Volume IV of the 2020 Pharmacopoeia. Additionally, the deviation parallelism and regression terms satisfied the reliability test requirements of General Chapter 1431 (biological assay statistics) in the same pharmacopoeia edition. In conclusion, this study successfully established a method for detecting the biological activity of rhFSH-CTP, which demonstrates good validity and reliability.

Key words: biological activity; reporter gene method; recombinant human follicle-stimulating hormone-CTP fusion protein; methodological validation; method optimization; reliability inspection

作为治疗不孕不育的长效促卵泡激素 (follicle-stimulating hormone, FSH) 制剂, 与传统的重组人促卵泡激素 (recombinant human follicle-stimulating hormone, rhFSH) 制剂相比, 重组人促卵泡激素-CTP 融合蛋白 (recombinant human follicle-stimulating hormone-CTP fusion protein, rhFSH-CTP) 延长了药物半衰期, 患者从每天注射 1 或 2 次减少至每周注射一次, 大大提高了患者的依从性[1]。rhFSH-CTP 通过基因重组技术, 将人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, HCG) β 亚基的羧基末端肽 (carboxy-terminal peptides, CTP) 序列与 FSH β 亚基的 cDNA C 端融合[2], 构成重组 FSH-CTP 蛋白。rhFSH-CTP 通过与细胞表面的跨膜 FSH 受体结合激活蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA), 活化的 PKA 诱使 cAMP 反应元件结合蛋白 (cyclic-AMP response binding protein, CREB) 与 cAMP 反应元件结合, 启动下游基因的转录, 产生生物学效应[3]。生物学活性评价是生物技术药物的关键质量属性, 它体现了大分子蛋白药物高级结构的正确性与生物学功能的完整性, 与产品的有效性密切相关[4]。目前各国药典中收录的 FSH 生物学活性测定方法均为雌幼大鼠卵巢增重法[5], 该法耗时 4 天, 存在操作繁琐、结果重复性差、不符合“3R”原则、成本高等缺陷。由于体内动物法的局限性, 基于细胞的活性测定方法逐渐被用于 FSH 类产品的质量控制[6]。对于 rhFSH-CTP 产品, 现有的企业申报的体外细胞法为采用 ELISA 法检测药物刺激细胞后的 cAMP 增量, 方法操作繁琐、周期长、可能存在交叉反应, 检测结果变异较高[7]。因此急需开发更简便、灵敏、准确、精密度高的体外生物学活性测定方法, 用于评价此类药物的生物学活性。

报告基因法具有快速简便、通量高、准确稳定等优势。通过构建稳定表达药物受体的报告基因细胞系, 药物与细胞表面的受体结合后, 经信号转导启动报告基因表达, 通过检测报告基因的表达量评价药物的生物学活性[8]。本研究使用稳定表达 FSH 受体及含有荧光素酶报告基因的 CHO-K1-FSHR-CRE-Luc 细胞, 加药刺激后, 荧光素酶表量即可指征 rhFSH-CTP 的生物学活性, 本研究基于此原理建立一种生物学活性检测方法, 且该方法参考《中华人民共和国药典》(2020 年版) 四部通则 1431 对结果进行可靠性测验, 并按照《中华人民共和国药典》(2020 年版) 四部通则 9401 开展了全面的方法学验证[9]。该方法测定 rhFSH-CTP 的生物学活性具有快速简便、专属性强、准确度及精密度良好等优势, 可替代传统的 rhFSH-CTP 生物学活性测定方法。

材料与方法

材料与仪器 CHO-K1-FSHR-CRE-Luc 细胞、rhFSH-CTP 对照品 (批号 RP-W20231002)、rhFSH-CTP 原液 (批号 DS20220901, DS20220902, DS20221003 共 3 批)、rhFSH-CTP 注射液 (批号 20230506, 20230607, 20230608, 20230609, 20230610, 20230611, C202301003, C202303002 共 8 批)、重组人促黄体激素 (recombinant human luteinizing hormone, rhLH, 批号 150531-202405)、重组人绒毛膜促性腺激素 (recombinant human chorionic gonadaotropin, rHCG, 批号 150555-201804)、重组人促甲状腺激素 (recombinant human thyroid-stimulating hormone, rhTSH, 批号 150530-202204) 均来源于中国食品药品检定研究院激素室; DMEM/F12 有酚红培养基、DMEM/F12 无酚红培养基、0.25% trypsin-EDTA、胎牛血清、遗传霉素均购自美国 Gibco 公司; 潮霉素 B (美国 Invitrogen 公司); Steady-Glo Luciferase Assay System (美国 Promega 公司); CellXpert C170i 型二氧

化碳细胞培养箱 (德国 Eppendorf 公司); TS2-FL 型倒置显微镜 (日本 Nikon 公司); SORVall ST8 型台式离心机和 Heraguard ECO 型超净工作台 (美国 Thermo Scientific 公司); TC-20 型全自动细胞计数仪 (美国 Bio-Rad 公司); SpectraMax M5e 多功能酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); LC-20A 型液相色谱仪 (日本 Shimadzu 公司)。

生物学活性测定方法 取对数生长期的 CHO-K1-FSHR-CRE-Luc 细胞, 加入适量 trypsin-EDTA 消化细胞, 1 000 r·min^{-1} 离心 5 min 后用种板培养基 (DMEM/F12 无酚红培养基 480 mL, 加入 FBS 20 mL) 重悬细胞并计数, 以种板培养基稀释细胞至 5×10^5 cells·mL^{-1}, 以每孔 100 μL 接种至 96 孔细胞培养板, 于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 16～24 h, 取出, 弃上清。以 DMEM/F12 无酚红培养基将 rhFSH-CTP 对照品及供试品预稀释至起始浓度 900 ng·mL^{-1}, 再进行 3 倍系列稀释, 共 9 个稀释度。将系列稀释的 rhFSH-CTP 对照品和供试品溶液以 100 μL 每孔加入接种的 96 孔板中, 每个浓度两个复孔。96 孔板置 37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育 5 h 后取出, 弃对照品溶液和供试品溶液, 以 100 μL 每孔加入底物试剂 (由 luciferase 底物−细胞裂解液与 DMEM/F12 无酚红培养基 1∶1 混合配制成), 避光反应 5 min。振荡混匀后采用多功能酶标仪读取化学发光值 (relative luciferase units, RLU)。

实验条件优化 将 rhFSH-CTP 对照品以 DMEM/F12 无酚红培养基稀释至初始浓度为 218 700 ng·mL^{-1}, 继续进行 3 倍系列稀释后测定, 探索最佳初始浓度, 以上述实验确定的最佳初始浓度为药物刺激的初始浓度进行后续实验操作。取对数生长期的 CHO-K1-FSHR-CRE-Luc 细胞, 用种板培养基制成密度分别为 7.5、5、2.5、1×10^5 cells·mL^{-1} 的细胞悬液, 以 100 μL 每孔分别接种于 96 孔细胞培养板中, 按照上述检测方法进行活性测定, 确定最佳细胞接种密度, 以上述实验确定的最佳铺板密度为细胞铺板密度进行后续实验操作。将 rhFSH-CTP 对照品稀释至 900 ng·mL^{-1} 的初始浓度, 再分别进行 2、3、4、5 倍系列稀释后测定, 确定本方法的最佳稀释倍数, 以上述实验确定的最佳稀释倍数为药物稀释倍数进行后续实验操作。设置 3、4、5、6 h 共 4 个不同的孵育细胞时间, 按上述检测方法测定, 确定药物的孵育时间, 以上述实验确定的孵育时间为药物孵育时间进行后续实验操作。加入荧光底物后分别测定 5、10、15、20 min 共 4 个刺激时间, 按上述检测方法测定, 确定荧光底物刺激时间。最终获得该方法的最佳实验条件。

方法学验证 优化后的方法依照《中华人民共和国药典》(2020 年版) 四部通则 9401 对专属性、相对准确度、中间精密度和线性和范围进行验证。依照《中华人民共和国药典》(2020 年版) 四部通则 1431 对测定结果进行可靠性检测[9]。

专属性 为考察方法专属性, 选取 rhFSH、rhLH、rHCG、rhTSH、制剂缓冲液和 rhFSH-CTP 对照品进行相对生物学活性检测。

相对准确度、中间精密度、线性和范围 取 rhFSH-CTP 对照品, 以 DMEM/F12 无酚红培养基预稀释至 900 ng·mL^{-1}, 作为方法验证对照品。以 DMEM/F12 无酚红培养基分别制备初始浓度为 1 800、1 125、900、720、450 ng·mL^{-1} 的系列溶液, 作为 5 个不同效价水平 (50%、80%、100%、125%、200%) 的供试品, 每个效价水平由两名分析人员在不同日期使用 4 个代次的细胞进行相对效价测定, 每个效价水平重复 2 次, 每次设置 4 块 96 孔板, 共 8 次实验。以稀释因子为横坐标, RLU 为纵坐标绘制四参数量效曲线, 得到曲线的 ED_{50} 值 (50 percent of effective dilution factor), 计算各供试品的相对效价, 相对效价 = 供试品 ED_{50}/对照品 ED_{50}×100%。计算各效价水平的几何均值及相对偏倚, 通过相对偏倚 (relative bias, RB) 评价相对准确度, RB = 相对效价测定值/相对效价理论值×100%。根据各效价水平测定结果的对数值计算几何变异系数 (GCV, %) 及相应的 95% 置信区间上限, 考察中间精密度。以 5 个不同效价水平理论值的自然对数 (x) 对其相应的效价测定值的自然对数 (y) 作直线回归, 采用最小二乘法进行线性拟合, 考察方法的线性和范围。

可靠性 以 rhFSH-CTP 浓度对数为横坐标, 以 RLU 为纵坐标绘制四参数量效曲线, 按照《中华人民共和国药典》(2020 年版) 四部通则 1431 生物检定统计法中的要求用约束模型对测定结果进行可靠性验证[9]。实验结果可靠性判断标准: 拟合曲线的 $R^2 \geqslant 0.98$ 回归项应非常显著 ($P < 0.01$); 偏离平行项均应不显著 ($P \geqslant 0.05$)。对所测样品的回归项、偏离平行项、R^2 进行统计, 验证该方法的检测结果是否具有可靠性[9]。

破坏性 取 rhFSH-CTP 对照品, 以每支 1 000 μL 分装后置 60 ℃的水浴锅中加热破坏 3、4、8、20、24、72、120、168、240 h, 分别进行生物学活性测定。取上述加热破坏后的对照品进行高效液相色谱法测定主成分含量, 采用 TOSHO TSK gel G2000 SW_{XL} 色谱柱 (300 mm × 7.8 mm, 5 μm); 配套 TOSHO TSK gel Guard column SW_{XL} 保护柱 (40 mm × 6.0 mm, 7 μm); 流动相为 14 mmol·L^{-1} Na_2HPO_4 + 6 mmol·L^{-1} NaH_2PO_4 + 149.91 mmol·L^{-1} NaCl (pH 7.0), 等度洗脱, 流速为 0.5 mL·min^{-1}, 柱温 25 ℃, 进样量 50 μL, 检测波长为 280 nm。

细胞代次稳定性 采用第5、13、24和40代细胞。测定同一份rhFSH-CTP对照品的相对生物学活性考察细胞代次稳定性。

多批次rhFSH-CTP生物学活性测定 选取11批rhFSH-CTP原液和注射液, 均进行生物学活性测定, 计算RSD (n = 3)。

结果

1 rhFSH-CTP生物活性测定方法优化

初始浓度为218 700 ng·mL^{-1}的rhFSH-CTP刺激CHO-K1-FSHR-CRE-Luc细胞, 进行生物学活性测定, 结果如图1A所示, 浓度为900 ng·mL^{-1}时, 量效反应曲线呈典型的S型, 曲线上的点分布均匀, 确定最佳初始浓度为900 ng·mL^{-1}。再分别以7.5×10^5、5×10^5、2.5×10^5、1×10^5 cells·mL^{-1}的细胞密度铺板, 检测同一份rhFSH-CTP的生物学活性, 如图1B所示, 当细胞密度为5×10^5 cells·mL^{-1}时R^2为0.999, 信噪比 (S/N) 为10.54, EC_{50}值较低, 为12.83。稀释倍数优化结果显示 (图1C), 仅3倍梯度稀释的rhFSH-CTP刺激细胞能得到典型S型曲线, 曲线上点分布均匀, S/N和EC_{50}较好。药物刺激时间优化结果显示 (图1D), rhFSH-CTP刺激细胞5 h能得到S型曲线, EC_{50}值 (12.01) 最小, S/N (11.12) 较高, 选择5 h为最佳药物刺激时间。荧光底物刺激时间优化结果显示 (图1E), 荧光底物刺激时间为5 min时, 量效曲线各浓度点分布均匀且有清晰的上下平台, 信噪比 (12.74) 最高, 确定荧光底物最佳刺

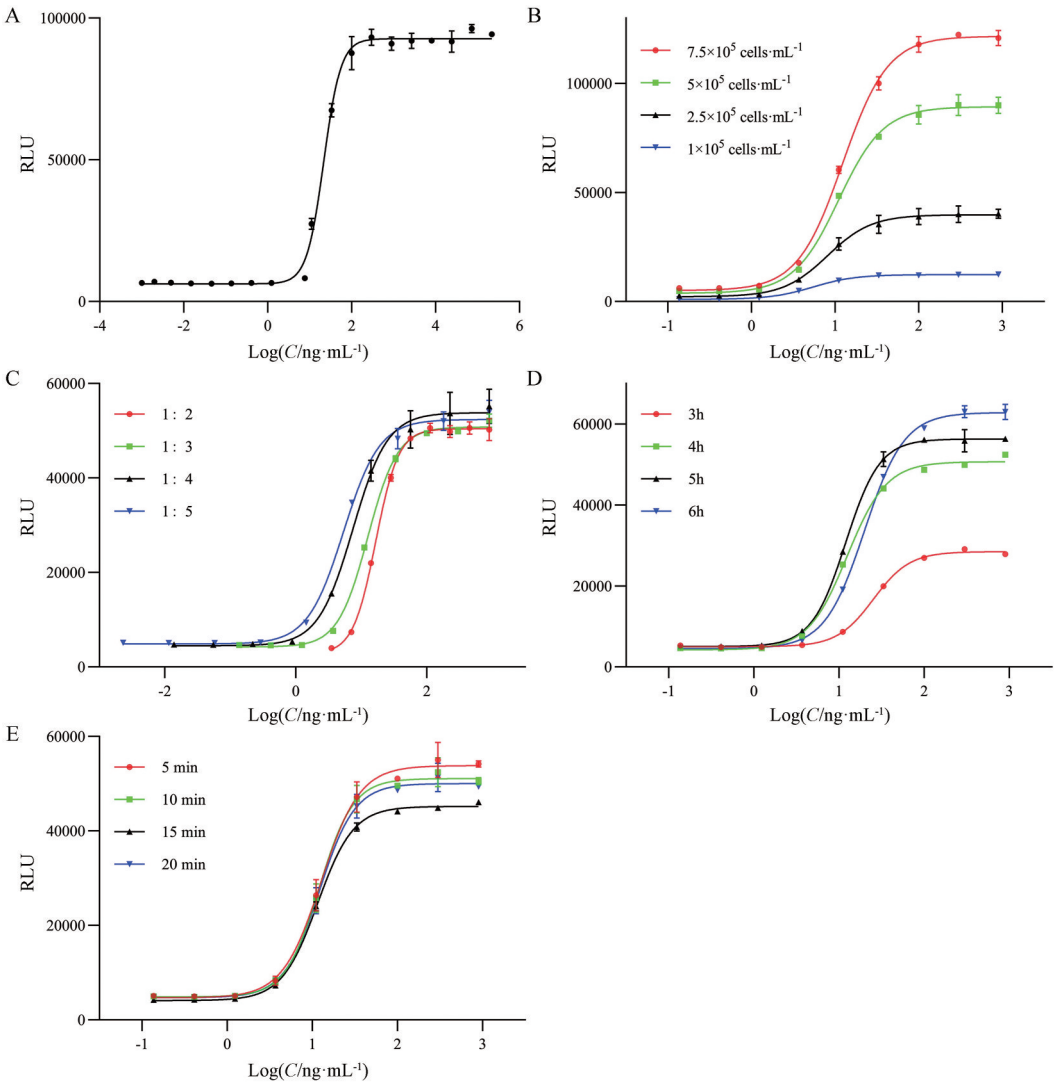


Figure 1 The dose-response curves of recombinant human follicle-stimulating hormone-CTP fusion protein (rhFSH-CTP) after the optimization of various biological activity assay conditions. A: Optimization of the optimal initial concentration; B: Optimization of cell seeding density; C: Optimization of dilution factor; D: Optimization of drug stimulation time; E: Optimization of fluorescence substrate stimulation time. RLU: Relative luciferase unit

激时间为5 min。

2 方法学验证

2.1 专属性 对rHCG、rhLH、rhTSH和制剂缓冲液进行生物学活性测定，结果如图2所示，该方法对rhFSH-CTP和rhFSH均有显著的量效曲线，通过该方法测得的rhFSH的EC_{50}值为48.98，rhFSH-CTP的EC_{50}值为6.103，二者存在显著差异，对rHCG、rhLH、rhTSH和制剂缓冲液均无明显量效曲线，表明此方法专属性好。

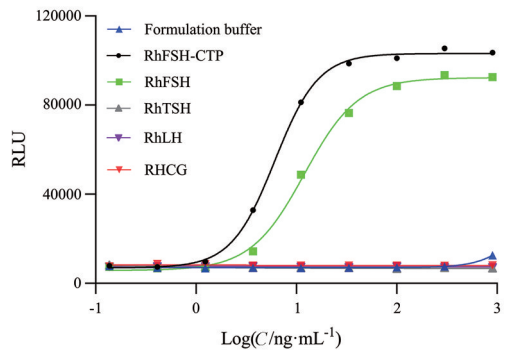


Figure 2 Dose-response curves of samples: 6 samples were added to stimulate the cells, RLU was measured, and the 4-parameter curve was plotted. rhLH: Recombinant human luteinizing hormone; rHCG: Recombinant human chorionic gonadaotropin; rhTSH: Recombinant human thyroid-stimulating hormone; rhFSH: Recombinant human follicle-stimulating hormone

2.2 相对准确度、中间精密度、线性和范围 由2名实验人员分别测定5个不同效价水平(50%、80%、100%、125%、200%)的相对效价，每个效价水平测定8次，每次2块96孔板。根据5个效价水平测定的相对效价结果计算5个不同效价水平几何均值和相对偏倚。相对效价的几何均值分别为：(53.87 ± 2.47)%、(81.58 ± 1.66)%、(96.76 ± 4.64)%、(127.03 ± 8.19)%、(207.62 ± 15.52)%。相对偏倚(RB)及其90%置信区间分别为7.7% (4.2%, 10.8%)、2.0% (0.6%, 3.3%)、−3.2% (−6.4%, −0.3%)、1.6% (−2.9%, 5.8%)、3.8% (−1.6%, 8.9%)，相对偏倚及置信区间的绝对值均小于11%，表明方法的相对准确度好。根据各效价水平测定结果的对数值计算GCV (%)，采用卡方检验计算GCV的95%置信区间上限，GCV%范围为2.1%～7.9%，说明该方法的中间精密度好。以5个不同效价水平理论值的自然对数(x)对其相应的效价测定值的自然对数(y)作直线回归，采用最小二乘法进行线性拟合，拟合的直线回归方程为$y = 0.974\ 2x + 0.020\ 9$，$R^2 = 0.994\ 8$。斜率在0.8～1.25内，$R^2 \geqslant 0.98$，该方法在50%～200%的效价水平范围内线性较好。

2.3 可靠性 《中华人民共和国药典》(2020年版)四部通则1431生物检定统计法可靠性检验对各变异项的要求为：回归项非常显著($P < 0.01$)、R^2非常显著($R^2 \geqslant 0.98$)、偏离平行项不显著($P \geqslant 0.05$)。本研究对R^2、回归项、偏离平行项进行统计，R^2均大于0.98 (最小值为0.986)，回归项均小于0.01 (最大值为$1.08e^{-23}$)，偏离平行项均大于0.05 (最小值为0.063)。结果符合药典规定，本方法测定结果的可靠性较好[9]。

2.4 破坏性 rhFSH-CTP对照品经60 ℃加热破坏3、4、8、20、24、72、120、168、240 h后，采用分子排阻色谱法测定主成分含量，数据结果如图3蓝线所示，随破坏时间的延长主成分含量逐渐降低，解离亚基含量不断升高，其中主成分含量分别为90%、81%、59%、58%、54%、43.4%、31.8%、23.8%、18.7%，表明该方法能够区分样品和其降解的物质。上述加热破坏后的rhFSH-CTP生物学活性如图3红线所示，与未经处理的rhFSH-CTP相比，随破坏时间的延长相对生物学活性逐渐降低，分别为93%、78%、66%、58%、54%、45%、41%、30%、34%。表明本方法可灵敏地反映加热破坏导致的rhFSH-CTP活性降低。

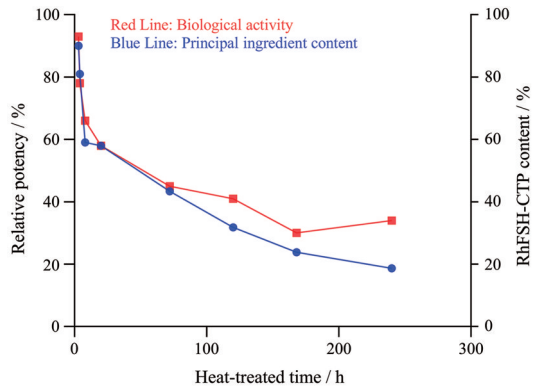


Figure 3 Results of main component content and biological activity of rhFSH-CTP after heat destruction

2.5 细胞代次稳定性 采用第5、13、24、40代CHO-K1-FSHR-CRE-Luc细胞测定同一份rhFSH-CTP的生物学活性，4个代次的细胞得到的量效曲线无明显差异，EC_{50}和信噪比的相对标准偏差(relative standard deviation; RSD)为8.75%和4.42%，结果均小于10%。表明该细胞系具有良好的传代稳定性。

2.6 多批次rhFSH-CTP生物学活性测定 取3批rhFSH-CTP原液(stock solution, SS)，来自两个生产厂家的8批rhFSH-CTP注射液。分别进行生物学活性测定，平行测定3次，结果如表1所示，每批样品测定结果均在规定范围内(70%～130%)，且RSD均不超过10%，表明该方法的重复性较好。

Table 1 Results of multiple batches of rhFSH-CTP biological activity assays

Sample	Biological activity			Average	RSD
SS A	94.1%	91.4%	97.7%	94.4%	2.73%
SS B	108.1%	89.1%	111%	102.77%	9.47%
SS C	99.4%	106.1%	102.9%	102.8%	3.26%
Injection A	115.0%	96.9%	100.2%	104.03%	7.57%
Injection B	101.5%	107.7%	98.1%	102.43%	3.88%
Injection C	91.3%	98.9%	100.5%	96.9%	4.14%
Injection D	110.1%	108.3%	96.5%	104.97%	5.75%
Injection E	117%	114.3%	108.7%	113.2%	3.21%
Injection F	86.6%	92.9%	89.1%	89.53%	2.89%
Injection G	98.7%	96%	112.9%	102.53%	7.23%
Injection H	96.5%	94.3%	104.2%	98.33%	4.32%

讨论

不孕不育症在我国的育龄夫妇中约有10%, 近年来适龄夫妇不孕不育率呈上升趋势[10]。FSH是辅助生殖技术临床应用最为广泛的药物, 随着市场需求的持续增长, FSH药物的研发热度显著上升, 尤其是长效重组FSH药物[11]。为推进我国FSH类创新药物的上市进程, 当前应提高和完善其生物学活性等关键质控方法。目前国际公认的活性测定法为雌幼大鼠卵巢增重法, 该法繁琐费时, 需耗用大量实验动物, 不符合“3R”原则。

本研究利用CHO-K1-FSHR-CRE-Luc转基因细胞通过对rhFSH-CTP初始浓度、细胞铺板密度、rhFSH-CTP孵育时间、稀释倍数和荧光底物刺激时间各实验参数的优化, 得到了良好的S型量效曲线, 为rhFSH-CTP建立了报告基因测定生物学活性方法。依据ICHQ2和中国药典进行了全面的方法学验证, 具有较好的专属性、相对准确度和精密度。根据《中华人民共和国药典》(2020年版) 四部通则1431生物检定统计法对上述优化及验证的结果进行了统计分析和计算, 结果均通过了平行性、模型失拟等可靠性检验[9]。以相同摩尔浓度的rhFSH-CTP和rhFSH刺激转基因细胞后拟合剂量效应曲线, 所得的EC_{50}值相差约8倍, 存在显著差异。可见本方法能够敏感区分因结构差异而与受体亲和力不同的配体分子。将rhFSH-CTP于60 ℃加热处理3、4、8、20、24、72、120、168、240 h同时测定其主成分含量和生物学活性, 结果表明主成分被加热破坏后引起了α和β亚基的解离, 引发了样品的生物学活性下降, 加热引起的主成分含量与体外生物学活性下降趋势一致。表明本方法能够灵敏地反映破坏样品的活性下降, 可以很好地验证结构与功能相关性。此外, 通过热破坏实验明确了该药物的热敏感阈值, 为冷链运输优化及临床使用中的临时高温暴露 (如运输延误) 提供了风险缓释策略。

但本文建立的rhFSH-CTP体外生物学活性测定方法中仍存在部分局限性, 本方法所使用的细胞为过表达FSHR的CHO细胞, 经基因构建后的工具细胞可能会导致基因组和表观遗传变化, 引起基因毒性[11], 从而影响细胞的稳定性, 包括基因丢失, 基因突变, 细胞凋亡风险增加等[12]。基于构建细胞常存在的缺陷, 可以考虑采用更符合人体细胞环境的模型, 例如卵巢肿瘤细胞的HTOG、COV434、KGN细胞系, 通过致癌性转化的HGL、HO-23、GCLa、HGP53细胞系等天然表达FSH受体的人卵巢颗粒细胞系[13]。但是天然表达受体的细胞系可能存在受体表达量不够高, 检测靶标物偏下游, 存在检测方法繁琐、信号偏低、灵敏度偏低等问题[14]。

rhFSH-CTP作为一种长效FSH药物, 其能够将循环FSH水平保持在足够卵泡生长一整周所需的阈值以上。其单次可以替代每天7次FSH注射, 并且可以使辅助生殖对患者更加友好[15]。目前已广泛应用于临床, 作为反映该类产品有效性的关键质量属性, 快速、简便、灵敏的生物学活性评价方法至关重要。本研究建立的报告基因体外测活方法采用96孔板进行高通量检测, 检测时间可缩短至2天, 显著缩短药物初筛耗时和药物研发周期。与传统体内动物法相比, 操作更简便, 结果准确度更高、精密度更好, 且能够显著提升检测效率、降低实验成本, 可极大地促进FSH-CTP药物的研发与生产。体外培养的细胞模型, 还可以阐明FSH-CTP药物在细胞水平的摄取、分布、代谢、排泄等动力学过程[16]。目前我国自主研发的一类新药rhFSH-Fc已经进入临床研究, 同时有多家国内企业处于临床前研究阶段。因此, 推测将本文建立的体外生物学活性测定方法也可应用于此类药物[17]。综上, 该方法对产品的适用性, 形成标准化的基于报告基因的重组人促卵泡激素体外生物学活性测定方法, 使该方法能更好地应用于rhFSH类产品的质控, 在此类产品的工艺筛选、过程控制、终产品放行及稳定性研究方面具有应用价值[18]。

作者贡献: 许凯心和王绿音负责实验设计文章撰写; 孙铭健和白璧炜文献检索; 吕萍对文章进行客观核对; 李晶、高向东和梁成罡对文章进行指导和修改。

利益冲突: 所有作者声明没有利益冲突。

References

[1] Scholtes MC, Schnittert B, Van Hoogstraten D, et al. A comparison of 3-day and daily follicle-stimulating hormone injections on stimulation days 1–6 in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation [J]. Fertil Steril, 2004, 81: 996-1001.

[2] Ben-Menahem D. Preparation, characterization and application of long-acting FSH analogs for assisted reproduction [J]. Theriogenology, 2018, 112: 11-17.

[3] Casarini L, Crépieux P. Molecular mechanisms of action of FSH [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2019, 10: 305.

[4] Yang YF, Wang LY, Liang YL, et al. Determination of biological activity of human insulin by time-resolved fluorescence immunoassay [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2022, 42: 51-59.

[5] Alper M, Meyer R, Dekkers C, et al. Assessment of the biopotency of follitropin alfa and lutropin alfa combined in one injection: a comparative trial in Sprague-Dawley rats [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2008, 6: 31.

[6] Wang LY, Yang Y, Zhang H, et al. Determination of biological activity of human insulin by homogeneous time-resolved fluorescence [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2022, 57: 3223-3228.

[7] Tabatabaei MS, Ahmed M. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. Methods Mol Biol, 2022, 2508: 115-134.

[8] Guo X, Yu C, Wang L, et al. Development and validation of a reporter gene assay for bioactivity determination of anti-CGRP monoclonal antibodies [J]. Anal Biochem, 2021, 634: 114291.

[9] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2020 Ed. Vol IV. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 196.

[10] Yang F, Huang H, Li YC, et al. Properties and pharmacokinetics of novel long-acting recombinant follicle-stimulating hormones [J]. China Biotechnol (中国生物工程杂志), 2014, 34: 45-51.

[11] Tihanyi B, Nyitray L. Recent advances in CHO cell line development for recombinant protein production [J]. Drug Discov Today Technol, 2020, 38: 25-34.

[12] Rothe M, Modlich U, Schambach A. Biosafety challenges for use of lentiviral vectors in gene therapy [J]. Curr Gene Ther, 2013, 13: 453-468.

[13] Havelock JC, Rainey WE, Carr BR. Ovarian granulosa cell lines [J]. Mol Cell Endocrinol, 2004, 228: 67-78.

[14] Szymańska K, Kałafut J, Przybyszewska A, et al. FSHR transactivation and oligomerization [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2018, 9: 760.

[15] Pouwer AW, Farquhar C, Kremer JA. Long-acting FSH *versus* daily FSH for women undergoing assisted reproduction [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2015, 2015: CD009577.

[16] Song B, Gu JX, Wang YF, et al. Research on alternative technology of laboratory animals [J]. Acta Lab Anim Sci Sin (中国实验动物学报), 2020, 28: 680-687.

[17] Sun S, Wang LY, Li J, et al. Study on the determination method of biological activity of recombinant human follicle-stimulating hormone Fc fusion protein based on reporter gene [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2022, 42: 60-67.

[18] Wang LY, Lv P, Zhang H, et al. Joint validation of *in vitro* assay method for the determination of biological activity of recombinant human follicle-stimulating hormone [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2023, 58: 760-766.