

## 重组人生长激素体外生物学活性测定 Nb2-11 细胞增殖法的联合验证

张孝明<sup>1,2#</sup>, 李鹤洋<sup>1,2#</sup>, 邓哲<sup>3</sup>, 齐乃松<sup>4</sup>, 吴熙<sup>5</sup>, 李懿<sup>1,2</sup>, 王绿音<sup>1,2</sup>,  
吕萍<sup>1,2</sup>, 梁成罡<sup>1,2</sup>, 李晶<sup>1,2\*</sup>

(1. 中国食品药品检定研究院, 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. 药品监管科学全国重点实验室, 北京 102629; 3. 吉林大学生命科学学院, 吉林 长春 130012; 4. 河南省药品医疗器械检验院, 河南省疫苗批签中心, 河南 郑州 450008; 5. 深圳市药品检验研究院, 广东 深圳 518057)

**摘要:** 为探索基于 Nb2-11 细胞增殖的重组人生长激素 (rhGH) 体外生物学活性测定方法的标准化, 本研究首先检测了 2 批 rhGH 原液, 3 批注射用 rhGH 和 24 批 rhGH 注射液的生物学活性, 初步制订了实验有效标准。进一步按照《中华人民共和国药典》2020 年版通则 9401 进行方法学验证。随后联合 7 家实验室采用本方法测定来自 4 家不同生产企业的 6 批制剂及 2 批原液的体外生物学活性, 分别对实验室间一致性, 实验室内和实验室间精密性进行了研究。用本方法和体内动物法分别检测 28 批 rhGH 原液, 进行体内外结果一致性研究。最后检测多批不同效期 rhGH 样品, 进行标准限度研究。联合验证结果表明, 本方法具有良好的实验室内及实验室间重现性, 拟订实验有效标准通过率为 100%。本方法与体内动物法检测结果具有良好的一致性。动物实验获得中国食品药品检定研究院实验动物福利伦理委员会批准 [批准号: 中检动 (福) 第 2024 (B) 004 号]。本方法适用于国内外不同生产厂家的 rhGH 原液与制剂, 可作为测定 rhGH 类产品生物学活性的标准化方法替代体内动物法应用于 rhGH 的质量控制和放行检验。

**关键词:** 重组人生长激素; 生物学活性; 细胞增殖法; 方法学验证; 联合验证

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)03-0784-07

## A collaborative study to evaluate the NB2-11 cell proliferation bioassay for human recombinant growth hormone

ZHANG Xiao-ming<sup>1,2#</sup>, LI He-yang<sup>1,2#</sup>, DENG Zhe<sup>3</sup>, QI Nai-song<sup>4</sup>, WU Xi<sup>5</sup>, LI Yi<sup>1,2</sup>,  
WANG Lü-yin<sup>1,2</sup>, LÜ Ping<sup>1,2</sup>, LIANG Cheng-gang<sup>1,2</sup>, LI Jing<sup>1,2\*</sup>

(1. NHC Key Laboratory of Research on Quality and Standardization of Biotech Products, NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Biological Products, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China; 2. State Key Laboratory of Drug Regulatory Science, Beijing 102629, China; 3. College of Life Science, Jilin University, Changchun 130012, China; 4. Henan Institute for Drug and Medical Device Inspection, Henan Vaccine Issuance Center, Zhengzhou 450008, China; 5. Shenzhen Institute for Drug Control, Shenzhen 518057, China)

**Abstract:** To explore the standardization of the *in vitro* Nb2-11 cell proliferation bioassay for recombinant human growth hormone (rhGH), we first tested the biological activity of 2 batches of rhGH drug substances, 3 batches of rhGH for injection, and 24 batches of rhGH injections, based on which we proposed the experimental effective criteria. Furthermore, we conducted methodological validation in accordance with General Rule 9401 of

收稿日期: 2024-10-10; 修回日期: 2024-12-12.

基金项目: 2023 年《中华人民共和国药典》药品标准提高课题 (2023S08); 药品监管科学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: li\_jing@nifdc.org.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0985

the 2020 edition of the Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Subsequently, the inter-laboratory consistency, intra-laboratory and inter-laboratory precision of seven labs were studied by determining the *in vitro* bioactivity of six batches of rhGH products and two batches of rhGH drug substances from four different manufacturers using this method. The consistency of the *in vitro* and *in vivo* bioassays was assessed by evaluating 28 batches of rhGH drug substances with both methods. Finally, multiple batches of rhGH samples with different expiration dates were tested to determine the standard limits of the bioassay. The results of this collaborative study indicate that the Nb2-11 cell bioassay exhibits good intra- and inter-laboratory reproducibility, with a 100% pass rate for the experimental effective criteria. The Nb2-11 cell bioassay had high consistency with *in vivo* animal bioassay. Animal experiments were approved by the Experimental Animal Welfare Ethics Committee of China National Institute of Food and Drug Control (approval number: NIFDC (Fu) No. 2024 (B) 004). This method is applicable to rhGH drug substances and products from different manufacturers. Collectively, the Nb2-11 cell bioassay can be used as a standardized method for determining the biological activity of rhGH products, replacing *in vivo* animal methods for quality control and release testing.

**Key words:** recombinant human growth hormone; bioactivity; cell proliferation assay; method validation; collaborative validation

重组人生长激素 (recombinant human growth hormone, rhGH) 是通过基因重组技术在体外表达的人生长激素蛋白药物。rhGH 与人脑垂体产生的生长激素化学结构完全一致, 生理、药理作用也保持一致, 可明显促进矮小儿童的身高增长, 并改善其全身各器官组织的生长发育<sup>[1-3]</sup>。随着人们对 rhGH 功能认识的不断提高, rhGH 药物的应用也正日益增加<sup>[4]</sup>, 市场规模正在迅速增长, 预计到 2030 年全球 rhGH 市场价值将增至 92 亿美元<sup>[5]</sup>。我国是目前全球第一大 rhGH 用药国。截至 2024 年 7 月, 国家药品监督管理局已批准 5 个国内厂家的 35 个不同规格的 rhGH 产品注册, 其中 4 个厂家的 30 个产品已上市, 分为注射用 rhGH 和 rhGH 注射液两种剂型, 批准的适应症已达 12 个; 另外还批准了 2 个国外厂家的 11 个 rhGH 产品在我国注册。

rhGH 生物学活性与其结构功能密切相关, 生物学活性是评价 rhGH 有效性的关键指标。《中华人民共和国药典》2020 版 (ChP2020) 收载 rhGH 生物活性测定方法仅有体内动物法<sup>[6]</sup>, 要求对 rhGH 原液进行至少每年一次生物学活性测定, 限度要求应不低于  $2.5 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。该方法需要构建去垂体大鼠实验模型, 需要自幼龄 (26~28 天) 大鼠下颌去除脑垂体, 且不能碰触其他脑组织, 不能有垂体残留, 手术操作繁琐且要求极高, 很多已上市企业都不具备相关检测技术。而且由于术后动物存活率通常不超过 50%, 每检测一批 rhGH 样品的生物学活性都需要消耗上百只大鼠, 不符合“3R”原则要求<sup>[7]</sup>。术后大鼠还需要恢复 2~3 周才能用于实验, rhGH 的活性测定还需要连续给药 6 日, 整个实验耗时 3~4 周, 很难满足常规生物学活性测定的要求。欧洲药典 (EP) 从 2000 年第 3 版删除体内动物法, 美国药典 (USP) 也从 2023 版删除了体内法, 仅保留体外细胞法,

要求对 rhGH 原料药或成品进行生物鉴别, 生物学活性应不低于  $2.0 \text{ USP somatropin U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

为建立高效、简便的 rhGH 体外活性替代法, 前期研究建立了基于 Nb2-11 细胞增殖的 rhGH 体外活性测定法, 该方法的原理是大鼠淋巴瘤细胞 Nb2-11 表达催乳素受体 (prolactin receptor, PRLR), rhGH 可以与 PRLR 结合促进 Nb2-11 细胞增殖<sup>[8]</sup>。Nb2-11 细胞法不仅可缩短检测时间至 2 天, 而且检测结果与体内动物法有良好的一致性<sup>[9]</sup>。为使该方法能更好地应用于 rhGH 类产品, 基于国家药典委员会《基于 Nb2-11 细胞增殖的人生长激素生物学活性测定方法研究》课题, 本研究探索了 Nb2-11 细胞法标准化应用的可行性。首先根据 29 批 rhGH 产品的检测结果初步拟定了实验有效标准, 随后征集了国内外已上市 8 批 rhGH 产品, 邀请相关产品生产企业、省级药检机构等 7 家实验室开展实验室间联合验证, 根据 7 个实验室的测定结果, 对实验室间测定结果的一致性 & 精密度进行分析, 又用体内动物法和体外细胞法分别检测了 28 批 rhGH 原液的生物学活性, 研究了体外细胞法替代体内动物法的可行性。最后征集协作研究单位近、中、远效期共 49 批 rhGH 样品的检测结果, 初步拟定了方法的标准限度。本研究为 rhGH 产品质量控制和放行检验提供了新的标准化体外活性测定方法。

## 材料与方法

**仪器** 多功能酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司, 内置 Softmax Pro 7.1 软件); TC-20 全自动细胞计数仪 (美国 Bio-Rad 公司); 微孔板振荡器 (德国 IKA 公司); Enspire 多功能酶标仪 (美国 PerkinElmer 公司, 内

置软件版本4.13.3005.1482)。

**供试品与试剂** CellTiter-Glo<sup>®</sup>发光法细胞活力检测试剂盒 (cell Titer-Glo luminescent kit, 批号0000504104)、Fischer's 培养基 (批号2381043)、胎牛血清 (FBS, 批号2236255CP)、马血清 (HS, 批号1763585)、 $\beta$ -巯基乙醇 (批号2279505)、L-谷氨酰胺 (批号2192423)、磷酸盐缓冲液 (PBS, 批号2277093), 购于美国Gibco公司。人生长激素标准品 (批号140635-202206, 比活性为3 IU·mg<sup>-1</sup>) 由中国食品药品检定研究院提供。rhGH 供试品共35批为本实验室留存, 包括5批rhGH原液 (上海联合赛尔2批、长春金赛1批、安徽安科2批), 5批注射用rhGH (上海联合赛尔2批、长春金赛3批) 和25批rhGH注射液 (上海联合赛尔4批、长春金赛6批、安徽安科2批、诺和诺德7批, 中山海剂6批)。其中用于联合验证的供试品B1和B2为厂家B的注射用rhGH, C1和C2为厂家C的rhGH注射液, D1和D2为厂家D的rhGH原液, E1和E2为厂家E的rhGH注射液。近、中、远效期的rhGH样品为各协作研究单位留存。牛血清白蛋白冻干粉 (北京经科化学试剂公司进口分装); 氯化钠注射液 (石家庄四药有限公司, 批号1910113203)。Nb2-11细胞株购自欧洲认证细胞培养物收藏中心 (ECACC)。

**实验动物** SPF级SD雄性大鼠, 出生日龄26~28 d, 体重60~80 g, 由中国食品药品检定研究院实验动物中心提供 [合格证号: SYXK (京) 2022-0014]。

**试剂配制** 完全培养液: Fischer's 培养基 + 10% 热灭活FBS + 10% 热灭活HS + 碳酸氢钠溶液 (终浓度0.075%) +  $\beta$ -巯基乙醇 (终浓度0.05 mmol·L<sup>-1</sup>)。工作培养液: Fischer's 培养基 + 1% 热灭活HS + 碳酸氢钠溶液 (终浓度0.075%) +  $\beta$ -巯基乙醇 (终浓度0.05 mmol·L<sup>-1</sup>)。

**细胞生长曲线考察** 取冻存的Nb2-11细胞, 置于37℃水浴复苏后, 用完全培养液进行培养并扩增。扩增后的细胞用完全培养液调至细胞密度每毫升为 $1.0 \times 10^4$ 、 $2.0 \times 10^4$ 、 $5.0 \times 10^4$ 和 $1.0 \times 10^5$ 个, 上述细胞分别接种至2个不同的T25培养瓶中, 每瓶5 mL, 每隔24 h计数。细胞密度为每毫升 $1.0 \times 10^5$ 个的细胞悬液由于接种密度高, 可测的对数生长期短, 为此在对数生长期时每隔12 h计数。为提高计数准确率, 每个时间点取2瓶中的细胞计数, 并在计数前将瓶中细胞悬液充分混匀, 如此操作直至第5天结束。以培养时间为横坐标, 活细胞密度为纵坐标, 利用GraphPad Prism绘制细胞生长曲线图, 根据生长曲线图的对数生长期计算细胞倍增时间, 计算公式为 $T_d = \Delta t \times \lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)$ , 其中,  $T_d$ 为倍增时间,  $\Delta t$ 为计数时间间隔天数,  $N_t$ 为对数生长期任意一天的观察值,  $N_0$ 为对数生长期初期对应的初始值。

**rhGH体外生物学活性检测** 将对数生长期的

Nb2-11细胞用PBS清洗2次后计数, 加入工作培养液调整细胞密度为每毫升 $1.0 \times 10^5$ 个。将细胞悬浮液以每孔50  $\mu$ L加到96孔不透光细胞培养板中 (每孔约5000个细胞) 备用。将rhGH标准品和rhGH供试品用工作培养液稀释至 $60 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 再在96孔细胞培养板中做3倍系列稀释, 共10个稀释度, 每个稀释度3个孔。将稀释好的溶液加入已接种细胞的培养板中, 每孔50  $\mu$ L, 每个药物浓度标准品和样品交叉上样3个复孔 (药物作用起始终浓度为 $30 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。将细胞培养板置于37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下培养 $30 \pm 2 \text{ h}$ 。培养结束后, 以每孔100  $\mu$ L向培养板中加入cell Titer-Glo luminescent发光底物溶液。将细胞培养板置于微孔板振荡器上, 室温避光振荡混匀15 min, 随后静置15 min, 用酶标仪读取各孔luminescence发光值。

**实验有效标准的拟订** 实验有效标准要求包括系统适用性要求和可靠性测验要求。系统适用性要求评判了该次试验是否有效。USP-NF2024通则<126>系统适用性要求曲线信噪比应不低于3, 每组数据拟合曲线技术异常值不超过4个, 供试品95%置信区间应为测定值的75%~133%。此外, USP-NF2024通则<1034>四参数回归计算法中指出完整的四参数是可靠性测验分析和效价计算的前提。ChP2020通则1431四参数回归计算法要求对照品和供试品拟合曲线决定系数 $R^2$ 应 $\geq 0.98$ , 每一剂量组反应值的相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 应 $\leq 10\%$ 。基于国内外药典调研, 本研究设置“标准品和供试品的四参数剂量反应曲线应当完整, 上、下渐近线应各至少包含一个浓度点, 线性部分至少包含两个浓度点”的四参数曲线要求, 并对标准品和供试品的剂量反应曲线的上下渐近线比值、拟合度 $R^2$ 、每一剂量组反应值的RSD及供试品95%置信区间作为系统适用性评价指标。可靠性测验指标评价了试验数据拟合后的模型是否可用于效价计算, 样品是否可出具有效报告值。参照ChP2020通则1431四参数回归计算法, 本研究拟对回归项、偏离平行和模型失拟的结果判断显著性水平 $\alpha$ 的取值进行考察。利用Nb2-11细胞法测定了5个厂家的29批rhGH样品的生物学活性, 包括3批rhGH原液, 3批注射用rhGH和23批rhGH注射液, 并对其中1批注射液在3个不同日期分别测定3次, 共得到31个测定结果。通过对31个结果的分析初步拟定了实验有效标准。

**数据结果分析** 以标准品或供试品溶液浓度的对数为横坐标, 发光值为纵坐标, 照ChP2020生物检定统计法通则1431中的四参数回归计算法进行实验数据处理, 按下述公式计算供试品相对效价和生物学活性: 供试品相对效价 =  $E_r/E_s \times 100\%$ 。式中,  $E_r$ 为约束模型

中标准品的 50% 效应浓度,  $E_s$  为约束模型中供试品的 50% 效应浓度。供试品生物学活性 ( $IU \cdot mg^{-1}$ ) = 供试品相对效价  $\times$  标准品比活 ( $IU \cdot mg^{-1}$ )。

**方法学验证** 按照通则 9401 采用合并设计, 验证方法的相对准确度、中间精密性、线性和范围。取 rhGH 标准品, 制备  $60 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  浓度的 rhGH 标准品溶液作为对照。再将 rhGH 标准品用工作培养液分别稀释成 30、42.6、60、84.6、120  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  浓度的待测样品, 5 种待测样品对应于  $60 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  浓度的 rhGH 对照品溶液的相对效价分别为 50%、71%、100%、141% 和 200%。上述待测样品分别在 96 孔细胞培养板中进行 3 倍梯度稀释, 共 10 个稀释度。由 4 名实验人员在 4 个不同日期进行相对效价检测。按照拟定的实验有效标准和 ChP2020 通则 9401 进行结果分析。

**统计学分析** 实验数据经 GraphPad Prism 8.0 软件统计处理, 通过  $F$  检验分析回归方程的显著性,  $P < 0.05$  认为直线呈显著回归。S 曲线所有的点的结果均为各浓度下三复孔平均值  $\pm$  标准差。

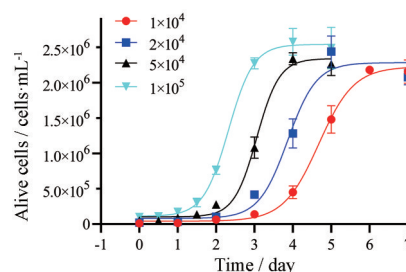
**精密性联合验证** 分发来自 3 家国内生产企业的 2 批注射用 rhGH、2 批 rhGH 原液、2 批 rhGH 注射液和 1 家国外生产企业的 2 批 rhGH 注射液至 6 个协作研究实验室。本实验室及 6 个协作研究实验室均以 rhGH 标准品为对照品检测各批样品的相对效价, 并在不同日期对其中 1 批国产注射液 (样品 C1) 重复检测 3 次。统计学分析包括: ① 利用 Shapiro-Wilk 检验分析 7 家实验室检测 8 批样品结果的正态性, 然后利用单因素方差分析考察 7 组结果的一致性; ② 7 家实验室测定 C1 的 3 次结果分别取自然对数后计算几何变异系数 GCV%, 分析实验室内精密性; ③ 分别计算 7 家实验室测定 C1 的平均效价并取自然对数后计算几何变异系数 GCV%, 计算 7 家实验室测定 8 批样品结果的 GCV%, 分析实验室间精密性。

**rhGH 体内生物学活性检测** 用 0.1% 牛血清白蛋白溶液配制高剂量 rhGH 标准品溶液 ( $0.2 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 和低剂量 rhGH 标准品溶液 ( $0.05 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 按估计效价照标准品溶液的制备配制 rhGH 原液稀释液作为供试品溶液。取去垂体手术后 2~3 周、术前体重变化  $< 10\%$  的幼龄大鼠, 按体重随机分成 4 组, 每组至少 8 只, 每只编号并记录体重。分别自颈部皮下注射标准品溶液或供试品溶液 0.5 mL, 每日 1 次, 连续 6 天。于最后 1 次给药后 24 h 称体重, 处死动物。每只动物给药后体重增加的克数作为反应值, 按照 ChP2020 反应平行线测定法计算效价及实验误差。本实验获得中国食品药品检定研究院实验动物福利伦理委员会批准 [批准号: 中检动 (福) 第 2024 (B) 004 号]。

## 结果

### 1 Nb2-11 细胞传代培养方式的确定

Nb2-11 细胞法的建立基于 rhGH 与 Nb2-11 细胞表面的催乳素受体结合后能刺激其增殖。Nb2-11 细胞作为关键材料可对实验结果产生重大影响。只有当细胞处于对数生长期, 状态最佳时才可用于活性测定。为获得适宜的 Nb2-11 细胞日常培养基本条件和参数, 为联合验证参与实验室提供参考, 本研究首先考察了不同细胞接种密度下 Nb2-11 细胞的倍增时间。如图 1 所示, 细胞接种密度影响了 Nb2-11 细胞进入对数生长期的时间。根据生长曲线图的对数生长期计算细胞倍增时间 (表 1), Nb2-11 细胞在完全培养液中倍增时间约为 12~16 h。根据 Nb2-11 细胞生长曲线考察结果, 按如下方式进行传代培养: 接种密度约每毫升  $1 \times 10^4$  个, 传代后 4 天用于实验; 接种密度约每毫升  $2 \times 10^4$  个, 传代后 3 天用于实验; 接种密度约每毫升  $1 \times 10^5$  个, 传代后 2 天用于实验。



**Figure 1** Nb2-11 cell proliferation profile at different seeding densities

**Table 1** Doubling time of Nb2-11 cells at different seeding densities.  $N_0$ : Cell density corresponding to the beginning of the logarithmic growth phase;  $N_t$ : Observed cell density on any given day during the logarithmic growth phase;  $\Delta t$ : Interval time between  $N_0$  and  $N_t$ ; Td: Cell doubling time

Seeding density / $\times 10^4$ per mL	$N_0/\times 10^4$ per mL	$\Delta t$ / h	$N_t/\times 10^4$ per mL	Td/h
1	13.775	24	45.175	14
		48	148.000	14
2	10.485	24	41.600	12
		48	128.225	13
5	4.805	24	13.750	16
		24	27.575	15
10	11.025	24	30.475	16
		24	53.275	15

### 2 实验有效标准的拟定

对本实验室留存的 29 批样品测定的 31 次检测结果进行系统适用性设定要求分析 (标准品和供试品的四参数剂量反应曲线应当完整, 上、下渐近线应各至少包含一个浓度点, 线性部分至少包含两个浓度点),

四参数曲线要求通过率为100%，标准品与供试品剂量反应曲线上、下渐近线比值在3.77~18.87内， $R^2$ 值在0.980~0.995内。复孔间RSD  $\leq 10\%$ 的通过率为41.9%，复孔间RSD  $\leq 20\%$ 的通过率为100%。供试品95%置信区间测定值在79.0%~126.6%内。基于上述结果将系统适用性要求拟定为：标准品和供试品的四参数剂量反应曲线应当完整，上、下渐近线应各至少包含一个浓度点，线性部分至少包含两个浓度点。标准品与供试品剂量反应曲线上、下渐近线比值应不小于3， $R^2$ 应不小于0.98，复孔间RSD应不大于20%。供试品相对效价95%置信区间应为测定值的75%~133%。

该31次检测数据的可靠性测验中，回归项应非常显著 ( $P < 0.01$ ) 通过率为100%。当显著性水平  $\alpha$  取0.05时，偏离平行项应不显著的通过率为96.8%，当  $\alpha$  取0.01时，偏离平行项应不显著的通过率为100%。当  $\alpha$  取0.05或0.01时，模型失拟项应不显著的通过率分别为90.3%和83.9%。根据ChP2020通则1431，个别情况下，当残差II或误差项的方差非常小时，偏离平行或模型失拟检验结果可能判为显著。上述验证结果偏离平行和模型失拟应不显著的通过率不能达到100%的原因可能是由于复孔间差异极小导致的误判。因此，结合本研究31次检测数据及企业历史数据可靠性检验分析结果，将偏离平行不显著的判定要求设为  $P \geq 0.01$ ，并以  $R^2$  代替模型失拟进行拟合优度评价。

### 3 方法学验证

为确定拟订系统适用性及可靠性检验要求设置的可行性，由4名人员参照ChP2020四部通则9401对方法的相对准确度、中间精密度、线性和范围进行了验证，所有试验结果均符合拟订系统适用性及可靠性检验要求。

**3.1 相对准确度** 4名实验人员测定5个效价水平的rhGH标准品的相对效价几何均值分别为：(50.76  $\pm$  3.39)%、(71.94  $\pm$  3.01)%、(98.60  $\pm$  3.50)%、(139.25  $\pm$  3.17)%、(194.99  $\pm$  9.13)%。相对偏倚及其90%置信区间分别为1.06% (-5.65%, 8.25%)、1.15% (-3.04%, 5.52%)、-1.52% (-4.95%, 2.04%)、-1.29% (-3.52%, 0.99%)、-2.70% (-6.94%, 1.74%)。在50%~200%效价内测定的相对效价的相对偏倚在 $\pm 12\%$ 内，符合通则9401相对偏倚的要求。

**3.2 线性** 根据通则9401，拟合50%~200%效价理论值自然对数和效价测定值自然对数的直线回归方程，回归方程为  $Y = 0.971X - 0.007$ ，相关系数为0.982，符合通则9401“直线回归方程的斜率应在0.80~1.25，相关系数应不低于0.98”的要求。

**3.3 中间精密度** 5个效价水平相对效价测定值的几何

变系数(GCV%) 在3.5%~10.8%，均小于20%，GCV的95%置信上限在6.3%~20.3%，中间精密度良好。

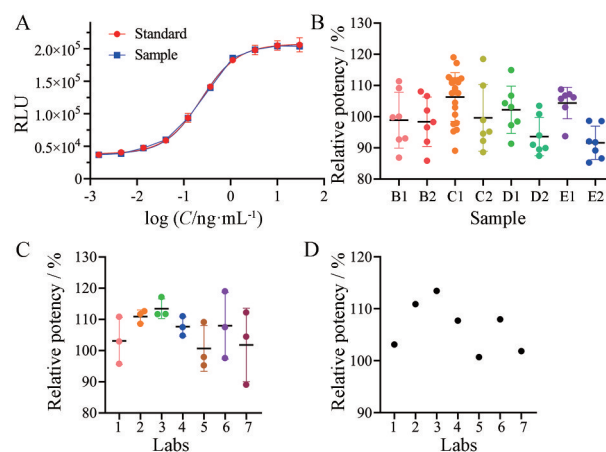
**3.4 范围** 根据相对准确度、中间精密度和线性的结果，本方法可检测的效价水平范围为50%~200%。

### 4 精密度联合验证

7个实验室分别对编号为B1~E2的样品进行活性测定，拟合四参数方程剂量效应曲线如图2A。7家实验室检测8批rhGH样品结果均符合拟定的实验有效标准要求。如图2B所示，除样品C1得到21个测定结果外，其余7批样品分别得到7个测定结果。7家实验室检测8批样品共得到80个相对效价结果，在85%~119%内，利用平均值 $\pm 3SD$ 计算相对效价范围在74%~127%。8批样品各个实验室检测结果的均值在93%~108%，RSD在4.84%~10.64%内，Shapiro-Wilk检验分析7家实验室测定结果的 $P$ 值均大于0.05，结果呈正态分布。单因素方差分析考察7组相关测定结果 $P$ 值为0.78，差别不具有统计学意义，表明7家实验室检测8批样品结果的均值具有一致性。图2C为7家实验室对C1分别测定3次相对效价的结果，将上述结果取自然对数，并计算几何变异系数GCV%，7家实验室测定结果的几何变异系数GCV%均小于20%，表明实验室内精密度良好。图2D为7家实验室对C1分别测定3次相对效价的平均值，计算几何变异系数GCV%结果为4.56%。7个实验室检测8批样品结果的GCV%为9.22%，表明实验室间精密度良好。

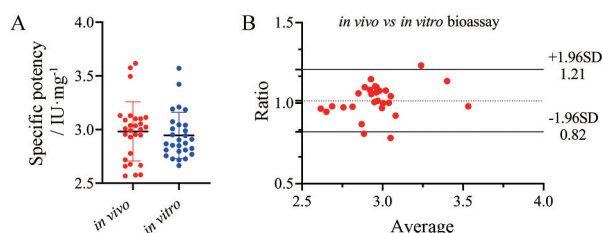
### 5 体内外结果一致性分析

利用Nb2-11细胞法和体内动物法分别检测28批rhGH原液的生物学活性，体内法检测比活性结果均值



**Figure 2** Overview of the relative bioactivity of recombinant human growth hormone (rhGH) detected by 7 labs. A: Represented dose-response curve of rhGH; B: Relative bioactivity of 8 batches of rhGH detected by 7 labs; C: Relative bioactivity of rhGH sample C1 detected by 7 labs; D: Average relative bioactivity of rhGH sample C1 detected by 7 labs. RLU: Relative light units

为  $2.99 \text{ IU}\cdot\text{mg}^{-1}$ , RSD 为 9.3%, 体外法检测结果均值为  $2.95 \text{ IU}\cdot\text{mg}^{-1}$ , RSD 为 7.4% (图 3A)。对结果进行双样本  $t$  检验, 显著性水平  $P = 0.581$ , 表明两种方法检测结果无显著差异。对两种方法测定结果进行 Bland-Altman 分析 (图 3B), 两种方法平均比率为 1.016, 几乎所有数据点均在 95% 一致性区间内 (0.82~1.21), 表明两种方法具有较好的一致性。



**Figure 3** Comparison of the Nb2-11 cell bioassay and *in vivo* bioassay (classic method). A: Relative bioactivities of 28 batches of rhGH were estimated by Nb2-11 cell bioassay and *in-vivo* bioassay; B: Agreement between the two methods was analyzed using the Bland Altman plot. The middle dotted line represents the average ratio of the two methods, and the upper and lower dotted lines represent the 95% agreement limits

## 6 不同效期 rhGH 样品生物学活性检测

从 4 家生产企业征集了各自留样的近、中、远效期共 49 批 rhGH 样品的体外活性检测结果, 包括 12 批注射用 rhGH、15 批 rhGH 注射液和 22 批 rhGH 原液, 测得相对效价平均值和结果范围分别为 100% (89%~109%)、100% (87%~115%)、108% (90%~119%), 比活性平均值和结果范围分别为  $3.0 \text{ IU}\cdot\text{mg}^{-1}$  ( $2.7\sim 3.2 \text{ IU}\cdot\text{mg}^{-1}$ )、 $3.0 \text{ IU}\cdot\text{mg}^{-1}$  ( $2.6\sim 3.5 \text{ IU}\cdot\text{mg}^{-1}$ )、 $3.2 \text{ IU}\cdot\text{mg}^{-1}$  ( $2.7\sim 3.5 \text{ IU}\cdot\text{mg}^{-1}$ )。利用平均值  $\pm 3\text{SD}$  计算 49 批 rhGH 样品相对效价范围在 76%~128%, 比活性范围在  $2.6\sim 3.5 \text{ IU}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。

## 讨论

自 1985 年利用大肠杆菌生产的第一个 rhGH 被 FDA 批准用于治疗儿童生长激素缺乏症以来, 全世界已有几十款 rhGH 药物获批上市。尽管 rhGH 已被公认为是安全有效的药物, 不良反应相对较少, 但 rhGH 的修饰和变异, 如脱酰胺、氧化和二聚化等仍有可能在发酵和纯化过程中出现。虽然许多精密的理化技术可用于分析 rhGH 的异质结构, 但仍不能替代生物活性测定。

近年来, 各国监管机构都在推动基于细胞的生物学活性方法应用于生物大分子药物的放行及稳定性分析。由于生长激素体内活性测定法操作难度极高, 需要消耗大量的动物, EP 和 USP 均已删除体内活性测定

法。为对 rhGH 的生物学活性进行有效的质量控制, 在前期研究建立的基于 Nb2-11 细胞增殖的生物学活性测定方法的基础上, 本研究对国内所有生长激素类药物生产企业进行了技术转移和培训。细胞增殖法对细胞生长状态要求高, 实验条件或操作人员变化均可能影响实验结果。本研究根据 Nb2-11 细胞生长曲线考察结果, 推测了 Nb2-11 细胞的倍增时间和传代培养方式, 为该方法的顺利推广奠定了基础。

为建立标准化的测定 rhGH 活性的平台方法, 本研究首先结合国内外药典规定拟定了实验有效标准, 并通过 29 批 rhGH 产品的检测结果初步验证了实验有效标准。随后由 4 名实验人员分别测定 5 个效价水平的 rhGH 标准品的相对效价, 对拟定的实验有效标准、相对准确度、中间精密度、线性和范围进行了研究。结果表明拟定的实验有效标准通过率为 100%, 方法在 50%~200% 的验证范围内准确度高、精密度良好、线性符合 ChP2020 通则 9401 要求。进一步, 联合 7 家实验室, 对 8 批 rhGH 样品进行生物学活性测定, 结果表明 7 家实验室检测结果具有一致性, 实验室间精密度良好, 各实验室内精密度也良好。统计了 8 批样品共 80 次相对效价测定结果的范围在 85%~119%, 利用平均值  $\pm 3\text{SD}$  计算相对效价限度范围在 74%~127%, 这与 49 批近、中、远效期 rhGH 样品测得相对效价平均值  $\pm 3\text{SD}$  计算限度范围 (76%~128%) 基本一致。此外, 7 家实验室检测 2 批 rhGH 原液的 14 次测定结果平均值为  $2.9 \text{ IU}\cdot\text{mg}^{-1}$ , 22 批近、中、远效期 rhGH 原液测定结果平均值为  $3.0 \text{ IU}\cdot\text{mg}^{-1}$ , 表明体外法检测 rhGH 原液生物学活性均不小于原体内法标准限度规定的  $2.5 \text{ IU}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。

为探索 Nb2-11 细胞法替代体内动物法的可行性, 本研究用两种方法分别检测了 28 批 rhGH 原液的生物学活性, 体内法和体外法检测比活性结果均值分别为  $2.99 \text{ IU}\cdot\text{mg}^{-1}$  和  $2.95 \text{ IU}\cdot\text{mg}^{-1}$ , 双样本  $t$  检验表明两种方法检测结果无显著差异, Bland-Altman 分析两种方法测定结果的差值 95% 一致性区间 (差值的 1.96 个标准差范围) 为 0.82~1.21, 图 3B 可见几乎所有数据点均位于 95% 一致性区间内, 表明两种方法具有较好的一致性。以上研究为 Nb2-11 细胞法替代体内动物法提供了可靠数据支持。从作用机制上看, 体内动物法的原理是基于 rhGH 对去垂体大鼠的增重作用, 而 Nb2-11 细胞法是基于 rhGH 与催乳素受体结合后对 Nb2-11 细胞的增殖促进作用。虽然细胞法实际上反映了 rhGH 的催乳活性, 且存在专属性差的缺点, 但是相对于体内动物法, 细胞法操作更简便且耐用性高, 且已被广泛应用于 rhGH 活性研究<sup>[10-15]</sup>, 因此, 本研究联合验证后确

立的Nb2-11细胞法可在短期内解决我国rhGH体外活性方法的可及性。

对实验有效标准验证用25批rhGH注射液的测定结果及联合验证用4批rhGH注射液的42次测定结果进行相对效价限度分析,67个相对效价平均值 $\pm 3SD$ 计算限度范围为76%~127%,15批近、中、远效期rhGH注射液相对效价平均值 $\pm 3SD$ 计算限度范围为82%~133%。实验有效标准验证用3批注射用rhGH及联合验证用14批注射用rhGH相对效价平均值 $\pm 3SD$ 范围为76%~123%,14批近、中、远效期注射用rhGH相对效价平均值 $\pm 3SD$ 计算限度范围为71%~128%。因此,可以将注射用rhGH和rhGH注射液的质量标准限度定为“应为标准品的70%~140%”。

本联合验证研究表明,Nb2-11细胞增殖法适用于国内外不同生产企业的rhGH原液、注射用rhGH和rhGH注射液产品,联合验证的方法具有良好的重复性,拟定的实验有效标准通过率为100%,本方法可作为体内动物法的替代方法用于rhGH质量控制和放行检验。

**致谢:** 河南省药品医疗器械检验院、深圳市药品检验研究院、长春金赛药业有限责任公司、厦门特宝生物工程股份有限公司、安徽安科生物工程(集团)股份有限公司、上海联合赛尔生物工程有限公司参与本次联合验证;美谷分子仪器(上海)有限公司的应用技术钱君娣对本研究软件应用给予了支持。

**作者贡献:** 张孝明负责实验设计、完成实验和文章撰写;李鹤洋负责完成体内动物法实验和数据分析;邓哲、齐乃松、吴熙协助完成实验;李懿、王绿音、吕萍负责提供技术和材料支持;梁成罡、李晶负责指导实验设计思路、提出修改意见。

**利益冲突:** 全体作者均同意最终的文章,无任何利益冲突。

## References

- [1] Wang Y, Langley RJ, Tamshen K, et al. Long-acting human growth hormone receptor antagonists produced in *E. coli* and conjugated with polyethylene glycol [J]. *Bioconjug Chem*, 2020, 31: 1651-1660.
- [2] Khan J, Pernicova I, Nisar K, et al. Mechanisms of ageing: growth hormone, dietary restriction, and metformin [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2023, 11: 261-281.
- [3] Boguszewski CL, Boguszewski M. Growth hormone's links to cancer [J]. *Endocr Rev*, 2019, 40: 558-574.
- [4] Ranke MB, Wit JM. Growth hormone—past, present and future [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, 14: 285-300.
- [5] Wang Y, Kim M, Buckley C, et al. Growth hormone receptor agonists and antagonists: from protein expression and purification to long-acting formulations [J]. *Protein Sci*, 2023, 32: e4727.
- [6] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Part 4. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 466-472.
- [7] Hey A, Baumann A, Kronenberg S, et al. Nonclinical development of biologics: integrating safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics to create smarter and more flexible nonclinical safety programs optimizing animal use [J]. *Int J Toxicol*, 2021, 40: 270-284.
- [8] Ishikawa M, Nimura A, Horikawa R, et al. A novel specific bioassay for serum human growth hormone [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85: 4274-4279.
- [9] Zhang XM, Huang Y, Liang YL, et al. A study of human recombinant growth hormone biological activity detection assay based on NB2-11 cell proliferation [J]. *Chin J Pharm (中国医药工业杂志)*, 2022, 53: 773-778.
- [10] Karbasian M, Kouchakzadeh H, Anamaghi PN, et al. Design, development and evaluation of PEGylated rhGH with preserving its bioactivity at highest level after modification [J]. *Int J Pharm*, 2019, 557: 9-17.
- [11] Ikeda M, Wada M, Fujita Y, et al. A novel bioassay based on human growth hormone (hGH) receptor mediated cell proliferation: measurement of 20K-hGH and its modified forms [J]. *Growth Horm IGF Res*, 2000, 10: 248-255.
- [12] Perez-Perez DA, Pioquinto-Avila E, Arredondo-Espinoza E, et al. Engineered small metal-binding protein tag improves the production of recombinant human growth hormone in the periplasm of *Escherichia coli* [J]. *FEBS Open Bio*, 2020, 10: 546-551.
- [13] Amet N, Wang W, Shen WC. Human growth hormone-transferrin fusion protein for oral delivery in hypophysectomized rats [J]. *J Control Release*, 2010, 141: 177-182.
- [14] Nguyen MT, Koo BK, Thi VTT, et al. Prokaryotic soluble overexpression and purification of bioactive human growth hormone by fusion to thioredoxin, maltose binding protein, and protein disulfide isomerase [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e89038.
- [15] Zhang XM, Huang Y, Wang LY, et al. A novel bioassay to assess bioactivity of PEG-rhGH using Nb2-11 cells [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023, 58: 773-778.