HL-60/NF-κB 报告基因热原检测法在单抗药品热原检测中的应用

刘荔桢[1,2]，王　灿[2]，王鸣人[2]，陈　钢[2]，邵　泓[2*]

（1. 复旦大学药学院，上海 201203；
2. 上海市食品药品检验研究所，国家药品监督管理局治疗类单抗质量控制重点实验室，上海 201203）

摘要：初步建立了一种全新的人早幼粒白血病（HL-60）/ 核转录因子 -κB（NF-κB）报告基因热原检测法，探讨该方法在阿达木单抗注射液、贝伐珠单抗注射液、托珠单抗注射液和达雷妥尤单抗注射液热原检测中的应用，并对该方法进行准确度、重复性和灵敏度验证。在 4 种单抗注射液无干扰最小稀释倍数下配制不同浓度的脂多糖（LPS）标准品溶液作用于细胞，以 LPS 浓度对数值为横坐标，化学光强度值为纵坐标，拟合标准曲线。结果显示，R^2 均大于 0.950 0，当 LPS 标准品浓度大于 1 EU/ml 时，变异系数小于 20%，方法检测限平均值为 0.02 EU/ml，为生物制品药物热原检测新方法的拓展提供了参考。

关键词：热原；报告基因法；单克隆抗体；阿达木单抗；贝伐珠单抗；托珠单抗；达雷妥尤单抗

中图分类号：R927.12　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255（2022）02-0202-06

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.02.006

Application of HL60/NF-κB Pyrogen Reporter Gene Assay in Detection of Pyrogen in Monoclonal Antibodies

LIU Lizhen[1,2], WANG Can[2], WANG Mingren[2], CHEN Gang[2], SHAO Hong[2*]

(*1. School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203; 2. NMPA Key Lab. for Quality Control of Therapeutic Monoclonal Antibodies, Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203*)

ABSTRACT: A new human promyelocytic leukemia (HL-60)/nuclear factor-κB (NF-κB) reporter gene pyrogen detection method was established initially, and its application in pyrogen detection in adalimumab injection, bevacizumab injection, tocilizumab injection and daratumumab injection was discussed. And the accuracy, repeatability and sensitivity of this method were validated. The lipopolysaccharide (LPS) standard solutions with different concentrations were prepared to act on the cells under the minimum dilution factor of the four monoclonal antibody injections without interference. The logarithmic value of LPS concentration was taken as the abscissa and the chemiluminescence intensity value was taken as the ordinate, and a standard curve was fitted. The results showed that the R^2 values were all greater than 0.950 0. When the concentration of LPS standard was greater than 1 EU/ml, the coefficient of variation was less than 20%, and the average detection limit of this method was 0.02 EU/ml, which provided a reference for the expansion of the pyrogen detection method for biological products.

Key Words: pyrogen; reporter gene assay; monoclonal antibody; adalimumab; bevacizumab; tocilizumab; daratumumab

阿达木单抗（adalimumab，ADA）和贝伐珠单抗（bevacizumab，BEV）是血清肿瘤坏死因子 -α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）特异性重组人源化免疫球蛋白 G1（IgG1）单克隆抗体[1—2]。美国和欧盟陆续批准 ADA 用于治疗银屑病关节炎、强直性脊柱炎、克罗恩病等 6 个适应证。托珠单抗

收稿日期：2021-02-24

基金项目：国家药典委员会专项课题《热原检测替代方法（报告基因）的研究建立》（2019808）

作者简介：刘荔桢（1995—），女，硕士研究生，专业方向：生物制品生物活性分析方法。

通信作者：邵　泓（1969—），女，主任药师，硕士生导师，从事生物制品质量评价方法的研究与开发。

E-mail：shaohong@smda.sh.cn

(tocilizumab，TCZ) 是一种人源性抗白细胞介素 -6 受体 (IL-6R) 单克隆抗体，可通过与 IL-6R 结合，从而抑制 IL-6R 的生物学作用以治疗类风湿性关节炎 [3]。达雷妥尤单抗 (daratumumab，DARA) 是一种人源化、抗 CD38 单克隆抗体，对治疗复发性、难治性、多发性骨髓瘤疗效显著 [4]，于 2019 年正式进入中国市场。

随着上述 4 种单抗类产品陆续进入中国市场，作为注射用药，为保证其用药安全，应对其进行热原检测，目前 4 种单抗注射液的热原检查均只采用脂多糖 (lipopolysaccharide，LPS) 检查法，但 LPS 检查法主要检测革兰阴性菌来源的热原，不能检测其他类型的热原。报告基因法是近年来发展较好的一种生物检定新方法，已广泛应用于生物制品的活性测定。其作用原理是根据药物的作用机制，在细胞中转染入带有目标基因和荧光素酶报告基因的质粒，通过刺激细胞表面受体，激活下游包括目标基因的信号通路，同时激活荧光素酶报告基因的表达。再根据药物浓度和荧光素酶报告基因表达的量效关系，评价药物的生物活性。该方法具有操作简单、检测时间短、灵敏度高等优点 [5]。

在本课题组的前期研究中发现，人早幼粒白血病 (HL-60) 细胞表面 Toll 样受体 (toll-like receptor，TLR)2、4、6 均表达丰富，热原与 HL-60 细胞表面 TLR2、TLR4、TLR6 结合后，通过核转录因子 -κB (nuclear factor-κB，NF-κB) 信号通路刺激细胞因子的分泌；本研究前期根据热原刺激 HL-60 细胞分泌细胞因子的作用机制，将带有 NF-κB 和荧光素酶报告基因的质粒转染入 HL-60 细胞中，构建了 HL-60-pNL3.2 稳转细胞株，发现该细胞株受不同来源的热原 [如革兰阴性菌来源的 LPS、酵母来源的酵母聚糖 (zymosan) 和革兰阳性菌来源的脂磷壁酸 (lipoteichoic acid，LTA)] 刺激后，分泌荧光素酶的量与热原浓度呈一定的量效关系。根据该现象，本实验室建立了 HL-60/NF-κB 报告基因热原检测法，且该方法的线性、重复性、回收率和灵敏度均良好 [6]。本研究旨在探讨该方法是否可用于测定以上 4 种单抗产品中的热原，并确定方法的关键参数，建立适用于单抗药品的体外热原测定方法并进行验证，以期为生物制品中热原检测新方法的拓展提供参考。

1 仪器与试药

Envision 型酶标仪 (美国 PE 公司)；AE2000 型倒置三目显微镜 (美国 Motic 公司)；Series II Water Jacket 型二氧化碳培养箱 (美国 Thermo fisher 公司)。

HL-60-pNL3.2 稳转株细胞 (张江生物技术有限公司)；ADA 注射液 [德国 Vetter Pharma Fertigung 公司，规格 40 mg ： 0.8 ml，批号 05041XH01，污染物限制值 (contaminant limit concentration，CLC) 为 10 EU/ml，最大有效稀释倍数 (maximum valid dilution，MVD) 为 100]；BEV 注射液 (德国 Roche Diagnostic 公司，规格 100 mg ： 4 ml，批号 H0205，CLC 为 5 EU/mg，MVD 为 50)；TCZ 注射液 (日本 Chugai Pharma Manufacturing 公司，规格 80 mg ： 4 ml，批 号 B2106B01，CLC 为 1 EU/ml，MVD 为 10)；DARA 注射液 (美国 Janssen 公司，规格 400 mg ： 20 ml，批号 443207，CLC 为 0.21 EU/mg，MVD 为 42)。

LPS 标准品 (中国食品药品检定研究院，规格为每支 1 000 EU，批号 150800-201601)；IMDM 培养液 (批号 2120769) 和胎牛血清 (批号 1966174C) 均购于美国 Gibco 公司；显色剂 NANO® Lucifurase Assay (美国 Promega 公司，批号 0000404602)。

2 HL-60/NF-κB 报告基因热原检测法

2.1 试验方法

取 LPS 标准品 1 支，在无菌条件下，加入无菌检查用水 9 ml 复溶后，用试验培养基 (含 2% 胎牛血清的 IMDM 培养液) 稀释成 500、250、125、25、5、1、0.2、0.04、0.008 和 0.000 2 EU/ml 的 LPS 标准品溶液。取待测样品适量，在无菌条件下，用试验培养基稀释至对方法无干扰的最小稀释倍数。

取细胞状态良好、处于对数生长期的 HL-60-pNL3.2 稳转株细胞，用试验培养基制备成每毫升约含细胞 1.0×10^6 个的细胞悬液，加入 96 孔细胞培养板，每孔 50 μl。将已制备好的不同浓度的 LPS 标准品溶液或待测样品溶液加至含 HL-60-pNL3.2 稳转株细胞的 96 孔板中，每孔 50 μl。同时，以试验培养基代替待测样品溶液，作为阴性对照。将 96

孔细胞培养板置 37 ℃、5%二氧化碳的条件下培养 3 h 后，加入显色剂，用酶标仪检测化学光强度值（RFU）。以 LPS 标准品溶液质量浓度对数值为横坐标、RFU 为纵坐标拟合标准曲线。将测得的 RFU 值代入标准曲线中，计算供试品溶液中的热原含量。

2.2 cut-off 值、CLC 以及 MVD 的确定

2.2.1 cut-off 值

参照欧洲药典（EP 9.0）中的单核细胞激活测定法（monocyte-activation test），cut-off 值为阴性对照平均值与其 3 个标准差的和，即 $\bar{x}$+3SD，将 cut-off 值作为 y 值，代入拟合曲线中，计算得相应的热原浓度（x 值），即为该方法检测相应热原的检测限。

2.2.2 CLC

CLC 按式①计算。

$$CLC=K/M \qquad 式①$$

式中，K 为人每千克体质量每小时最大可接受的热原剂量；M 为人用每千克体质量每小时的最大供试品剂量。

2.2.3 MVD

MVD 是指在试验中供试品溶液被允许达到的最大稀释倍数，在不超过此稀释倍数的浓度下进行 LPS 限值的检测，具体 MVD 值按式②计算。

$$MVD=c\times L/\lambda \qquad 式②$$

式中，L 为供试品的 CLC；λ 为方法检测限，因多次试验显示方法检测限稳定在 0.02 ～ 0.1，本研究为确保 MVD 值可靠，λ 均采用 0.1 进行计算；c 为供试品溶液的浓度，当 L 以 EU/ml 表示时，则 c 等于 1.0 ml/ml，当 L 以 EU/mg 或 EU/U 表示时，c 的单位需为 mg/ml 或 U/ml。如供试品为注射用无菌粉末或原料药，则 MVD 取 1，可计算供试品的最小有效稀释浓度 $c=\lambda/L$。本研究所采用的供试品均为注射液，MVD 值信息见“**1**”项下所述。

2.3 热原干扰试验

参照《中华人民共和国药典》2020 年版四部通则 1143，当首次应用本法进行供试品热原检测时，须对供试品进行热原干扰试验以判断供试品是否会干扰热原测定。选择 LPS 标准曲线中点或靠近中点的 LPS 标准品浓度，作为供试品干扰试验中添加的 LPS 标准品浓度。取供试品溶液（n/2 倍稀释液，可根据试验自设 n，但不得超过 MVD）和 2 倍浓度的 LPS 标准品溶液，等体积混匀，即为干扰试验供试品溶液。按“**2.1**”项下方法进行试验，将干扰试验供试品溶液测得的 LPS 值（A）、供试品溶液（n 倍稀释液）测得的 LPS 值（B）和添加的 LPS 值（C），代入式③，计算本试验条件下 LPS 的回收率（R）。

$$R=(A-B)/C\times 100\% \qquad 式③$$

当回收率为 50%～ 200%，则认为在此试验条件下供试品溶液不存在干扰作用。当回收率不在指定的范围内，须排除干扰因素，并重复干扰试验来验证处理结果的有效性。

3　HL60/NF-κB 报告基因热原检测法在 ADA 注射液热原检测中的应用

3.1 热原干扰试验

为确保 HL-60 热原报告基因法可用于检测 ADA 注射液中的热原，并可对热原含量准确定量，需要进行热原干扰试验以判断 ADA 注射液对热原测定是否有干扰。分别取 ADA 注射液的 25 和 50 倍稀释液，以及 8 EU/ml 的 LPS 标准品溶液，等体积混匀，分别配制成含有 4 EU/ml 的 50 倍和 100 倍 ADA 注射液的稀释液，按“**2.1**”项下方法进行试验，将测得的 RFU 作为 y 值代入标准曲线，得出实测热原浓度，计算回收率。结果显示，ADA 注射液稀释 50 倍时回收率为 44.4%，稀释 100 倍时回收率为 76.6%。结果表明，ADA 注射液稀释 100 倍时，回收率在 50%～ 200%，对方法没有干扰。

3.2 方法学验证

3.2.1 标准曲线

取 ADA 注射液 100 μl 加入试验培养基 900 μl 中，制备 ADA 注射液的 10 倍稀释液，取 ADA 注射液的 10 倍稀释液 100 μl，加入试验培养基 900 μl 中制备 ADA 注射液的 100 倍稀释液。取 LPS 标准品 1 支，加入试验培养基 1 ml 复溶，于涡旋振荡仪上振荡溶解 15 min。将 1 000 EU/ml 的 LPS 标准溶液母液用 100 倍的 ADA 注射液稀释液进一步稀释，配制成含 LPS 500、250、125、25、5、1、0.2、0.04 和 0.008 EU/ml 的 LPS 标准品溶液。按“**2.1**”项下

方法进行试验，用酶标仪测得 RFU 值，采用计算机程序或四参数回归计算法进行处理，以标准品浓度的对数值为横坐标，以测得的 RFU 值为纵坐标，量效关系见图 1，所得标准曲线的相关系数 R^2 为 0.986 3。

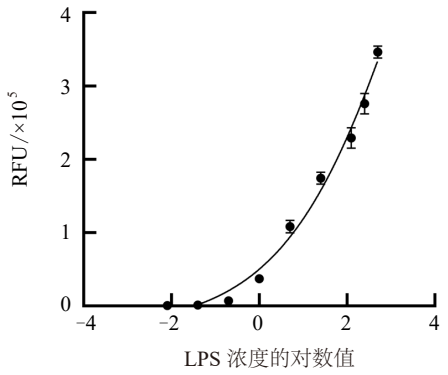


图 1 细胞对 ADA 注射液稀释液中不同浓度 LPS 的量效关系曲线（*n*=4）

Fig.1 Dose-response Curve of Cells to Different Concentrations of LPS in Adalimumab Injection Diluent (*n*=4)

3.2.2 准确度试验

用 100 倍的 ADA 注射液稀释液配制 250、125、25、5、1 EU/ml 的 LPS 溶液作用于细胞，按“**2.1**”项下方法进行热原测定，以 LPS 浓度的理论值为横坐标、LPS 浓度的实际测定值为纵坐标，进行线性拟合。结果见图 2，1 ～ 250 EU/ml 的 LPS 回收率在 66%～ 160%，直线回归方程斜率为 0.77（*n*=5）。

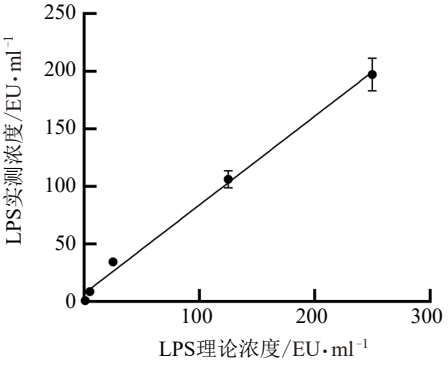


图 2 ADA 注射液稀释液中 LPS 的回收率（*n*=5）

Fig.2 Recovery of LPS in Diluent of Adalimumab Injection (*n*=5)

3.2.3 重复性试验

取“**3.2.1**”项下浓度为 500、250、125、25、5、1、0.2、0.04 和 0.008 EU/ml 的 LPS 标准品溶液，按“**2.1**”项下方法进行试验，并测定其 LPS 含量，重复测定 6 次。结果见表 1。

表 1 ADA 注射液稀释液中 LPS 含量的测定结果（*n*=6）

Tab.1 Determination Results of LPS Content in Diluent of Adalimumab Injection (*n*=6)

理论值/EU·ml^{-1}	实测平均值±标准差/EU·ml^{-1}	变异系数(CV)/%
500	572.76±14.09	2.5
250	202.44±11.56	5.7
125	106.21±4.59	4.3
25	33.59±1.03	3.1
5	8.73±0.57	6.5
1	0.79±0.15	18.8
0.2	0.04±0.01	24.7
0.04	0.02±0.01	66.8
0.008	0.01±0.01	69.4

3.2.4 检测限

取“**3.2.1**”项下 LPS 标准品溶液，按“**2.1**”项下方法进行试验，同时用 100 倍的 ADA 注射液稀释液替代 LPS 标准品溶液，作为阴性对照。将阴性对照的 RFU 平均值和其 3 倍标准差（$\bar{x}$+3SD）代入热原标准曲线，计算该方法的检测限。结果见表 4，3 次试验检测限分别为 0.034、0.012、0.012 EU/ml。

表 2 3 次试验测得的 LPS 检测限

Tab.2 Detection Limits of LPS Measured in Three Tests

测量次数	$\bar{x}$ / EU·ml^{-1}	SD	cut-off值	检测限/EU·ml^{-1}
1	273.00	79.26	510.78	0.034
2	266.25	51.59	421.01	0.012
3	227.25	44.05	359.39	0.012

3.3 样品中 LPS 的含量测定

按“**2.1**”项下方法对 ADA 注射液进行 LPS 含量测定，结果显示，ADA 注射液样品中 LPS 浓度低于 0.02 EU/ml。

4 基于 HL60 细胞的热原报告基因法在其他单抗检测中的应用

4.1 干扰试验

取 TCZ 注射液的 2.5 和 5 倍稀释液、DARA 注射液的 10 和 20 倍稀释液、BEV 注射液的 12.5 和

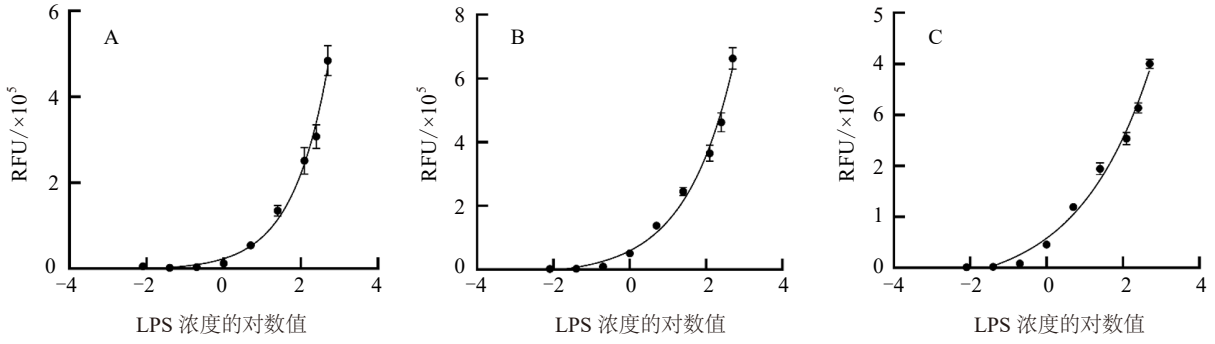
25 倍稀释液，分别与 8 EU/ml 的 LPS 标准品溶液等体积混匀，分别作为相对应的干扰试验供试品溶液，按“**2.1**”项下方法进行试验。按“**2.3**”项下方法计算回收率，结果显示，TCZ、DARA 和 BEV 的回收率均满足要求。

4.2 方法学验证

用试验培养基将 TCZ、DARA 和 BEV 的注射液分别稀释 10、40、50 倍，按“**2.1**”项下方法进行热原含量测定，并对 3 种单抗注射液分别进行与 ADA 注射液相同的线性、准确度、重复性等方法学验证。线性结果见图 3，标准曲线的 R^2 均大于 0.982 0，曲线拟合度良好，并且重复试验多次，曲线的 R^2 均大于 0.950 0，说明 HL60-pNL3.2 细胞对 3 种单抗注射液中不同 LPS 浓度呈良好的线性关系。回收率试验结果见图 4，重复性试验结果见表 3。

5 小结

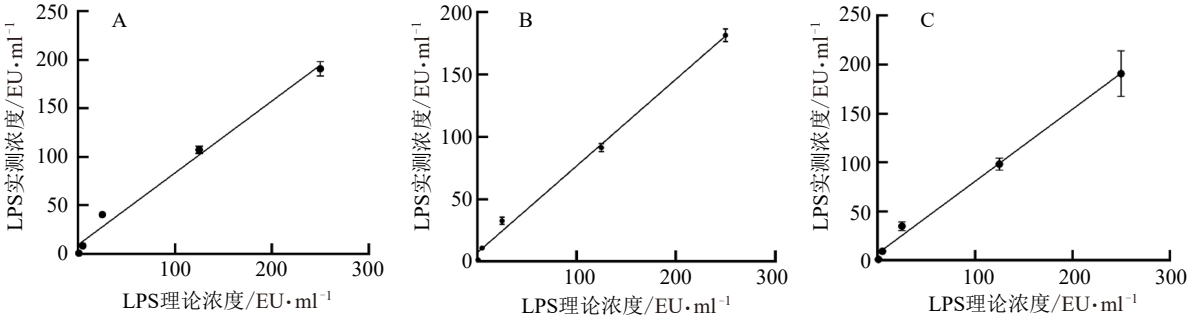
目前国内外药典均未收载报告基因法作为热原检测标准，但相关文献较多[6—8]。2017 年，PALMER 等在单核细胞系 MM6 中转染了 NF-κB 报告基因，建立了一种新的荧光报告基因热原检测方法[7]。2018 年，LI 等在人腺癌肺泡基底上皮 A549 细胞中转染入 NF-κB 报告基因，构建了适用于热原测定的稳转细胞株[8]。2019 年，HE 等在小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 细胞中转染入 NF-κB 报告基因，建立了基于 RAW264.7 细胞的报告基因热原测定方法[9]。虽有多篇文献建立了基于不同细胞的热原报告基因检测方法或构建出稳定转染细胞株，但目前关于热原报告基因法在生物制品药物热原检测



A：TCZ 注射液，B：DARA 注射液，C：BEV 注射液

图 3　HL-60-pNL3.2 细胞对不同注射液稀释液配制的不同浓度的 LPS 量效曲线（*n*=4）

Fig.3　Dose-response Curves of HL-60-pNL3.2 Cells to Different Concentrations of LPS in Different Injection Diluents (*n*=4)



A：TCZ 注射液，B：DARA 注射液，C：BEV 注射液

图 4　不同注射液稀释液的 LPS 回收率（*n*=5）

Fig.4　LPS Recoveries of Different Injection Diluents (*n*=5)

表 3 不同注射液稀释液中 LPS 含量的测定结果（*n*=6）

Tab.3 Determination Results of LPS Content in Different Injection Diluents (*n*=6)

TCZ注射液稀释液			DARA注射液稀释液			BEV注射液稀释液		
理论值/EU·ml^{-1}	实测平均值±标准差/EU·ml^{-1}	CV/%	理论值/EU·ml^{-1}	实测平均值±标准差/EU·ml^{-1}	CV/%	理论值/EU·ml^{-1}	实测平均值±标准差/EU·ml^{-1}	CV/%
500	560.34±24.67	4.4	500	599.39±35.67	6.0	500	591.26±29.17	4.9
250	199.31±13.05	6.5	250	193.32±17.55	9.1	250	195.45±16.71	8.5
125	114.60±10.23	8.9	125	97.57±7.27	7.4	125	100.12 ±4.72	4.7
25	37.26±3.34	9.0	25	34.50±2.67	7.7	25	35.19±2.59	7.4
5	7.16±1.56	21.8	5	9.48±1.59	16.8	5	9.04±1.02	11.3
1	0.47±0.18	39.2	1	1.00±0.31	31.2	1	0.84±0.16	19.4
0.2	0.042±0.017	39.4	0.2	0.045±0.008	17.3	0.2	0.045±0.007	14.7
0.04	0.020±0.007	36.1	0.04	0.011±0.004	32.8	0.04	0.015±0.009	56.8
0.008	0.028±0.023	81.6	0.008	0.009±0.003	36.6	0.008	0.013±0.008	64.4

中的研究仍较少。

本研究将 4 种单抗注射液稀释至一定倍数（不超过最大有效稀释倍数，且不对 HL-60 热原报告基因法产生干扰）后，配制不同浓度的 LPS 标准品溶液，测定 RFU，拟合标准曲线，并对方法进行验证。结果表明目前采用的方法在线性、准确度、重复性和灵敏度等方面均具有良好的数据支撑，为单抗类产品热原检测提供了新方法，也为疫苗、基因工程药物等生物技术药物热原检测研究提供了新思路。

参考文献：

[1] BALUK P, HASHIZUME H, MCDONALD D M. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2005, **15**(1): 102-111.

[2] 安富荣, 崔 岚, 王 勤. 阿达木单抗治疗自身免疫疾病的临床研究进展[J]. 中国新药与临床杂志, 2010, **29**(6): 410-415.

[3] 胡巧织, 王 凌, 占 美, 等. 托珠单抗联合改变病情抗风湿药物治疗类风湿性关节炎的系统评价[J]. 中国医院药学杂志, 2016, **36**(5): 380-386.

[4] 项秋晴, 陆敏秋, 褚 彬, 等. 达雷妥尤单抗治疗复发/难治性多发性骨髓瘤疗效观察研究[J]. 中国全科医学, 2021, **24**(2): 237-242.

[5] WANG L, YU C, WANG J. Development of reporter gene assays to determine the bioactivity of biopharmaceuticals [J]. *Biotechnol Adv*, 2020, **39**(2): 107466.

[6] CAI Y, SUKHOVA G K, WONG H K, *et al*. Rap1 induces cytokine production in pro-inflammatory macrophages through NFκB signaling and is highly expressed in human atherosclerotic lesions [J]. *Cell Cycle*, 2015, **14**(22): 3580-3592.

[7] PALMER B W, STROM K, WONG C. Hand-assisted laparoscopic nephroureterectomy with cystoscopic en-bloc excision of the distal ureter and bladder cuff and isthmusectomy in a horseshoe kidney for invasive urothelial carcinoma of the renal pelvis [J]. *J Sci Lett*, 2011, **15**(3): 412-414.

[8] LI K, XU H, JIANG W, *et al*. Development and characterization of stable reporter cells for fast and sensitive detection of pyrogen [J]. *Anal Biochem*, 2018, **557**: 69-76.

[9] HE Q, YU C, WANG L, *et al*. A novel reporter gene assay for pyrogen detection [J]. *Jpn J Infect Dis*, 2020, **73**(2): 111-118.