

3538 曲妥珠单抗生物学活性测定法

本法系依据高表达人表皮生长因子受体-2 (HER2) 的人乳腺癌细胞 (BT-474) 在不同浓度曲妥珠单抗作用下增殖情况不同, 检测曲妥珠单抗的生物学活性。

试剂 完全培养液 取 DMEM/F12 培养基 (或 RPMI1640 培养基等其他适宜的培养基) 90ml, 加胎牛血清 10ml, 混匀, 2~8℃ 保存。

磷酸盐缓冲液 (PBS) 取氯化钠 8.01g、氯化钾 0.20g、磷酸氢二钠 3.58g 与磷酸二氢钾 0.27g, 加水 800ml 使溶解, 用磷酸或氢氧化钠溶液调节 pH 值至 7.5 ± 0.1 , 用水稀释至 1000ml, 经 0.22 μ m 滤膜滤过。也可采用经验证的商品化试剂。

消化液 商品化 0.25% 胰酶溶液或其他适宜消化液。

显色液 商品化细胞计数试剂 (CCK-8) 溶液。

标准品溶液 取曲妥珠单抗生物学活性测定标准品, 用完全培养液稀释至每 1ml 约含 10 μ g 或适宜浓度。在 96 孔细胞培养板中, 做 2 倍系列稀释, 共 10 个稀释度, 每个稀释度重复 2 孔。以上操作在无菌条件下进行。

供试品溶液 取本品, 用完全培养液稀释至每 1ml 约含 10 μ g 或适宜浓度。在 96 孔细胞培养板中, 做 2 倍系列稀释, 共 10 个稀释度, 每个稀释度重复 2 孔。以上操作在无菌条件下进行。

测定法 BT-474 细胞株用完全培养液于 37℃、5% 二氧化碳条件下培养。取处于对数生长期, 生长状态良好的 BT-474 细胞, 用适量消化液消化, 弃去消化液并收集细胞, 用完全培养液重悬, 制成每 1ml 中含 $1.0\times 10^5\sim 1.5\times 10^5$ 个细胞的细胞悬液, 接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔 100 μ l, 于 37℃、5% 二氧化碳条件下培养 16~20 小时, 加入标准品溶液或供试品溶液, 每孔 50 μ l, 于 37℃、5% 二氧化碳条件下培养 72~96 小时, 以上操作在无菌条件下进行。再向上述各孔加入显色液 15 μ l, 混匀, 于 37℃、5% 二氧化碳条件下培养 2~4 小时。用酶标仪在参比波长 630nm, 检测波长 450nm 处测定吸光度。

以标准品或供试品溶液浓度为横坐标, 吸光度值为纵坐标, 照生物检定统计法 (通则 1431) 中的四参数回归计算法进行试验数据处理, 计算约束模型中

29 标准品溶液和供试品溶液的 50% 效应浓度 (EC_{50})，按下式计算供试品生物学
30 活性。

31 供试品生物学活性 (%) = 标准品溶液 EC_{50} / 供试品溶液 EC_{50} × 100%

32 试验有效标准：标准品和供试品的四参数剂量反应曲线应当完整，上、下
33 渐近线应各至少包含一个浓度点，线性部分应至少包含两个浓度点；标准品和
34 供试品的剂量反应曲线上、下渐近线的差值应不小于 0.3，拟合度 R^2 应不小于 0.95，
35 各浓度点两复孔吸光度值的相对标准偏差应不大于 20%；可靠性测验中回归项
36 应非常显著 ($P < 0.01$)，偏离平行项应不显著 ($P \geq 0.01$)。

37

38

39

40

41

42

43

起草单位：上海市食品药品检验研究院

联系方式：021-50798176