

3541 贝伐珠单抗生物学活性测定法

第一法 人脐静脉内皮细胞增殖抑制法（HUVEC 增殖抑制法）

本法系依据不同浓度的贝伐珠单抗中和人表皮生长因子后对人脐静脉内皮细胞（HUVEC）的增殖抑制作用不同，检测贝伐珠单抗的生物学活性。

试剂 （1）工作培养基 取人内皮无血清基础培养基 500 ml，加商品化的粘附因子 25 ml 和 50 mg/ml 硫酸庆大霉素溶液 0.5ml，摇匀，2~8℃ 保存。

（2）重组人血管内皮生长因子 165（rhVEGF165）贮备液 商品化 rhVEGF165 试剂，按照说明书要求复溶，-70℃ 及以下保存。

（3）显色液 商品化阿尔玛蓝细胞活力检测试剂。

供试品溶液 取供试品，精密量取适量，用工作培养基定量稀释制成每 1ml 约含贝伐珠单抗 4μg 的溶液。精密量取上述溶液适量，分别用工作培养基定量稀释制成每 1ml 约含贝伐珠单抗 2μg、1μg、0.500μg、0.400μg、0.360μg、0.320μg、0.200μg、0.115μg、40ng 的溶液，共 10 个浓度，每个浓度重复 2 孔。

标准品溶液 取贝伐珠单抗标准品，照供试品溶液同法制备。

测定法 取 rhVEGF 贮备液适量，用工作培养基稀释至确定的浓度（rhVEGF 标定曲线中最大增殖效力的最小浓度），分别与标准品溶液和供试品溶液等体积混合，孵育 0.5~1.5 小时。

取处于对数生长期生长状态良好的 HUVEC 细胞，用工作培养基配制成每 1ml 约含 2×10^5 个细胞的细胞悬液。取透明 96 孔细胞培养板，每孔加细胞悬液 50μl 和分析培养基 100 μl，再分别加上述标准品和供试品孵育溶液 50μl，混匀，于 37℃、5%二氧化碳条件下培养 90~98 小时，每孔加显色液 25 μl，混匀，于 37℃、5%二氧化碳条件下继续培养 6~8 小时，混匀，置酶标仪中，以 530 nm 为激发波长，590 nm 为发射波长分别测定荧光强度。

以标准品溶液或供试品溶液浓度为横坐标，以荧光强度平均值为纵坐标，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，计算标准品和供试品的半数有效浓度（EC₅₀），按下式计算供试品生物学活性。

供试品生物学活性（%）= 标准品 EC₅₀/供试品 EC₅₀ × 100%

试验有效标准：各浓度点 2 个复孔吸光度值的变异系数（n=2）应不大于 20%；

采用非限制性四参数回归法分别计算标准品和供试品的剂量反应曲线，应均近似于 S 形，且出现明显上、下平台，决定系数 R^2 均应不小于 0.95；标准品与供试品曲线斜率（四参数曲线的 B 值）的比值应在 70%~130%范围内，标准品与供试品曲线上渐近线（四参数曲线的 A 值）的比值应在 80%~120%范围内。

第二法 报告基因法

本法系采用报告基因细胞作为贝伐珠单抗生物活性测定用细胞。通过不同浓度贝伐珠单抗阻断血管内皮生长因子（VEGF）刺激细胞荧光素酶的表达情况不同，测定贝伐珠单抗的生物学活性。

试剂 （1）生长培养基 取 DMEM 培养基 450mL，加胎牛血清 50mL，10mg/mL 的嘌呤霉素 25 μ l 及 50 mg/mL 的潮霉素 B 250 μ l，混匀，2~8℃保存。

（2）工作培养基 取胎牛血清 50ml 和 DMEM 培养基 450ml，混匀，2~8℃保存。

（3）重组人血管内皮生长因子 165（rhVEGF165）溶液 取商品化 rhVEGF165 试剂，照说明书要求复溶（-70℃及以下保存）。取适量，用工作培养基稀释制成每 1ml 含 rhVEGF165 40ng 的溶液。

（4）荧光素酶报告基因检测试剂盒。

（5）消化液 商品化 0.25%胰蛋白酶溶液。

（6）磷酸盐缓冲液（PBS）商品化经无菌化处理的磷酸盐缓冲液，pH 7.2~7.4。

报告基因细胞 取已稳定转染血管内皮生长因子受体 2 基因和荧光素酶报告基因的人胚肾细胞（HEK293- VEGFR2 细胞），用生长培养基于 37℃、5%二氧化碳条件下培养。或其他适宜的报告基因细胞（报告基因细胞的构建及细胞库管理和质控应参照“9404 基于基因修饰细胞系的生物检定法指导原则”有关要求执行）。

供试品溶液 取供试品，精密量取适量，用 rhVEGF165 溶液定量稀释制成每 1ml 约含贝伐珠单抗 3 μ g 的溶液。精密量取适量，用 rhVEGF165 溶液进行 2 倍梯度稀释，共得到 9 个稀释度，每个稀释度重复 3 孔。

标准品溶液 取贝伐珠单抗标准品，照供试品溶液同法制备。

阳性对照溶液 工作培养基。

59 **阴性对照溶液** rhVEGF165 溶液。

60 **测定法** 取处于对数生长期生长状态良好的 HEK 293-VEGFR2 细胞,用 PBS
61 适量清洗细胞,用消化液适量消化并收集细胞,用工作培养基制成每 1ml 中约含
62 1.25×10^6 个细胞的细胞悬液,取白色 96 孔细胞培养板,每孔加细胞悬液 40 μ l。
63 分别加标准品溶液、供试品溶液、阳性对照溶液和阴性对照溶液,每孔 40 μ l,于
64 37℃、5%二氧化碳条件下培养 5~6 个小时。培养结束后,室温条件下平衡 5~10
65 分钟,避光条件下每孔加平衡至室温的荧光素酶报告基因检测底物 40 μ l,于 30
66 分钟内置酶标仪中,以 Luminescence 模式、整合时间 500ms 分别测定相对光单
67 位 (RLU)。

68 以标准品溶液或供试品溶液浓度为横坐标,以相对光单位 (RLU) 平均值为
69 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
70 理,计算供试品和对照品的半数有效浓度(EC₅₀)。按下式计算供试品生物学活性。

71 供试品生物学活性(%)=标准品 EC₅₀/供试品 EC₅₀×100%

72 试验有效标准:各浓度点标准品和供试品的 RLU 的变异系数(n=3)应不大
73 于 20%;阴性对照 RLU 均值与阳性对照 RLU 均值的比值不小于 5.0。采用非限
74 制性四参数回归法分别计算标准品和供试品的剂量反应曲线,应均近似于 S 形,
75 且出现明显上、下平台,决定系数 R² 应不小于 0.98,标准品与供试品曲线斜率
76 (四参数曲线的 B 值)的比值应在 70%~130%范围内,标准品与供试品曲线的上
77 渐近线(四参数曲线的 A 值)的比值应在 80%~120%范围内。

81 起草单位: 中国食品药品检定研究院

联系方式: 010-53852178