

重组人生长激素体内生物活性测定中美药典方法对比研究

梁誉龄, 高学军, 李湛军, 梁成罡* (中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

摘要 目的: 对重组人生长激素 (rhGH) 中国药典与美国药典的体内生物活性测定方法进行试验比较与梳理分析。**方法:** 按照《中国药典》2015年版四部通则1219和《美国药典》40版通则126的rhGH去垂体大鼠体内生物测定法, 分别测定3批rhGH生物活性。**结果与结论:** 应用二种方法测定3批rhGH原料生物效价的结果相近。通过分析比较两种测定方法的结果及各个环节, 可以得出结论, 中国药典与美国药典的rhGH体内生物活性测定方法基本相同。

关键词: 重组人生长激素; 体内生物测定; 去垂体大鼠; 中国药典2015年版; 美国药典40版; 比较研究

中图分类号: R95 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-7777(2020)06-0658-06

doi:10.16153/j.1002-7777.2020.06.007

A Comparative Study on *Chinese Pharmacopeia* and *U. S. Pharmacopeia* Methods for rhGH in Vivo Bioactivity Determination

Liang Yuling, Gao Xuejun, Li Zhanjun, Liang Chenggang* (National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

Abstract Objective: To compare and analyze the *Chinese Pharmacopeia* (ChP) and *U. S. Pharmacopeia* (USP) methods for recombinant human growth hormone (rhGH) in vivo bioactivity determination. **Methods:** Three batches of rhGH were tested in hypophysectomized rats according to the in vivo bioassays in general rule 1219 of part IV of ChP 2015 edition and general rule 126 of USP 40 edition, respectively. **Results and Conclusion:** The bioactivity results of the three batches of rhGH are almost equivalent by the two methods. The ChP and USP methods for rhGH in vivo bioactivity determination are almost the same, both having advantages and disadvantages based on analyzing and comparing the results of the two methods and each element.

Keywords: recombinant human growth hormone; in vivo bioactivity determination; hypophysectomized rat; *Chinese Pharmacopeia* 2015 edition; *U. S. Pharmacopeia* 40 edition; comparative study

重组人生长激素 (Recombinant Human Growth Hormone, rhGH) 国内有多家企业研发及生产, 但走出国门必须符合USP^[1]的标准要求, 其中, 对于体内生物测定方法, USP与中国药典 (*China Pharmacopeia*, ChP)^[2]的要求有所不同, 生物统计学方法及误差表示方式也不同, 美国FDA规定生

物技术药被批准上市前, 必须测定其生物效价^[3]。因此, 针对USP和ChP的rhGH体内生物活性测定方法进行了比较研究。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级SD大鼠, 雄性, 出生日龄26~28 d,

作者简介: 梁誉龄, 药师; 研究方向: 生物检定; Tel: (010) 53851462; E-mail: 775269307@qq.com

通信作者: 梁成罡, 研究员; 研究方向: 激素及生物技术药物质量控制; Tel: (010) 53851638; E-mail: liangchenggang@nifdc.org.cn

体重60~80 g, 数量208只, 由中国食品药品检定研究院实验动物中心提供, 动物合格证号11400500030226和11400500034057号。动物生产许可证号SCXK(京)2017-0005号。饲养在无菌空气二级过滤实验动物室内, 饲养室温度23~25℃, 相对湿度50%~55%, 人工照明12小时; 并将大鼠饲养于独立通风笼具(IVC)中, 笼具体积420 mm×250 mm×230 mm, 实验动物使用许可证号SYXK(京)2017-0013。

1.2 仪器

真空泵(台州真空泵厂); Mettler-240型电子天平(瑞士Mettler公司); YP5001型电子天平(上海越平公司)。

1.3 药品与试剂

rhGH标准品: 美国药典参考品(Somatropin USP Reference Standard), 由美国药典委员会制备, 批号R07750, 规格每瓶rhGH 3.86 mg(相当于每瓶11.58 U)。

供试品: rhGH原料冻干粉3批, 批号分别为20180103、20180104、2018010, rhGH含量分别为0.144、0.143、0.136 mg·mg⁻¹, 某生物技术有限公司生产。

试剂: 氨基甲酸乙酯(乌拉坦), 国药集团化学试剂有限公司, 化学纯, 批号20180427; 氯化钠注射液, 规格每瓶500 mL, 石家庄四药有限公司提供, 批号1708146201; 牛血清白蛋白冻干粉, 北京经科化学试剂公司进口分装。

2 方法

2.1 原理及脑垂体摘除术

USP^[1]和ChP^[2]的rhGH生物活性测定方法, 均根据rhGH在生物体内促进动物机体生长的药理特性而设计; 选择去除幼龄大鼠脑垂体作为动物模型, 以消除动物体内生长激素的产生来源, 去除对动物机体生长的影响, 这是该方法的工作原理, 测定终点指标为观察给药后对幼龄大鼠去除脑垂体动物体重增加的影响, 本文制备幼龄大鼠去垂体模型的方法, 在清洁条件下, 经大鼠咽旁路手术摘除脑垂体^[4-6]。

2.2 筛选合格去垂体大鼠标准

USP法: 摘除脑垂体术后第2周内, 体重变化小于±10%, 并且健康的大鼠为合格去脑垂体大鼠。ChP法: 摘除脑垂体第2周后, 体重变化小于

手术前±10%的健康大鼠, 两法不同。

2.3 标准品与供试品溶液配制

用氯化钠注射液配制0.1%牛血清白蛋白溶液作为溶剂。标准品(Standard, S)溶液, 临用时用0.1%牛血清白蛋白溶液配制高剂量(SH)和低剂量(SL)标准溶液; USP法应用剂量0.3、0.075 U·mL⁻¹, ChP法应用剂量0.2、0.05 U·mL⁻¹。供试品溶液3批(以T1~T3表示), 临用时分别精密称量约10 mg, 计算其中含有rhGH量, 按估计效价1 mg rhGH为3 U, 应用0.1%牛血清白蛋白溶液配制高剂量(TH)及低剂量(TL)溶液; USP法应用剂量0.3、0.075 U·mL⁻¹, ChP法应用剂量0.2、0.05 U·mL⁻¹。

2.4 动物实验分组与给药剂量

1) USP法, 取50只摘除脑垂体大鼠, 随机分为5组, 每组10只; 即标准品高剂量组(SH)、标准品低剂量组(SL)、供试品高剂量组(TH)、供试品低剂量组(TL)、空白对照组(模型组); 模型组给予溶剂, 标准品组与供试品给药剂量相同; 给药剂量以大鼠平均体重70 g计算, 高剂量组(0.43 U·kg⁻¹·day⁻¹)、低剂量组(0.11 U·kg⁻¹·day⁻¹), 各组大鼠给药途径为颈部皮下注射给予相应药液, 每只大鼠每次给药提积0.1 mL, 每天给药1次, 连续给药10 d。

2) ChP法, 取32只摘除脑垂体大鼠, 随机分为4组, 每组8只; 即标准品高剂量组、标准品低剂量组、供试品高剂量组、供试品低剂量组, 标准品组与供试品组给药剂量相同, 以大鼠平均体重70 g计算, 高剂量组给药剂量1.43 U·kg⁻¹·day⁻¹、低剂量组给药剂量0.36 U·kg⁻¹·day⁻¹, 各组大鼠给药途径为颈部皮下注射给予相应药物溶液, 每只大鼠每次给予0.5 mL, 每天给药1次, 连续给药6 d。

2.5 检测指标与动物给药时间及试验终点时间

USP和ChP的rhGH体内生物活性测定方法, 均在每天同一时间给药后称量大鼠体重, 并将体重与给药前比较, 计算每只大鼠每天增重, 绘制生长曲线, 最后一次给药24 h后(试验终点时间)的大鼠体重与给药前d1体重之差即体重增加(Δbw)。Δbw= bw_i-bw₁; bw₁代表给药前d1体重, bw_i代表给药后某一天(di)的体重。USP法大鼠连续给药时间10 d, 终点时间d11; ChP法大鼠连续给药时间

6 d, 终点时间d7。

2.6 比活标准规定及生物统计学方法计算效价

1) USP标准规定, 比活是生物效价U与rhGH含量mg之比。USP标准规定, rhGH比活不少于(No Less Than, NLT) $2.0 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 95%可信限相对效价变化率63%~158%, 代表试验误差的L值应不大于(No More Than, NMT) 0.4^[1], $L^{[7]} = 2t \times \text{Sm}$, 其中Sm为标准误(Standard Error of Mean), t 为标准误的自由度df(Degrees of Freedom)下的 t 值。经系统适应性考察应合格^[8], 运用中国食品药品检定研究院编制生物统计软件ReguStats计算效价和误差。

2) ChP标准规定, rhGH比活^[9]不少于 $2.5 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 代表试验误差的是平均可信限率(Fiducial Limit %, FL%)应不大于50%, 按量反应平行线原理进行统计学计算, 试验可靠性分析应通过F检验, 回归项应非常显著($P < 0.01$), 偏离平行不显著($P > 0.05$)^[2], 运用中国食品药品检定

研究院编制软件中国药典生物检定统计程序Biostat或BS2000^[10]软件计算效价和误差。

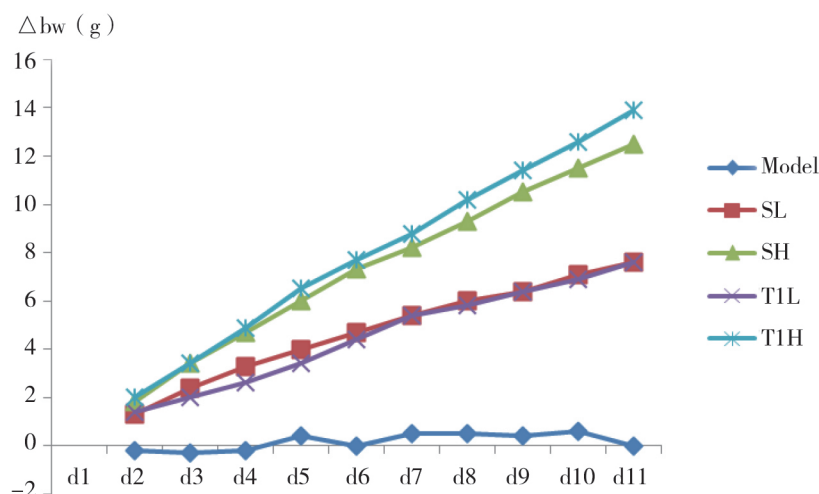
3 结果

3.1 USP法结果

rhGH供试品3批经按USP法测定, 给药10 d后空白对照组即模型组大鼠体重基本无变化, 各剂量组大鼠体重均有明显增长, 与空白对照组比较差异有显著性($P < 0.01$)。图1为供试品T1批号20180103与S的生长曲线, 从图1可见各剂量组随给药天数d增加大鼠体重 Δbw 增加, 具有显著促进生长的趋势, 并有量效关系, T1与S的反应值相当, 两条量效曲线平行, 如图2所示。3批rhGH供试品T1~T3含量分别为0.144、0.143、0.136 $\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$, 测得生物效价分别为0.49、0.45、0.45 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 故其比活分别为3.4、3.1、3.3 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 均大于 $2.0 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, L值分别为0.28、0.23、0.27, 均小于0.4, 系统适应性考察合格, 符合USP标准规定, 如表1所示。

表1 USP体内生物活性测定法对rhGH原料的测定结果

批号	生物效价 / ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	rhGH 比活 / ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	95% 可信限相对效价范围率 / %	L	Sm	系统适应性考察
20180103	0.49	3.4	73 ~ 138	0.28	0.068	合格
20180104	0.45	3.1	77 ~ 130	0.23	0.056	合格
20180105	0.45	3.3	74 ~ 137	0.27	0.066	合格
标准规定	—	NLT 2.0	63 ~ 158	NMT 0.4		应合格



T1L原料低; T1H原料高; SL标准低; SH标准高; Model模型组。

图1 USP原料药标准及模型组的生长曲线

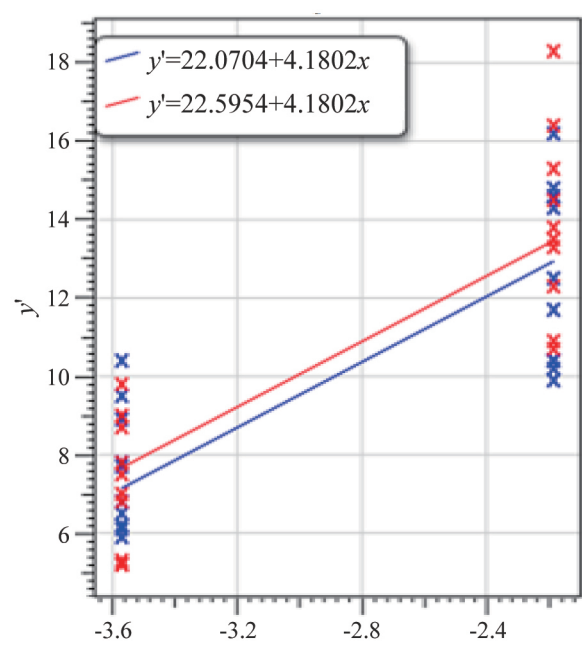


图2 USP法T1与S对数剂量反应的量效曲线

3.2 ChP法结果

摘除脑垂体大鼠在连续给药6天后，rhGH供试品3批（T1～T3）生物测定生物效价分别为0.48、0.43、0.41 U·mg⁻¹，故其比活分别为3.3、3.0和

3.0 U·mg⁻¹，均大于2.5 U·mg⁻¹，平均可信限率分别为43%、39%和47%，均小于50%，符合ChP标准规定，如表2所示。

表 2 ChP 体内生物活性测定对 rhGH 原料的测定结果

批号	生物效价 / (U·mg ⁻¹)	rhGH 比活 / (U·mg ⁻¹)	可信限率 /%	实验可靠性分析			
				回归		偏离平行	
				F	P	F	P
20180103	0.48	3.3	43	51.4	0.00	0.11	0.74
20180104	0.43	3.0	39	59.4	0.00	0.78	0.38
20180105	0.41	3.0	47	43.4	0.00	1.35	0.25
标准规定	—	NLT 2.5	NMT 50	< 0.01		> 0.05	

3.3 USP法和ChP法的方法比较

ChP法与USP方法测定效价结果相近，效价差异3%～10%，在生物测定允许误差范围之内（20%）。rhGH生物测定方法的USP法和ChP法不

同之处如表3所示，筛选合格去垂体大鼠不同，给药剂量、体积、天数不同，动物只数、组数不同，效价及误差表示不同。

表3 rhGH体内生物活性测定 USP法和ChP法不同

项目	ChP法	USP法
大鼠日龄	26 ~ 28 d	25 ~ 30 d
品系	同品系	SD大鼠
筛选合格大鼠	首次称重时间	去垂体手术前称重
	再次称重时间	37 ~ 44 d (术后1 ~ 2周) 称重
	判断标准	44 ~ 52 d后再称重
	体重变化小于手术前 $\pm 10\%$ 的健康大鼠	最后7 d内体重变化小于 $\pm 10\%$ 并且健康的大鼠
大鼠分组	4组 SH、SL、TH、TL	5组 Control、SH、SL、TH、TL
每组大鼠数/只	8	10
高剂量溶液浓度	$0.1 \sim 0.2 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$	$10 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($0.03 \sim 0.3 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$)
高剂量给药剂量	$0.7 \sim 1.43 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	$0.043 \sim 0.43 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$
每天给药体积	0.5 mL/鼠	0.1 mL/鼠
连续给药时间	6 d	10 d
高剂量给药总量	0.3 ~ 0.6 U/鼠	0.03 ~ 0.3 U/鼠
效价计算	量反应平行线测定 2.2 法计算 PT	相对效价 63% ~ 158% 可信范围计算 PT
误差分析	可信限率: NMT 50%	L: NMT 0.40

4 讨论

rhGH体内生物测定USP法与ChP法有很多不同之处,讨论如下。

1) 筛选USP标准规定大鼠方法不同。判断是否成功去除脑垂体,体重不增加是唯一标准;ChP法是在术后2~3周后,根据大鼠体重变化率小于手术前体重 $\pm 10\%$ 的健康动物,作为确定合格去除脑垂体的指标;而USP法是术后第2~3周(鼠龄37~44天)开始称重,再过7天后再次称重,这7天内大鼠体重变化率小于 $\pm 10\%$ 的健康动物为合格去除脑垂体大鼠。我们认为USP法对筛选合格去脑垂体大鼠更为合理,因大鼠去脑垂体手术时,由于很多因素如实验室环境不适应性、麻醉、手术、进食、饮水、排泄等因素的影响,对“手术前体重”影响较大,故ChP法存在不合理性。

2) 每组动物数及组数不同。USP法应用5个组,比ChP法多一组空白对照组;因为USP法也叫生物鉴别试验(Bioidentity Tests)^[1],故其它各组

需与空白对照组相比较,大鼠体重应有明显增长($P < 0.01$),空白对照组并不参与生物效价的计算。每组动物数也比ChP法多2只大鼠,ChP法要求每组8只大鼠,USP法每组增加了动物数,具有更大精确度。

3) 给药天数与试验终点时间不同。USP法连续给药10 d,最后一次给药24 h后为试验终点,试验终点为d11;ChP法连续给药6 d,即试验终点时间为d 7,在满足量反应平行线原理基础上,ChP法可节省实验时间,并在大鼠产生生长激素抗体前结束实验^[4],一般认为大鼠于第9天将产生生长激素抗体。

4) 给药剂量不同。USP法每只大鼠给药体积0.1 mL,ChP法每只大鼠给药体积0.5 mL,给药总量ChP法比USP法多,因此,量效曲线中有较大的斜率。

5) 生物统计学计算和误差表示方式不同。分别应用不同软件计算,USP法规定95%可信限相对

效价变化范围63%~158%，试验误差以L值标示（NMT 0.4）， $L=2t \times S_m$ ；ChP法试验误差以平均可信限率标示（NMT 50%），ChP这种计算方法和对误差的表示方式为中国独有，当平均可信限率小于50%时，标准误 S_m 值一般都小于0.1， $t=2.0$ ，故L值也都小于0.4，可见ChP法对误差的要求基本符合USP的要求。

6) 比活标准不同。供试品中每1 mg rhGH具有的生物学活性单位，即生物活性U与含量mg的比值称为比活，它是衡量产品一致性的重要指标，USP标准规定rhGH比活不少于 $2.0 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ，ChP规定其比活不少于 $2.5 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ，各国药典都定义每1 mg无水rhGH生物学活性为3.0 U，即理论比活 $3.0 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ，已达成国际共识。目前，英国药典（British Pharmacopoeia, BP）及欧洲药典（European Pharmacopoeia, EP）都已取消生物活性测定，以理化测定的HPLC法代替之，国内外多批rhGH产品生物测定比活平均值为 $3.0 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ，故默认理论比活值。对rhGH质量控制以理化分析为主，生物测定为辅，直至被替代，改变质量控制的理念，已成为大趋势，USP与ChP法虽然保留体内生物测定法，但处于辅助地位。本试验研究，解析了USP体内生物测定方法，梳理了其与中国药典的异同，为中国生产rhGH产品的企业走向国际提供帮助。

参考文献：

[1] USP 40-NF35. General Chapter <126> Somatropin

Bioidentity Tests[S]. 2017: 214-215.

- [2] 中华人民共和国药典：四部（1219）生长激素生物测定法[S]. 2015: 172-182.
- [3] FDA Public Health Service Act Section 351: the Biological Product that is the Subject of the Application is Safe, Pure, and Potent[EB/OL]. (2019-12-08) [2020-02-13].<https://www.law.cornell.edu/uscode/text/42/262>.
- [4] 李湛军，阎安装. rhGH生物测定方法的探讨：I 去垂体大鼠体重法. II 胫骨法[J]. 药物分析杂志，1995: 15 (2): 3-10.
- [5] 中国食品药品检定研究院. 中国药品检验标准操作规范（2019年版）[M]. 北京：中国医药科技出版社，2019: 595-599.
- [6] 李湛军，苑方圆，梁成罡. 重组人生长激素水针剂与冻干剂对去垂体大鼠的药效和生物活性比对研究[J]. 药物分析杂志，2015, 35 (7): 1140-1144.
- [7] 周海均. 生物统计方法[M]. 北京：人民卫生出版社，1983: 40.
- [8] USP40-NF35. General Chapters <111> Design and Analysis of Biological Assays[S]. 2017: 199.
- [9] 中国药典2015 年版. 二部 重组人生长激素[S]. 2015: 787-789.
- [10] 沈连忠，李波. 中国药典生物检定统计软件BS2000 For Windows 9X[J]. 中国卫生统计，2000, 17 (6): 330.
- [11] 李湛军，徐康森. 生化药质量控制中生物测定的应用与局限[J]. 药物分析杂志，2007, 27 (2): 297-301.

（收稿日期 2020年2月13日 编辑 范玉明）