



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108303384 A

(43)申请公布日 2018.07.20

(21)申请号 201710019912.7

(22)申请日 2017.01.12

(71)申请人 山东先声生物制药有限公司

地址 264006 山东省烟台市经济技术开发区
黑龙江路1号

申请人 江苏先声药业有限公司

(72)发明人 姜桂香 刘珊珊 刘晓艳 陈倩洁
陈虹

(51)Int.Cl.

G01N 21/31(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页

(54)发明名称

一种重组人血管内皮抑制素生物活性检测方法

(57)摘要

本发明涉及一种重组人血管内皮抑制素生物活性检测方法,该方法为分别利用样品和标准品活性测定结果中呈直线的效价区间中的浓度梯度点抑制HUVEC细胞增殖,并采用MTS比色法测定血管内皮抑制素对HUVEC的增殖抑制活性,进而使用量反应平行线测定方法分析重组人血管内皮抑制素对血管生成抑制的生物活性。该活性检测方法可适用于低浓度的样品检测,显著提高方法重复性,缩小方法误差范围。

1. 一种重组人血管内皮抑制素生物活性的检测方法,包括如下步骤:

(1) 人脐静脉血管内皮细胞传代培养至对数生长期,胰酶消化后均匀悬浮,接种相同体积的细胞悬液至培养孔中;

(2) 预估待测样品的活性,将重组人血管内皮抑制素标准品和待测样品稀释至多个效价一致的浓度梯度点,向步骤(1)中的培养孔中加入相同体积的各浓度梯度点的重组人血管内皮抑制素标准品或待测样品继续培养;

(3) 采用MTS染色法,测定培养孔中的OD值;

(4) 按照量反应平行线法计算实验结果。

2. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于所述培养条件为在37℃,5%CO₂的培养箱中培养。

3. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于步骤(1)中所述人脐静脉血管内皮细胞传代培养至对数生长期,具体为人脐静脉血管内皮细胞传代培养至3~5代。

4. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于步骤(1)中所述向培养孔中接种相同体积的细胞悬液,具体为向培养孔中接种密度为4000-6000个/ml的细胞悬液,优选约5000个/ml;接种体积为160μl-180μl,优选为160μl;培养孔为96孔板中的培养孔。

5. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于步骤(2)中所述的继续培养的时间为3-5天。

6. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于步骤(2)中所述的浓度梯度点为2-4个,优选3个。

7. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于步骤(2)中所述的稀释为采取相同的比例稀释,优选相邻浓度比为0.8。

8. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于步骤(2)中所述每个浓度梯度加入4-6个培养孔,优选为5个培养孔。

9. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于步骤(3)中所述测定培养孔中的OD值的条件为在490nm波长、630nm参比波长下测定。

10. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于所述重组人血管内皮抑制素标准品采用重组人血管内皮抑制素冻干制剂。

11. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于所述重组人血管内皮抑制素为Endostar。

一种重组人血管内皮抑制素生物活性检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物制品生物检定统计法技术领域,具体涉及血管内皮抑制素生物活性的检测方法。

背景技术

[0002] 血管内皮抑制素(Endostatin)是O'Reilly于1997年从小鼠内皮细胞系EOMAD的培养液中分离得到的一种具有抑制血管内皮细胞作用的物质(O'Reilly, M.S., et al. Cell. 88: 299-285, 1997)。氨基酸序列分析该物质为胶原蛋白XVIII的羧基末端的降解片段,分子量为20kD左右。

[0003] 重组人血管内皮抑制素(rhEndostatin)与重组鼠血管内皮抑制素在氨基酸序列上有85%的同源性。1996年美国Entremed公司采用酵母作为表达体系生产了重组人血管内皮抑制素。以重组DNA技术生产,以大肠杆菌为表达系统,表达出的重组人血管内皮抑制素与先前的Endostatin相比较,表达水平更高,疗效更强,并且没有因为附加N端序列而导致体内免疫原性。

[0004] 但是利用传统的大肠杆菌表达方法得到的重组人血管内皮抑制素难以复性并且易于形成沉淀,而用巴斯德毕赤酵母表达系统所耗费的生产成本巨大,两种方法均未能解决将重组人血管内皮抑制素进行工业生产的问题。为此研究人员通过修饰人血管内皮抑制素的核苷酸编码序列,生产出重组人血管内皮抑制素(rhEndostatin, 商品名恩度®(Endostar®)),大大简化了纯化步骤,提高了产物的纯度(ZL00107569.1)。

[0005] 现有技术中检测Endostatin的细胞增殖抑制活性方法主要是根据Endostatin的可能作用机制,采用Endostatin抑制HUVEC(人脐静脉血管内皮细胞)、HMEC(人微血管内皮细胞)、ECV304(人脐静脉内皮细胞)等不同细胞增殖、迁移来检测其细胞增殖抑制活性,但所选择实验材料及检测结果误差相对偏大,其中很多检测结果重复性差。

[0006] 国内也有厂家采用Endostatin抑制小鼠肿瘤生长来评价其生物活性,但由于小鼠肿瘤大小差异非常大,因此体内测活方法缺少规律性,具有误差大,重复性差且操作难度大等缺点。

[0007] 现重组人血管内皮抑制素(rhEndostatin)细胞增殖抑制活性检测存在以下缺点:
(1) 样品蛋白含量要求至少大于5mg/ml,低浓度样品无法采用该方法进行活性测定;
(2) 活性测定结果需进行四参数拟合,实验中影响因素较多,可能存在无法拟合得出EC50的情况;
(3) 活性检测结果误差范围较大,为50%-200%。。

[0008] 鉴于上述方法存在上述缺点,对于研究一种能用于较低浓度、重复性更好,误差波动更小的重组人血管内皮抑制素活性检测方法是非常必要的。

[0009] 本发明是将量反应平行线生物检定统计法首次应用到重组人血管内皮抑制素的活性测定中,也是目前国内首例重组人血管内皮抑制素的量反应平行线法测定生物学活性的技术方案,具有重要的应用价值和意义。

发明内容

[0010] 本发明的目的是提供一种检测重组人血管内皮抑制素细胞增殖抑制活性的方法，该检测方法适用于各种浓度样品的检测(含低于5mg/ml低浓度样品检测)，且重复性好，检测误差范围小。

[0011] 本发明的技术方案如下：

[0012] 一种血管内皮抑制素生物活性的检测方法，包括如下步骤：

[0013] 1、人脐静脉血管内皮细胞传代培养至对数生长期，胰酶消化后均匀悬浮，接种相同体积的细胞悬液至培养孔中；

[0014] 2、预估待测样品的活性，将重组人血管内皮抑制素标准品和待测样品稀释至多个效价一致的浓度梯度点，向步骤1中的培养孔中加入相同体积的各浓度梯度点的重组人血管内皮抑制素标准品或待测样品继续培养；

[0015] 3、采用MTS染色法，测定培养孔中的OD值；

[0016] 4、按照量反应平行线法计算活性结果；

[0017] 4.1差方和计算

[0018] $m=5$

[0019] $K=k+k=3+3=6$

[0020] 差方和(总) = 方 $y^2 - (\sum y)^2 / mk$

[0021] $f(总) = mk - 1 = 5 \times 6 - 1 = 29$ 算实验

[0022] 差方和(剂间) = 方 $((\sum y(k))^2) / m - (\sum y)^2 / mk$

[0023] $f(剂间) = k - 1 = 6 - 1 = 5$

[0024] 差方和(区组间) = 方 $((\sum y(m))^2) / k - (\sum y)^2 / mk$

[0025] $f(区组间) = m - 1 = 5 - 1 = 4$

[0026] 差方和(误差) = 差方和(总 - 差方和(剂间) - 差方和(区组间))

[0027] $f(误差) = (m - 1) \times (k - 1) = 4 \times 5 = 20$ 区组间

[0028] $S^2 = \text{差方和(误差)} / f(误差)$

[0029] 其中， m 为平行线测定法各剂量组内反应的个数； k 为S和T的剂量组数和； f 为自由度； S 为标准品； T 为供试品； $\sum y(k)$ 为S和T各剂量组反应值之和； $\sum y(m)$ 为S和T各剂量组内各区组反应值之和。

[0030] 4.2可靠性测验及结果判断

[0031] 表1

[0032]

变异来源	自由度	差方和	方差	F值(实测)	F值(标准)	P值
试品间	1				4.35	$P > 0.05$
回归间	1				8.10	$P < 0.01$
偏离平行	1					$P > 0.05$
二次曲线	1					$P > 0.05$
反二次曲线	1					$P > 0.05$
剂间	5					$P < 0.01$
区组间	4				2.87, 4.43	$P > 0.05$
误差	20					
总变异	29					

[0033] 4.3效价及可信限计算

[0034] $r=1:0.8=1.25$

[0035] $I=\lg 2=0.096910$

[0036] $V=(T_3+T_2+T_1-S_3-S_2-S_1)/3$

[0037] $W=(T_3-T_1+S_3-S_1)/4$

[0038] $D=1$

[0039] $A=2/3$

[0040] $B=1/4=0.25$

[0041] $t=2.09$

[0042] $g=t^2s^2m/W^2$

[0043] $R=D \times \text{antilg}(IV/W)=1.052219$

[0044] $S_M = \{I/(W^2(1-g))\} \{ms^2\{(1-g)AW^2+BV^2\}\} 0.5$

[0045] R的FL= $\text{antilg}(\lg R/(1-g) \pm t \cdot S_M)$

[0046] A_T (估计效价)=11000U/mg

[0047] P_T 的FL= $A_T \cdot R$ 的FL

[0048] P_T 的FL%

[0049] $P_T = A_T \cdot R$

[0050] 其中r为S和T相邻高低剂量的比值;I为相邻高低剂量比值的对数, $I=\lg r$;V为平行线测定效价计算用数值;W同V;D为效价计算用数值;R为S和T的等反应剂量比值;M为效价比值(R)的对数; S_M 为M的标准误;A、B均为 S_M 计算公式中的数值;t为可信限计算用t值;g为回归的显著性系数; P_T 为供试品T的测得效价。

[0051] 进一步的,步骤1中所述培养具体为:在37℃,5%CO₂的培养箱中培养。

[0052] 进一步的,步骤1中所述步骤(1)中所述人脐静脉血管内皮细胞传代培养至对数生长期,具体为人脐静脉血管内皮细胞传代培养至3~5代。

[0053] 进一步的,步骤1中所述所述向培养孔中接种相同体积的细胞悬液,具体为向培养孔中接种密度为4000-6000个/ml的细胞悬液,优选约5000个/ml;96孔板接种体积为160μl-180μl,优选为160μl。

[0054] 进一步的,步骤2中所述培养板内每孔加入标准品或待测样品继续培养,具体为继续培养3-5天,优选5天。

[0055] 进一步的,步骤2中所述的浓度梯度点为2-4个,优选3个。

[0056] 进一步的,步骤2中所述的稀释为采取相同的比例稀释,优选相邻浓度比为0.8。

[0057] 进一步的,步骤2中所述所述每个浓度梯度加入4-6个培养孔,优选为5个培养孔。

[0058] 进一步的,步骤3中所述测定培养孔中的OD值的条件为在490nm波长,630nm参比波长下测定。

[0059] 进一步的,所述重组人血管内皮抑制素标准品采用重组人血管内皮抑制素冻干制剂。

[0060] 进一步的,所述重组人血管内皮抑制素为Endostar。

[0061] 本方法采用山东先声麦得津生物制药有限公司生产的重组人血管内皮抑制素冻干制剂作为标准品,其制剂稳定,生物活性能够长期保持稳定。

[0062] 本发明是采用量反应平行线法进行重组人血管内皮抑制素的活性检测,能够满足低浓度样品的活性测定要求,需进行大量的统计学参数来评价每一次活性实验的系统适用性,只有全部参数均通过实验结果方通过,所以该法所得结果相对更严谨;克服了现有增殖法的的误差大,重复性差等缺点。

具体实施方式

[0063] 下面结合实施例具体说明本发明,如无特殊说明下文中所涉及的实验用材料均可通过商业途径获得或按照常规方法制备。

[0064] 实施例1样品检测

[0065] 1.1检测步骤

[0066] 1.1.1细胞培养:HUVEC细胞,将HUVEC细胞用ECM完全培养基于37℃,5%CO₂的培养箱中培养传代至5代,待细胞状态良好准备接种。

[0067] 1.1.2接种:

[0068] 将细胞用0.25%胰酶-0.02%EDTA消化约1min,镜检观察,当细胞变圆立即加入培养液终止消化,吹打,1000转/分钟离心5分钟,弃上清,用培养基重新混悬,显微镜下血细胞计数板计数活细胞。调细胞密度约为5000个/ml,加入到96孔培养板内,每孔加入160μl细胞悬液。

[0069] 1.1.3样品准备及加药

[0070] 根据重组人血管内皮抑制素标准品活性,将重组人血管内皮抑制素标准品加注射用水复溶后再稀释至1.28mg/ml、1.02mg/ml、0.82mg/ml;

[0071] 预估样品活性为11000U/mg,将重组人血管内皮抑制素待测样品稀释至2.17mg/ml、1.73mg/ml、1.39mg/ml,使各浓度与对应浓度的标准品效价一致;

[0072] 每个梯度浓度设5个平行复孔,在96孔培养板内每孔加入40μl标准品或待测样品。

1.1.4培养

[0073] 将96孔板置37℃5%CO₂培养箱中培养96小时。

[0074] 按下表进行检测(S1:S2=T1:T2=1:0.8):

[0075] 表2

	S1	S2	S3	T1	T2	T3
效价剂量 (u/ml)	15237	19046	23808	15237	19046	23808
蛋白浓度 (mg/ml)	0.82	1.02	1.28	1.39	1.73	2.17
[0076] y(OD 值)	40 μl 样品+160μl 细胞					
	40 μl 样品+160μl 细胞					
	40 μl 样品+160μl 细胞					
	40 μl 样品+160μl 细胞					
	40 μl 样品+160μl 细胞					

[0077] 1.1.5染色及检测

[0078] MTS法测定。将MTS溶液室温融化后,每孔加入20μl,置37℃5%CO₂培养箱中培养4小时后使用酶标仪以630nm为参比波长,于490nm波长下测定OD值。

[0079] 1.1.6数据分析

[0080] (1) 实验数据

[0081] 表3

	S1	S2	S3	T1	T2	T3
剂量 (u/ml)	15237	19046	23808	15237	19046	23808
浓度 (mg/ml)	0.82	1.02	1.28	1.39	1.73	2.17
y (OD 值)	0.968466	0.942925	0.899112	0.971087	0.936633	0.933703
	1.02304	0.979346	0.907722	1.01658	0.949279	0.871498
	1.04429	0.914965	0.897843	0.996411	0.926058	0.831493
	0.973199	0.922921	0.89392	0.97599	0.908181	0.904682
	1.02631	0.942512	0.873514	0.955077	0.926139	0.936032

[0083] 表4

剂量 U/ml	标准品			供试品			组间和
	低剂量 S1	中剂量 S2	高剂量 S3	低剂量 T1	中剂量 T2	高剂量 T3	
	15237	19046	23808	15237	19046	23808	
y (OD 值)	0.968466	0.942925	0.899112	0.971087	0.936633	0.933703	5.651926
	1.023040	0.979346	0.907722	1.016580	0.949279	0.871498	5.747465
	1.044290	0.914965	0.897843	0.996411	0.926058	0.831493	5.611060
	0.973199	0.922921	0.893920	0.975990	0.908181	0.904682	5.578893
	1.026310	0.942512	0.873514	0.955077	0.926139	0.936032	5.659584
组内和	5.035305	4.702669	4.472111	4.915145	4.646290	4.477408	28.248928

[0086] (2) 方差分析 (计算各变异项的差方和、自由度 (f) 及误差项的方差)

[0087] $m=5$

[0088] $K=k+k=3+3=6$

[0089] 差方和 (总) = $\sum y^2 - (\sum y)^2 / mk = 0.071371$

[0090] $f(\text{总}) = mk - 1 = 5 \times 6 - 1 = 29$

[0091] 差方和 (剂间) = $\sum ((\sum y(k))^2) / m - (\sum y)^2 / mk = 0.052538$

[0092] $f(\text{剂间}) = k - 1 = 6 - 1 = 5$

[0093] 差方和 (区组间) = $\sum ((\sum y(m))^2) / k - (\sum y)^2 / mk = 0.002695$

[0094] $f(\text{区组间}) = m - 1 = 5 - 1 = 4$

[0095] 差方和 (误差) = 差方和 (总 - 差方和 (剂间) - 差方和 (区组间)) = 0.016139

[0096] $f(\text{误差}) = (m - 1) \times (k - 1) = 4 \times 5 = 20$

[0097] $S^2 = \text{差方和 (误差)} / F(\text{误差}) = 0.000807$

[0098] (3) 可靠性测验结果:

[0099] 表5

变异来源	自由度	差方和	方差	F 值		P 值
试品间	1	0.000977	0.000977	1.21	4.35	$P > 0.05$
回归间	1	0.050093	0.050093	62.08	8.10	$P < 0.01$
偏离平行	1	0.000787	0.000787	0.98		$P > 0.05$
二次曲线	1	0.000680	0.000680	0.84		$P > 0.05$
反二次曲线	1	0.000000	0.000000	0.00		$P > 0.05$
剂间	5	0.052538	0.010508	13.02		$P < 0.01$
区组间	4	0.002695	0.000674	0.83	2.87, 4.43	$P > 0.05$
误差	20	0.016139	0.000807			
总变异	29	0.071371	0.002461			

[0100]

- [0101] (4) 效价及可信限计算
- [0102] $r=1:0.8=1.25$
- [0103] $I=\lg 2=0.096910$
- [0104] $V=(T_3+T_2+T_1-S_3-S_2-S_1)/3=-0.057081$
- [0105] $W=(T_3-T_1+S_3-S_1)/4=-0.250233$
- [0106] $D=1$
- [0107] $A=2/3$
- [0108] $B=1/4=0.25$
- [0109] $t=2.09$
- [0110] $g=t^2s^2m/W^2=0.000276$
- [0111] $R=D \times \text{antilg}(IV/W)=1.052219$
- [0112] $S_M=\{I/(W^2(1-g))\} \{ms^2\{(1-g)AW^2+BV^2\}\} 0.5=0.02028343$
- [0113] R 的FL= $\text{antilg}(\lg R/(1-g) \pm t \cdot S_M)=0.95437687 \sim 1.16012461$
- [0114] A_T (估计效价)=11000U/mg
- [0115] P_T 的FL= $A_T \cdot R$ 的FL=10498~12761U/mg
- [0116] P_T 的FL%=9.8%
- [0117] $P_T=A_T \cdot R=11000 \cdot 1.046271=11574$ U/mg
- [0118] (5) 结论
- [0119] 估计效价 A_T 为11000U/mg,计算效价 P_T 为11574U/mg,计算效价范围10498~12761U/mg,判断估计效价正确。可靠性判断,结果成立。
- [0120] 实施例2精密度评价
- [0121] 精密度评价包含板内重复性评价,板间重复性评价及中间精密度。
- [0122] 板内重复性考察方法:于同一块96孔板中测定同一供试品溶液2份,计算板内样品比活性的RSD%(相对标准偏差)为7.9%。
- [0123] 板间重复性考察方法:同一人于5块96孔板中分别测定同一供试品溶液5次,计算板间样品比活性的RSD%为16.0%。
- [0124] 中间精密度考察方法:2人分别于不同时间单独进行本次试验,分别检测同一供试品溶液3次的比活性,计算2人共计6次供试品测得比活性的RSD为7.3%。
- [0125] 结果显示,精密度评价均符合要求。
- [0126] 表6

[0127]

测试项目	板内重复性							
样品编号	1		2		RSD (%)			
比活性 (U/mg)	11325		12649		7.9			
测试项目	板间重复性							
样品编号	1	2	3	4	5	RSD (%)		
比活性 (U/mg)	12649	8385	9748	9298	9977	16.0		
测试项目	中间精密度							
实验人	实验人 1				实验人 2			
样品编号	1	2	3	RSD (%)	1	2	3	RSD (%)
比活性 (U/mg)	8385	9748	9298	7.6	8931	8031	8448	5.4
2 人的 RSD%	7.3							

[0128] 实施例3耐用性评价

[0129] 针对可能引起活性测定实验偏差的因素进行评价：每孔中细胞数量不同的影响，细胞培养时间不同的影响，结果均符合要求。

[0130] 3.1不同细胞数量：分别将细胞数调整为4000和6000个/ml，检测样品活性，计算其比活性。标准品与供试品曲线平行，三种条件下供试品比活性RSD为1.4%，符合要求。

[0131] 3.2不同培养时间：加药后分别培养72h、89h、96h，检测样品活性，计算其比活性。标准品与供试品曲线平行，三种条件下供试品比活性RSD为10.6%，符合要求。

[0132] 表7

[0133]

测试项目	不同细胞数评价					
细胞个数/ml	4500		5000		5500	
样品种类	标准品	供试品	标准品	供试品	标准品	供试品
比活性 (U/mg)	-	9719	-	9748	-	9955
3 个细胞数量比活结果的 RSD 计算：1.4%						
测试项目	不同培养时间					
培养时间	72 h		89 h		96 h	
样品种类	标准品	供试品	标准品	供试品	标准品	供试品
比活性 (U/mg)	-	9811	-	10814	-	8746
3 个培养时间比活结果的 RSD 计算：10.6%						

专利名称(译)	一种重组人血管内皮抑制素生物活性检测方法		
公开(公告)号	CN108303384A	公开(公告)日	2018-07-20
申请号	CN201710019912.7	申请日	2017-01-12
[标]申请(专利权)人(译)	江苏先声药业有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏先声药业有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏先声药业有限公司		
[标]发明人	姜桂香 刘珊珊 刘晓艳 陈倩洁 陈虹		
发明人	姜桂香 刘珊珊 刘晓艳 陈倩洁 陈虹		
IPC分类号	G01N21/31 G01N33/535		
CPC分类号	G01N21/314 G01N33/535 G01N2021/3148		
其他公开文献	CN108303384B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种重组人血管内皮抑制素生物活性检测方法，该方法为分别利用样品和标准品活性测定结果中呈直线的效价区间中的浓度梯度点抑制HUVEC细胞增殖，并采用MTS比色法测定血管内皮抑制素对HUVEC的增殖抑制活性，进而使用量反应平行线测定方法分析重组人血管内皮抑制素对血管生成抑制的生物活性。该活性检测方法可适用于低浓度的样品检测，显著提高方法重复性，缩小方法误差范围。