



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104181290 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 03

(21) 申请号 201410387494. 3

(22) 申请日 2014. 08. 08

(71) 申请人 北京泰德制药股份有限公司

地址 100176 北京市大兴区亦庄经济技术开  
发区荣京东街 8 号

(72) 发明人 常翠云 贾慧 齐连权 刘福星  
崔颖 刘利波

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

一种评价促血小板生成素受体激动剂体外活性的分析方法

(57) 摘要

本发明公开了一种利用悬浮细胞 M07e 评价促血小板生成素受体(TPO 受体) 激动剂体外活性的分析方法。该方法通过评价样品对细胞的促增殖发育能力来反映样品与 TPO 受体结合活性以及促血小板生成活性。本发明一方面解决了现有技术中 BaF3-hMp1 细胞系构建难度大耗时长, 检测结果不稳定的问题; 另一方面解决了悬浮细胞 MTT 法显色时间长并且产生不溶性甲臃产物, 导致结果重现性差、准确度低的问题; 同时采用优于存活率评价指标的四参数数据处理方法, 可直接定义样品活性值。

1. 一种评价促血小板生成素受体激动剂体外活性的分析方法,其特征在于该方法是利用悬浮细胞 M07e 进行促血小板生成素受体激动剂体外活性的评价。

2. 根据权利要求 1 所述的一种评价促血小板生成素受体激动剂体外活性的分析方法,其特征在于该方法含有如下步骤:

- (1) 细胞复苏及传代;
- (2) 细胞活力评价;
- (3) 标准品及样品制备;
- (4) 样品活性检测;
- (5) 显色方法;
- (6) 原始数据处理。

3. 根据权利要求 2 所述的一种评价促血小板生成素受体激动剂体外活性的分析方法,其特征在于该方法含有如下步骤:

- (1) 细胞复苏及传代:

将细胞株从液氮罐中取出,迅速放入 37°C 水浴中,轻轻震荡使其快速融解;在超净台中将其移入离心管中,加入浓度为 10%-20% 的 FBS+1640 培养基重悬细胞;800-1000rpm 离心 3-10min 后弃去上清,加入细胞培养基及生长因子重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 GM-CSF,吹打混匀,移至细胞培养瓶中;瓶壁上标明细胞名称、操作日期、细胞代次;

将处于对数生长期的细胞吹打混匀,取 100  $\mu$ l 细胞悬液测定活细胞浓度、细胞存活率;将细胞悬液用新鲜细胞培养基稀释至细胞浓度约为  $5 \times 10^4$  个/ml  $\sim$   $10 \times 10^4$  个/ml,每瓶 15ml;轻轻摇匀,37°C,5%-10%CO<sub>2</sub> 条件下培养;复苏后最多传至 20 代弃用;

- (2) 细胞活力评价:

取 50  $\sim$  100  $\mu$ l 细胞悬液与 0.4% 台盼蓝等体积混合;于细胞计数仪测定活细胞浓度、细胞存活率;细胞传代浓度为  $5 \times 10^4$  个/ml  $\sim$   $10 \times 10^4$  个/ml,每 3  $\sim$  4 天传代一次;

- (3) 标准品及样品制备

取一支 TPO 受体激动剂,注射用水溶解至蛋白浓度为 0.02  $\sim$  0.07mg/ml,用浓度为 10%-20% 的 FBS+1640 培养基进行 5  $\sim$  10 倍梯度稀释,配制 7  $\sim$  9 个浓度的活性标准品溶液;

- (4) 样品活性检测:

取处于对数生长期的 M07e 细胞,吹打混匀,800-1000rpm 离心;上清液高速离心后加入空白对照孔;沉淀细胞用无血清 1640 培养基洗涤两次;再用浓度为 10%-20% 的 FBS+1640 培养基重悬;用细胞计数仪计数后调整细胞浓度至  $1.5 \times 10^5 \sim 2.2 \times 10^5$  个/ml;样品及空白对照 50 $\mu$ l/孔,细胞 150 $\mu$ l/孔加入 96 孔板中,37°C,5%-10% CO<sub>2</sub> 条件下培养 48  $\sim$  72 小时;

- (5) 显色方法:

将 CCK-8 试剂用浓度为 10%-20% 的 FBS+1640 培养基等体积稀释;加入 96 孔板中;每孔 20  $\mu$ l,摇匀,放入 CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 2h,用酶标仪测定 450nm 和 600nm 处吸光度;

- (6) 原始数据处理

以标准品溶液和样品溶液的稀释倍数为 x 值,以对应的吸光度为 y 值,用 Gen5 1.10 软件作四参数回归曲线; $Y = (A - D) / (1 + (X/C)^B) + D$ ;

其中 :A :曲线上渐近线估值即最大吸光度值 ; B :曲线的斜率 ; C :最大有效量一半时对应的浓度 ; D :曲线下渐近线估值即最小吸光度值 ;

将标准品溶液四参数曲线的(A+D)/2 代入标准品与样品方程,得到标准品  $E_r$  与样品  $E_s$  ;

其中 :A :标准品最大吸光度值即为 450nm 扣除 600nm 吸光度,再减去空白对照 ;

D :标准品最小吸光度值即为 450nm 扣除 600nm 吸光度,再减去空白对照 ;

其中 :样品活性 / 比活性计算公式 :供试品活性 / 比活性计算公式 :

供试品活性(U/ml) =  $Pr \times$  ;

供试品比活性(U/mg) = ;

其中 :

$Pr$  :标准品活性, U/ml ;

$D_s$  :样品预稀释倍数 ;

$D_r$  :标准品预稀释倍数 ;

$E_s$  :样品相当于标准品半效量的稀释倍数 ;

$E_r$  :标准品半效量的稀释倍数。

4. 根据权利要求 1 至 3 所述的一种评价促血小板生成素受体激动剂体外活性的分析方法,其特征在于步骤(1)中所使用的培养基是完全培养基,且添加的 M07e 生长所依赖的 GM-CSF 终浓度为 5 ~ 10ng/ml。

5. 根据权利要求 1 至 3 所述的一种评价促血小板生成素受体激动剂体外活性的分析方法,其特征在于步骤(2)中进行细胞活力评价时,用于样品检测的细胞活力范围为 :活细胞浓度  $7 \times 10^5$  个 /ml ~  $12 \times 10^5$  个 /ml,细胞存活率  $\geq 90\%$ 。

6. 根据权利要求 1 至 3 所述的一种评价促血小板生成素受体激动剂体外活性的分析方法,其特征在于步骤(3)中标准品和样品的浓度范围为 :0.00005ng/ml ~ 5000ng/ml,采用 5 ~ 10 倍梯度稀释对样品进行处理。

7. 根据权利要求 1 至 3 所述的一种评价促血小板生成素受体激动剂体外活性的分析方法,其特征在于步骤(4)中样品活性检测过程使用培养基不含有 M07e 细胞复苏和传代时所依赖的生长因子,而是加入一定浓度待检测的 TPO 受体激动剂。

8. 根据权利要求 1 至 3 所述的一种评价促血小板生成素受体激动剂体外活性的分析方法,其特征在于,步骤(5)中的显色方法为细胞培养 48 ~ 72 小时后加入 CCK-8 显色试剂。

9. 根据权利要求 1 至 3 所述的一种评价促血小板生成素受体激动剂体外活性的分析方法,其特征在于步骤(6)中的原始数据处理采用四参数算法。

10. 根据权利要求 1 至 3 所述的一种评价促血小板生成素受体激动剂体外活性的分析方法,其特征在于,促血小板生成素受体激动剂含有重组人全长血小板生成素 rhTPO 或聚乙二醇修饰的重组人巨核细胞生长和发育因子 PEG-rhMG-DF 或 TPO/IL3 融合蛋白或 TPO 肽类模拟物或 TPO 非肽类模拟物和抗体类小分子 TPO 受体激动剂中的任意一种。

## 一种评价促血小板生成素受体激动剂体外活性的分析方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于蛋白质医药生物工程与技术领域,具体涉及一种新颖的利用悬浮细胞 M07e 评价促血小板生成素受体(TPO 受体)激动剂体外活性的分析方法。

### 背景技术

[0002] 促血小板生成素受体(TPO 受体)激动剂特异性与 TPO 受体 c-Mp1 结合,促进巨核细胞增殖发育,进而产生血小板,通常用于治疗化疗引起的血小板减少或血小板减少性紫癜。此类生物制品包括重组人血小板生成素(rhTPO)、聚乙二醇修饰的重组人巨核细胞生长和发育因子(PEG-rhMG-DF)、TPO 肽类模拟物,另外还有 TPO 非肽类模拟物。它们均可结合并活化 TPO 受体(Mp1)从而发挥生物学效应。

[0003] 第一代 TPO 受体激动剂以重组人血小板生成素 rhTPO (特比澳等)为代表,其与内源性 TPO 的氨基酸序列相同,能与巨核细胞表面 TPO 受体 Mp1 结合进而引起巨核细胞增殖,进而产生血小板。

[0004] TPO 模拟肽 -Fc 融合蛋白(罗米司亭等)为一种新型重组蛋白,属于第二代 TPO 受体激动剂,是一种长效 TPO 受体激动剂。该蛋白是在抗体 Fc 片段羧基端连接了两段 TPO 模拟肽,该模拟肽可以与 TPO 受体特异结合,诱导骨髓中的造血干细胞分化为巨核细胞,并促进巨核细胞的生长、成熟和分化,使巨核细胞最终释放血小板。

[0005] 艾曲波帕为口服非肽类小分子 TPO 受体激动剂,可特异结合 TPO 受体,引起受体二聚化,激活酪氨酸激酶 - 信号转导及转录激活(JAK-STAT)等信号通路,进而引起巨核细胞增殖分化,产生血小板。

[0006] 由于 TPO 受体激动剂具有刺激细胞增殖的作用,因此通常采用相关细胞进行体外生物学活性评价。有文献报道使用 BaF3-hMp1 细胞进行 rhTPO 或罗米司亭体外活性分析。但是这种方法所用细胞系 BaF3-hmp1 细胞是在原细胞基础上导入 c-mp1 基因,进而在细胞表面表达 TPO 的受体 Mp1,细胞系的构建时间长,受体数量不均一,细胞稳定性较差。活性检测结果容易受到细胞稳定性的影响而有较大变动。此方法采用 MTT 比色法,产生的甲贲产物不易溶解,需加入 DMSO 溶解甲贲产物,且往往因溶解不全而对实验结果造成影响。此方法采用存活率指标来评价不同浓度 rhTPO 或罗米司亭对 BaF3-mp1 细胞增殖的影响,但是计算存活率的方法不能换算成样品活性值。

[0007] 本发明人过潜心研究发现采用从白血病患者外周血中分离所得的 M07e 细胞株能够特异性地表达 TPO 受体 Mp1,无需任何改造,简单方便实用。相比现有技术中采用 BaF3-mp1 细胞株更均一,性质更加稳定。采用 M07e 细胞株进行体外活性检测,评价结果的重现性和准确度均有大幅度提高,同时大大缩短构建和筛选细胞株所需的 3 个月~5 个月,提高了生产效率,降低了生产成本。

[0008] 另外,本发明人发现联合采用一种新型显色剂 -CCK-8 (cell counting 8)进行活性评价能够进一步解决现有技术中存在采用有机溶剂,安全性低,测试结果不准确的缺陷。此试剂利用了 Dojindo 开发的水溶性四唑盐 -WST-8,它在电子载体 1- 甲氧基 -5- 甲基吩嗪

鎊硫酸二甲酯(1-Methoxy PMS)存在的情况下能够被还原成水溶性的甲臞染料。WST-8 被细胞内脱氢酶氧化还原后生成的橙黄色甲臞染料能够溶解在组织培养基中,生成的甲臞量与活细胞数量成正比。CCK-8 比色法无需裂解细胞,可直接进行比色,该方法步骤简便,显色时间仅需 2 小时(MTT 法需要过夜显色),并且准确性和重复性得到了明显提高。

[0009] 根据中华人民共和国药典三部(2010 版)附录 X,多种细胞因子活性采用细胞增殖法 /MTT 比色法测定,实验数据采用四参数法进行处理,最终计算出样品生物学活性。据此,根据本发明测定方法可以通过四参数法处理数据,能够直接计算出 TPO 受体激动剂活性值,较以往的存活率评价方法更直观体现 TPO 受体激动剂的体外活性。

[0010] 本发明人根据长期研究和实践,建立了一种新型的利用悬浮细胞(M07e)评价 TPO 受体激动剂体外活性的分析方法:细胞与 TPO 受体激动剂孵育一段时间后,加入显色试剂 CCK-8 对吸光度值进行检测,进而将检测值进行四参数回归分析。结果在一定范围内使得 TPO 受体激动剂的浓度对数值与 M07e 细胞增殖量呈现良好的线性关系,可以准确真实地反映出体外活性的情况。

## 发明内容

[0011] 本发明要解决的技术问题在于提供一种评价促血小板生成素受体激动剂体外活性的分析方法,此方法中涉及的 M07e 细胞本身表达 TPO 受体,与传统检测方法相比,无需单独在细胞表面表达受体,细胞稳定性强。此检测方法简便、稳定性好,用时短,成本低,重现性高。

[0012] 为实现本发明的技术目的,本发明采用以下技术方案:

利用悬浮细胞 M07e 进行促血小板生成素受体激动剂体外活性的评价。

[0013] 其中,该方法含有如下步骤:

- (1) 细胞复苏及传代;
- (2) 细胞活力评价;
- (3) 标准品及样品制备;
- (4) 样品活性检测;
- (5) 显色方法;
- (6) 原始数据处理。

[0014] 进一步地,该方法的详细步骤如下所示:

- (1) 细胞复苏及传代:

将细胞株从液氮罐中取出,迅速放入 37℃ 水浴中,轻轻震荡使其快速融解;在超净台中将其移入离心管中,加入浓度为 10%-20% 的 FBS+1640 培养基重悬细胞;800-1000rpm 离心 3-10min 后弃去上清,加入细胞培养基及生长因子重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 GM-CSF,吹打混匀,移至细胞培养瓶中;瓶壁上标明细胞名称、操作日期、细胞代次;

将处于对数生长期的细胞吹打混匀,取 100  $\mu$ l 细胞悬液测定活细胞浓度、细胞存活率;将细胞悬液用新鲜细胞培养基稀释至细胞浓度约为  $5 \times 10^4$  个 /ml ~  $10 \times 10^4$  个 /ml,每瓶 15ml;轻轻摇匀,37℃,5%-10%CO<sub>2</sub> 条件下培养;复苏后最多传至 20 代弃用;

- (2) 细胞活力评价:

取 50 ~ 100  $\mu$ l 细胞悬液与 0.4% 台盼蓝等体积混合;于细胞计数仪测定活细胞浓度、

细胞存活率；细胞传代浓度为  $5 \times 10^4$  个 /ml ~  $10 \times 10^4$  个 /ml, 每 3 ~ 4 天传代一次；

### (3) 标准品及样品制备

取一支 TPO 受体激动剂, 注射用水溶解至蛋白浓度为 0.02 ~ 0.07mg/ml, 用浓度为 10%-20% 的 FBS+1640 培养基进行 5 ~ 10 倍梯度稀释, 配制 7 ~ 9 个浓度的活性标准品溶液；

### (4) 样品活性检测：

取处于对数生长期的 M07e 细胞, 吹打混匀, 800-1000rpm 离心；上清液高速离心后加入空白对照孔；沉淀细胞用无血清 1640 培养基洗涤两次；再用浓度为 10%-20% 的 FBS+1640 培养基重悬；用细胞计数仪计数后调整细胞浓度至  $1.5 \times 10^5$  ~  $2.2 \times 10^5$  个 /ml；样品及空白对照 50 $\mu$ l / 孔, 细胞 150 $\mu$ l / 孔加入 96 孔板中, 37 $^{\circ}$ C, 5%-10% CO<sub>2</sub> 条件下培养 48 ~ 72 小时；

### (5) 显色方法：

将 CCK-8 试剂用浓度为 10%-20% 的 FBS+1640 培养基等体积稀释；加入 96 孔板中；每孔 20  $\mu$ l, 摇匀, 放入 CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 2h, 用酶标仪测定 450nm 和 600nm 处吸光度；

### (6) 原始数据处理

以标准品溶液和样品溶液的稀释倍数为 x 值, 以对应的吸光度为 y 值, 用 Gen5 1.10 软件作四参数回归曲线； $Y = (A - D) / (1 + (X/C)^B) + D$ ；

其中：A：曲线上渐近线估值即最大吸光度值；

B：曲线的斜率；

C：最大有效量一半时对应的浓度；

D：曲线下渐近线估值即最小吸光度值；

将标准品溶液四参数曲线的  $(A+D)/2$  代入标准品与样品方程, 得到标准品  $E_r$  与样品  $E_s$ ；

其中：A：标准品最大吸光度值即为 450nm 扣除 600nm 吸光度, 再减去空白对照；

D：标准品最小吸光度值即为 450nm 扣除 600nm 吸光度, 再减去空白对照；

其中：样品活性 / 比活性计算公式：供试品活性 / 比活性计算公式：

供试品活性 (U/ml) =  $P_r \times$  ；

供试品比活性 (U/mg) = ；

其中：

$P_r$ ：标准品活性, U/ml；

$D_s$ ：样品预稀释倍数；

$D_r$ ：标准品预稀释倍数；

$E_s$ ：样品相当于标准品半效量的稀释倍数；

$E_r$ ：标准品半效量的稀释倍数。

[0015] 其中, 步骤(1)中所使用的培养基是完全培养基, 且添加的 M07e 生长所依赖的 GM-CSF 终浓度为 5 ~ 10ng/ml。

[0016] 其中, 步骤(2)中进行细胞活力评价时, 用于样品检测的细胞活力范围为：活细胞浓度  $7 \times 10^5$  个 /ml ~  $12 \times 10^5$  个 /ml, 细胞存活率  $\geq 90\%$ 。

[0017] 其中, 步骤(3)中标准品和样品的浓度范围为：0.00005ng/ml ~ 5000ng/ml, 采用

5 ~ 10 倍梯度稀释对样品进行处理。

[0018] 其中,步骤(4)中样品活性检测过程使用培养基不含有 M07e 细胞复苏和传代时所依赖的生长因子,而是加入一定浓度待检测的 TPO 受体激动剂。

[0019] 其中,步骤(5)中的显色方法为细胞培养 48 ~ 72 小时后加入 CCK-8 显色试剂。

[0020] 其中,步骤(6)中的原始数据处理采用四参数计算法。

[0021] 其中,促血小板生成素受体激动剂含有重组人全长血小板生成素 rhTPO 或聚乙二醇修饰的重组人巨核细胞生长和发育因子 PEG-rhMG-DF 或 TPO/IL3 融合蛋白或 TPO 肽类模拟物或 TPO 非肽类模拟物和抗体类小分子 TPO 受体激动剂中的任意一种。

[0022] 本发明的有益效果在于:

(1) 省去了构建细胞系及筛选细胞系的 2 ~ 5 个月的时间;

(2) 本细胞株可稳定表达 TPO 受体,大大提高了检测结果的稳定性、重复性;

(3) 本方法使用 CCK-8 进行显色,与传统 MTT 法相比,显色时间仅 1 ~ 4 小时,节省传统方法中需要过夜放置的时间,并且在悬浮细胞显色不会出现沉淀;

(4) 本检测方法采用四参数回归计算法处理原始数据,与传统存活率计算方式相比,数据结果更可靠、直观。

#### 附图说明

[0023] 图 1 为 TMP-Fc 四参数拟合曲线。

[0024] 图 2 为重组人促血小板生成素模拟肽 -Fc 融合蛋白(TMP-Fc)四参数拟合曲线(5 倍稀释梯度)。

[0025] 图 3 为重组人促血小板生成素模拟肽 -Fc 融合蛋白(TMP-Fc)四参数拟合曲线(10 倍稀释梯度)。

[0026] 图 4 为罗米司亭体外活性检测四参数拟合曲线。

[0027] 图 5 为人重组血小板生成素 rhTPO 体外活性检测四参数拟合曲线。

#### 具体实施方式

[0028] 以下通过实施例形式的具体实施方式对本发明的内容作进一步的详细说明。但不应将其理解为本发明的范围仅限于以下实施例。凡基于本发明的内容所实现的技术方案均属于本发明的范围。显然,根据本发明的内容,按照本领域的普通技术知识和惯用手段,在不脱离本发明的基本技术思想的前提下,还可以做出其它多种形式的修改、替换和变更。

[0029] 实施例一 重组人促血小板生成素模拟肽 -Fc 融合蛋白(TMP-Fc)体外活性评价(5 倍稀释梯度)

##### (1) 细胞复苏及传代

将细胞株从液氮罐中取出,迅速放入 37℃ 水浴中,轻轻震荡使其快速融解。在超净台中将其移入离心管中,加入 10% FBS+1640 培养基重悬细胞。800rpm 离心 5min 后弃去上清,加入细胞培养基及生长因子重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF),终浓度 10ng/ml,吹打混匀,移至细胞培养瓶中。瓶壁上标明细胞名称、操作日期、细胞代次。

[0030] 将处于对数生长期的细胞吹打混匀,取 100  $\mu$ l 细胞悬液测定活细胞浓度、细胞存活率等。将细胞悬液用新鲜细胞培养基稀释至细胞浓度约为  $10 \times 10^4$  个 /ml,每瓶 15ml。轻

轻摇匀,37℃,8% CO<sub>2</sub> 条件下培养。复苏后最多传至第 4 代用于本次检测。

#### [0031] (2) 细胞活力评价

取 100 μl 细胞悬液与 0.4% 台盼蓝等体积混合,于细胞计数仪测定活细胞浓度  $1.1 \times 10^5$  个/ml、细胞存活率 95.3%。

#### [0032] (3) 标准品及样品制备

取一支 TMP-Fc,注射用水溶解至蛋白浓度为 0.025mg/ml,用 10% FBS+1640 培养基进行 5 倍梯度稀释,配制 9 个浓度的样品溶液

#### (4) 样品活性检测

取处于对数生长期的 M07e 细胞,吹打混匀,800rpm 离心。上清液高速离心后加入空白对照孔。沉淀细胞用无血清 1640 培养基洗涤两次,再用 10% FBS+1640 培养基重悬。用细胞计数仪计数后调整细胞浓度至  $1.8 \times 10^5$  个/ml。样品及空白对照 50μl/孔,细胞 150μl/孔加入 96 孔板中,37℃,8% CO<sub>2</sub> 条件下培养 60 小时。

#### [0033] (5) 显色方法

将 CCK-8 试剂用 10% FBS+1640 培养基等体积稀释(现用现配),加入 96 孔板中。每孔 20 μl,摇匀,放入 CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 2h,用酶标仪测定 450nm 和 600nm 处吸光度。

#### [0034] (6) 原始数据处理

以标准品溶液和样品溶液的浓度为 x 值,以对应的吸光度(450nm 扣除 600nm 吸光度,再减去空白对照)为 y 值,用 Gen5 1.10 软件作四参数回归曲线。

#### [0035] $Y = (A - D) / (1 + (X/C)^B) + D$

A:曲线上渐近线估值(最大吸光度值) B:曲线的斜率 C:最大有效量一半时对应的浓度 D:曲线下渐近线估值(最小吸光度值)

将标准品溶液四参数曲线的(A+D)/2 代入标准品与样品方程,得到待测样品半数有效浓度。

[0036] 结果如图 2 所示,在 TMP-Fc 浓度为 0.0032ng/ml ~ 1250ng/ml 的范围内,M07e 细胞增殖量与 TMP-Fc 浓度的以 10 为底的对数呈现出良好的线性关系, $R^2 = 0.998$ 。TMP-Fc 半效浓度为 2.8ng/ml。

[0037] 实施例二 重组人促血小板生成素模拟肽 -Fc 融合蛋白(TMP-Fc) 体外活性评价(10 倍稀释梯度)

细胞复苏及传代、细胞活力评价、样品检测、显色方法、数据处理详细步骤见案例一,样品制备采用 10 倍梯度稀释,配制 9 个浓度的样品溶液

结果如图 3 所示,在 TMP-Fc 浓度为 0.0005ng/ml ~ 5000ng/ml 的范围内,M07e 细胞增殖量与 TMP-Fc 浓度的以 10 为底的对数呈现出良好的线性关系, $R^2 = 0.999$ 。TMP-Fc 半效浓度为 3.0ng/ml。

#### [0038] 实施例三罗米司亭体外活性评价

细胞复苏及传代、细胞活力评价、样品检测、显色方法、数据处理详细步骤见案例一。

[0039] 样品制备:取罗米司亭样品,用 10% FBS+1640 培养基稀释蛋白浓度至 0.05mg/ml,采用 10 倍梯度稀释,配制 9 个浓度的样品溶液。

[0040] 结果如图 4 所示,在罗米司亭浓度为 0.0005ng/ml ~ 5000ng/ml 的范围内,M07e 细胞增殖量与罗米司亭浓度浓度的以 10 为底的对数呈现出良好的线性关系, $R^2 = 0.995$ 。罗

米司亭浓度半效浓度为 3.0ng/ml。

#### [0041] 实施例四 rhTPO 细胞活性评价

细胞复苏及传代、细胞活力评价、样品检测、显色方法、数据处理详细步骤见案例一。

[0042] 样品制备：取人重组血小板生成素 rhTPO 样品，用 10% FBS+1640 培养基稀释蛋白浓度至 512ng/ml，采用 2 倍梯度稀释，配制 9 个浓度的样品溶液。

[0043] 结果如图 5 所示，rhTPO 浓度在 0 ~ 256ng/ml 之间浓度曲线呈上升状态，rhTPO 浓度为 256ng/ml 时，M07e 细胞增殖达到平台期。rhTPO 半效浓度为 51.2ng/ml。

#### [0044] 比较例（MTT 及 CCK-8 显色方法的比较）

分别采用 MTT 显色法及 CCK-8 显色法检测 TMP-Fc 对 M07e 细胞的增殖效果，样品与细胞孵育 72 小时后进行显色，其中 MTT 显色法每孔加入 100  $\mu$ l DMSO 后过夜放置，次日发现蓝紫色结晶甲臞仍未完全溶解，无法检测其吸收值；CCK-8 法加入显色剂 10  $\mu$ l，放置 2 小时检测 450nm/600nm 吸收值。

[0045] MTT 法显色形成甲臞沉淀，需要再加入 DMSO 过夜溶解，而 CCK-8 显色后直接形成水溶性甲臞染料，省去甲臞溶解时间，操作简便，显色时间短（2h）。根据文献报道，CCK-8 法检测的 OD 值与活细胞数的相关度要优于 MTT 法，是一种灵敏度高、重复性好的细胞活性检测方法。基于上述原因，选择 CCK-8 法作为该发明的显色方法。

#### [0046] 验证例

##### (1) 线性与范围

	样品浓度范围	线性 R <sup>2</sup>
实例一	0.0032ng/ml ~ 1250ng/ml	0.998
实例二	0.0005ng/ml ~ 5000ng/ml	0.999
实例三	0.0005ng/ml ~ 5000ng/ml	0.997

##### (2) 重现性

根据发明内容中具体步骤及线性与范围要求稀释 TMP-Fc 样品，重复测定 6 次计算 RSD，表 1 结果显示，采用该方法检测 TMP-Fc 体外活性的重现性 RSD= 8.1%，RSD  $\leq$  20%，符合一般生物制品活性检测精密度要求。

#### [0047] 表 1 TMP-Fc 样品重复性验证试验结果

样品	比活性值 U/mg	平均值 U/mg	RSD
1	447897		
2	435795		
3	389073	400933	9.5%
4	409427		
5	345565		
6	377843		

##### (3) 准确度

TMP-Fc 样品与 TMP-Fc 标准品按照一定比例混合，分别制成 50%、100%、150% 添加回收率样品，按发明内容中具体步骤测定未添加对照、50%、100% 及 150% 添加回收率样品的活性，并与理论添加值比较，回收率在 70% ~ 130% 范围内满足本方法准确度要求。

[0048] TMP-Fc 样品 50%、100%、150% 添加试验结果如表 2 所示，在添加样品中，50%、100%、

150% 添加回收率测定值范围为 80% ~ 120% 之间, 因此该方法准确度符合要求。

[0049] 表 2 TMP-Fc 样品准确度验证试验结果

样品	测定活性 U/ml	测定添加值 U/ml	理论添加值 U/ml	回收率
50%添加	30407	8722	10526	82.9%
100%添加	43990	23286	21052	110.6%
150%添加	54412	26777	31378	84.8%
未添加-1	21655	0	0	0
未添加-2	20704	0	0	0
未添加-3	27635	0	0	0

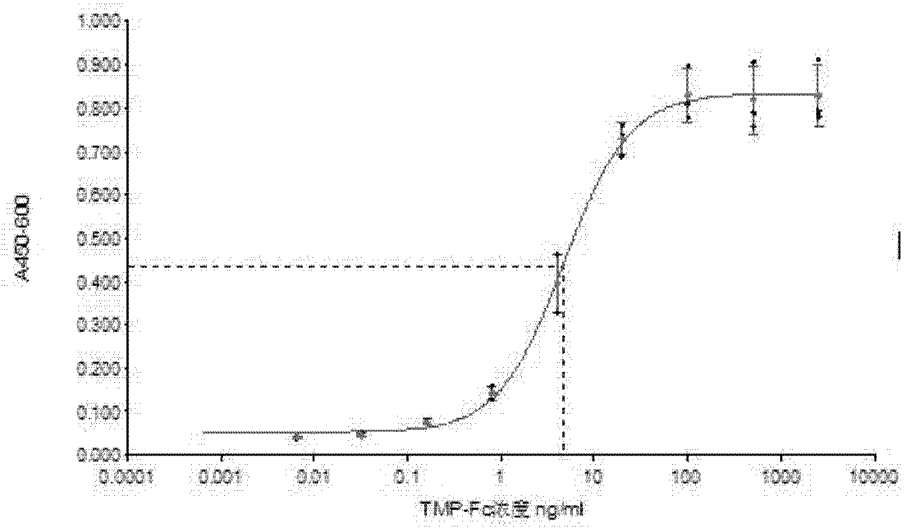


图 1

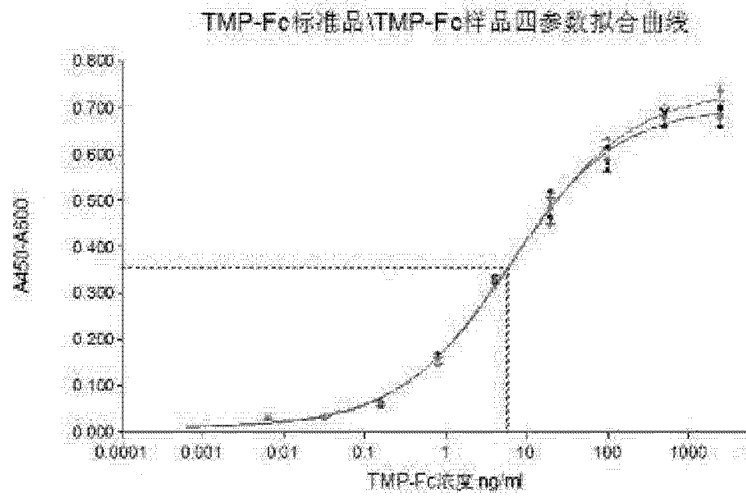


图 2

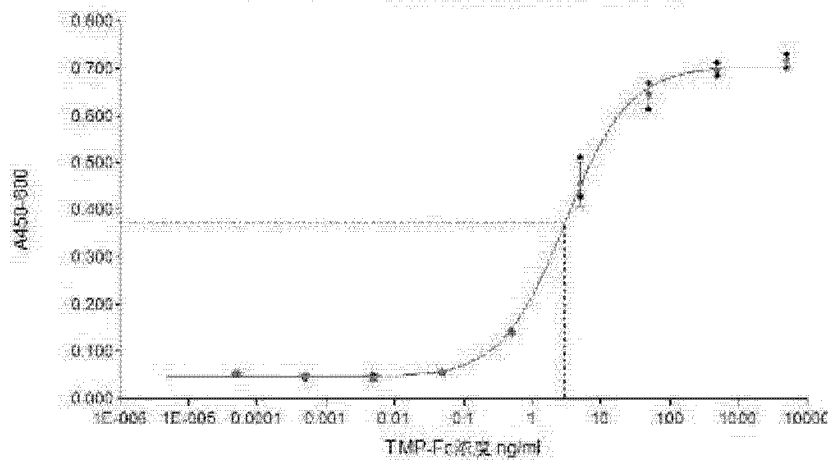


图 3

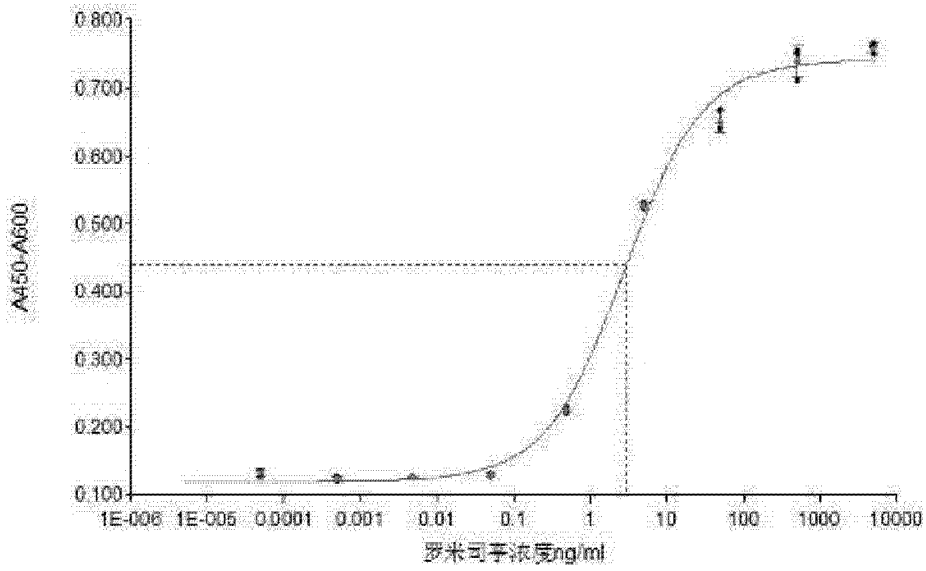


图 4

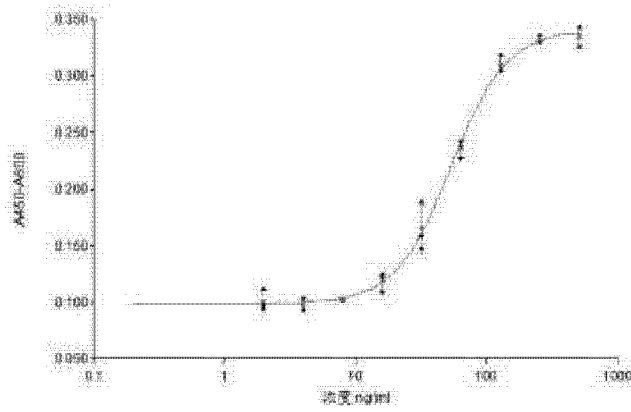


图 5

专利名称(译)	一种评价促血小板生成素受体激动剂体外活性的分析方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN104181290A</a>	公开(公告)日	2014-12-03
申请号	CN201410387494.3	申请日	2014-08-08
[标]申请(专利权)人(译)	北京泰德制药股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京泰德制药股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京泰德制药股份有限公司		
[标]发明人	常翠云 贾慧 齐连权 刘福星 崔颖 刘利波		
发明人	常翠云 贾慧 齐连权 刘福星 崔颖 刘利波		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6863		
其他公开文献	CN104181290B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种利用悬浮细胞MO7e评价促血小板生成素受体(TPO受体)激动剂体外活性的分析方法。该方法通过评价样品对细胞的促增殖发育能力来反映样品与TPO受体结合活性以及促血小板生成活性。本发明一方面解决了现有技术中BaF3-hMpl细胞系构建难度大耗时长,检测结果不稳定的问题;另一方面解决了悬浮细胞MTT法显色时间长并且产生不溶性甲臃产物,导致结果重现性差、准确度低的问题;同时采用优于存活率评价指标的四参数数据处理方法,可直接定义样品活性值。

