

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200610076398.2

[51] Int. Cl.  
G01N 33/53 (2006.01)  
C12Q 1/00 (2006.01)  
A61K 38/22 (2006.01)  
A61P 3/10 (2006.01)

[43] 公开日 2006年10月11日

[11] 公开号 CN 1844925A

[22] 申请日 2006.4.24

[21] 申请号 200610076398.2

[71] 申请人 东莞市博康健医药科技有限公司

地址 523560 广东省东莞市常平镇常黄公路  
板石路口星汇中心15楼

[72] 发明人 韩为跃 阳 勇 张仁怀 杨立明  
刘社际 何 凯 黄碧莲 刘德林

[74] 专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理有限公司

代理人 丁业平 罗建民

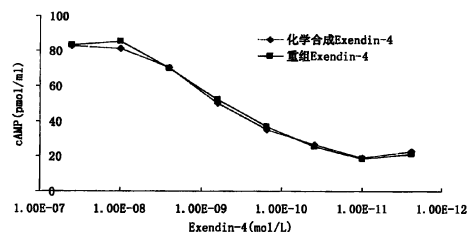
权利要求书 3 页 说明书 10 页 附图 2 页

## [54] 发明名称

一种重组促胰岛素分泌素生物学活性测定方法及其应用

## [57] 摘要

本发明涉及一种重组促胰岛素分泌素 (Exendin-4) 生物学活性测定方法及其应用。该重组促胰岛素分泌素的生物学活性测定方法, 是用 Exendin-4 刺激细胞使胞内 cAMP 分泌, 胞内 cAMP 量迅速升高, 用酶联免疫方法测定裂解的细胞上清中的 cAMP 含量, 裂解的细胞上清中 cAMP 含量呈剂量依赖性, 进而计算出 Exendin-4 的生物活性。用 Exendin-4 刺激的细胞为 RIN-5F 细胞。所述的测定方法可在重组促胰岛素分泌素 Exendin-4 质控中应用。本发明采用酶联免疫方法测定重组促胰岛素分泌素 Exendin-4 的生物学活性具有步骤简便、废物少并且易于处理、简便、快速、准确度高、安全性好等优点。



1、一种促胰岛素分泌素(Exendin-4)的生物学活性测定方法，包括如下步骤：

- (1) 用Exendin-4刺激细胞，使胞内cAMP分泌，
- (2) 将步骤(1)的细胞裂解，收集裂解上清液；
- (3) 用酶联免疫方法测定步骤(2)所收集的细胞上清中的cAMP含量，

以及

- (4) 根据步骤(3)测得cAMP含量计算出所述Exendin-4的生物活性。

2、根据权利要求1所述的促胰岛素分泌素的生物学活性测定方法，其特征在于所述用Exendin-4刺激的细胞为RIN-5F细胞。

3、根据权利要求2所述的促胰岛素分泌素的生物学活性测定方法，其特征在于用不同剂量的Exendin-4和一定剂量的IBMX同时刺激RIN-5F细胞3-12min，使胞内cAMP分泌。

4、根据权利要求3所述的促胰岛素分泌素的生物学活性测定方法，其特征在于所述步骤(1)是如下完成的：

(a) 取对数生长期的RIN-5F细胞，用含血清的细胞培养液RPMI1640制成细胞悬液，调整细胞密度为 $(1.6-2.4) \times 10^4$ 个/孔接种于细胞培养板，培养至细胞汇合率达到70%以上；

(b) 除去上述含血清的细胞培养液，加入无血清细胞培养液，培养

箱中孵育1-4小时；

(c) 用含0.2-1mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX) 和无血清细胞培养液作为稀释液，将Exendin-4预稀释到100至400ng/ml，然后作3-6倍稀释，稀释6-10个梯度；

(d) 除去无血清培养上清，将稀释好的各稀释梯度Exendin-4按每孔140-220  $\mu$  l加入细胞培养板的对应孔中，置培养箱孵育3-12分钟。

5、根据权利要求4所述的促胰岛素分泌素的生物学活性测定方法，其特征在于步骤(a)中调整细胞密度为 $1 \times 10^5$ 个/ml，接种细胞于96孔的培养板中，接种量为200  $\mu$  l/孔，置培养板于37°C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中，连续培养3天；步骤(b)中除去细胞培养上清，加入200  $\mu$  l无血清细胞培养基，CO<sub>2</sub>培养箱孵育2小时。

6、根据权利要求4所述的促胰岛素分泌素的生物学活性测定方法，其特征在于步骤(c)中是用含1mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX) 和含0.1% BSA的无血清细胞培养液作为稀释液，将Exendin-4预稀释至200ng/ml，然后作4倍稀释，作8个稀释梯度，每个稀释梯度做双复孔。

7、根据权利要求4所述的促胰岛素分泌素的生物学活性测定方法，其特征在于步骤(d)中除去无血清培养上清，将稀释好的各浓度梯度Exendin-4 180  $\mu$  l加入细胞培养板对应孔中，置37°C，5%CO<sub>2</sub>培养箱孵育5分钟。

8、根据权利要求1所述的促胰岛素分泌素的生物学活性测定方法，其特征在于步骤（2）是如下完成的：将用于刺激细胞的上清液除去，每孔加入200  $\mu$  l 0.1N的HCl，在37℃孵育30min，离心收集上清液用于检测；所述步骤（3）是如下完成的：取步骤（2）得到的上清液100  $\mu$  l，采用cAMP酶联免疫检测试剂盒，测定cAMP含量。

9、根据权利要求1所述的促胰岛素分泌素的生物学活性测定方法，其特征在于步骤（1）包括利用ORIGIN软件进行四参数（Logistic）运算处理，求出Exendin-4的半效浓度EC<sub>50</sub>，即以该值表示为1个活性单位（AU）。

10、权利要求1-9之一所述的促胰岛素分泌素的生物学活性测定方法在重组促胰岛素分泌素Exendin-4质控中应用。

## 一种重组促胰岛素分泌素生物学活性测定方法及其应用

### 技术领域

本发明属于细胞因子生物活性检测技术领域，涉及一种重组促胰岛素分泌素(即Exendin-4)生物学活性测定方法及其应用。

### 背景技术

促胰岛素分泌素(Exendin-4)是从大毒蜥Gila monster Heoderma suspectum口腔分泌物中分离出的一种含有39个氨基酸的多肽(Eng, J.等, J. Biol. Chem., 265:20259-62, 1990; Eng, J.等, J. Biol. Chem., 267:7402-05, 1992)。其氨基酸序列与类胰高血糖素(glucagon-like peptide, GLP-1)有53%的同源性(Coke等, J. Biol. Chem., 268:19650-55, 1993)。Chen和 Drucker克隆了该基因,并得出它是不同于胰高血糖素基因(GLP-1是由胰高血糖素原加工而成)的另外一个基因的表达产物(J. Biol. Chem., 272:4108-15, 1997)。

大量动物模型实验显示, Exendin-4表现出了与GLP-1类似的抗糖尿病药的作用。包括:促进 $\beta$ 细胞的增殖和 $\beta$ 前细胞的再生;在高血糖条件下,刺激胰岛素的分泌,低血糖时则不能,因此,可防止用药后低血糖的发生;它还能调节胃的排空减慢营养物质进入血液的速度。目前已证实长期皮下给予Exendin-4能减少肥胖动物的食物消耗,减轻体重。更为重要的是,在II型糖尿病动物模型中, Exendin-4可使血糖降到接近正常水平。Exendin-4进入体内后不受二肽酶(DPP-IV)分解的影响,而GLP-1仅1~

2分钟，即被二肽酶分解，相比于GLP-1, Exendin-4的药效时间更长。在糖尿病动物模型上，无论口服、舌下含服、肺部、气道还是鼻腔给予Exendin-4均有效。

Exendin-4特异性的与肺膜及胰岛瘤细胞的GLP-1受体相互作用，与GLP-1一样，在分离的大鼠胰岛和小鼠胰岛瘤细胞 $\beta$ -TC-1中，在葡萄糖的刺激下，其呈剂量依赖的诱导胰岛素的分泌；同样，Rüdiger GÖke, Hans-Christoph Fehmann 等报道，Exendin-4也刺激RIN-5F细胞胞内cAMP和胰岛素的分泌，用不同剂量的Exendin-4和IBMX（3-isobutyl-1-methyl-xanthine, 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤）同时刺激RIN-5F细胞5min，胞内cAMP迅速升高，裂解的细胞上清中的cAMP含量呈剂量依赖性。IBMX是磷酸二酯酶抑制剂，阻止产生的cAMP的降解。

生物学活性评价是蛋白多肽产品质量最客观、有效的指标，因此建立蛋白多肽活性检测方法也成为蛋白多肽研究的重点之一。目前，已报道的Exendin-4生物学活性检测方法有：利用Exendin-4刺激胰岛 $\beta$ 细胞胰岛素分泌测定胰岛素含量变化；利用放射免疫法（RIA）测定cAMP水平变化，如中国专利CN1384755A公布了一种通过放射免疫法测定化学合成的新型Exendin激动剂生物活性的方法；通过皮下注射测定小鼠血糖水平效应量的变化；前两种方法方法都是采用同位素标记，试验操作有一定危险，废物不易处理，而后一种方法由于动物本身个体差异，产生的误差较大，应用性差。

## 发明内容

本发明所要解决的技术问题是针对现有技术中存在的上述不足，提供了一种简便、快速、准确度高、安全性好的重组促胰岛素分泌素生物活性检测方法及其应用。

解决本发明技术问题所采用的技术方案是该重促胰岛素分泌素(Exendin-4)的生物学活性测定方法，包括如下步骤：

- (1) 用Exendin-4刺激细胞，使胞内cAMP分泌，
  - (2) 将步骤(1)的细胞裂解，收集裂解上清液；
  - (3) 用酶联免疫方法测定步骤(2)所收集的细胞上清中的cAMP含量，
- 以及

- (4) 根据步骤(3)测得cAMP含量计算出所述Exendin-4的生物活性。

本发明技术方案优选的是所述用Exendin-4刺激的细胞为RIN-5F细胞。

进一步优选的是用不同剂量的Exendin-4和一定剂量的IBMX同时刺激RIN-5F细胞3-12min，使胞内cAMP分泌。

本发明重组促胰岛素分泌素Exendin-4的生物学活性测定方法的应用是重组促胰岛素分泌素Exendin-4的生物学活性测定方法在重组促胰岛素分泌素Exendin-4质控中应用。重组产品生物学活性是质控中重要的检测指标，以确保产品具有稳定的生物活性。

本发明是根据Exendin-4刺激RIN-5F细胞使胞内cAMP呈剂量依赖分泌的原理，用不同剂量的Exendin-4和一定剂量如1mM的IBMX同时刺激RIN-5F细胞5min，胞内cAMP迅速升高，用酶联免疫方法测定各剂量刺激后裂解的细胞上清中的cAMP含量，进而计算出Exendin-4的生物活性。

本发明采用酶联免疫方法测定重组促胰岛素分泌素（Exendin-4）的生物学活性具有步骤简便、废物少并且易于处理、简便、快速、准确度高、安全性好等优点。

## 附图说明

- 图1. 重组Exendin-4与合成Exendin-4的活性剂量反应曲线
- 图2. 酶联免疫法测定重组Exendin-4活性的计算结果
- 图3. 放射免疫法测定重组Exendin-4活性的计算结果

## 具体实施方式

以下是本发明的非限定实施例，将有利于本领域的普通技术人员进一步理解本发明。

### 实施例1 Exendin-4活性测定方法

采用RIN-5F细胞（购自ATCC，货号CRL-2058）测定Exendin-4活性的方法包括如下步骤：

（1）取对数生长期的RIN-5F细胞，用含血清的细胞培养液RPMI1640如10%胎牛血清的RPMI1640制成细胞悬液，调整细胞密度为 $(1.6-2.4) \times 10^4$ 个/孔，接种细胞于培养板，培养至细胞汇合率达到70%以上；

（2）除去上述含血清的细胞培养液，加入无血清细胞培养液，培养箱中孵育1-4小时，此步的目的是除去血清并让细胞预先适应刺激反应条件体系，血清本身含较高的cAMP含量，其会影响刺激产生的cAMP，从而影

响测定结果。

(3) 用含0.2~1mmol/L的3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX) 和无血清细胞培养液作为稀释液, 将Exendin-4预稀释到100~400ng/ml, 然后作2-6倍稀释, 每个样本6-10个稀释梯度;

(4) 除去无血清培养上清, 将稀释好的各梯度Exendin-4 按每孔140-220  $\mu$  l加入细胞培养板的对应孔中, 置培养箱孵育3-12分钟, 即刺激3-12分钟;

(5) 除去刺激细胞的上清, 加入细胞裂解剂如0.1N HCl 在35-40 $^{\circ}$ C孵育20-50min, 提取细胞中的cAMP, 取裂解上清用于检测;

(6) 取上清, 采用cAMP检测试剂盒, 酶联免疫法测定, 按要求操作测定cAMP含量;

(7) 结果计算: 根据测定的cAMP含量数据, 算出重组促胰岛素分泌素Exendin-4的生物学活性。

优选的是步骤(1)中调整细胞密度为 $1 \times 10^5$ 个/ml, 接种细胞于96孔的培养板中, 接种量为200  $\mu$  l/孔, 置培养板于37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中, 连续培养3天; 步骤(2)中除去细胞培养上清, 加入200  $\mu$  l无血清细胞培养基, CO<sub>2</sub>培养箱孵育2小时。

进一步优选的是, 步骤(3)中是用含1mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX) 和0.1%BSA的无血清细胞培养液作为稀释液, 将样本预稀释至200ng/ml, 然后作4倍稀释, 每个样本8个稀释度, 每个稀释梯度做双复孔。

进一步优选的是, 步骤(4)中除去无血清培养上清, 将稀释好的各梯度样本180  $\mu$  l加入细胞培养板对应孔中, 置37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub>培养箱孵育5分

钟，即刺激5分钟。

进一步优选的是，步骤（5）是如下完成的：将用于刺激细胞的上清液除去，每孔加入200  $\mu$ l 0.1N的HCl 在37 $^{\circ}$ C孵育30min，离心收集上清液用于检测；步骤（6）是如下完成的：取步骤（5）得到的上清液100  $\mu$ l，采用cAMP酶联免疫检测试剂盒，测定cAMP含量。如采用R&D公司的cAMP检测试剂盒，酶联免疫法测定，按说明书要求操作测定cAMP含量；

进一步优选的是，步骤（7）中包括利用ORIGIN软件进行四参数（Logistic）运算处理，求出Exendin-4的半效浓度 $EC_{50}$ ，即以该值表示为1个活性单位（AU）。

## 实施例2 Exendin-4活性测定方法的可重复性

利用实施例1的方法测定重组Exendin-4活性，10次重复试验的半效反应剂量（ $EC_{50}$ ）及相关转换数据见表1：

表1 10次重复试验的半效反应剂量（ $EC_{50}$ ）及相关转换数据

试验次数	半效剂量 (ng/ml)	效价 X (AU/mg)	$\text{Log}_{10}^x$
1	1.98	505050.5	5.703334805
2	2.84	352112.7	5.546681689
3	2.54	393700.8	5.595166297
4	2.24	446248.6	5.649576867
5	3.21	311526.5	5.493494996
6	1.61	621118.0	5.793174115

7	2.34	427350.4	5.630784115
8	2.51	398406.4	5.600326306
9	2.14	467289.7	5.669586208
10	3.07	325732.9	5.512861626
Mean	2.448	424853.7	5.6195
SD	0.49493	92403.2	0.09083
SE	0.15651	29220.5	0.02872
RSD%	20.22	21.75	1.62

对上述试验数据统计分析,自由度  $f=n-1=9$ ,查  $t$  值表得  $t_{(9)0.05}=2.262$ , 10 次  $\text{Log}(X \pm \text{SD})$  为  $5.6195 \pm 0.09083$ , 各实验数据在  $\text{Log}X$  上下呈正态分布,  $10^x = 10^{5.6195} = 416389.7 \text{AU/mg}$ ; 95% 可信区间  $= 10^{5.52867} \sim 10^{5.71033} = 337808.0 \sim 513251.2 \text{AU/mg}$ , 95% 可信区间为均数的 81.1%~123.3%, 平均可信限率为 1.1%。以上结果表明用该方法测定重组 Exendin-4 生物学活性稳定可靠。

### 实施例 3 重组 Exendin-4 与合成 Exendin-4 活性比较

采用本发明的方法,对重组 Exendin-4 和化学合成 Exendin-4 (购自 Bachem, 货号: H8730) 进行活性分析, 试验数据见表 2, 回归运算见表 3, 活性比较图谱见图 1。

表 2. 重组 Exendin-4 与合成 Exendin-4 的活性试验结果

浓度 (mol/L)	cAMP 值 (pmol/ml)
------------	------------------

	化学合成	重组
	Exendin-4	Exendin-4
4.00E-08	82.52	83.23
1.00E-08	80.83	85.32
2.50E-09	70.13	69.58
6.25E-10	49.90	52.04
1.56E-10	35.01	36.45
3.91E-11	26.35	25.53
9.77E-12	19.30	18.64
2.44E-12	22.85	21.37

表 3. 重组 Exendin-4 和合成 Exendin-4 活性试验结果四参数运算

计算公式:  $y = A2 + (A1-A2)/(1 + (x/x0)^p)$

$\text{Chi}^2/\text{DoF}=3.10765 \quad R^2=0.9976$

Parameter	Value	Error
A1	20.94727	2.02863
A2	85.05326	2.99682
x0 (化学合成 Ex-4)	7.05E-10	1.36E-10
p	0.90979	0.15224
A1_2	19.2591	2.21188
A2_2	87.66113	3.20204
x0_2(重组 Ex-4)	6.51E-10	1.28E-10

---

p_2	0.84372	0.13679
-----	---------	---------

---

结果表明，合成 Exendin-4 的活性 ( $EC_{50}$ ) 与文献报道一致，重组 Exendin-4 与合成 Exendin-4 剂量反应曲线平行，基本重叠，进一步说明该方法重复性强、准确度高，可作为重组 Exendin-4 的生物活性测定方法。

#### 实施例 4 Exendin-4 活性测定中酶联免疫法 (EIA) 和放射免疫法 (RIA) 的比较

同时作两块96孔板，测定重组Exendin-4样品活性，一块用作酶联免疫法检测，一块用作放射免疫法检测。

**酶联免疫法：**刺激细胞5min后，除去上清，200 $\mu$ l 0.1N的HCl 37 $^{\circ}$ C孵育30min，取100 $\mu$ l上清到预包被的酶标板中，依次加入50 $\mu$ lcAMP耦联物和50 $\mu$ lcAMP抗体，室温孵育2小时，洗涤3次，加入200 $\mu$ l pNPP底物，室温反应30分钟，加入50 $\mu$ l 0.2M  $Na_3PO_4$ 终止液，检测 $OD_{405/570}$ ，换算成cAMP值后计算重组Exendin-4活性（见图2）：

**放射免疫法：**刺激细胞5min后，除去上清，200 $\mu$ l 90%正丁醇37 $^{\circ}$ C孵育60min，取150 $\mu$ l提取液 $N_2$ 吹干，400 $\mu$ l醋酸缓冲液复溶，按照cAMP放免试剂盒（上海第二医科大学实验核医学教研室）依次加入cAMP标准（或样本50 $\mu$ l）、 $^3H$ -cAMP 100 $\mu$ l、乙酰化试剂8 $\mu$ l，立即混匀，再加入抗血清100 $\mu$ l混匀，4 $^{\circ}$ C保温4小时；向反应液中加入1ml淋洗缓冲液后，立即滴加到微孔滤膜上过滤，并用淋洗液洗涤2次，转移滤膜到EP管中，80 $^{\circ}$ C约30分钟烘干滤膜。向置有滤膜的EP管中加入1ml闪烁液（二甲苯中含0.4%PPO和

0.01%POPOP)后,置闪烁杯中,用液体闪烁计数器测定2分钟的cpm值,换算成cAMP值后计算重组Exendin-4活性(见图3)。

用酶联免疫法和放射免疫法测定重组Exendin-4活性活性的结果比较表明:两种检测方法得到的Exendin-4刺激RIN-5F细胞产生cAMP的半效反应剂量一致。但相比放免法,酶联免疫法具有步骤简便、废物少并且易于处理等优点。

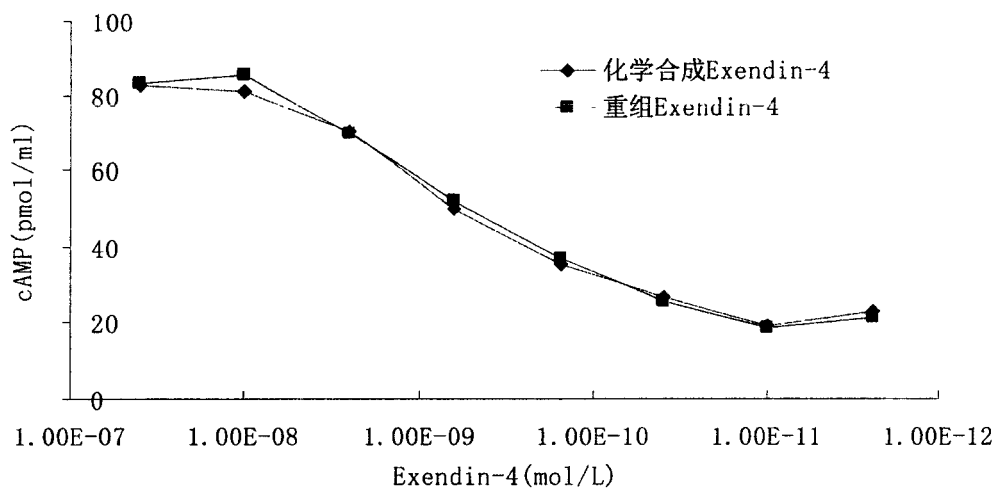


图 1

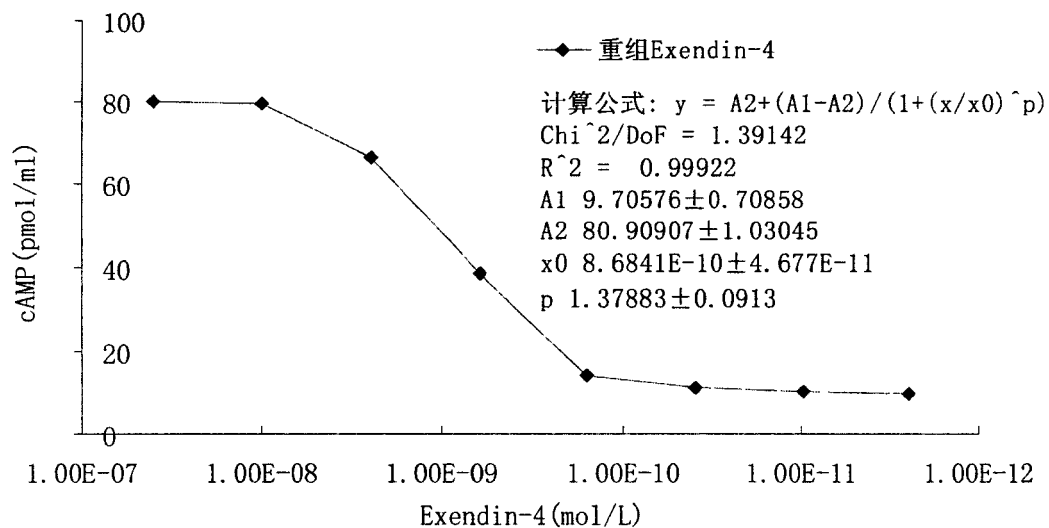


图 2

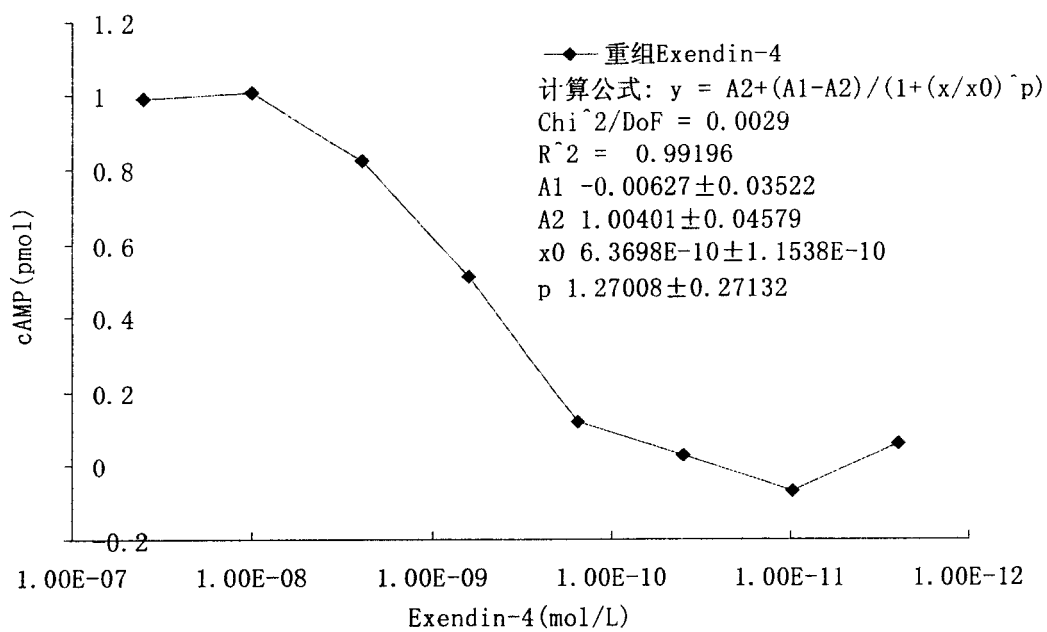


图 3

专利名称(译)	一种重组促胰岛素分泌素生物学活性测定方法及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN1844925A</a>	公开(公告)日	2006-10-11
申请号	CN200610076398.2	申请日	2006-04-24
[标]申请(专利权)人(译)	东莞市博康健医药科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	东莞市博康健医药科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	东莞太力生物工程有限公司		
[标]发明人	韩为跃 阳勇 张仁怀 杨立明 刘社际 何凯 黄碧莲 刘德林		
发明人	韩为跃 阳勇 张仁怀 杨立明 刘社际 何凯 黄碧莲 刘德林		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/22 A61P3/10 C12Q1/00		
代理人(译)	丁业平 罗建民		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种重组促胰岛素分泌素(Exendin - 4)生物学活性测定方法及其应用。该重组促胰岛素分泌素的生物学活性测定方法，是用Exendin - 4刺激细胞使胞内cAMP分泌，胞内cAMP量迅速升高，用酶联免疫方法测定裂解的细胞上清中的cAMP含量，裂解的细胞上清中cAMP含量呈剂量依赖性，进而计算出Exendin - 4的生物活性。用Exendin - 4刺激的细胞为RIN - 5F细胞。所述的测定方法可在重组促胰岛素分泌素Exendin - 4质控中应用。本发明采用酶联免疫方法测定重组促胰岛素分泌素Exendin - 4的生物学活性具有步骤简便、废物少并且易于处理、简便、快速、准确度高、安全性好等优点。

