(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 104619857 A
(43)申请公布日 2015.05.13

(21)申请号 201280074120.5
(22)申请日 2012.06.22
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.12.19
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IT2012/000193 2012.06.22
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2013/190582 EN 2013.12.27
(71)申请人 真蒂奥姆有限公司
地址 意大利瓜尔迪镇
(72)发明人 T·伊诺尼 V·库马尔
K·伊斯拉姆
(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247
代理人 黄革生 林柏楠
(51)Int.Cl.
C12Q 1/37(2006.01)
C12Q 1/56(2006.01)
G01N 33/48(2006.01)

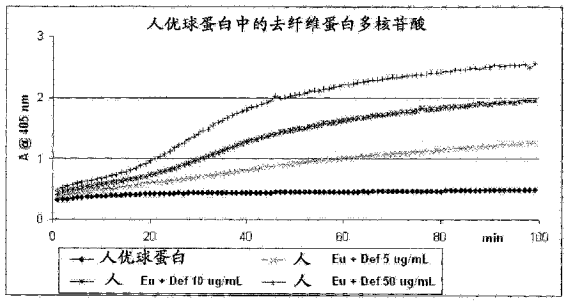
权利要求书1页 说明书11页 附图2页

(54)发明名称

用于测定去纤维蛋白多核苷酸的生物活性的基于优球蛋白的方法

(57)摘要

公开了用于测定去纤维蛋白多核苷酸的生物活性的方法，其包括以下步骤：a)使哺乳动物的优球蛋白及对血纤维蛋白溶酶具特异性的底物接触去纤维蛋白多核苷酸，该底物通过与该血纤维蛋白溶酶作用而提供可测量的产物；以及b)测量于连续时间中所产生的产物的量，从而测定该去纤维蛋白多核苷酸的生物活性。亦公开了液体去纤维蛋白多核苷酸制剂，其优选为水溶液，具有定义的生物活性，且特别地具有去纤维蛋白多核苷酸的活性为25至35IU/mg，优选27.5至32.5IU/mg，以及更优选28至32IU/mg。



CN 104619857 A

1. 用于测定去纤维蛋白多核苷酸的生物活性的方法，所述方法包括以下步骤：

a) 使哺乳动物的优球蛋白及血纤维蛋白溶酶特异性的底物接触去纤维蛋白多核苷酸，所述底物通过与血纤维蛋白溶酶反应提供可测量的产物；以及

b) 测量在连续时间中所形成的产物的量，从而以测定去纤维蛋白多核苷酸的生物活性。

2. 根据权利要求 1 的方法，其中优球蛋白是哺乳动物优球蛋白。

3. 根据权利要求 2 的方法，其中优球蛋白是人、兔或牛优球蛋白。

4. 根据权利要求 1 的方法，其中与血纤维蛋白溶酶特异性的底物反应的血纤维蛋白溶酶由包含于优球蛋白中的血纤维蛋白溶酶原所释放。

5. 根据权利要求 1 的方法，其中血纤维蛋白溶酶特异性的底物是发色底物。

6. 根据权利要求 1 的方法，其中血纤维蛋白溶酶特异性的底物为式 A_1-A_2-A_3-X 的化合物，其中 A_1 与 A_2 为非极性氨基酸，A_3 是赖氨酸或精氨酸，以及 X 是可测量的产物。

7. 根据权利要求 6 的方法，其中可测量的产物 X 选自对硝基苯胺与 2- 萘胺所组成的组。

8. 根据权利要求 4 的方法，其中血纤维蛋白溶酶特异性的底物是 H-D- 缬氨酰 -L- 亮氨酰 -L- 赖氨酸 -p- 硝基苯胺。

9. 根据权利要求 6 的方法，其中通过分光光度法或荧光测定法测量可测量的产物 X。

10. 根据权利要求 2 的方法，其中用合适的缓冲液将哺乳动物优球蛋白重构为与来源血浆相同的体积，或高至 1:10 稀释，且发色 / 发荧光底物具有从 2.5 至 3.5mM，优选 3mM 的浓度。

11. 根据权利要求 1 的方法，其中所述方法在反应基质中进行，所述反应基质是缓冲至 pH 7 至 8，优选至 pH 7.4 的水溶液。

12. 根据权利要求 1 的方法，其中温度维持在从 35 至 39℃，优选为 37℃。

13. 根据权利要求 1 的方法，其中血纤维蛋白溶酶特异性的底物的浓度为从 0.3 至 4mM，优选从 2.5 至 3.5mM，更优选为 3mM。

14. 根据权利要求 1 的方法，所述方法包括步骤：c) 在标准样品与测试样品二者的酶促反应过程中，测定可测量的产物的释放速率；d) 数学上地及 / 或图形上地关联释放速率与所对应的去纤维蛋白多核苷酸浓度，以得到去纤维蛋白多核苷酸的测试样品的生物活性。

15. 液体去纤维蛋白多核苷酸制剂，其具有的去纤维蛋白多核苷酸的生物活性为 25 至 35IU/mg，优选从 27.5 至 32.5IU/mg，更优选从 28 至 32IU/mg。

16. 根据权利要求 15 的液体去纤维蛋白多核苷酸制剂，其特征在于其是水溶液。

17. 根据权利要求 16 的液体去纤维蛋白多核苷酸制剂，其特征在于被缓冲，优选 pH 从 6.5 至 8.5，优选从 7 至 8。

18. 根据权利要求 15 至 17 的液体去纤维蛋白多核苷酸制剂，其用于 VOD 的治疗与预防。

19. 容器，其含有液体去纤维蛋白多核苷酸制剂且具有 5000 至 7000IU，优选 5500 至 6500IU，更优选 5600 至 6400 的生物活性。

20. 根据权利要求 19 的容器，其中所述液体去纤维蛋白多核苷酸制剂是水溶液。

用于测定去纤维蛋白多核苷酸的生物活性的基于优球蛋白的方法

[0001] 本发明是关于一种用于测定去纤维蛋白多核苷酸的生物活性的方法，以及更特别地是关于一种间接酶促方法，用于测定去纤维蛋白多核苷酸的生物活性。

[0002] 发明的技术领域

[0003] 去纤维蛋白多核苷酸 (Merck Index, 1996, no. 2915) 是天然起源的物质，其是从动物器官提取而得，且其是由低分子量的聚脱氧核糖核苷酸钠盐组成。去纤维蛋白多核苷酸已成为许多医药研究的主题，所述研究已推测其可作为抗凝血剂用于治疗（美国专利号 3,829,567）。

[0004] 此外，去纤维蛋白多核苷酸亦已被成功用于治疗外周动脉血管疾病、急性肾功能不全（美国专利号 4,694,134）或急性心肌缺血（美国专利号第 4,693,995）。

[0005] 目前，去纤维蛋白多核苷酸正用于进行静脉阻塞疾病 (VOD) 的治疗与预防的临床试验。

[0006] 如同其他提取而得的生物物质，去纤维蛋白多核苷酸也受制于组成的有限变化性，这对于天然生物聚合物是典型的。此状况的经典例子是肝素，已知其在链长、分子量、组成、硫酸盐化的程度等方面随批次的变化性。此结果是相同重量的去纤维蛋白多核苷酸可能实际上从比生物活性的观点而言是非等同的。

[0007] 由于其固有的生物聚合物本质，提取、分离与纯化的过程无法本身确保产物的绝对的再现性。

[0008] 然而，如果控制良好，可能降低此变化性。为达此目的，已有研究得到用于通过从器官提取分离去纤维蛋白多核苷酸的标准化的工业过程，例如美国专利号 4,985,552 所描述的。

[0009] 上述过程所得到的产物通过测定一些特定的物理化学参数而表征，例如，电泳移动率、消光系数、旋光力以及质量平均相对分子质量。然而，这些参数基本上取决于去纤维蛋白多核苷酸的结构，并且无法提供其生物活性的信息。

[0010] 目前如我们所知，已报导用于评估去纤维蛋白多核苷酸的生物活性的方法仅有纤维蛋白平板测试法与优球蛋白水解时间凝血弹性图式记录 (thromboelastographic recording)(Prino G.、Mantovani M.、Niada R.、Coccheri S.、Butti A.、Indagini preliminari sull′ attività fibrinolitica、nell′ animale e nell′ uomo 与 di una nuova sostanza 发表的 diversi organi animali, Simposio Internazionale:La ricerca scientifica nell'industria farmaceutica, 意大利，罗马，1975 年 10 月 2-4 日—Il Farmaco, Ed. Prat.)(1969), 24, 552-561)，以及美国专利号 7,338,777 公开的以血纤维蛋白溶酶为基础的方法，上述皆通过引用并入本案。

[0011] 然而，在上述方法中，优球蛋白水解时间凝血弹性图式记录的特征是相当大的实验复杂性、不令人满意的再现性与精准性，以及，在凝血弹性图式记录的一些特定例子中，反应线性受限于非常严格的浓度范围。

[0012] 关于血纤维蛋白溶酶为基础的方法，通常通过体外测试中的多种标准而测定

血纤维蛋白溶酶的酶促活性。最常使用的方法之一是由分光光度法或荧光测定法测定发色或发荧光化合物，所述化合物是通过血纤维蛋白溶酶作用于合适的底物上而释放(Haemostasis,(1978),7,138-145)。通常使用具有式 A_1-A_2-A_3-X 的肽底物，其中 A_1与 A_2是主要为非极性的氨基酸，A_3是赖氨酸或精氨酸，以及 X 代表可测量的游离的化合物，例如对硝基苯胺(pNa)或 2- 萘胺(NA)(Haemostasis,(1978),7,146-149)。除了上述肽底物之外，已成功使用其他的、较简单的化合物，例如 p- 硝基苄基对甲苯磺酰 -L- 精氨酸(Haemostasis,(1978),7,105-108)。

[0013] 该化合物 X 释放至孵育基质中的速率是与样品中存在的血纤维蛋白溶酶活性（单位 / 毫克）成比例。美国专利号 7,338,777 公开的方法因此是基于上述血纤维蛋白溶酶评估测试法中的发现，去纤维蛋白多核苷酸增加化合物 X 的释放速率与其浓度成比例。

[0014] 然而，此方法是在 TRIS 缓冲液进行，不需要任何其他的血浆 / 血清活化物 / 抑制物。因此，该程序不会反应出生理条件或是恰当模拟去纤维蛋白多核苷酸在体内的作用机制。

[0015] 因此，至今未有真正有效地、精确地且可再现的方法被描述并且验证用于测量去纤维蛋白多核苷酸的生物活性，而精确地反映出产物在复杂生物系统（体内）中的作用机制。。

[0016] 我们已经建立简单与可靠的方法用于测定去纤维蛋白多核苷酸的生物活性，使得通过提取得到的样品受到控制，且因而使得以去纤维蛋白多核苷酸为基础的药物制备能够被标准化。

[0017] 本发明的方法可测定去纤维蛋白多核苷酸的比生物活性，与参考标准比较，具有高度的精准性与正确性。

[0018] 附图简述

[0019] 图 1 是通过以去纤维蛋白多核苷酸（浓度为 0-50μg/ml，0-100 分钟）活化或非活化的哺乳动物的优球蛋白级分，显示 pNA 自底物 S-2251 的释放动力学的曲线图。

[0020] 图 2 是说明关于去纤维蛋白多核苷酸的标准品与测试样品的上升的 S 形曲线图。

[0021] 图 3 是显示标准制剂（例如 :S1_Ca,S1_Cb,S1_Cc）的“吸光度与时间的对应图”，其鉴定合适的线性范围（例如 :从 30 至 35 分钟）。

发明内容

[0022] 本发明因此涉及用于测定去纤维蛋白多核苷酸样品的比生物活性的方法，该方法包含以下步骤 :

[0023] a) 使优球蛋白及血纤维蛋白溶酶特异性的底物接触去纤维蛋白多核苷酸，该底物通过与该血纤维蛋白溶酶反应而提供可测量的产物 ;以及

[0024] b) 测量在连续时间所形成的产物的量。

[0025] 本发明是一种间接的体外方法，用于测定去纤维蛋白多核苷酸的活性，其以去纤维蛋白多核苷酸与优球蛋白之间的功能性相互作用为基础。

[0026] 优球蛋白是血清球蛋白的级分，其无法溶于蒸馏水中，但可溶于盐溶液中。

[0027] 优球蛋白包含纤维蛋白原、PAI-1、组织血纤维蛋白溶酶原活化剂(tPA)、血纤维蛋白溶酶原、以及少量的 α2- 抗血纤维蛋白溶酶和因子 VIII。

[0028] 本发明人惊讶地发现去纤维蛋白多核苷酸催化血纤维蛋白溶酶原水解为血纤维蛋白溶酶。因此，当去纤维蛋白多核苷酸与优球蛋白及血纤维蛋白溶酶特异性的底物（例如式 A_1-A_2-A_3-X 的肽，如 Haemostasis,(1978),7,138-149 公开的，通过引用并入本文）孵育时，该化合物 X 释放至孵育基质的速率增加与去纤维蛋白多核苷酸本身的浓度成比例。

[0029] 换言之，去纤维蛋白多核苷酸催化优球蛋白中所含的血纤维蛋白溶酶原水解为血纤维蛋白溶酶；所述血纤维蛋白溶酶与血纤维蛋白溶酶特异性的底物，优选发色底物酶促反应，以提供可测量的产物。

[0030] 本发明的方法因此还包括步骤：c) 在去纤维蛋白多核苷酸的标准样品与测试样品二者的酶促反应过程中，测定该可测量的产物的释放速率；d) 数学上地及 / 或图形上地关联该释放速率与所对应的去纤维蛋白多核苷酸浓度，以得到该去纤维蛋白多核苷酸的测试样品的生物活性。

[0031] 本发明中用于测定的去纤维蛋白多核苷酸样品通常依照已知方法由从器官提取而制备，所述方法例如在美国专利号 4,985,552 中描述，其于前已述，且亦通过引用并入本文。

[0032] 根据本发明的方法，选择正常工业制造的批次的去纤维蛋白多核苷酸作为参考样本（标准品），并将其用于制备校正曲线。

[0033] 一般而言，本发明的方法甚至在污染物存在下提供去纤维蛋白多核苷酸的精准与正确测量，所述污染物为例如 RNA、肝素、降解的去纤维蛋白多核苷酸（从中已移除嘌呤与嘧啶的去纤维蛋白多核苷酸）或是乙醇，前提是它们的浓度以重量计通常小于 10％，从而不会损害系统。

[0034] 除了允许测定去纤维蛋白多核苷酸之外，本发明的方法亦可测定衍生自去纤维蛋白多核苷酸的其他生物学上相当的物质，例如去氨基的去纤维蛋白多核苷酸，或更简单地，受到物理化学条件结合而变性 / 降解的去纤维蛋白多核苷酸。

[0035] 本方法的灵敏度足以检测浓度（测定系统中的最终浓度）小于或等于 2.5μg/ml 的去纤维蛋白多核苷酸，并且通常表现良好的关联性，高达大于或等于 1000μg/ml 的最大浓度值。

[0036] 所使用的优球蛋白通常是任何的哺乳动物优球蛋白级分，例如牛、猪、兔或人类的优球蛋白，优选人类与牛的优球蛋白。

[0037] 然而，虽然优球蛋白级分是选择的酶促系统，使用其他等同酶促系统，例如稀释的血浆与血清（使用缓冲液高达 1:10）、人工制成或是分离的血纤维蛋白溶酶原的组合、tPA、uPA、PAI-1&2 与 α2- 抗血纤维蛋白溶酶以及化学与生物相关且具有相似功能的酶促系统等，皆落入本发明的范围内。

[0038] 在本发明的方法中，血纤维蛋白溶酶的底物可被理解为任何对于血纤维蛋白溶酶有特异性的底物，其在此方法条件下，释放出可检测的水解产物 X。

[0039] 取决于可检测的基团 X 的本质，亦可采用本领域技术人员所周知的备选检测系统。分光光度或荧光测定的检测系统特别有利，特别是分光光度系统。

[0040] 通常使用的底物是血纤维蛋白溶酶原 - 血纤维蛋白溶酶测定法特异性的底物。优选使用式 A_1-A_2-A_3-X 的肽，其中 A_1 与 A_2 为主要是非极性的氨基酸，A_3 是赖氨酸或精氨酸，以及 X 代表可测量的基团。这些底物的实例是 Val-Leu-Lys-pNa、Val-Phe-Lys-pNa 或

pyroGlu-Phe-Lys-pNa，其中分光光度法可检测的基团 X 是对硝基苯胺 (pNA)。其他合适的底物，例如 Val-Gly-Arg-2NA，包含 2- 萘胺，其可由荧光测定法测量。特别优选的底物是化合物 H-D- 缬氨酰 -L- 亮氨酰 -L- 赖氨酸 -p- 硝基苯胺 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA)。

[0041] 用于测定优球蛋白级分中的去纤维蛋白多核苷酸活性的具体底物通常是为商业上可取得的。

[0042] 本发明的测定方法是通过将去纤维蛋白多核苷酸样品置放于特定 pH 与摩尔浓度的优球蛋白溶液中实施的。

[0043] 特别地，得自哺乳动物血浆的优球蛋白级分是以盐缓冲液将优球蛋白溶解并稀释为产生血浆的原始体积而重构的（例如：得自 10 毫升血浆的优球蛋白级分以盐缓冲溶液溶解并重构为 10 毫升，其 pH 在 7 与 8 之间）。

[0044] 然而，在发色底物的情况下，通常使用的底物浓度为从 0.3 至 4mM，优选为从 2.5 至 3.5mM，以及有利地为 3mM，而在发荧光底物的情况下，使用浓度为从 0.05 至 0.15mM。

[0045] 如同其他酶促方法，本发明的测定方法对基质的 pH 敏感。

[0046] 事实上，它通常不能用于极端的 pH 值，在所述 pH 值酶促系统会被失活。

[0047] 优选在进行测量期间的任何时间，基质的 pH 值都不会发生变化，因此，以选自通常用于生物测试的那些的缓冲系统重构优球蛋白级分。合适的缓冲系统，例如可为磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液或是三（羟甲基）氨基甲烷盐酸盐与氯化钠 (TRIS-NaCl) 缓冲液。优选以 TRIS-NaCl 进行优球蛋白级分的重构。

[0048] 在本发明的方法中，通常优选是将孵育基质的 pH 维持在约 7 至 8 的范围，更优选为约 7.4 至 7.6。

[0049] 此外，优选地保持缓冲系统的浓度在 10 至 200mM 的范围，优选为约 50mM。更具体而言，TRIS-NaCl 的浓度应为 50mM 的 TRIS 与 150mM 的氯化钠。

[0050] 在用于测定去纤维蛋白多核苷酸生物活性的本发明的方法中，去纤维蛋白多核苷酸样品溶液直接稀释于优球蛋白级分中，而后加入发色或发荧光底物。特别地，为了能够测量，优选地将去纤维蛋白多核苷酸预稀释 / 溶解于 TRIS-NaCl 缓冲液中，以得到样品与标准品二者的母储液溶液。通过连续稀释，从母储液溶液稀释该样品与该标准品成为定义体积的优球蛋白级分，直到约 1 至 1000 μ g/mL 的去纤维蛋白多核苷酸的分析浓度范围。

[0051] 本发明的测定方法的重要参数为温度。关于建立参考曲线以及在测量阶段，优选地在整个测量过程中，以及对于所有测量的样品维持相同温度。为了达到此目的，优选使用温控装置，视需要可进行数组测量，适当改变样品的位置，以确保系统具有最大的热均质。

[0052] 一般而言，此测定方法使用的温度范围，例如 25 至 40℃，优选为 35 至 39℃，甚至更优选为 37℃。

[0053] 根据本发明，当已经加入所有的反应试剂时，开始测量通过去纤维蛋白多核苷酸的作用释放在基质中的化合物 X 的浓度，并且以预定的频率，持续测量一段预定的时间，作为 X 与检测系统的化学本质的函数。

[0054] 类似于其他生物测定方法，本发明的方法亦提供校正阶段与测量阶段，所述校正阶段与测量阶段在相同的微量板上进行，以尽可能减少实验变量的发生。

[0055] 该校正阶段包括在已知增加的去纤维蛋白多核苷酸（标准品）浓度，获得与样品相关的吸光度数据，那些数据的统计再处理以及校正曲线的外推，其表示本发明的酶促反

应速率的增加与优球蛋白级分中存在的去纤维蛋白多核苷酸的浓度之间的关联性。在测量阶段中，由于在校正阶段得到的该关联性，可在相同条件下所测量和处理的吸光度基础上，决定去纤维蛋白多核苷酸样品的未知生物活性。

[0056] 详言之，实验规程通常提供用于制备数个样品，在多种已知浓度的去纤维蛋白多核苷酸的标准品与未知。根据预定的稀释因子，通过连续稀释母溶液制备去纤维蛋白多核苷酸样品

[0057] 在本发明的方法中，优选制备至少 5 个浓度的标准品与 5 个浓度的待测样品，对于标准品的每一个浓度以及类似地对于测试样品的每一个浓度，通常是对母溶液连续 1:2 稀释，制备至少 4 个重复。

[0058] 去纤维蛋白多核苷酸的标准品与测试样品浓度通常是 0.1 至 1000 μ g/ml。

[0059] 该测试样品的浓度优选与标准品浓度的数量级相同。

[0060] 根据上述说明，每一个浓度的测量优选是在一个微量板上进行，其中每个样品，分别是对应浓度的标准品与测试样品的位置优选是交替的。根据此样品放置的方案（所述方案以细节说明于实验部分），对于每一浓度的去纤维蛋白多核苷酸标准品与测试样品，每一次至少测量 4 个吸光度值。

[0061] 在预定的时间进行上述测量的组，亦即，首先在时间 t_0，即已经加入所有的成分且在本发明的酶促反应开始之前，而后以准确的间隔，进行足够长的时间以获取所需要的数据。

[0062] 优选地，持续进行吸光度测量至最多 90 分钟，每 1-10 分钟进行读取。更有利的是每分钟进行读取。在这样的波长进行分光吸光值读取，所述波长取决于在酶促水解反应过程中所释放的可检测的基团 X 的本质。在 X 为 p-NA 的具体例子中，测量 405nm 处的吸光度。

[0063] 称为原始数据的标准品与未知的去纤维蛋白多核苷酸样品的吸光度读数通常是直接源自于提供读取操作的相同装置，其以表示每一时间点与孔的吸光值的方式被制表。

[0064] 而后，使用例如 Spread Sheet—Microsoft **Excel®**，处理该原始数据。此第一处理操作导致计算在每一时间点以及对于每组读数的平均吸光度与相关标准偏差，各组包括标准品与测试样品去纤维蛋白多核苷酸二者的每一浓度至少 4 个重复。

[0065] 以用于生物测定法测定的商业上可获取的软件进行另外的数据的统计处理，如 Finney D J, Statistical Method in Biological Assay, 第 2 版 Ch.Griffin, London 和相关药典中所述。

[0066] 更确切而言，根据本发明，可使用如相关 European Pharmacopoeia General text 5.3, Statistical Analysis 中所定义的平行线模式、斜率比例模式与四参数逻辑曲线模式，进行去纤维蛋白多核苷酸的生物测定法测定。

[0067] 如第 1 图所示，通过将时间放在横坐标以及吸光度放在纵坐标，得到直线，其斜率“b”与酶促反应的速率成比例 :通过增加去纤维蛋白多核苷酸的浓度，水解的速率与“b”值会成比例地增加。最后，如上所述标准品去纤维蛋白多核苷酸与测试样品去纤维蛋白多核苷酸的每组重复计算的斜率值与其相关的去纤维蛋白多核苷酸的浓度的相关。可使用横坐标的合适的数学转型（亦即去纤维蛋白多核苷酸浓度的对数）以替代真实值。

[0068] 图形上，该关联性造成该标准品为 S 形以及测试样品为 S 形（图 2）;S 形的中央部分具有两条直线，其通常为平行，且其间距离是该测试样品与该标准品之间生物活性差

的函数。此间隔使用如Finney D J, Statistical Method in Biological Assay, 第2版 Ch.Griffin, London 中所述的平行线模式用于效能测定。

[0069] 为了更具体的测定，使用四参数逻辑曲线模式，并且在此情况中，样品与标准品二者的整个S形曲线用于计算样品的相对生物效能。

[0070] 在本发明优选的实施方式中，去纤维蛋白多核苷酸的标准溶液与待测的样品溶液被置入微量板的各个孔中。优球蛋白级分在要使用时制备，且其是去纤维蛋白多核苷酸储液的稀释基质。最后，加入含有发色底物的溶液。而后，将微量板置于恒温读取器，并在快速搅动后，以预定的间隔与预定的时间期间，进行系统的吸光度的读取。而后，处理得到的原始数据，因而测定去纤维蛋白多核苷酸样品的未知活性。

[0071] 由以下实施例可理解，根据本发明的方法可得到液体去纤维蛋白多核苷酸制剂，优选为水溶液，其具有定义的生物活性，以及特别地具有25至35IU/mg，优选27.5至32.5IU/mg，以及更优选28至32IU/mg的去纤维蛋白多核苷酸活性。

[0072] 液体去纤维蛋白多核苷酸制剂优选以容器，更优选以小瓶的形式销售，包含于2.5ml的缓冲水溶液中的200mg的去纤维蛋白多核苷酸（优选为pH6.5至8.5，更优选为7至8），在使用前稀释；结果，当以本发明的方法评估生物活性时，每一个容器呈现5000至7000IU，优选5500至6500IU，更优选5600至6400IU的去纤维蛋白多核苷酸活性。

[0073] 本发明的上述与其他方面如以下实施例所述，然而以下实施例并不被视为限制本发明。

实施例

[0074] 以下材料用于本案的实施例中：

[0075] 装置

[0076]

主要特征	**装备有恒温腔室与405 nm吸收滤光器的用于UV-Vis吸光度测定的微量板读取器**		
检测	**在405 nm处的动力吸光度测定**		
板型	**清晰用于UV-Vis测定的96孔**		
腔室温度	**37°C**	**总吸光度记录时间**	**45-60分钟**
吸光度记录频率	**约1 x分**		

[0077] 程序与软件

[0078] oMicrosoft **Excel®**（微软公司，Redmond, Wash., USA）物质

[0079] o去纤维蛋白多核苷酸（Gentium）

[0080] o发色底物S-2251(Chromogenix Instrumentation Laboratory S.p.A.，意大利米兰）

[0081] o三（羟甲基）氨基甲烷盐酸盐（TRIS)-氯化钠（TRIS-NaCl），(Sigma-Aldrich,

意大利米兰）

[0082] o1N HCl(Carlo Erba reagenti, 意大利米兰）

[0083] o1N NaOH(Carlo Erba reagenti, 意大利米兰）

[0084] o 牛血浆 (Tebu Bio Italia,Magenta(MI), 意大利）

[0085] o 冰醋酸 (Carlo Erba reagenti, 意大利米兰）溶液

[0086] oTRIS-NaCl（制备 1L）：将 6.06 克的 TRIS-HCl 与 2.2g 的 NaCl 定量转入 1L 烧杯中。溶解于 500mL 的经纯化的水中，并且以约 40mL 的 1N HCl 将 pH 调整至 7.4。将溶液定量转入 1L 容量瓶中，并且以纯水稀释溶液至容量。将该溶液储存于冰箱 (2-8℃）。

[0087] o 发色底物 S2251(CAS 63589-93-5)3mM（制备 15.2mL）：以 15.2mL 经纯化的水溶解约 25mg 的发色底物。将该溶液储存于冰箱 (2-8℃）。

[0088] o 牛的优球蛋白（制备 10mL)。在最小容量为 300mL 的容器中，加入 240mL 的冰冷的经纯化的水，并且在搅拌下加入 10mL 牛血浆。以 1％醋酸调整 pH 至 5.3±0.1。在 2-8℃允许静置 1 至 16 小时。通过虹吸移除上清溶液，并且在 4℃于 2.800rpm 离心 5 分钟以收集沉淀物。机械式分散（例如：使用实验用玻璃棒）悬浮该沉淀于 5mL 的冰纯水，震荡约 5 分钟，并且在 4℃于 2.800rpm 离心 5 分钟以收集沉淀。将该沉淀机械式分散于约 10mL 的 TRIS-NaCl；为促使该沉淀溶解，以合适的仪器（例如：实验用玻璃棒）破坏沉淀颗粒。将所得到的悬浮液储存在 2-8℃在使用前不少于 1 小时且不超过 6 小时。

[0089] 标准品与样品去纤维蛋白多核苷酸溶液

[0090] 参考储液

[0091] 将准确测量的约 100mg 的去纤维蛋白多核苷酸参考标准品定量转入 20mL 的容量瓶中。以约 10mL 的 TRIS-NaCl 溶解粉末，并以相同溶剂补足体积。将所得到的溶液以 TRIS-NaCl 稀释 1:4，以得到约 1.25mg/mL 的去纤维蛋白多核苷酸 RS 溶液。

[0092] 样品储液

[0093] 将准确测量的约 100mg 的去纤维蛋白多核苷酸样品定量转入 20mL 的容量瓶中。以约 10mL 的 TRIS-NaCl 溶解粉末，并以相同溶剂补足体积。将所得到的溶液以 TRIS-NaCl 稀释 1:4，以得到约 1.25mg/mL 的去纤维蛋白多核苷酸样品溶液。

[0094] 参考品与样品溶液的制备

[0095] a)125ug/mL 的去纤维蛋白多核苷酸：用 TRIS NaCl（对应于板孔中为 50ug/mL) 以 1:10 稀释去纤维蛋白多核苷酸储液（参考品与样品）。定量转入 500uL 的制备的溶液于 eppendorf 管中，并与 500uL 的优球蛋白混合。封闭该离心管，并且将其储存于冰冷的水中。

[0096] b)62.5ug/mL 的去纤维蛋白多核苷酸：用 TRIS NaCl（对应于板孔中为 25ug/mL) 以 1:2 稀释溶液 (a)。定量转入 500uL 的制备的溶液于 eppendorf 管中，并与 500uL 的优球蛋白混合。封闭该离心管，并且将其储存于冰冷的水中。

[0097] c)31.25ug/mL 的去纤维蛋白多核苷酸：用 TRIS NaCl（对应于板孔中为 12.5ug/mL) 以 1:2 稀释溶液 (b)。定量转入 500uL 的制备的溶液于 eppendorf 管中，并与 500uL 的优球蛋白混合。封闭该离心管，并且将其储存于冰冷的水中。

[0098] d)12.5ug/mL 的去纤维蛋白多核苷酸：用 TRIS NaCl（对应于板孔中为 5ug/mL) 以 1:2.5 稀释溶液 (d)。定量转入 500uL 的制备的溶液于 eppendorf 管中，并与 500uL 的优球蛋白混合。封闭该离心管，并且将其储存于冰冷的水中。

[0099] 空白溶液

[0100] 混合 1 体积的优球蛋白与 1 体积的 TRIS NaCl 溶液（例如 :500uL+500uL）。

[0101] 板储存

[0102] 根据所提出的储存方案（请见以下表 1），在微量板的每一孔中，加入 200uL 的标准品或样品或空白溶液。注意到可根据自动移液管的可用性与配置，而使用不同的储存方案。然而，对于每个参考品与样品溶液，必须使用不少于四个储存以用于测定法。

[0103] 在紧接将板在微量板读取器中孵育前，加入 50uL 的发色底物于每一孔中。

[0104] 表 1

[0105]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	BLK	S1_Ca	S1_Cb	S1_Cc	S1_Cd	-	-	-	-	-	-
B	-	BLK	S2_Ca	S2_Cb	S2_Cc	S2_Cd	-	-	-	-	-	-
C	-	BLK	S3_Ca	S3_Cb	S3_Cc	S3_Cd	-	-	-	-	-	-
D	-	BLK	S4_Ca	S4_Cb	S4_Cc	S4_Cd	-	-	-	-	-	-
E	-	BLK	U1_Ca	U1_Cb	U1_Cc	U1_Cd	-	-	-	-	-	-
F	-	BLK	U2_Ca	U2_Cb	U2_Cc	U2_Cd	-	-	-	-	-	-
G	-	BLK	U3_Ca	U3_Cb	U3_Cc	U3_Cd	-	-	-	-	-	-
H	-	BLK	U4_Ca	U4_Cb	U4_Cc	U4_Cd	-	-	-	-	-	-

[0106] S1, S2, S3, S4 :参考品溶液储存 1、储存 2、储存 3、储存 4

[0107] U1, U2, U2, U5 :样品溶液储存 1、储存 2、储存 3、储存 4

[0108] Ca, Cb, Cc 等 :去纤维蛋白多核苷酸参考品与样品浓度 a、b、c 等

[0109] BLK :空白溶液

[0110] 计算与结果

[0111] 从动力图可知，标准品制剂的“吸光值与时间”（例如 :S1_Ca、S1_Cb、S1_Cc）鉴定合适的线性范围（例如 :30 至 35 分钟，请见图 3）。

[0112] 线性动力范围的鉴定 (A@405nm 与时间）

[0113] 如下计算标准品与样品的每一制剂在预定时间范围内的测定法的反应（斜率）。

[0114]

$$\text{样品\&标准品反应} = \frac{A_b - A_a}{T_b - T_a} \times 1000$$

[0115] 其中 :

[0116] Aa 是在时间 Ta 的吸光值（自上述图的 30 分）

[0117] Ab 是在时间 Tb 的吸光值（自上述图的 35 分）

[0118] 以列表的形式报告获得的值，如表 2 中所报告。

[0119] 表 2

[0120]

	标准品制剂				样品制剂			
浓度水平 [ug/mL]	S1	S2	S3	S4	U1	U2	U3	U4
5	S1_Cd	S2_Cd	S3_Cd	S4_Cd	U1_Cd	U2_Cd	U3_Cd	U4_Cd
12,5	S1_Cc	S2_Cc	S3_Cc	S4_Cc	U1_Cc	U2_Cc	U3_Cc	U4_Cc
25	S1_Cb	S2_Cb	S3_Cb	S4_Cb	U1_Cb	U2_Cb	U3_Cb	U4_Cb
50	S1_Ca	S2_Ca	S3_Ca	S4_Ca	U1_Ca	U2_Ca	U3_Ca	U4_Ca

[0121] 将待测物质的反应及标准品的反应与浓度的对数作图，并且使用 Ph.Eur 目前版本的相关的第 5.3.2 章定义的平行线模式计算待检测物质的活性。

[0122] 应该使用不少于 3 个连序系列稀释的参考品与样品（例如去纤维蛋白多核苷酸浓度 5μg/mL、12.5μg/mL、25μg/mL、50μg/mL 或 5μg/mL、12.5μg/mL、25μg/mL、或 12.5μg/mL、25μg/mL、50μg/mL）。

[0123] 变异的分析

[0124] 根据 Ph.Eur. 目前版本的 5.3.2.3 部分以及 Finney DJ(1964 年)Statistical Method in Biological Assay 第 2 版，进行变异的分析。

[0125] 有效性的测试

[0126] 1) 线性回归条件是显著的，亦即计算的概率小于 0.05。如果未符合标准，不可能计算 95% C.I。

[0127] 2) 非平行的条件不是显著的，亦即计算的概率小于 0.05。

[0128] 3) 非线性的条件不是显著的，亦即计算的概率小于 0.05。

[0129] 接受条件

[0130] 4) 估计效能不小于 90%，且不大于所称效能的 111%。

[0131] 5) 估计效能的置信限制 (P = 0.95) 不小于 80%，且不大于所称效能的 125%。

[0132] 计算

[0133]

$$\text{样品效能}(\text{UI/mg}) = \frac{R \times \text{Std 效能}\ (\text{UI/mg}) \times \text{标准品浓度}(\text{mg/mL})}{\text{样品浓度}(\text{mg/mL})}$$

[0134] 其中：

[0135] R：平行线模式分析所得的样品结果

[0136] Std 效能：标准品的所称效能（干物质的 UI/mg）

[0137] 标准品浓度：标准品的浓度（干物质的 mg/mL）

[0138] 样品浓度：样品的浓度（干物质的 mg/mL）

[0139] 用于去纤维蛋白多核苷酸制剂的测定法

[0140] 以上公开的测定法已用于测定液体制剂的生物活性，所述液体制剂在 2.5ml 中含有 200mg 的去纤维蛋白多核苷酸（每毫升有 80 毫克）且具有表 3 中所报告的定性定量组成。

[0141] 表 3

[0142]

组分	参考标准质量	功能	200 mg 注射	浓度 (每毫升)
去纤维蛋白多核苷酸	内部标准	药物物质	200.00 mg	80.00 mg
柠檬酸钠，二水合物	USP - EP	缓冲剂	25.00 mg	10.00 mg
注射用水	USP - EP	溶剂/载体	适量至 2.5 mL	1.00 mL
氢氧化钠 1M 或盐酸 1M	NF - EP	pH 调整	适量至 6.8–7.8	-
氮气	NF - EP	惰性气体以取代空气	适量	-

[0143] 结果如表 4 所报告。

[0144] 表 4

[0145]

批次	效能 IU/mg	效能 IU/ 200 mg 的容器
688	31	6200
738	34	6800
785	32	6400
836	30	6000
0406	31	6200
DS0617	35	7000
DV0502*	*	不可得
DV0601	35	7000
1070010073	32	6400
1080010016	32	6400
1080020018	31	6200
1080030021	31	6200
1080040110	32	6400
1080050114	35	7000
1080060117	34	6800
平均	33	
最小	30	
最大	35	
RSD (%)	5,4	

[0146] *用作参考标准。

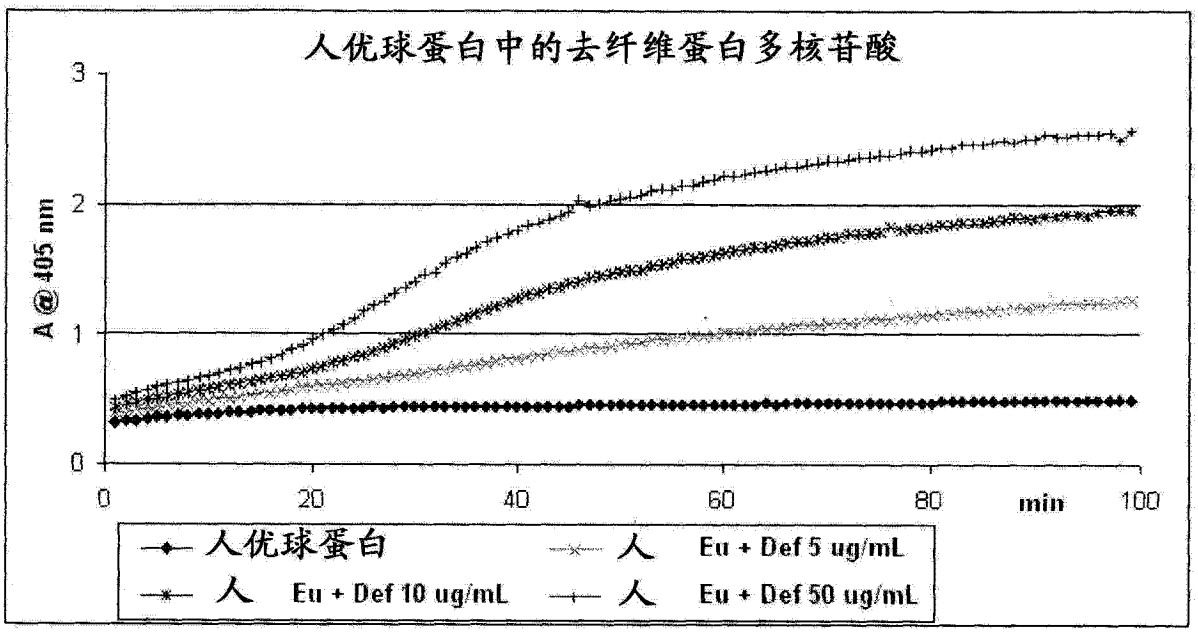

人优球蛋白中的去纤维蛋白多核苷酸
A @ 405 nm
3
2
1
0
0
20
40
60
80
min
100
人优球蛋白
人 Eu + Def 5 ug/mL
人 Eu + Def 10 ug/mL
人 Eu + Def 50 ug/mL

图 1

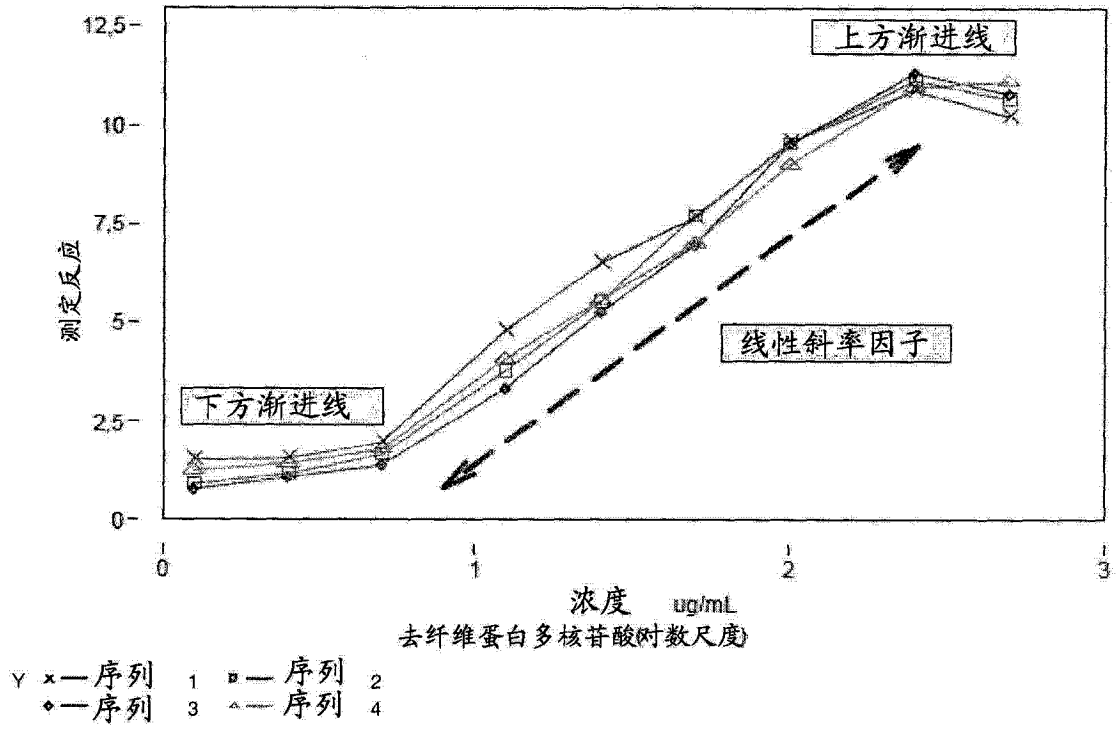

12,5
10
7,5
5
2,5
0
测定反应
上方渐进线
线性斜率因子
下方渐进线
0
1
2
3
浓度 ug/mL
去纤维蛋白多核苷酸(对数尺度)
Y x—序列 1 —序列 2
—序列 3 —序列 4

图 2

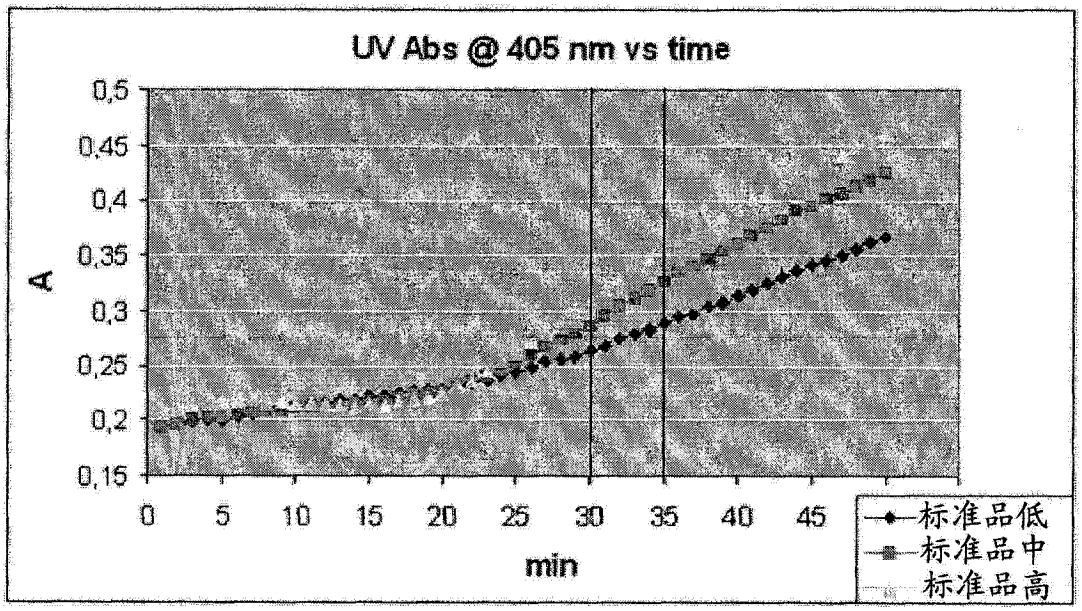

UV Abs @ 405 nm vs time
A
0,5
0,45
0,4
0,35
0,3
0,25
0,2
0,15
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
min
标准品低
标准品中
标准品高

图 3