(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 108398390 A
(43)申请公布日 2018.08.14

(21)申请号 201710065536.5

(22)申请日 2017.02.06

(71)申请人 辽宁远大诺康生物制药有限公司
地址 110171 辽宁省沈阳市浑南新区南屏东路18-1号

(72)发明人 徐梅 李娜 康乐 刘伟 陈宏超 薛雁 王宏英 薛百忠

(74)专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理有限公司 11280
代理人 李渤 郭广迅

(51)Int.Cl.
G01N 21/31(2006.01)
G01N 33/50(2006.01)

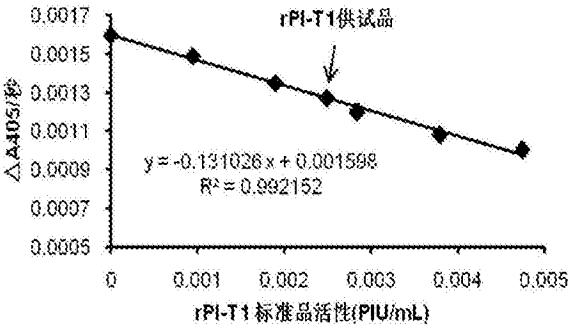
权利要求书2页 说明书12页 附图3页

(54)发明名称

一种测定丝氨酸蛋白酶抑制剂活性的方法

(57)摘要

本发明提供一种测定丝氨酸蛋白酶抑制剂活性的方法。本发明还提供了所述的方法在丝氨酸蛋白酶抑制剂的生产过程中用于活性控制或定量和稳定性中的用途。与现有技术相比，本发明提供的方法具有以下优点：1)本发明提供的方法步骤简单、使用标准品进行质控、酶动力学动态监测、实验数据清晰，实验结果准确，适用于各种来源的丝氨酸蛋白酶抑制剂原液和制剂的质量标准控制。2)本发明提供了的方法不仅准确度高、精密度及稳定性也大大提高。3)本发明提供的方法，无需使用终止剂。



CN 108398390 A

1.一种测定丝氨酸蛋白酶抑制剂活性的方法，所述方法包括以下步骤：

1)使用去离子水制备浓度为1-2mmol/L的生色底物水溶液；

优选地，所述生色底物选自S2765、BAEE和BAPNA；

2)使用稀释液制备活性为0.38-0.57U/L的丝氨酸蛋白酶溶液；

优选地，所述稀释液为1mmol/L的HCl、去离子水、Tris盐酸缓冲液、磷酸缓冲液或硼砂氯化钙缓冲液；所述丝氨酸蛋白酶选自胰酶、纤溶酶和激肽释放酶；

3)使用缓冲液制备丝氨酸蛋白酶抑制剂标准品；使用缓冲液制备浓度为0.5-2.5μmol/L的供试品；

优选地，所述供试品为rPI-T1；

优选地，所述缓冲液选自pH为7.0-8.0、浓度为20-150mmol/L的Tris盐酸缓冲液，pH为7.2-7.8、浓度为20-150mmol/L的磷酸缓冲液或pH为7.0-8.0、浓度为20-50mmol/L的硼砂氯化钙缓冲液；

优选地，所述制备丝氨酸蛋白酶抑制剂标准品的浓度梯度为0、0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40PIU/mL；进一步优选地为0、0.05、0.10、0.15、0.20PIU/mL；

4)在比色皿中加入步骤2)制得的丝氨酸蛋白酶溶液，然后分别加入等体积的步骤3)制得的不同的浓度梯度的丝氨酸蛋白酶抑制剂标准品，再加入步骤1)制得的生色底物水溶液，随后使用pH为7.4、浓度为50mmol/L的Tris-HCl缓冲液补充至终体积为1mL，混匀，于36-38℃孵育1-40分钟，在波长405nm处检测吸光度，每20-40秒读数一次，共检测4-10分钟；

优选地，在比色皿中加入20μL步骤2)制得的丝氨酸蛋白酶溶液，然后分别加入20μL的步骤3)制得的不同的浓度梯度的丝氨酸蛋白酶抑制剂标准品，再加入80μL步骤1)制得的生色底物水溶液；

5)以丝氨酸蛋白酶抑制剂标准品的活性(PIU/ml)为横坐标，以A405对应时间(秒)的变化率为纵坐标，绘制标准曲线，得到标准方程，其R≥0.99，将供试品测得的斜率带入标准方程中，计算出活性。

2.根据权利要求1所述的方法，其特征在于，所述丝氨酸蛋白酶抑制剂选自来源于微生物、昆虫、植物或动物的丝氨酸蛋白酶抑制剂和/或重组以及突变的丝氨酸蛋白酶抑制剂；

优选地，所述丝氨酸蛋白酶抑制剂选自Kunitz或Kazal型蛋白酶超家族；

优选地，所述丝氨酸蛋白酶抑制剂为蛇毒类重组胰酶或纤溶酶抑制剂；

更优选地，所述丝氨酸蛋白酶抑制剂的结构域P1氨基酸为碱性氨基酸，进一步优选地，为Arg和/或Lys。

3.根据权利要求1或2所述的方法，其特征在于，在步骤1)中，在步骤1)中，所述生色底物为S2765；

优选地，在步骤1)中，所述生色底物水溶液的浓度为2mmol/L。

4.根据权利要求1-3中任一项所述的方法，其特征在于，在步骤2)中，所述稀释液为1mmol/L的HCl；

优选地，在步骤2)中，所述丝氨酸蛋白酶为胰酶；

优选地，在步骤2)中，所述胰酶的活性为0.47TU/ml。

5.根据权利要求1-4中任一项所述的方法，其特征在于，在步骤3)中，所述缓冲液为pH为7.4、浓度为50mmol/L的Tris盐酸缓冲液；

优选地，在步骤3)中，所述丝氨酸蛋白酶抑制剂标准品纯度≥99％。

6.根据权利要求1-5中任一项所述的方法，其特征在于，在步骤3)中，所述供试品选自生产过程中产生的发酵液、微滤液、原液和制剂。

7.根据权利要求1-6中任一项所述的方法，其特征在于，在步骤4)中，所述孵育温度为37℃。

8.根据权利要求1-7中任一项所述的方法，其特征在于，在步骤4)中，所述孵育时间为2分钟。

9.根据权利要求1-8中任一项所述的方法，其特征在于，所述标准曲线的线性范围终浓度为0.05-0.4PIU/mL，更优选地为0.05-0.25PIU/mL。

一种测定丝氨酸蛋白酶抑制剂活性的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测领域，具体而言，本发明涉及一种测定丝氨酸蛋白酶抑制剂活性的方法。

背景技术

[0002] 丝氨酸蛋白酶，是一类以丝氨酸为活性中心的重要的蛋白水解酶，它们的作用是水解大分子蛋白质中的肽键，使之成为小分子蛋白质。丝氨酸蛋白酶抑制剂几乎存在于所有生物体中，并在生物体内与相应的丝氨酸蛋白酶形成一个动态的系统，对一系列生理过程起着调控作用。当前已知的丝氨酸蛋白酶抑制剂已超过1500种，分为17个蛋白家族，其中包括胰腺蛋白酶抑制剂(Kunitz)家族、胰腺分泌类胰蛋白酶抑制剂(Kazal)家族、链霉菌枯草杆菌蛋白酶抑制剂家族等。丝氨酸蛋白酶抑制剂各成员的抑制专一性是由活性位点P1决定的，且与被抑制的酶的特异性切点一致。丝氨酸蛋白酶抑制剂最基本的功能是防止不必要的蛋白水解，调节丝氨酸蛋白酶的水解平衡，其在生物体内血液凝结、免疫反应、纤溶、血管发生、炎症和肿瘤抑制等一些列生理过程中起重要作用。

[0003] 丝氨酸蛋白酶抑制剂活性测定是基于蛋白酶活性测定方法，通过测定被抑制后酶的残留活性计算出抑制剂的活性。抑制剂活性单位定义为能抑制2单位酶活性50％时所需要的抑制剂的量为1个抑制剂单位。

[0004] 现有技术中，常见的测定丝氨酸蛋白酶活性的方法为滴定法和发色底物法。

[0005] 滴定法是利用化学反应的定量关系，根据消耗标准溶液的体积确定待测物的含量，间接测定酶的活性。此法的缺点是：1、点对点的对比测定，准确性受测定人经验影响较大。2、用标定好的碱滴定蛋白酶水解反应产生的酸，通过计算间接测得酶的活性，步骤多，影响因素多。例如抑肽酶在药典当中的活性测定法为滴定法，该方法准确度不高，操作繁琐，试剂消耗量大，耗时较长，不利于实现自动化，近年来滴定法在我国药典中作为标准的生物药物的分析方法逐渐被其他方法所替代。

[0006] 发色底物法分为固定时间法和连续监测法，固定时间法起始于20世纪50年，通过加入强酸、强碱、蛋白沉淀剂等，使反应完全停止，才能测定底物或产物的变化，此法必须保证酶和底物在选定温度下作用时间要很精确，否则引起较大误差。

[0007] 鉴于上述滴定法和固定时间法的局限性，寻找一种更为科学、准确、精密的活性测定方法成为丝氨酸蛋白酶抑制剂制备成药品整个工艺中质量标准的应用的关键。

发明内容

[0008] 因此，本发明的目的是针对现有技术的不足，提供一种测定丝氨酸蛋白酶抑制剂活性的方法。本发明所述的方法特异性好、精密度高、操作简单，特别适用于丝氨酸蛋白酶抑制剂活性的测定，从而可以在丝氨酸蛋白酶抑制剂生产过程中用于原液和制剂的质量控制和稳定性考察。

[0009] 除非特别说明，在本发明中丝氨酸蛋白酶酶活性单位定义：在37℃，pH为7.4的条

件下，丝氨酸蛋白酶与带有发色基团对硝基苯胺(PNA)的发色底物孵育一定时间后，每分钟能水解底物产生1μmol/L的PNA，定义为一个酶活力单位，单位表示方法胰蛋白酶为TU(Trypsin Unit)、纤溶酶为PU(Plasmin Unit)、激肽释放酶为KU(Kallikrein Unit)，以此类推。

[0010] 利用公式1计算所述丝氨酸蛋白酶活力：

[0011] 公式1：

[0012] $$v=\frac{\Delta A\times V\times 10^{-9}}{1\times t\times \xi}$$

[0013] 式中：v-反应速度(μmol/min)；△A-吸光值变化；V-反应体积(L)；1-光程(cm)；t-反应时间(min)；ξ-摩尔吸光系数，10500(L/mol·cm)。

[0014] 本发明中丝氨酸蛋白酶抑制剂活性单位定义：在37℃，pH为7.4的条件下，能够抑制2个丝氨酸蛋白酶活性单位的50％所需要的抑制剂的量，为1个丝氨酸蛋白酶抑制剂的活性单位，表示方法为一蛋白酶抑制剂为TIU(Trypsin Inhibitor Unit)、纤溶酶抑制剂为PIU(Plasmin Inhibitor Unit)、激肽释放酶抑制剂为KIU(Kallikrein Inhibitor Unit)，以此类推。

[0015] 一方面，本发明提供了一种测定丝氨酸蛋白酶抑制剂活性的方法，所述方法包括以下步骤：

[0016] 1)使用去离子水制备浓度为1-2mmol/L的生色底物水溶液；

[0017] 优选地，所述生色底物选自S2765、BAEE(Na-苯甲酰-L-精氨酸乙酯盐酸盐)和BAPNA(Na-苯甲酰-DL-精氨酸-对硝基酰胺盐酸盐)；

[0018] 2)使用稀释液制备活性为0.38-0.57U/L的丝氨酸蛋白酶溶液；

[0019] 优选地，所述稀释液为1mmol/L的HCl、去离子水、Tris盐酸缓冲液、磷酸缓冲液或硼砂氯化钙缓冲液；所述丝氨酸蛋白酶选自胰酶、纤溶酶和激肽释放酶；

[0020] 3)使用缓冲液制备丝氨酸蛋白酶抑制剂标准品；使用缓冲液制备浓度为0.5-2.5μmol/L的供试品；优选地，所述供试品为rPI-T1；

[0021] 优选地，所述缓冲液选自pH为7.0-8.0、浓度为20-150mmol/L的Tris盐酸缓冲液，pH为7.2-7.8、浓度为20-150mmol/L的磷酸缓冲液或pH为7.0-8.0、浓度为20-50mmol/L的硼砂氯化钙缓冲液；

[0022] 优选地，所述制备丝氨酸蛋白酶抑制剂标准品的浓度梯度为0、0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40PIU/mL；进一步优选地为0、0.05、0.10、0.15、0.20PIU/mL

[0023] 4)在比色皿中加入步骤2)制得的丝氨酸蛋白酶溶液，然后分别加入等体积的步骤3)制得的不同的浓度梯度的丝氨酸蛋白酶抑制剂标准品，再加入步骤1)制得的生色底物水溶液，随后使用pH为7.4、浓度为50mmol/L的Tris-HCl缓冲液补充至终体积为1mL，混匀，于36-38℃孵育1-40分钟，在波长405nm处检测吸光度，每20-40秒读数一次，共检测4-10分钟；

[0024] 优选地，在比色皿中加入20μL步骤2)制得的丝氨酸蛋白酶溶液，然后分别加入20μL的步骤3)制得的不同的浓度梯度的丝氨酸蛋白酶抑制剂标准品，再加入80μL步骤1)制得的生色底物水溶液；

[0025] 5)以丝氨酸蛋白酶抑制剂标准品的活性(PIU/ml)为横坐标，以A405对应时间(秒)的变化率为纵坐标，绘制标准曲线，得到标准方程，其R≥0.99，将供试品测得的斜率带入标

准方程中，计算出活性；

[0026] 优选地，所述丝氨酸蛋白酶抑制剂选自来源于微生物、昆虫、植物或动物的丝氨酸蛋白酶抑制剂和/或重组以及突变的丝氨酸蛋白酶抑制剂；

[0027] 优选地，所述丝氨酸蛋白酶抑制剂选自Kunitz或Kazal型蛋白酶超家族。

[0028] 优选地，所述丝氨酸蛋白酶抑制剂为蛇毒类重组胰酶或纤溶酶抑制剂；

[0029] 更优选地，所述丝氨酸蛋白酶抑制剂的结构域P1氨基酸为碱性氨基酸，进一步优选地为Arg和/或Lys。

[0030] 优选地，在步骤1)中，所述生色底物为S2765；

[0031] 优选地，在步骤1)中，所述生色底物水溶液的浓度为2mmol/L；

[0032] 优选地，步骤2)中，所述稀释液为1mmol/L的HCl；

[0033] 优选地，在步骤2)中，所述丝氨酸蛋白酶为胰酶；

[0034] 优选地，在步骤2)中，所述胰酶的活性为0.47TU/ml；

[0035] 优选地，在步骤3)中，所述缓冲液为pH为7.4、浓度为50mmol/L的Tris盐酸缓冲液；

[0036] 优选地，在步骤3)中，所述丝氨酸蛋白酶抑制剂标准品纯度≥99％；其质量标准符合中国2015版《生物制品国家标准物质制备和标定规程》的要求。

[0037] 优选地，在步骤3)中，所述供试品选自生产过程中产生的发酵液、微滤液、原液和制剂。

[0038] 优选地，在步骤4)中，所述孵育温度为37℃；

[0039] 优选地，在步骤4)中，所述孵育时间为2分钟；

[0040] 优选地，在步骤5)中，所述标准曲线的线性范围终浓度为0.05-0.4PIU/mL，更优选地为0.05-0.25PIU/mL。

[0041] 在一个优选的实施方案中，本发明的方法为一种测定rPI-T1活性的方法，包括以下步骤：

[0042] 1)使用去离子水制备浓度为2mmol/L的S2765水溶液；

[0043] 2)使用1mmol/L的HCl制备活性为0.47TU/L的胰酶溶液；

[0044] 3)使用pH为7.0-8.0、浓度为20-150mmol/L的Tris盐酸缓冲液制备浓度梯度为0、0.05、0.10、0.15、0.20PIU/mL的丝氨酸蛋白酶抑制剂标准品；使用缓冲液制备浓度为0.5-2.5μmol/L的供试品rPI-T1；

[0045] 4)在比色皿中加入步骤2)制得胰酶溶液，然后分别加入等体积的步骤3)制得的不同的浓度梯度的丝氨酸蛋白酶抑制剂标准品，再加入步骤1)制得的生色底物水溶液，随后使用pH为7.4、浓度为50mmol/L的Tris-HCl缓冲液补充至终体积为1mL，混匀，于37℃孵育2分钟，在波长405nm处检测吸光度，每30秒读数一次，共检测5分钟；

[0046] 5)以丝氨酸蛋白酶抑制剂标准品的活性(PIU/ml)为横坐标，以A405对应时间(秒)的变化率为纵坐标，绘制标准曲线，得到标准方程，其R≥0.99，将供试品测得的斜率带入标准方程中，计算出活性；

[0047] 另一方面，本发明还提供了所述的方法在丝氨酸蛋白酶抑制剂的生产过程中用于活性控制或定量和稳定性的考察的用途。

[0048] Textilinin-1(Txln-1)是一种Kunitz型丝氨酸蛋白酶抑制剂，含有59个氨基酸，3对二硫键，分子量约为6.7kDa。本发明使用的重组textilinin-1(recombinant Plasmin

Inhibitor-Textilinin1,rPI-T1)是以毕氏酵母为表达体系获得的textilinin-1的重组蛋白。本发明人发现,动力学研究表明rPI-T1对纤溶酶和胰蛋白酶有很强的抑制作用,因此利用这个原理,可以添加相应的酶底物,通过监测产生发色基团所引起吸光度的变化值,从而测定rPI-T1抑制活性。

[0049] 本发明与现有技术相比,本发明提供的方法具有以下优点:

[0050] 1)本发明提供的方法步骤简单、使用标准品进行质控、酶动力学动态监测、实验数据清晰,实验结果准确,适用于各种来源的丝氨酸蛋白酶抑制剂原液和制剂的质量标准控制。

[0051] 2)本发明提供了的方法不仅准确度高、精密度、稳定性及灵敏度也大大提高

[0052] 3)本发明提供的方法,为酶动力学连续监测法,测定过程中,无需使用终止剂。

附图说明

[0053] 以下,结合附图来详细说明本发明的实施方案,其中:

[0054] 图1显示了本发明实施例1中对rPI-T1的活性测定;

[0055] 图2显示了本发明实施例2中对抑肽酶的活性测定;

[0056] 图3显示了本发明实施例3中反应时间的选择;

[0057] 图4显示了本发明实施例3中反应浓度的选择;

[0058] 图5显示了本发明实施例3中反应温度的选择;

[0059] 图6进一步显示了本发明实施例3中反应温度的选择

[0060] 图7显示了本发明实施例3中胰蛋白酶酶动力学参数的测定;

[0061] 图8显示了本发明实施例3中rPI-T1对胰蛋白酶酶动力学抑制参数的测定。

具体实施方式

[0062] 以下参照具体的实施例来说明本发明。本领域技术人员能够理解,这些实施例仅用于说明本发明,其不以任何方式限制本发明的范围。

[0063] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的原料、试剂材料等,如无特殊说明,均为市售购买产品。

[0064] 实施例1使用本发明的方法测定重组丝氨酸蛋白酶抑制剂Textilinin-1的活性

[0065] Textilinin-1(Txln-1)是一种Kunitz型丝氨酸蛋白酶抑制剂,含有59个氨基酸,3对二硫键,分子量约为6.7kDa。本发明使用的重组textilinin-1(recombinant Plasmin Inhibitor-Textilinin1,rPI-T1)是以毕氏酵母为表达体系获得的textilinin-1的重组蛋白。本发明人发现动力学研究表明rPI-T1对纤溶酶和胰蛋白酶有很强的抑制作用,因此利用这个原理,可以添加相应的酶底物,通过监测产生发色基团所引起吸光度的变化值,从而测定rPI-T1抑制活性。

[0066] 标准品及供试品来源:

[0067] 所述丝氨酸蛋白酶抑制剂标准品rPI-T1选自辽宁远大诺康生物制药有限公司生产的批号为160301的标准品制剂,规格为0.1mg/支,活性为15.2PIU/mg。

[0068] 所述丝氨酸蛋白酶抑制剂供试品选自辽宁远大诺康生物制药有限公司生产的批号为160401的原液样品。

[0069] 使用本发明的方法测定rPI-T1的活性，包括以下步骤：

[0070] 1)使用去离子水制备浓度为2mmol/L的S2765水溶液；

[0071] 2)使用1mmol/L的HCl制备活性为0.47TU/L的胰蛋白酶(重组猪源，购自美国药典，批号：1700013)；

[0072] 3)使用pH为7.4、浓度为50mmol/L的Tris盐酸缓冲液制备浓度为0.05、0.10、0.15、0.20、0.25PIU/mL的丝氨酸蛋白酶抑制剂标准品；

[0073] 4)将20μL步骤2)制得的胰蛋白酶置于1mL的比色皿中，加入20μL步骤3)制得的不同浓度的丝氨酸蛋白酶抑制剂标准品，加入80μL步骤1)制得的生色底物水溶液，然后使用pH为7.4、浓度为50mmol/L的Tris-HCl缓冲液补充至终体积为1mL，混匀，于37℃孵育2分钟，在波长405nm处检测吸光度，每30秒读数一次，共检测5分钟；

[0074] 5)以丝氨酸蛋白酶抑制剂标准品的活性(PIU/ml)为横坐标，以A405对时间(秒)的变化值为纵坐标，绘制标准曲线，得到标准方程，其R≥0.99。

[0075] 6)重复步骤4)，加入20μL浓度范围为0.5-2.5μmol/L的供试品代替标准品，将供试品测得的A405的变化值对应时间的斜率带入标准方程中，以接近标准曲线中点的斜率为准，计算出活性(PIU/mL)，再结合已知质量浓度(mg/mL)计算出比活性为14.21PIU/mg(图1)。

[0076] 实施例2使用本发明的方法测定丝氨酸蛋白酶抑制剂抑肽酶的活性

[0077] 试剂：

[0078] 所述抑肽酶购自Sigma公司，A1153-10mg，牛肺

[0079] 使用本发明的方法测定抑肽酶的活性，包括以下步骤：

[0080] 1)使用去离子水制备浓度为2mmol/L的S2765水溶液；

[0081] 2)使用1mmol/L的HCl制备活性为0.47TU/L的胰蛋白酶(USP，重组猪源)；

[0082] 3)使用pH为7.4、浓度为50mmol/L的Tris盐酸缓冲液制备浓度为2.5-22.5nmol/mL的抑肽酶供试品。

[0083] 4)将20μL步骤2)制得的胰蛋白酶置于1mL的比色皿中，加入20μL步骤3)制得的不同浓度的抑肽酶供试品(至少5个浓度，不包括零点)，加入80μL步骤1)制得的生色底物水溶液，然后使用pH为7.4、浓度为50mmol/L的Tris-HCl缓冲液补充至终体积为1mL，混匀，于37℃孵育2分钟，在波长405nm处检测吸光度，每30秒读数一次，共检测5分钟；

[0084] 5)以抑肽酶终反应浓度(nmol//L)为横坐标，以不同浓度抑肽酶抑制的胰蛋白酶对应活性(TU/mL)为纵坐标，绘制标准曲线，得到标准方程，其R≥0.99，根据公式1及丝氨酸蛋白酶抑制剂活性单位定义，计算出抑肽酶的比活性为80.21TIU/mg(图2)。

[0085] 实施例3本发明丝氨酸蛋白酶抑制剂测定方法的方法学验证

[0086] 3.1所述测定方法中的(反应)时间选择

[0087] 在1mL的比色皿中按顺序加入20μL 0.47TU/mL胰蛋白酶，20μL1μmol/L的rPI-T1，80μL 2mmol/L S2765，最后加入880μL pH为7.4，浓度为50mmol/L Tris-HCl缓冲液，混匀。将比色皿放入37℃紫外分光光度计中开始反应不同的时间范围为0-100分钟(前30分钟每隔5分钟测一次，30分钟-60分钟每隔10分钟测一次，1小时后隔30分钟测一次)，反应完毕后在405nm波长下测定吸收值，每30秒测定一次，共5分钟。

[0088] 实验结果以反应时间(分)为横坐标，吸收值对应时间的变化率为纵坐标作图，结

果如图3所示，反应时间选定其呈线性的时间在1-40分钟之间，考虑到测定的效率、反应结果的可靠性和灵敏度，该反应体系中孵育时间优选为2分钟。

[0089] 3.2所述测定方法中供试品浓度的选择

[0090] 用pH为7.4、浓度为50mmol/L的Tris-HCl缓冲液稀释rPI-T1至不同的浓度范围0.5μmol/L-12.5μmol/L，在1mL比色皿中加入20μL0.47TU/mL胰蛋白酶，20μL rPI-T1至终浓度范围为10nmol/L-250nmol/L，80μL 2mmol/L S2765，最后加入880μL 50mmol/L pH7.4Tris-HCl缓冲液，混匀。将比色皿放入37℃紫外分光光度计中孵育2分钟，然后在405nm波长下测定吸收值，每30秒测定一次，共5分钟。实验结果以rPI-T1浓度(nmo/L)为横坐标，吸收值对应时间的变化率为纵坐标作图，并分析结果。

[0091] 结果如图4所示，rPI-T1终浓度范围在10-80nmol/L时，其R≥0.98，最优范围为10-50nmol/L，线性关系良好，其R≥0.99，故其线性范围的浓度为10-50nmol/L。

[0092] 3.3所述测定方法中反应温度的选择

[0093] 本实施例中用pH为7.4、浓度为50mmol/L Tris-HCl的缓冲液稀释rPI-T1至不同的浓度，在1mL比色皿中加入20μL 0.47TU/mL胰蛋白酶，20μL rPI-T1至终浓度范围为10nmol/L-50nmol/L，80μL 2mmol/L S2765，最后加入880μL 50mmol/L pH7.4Tris-HCl缓冲液，混匀。将比色皿分别放入25℃、37℃紫外分光光度计中孵育2分钟，然后在405nm波长下测定吸收值，每30秒测定一次，共5分钟。实验结果以rPI-T1浓度(nmo/L)为横坐标，吸收值对应时间的变化率为纵坐标作图，并比较两个条件下的标准曲线斜率。

[0094] 标准曲线的斜率是灵敏度的重要指标，由图5可以看出，标准曲线在温度37℃下的斜率比25℃下的斜率高，即37℃时标准曲线的灵敏度更高，而37℃是人体正常温度，从静脉滴注的候选药物角度来看，反应温度都应选择37℃。

[0095] 3.4所述测定方法中胰酶动力学参数的测定

[0096] 使用1mmol/L的HCl将胰蛋白酶稀释至2TU/mL，在1mL比色皿中加入20μL胰酶，加入不同体积S2765至终浓度范围为15μmol/L-80μmol/L，最后加入相应体积pH为7.4，浓度为50mmol/L的Tris-HCl缓冲液，至最终反应体积1mL，混匀。

[0097] 将比色皿放入37℃紫外分光光度计中孵育30分钟，然后在405nm波长下测定吸收值，每30秒测定一次，共5分钟。根据米氏方程公式2导出公式3，以1/S2765为横坐标，以1/v为纵坐标，得到标准曲线方程为Y＝-0.9063X+40.8675，R^2＝0.9969，图6中横轴截距为1/Vmax，斜率为Km/Vmax，计算求得Km＝0.0222mmol/L，Vmax＝0.0244693460D/min，按照胰蛋白酶分子量为22000，计算得到kcat＝82.0279±1.5219s^{-1}

[0098] 公式2：$v=\frac{S}{x}$

[0099] 公式3：$\frac{1}{v}=\frac{Km}{Vm}\times\frac{1}{S}$

[0100] 式中v-反应初速度(微摩尔浓度变化/min)；Vm-最大反应速度(微摩尔浓度变化/min)；[S]-底物浓度(mol/L)；Km-米氏常数(mol/L)。

[0101] 3.5rPI-T1对胰蛋白酶抑制参数的测量

[0102] 用2mmol/L的HCl稀释胰蛋白酶至2TU/mL，在1mL比色皿中加入20μL胰酶，加入不同体积的rPI-T1至终浓度范围为7.5nmol/L-67.5nmol/L，加入不同体积S2765至终浓度分别为30μmol/L、60μmol/L、180μmol/L，最后加入相应体积50mmol/L pH7.4Tris-HCl缓冲液，至

最终反应体积1mL，混匀，加样体系见表1。

[0103] 表1Rtxl1对胰蛋白酶抑制参数测量体系

S2765 (mM)	rPI-T1 (nM)	V1(OD/min)	V2(OD/min)	V3(OD/min)
	67.5	0.002247	0.002102	0.002255
	52.5	0.002404	0.002428	0.002506
0.03	37.5	0.002808	0.002855	0.002942
	22.5	0.003525	0.003598	0.003498
	7.5	0.004364	0.004474	0.004418
	67.5	0.003522	0.003568	0.003693
	52.5	0.004026	0.004121	0.004124
0.06	37.5	0.004743	0.00485	0.004434
	22.5	0.005709	0.005456	0.005409
	7.5	0.006284	0.006374	0.006396
	67.5	0.007435	0.007449	0.007241
	52.5	0.00834	0.007961	0.008451
0.18	37.5	0.009078	0.00854	0.009237
	22.5	0.009212	0.009369	0.01009
	7.5	0.010442	0.01092	0.009078

[0104]

[0105] 将比色皿放入37℃紫外分光光度计中孵育30分钟，然后在405nm波长下测定吸收值，每30秒测定一次，共5分钟。利用dixon作图测Ki，结果见图7，Ki＝32.26242，R^2＝0.99903。从抑制酶促动力学试验可以看出，rPI-T1对胰酶有明显的抑制作用，呈显著的剂量-效应关系。

[0106] 3.6方法的精密度考察

[0107] 随机选取辽宁远大诺康生物制药有限公司生产留样的批号为160301的标准品其标定活性为14.2PIU/mg，和批号为160701的rPI-T1的供试品。以标准品制作标准曲线，线性范围为10-50nmol/L，供试品选取三个浓度。重复性考察为，在同一天内，人员、试验仪器不变的情况下，每一个浓度重复测定3次，计算每一浓度测定结果的均值和SD，计算每一浓度的变异系数CV值，评价日内精密度，结果见表5。

[0108] 日间精密度为在不同天内，人员、试验仪器不变的情况下，每一个浓度重复测定3次，计算每一浓度测定结果的均值和SD，计算每一浓度的变异系数CV值，评价日间精密度，结果见表5。

[0109] 表2日内及日间精密度结果(PIU/mg)

[0110]

	供试品终浓度（nmol/L）	测定 1	测定 2	测定 3	平均比活（PIU/mg）	SD	CV（%）
日内精密度	25	14.94	14.94	14.94	14.94	0.00	0.00
	35	15.07	15.39	15.39	15.28	0.18	1.19
	50	14.52	14.96	14.74	14.74	0.22	1.49
日间精密度		第 1 天	第 2 天	第 3 天	平均比活（PIU/mg）	SD	CV（%）
	25	14.94	15.82	15.52	15.38	0.62	4.05
	35	15.28	15.70	15.55	15.49	0.30	1.91
	50	14.74	14.22	14.54	14.48	0.36	2.51

[0111] 由表2可以看出，本测定方法的日内精密度≤2.0%，日间精密度≤5%，说明该方法精密度较高。

[0112] 实施例4标准品的标定及质量标准

[0113] 本实施例随机选取辽宁远大诺康生物制药有限公司生产留样的批号为160301的rPI-T1标准品的冻干制剂，其质量标准按2015版《生物制品国家标准物质制备和标定规程》的要求进行。其成分、含量及质量标准见表3。分别在-20℃、4℃、25℃和37℃4个温度下放置，考察其3个月的稳定性，以rPI-T1抑制纤溶酶活性为考察指标：活性波动幅度在20%以内为稳定，rPI-T1抑制纤溶酶的活性单位定义如下：

[0114] rPI-T1抑制胰蛋白酶活性单位定义(PIU)：在37℃，pH7.4的条件下使2个单位的纤溶酶(1个纤溶酶单位是每分钟水解发色底物S2765产生1μmol/L的对硝基苯胺的量)下降50%时所需要的rPI-T1的量称为1个抑制单位，以PIU表示。

[0115] 根据rPI-T1抑制胰蛋白酶活性定义来计算rPI-T1标准品的活性，其结果见表3。

[0116] 表3 160301批rPI-T1标准品活性稳定性及质量标准

[0117]

原料来源		批号：20160301 配制浓度 0.1mg＋5%甘露醇（200uL）			
保存时间	温度	0个月	1个月	2个月	3个月
稳定性研究：活性残留率（%）	37℃	100	96.7	101.6	94.6
	25℃	100	97.4	103.4	109.7
	4℃	100	101.9	103.9	98.7
	-20℃	100	101.4	103.5	96.9
质量标准	纯度	＞99%			
	分装精度	≤1.00% 合格			
	水分	＜3% 合格			
	无菌	合格			

[0118] 由表3结果可以看出160301批的rPI-T1标准品的质量标准符合要求，其3个月活性稳定性考察指标为±10%，均在20%幅度以内波动，说明其在4个温度下均稳定。

[0119] 实施例5rPI-T1制剂辅料对活性测定的影响

[0120] 本实施例随机选取辽宁远大诺康生物制药有限公司生产留样的批号为160701的rPI-T1冻干制剂，规格为50mg/支，含有5%(W/V)甘露醇，对其进行专属性检测。其中各组合的样品见表4，在1mL的反应体系中加入体积为20μL，其他不变，以rPI-T1活性百分比为考察指标，其结果如下表。

[0121] 表4制剂辅料甘露醇对活性测定的影响

[0122]

供试品组合	rPI-T1活性百分比（%）			
	测定1	测定2	测定3	平均值

[0123]

1μmol/L rPI-T1	94.40	103.73	106.33	101.49
1μmol/L rPI-T1+1%甘露醇	106.80	107.67	94.20	102.89
0.01μg 甘露醇	105.80	107.20	90.93	101.31
1μmol/L rPI-T1+5%甘露醇	99.53	103.80	89.33	97.56
0.07mg 甘露醇	103.20	102.27	86.87	97.44
1μmol/L rPI-T1+7%甘露醇	103.47	97.00	92.33	97.60
0.1μg 甘露醇	0.00	0.00	0.00	101.60
1μmol/L rPI-T1+10%甘露醇	105.07	98.40	101.33	94.42
5%甘露醇	101.00	93.07	89.20	97.62

由上表得到结果，不同浓度甘露醇对rPI-T1活性测定值波动在±5%以内，因此不同浓度甘露醇对该方法没有干扰性。

[0124] 实施例6使用不同方法测定rPI-T1活性的比较

[0125] 本实施例使用如实施例1和实施例2所示的方法，对rPI-T1供试品及抑肽酶进行滴定法和酶动力学连续监测法进行活性测定；其中滴定法按照2015版药典二部中，其方法如下：

[0126] 取硼砂-氯化钙缓冲液(pH8.0)9.0mL与底物溶液BAEE(6.85mg/mL)1.0mL，置于25mL烧杯中，与25℃±0.5℃恒温水浴中放置3-5分钟，在搅拌下滴加氢氧化钠滴定液(0.1mol/L)调节pH至8.0，精密加入抑肽酶溶液(0.015mg/mL)和胰蛋白酶溶液(0.1mg/mL)的混合液1mL(经25℃保温3-5分钟)，并立即计时，用1mL微量滴定管以氢氧化钠滴定液(0.1mol/L)的体积(mL)滴定释放出的酸，使溶液pH值始终保持在7.9-8.1.每隔60秒读取pH值恰为8.0时所消耗的氢氧化钠滴定液的体积(mL)，共6分钟。另精密量取胰蛋白酶稀释液1mL，按上法操作，作为对照(重复一次)。以时间为横坐标，消耗的氢氧化钠滴定液为纵坐标，应为一条直线。供试品和对照两条直线应基本重合，求出每秒钟消耗氢氧化钠滴定液的体积(mL)，按以下公式计算：

[0127] 公式2：

[0128] $$每\ 1mg\ 抑肽酶的效价\ (TIU/mg) = \frac{(2n_1 - n_2)4000 \bullet f}{W}$$

[0129] 式中4000为系数

[0130] W为抑肽酶的酶量，mg

[0131] n1为对照测定时每秒钟消耗的氢氧化钠滴定液(0.1mg/L)的体积，mL；

[0132] n2为供试品溶液每秒钟消耗氢氧化钠滴定液(0.1mg/L)的体积，mL；

[0133] 2为供试品溶液中所加入胰蛋白酶的量为对照测定时的2倍。

[0134] f为氢氧化钠滴定液(0.1mol/L)校正因子。

[0135] 表5不同方法测定rPI-T1活性的比较

[0136]

测定方法	测定供试品终浓度范围	供试品	测定1	测定2	测定3	平均比活	SD	CV（%）
连续监测法	0-0.3μg/mL	rPI-T1（PIU/mg）	14.16	15.56	15.95	15.22	0.94	6.18
		抑肽酶（TIU/mg）	75.00	81.61	78.32	78.30	0.11	4.21
滴定法	0-1.5μg/mL	rPI-T1（PIU/mg）	1.36	1.71	1.52	1.53	0.24	15.75
		抑肽酶（TIU/mg）	1.02	1.22	1.11	1.12	0.12	11.03

[0137] 由表中结果可以看出，连续监测法精密度要好于滴定法，其测定浓度范围更小，灵敏度更高，并且节省试剂量及人员成本，是理想的替代方法。

[0138] 滴定法试剂消耗量大，试验步骤复杂。首先氢氧化钠滴定液要求准确标定，并且底物BAEE稳定时长仅2个小时，现配现用。其次试验人员需要始终监测并保证pH值在8.0左右，并同时记录氢氧化钠消耗的体积，为保证结果的准确性，需要两人进行试验。再次测定抑制剂时残留酶的活性要与对照品酶的活性越接近越准确，否则稍微偏差一点，就会影响其结果的准确度。而基于酶动力学的连续监测法，仅在起始阶段加好反应体系，仪器自动检测并生成数据，无需人员实时检测。

[0139] 实施例7rPI-T1活性测定法对不同底物的适应性

[0140] 本实施例随机选取辽宁远大诺康生物制药有限公司生产留样的批号为160301的rPI-T1供试品，分别使用三种不同的底物(S2765、BAPNA和BAEE)，加入的反应体系见表6，其他条件相同，进行活性测定。

[0141] 表6rPI-T1活性测定法对不同底物加样表

[0142]

	S2765	BAPNA	BAEE	加入体积(μL)
检测波长（nm）	405	405	253	——
胰蛋白酶（TU/L）	0.47	0.4	0.15	20
rPI-T1（nmol/L）	0.5-2.5	0.5-7.5	0.5-20	20
底物（mol/L）	2	0.0025	10	80
50mmol/L pH7.4 Tris-HCl	——	——	——	880

[0143] 表7rPI-T1活性测定法对不同底物的结果

[0144]

不同底物	S2765	BAPNA	BAEE	平均比活（PIU/mg）	SD	CV（%）
rPI-T1 线性终浓度范围（nmol/L）	10-50	50-200	100-400	——	——	——
抑制曲线斜率	0.000090	0.000019	0.000002	——	——	——
比活（PIU/mg）	14.90	16.90	15.50	15.77	1.02	6.51

[0145] 由表7可以看出，三种底物对应的抑制剂范围有所不同，其中以S2765为底物的抑制剂浓度范围最小，其斜率最大，表明本发明优选的S2765作为底物其灵敏度最好，更有利于抑制剂活性测定的准确度和精密度。

[0146] rPI-T1用三种不同的底物测定的比活性偏差CV值为6.51％，测定值基本一致，因此以上三种底物均适用于rPI-T1的活性测定。

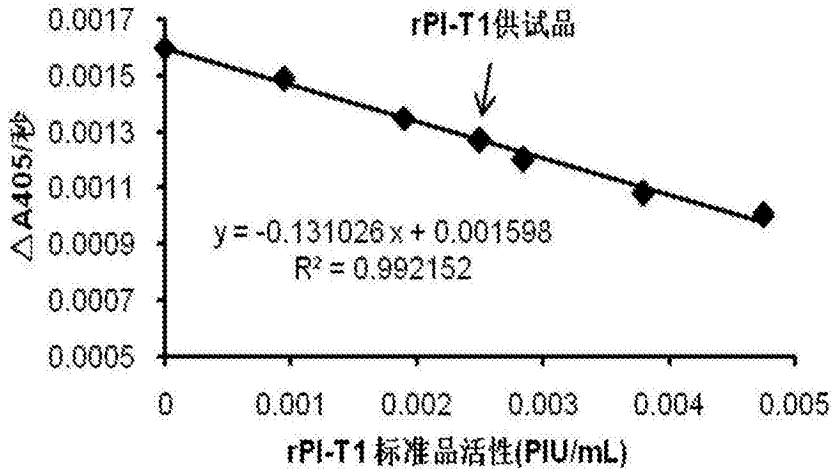

rPI-T1供试品
0.0017
0.0015
0.0013
0.0011
0.0009
0.0007
0.0005
△A405/秒
y = -0.131026 x + 0.001598
R² = 0.992152
0
0.001
0.002
0.003
0.004
0.005
rPI-T1 标准品活性(PIU/mL)

图1

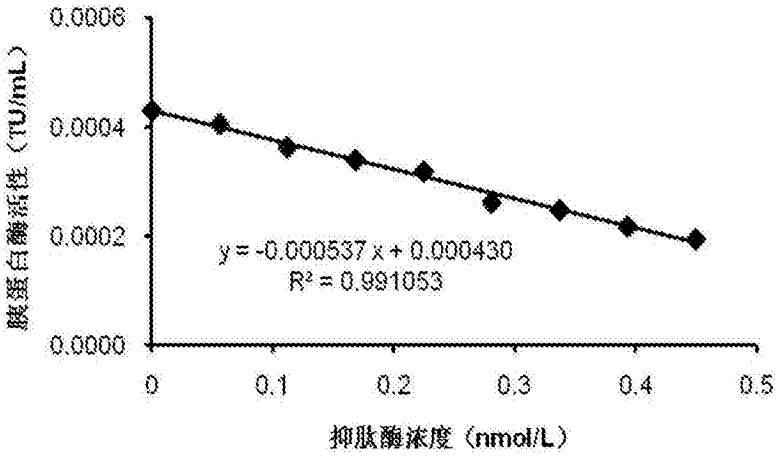

0.0006
0.0004
0.0002
0.0000
胰蛋白酶活性（TU/mL）
y = -0.000537 x + 0.000430
R² = 0.991053
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
抑肽酶浓度（nmol/L）

图2

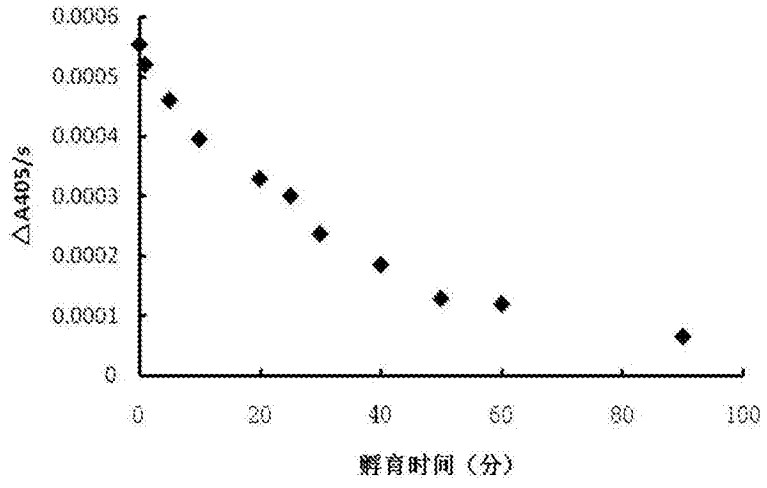

0.0006
0.0005
0.0004
0.0003
0.0002
0.0001
0
△A405/s
0
20
40
60
80
100
孵育时间（分）

图3

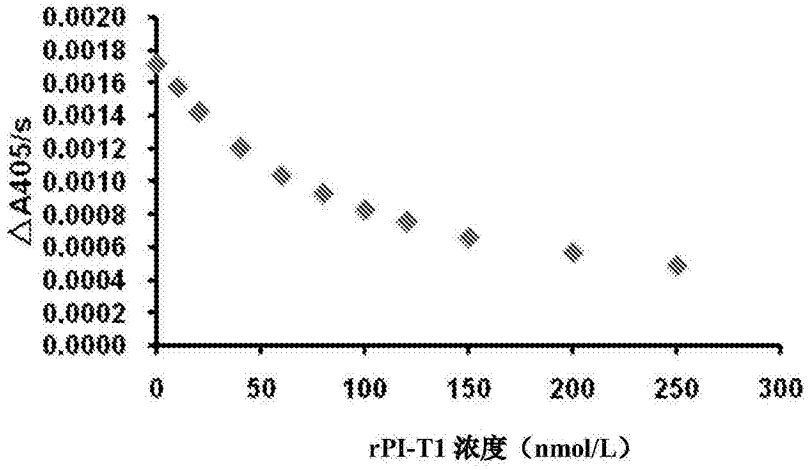

0.0020
0.0018
0.0016
0.0014
0.0012
0.0010
0.0008
0.0006
0.0004
0.0002
0.0000
△A405/s
0
50
100
150
200
250
300
rPI-T1 浓度（nmol/L）

图4

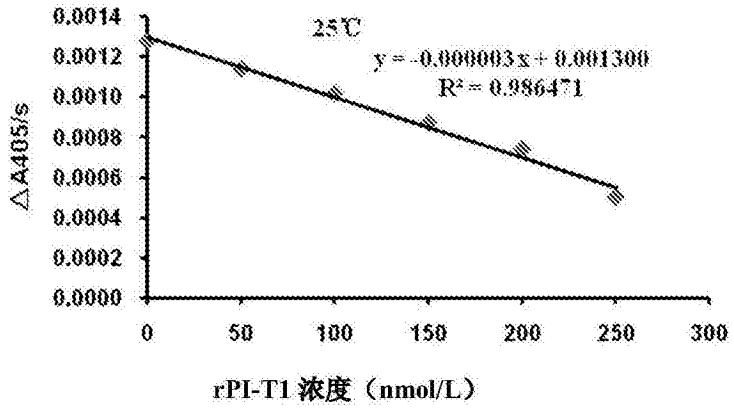

25℃
y = -0.000003x + 0.001300
R² = 0.986471
0.0014
0.0012
0.0010
0.0008
0.0006
0.0004
0.0002
0.0000
△A405/s
0
50
100
150
200
250
300
rPI-T1 浓度（nmol/L）

图5

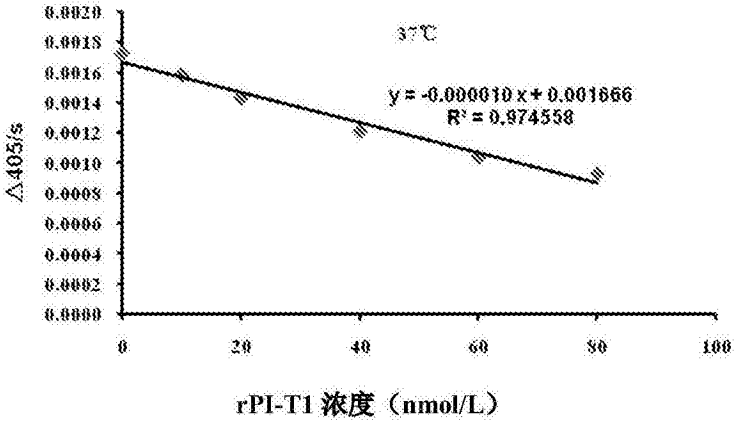

37℃
y = -0.000010x + 0.001666
R² = 0.974558
0.0020
0.0018
0.0016
0.0014
0.0012
0.0010
0.0008
0.0006
0.0004
0.0002
0.0000
△405/s
0
20
40
60
80
100
rPI-T1 浓度（nmol/L）

图6

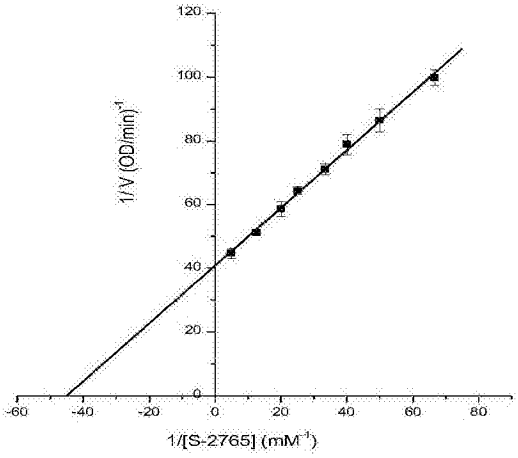


图7

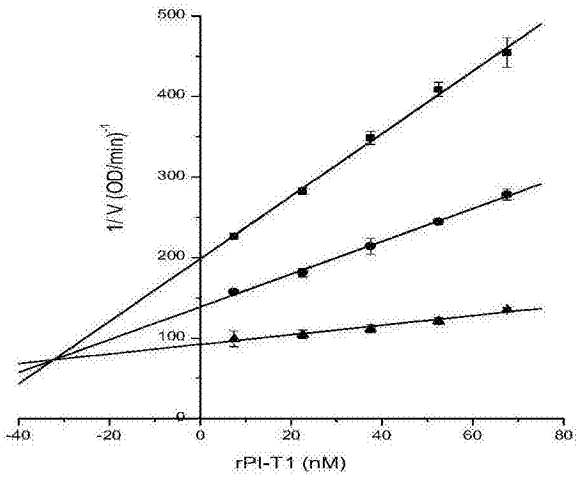


图8