



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104447984 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 25

(21) 申请号 201410799413. 0

G01N 33/531(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 12. 20

(71) 申请人 苏州博源医疗科技有限公司

地址 215163 江苏省苏州市高新区锦峰路 8 号

(72) 发明人 虞留明 涂建成 卢忠心 王英
徐琦璿

(51) Int. Cl.

C07K 14/765(2006. 01)

C07K 14/795(2006. 01)

C07K 14/47(2006. 01)

C07K 1/107(2006. 01)

C07K 16/44(2006. 01)

C07K 16/06(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

权利要求书3页 说明书14页 附图1页

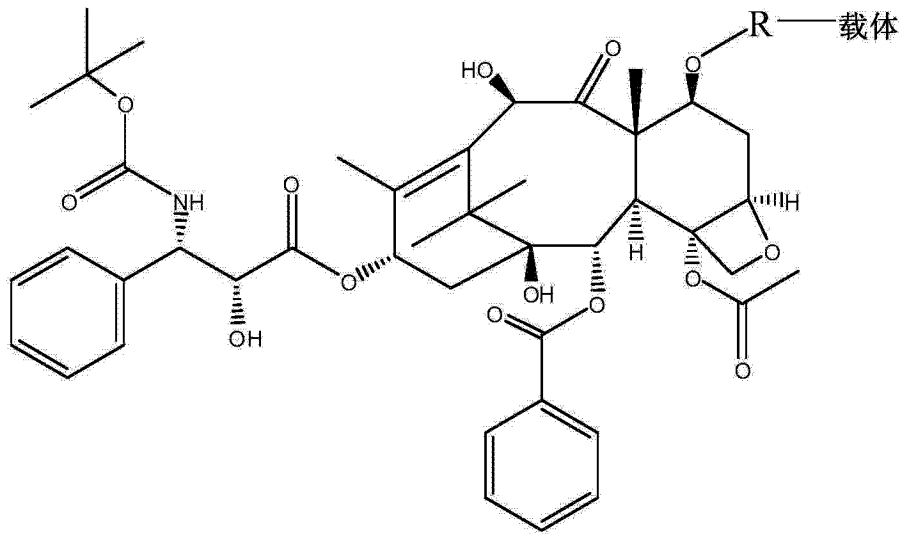
(54) 发明名称

多西紫杉醇免疫原、抗多西紫杉醇特异性抗体和多西紫杉醇检测试剂

(57) 摘要

本发明公开了一种多西紫杉醇免疫原及其合成方法,以及由该免疫原获得的抗多西紫杉醇抗体、检测试剂及其制备方法。本发明的多西紫杉醇免疫原由全新的多西紫杉醇衍生物合成,具有免疫原性高的优点,并且可以诱导得到特异性高和结合力强的抗多西紫杉醇特异性抗体,并且与常见的62种药物无任何交叉反应。由该抗体制备的多西紫杉醇检测试剂,可以方便、精确地确定样品中的多西紫杉醇含量,有利于临床的个体化治疗。与现有技术方法相比,本发明的检测试剂可以实现在全自动生化分析仪上的高通量、快速化检测,且具有操作简便、灵敏度高、特异性强、结果准确等优点,还能有效降低多西紫杉醇检测成本,适合临床大规模推广使用。

1. 一种多西紫杉醇免疫原,其结构式如式 (I) 所示 :



式 (I)

式中, R 为连接基团 $-CO-(CH_2)_n-COO-$, n 是 1 至 20 之间的整数, 优选 R 为 $-CO-(CH_2)_2-COO-$; 载体为具有免疫原性的蛋白质或多肽, 选自血清蛋白、血蓝蛋白或甲状腺球蛋白中的一种, 优选为血清蛋白, 更优选为牛血清白蛋白。

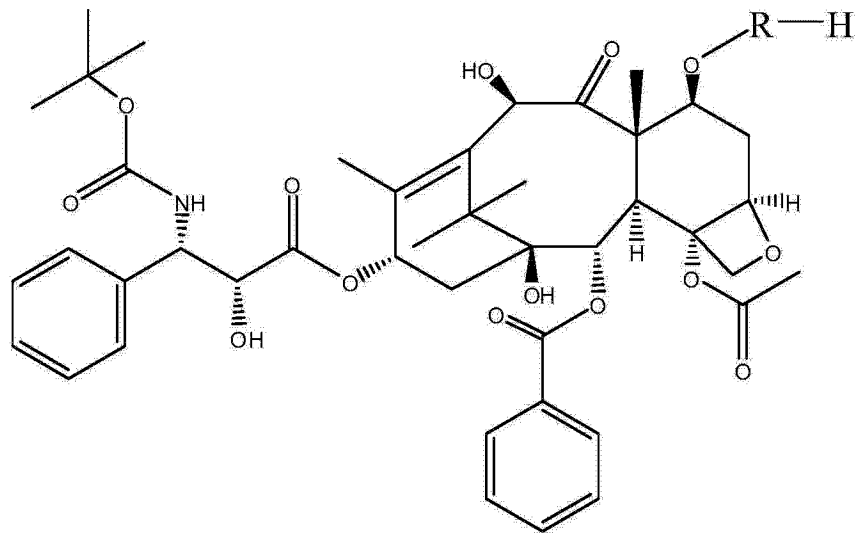
2. 一种如权利要求 1 所述的多西紫杉醇免疫原的合成方法, 其特征在于包含以下步骤:

(1) 将载体蛋白 200mg 溶解于 50ml 0.2M, pH 8.5 的磷酸缓冲液中;

(2) 将如下化学品加入到小烧杯中室温下搅拌溶解反应 30min: 200mg 多西紫杉醇衍生物、3.5ml 二甲基甲酰胺、3.5ml 乙醇、7.0ml 10mM, pH 5.0 的磷酸钾缓冲液、200mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺、50mg N-羟基琥珀酰亚胺;

(3) 将溶解好的溶液滴加至载体蛋白溶液中, 并在 $2\sim 8^\circ\text{C}$ 下搅拌过夜, 得到抗原; 将合成好的抗原经过透析进行纯化, 得到多西紫杉醇免疫原。

3. 根据权利要求 2 所述的多西紫杉醇免疫原的合成方法, 其特征在于所述的多西紫杉醇衍生物结构式如式 (II) 所示:



式 (II)

上述 R 为连接基团 $-CO-(CH_2)_n-COO-$, n 为 1 至 20 之间的整数, 优选 n 为 2。

4. 根据权利要求 2-3 任一项所述的多西紫杉醇衍生物, 其特征在于由以下步骤合成:

(1) 称取 1g 多西紫杉醇、2g 化合物 A 加入反应体系中, 然后用 20ml 吡啶或者干燥的苯在连续回流的玻璃烧瓶中进行孵育;

(2) 将此反应混合物在 70-80°C 的回流温度下持续加热 6 小时, 然后将反应混合物缓慢冷却至室温, 轻轻倒去多余的吡啶或苯;

(3) 将剩余的有机成分在负压条件下持续通入氮气流使其蒸发干燥, 得到干燥残留产物;

(4) 将步骤 (3) 得到的产物用蒸馏水配制的 60% 乙醇冲洗 10 次以上, 获得重结晶物质即为多西紫杉醇衍生物;

所述的化合物 A 为含有 3-22 个碳原子的烷二酸或相应的酸酐, 优选为丁二酸酐。

5. 一种抗多西紫杉醇特异性抗体, 由权利要求 1-2 任一项所述的多西紫杉醇免疫原免疫实验动物后产生得到的完整抗体分子, 或者为保留与多西紫杉醇特异性结合的能力的抗体片段或抗体衍生物。

6. 根据权利要求 5 所述的一种抗多西紫杉醇特异性抗体, 其特征在于所述的完整的抗体分子、抗体片段或抗体衍生物, 为采用单一的多西紫杉醇免疫原对动物加强免疫所获得的多克隆抗体, 或者为免疫后经体细胞杂交获得的单克隆抗体; 所述的实验动物选自兔、山羊、小鼠、绵羊、豚鼠或马中的一种, 优选为兔。

7. 一种如权利要求 5-6 中任一项所述的抗多西紫杉醇特异性抗体的制备方法, 其特征在于包含以下步骤:

(1) 用 PBS 将多西紫杉醇免疫原稀释至 1.0mg/ml, 得到抗原溶液, 然后用 1.0ml 抗原溶液与弗氏完全佐剂混合, 对实验动物进行注射;

(2) 2~3 周后, 再用 1.0ml 相同的抗原溶液与弗氏不完全佐剂对上述实验动物注射一次, 之后每隔四周注射一次, 共计注射 4 次;

(3) 对步骤 (2) 的实验动物取血, 分离纯化得到效价为 1:30000-1:50000 的抗多西紫杉醇特异性抗体。

8. 一种多西紫杉醇检测试剂, 含有权利要求 5-7 任一项所述的抗多西紫杉醇特异性抗体和指示试剂, 所述的指示试剂选自酶试剂、放射性同位素试剂、荧光试剂或发光试剂中的一种, 优选为酶试剂; 所述的酶试剂由多西紫杉醇酶标偶联物和酶底物所组成, 酶标偶联物优选为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物, 酶底物优选为葡萄糖-6-磷酸。

9. 一种如权利要求 8 所述的多西紫杉醇检测试剂的制备方法, 其特征在于包含以下步骤:

(1) 试剂 A: 将 4.036g、11.25mM 氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和 1.711g、11.25mM 葡萄糖-6-磷酸用 1L 55mM、pH = 8.0 的 Tris 缓冲液溶解制成均相酶底物; 将权利要求 5-7 中任一项所述的抗多西紫杉醇特异性抗体加到上述均相酶底物中, 抗多西紫杉醇特异性抗体与均相酶底物的体积比为 1:100 ~ 1:10000;

(2) 试剂 B: 将多西紫杉醇酶标偶联物加到 120mM、pH = 8.2 的 Tris 缓冲液中, 多西紫杉醇酶标偶联物与 Tris 缓冲液的体积比为 1:100 ~ 1:10000;

所述的抗多西紫杉醇特异性抗体与均相酶底物的体积比优选为 1:400;

所述的多西紫杉醇酶标偶联物与 Tris 缓冲液的体积比优选为 1:1500。

10. 根据权利要求 8-9 任一项所述的多西紫杉醇检测试剂, 其特征在于所述的多西紫杉醇酶标偶联物的制备方法包含以下步骤:

(1) 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液的制备: 称取 15mg 规格为 100KU 的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, 室温溶解于 12mL 含有 72.6mg 0.05M Tris、8mg 3.3mM MgCl₂ 和 100mg NaCl 的溶液中, pH = 9.0; 在溶液中加入 225mg 还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、135mg 葡萄糖-6-磷酸以及 0.75mL 卡必醇; 再逐滴加入 2mL 二甲基亚砷;

(2) 多西紫杉醇衍生物的激活: 在无水状态下称取 10mg 多西紫杉醇衍生物, 溶解于 600 μL 二甲基甲酰胺中; 使上述溶液温度降到 -2 ~ -8°C; 加入 3 μL 三丁胺; 加入 1.5 μL 氯甲酸异丁酯; -2 ~ -8°C 搅拌 30 分钟;

(3) 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与多西紫杉醇衍生物的连接: 将步骤 (2) 激活的多西紫杉醇衍生物溶液逐滴加入到步骤 (1) 溶解的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中; 2-8°C 搅拌过夜;

(4) 纯化产物: 通过 G-25 凝胶层析柱纯化连接产物, 获得的最终产物为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物, 于 2-8°C 下储存。

多西紫杉醇免疫原、抗多西紫杉醇特异性抗体和多西紫杉醇检测试剂

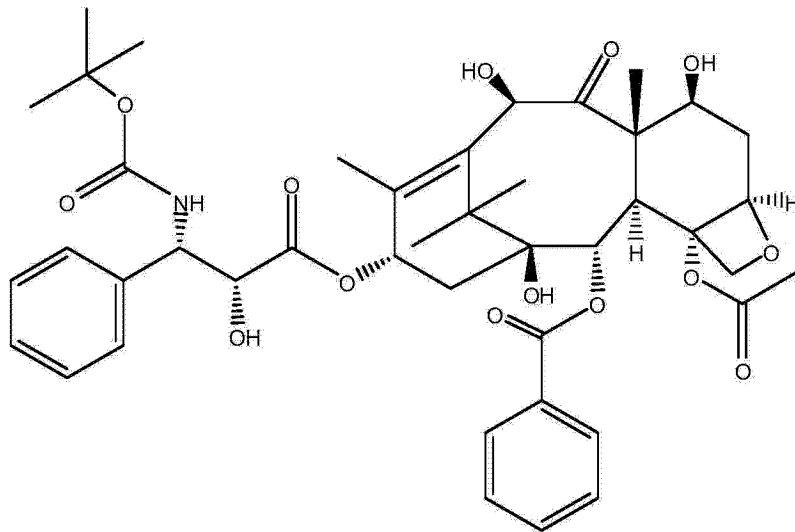
技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域，涉及多西紫杉醇免疫原、抗多西紫杉醇特异性抗体和多西紫杉醇检测试剂。

背景技术

[0002] 多西紫杉醇 (Docetaxel) 结构式如式 (III) 所示：

[0003]



式 (III)

[0004] 多西紫杉醇是一种新型半合成抗肿瘤药物，属于紫杉醇类化合物，其作用机制是加强微管蛋白聚合作用和抑制微管解聚作用，导致形成稳定的非功能性微管束，从而破坏肿瘤细胞的有丝分裂。近年来多西紫杉醇在乳腺癌、晚期非小细胞肺癌、胃癌等多种癌症的临床治疗中得到广泛应用，但其不良反应依然较为明显，主要包括：骨髓抑制、过敏反应、皮肤反应，其它不良反应还包括恶心、呕吐、腹泻、脱发、关节痛、低血压、肌肉疼痛、肺水肿、心动过速等。同时多西紫杉醇的血药浓度与治疗效果之间有着很高的可变关系，不同个体间多西紫杉醇的相同剂量会产生显著不同的临床疗效和不良反应；相同个体多西紫杉醇的相同剂量在肿瘤的不同阶段会产生显著不同的临床疗效和不良反应。因此快速、准确、高通量、低成本的测定多西紫杉醇在肿瘤患者体内的血药浓度，对于提高患者的生存率和降低毒副作用都至关重要。

[0005] 目前，国内外监测多西紫杉醇血药浓度的主要方法是酶联免疫吸附法 (ELISA)、高效液相色谱法 (HPLC)、反相高效液相色谱法 (RP-HPLC)、液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS) 等传统方法，但这些方法都不能满足高通量与低成本的临床需求。国内虽然已有使用胶乳增强免疫比浊法，可应用于生化分析仪的多西紫杉醇测定试剂盒上市，但是远不能满足日益增长的临床检测需求。目前市场上缺乏稳定性好、灵敏度高、特异性强的多西紫杉醇检测

试剂,尤其是质量好的自动化检验试剂,因此,研发生产质量达到临床要求、实用性强、性价比高,可应用于全自动生化分析仪的多西紫杉醇测定试剂已成为国内外体外诊断试剂行业的热点。

发明内容

[0006] 本发明为了克服现有技术存在的缺陷,采用全新的多西紫杉醇衍生物制备免疫原性强的多西紫杉醇免疫原及其抗体,并提供了一种操作简便、灵敏度高、特异性强的检测试剂。应用均相酶免疫检测技术实现在全自动生化分析仪上对多西紫杉醇的测定,可以高通量、快速化、精确地确定样品中的多西紫杉醇含量,且具有操作简便、灵敏度高、特异性强、结果准确等优点,有效降低多西紫杉醇检测成本,有利于临床的个体化治疗,适合临床广泛推广使用。

[0007] 本发明的一个目的在于提供一种多西紫杉醇衍生物。

[0008] 本发明的另一个目的在于提供一种免疫原性强的多西紫杉醇免疫原。

[0009] 本发明的另一个目的在于提供一种多西紫杉醇免疫原的制备方法。

[0010] 本发明的又一个目的在于提供使用本发明多西紫杉醇免疫原制备得到的特异性强的抗多西紫杉醇特异性抗体。

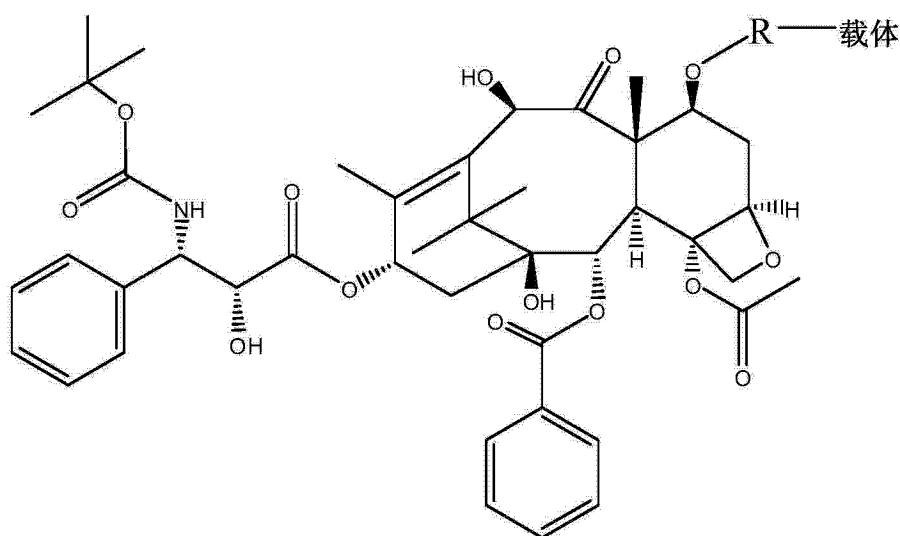
[0011] 本发明的再一个目的在于提供一种多西紫杉醇检测试剂。

[0012] 免疫原性与所合成的多西紫杉醇衍生物分子结构及所选载体种类有关,现有技术中多西紫杉醇免疫原的免疫原性较弱,所得到抗体的特异性、与多西紫杉醇的结合力,敏感度都不如本发明。本发明的多西紫杉醇免疫原,免疫原性高,可以诱导得到高效价的抗多西紫杉醇特异性抗体。该抗体特异性高,与多西紫杉醇的结合力强。由该抗体制备得到的多西紫杉醇检测试剂,可以快速、准确地确定样品中的多西紫杉醇含量。

[0013] 本发明所采取的技术方案如下:

[0014] 一种多西紫杉醇免疫原,其结构式如式(I)所示:

[0015]



式(I)

[0016] 式中, R 为连接基团 $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_n-\text{COO}-$, n 是 1 至 20 之间的整数, 优选 R 为 $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-\text{COO}-$ 。

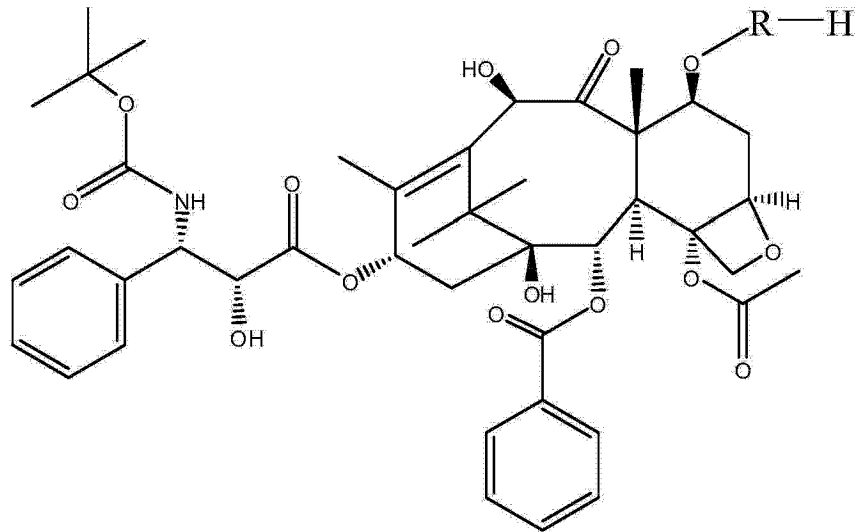
[0017] 载体为具有免疫原性的蛋白质或多肽,优选为血清蛋白、血蓝蛋白和甲状腺球蛋白,更优选为牛血清白蛋白。

[0018] 多西紫杉醇免疫原的合成途径和方法如下:

[0019] 1. 多西紫杉醇衍生物的制备方法:

[0020] 一种多西紫杉醇衍生物,其结构式如式(II)所示:

[0021]



式(II)

[0022] 式中, R 为连接基团 $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_n-\text{COO}-$, n 是 1 至 20 之间的整数。

[0023] (1) 称取 1g 多西紫杉醇、2g 化合物 A 加入反应体系中,然后用 20ml 吡啶或者干燥的苯在连续回流的玻璃烧瓶中进行孵育。

[0024] (2) 将此反应混合物在 70-80°C 的回流温度下持续加热 6 小时,然后将反应混合物缓慢冷却至室温,轻轻倒去多余的吡啶或苯。

[0025] (3) 将剩余的有机成分在负压条件下持续通入氮气流使其蒸发干燥,得到的干燥残留产物即为多西紫杉醇衍生物。

[0026] (4) 将上述得到的产物用蒸馏水配制的 60% 乙醇冲洗 10 次以上,以获得多西紫杉醇半琥珠酸酯(多西紫杉醇衍生物)的重结晶。

[0027] (5) 通过薄层色谱法(TLC)这一标准分析方法对最终产物的产率进行定量分析,在本实验中,最终合成得到的多西紫杉醇半琥珠酸酯残留物通过 TLC 实验显示其相对迁移系数(Rf) 大约为 0.1-0.15,然而作为对照的多西紫杉醇显示出更大的 Rf 值,大约为 0.3-0.4。在本实验的标准合成反应中,终产物多西紫杉醇衍生物的平均产率大约为 95% 或更高。

[0028] 本发明中,多西紫杉醇衍生物的制备过程的步骤(1)中的化合物 A 选用了丁二酸酐为合成原料,故所得的最终产物多西紫杉醇衍生物的链接基团 R 为 $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-\text{COO}-$ 。当 n 取其他值时,选用其他,含有 3-22 个碳原子的烷二酸或相应的酸酐进行实验时,合成方法完全一致。

[0029] 2. 多西紫杉醇免疫原的合成:

[0030] (1) 将载体蛋白 200mg 溶解于 50ml 0.2M, pH 8.5 的磷酸缓冲液中;

[0031] (2) 将如下化学品加入到小烧杯中搅拌溶解:200mg 本发明合成的多西紫杉醇衍

生物、3.5ml 二甲基甲酰胺、3.5ml 乙醇、7.0ml 10mM, pH 5.0 的磷酸钾缓冲液、200mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺、50mg N-羟基琥珀酰亚胺,将这些化学品在室温下搅拌溶解反应 30min;

[0032] (3) 将溶解好的溶液滴加至载体蛋白溶液中,并在 2~8℃下搅拌过夜,得到抗原;将合成好的抗原经过透析进行纯化,得到多西紫杉醇免疫原。

[0033] 本发明中当 n 取 1~20 范围内的其他整数时,用上述方法可以制备出如式(I)所示的多西紫杉醇免疫原。载体仍为具有免疫原性的蛋白质,可以是血清蛋白,血蓝蛋白和甲状腺球蛋白。优选的,载体为血清蛋白。更优选的,载体为牛血清白蛋白。

[0034] 本发明中提供的连接基团 R 为 $-CO-(CH_2)_n-COO-$,由于连接基团主要起小分子衍生物与载体的连接作用,免疫原性强弱与所合成的多西紫杉醇衍生物分子结构及所选载体种类有关,因此 n 取 1 至 20 之间的任意整数时,使用不同 n 值的多西紫杉醇衍生物制备的多西紫杉醇无显著差异,免疫原均具备强免疫原性,都能制备高效价的特异性抗体。

[0035] 本发明的抗多西紫杉醇特异性抗体,由上述的多西紫杉醇免疫原免疫实验动物后产生得到,制备的具体步骤如下:

[0036] (1) 用 PBS 将上述合成的多西紫杉醇免疫原稀释至 1.0mg/ml,得到抗原溶液,然后用 1.0ml 抗原溶液与弗氏完全佐剂混合,对实验动物进行注射。

[0037] (2) 2~3 周后,再用 1.0ml 相同的抗原溶液与弗氏不完全佐剂对上述实验动物注射一次,之后每隔四周注射一次,共计注射 4 次。

[0038] (3) 对上述实验动物取血,分离纯化得到效价为 1:30000-1:50000 的抗多西紫杉醇特异性抗体。

[0039] 本发明的抗多西紫杉醇特异性抗体为完整的抗体分子,也包括保留与多西紫杉醇特异性结合能力的抗体片段或抗体衍生物。本发明的抗体是多克隆抗体也可以是单克隆抗体,优选为多克隆抗体。

[0040] 本发明的抗体为采用单一的多西紫杉醇免疫原对动物加强免疫所获得的多克隆抗体,或者为免疫后经体细胞杂交获得的单克隆抗体;所述的实验动物为兔、山羊、小鼠、绵羊、豚鼠或马的一种,优选为兔。

[0041] 本发明提供一种多西紫杉醇检测试剂,含有上述抗多西紫杉醇特异性抗体和指示试剂。

[0042] 本发明指示试剂选自酶试剂、放射性同位素试剂、荧光试剂、发光试剂。优选的,指示试剂为酶试剂,由多西紫杉醇酶标偶联物和酶底物所组成。

[0043] 上述酶标偶联物为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物;上述酶底物为葡萄糖-6-磷酸。

[0044] 多西紫杉醇均相酶免疫检测试剂在使用之前,为了避免指示试剂中的酶标偶联物和酶的底物发生反应,酶标偶联物和酶的底物是不混合的且分开放置,所以将酶的底物与上述抗多西紫杉醇特异性抗体混合在一起。因此,多西紫杉醇均相酶免疫检测试剂包括两类试剂:

[0045] (1) 试剂 A 由抗多西紫杉醇特异性抗体和均相酶底物混合而成,具体制备步骤如下:

[0046] 1) 将 4.036g(11.25mM) 氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 NAD、1.711g(11.25mM) 葡

葡萄糖-6-磷酸 (G-6-P) 用 1L 55mM、pH = 8.0 的 Tris 缓冲液溶解制成均相酶底物；

[0047] 2) 将制备的抗多西紫杉醇特异性抗体加到上述均相酶底物中, 抗体与均相酶底物的体积比为 1:100 ~ 1:10000；

[0048] (2) 试剂 B 由葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物与 Tris 缓冲液混合而成, 制备方法如下：

[0049] 1) 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G6PDH) 溶液的制备：

[0050] a. 称取 15mg 规格为 100KU 的 G6PDH, 室温溶解于 12mL 含有 72.6mg (0.05M) Tris、8mg $MgCl_2$ (3.3mM) 和 100mg NaCl 的溶液中, 该溶液 pH = 9.0；

[0051] b. 加入 225mg 还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH), 135mg 葡萄糖-6-磷酸 (G-6-P) 以及 0.75mL 卡必醇；

[0052] c. 逐滴加入 2mL 二甲基亚砷；

[0053] 2) 多西紫杉醇衍生物的激活：

[0054] a. 在无水状态下称取 10mg 多西紫杉醇衍生物, 溶解于 600 μ L DMF 中；

[0055] b. 使上述溶液温度降到 -2 ~ -8 $^{\circ}$ C；

[0056] c. 加入 3 μ L 三丁胺；

[0057] d. 加入 1.5 μ L 氯甲酸异丁酯；

[0058] e. -2 ~ -8 $^{\circ}$ C 搅拌 30 分钟；

[0059] 3) G6PDH 与多西紫杉醇衍生物的连接：

[0060] a. 将上述激活的多西紫杉醇衍生物溶液逐滴加入到上述溶解的 G6PDH 溶液中；

[0061] b. 2-8 $^{\circ}$ C 搅拌过夜；

[0062] 4) 纯化产物：通过 G-25 凝胶层析柱纯化连接产物, 获得的最终产物为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物, 于 2-8 $^{\circ}$ C 下储存。

[0063] 5) 将制备的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物加到 120mM、pH = 8.2 的 Tris 缓冲液中, 上述偶联物与 Tris 缓冲液的体积比为 1:100 ~ 1:10000。

[0064] 本发明的多西紫杉醇免疫原特异性强、免疫原性高, 制备出的抗多西紫杉醇特异性抗体特异性强、效价高, 并且与常见的 62 种药物无任何交叉反应；含有上述抗多西紫杉醇特异性抗体的均相酶免疫检测试剂可以方便、快速、准确地确定样品中的多西紫杉醇含量, 并且可以在全自动生化分析仪上同时测定多个样品, 实现多西紫杉醇的高通量快速化测定, 准确度高, 特异性强, 精确度和检测效率相比之前都有了较大的提高, 同时实现了检测过程的全自动化, 对检测人员的要求不高, 易于实现和推广使用。

附图说明

[0065] 图 1 是多西紫杉醇 ELISA 检测反应曲线；

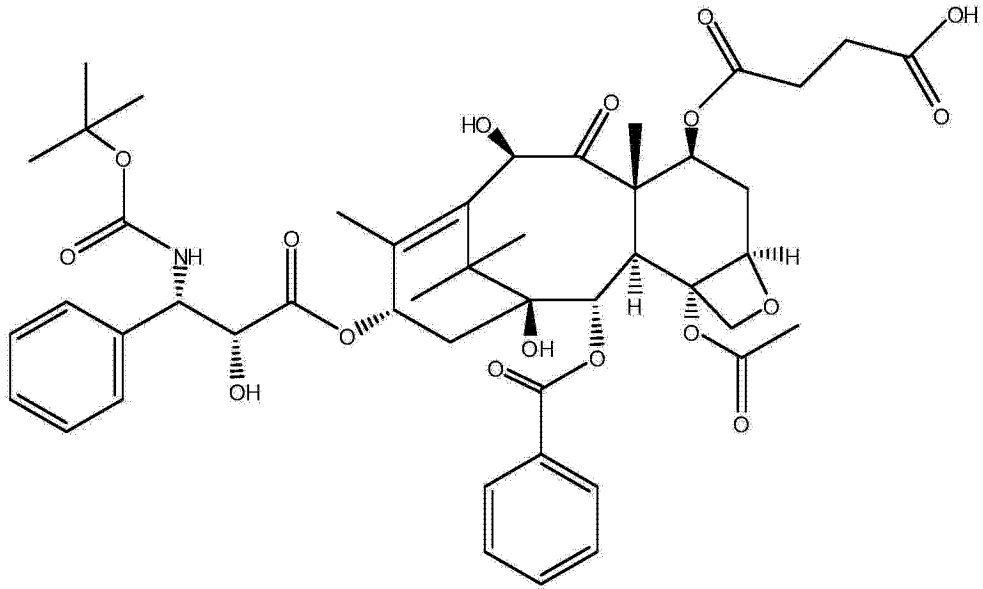
[0066] 图 2 是多西紫杉醇均相酶免疫反应曲线。

具体实施方式

[0067] 实施例一：多西紫杉醇衍生物的合成及其定量检测

[0068] 多西紫杉醇衍生物的化学结构如式 (IV) 所示：

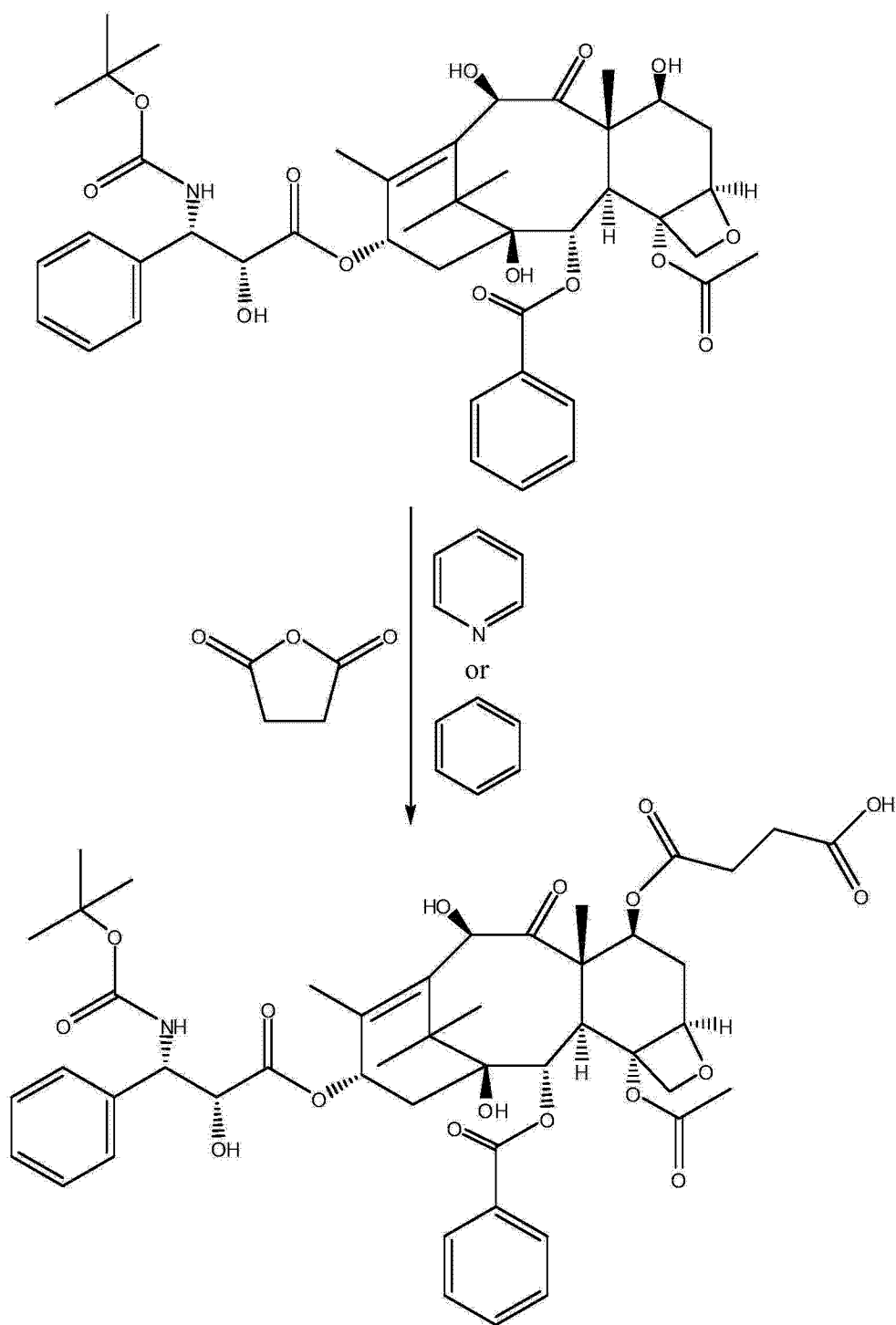
[0069]



式 (IV)

[0070] 上述多西紫杉醇衍生物的合成路线及制备步骤如下：

[0071]



[0072] 1. 称取 1g 多西紫杉醇、2g 丁二酸酐加入反应体系中，然后用 20ml 吡啶或者干燥的苯在连续回流的玻璃烧瓶中进行孵育。

[0073] 2. 将此反应混合物在 70-80℃ 的回流温度下持续加热 6 小时，然后将反应混合物缓慢冷却至室温，轻轻倒去多余的吡啶或苯。

[0074] 3. 将剩余的有机成分在负压条件下持续通入氮气流使其蒸发干燥，得到的干燥残留产物即为多西紫杉醇衍生物。

[0075] 4. 将上述得到的产物用蒸馏水配制的 60% 乙醇冲洗 10 次以上，以获得多西紫杉醇半琥珀酸酯（多西紫杉醇衍生物）的重结晶。

[0076] 5. 通过薄层色谱法 (TLC) 这一标准分析方法对最终产物的产率进行定量分析, 最终合成得到的多西紫杉醇半琥珀酸酯残留物通过 TLC 实验显示其相对迁移系数 (R_f) 为 0.1-0.15, 然而作为对照的多西紫杉醇显示出更大的 R_f 值为 0.3-0.4。在标准合成反应中, 终产物多西紫杉醇衍生物的平均产率大于 95%。

[0077] 实施例二: 多西紫杉醇免疫原的合成

[0078] 多西紫杉醇免疫原由牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA) 与式 (II) 所示的多西紫杉醇衍生物的 $-CO-(CH_2)_n-COO-$ 基团连接而成, 在本实施例中, 以 $n = 2$ 为例详细说明该免疫原的合成方法, 具体步骤如下:

[0079] 1. 将 BSA 200mg 溶解于 50ml 0.2M, pH 8.5 的磷酸缓冲液中;

[0080] 2. 将如下化学品加入到小烧杯中室温下搅拌溶解反应 30min: 200mg 多西紫杉醇衍生物、3.5ml 二甲基甲酰胺、3.5ml 乙醇、7.0ml 10mM, pH 5.0 的磷酸钾缓冲液、200mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺、50mg N-羟基琥珀酰亚胺;

[0081] 3. 将溶解好的溶液滴加至 BSA 溶液中, 并在 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 下搅拌过夜, 得到抗原; 将合成好的抗原经过透析进行纯化, 得到多西紫杉醇免疫原。

[0082] 实施例三: 抗多西紫杉醇特异性抗体的制备

[0083] 将实施例二制备得到的多西紫杉醇免疫原采用常规方法接种实验动物兔, 加强免疫后取抗血清, 具体步骤如下:

[0084] 1. 用 PBS 将合成的多西紫杉醇免疫原稀释至 1.0mg/ml, 得到抗原溶液, 然后用 1.0ml 抗原溶液与弗氏完全佐剂混合, 对实验动物兔进行注射。

[0085] 2. 2~3 周后, 再用 1.0ml 相同的抗原溶液与弗氏不完全佐剂对上述实验动物兔注射一次, 之后每隔四周注射一次, 共计注射 4 次。

[0086] 3. 对步骤 2 的实验动物兔取血, 分离纯化得到效价为 1:30000-1:50000 的抗多西紫杉醇特异性抗体。

[0087] 实施例四: 多西紫杉醇 ELISA 检验

[0088] 采用制得的抗体进行多西紫杉醇的 ELISA 检验, 该检验是利用竞争性免疫分析法来测定液体样本中的多西紫杉醇含量。

[0089] 1. 多西紫杉醇 ELISA 检测标准曲线的建立

[0090] (1) 标准品的制备

[0091] 将多西紫杉醇粉末 (购于 Sigma 公司) 溶解于甲醇溶液, 制备成 1mg/ml 的储存液。用 ELISA 缓冲液将储存液依次稀释为 400.00ng/mL、150.00ng/mL、50.00ng/mL、15.00ng/mL、5.00ng/mL 和 0.00ng/mL 的标准溶液。其中, ELISA 缓冲液含有 50.0mM Tris, 145mM NaCl 和 0.25% 的 BSA。

[0092] (2) 利用多西紫杉醇的 ELISA 检验方法制备标准曲线

[0093] 用 PBS 将实施例三中所制备的抗多西紫杉醇抗体稀释成 1:8000 的终浓度溶液, 100 μL /孔包被在 96 孔酶联板上, 4°C 放置 12-24h; 用 PBS 将上述包被有抗多西紫杉醇抗体的 96 孔酶联板洗涤 3 次后, 加入 200 μL /孔的 0.5% 的 BSA 溶液, 4°C 封闭放置 8-16h。然后用 PBS 洗涤 3 次, 加入 20 μL /孔的标准品。再加入 100 μL /孔工作浓度的 HRP-多西紫杉醇偶联物; 室温下孵育 30min 后 PBS 洗板 5 次; 然后每孔加入 100 μL TMB 底物, 室温孵育 30min。再每孔加入 100 μL 终止液 (2M 硫酸)。测定 450nm 的吸光值。根据各标准品所对

应的 450nm 的吸光值定标,制作标准曲线,结果如附图 1 所示。

[0094] 2. 待测样品中多西紫杉醇含量的检测

[0095] (1) 制作待测样品

[0096] 制备方法:将多西紫杉醇粉末(购于 Sigma 公司)溶解于甲醇溶液制成 1 μ g/mL 的储存液,并将此储存液稀释于空白全血中,至终浓度分别为 0.00, 5.00, 50.00, 300.00ng/mL,形成空白、低、中、高浓度的全血样本。该空白全血为不含多西紫杉醇的健康人血液。

[0097] (2) 测试方法

[0098] 利用上述多西紫杉醇的 ELISA 检验方法,将上述空白、低、中、高浓度的全血样本代替标准品,测试上述空白、低、中、高浓度的全血样本在 450nm 的吸光值。

[0099] (3) 测试结果

[0100] 对照图 1 中所示的多西紫杉醇 ELISA 检验的标准曲线,计算每个样本中多西紫杉醇含量,并对每个样本进行 3 个复孔测定,根据上述样本中多西紫杉醇的实际含量计算回收率,结果如表 1 所示。

[0101] 表 1 多西紫杉醇的 ELISA 检测回收实验

[0102]

血清样品	空白	低	中	高
样品浓度 (ng/mL)	0.00	5.00	50.00	300.00

[0103]

测试 1	0.03	5.13	51.96	303.15
测试 2	0.06	4.92	52.11	297.92
测试 3	0.01	5.14	49.00	305.06
平均值(ng/mL)	0.03	5.06	51.02	302.04
回收率(%)	-	101.2	102.0	100.7

[0104] 由表 1 中结果可知:采用本发明多西紫杉醇 ELISA 检测试剂测定不同浓度样品中的多西紫杉醇回收率都较高,均 > 90%,说明本发明所述的抗多西紫杉醇特异性抗体可以用于样本中多西紫杉醇的检测,并且结果准确度高。

[0105] 实施例五:葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物的制备

[0106] 1. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)溶液的制备:

[0107] (1) 准确称取 15mg 规格为 100KU 的 G6PDH,室温溶解于 12mL 含有 72.6mg(0.05M) Tris、8mg MgCl₂(3.3mM) 和 100mg NaCl 的溶液中,该溶液 pH = 9.0,本步骤在烧杯 C 中进行。

[0108] (2) 在上述烧杯 C 中加入 225mg 还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 NADH, 135mg 葡萄糖-6-磷酸以及 0.75mL 卡必醇。

[0109] (3) 在上述烧杯 C 中再逐滴加入 2mL 二甲基亚砷。

[0110] 2. 多西紫杉醇衍生物的激活:

[0111] (1) 在无水状态下称取 10mg 上述多西紫杉醇衍生物,溶解于 600 μ L DMF 中。

[0112] (2) 使上述溶液温度降到 -2 ~ -8 $^{\circ}$ C。

[0113] (3) 加入 3 μ L 三丁胺。

[0114] (4) 加入 1.5 μ L 氯甲酸异丁酯。

[0115] (5) $-2 \sim -8^{\circ}\text{C}$ 搅拌 30 分钟。

[0116] 3. G6PDH 与多西紫杉醇衍生物的连接：

[0117] (1) 将上述激活的多西紫杉醇衍生物溶液逐滴加入到上述溶解的 G6PDH 溶液中。

[0118] (2) $2-8^{\circ}\text{C}$ 搅拌过夜。

[0119] 4. 纯化产物：

[0120] 通过 G-25 凝胶层析柱纯化步骤 3 中的溶液，获得的最终产物为葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶 - 半抗原偶联物，于 $2-8^{\circ}\text{C}$ 下储存。

[0121] 实施例六：多西紫杉醇均相酶免疫检测试剂的制备

[0122] 1. 试剂 A 的制备：将 4.036g (11.25mM) 氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 NAD、1.711g (11.25mM) 葡萄糖 -6- 磷酸 (G-6-P) 置于烧杯 D 中，用 1L 55mM、 $\text{pH} = 8.0$ 的 Tris 缓冲液溶解制成均相酶底物；将上述制备的抗多西紫杉醇特异性抗体加到上述均相酶底物中，抗体与均相酶底物的体积比为 1:400。

[0123] 2. 试剂 B 的制备：将实施例五制备的葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶 - 半抗原偶联物加到 120mM、 $\text{pH} = 8.2$ 的 Tris 缓冲液中，上述偶联物与 Tris 缓冲液的体积比为 1:1500。

[0124] 实施例七：多西紫杉醇均相酶免疫检验及结果

[0125] 1. 获得标准曲线：

[0126] (1) 设置迈瑞 BS200 全自动生化分析仪反应参数（见表 2）；

[0127] (2) 操作过程为：先加试剂 A，再加入标准品，最后加入试剂 B。加入试剂 B 后，测定不同时间点的 OD_{340} 吸光值，算出不同标准品浓度时的反应速率，实际操作过程中需不断调整试剂 A 和试剂 B 的体积比例，同时调整测光点，最后得出较理想的反应标准曲线图，如图 2 所示。

[0128] 表 2 迈瑞 BS200 全自动生化分析仪反应参数

[0129]

迈瑞 BS-200 参数	
项目名称	多西紫杉醇
试剂 1	150 μ l
试剂 2	150 μ l
样本量	15 μ l
分析方法	2 point rate
主波长	340 nm
次波长	405 nm
反应时间	5 - 15 mins
孵育时间	5 mins
反应方向	上升
结果	$\mu\text{g}/\text{ml}$
结果精度	0.01
定标方法	Logistic-Log 5P
标准品浓度	0.000, 0.312, 0.625, 1.250, 2.500, 5.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$

[0130] 2. 样本检测

[0131] 通过本发明的均相酶免疫检测试剂得到的标准曲线,重复测定低、中、高浓度质控样本 10 次,上述质控样本为:将多西紫杉醇标准品溶解于人血清中,至浓度分别为 0.30, 1.50, 5.00 $\mu\text{g/ml}$ 。检测数据及数据分析见表 3。

[0132] 表 3 样品测定及精密度和回收率评估

[0133]

血液样品	低	中	高
样品浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	0.30	1.50	5.00
1	0.29	1.55	4.90
2	0.29	1.44	5.41
3	0.28	1.57	5.16
4	0.32	1.46	4.78
5	0.31	1.52	5.07
6	0.29	1.52	4.82
7	0.30	1.55	5.25
8	0.31	1.49	4.90
9	0.30	1.59	5.03
10	0.31	1.44	4.61
平均值 ($\mu\text{g/ml}$)	0.30	1.51	4.99
标准差 (SD)	0.0125	0.0538	0.2391
精密度 (CV%)	4.17	3.56	4.79
回收率%	100.0	100.7	99.8

[0134] 检测结果:本发明的均相酶免疫检测试剂测定的准确度高,回收率达到 95% -105%,精密度高, CV 均低于 5%。

[0135] 实施例八:药物干扰试验

[0136] 选取 62 种常见药物进行干扰检测,调整浓度至 10.0 $\mu\text{g/ml}$,采用实施例七的均相酶免疫方法进行测定:

[0137] 1. 将待测干扰药物与实施例六制备的试剂 A 接触反应,再加入试剂 B;

[0138] 2. 检测上述混合溶液的 OD_{340} 吸光值,根据实施例七的标准曲线得到相应物质的

浓度。

[0139] 常见的 62 种药物名称以及测定结果具体参见表 4。

[0140] 表 4 常见干扰药物测定结果

[0141]

ID#	化合物名称	等价于多西紫杉醇的浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	ID#	化合物名称	等价于多西紫杉醇的浓度 ($\mu\text{g/ml}$)
1	阿司匹林	0.0	32	苯丙醇胺	0.0

[0142]

ID#	化合物名称	等价于多西紫杉醇的浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	ID#	化合物名称	等价于多西紫杉醇的浓度 ($\mu\text{g/ml}$)
2	β -苯基乙胺	0.0	33	普鲁卡因酰胺	0.0
3	安非他命	0.0	34	普鲁卡因	0.0
4	氟苯青霉素	0.0	35	奎尼丁	0.0
5	甲氨二氮卓	0.0	36	佐美酸	0.0
6	氯丙嗪	0.0	37	苯肾上腺素	0.0
7	氯拉卓酸	0.0	38	桂皮酰艾克宁	0.0
8	二甲苯氧庚酸	0.0	39	芽子碱	0.0
9	非诺洛芬	0.0	40	地西洋	0.0
10	甲基苯丙胺	0.0	41	可替宁	0.0
11	龙胆酸	0.0	42	阿替洛尔	0.0
12	吉非贝齐	0.0	43	心得安	0.0
13	氢可酮	0.0	44	苯乙哌啶酮	0.0
14	布洛芬	0.0	45	苯基丁氮酮	0.0
15	丙咪嗪	0.0	46	麦角酸二乙基酰胺	0.0
16	二氨基二苯砜	0.0	47	大麻酚	0.0
17	萘普生	0.0	48	洛哌丁胺	0.0
18	氢氯噻嗪	0.0	49	异克舒令	0.0
19	哌替啶	0.0	50	苯基丙氨酸	0.0
20	烯丙羟吗啡酮	0.0	51	盐酸氟西汀	0.0
21	麻黄素	0.0	52	柳丁氨醇	0.0
22	烟酰胺	0.0	53	青霉素	0.0
23	甲胺咪硫	0.0	54	甲基二乙醇胺	0.0
24	异戊巴比妥	0.0	55	二亚甲基双氧苯丙胺	0.0
25	甲撑二氧苯丙胺	0.0	56	琥珀酸多西拉敏	0.0

[0143]

ID#	化合物名称	等价于多西紫杉醇的浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	ID#	化合物名称	等价于多西紫杉醇的浓度 ($\mu\text{g/ml}$)
26	四氢大麻酚	0.0	57	纳布啡	0.0
27	制霉菌素	0.0	58	去甲吗啡	0.0
28	乙酰吗啡	0.0	59	羟考酮	0.0
29	苯非他明	0.0	60	克他命	0.0
30	异丙嗪	0.0	61	苯海拉明	0.0
31	阿司帕坦	0.0	62	苯丁胺	0.0

[0144] 表 4 的检测结果显示, 62 种常见药物等价于多西紫杉醇的浓度均小于 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 。可见, 本发明的抗体是抗多西紫杉醇的特异性抗体, 与其它药物无交叉反应。

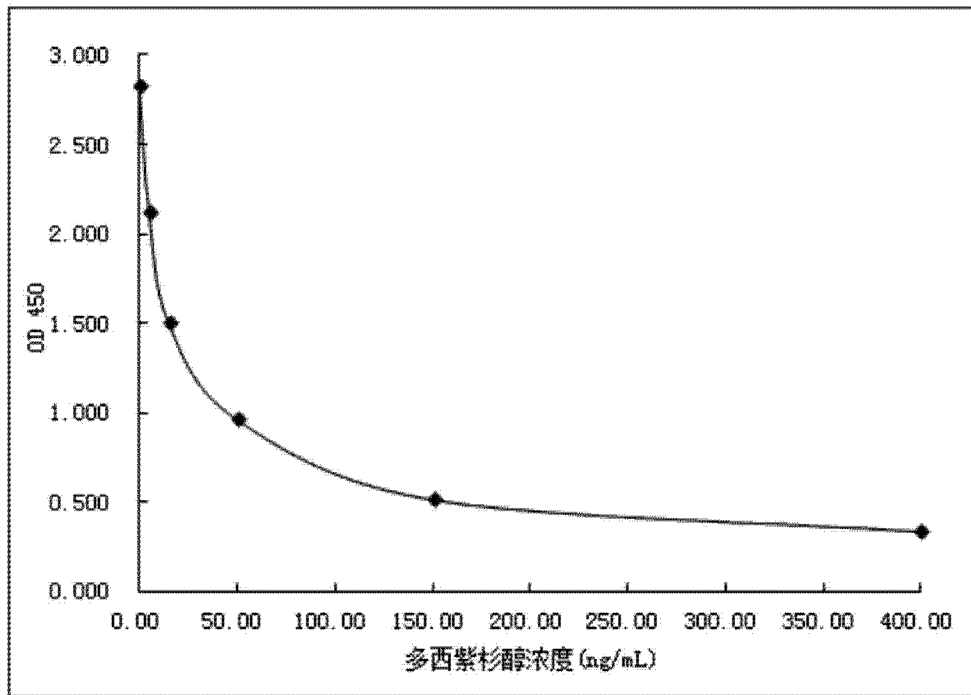


图 1

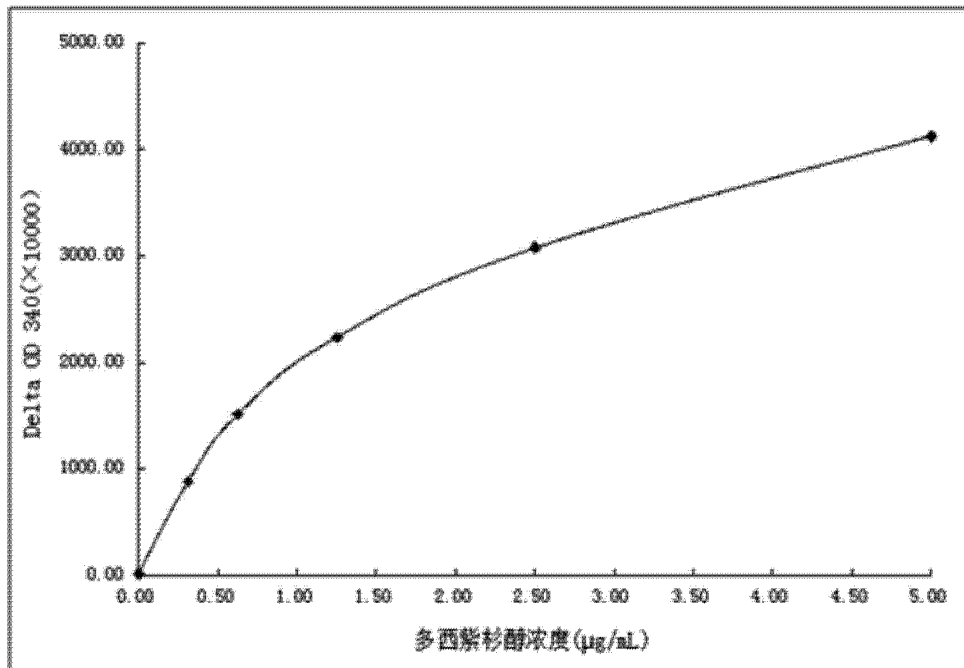
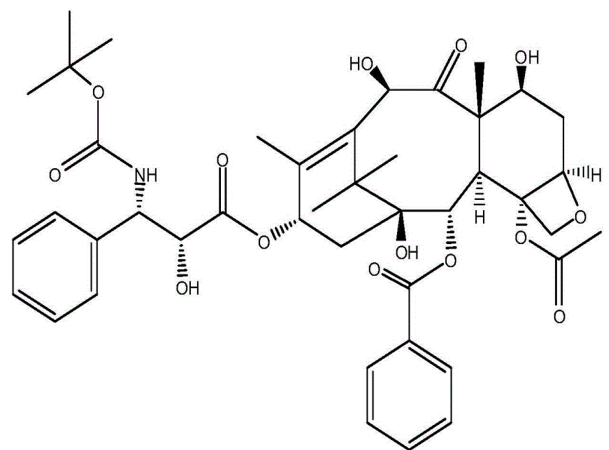


图 2

专利名称(译)	多西紫杉醇免疫原、抗多西紫杉醇特异性抗体和多西紫杉醇检测试剂		
公开(公告)号	CN104447984A	公开(公告)日	2015-03-25
申请号	CN201410799413.0	申请日	2014-12-20
[标]申请(专利权)人(译)	苏州博源医疗科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州博源医疗科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州博源医疗科技有限公司		
[标]发明人	虞留明 涂建成 卢忠心 王英 徐琦璿		
发明人	虞留明 涂建成 卢忠心 王英 徐琦璿		
IPC分类号	C07K14/765 C07K14/795 C07K14/47 C07K11/107 C07K16/44 C07K16/06 G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	C07K11/1077 C07K14/47 C07K14/765 C07K14/795 C07K16/06 C07K16/44 C07K19/00 G01N33/531 G01N33/68 G01N33/94		
其他公开文献	CN104447984B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种多西紫杉醇免疫原及其合成方法，以及由该免疫原获得的抗多西紫杉醇抗体、检测试剂及其制备方法。本发明的多西紫杉醇免疫原由全新的多西紫杉醇衍生物合成，具有免疫原性高的优点，并且可以诱导得到特异性高和结合力强的抗多西紫杉醇特异性抗体，并且与常见的62种药物无任何交叉反应。由该抗体制备的多西紫杉醇检测试剂，可以方便、精确地确定样品中的多西紫杉醇含量，有利于临床的个体化治疗。与现有技术方法相比，本发明的检测试剂可以实现在全自动生化分析仪上的高通量、快速化检测，且具有操作简便、灵敏度高、特异性强、结果准确等优点，还能有效降低多西紫杉醇检测成本，适合临床大规模推广使用。



式 (III)