



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104447984 B

(45)授权公告日 2019.02.26

(21)申请号 201410799413.0

C07K 16/44(2006.01)

(22)申请日 2014.12.20

C07K 16/06(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

G01N 33/543(2006.01)

申请公布号 CN 104447984 A

G01N 33/531(2006.01)

(43)申请公布日 2015.03.25

(56)对比文件

(73)专利权人 苏州博源医疗科技有限公司

CN 101019024 A,2007.08.15,

地址 215163 江苏省苏州市高新区锦峰路8号

CN 101019024 A,2007.08.15,

CN 102768284 A,2012.11.07,

(72)发明人 虞留明 涂建成 卢忠心 王英
徐琦璠

Guo Y等.Immunological detection and quantitation of 10-Deacetylbaccatin III in Taxus sp. plant and tissue cultures.《Biol Chem Hoppe Seyler》.1994,第375卷(第4期),281-287.

(51)Int.Cl.

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

C07K 14/47(2006.01)

C07K 1/107(2006.01)

审查员 刘树柏

权利要求书2页 说明书13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1:400;

(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1:1500;

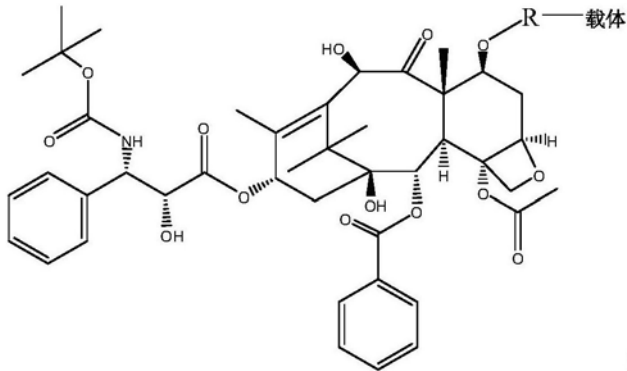
所述的抗多西紫杉醇特异性抗体的制备方法,包含以下步骤:

(I) 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,对实验动物兔进行注射;

(II) 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;

(III) 对步骤(II)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;

所述的多西紫杉醇免疫原,其结构式如式(I)所示:



式中,R为 $-CO-(CH_2)_2-COO-$,载体为具有免疫原性的牛血清白蛋白;所述的多西紫杉醇酶标偶联物为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物。

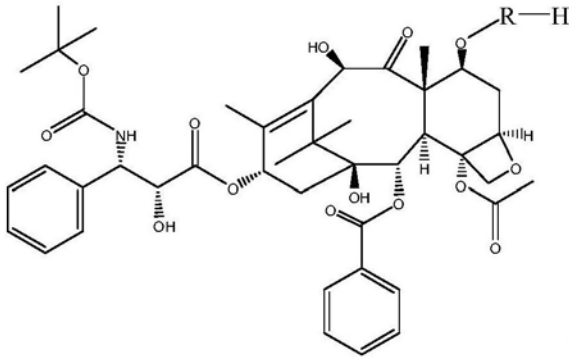
2. 根据权利要求1所述的多西紫杉醇检测试剂的制备方法,其特征在于,所述的多西紫杉醇免疫原的合成方法,包含以下步骤:

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2~8℃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;

其中,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 $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-\text{COO}-$,

所述的多西紫杉醇衍生物由以下步骤合成:

(a) 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;

(b) 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;

(c) 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;

(d) 将步骤(c)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为丁二酸酐。

3. 根据权利要求1所述的多西紫杉醇检测试剂的制备方法,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:

(A) 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 MgCl_2 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;

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

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

(D) 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℃下储存。

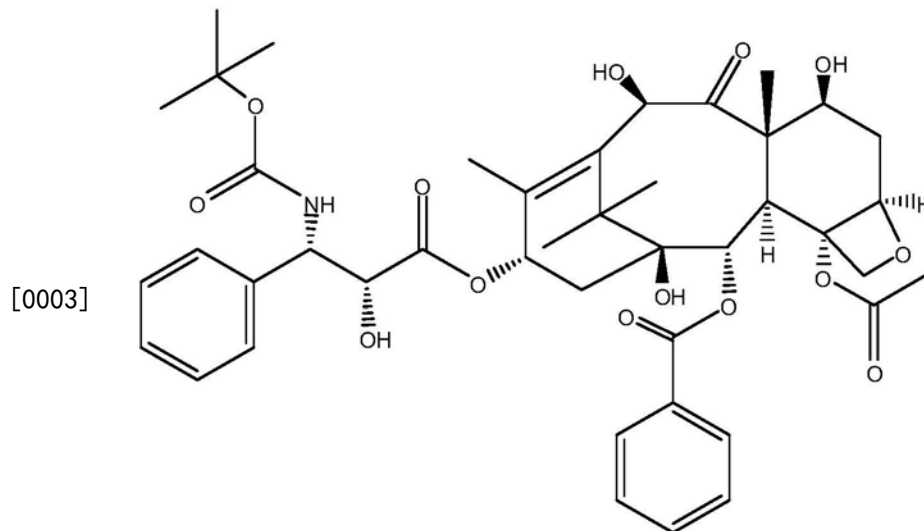
多西紫杉醇免疫原、抗多西紫杉醇特异性抗体和多西紫杉醇检测试剂

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:



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。

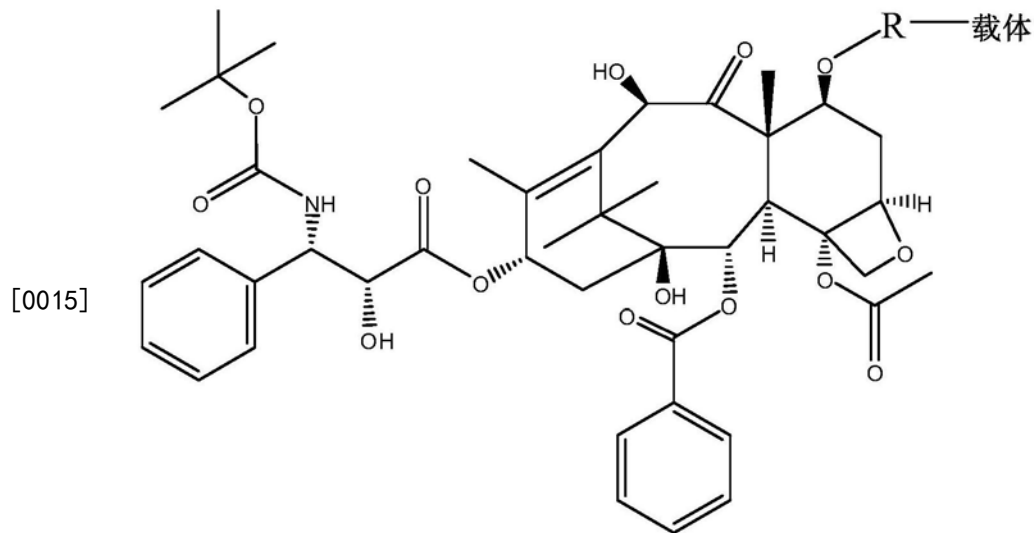
[0010] 本发明的又一个目的在于提供使用本发明多西紫杉醇免疫原制备得到的特异性强的抗多西紫杉醇特异性抗体。

[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:



式(I)

[0016] 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 $-CO-(CH_2)_2-COO-$ 。

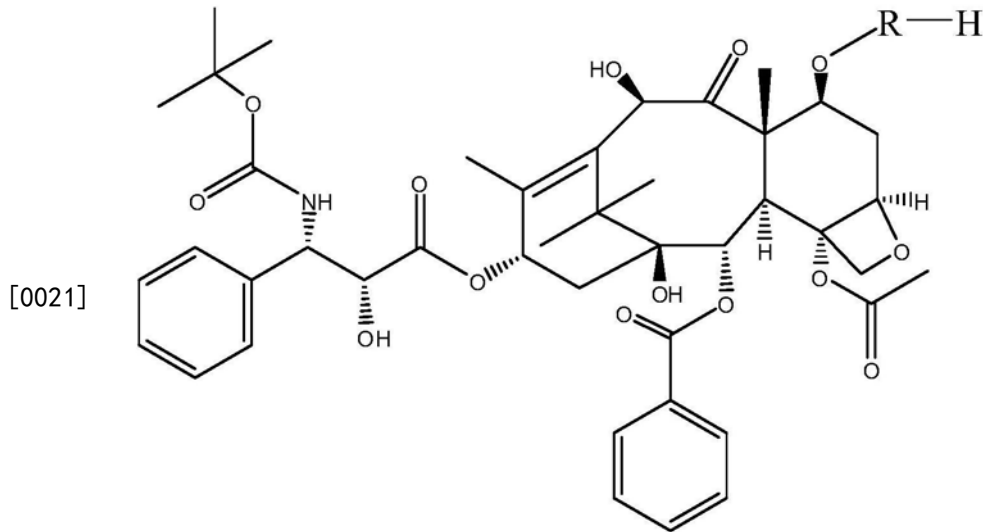
[0017] 载体为具有免疫原性的蛋白质或多肽,优选为血清蛋白、血蓝蛋白和甲状腺球蛋白。

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:



式(II)

[0022] 式中,R为连接基团 $-CO-(CH_2)_n-COO-$,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珀酸酯(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珀酸酯残留物通过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 $-CO-(CH_2)_2-COO-$ 。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-(CH₂)_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

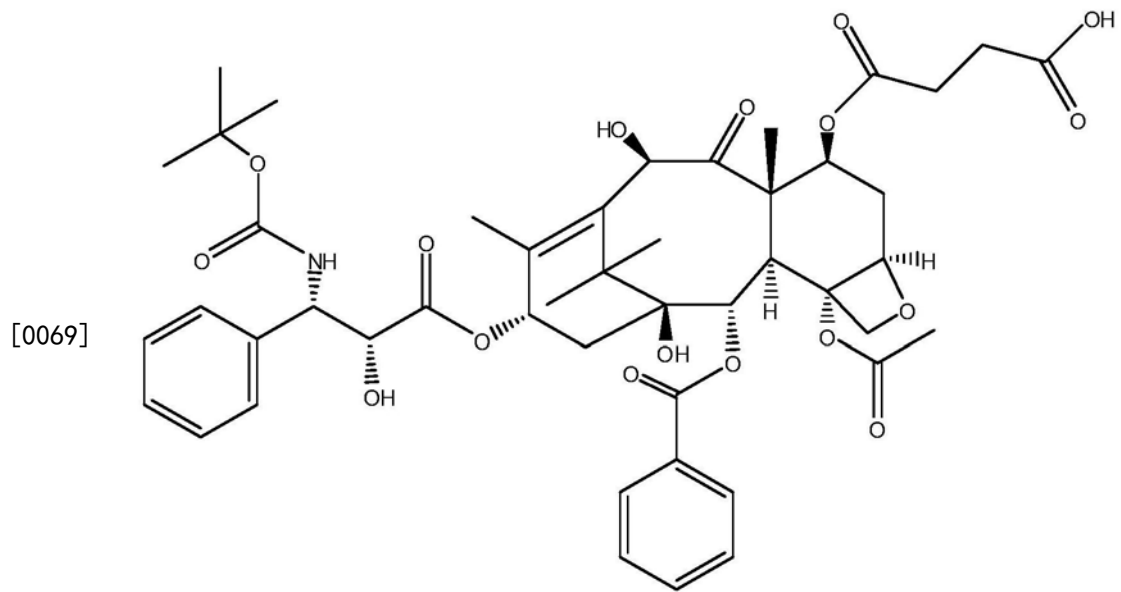
[0065] 图1是多西紫杉醇ELISA检测反应曲线;

[0066] 图2是多西紫杉醇均相酶免疫反应曲线。

具体实施方式

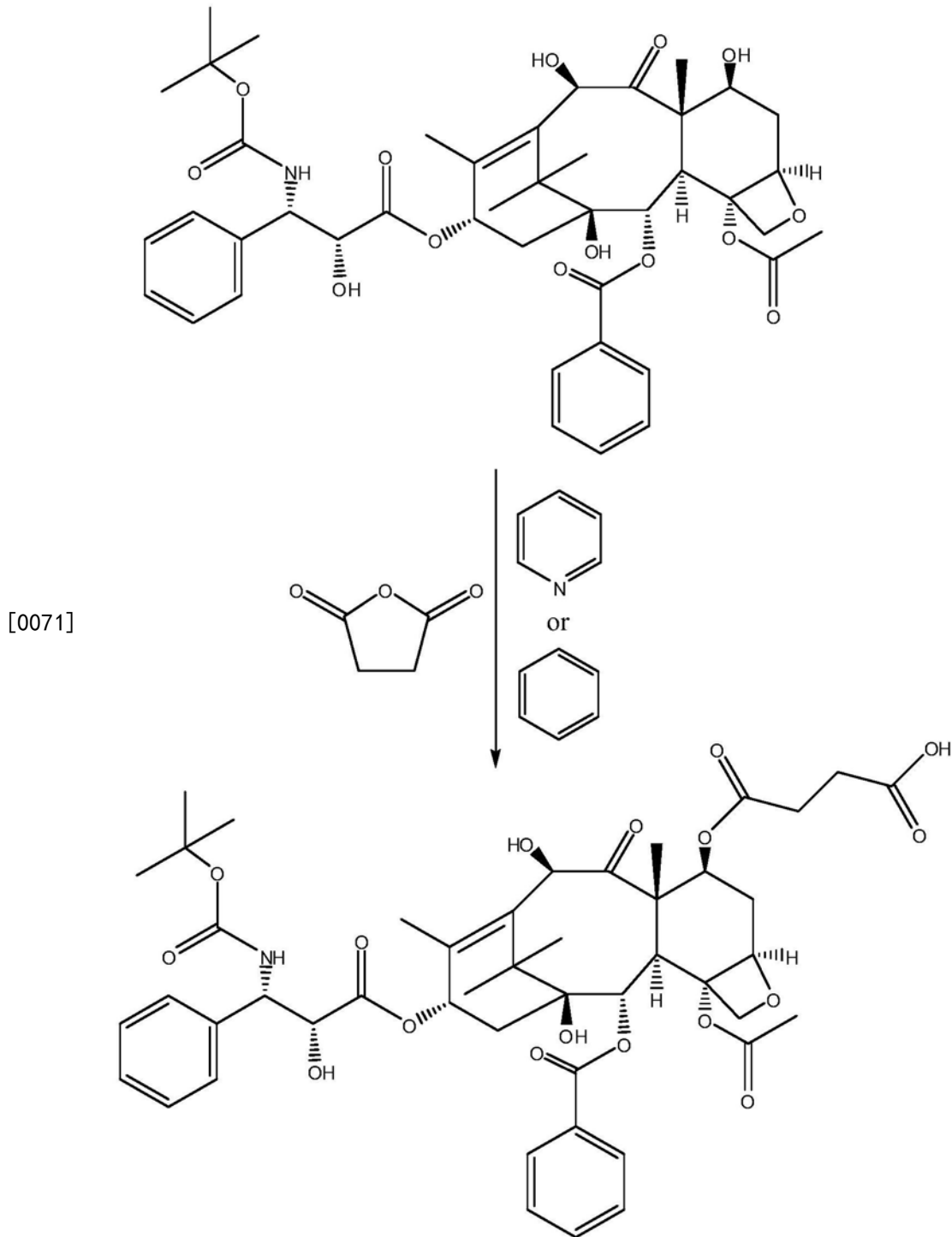
[0067] 实施例一:多西紫杉醇衍生物的合成及其定量检测

[0068] 多西紫杉醇衍生物的化学结构如式 (IV) 所示:



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：



[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珠酸脂(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(Rf)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-(CH₂)_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2~8℃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。

[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,100μL/孔包被在96孔酶联板上,4℃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200μL/孔的0.5%的BSA溶液,4℃封闭放置8-16h。然后用PBS洗涤3次,加入20μL/孔的标准品。再加入100μL/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100μL TMB底物,室温孵育30min。再每孔加入100μL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
	测试 1	0.03	5.13	51.96	303.15
	测试 2	0.06	4.92	52.11	297.92
[0103]	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~-8 $^{\circ}$ 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℃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℃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、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、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OD₃₄₀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

迈瑞 BS-200 参数	
项目名称	多西紫杉醇
试剂 1	150 μl
试剂 2	150 μl
样本量	15 μl
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	μg/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 μg/mL

[0129] 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OD₃₄₀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	氨基青霉素	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	二氨基二苯砒	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	甲胺呋硫	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

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

[0143] 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。

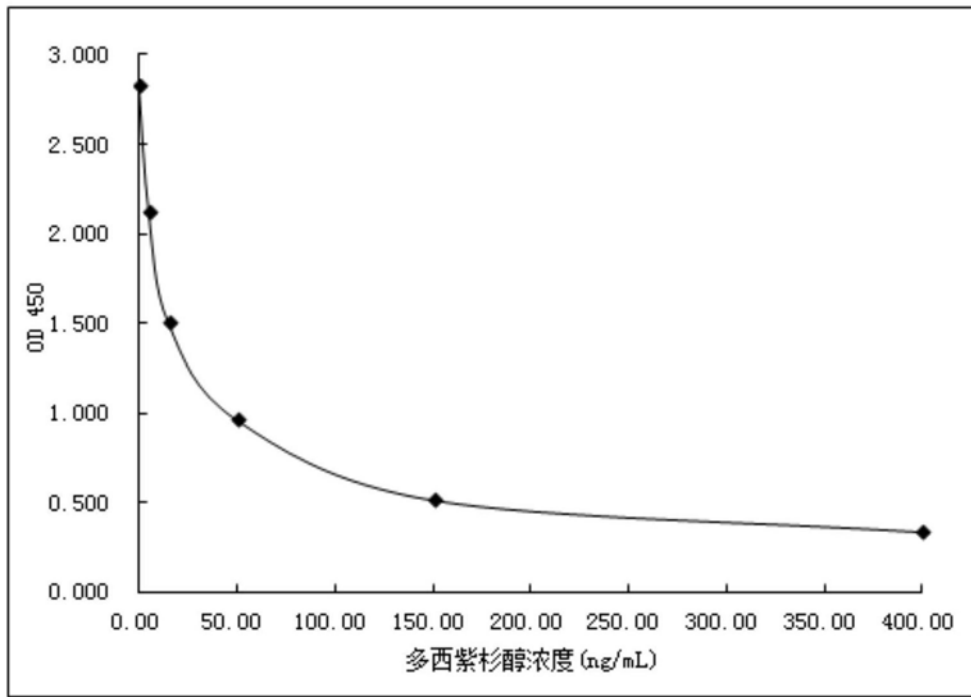


图1

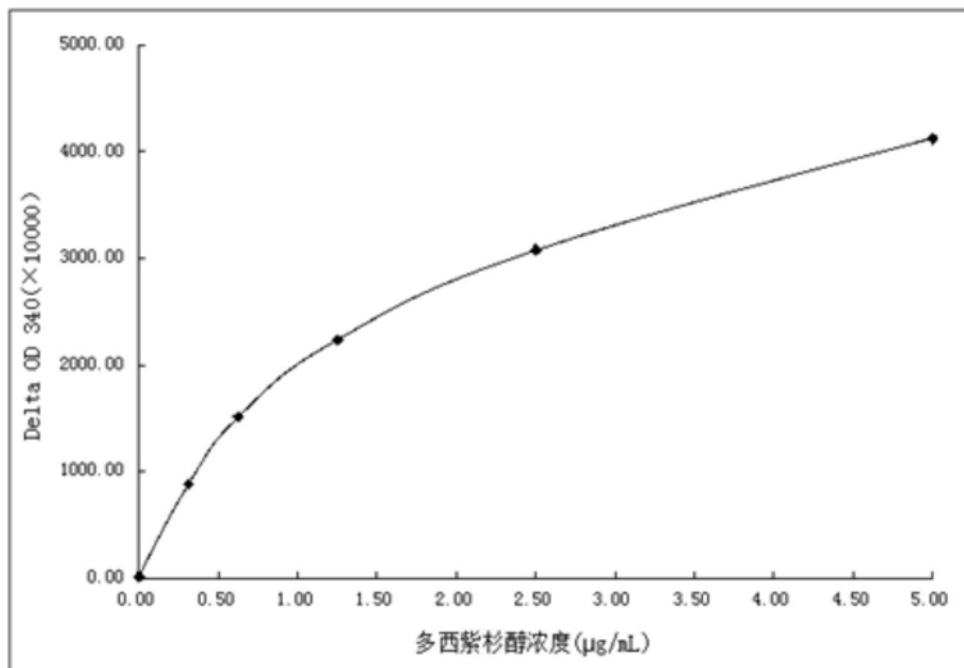
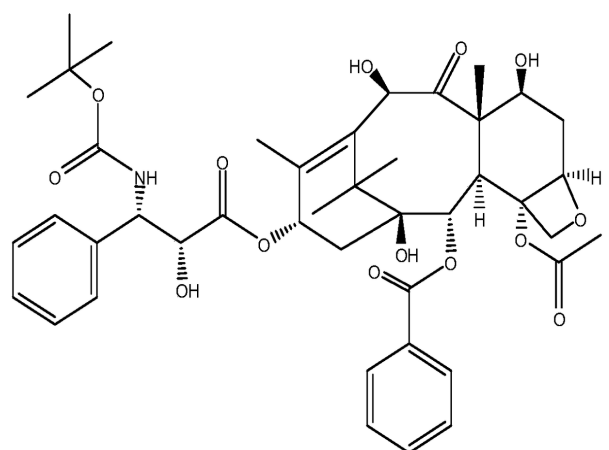


图2

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	CN104447984B	公开(公告)日	2019-02-26
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 C07K1/107 C07K16/44 C07K16/06 G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	C07K1/1077 C07K14/47 C07K14/765 C07K14/795 C07K16/06 C07K16/44 C07K19/00 G01N33/531 G01N33/68 G01N33/94		
审查员(译)	刘树柏		
其他公开文献	CN104447984A		
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)