



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105504047 A

(43) 申请公布日 2016. 04. 20

(21) 申请号 201610087472. 4

C07K 16/44(2006. 01)

(22) 申请日 2016. 02. 16

C07K 16/06(2006. 01)

(71) 申请人 苏州博源医疗科技有限公司

G01N 33/543(2006. 01)

地址 215163 江苏省苏州市高新区锦峰路 8 号

G01N 33/535(2006. 01)

(72) 发明人 虞留明 储小曼

(74) 专利代理机构 南京纵横知识产权代理有限公司 32224

代理人 薛海霞 董建林

(51) Int. Cl.

C07K 14/765(2006. 01)

C07K 14/795(2006. 01)

C07K 14/47(2006. 01)

C07K 1/107(2006. 01)

C07D 305/14(2006. 01)

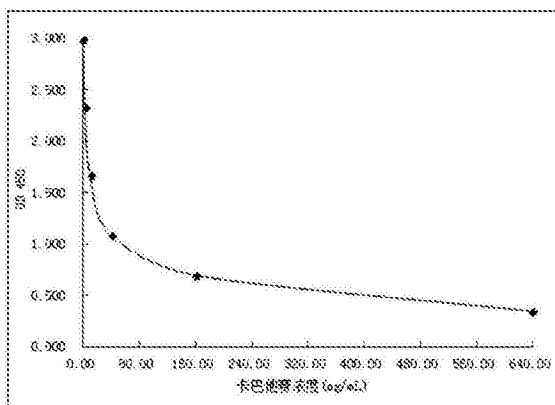
权利要求书4页 说明书14页 附图1页

(54) 发明名称

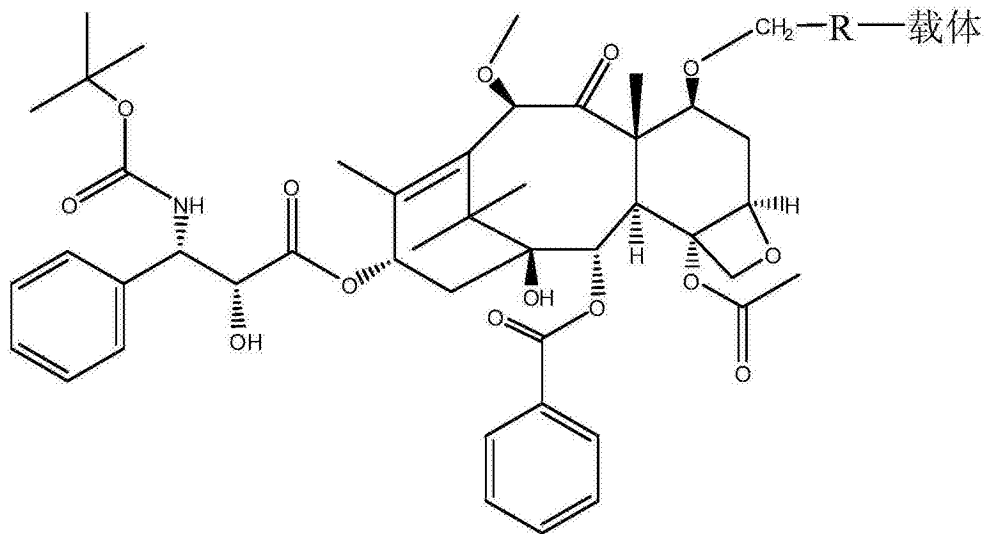
卡巴他赛免疫原、特异性抗体和检测试剂及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种卡巴他赛免疫原、特异性抗体和检测试剂及其制备方法,属于生物检测领域。本发明的卡巴他赛免疫原由全新的卡巴他赛衍生物合成,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卡巴他赛特异性抗体,并且与常见的 62 种药物无任何交叉反应。由该抗体制备的卡巴他赛检测试剂,可以方便、精确地确定样品中的卡巴他赛含量,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,还能有效降低卡巴他赛检测成本,适合临床大规模推广使用。



1. 一种卡巴他赛免疫原,其结构式如式(I)所示:



式 (I)

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

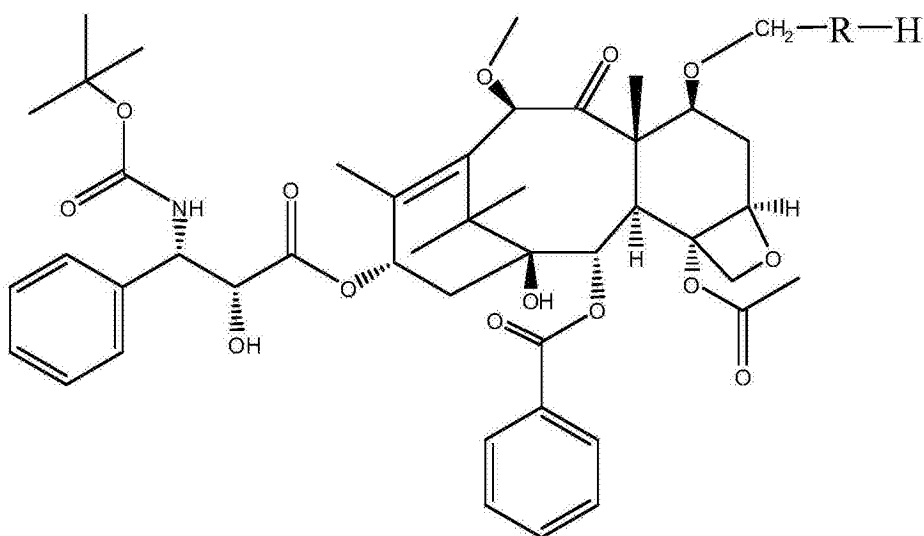
2. 权利要求1所述的卡巴他赛免疫原的合成方法,其特征在于,包含以下步骤:

(1)将载体蛋白100~300mg溶解于25~75ml 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20~60min:100~300mg卡巴他赛衍生物、1.5~6ml二甲基甲酰胺、1.5~6ml乙醇、3.5~10.0ml 10mM,pH 5.0的磷酸钾缓冲液、100~300mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺、25~75mg 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,得到卡巴他赛免疫原;

步骤(2)中,卡巴他赛衍生物结构式如式(II)所示:



式 (II)

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

3. 卡巴他赛衍生物的合成方法, 其特征在于, 具体步骤为:

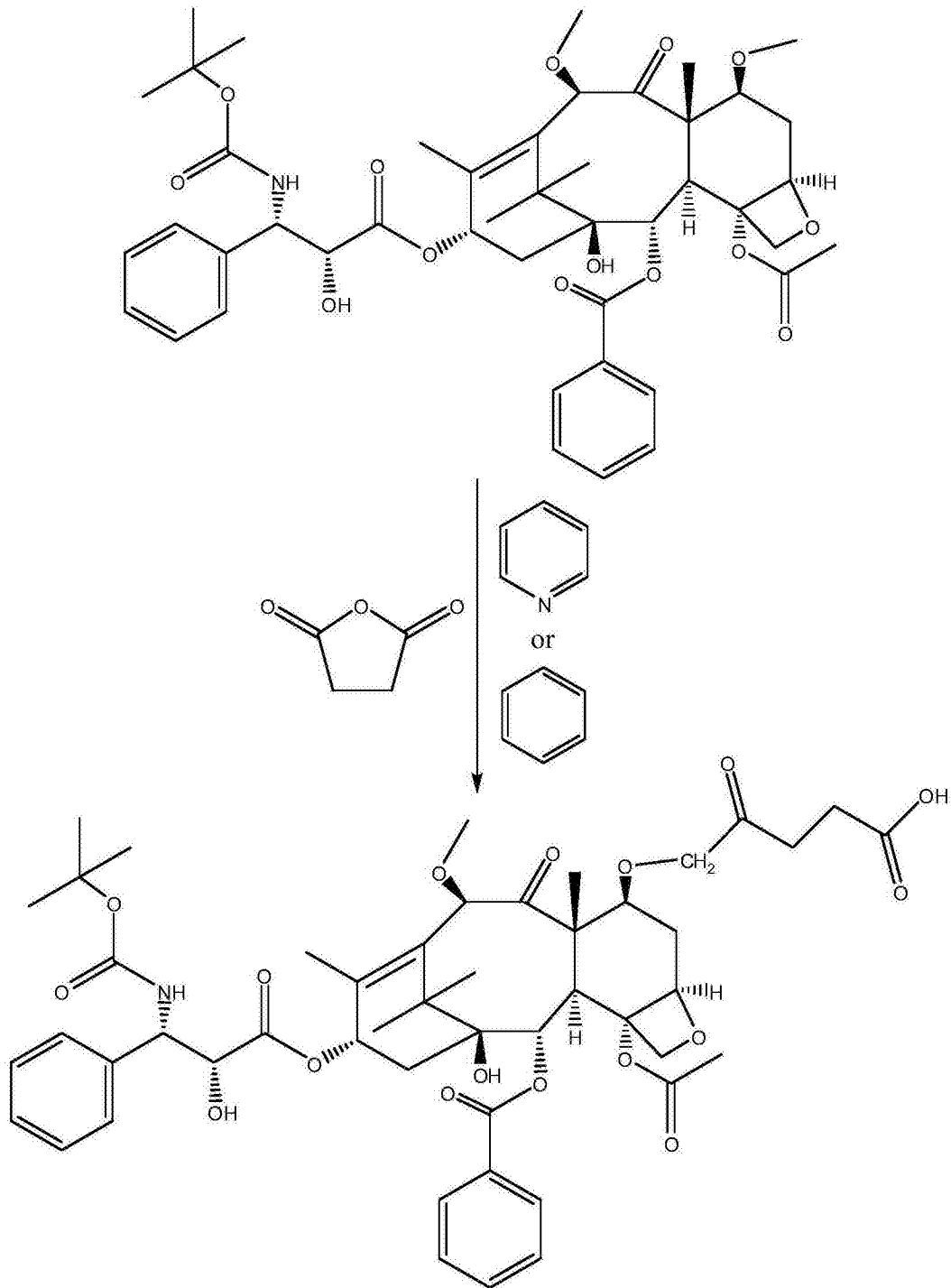
(1) 称取0.5~2.0g卡巴他赛、1.0~4.0g化合物A加入反应体系中, 然后用10~40ml吡啶或者干燥的苯在连续回流的玻璃烧瓶中进行孵育; 所述化合物A为有3-22个碳原子的烷二酸或相应的酸酐;

(2) 将此反应混合物在70-80°C的回流温度下持续加热3~12小时, 然后将反应混合物缓慢冷却至室温, 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, 得到的干燥残留产物即为卡巴他赛衍生物;

(4) 将上述得到的卡巴他赛衍生物用蒸馏水配制的60%乙醇冲洗多次, 以获得卡巴他赛半琥珀酸脂的重结晶。

4. 根据权利要求3所述的卡巴他赛衍生物的合成方法, 其特征在于, 当 $n=2$ 时, 合成路线为:



5. 一种抗卡巴他赛特异性抗体,其特征在于,为由权利要求1所述的卡巴他赛免疫原免疫实验动物后产生得到的完整抗体分子,或者为保留与卡巴他赛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所述的一种抗卡巴他赛特异性抗体,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,为采用单一的卡巴他赛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。

7. 一种抗卡巴他赛特异性抗体的制备方法,其特征在于,包含以下步骤:

(1)用PBS将权利要求1所述的卡巴他赛免疫原稀释至1.0mg/ml,得到抗原溶液,然后用0.5~2.0ml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0.5~2.0ml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3~6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的抗卡巴他赛特异性抗体。

8.一种卡巴他赛检测试剂,含有权利要求5或6所述的抗卡巴他赛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;所述的酶试剂由卡巴他赛酶标偶联物和酶底物所组成,卡巴他赛酶标偶联物为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物,酶底物为葡萄糖-6-磷酸;所述半抗原为卡巴他赛衍生物。

9.权利要求8所述的卡巴他赛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2.0~6.0g氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和1.0~3.0g葡萄糖-6-磷酸用0.5~2L 55mM、pH=8.0的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物;将权利要求5或6所述的抗卡巴他赛特异性抗体加到上述均相酶底物中,抗卡巴他赛特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:100~1:10000;

(2)试剂B:将卡巴他赛酶标偶联物加到0.5~2L 120mM、pH=8.2的Tris缓冲液中,卡巴他赛酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:100~1:10000。

10.根据权利要求9所述的卡巴他赛检测试剂的制备方法,其特征在于所述的卡巴他赛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5~25mg规格为100KU的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,室温溶解于6~20mL含有72.6mg 0.05M Tris、8mg 3.3mM MgCl<sub>2</sub>和100mg NaCl的溶液中,pH=9.0;在溶液中加入150~500mg还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、75~250mg葡萄糖-6-磷酸以及0.25~1.50mL卡必醇;再逐滴加入1~4mL二甲基亚砷;

(2)卡巴他赛衍生物的激活:在无水状态下称取5~20mg卡巴他赛衍生物,溶解于300~1000μL二甲基甲酰胺中;使上述溶液温度降到-2~-8℃;加入1.5~6μL三丁胺;加入0.5~3μL氯甲酸异丁酯;-2~-8℃搅拌15~60分钟;

(3)葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与卡巴他赛衍生物的连接:将步骤(2)激活的卡巴他赛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℃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℃下储存。

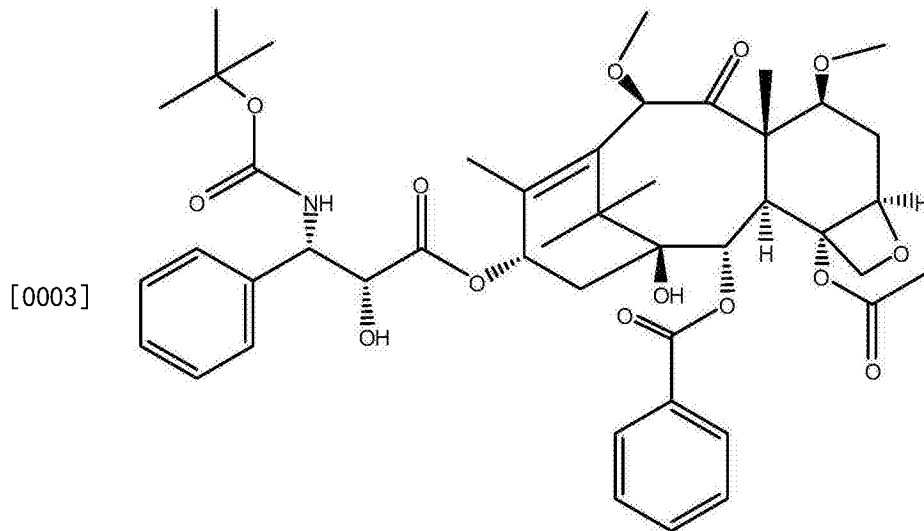
## 卡巴他赛免疫原、特异性抗体和检测试剂及其制备方法

## 技术领域

[0001] 本发明属于生物检测领域,涉及卡巴他赛免疫原、特异性抗体和检测试剂及其制备方法。

## 背景技术

[0002] 卡巴他赛(Cabazitaxel)结构式如式(III)所示:



式(III)

[0004] 卡巴他赛,别名:7 $\beta$ ,10 $\beta$ -二甲氧基多西紫杉醇,化学名:(2 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\beta$ ,10 $\beta$ ,13 $\alpha$ )-4-乙酰氧基-13-[[[(2R,3S)-3-[(叔丁氧羰基)氨基]-2-羟基-3-苯丙酰基]氧基]-1-羟基-7,10-二甲氧基-9-氧代紫杉-5,20-环氧基-11-烯-2-苯甲酸酯,是一种化学半合成紫杉烷类小分子抗肿瘤药物,通过从红豆杉中萃取的前体化合物半合成而来。卡巴他赛是多西紫杉醇的二甲氧基衍生物,通过对后者两个羟基的甲氧基化,消除了其对多药耐药基因MDR1编码的P-糖蛋白(P-gp)的亲合力,而该蛋白介导的多药耐药被认为是肿瘤细胞抵抗传统紫杉烷类化疗药物的经典机制。作为一种微管抑制剂,卡巴他赛通过与微管蛋白结合,在促进微管二聚体装配成微管的同时阻止微管的去多聚化过程,从而抑制微管分解,增加微管的稳定性,进而抑制肿瘤细胞的有丝分裂,将肿瘤细胞阻滞于G2/M期,并促进其凋亡,最终抑制肿瘤组织的增殖。临床上本品通常与泼尼松联用,用于晚期转移性前列腺癌患者的化疗。卡巴他赛的血药浓度与治疗效果之间有着密切关系,低于有效血药浓度达不到治疗效果,高于有效血药浓度会导致严重的毒副作用。因此,快速、准确、高通量、低成本的测定卡巴他赛在肿瘤患者体内的血药浓度,对于降低毒副作用和提高患者生存率都具有重要意义。

[0005] 目前,国内外监测卡巴他赛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。目前市场上缺乏稳定性好、灵敏度高、特异性强的卡巴他赛检测试剂,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卡巴他赛测定试

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,采用卡巴他赛衍生物制备免疫原性强的卡巴他赛免疫原及其抗体,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卡巴他赛的测定,可以高通量、快速化、精确地确定样品中的卡巴他赛含量,且具有操作简便、灵敏度高、特异性强、结果准确等优点,有效降低卡巴他赛检测成本,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卡巴他赛衍生物的合成方法。

[0008] 本发明的另一个目的在于提供一种免疫原性强的卡巴他赛免疫原。

[0009] 本发明的另一个目的在于提供一种卡巴他赛免疫原的制备方法。

[0010] 本发明的另一个目的在于提供使用本发明卡巴他赛免疫原制备得到的特异性强的抗卡巴他赛特异性抗体。

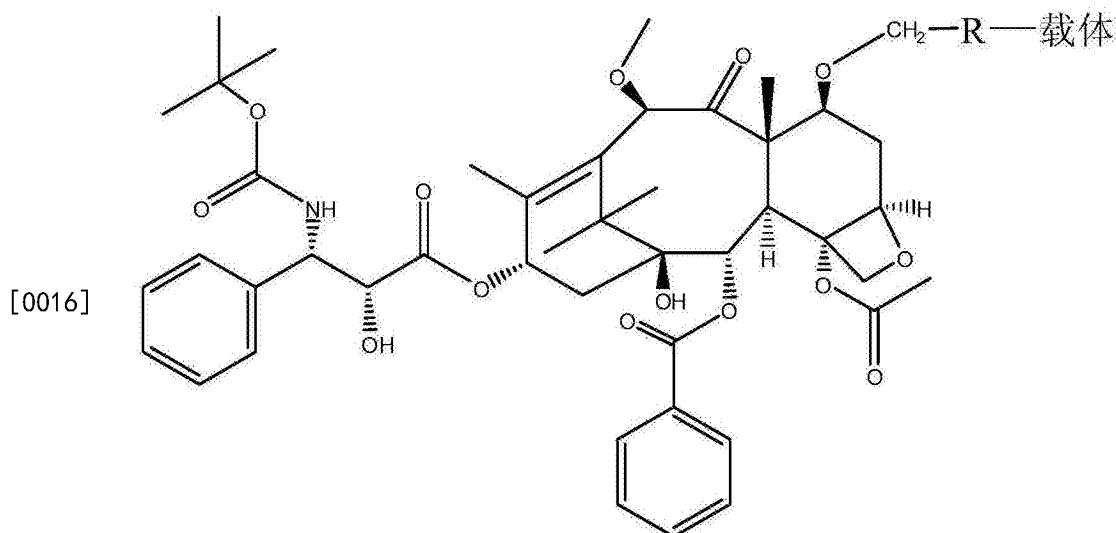
[0011] 本发明的又一个目的在于提供一种卡巴他赛检测试剂。

[0012] 本发明的再一个目的是提供卡巴他赛检测试剂的制备方法。

[0013] 免疫原性与所合成的卡巴他赛衍生物分子结构及所选载体种类有关,现有技术中卡巴他赛免疫原的免疫原性较弱,所得到抗体的特异性、与卡巴他赛的结合力,敏感度都不如本发明。本发明的卡巴他赛免疫原,免疫原性高,可以诱导得到高效价的抗卡巴他赛特异性抗体。该抗体特异性高,与卡巴他赛的结合力强。由该抗体制备得到的卡巴他赛检测试剂,可以快速、准确地确定样品中的卡巴他赛含量。

[0014] 本发明所采取的技术方案如下:

[0015] 一种卡巴他赛免疫原,其结构式如式(I)所示:



式(I)

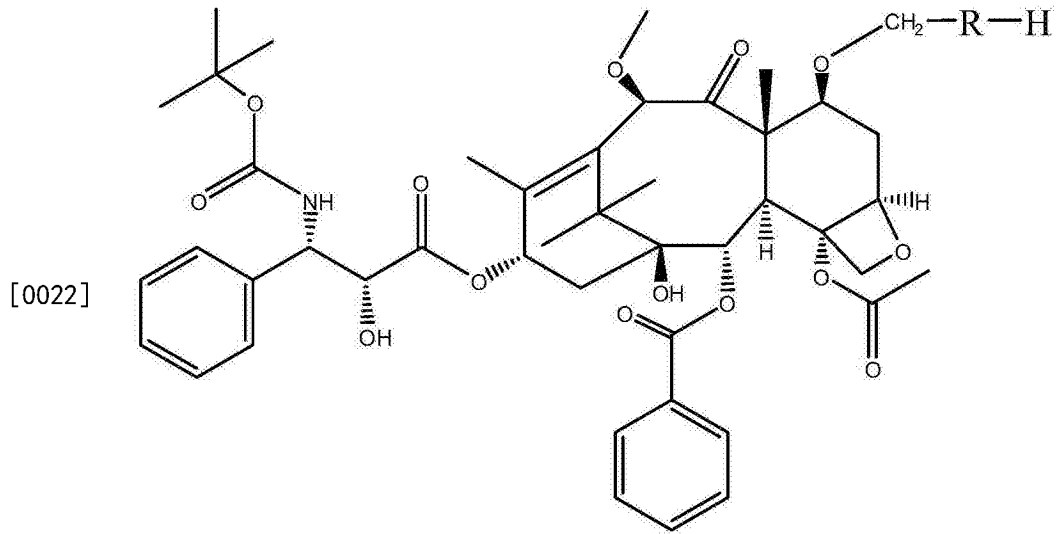
[0017] 式中,R为连接基团-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COO-,n是1至20之间的整数。优选R为-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-COO-。

[0018] 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。

[0019] 卡巴他赛免疫原的合成途径和方法如下:

[0020] 1. 卡巴他赛衍生物的制备方法:

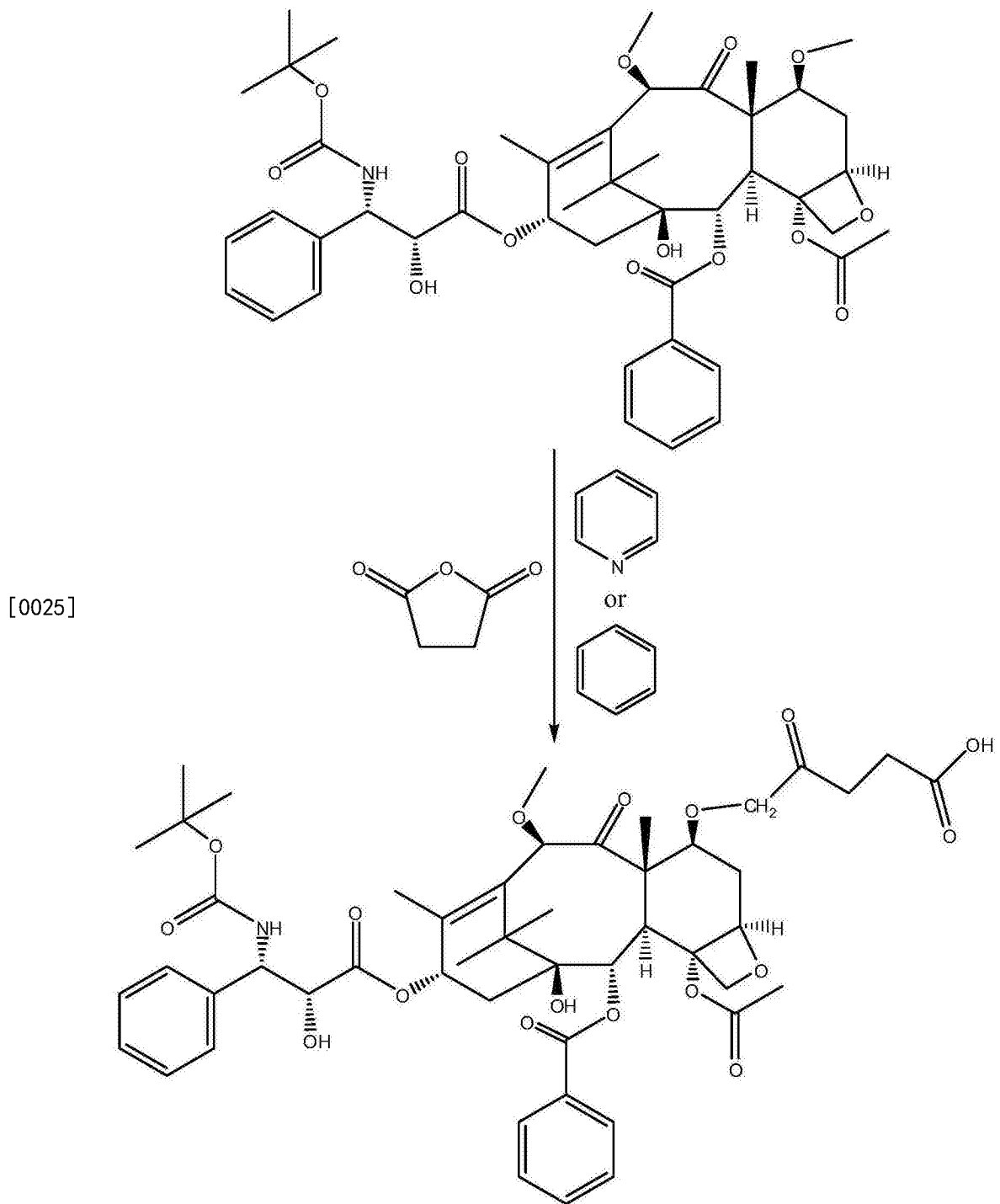
[0021] 一种卡巴他赛衍生物, 其结构式如式(II)所示:



式(II)

[0023] 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。

[0024] 上述卡巴他赛衍生物的合成路线及制备步骤如下:



[0026] (1)称取0.5~2.0g卡巴他赛、1.0~4.0g化合物A加入反应体系中,然后用10~40ml吡啶或者干燥的苯在连续回流的玻璃烧瓶中进行孵育。

[0027] (2)将此反应混合物在70-80℃的回流温度下持续加热3~12小时,然后将反应混合物缓慢冷却至室温(可在室温条件下让其自行冷却),轻轻倒去混合物上层的多余的吡啶或苯。

[0028] (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卡巴他赛衍生物。剩余的有机成分指的是反应混合物去除吡啶或苯之后的成分。

[0029] (4)将上述得到的产物用蒸馏水配制的60%乙醇冲洗5~20次以上,以获得卡巴他赛半琥珀酸脂(卡巴他赛衍生物)的重结晶。60%指的是体积份数,即乙醇体积为60份,蒸馏水体积为40份。

[0030] (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,最终合成得到的卡巴他赛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,然而作为对照的卡巴他赛显示更大的Rf值,大约为0.3-0.4。在标准合成反应中,终产物卡巴他赛衍生物的平均产率大约为97%。以上步骤(1)-(5)方法简便,得到的卡巴他赛衍生物纯度高。

[0031] 本发明中,卡巴他赛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,故所得的最终产物卡巴他赛衍生物的连接基团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。其中选用丁二酸酐时,n取值为2,碳原子个数为4个。

[0032] 2.卡巴他赛免疫原的合成:

[0033] (1)将载体蛋白100~300mg溶解于25~75ml 0.2M,pH 8.5的磷酸缓冲液中;

[0034] (2)将如下化学品加入到小烧杯中搅拌溶解:100~300mg本发明合成的卡巴他赛衍生物、1.5~6ml二甲基甲酰胺、1.5~6ml乙醇、3.5~10.0ml 10mM,pH 5.0的磷酸钾缓冲液、100~300mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺、25~75mg N-羟基琥珀酰亚胺,将这些化学品在室温下搅拌溶解反应20~60min;

[0035] (3)将溶解好的溶液滴加至载体蛋白溶液中,并在2~8°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,得到卡巴他赛免疫原。

[0036] 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)所示的卡巴他赛免疫原。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。

[0037] 本发明中提供的连接基团R为 $-CO-(CH_2)_n-COO-$ ,免疫原性强弱与所合成的卡巴他赛衍生物分子结构,连接基团的结构及所选载体种类有关,本发明连接基团的选取也具有增加免疫原性的作用,但是n取1至20之间的任意整数时,使用不同n值的卡巴他赛衍生物制备的卡巴他赛免疫原均具备强免疫原性,都能制备高效价的特异性抗体。

[0038] 本发明的抗卡巴他赛特异性抗体,由上述的卡巴他赛免疫原免疫实验动物后产生得到,制备的具体步骤如下:

[0039] (1)用PBS将上述合成的卡巴他赛免疫原稀释至1.0mg/ml,得到抗原溶液,然后用0.5~2.0ml抗原溶液与弗氏完全佐剂混合,对实验动物进行注射。

[0040] (2)2~3周后,再用0.5~2.0ml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3~6次。

[0041] (3)对上述实验动物取血,分离纯化得到效价为1:30000~1:50000的抗卡巴他赛特异性抗体。

[0042] 本发明的抗卡巴他赛特异性抗体为完整的抗体分子,也包括保留与卡巴他赛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。

[0043] 本发明的抗体为采用单一的卡巴他赛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。

[0044] 本发明提供一种卡巴他赛检测试剂,含有上述抗卡巴他赛特异性抗体和指示试剂。

[0045] 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,由卡巴他赛酶标偶联物和酶底物所组成。

[0046] 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。所述半抗原为卡巴他赛衍生物。

[0047] 卡巴他赛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卡巴他赛特异性抗体混合在一起。因此,卡巴他赛均相酶免疫检测试剂包括两类试剂:

[0048] (1)试剂A由抗卡巴他赛特异性抗体和均相酶底物混合而成,具体制备步骤如下:

[0049] 1)将2.0~6.0g氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD<sup>+</sup>)、1.0~3.0g葡萄糖-6-磷酸(G-6-P)用0.5~2L 55mM、pH=8.0的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物;

[0050] 2)将制备的抗卡巴他赛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;

[0051] (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:

[0052] 1)葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)溶液的制备:

[0053] a.称取5~25mg规格为100KU的G6PDH,室温溶解于6~20mL含有72.6mg(0.05M) Tris、8mg MgCl<sub>2</sub>(3.3mM)和100mg NaCl的溶液中,该溶液pH=9.0;

[0054] b.加入150~500mg还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH),75~250mg葡萄糖-6-磷酸(G-6-P)以及0.25~1.50mL卡必醇;

[0055] c.逐滴加入1~4mL二甲基亚砷;

[0056] 2)卡巴他赛衍生物的激活:

[0057] a.在无水状态下称取5~20mg卡巴他赛衍生物,溶解于300~1000μL DMF中;

[0058] b.使上述溶液温度降到-2~-8℃;

[0059] c.加入1.5~6μL三丁胺;

[0060] d.加入0.5~3μL氯甲酸异丁酯;

[0061] e. -2~-8℃搅拌15~60分钟;

[0062] 3)G6PDH与卡巴他赛衍生物的连接:

[0063] a.将上述激活的卡巴他赛衍生物溶液逐滴加入到上述溶解的G6PDH溶液中;

[0064] b. 2-8℃搅拌过夜;

[0065] 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℃下储存。

[0066] 5)将制备的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物加到0.5~2L 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。

[0067] 所述的抗卡巴他赛特异性抗体与均相酶底物的体积比优选为1:550;

[0068] 所述的卡巴他赛酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比优选为1:2500。

[0069] 本发明的卡巴他赛免疫原特异性强、免疫原性高,制备出的抗卡巴他赛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;含有上述抗卡巴他赛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卡巴他赛含量,并且可以在全自动生化分析仪上同时测定多个样品,实现卡巴他赛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

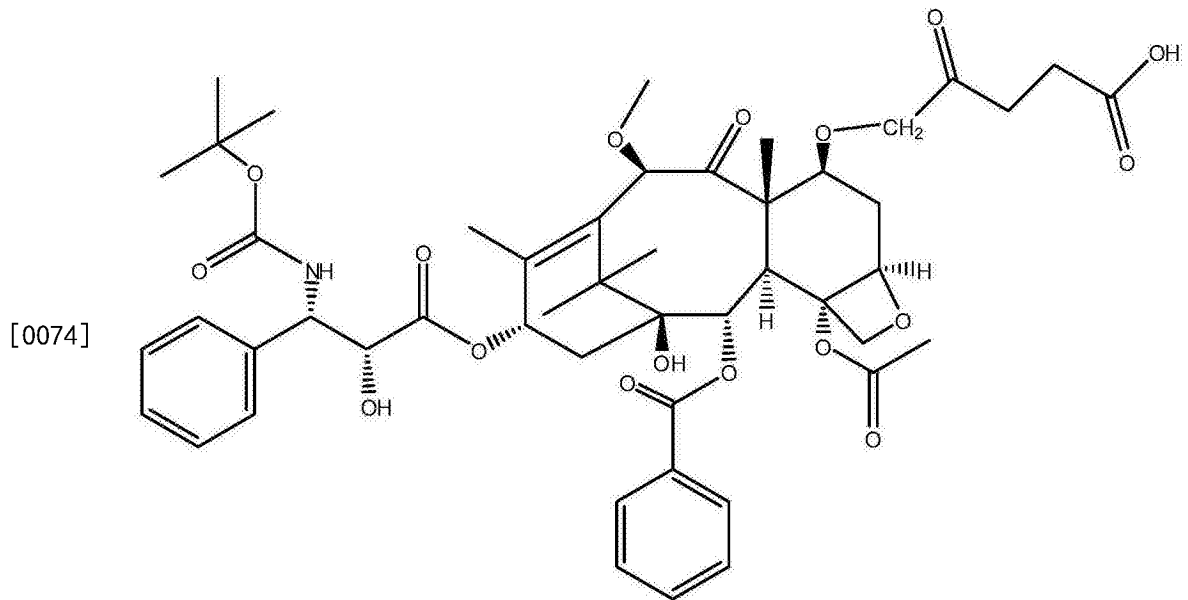
[0070] 图1是卡巴他赛ELISA检测反应曲线;

[0071] 图2是卡巴他赛均相酶免疫反应曲线。

#### 具体实施方式

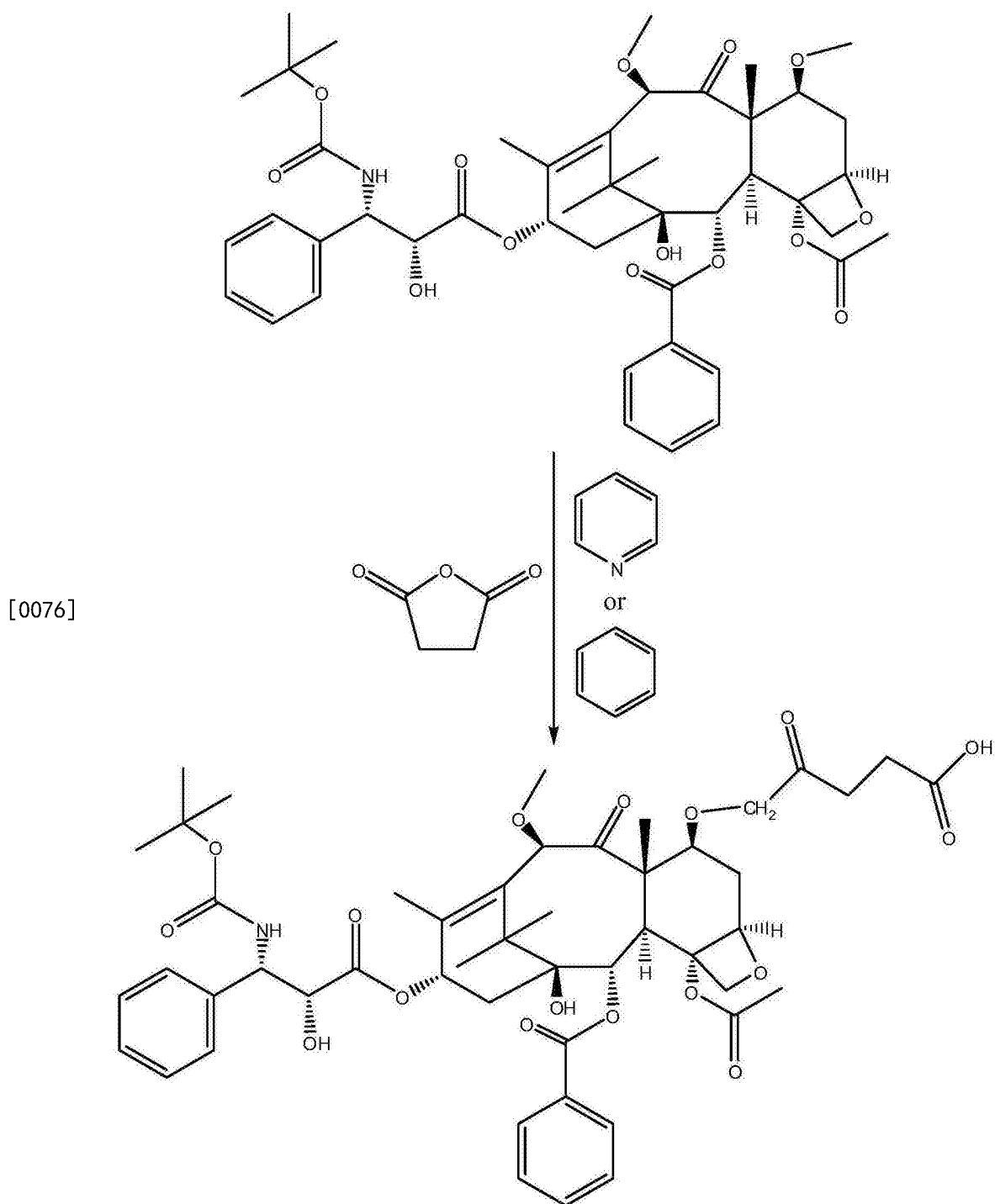
[0072] 实施例一:卡巴他赛衍生物的合成及其定量检测

[0073] 当 $n=2$ 时,卡巴他赛衍生物的化学结构如式(IV)所示:



式(IV)

[0075] 上述卡巴他赛衍生物的合成路线及制备步骤如下:



[0077] 1. 称取1g卡巴他赛、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。

[0078] 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。

[0079] 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卡巴他赛衍生物。

[0080] 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,以获得卡巴他赛半琥珀酸酯(卡巴他赛衍生物)的重结晶。

[0081] 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,最终合成得到的卡巴他赛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,然而作为对照的卡巴他赛显示出更大的Rf值为0.3-0.4。在本实验的标准合成反应中,终产物卡巴他赛衍生物的平均产率达到97%。

[0082] 实施例二:卡巴他赛免疫原的合成

[0083] 卡巴他赛免疫原由牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin,BSA)与式(II)所示的卡巴他赛衍生物的-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-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:

[0084] 1.将BSA 200mg溶解于50ml 0.2M,pH 8.5的磷酸缓冲液中;

[0085] 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卡巴他赛衍生物、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;

[0086] 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,得到卡巴他赛免疫原。

[0087] 实施例三:抗卡巴他赛特异性抗体的制备

[0088] 将实施例二制备得到的卡巴他赛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:

[0089] 1.用PBS将合成的卡巴他赛免疫原稀释至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。

[0090] 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。

[0091] 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的抗卡巴他赛特异性抗体。

[0092] 实施例四:卡巴他赛ELISA检验

[0093] 采用制得的抗体进行卡巴他赛的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卡巴他赛含量。

[0094] 1.卡巴他赛ELISA检测标准曲线的建立

[0095] (1)标准品的制备

[0096] 将卡巴他赛粉末(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640.00ng/mL、160.00ng/mL、40.00ng/mL、10.00ng/mL、2.50ng/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。

[0097] (2)利用卡巴他赛的ELISA检验方法制备标准曲线

[0098] 用PBS将实施例三中所制备的抗卡巴他赛抗体稀释成1:10000的终浓度溶液,100μL/孔包被在96孔酶联板上,4℃放置12-24h;用PBS将上述包被有抗卡巴他赛抗体的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-卡巴他赛偶联物;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。

[0099] 2.待测样品中卡巴他赛含量的检测

[0100] (1)制作待测样品

[0101] 制备方法:将卡巴他赛粉末(购于Sigma公司)溶解于甲醇溶液制成1 $\mu$ 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0.00ng/mL、3.00ng/mL、75.00ng/mL、500.00ng/mL,形成空白、低、中、高浓度的全血样本。该空白全血为不含卡巴他赛的健康人血液。

[0102] (2)测试方法

[0103] 利用上述卡巴他赛的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。

[0104] (3)测试结果

[0105] 对照图1中所示的卡巴他赛ELISA检验的标准曲线,计算每个样本中卡巴他赛含量,并对每个样本进行3个复孔测定,根据上述样本中卡巴他赛的实际含量计算回收率,结果如表1所示。

[0106] 表1 卡巴他赛的ELISA检测回收实验

血清样品	空白	低	中	高
样品浓度 (ng/mL)	0.00	3.00	75.00	500.00
[0107] 测试 1	0.02	3.14	76.36	513.59
测试 2	0.01	2.92	73.15	491.92
测试 3	0.01	3.07	77.00	508.87
平均值(ng/mL)	0.01	3.04	75.50	504.79
回收率(%)	-	101.3	100.7	101.0

[0108] 由表1中结果可知:采用本发明卡巴他赛ELISA检测试剂测定不同浓度样品中的卡巴他赛回收率都较高,均>90%,说明本发明所述的抗卡巴他赛特异性抗体可以用于样本中卡巴他赛的检测,并且结果准确度高。

[0109] 实施例五:葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物的制备

[0110] 1.葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)溶液的制备:

[0111] (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 MgCl<sub>2</sub>(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。

[0112] (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。

[0113] (3)在上述烧杯C中再逐滴加入2mL二甲基亚砷。

[0114] 2.卡巴他赛衍生物的激活:

[0115] (1)在无水状态下称取10mg上述卡巴他赛衍生物,溶解于600 $\mu$ L DMF中。

[0116] (2)使上述溶液温度降到-2~-8 $^{\circ}$ C。

[0117] (3)加入3 $\mu$ L三丁胺。

[0118] (4)加入1.5 $\mu$ L氯甲酸异丁酯。

[0119] (5)-2~-8 $^{\circ}$ C搅拌30分钟。

[0120] 3.G6PDH与卡巴他赛衍生物的连接:

[0121] (1)将上述激活的卡巴他赛衍生物溶液逐滴加入到上述溶解的G6PDH溶液中。

[0122] (2)2-8°C搅拌过夜。

[0123] 4.纯化产物:

[0124] 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°C下储存。

[0125] 实施例六:卡巴他赛均相酶免疫检测试剂的制备

[0126] 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<sup>+</sup>)、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;将上述制备的抗卡巴他赛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1:550。

[0127] 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1L 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1:2500。

[0128] 实施例七:卡巴他赛均相酶免疫检验及结果

[0129] 1.获得标准曲线:

[0130] (1)设置迈瑞BS200全自动生化分析仪反应参数(见表2);

[0131] (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<sub>340</sub>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。

[0132] 表2 迈瑞BS480全自动生化分析仪反应参数

迈瑞 BS-480 参数	
项目名称	卡巴他赛
[0133] 试剂 1	150 $\mu$ l
试剂 2	150 $\mu$ l
样本量	15 $\mu$ 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
[0134] 反应方向	上升
结果	ng/ml
结果精度	0.01
定标方法	Logistic-Log 5P
标准品浓度	0.00, 125.00, 250.00, 500.00, 1000.00, 2000.00 ng/mL

[0135] 2.样本检测

[0136] 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:将卡巴他赛标准品溶解于人血清中,至浓度分别为50.00, 250.00,1000.00ng/ml。检测数据及数据分析见表3。

[0137] 表3 样品测定及精密度和回收率评估

[0138]

血液样品	低	中	高
样品浓度(ng/ml)	50.00	250.00	1000.00
1	51.29	241.55	1094.00
2	50.18	245.42	1015.41
3	48.75	251.99	975.16
4	53.30	246.87	984.33
5	52.00	242.52	1055.56
6	49.09	253.00	1024.80
7	50.35	242.59	996.25
8	47.93	255.73	984.15
9	50.03	242.58	1000.03
10	48.33	245.01	1025.61
平均值(ng/ml)	50.13	246.73	1015.53
标准差(SD)	1.70	5.07	36.74
精密度(CV%)	3.39	2.05	3.62
回收率%	100.3	98.7	101.6

[0139] 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

[0140] 95%~105%,精密度高,CV均低于5%。

[0141] 实施例八:药物干扰试验

[0142] 选取62种常见药物进行干扰检测,调整浓度至1000.00ng/ml,采用实施例七的均相酶免疫方法进行测定:

[0143] 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;

[0144] 2.检测上述混合溶液的OD<sub>340</sub>吸光值,根据实施例七的标准曲线得到相应物质的浓度。

[0145] 常见的62种药物名称以及测定结果具体参见表4。

[0146] 表4 常见干扰药物测定结果

[0147]

ID#	化合物名称	等价于卡巴他赛的浓度 (ng/ml)	ID#	化合物名称	等价于卡巴他赛的浓度 (ng/ml)
1	阿司匹林	0.0	32	苯丙醇胺	0.0
2	$\beta$ -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	氮苄青霉素	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	蔡普生	0.0	48	洛哌丁胺	0.0

[0148]

ID#	化合物名称	等价于卡巴他赛的浓度 (ng/ml)	ID#	化合物名称	等价于卡巴他赛的浓度 (ng/ml)
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
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

[0149] 表4的检测结果显示,62种常见药物等价于卡巴他赛的浓度均小于0.1ng/ml。可见,本发明的抗体是抗卡巴他赛的特异性抗体,与其它药物无交叉反应。需要说明的是,以上所述仅为本发明的实施例,并非因此限制本发明的专利范围,凡是利用本发明说明书及附图内容所做的等效结构或等效流程变换,或直接或间接运用在其他相关技术领域,均同理包括在本发明的专利保护范围内。

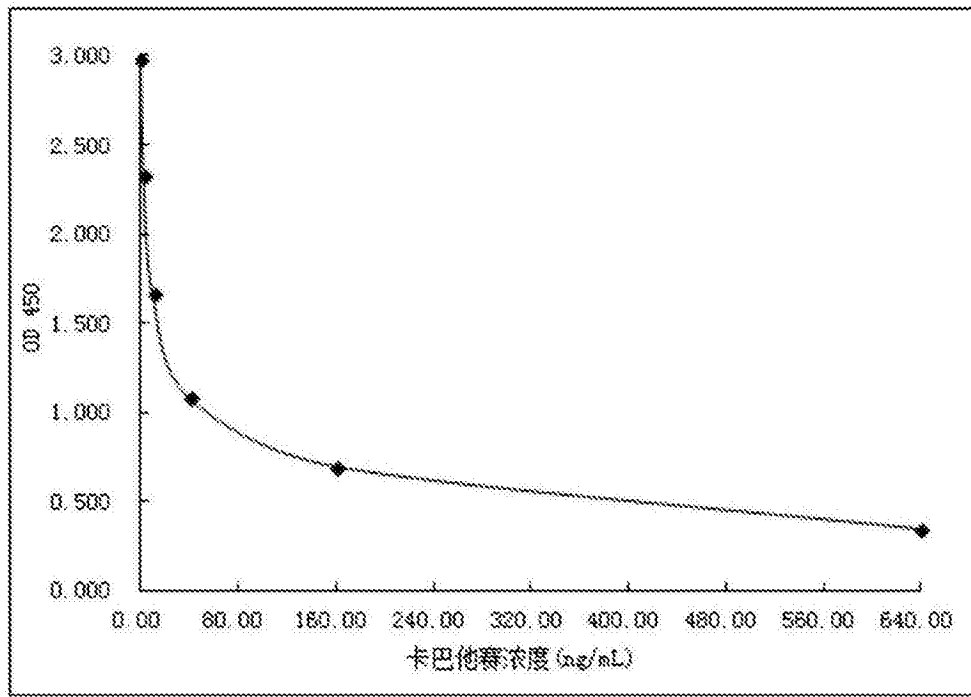


图1

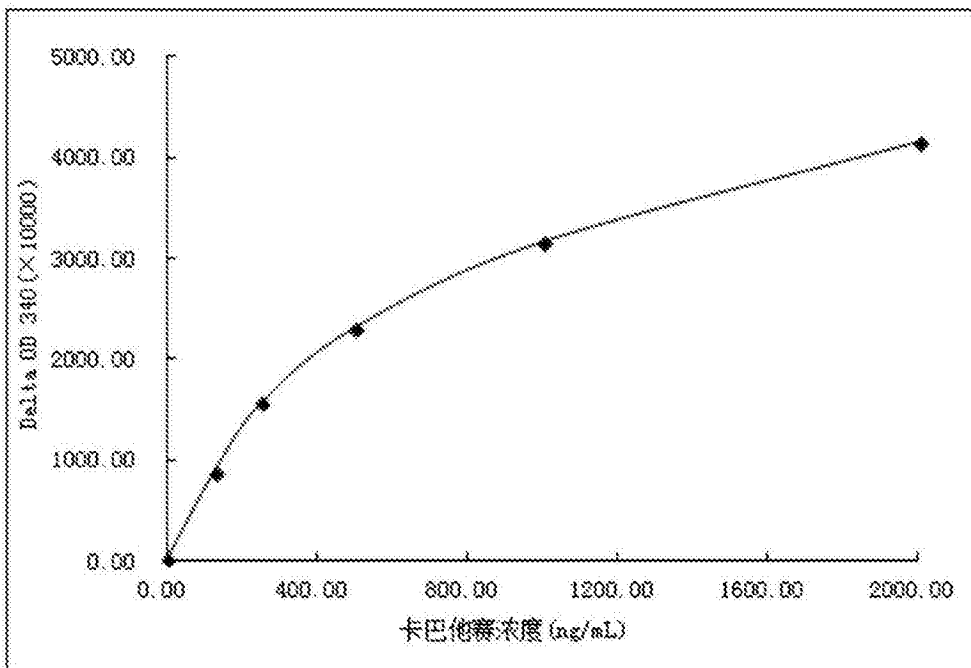


图2

专利名称(译)	卡巴他赛免疫原、特异性抗体和检测试剂及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN105504047A</a>	公开(公告)日	2016-04-20
申请号	CN201610087472.4	申请日	2016-02-16
[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 储小曼		
发明人	虞留明 储小曼		
IPC分类号	C07K14/765 C07K14/795 C07K14/47 C07K1/107 C07D305/14 C07K16/44 C07K16/06 G01N33/543 G01N33/535		
CPC分类号	C07K14/765 C07D305/14 C07K1/1077 C07K14/47 C07K14/795 C07K16/06 C07K16/44 C07K19/00		
代理人(译)	薛海霞 董建林		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种卡巴他赛免疫原、特异性抗体和检测试剂及其制备方法，属于生物检测领域。本发明的卡巴他赛免疫原由全新的卡巴他赛衍生物合成，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卡巴他赛特异性抗体，并且与常见的62种药物无任何交叉反应。由该抗体制备的卡巴他赛检测试剂，可以方便、精确地确定样品中的卡巴他赛含量，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，还能有效降低卡巴他赛检测成本，适合临床大规模推广使用。

