



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105899952 A

(43)申请公布日 2016.08.24

(21)申请号 201480059861.5

(74)专利代理机构 上海旭诚知识产权代理有限公司 31220

(22)申请日 2014.08.29

代理人 郑立 刘万磊

(30)优先权数据

61/871,642 2013.08.29 US

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.04.29

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2014/050833 2014.08.29

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/027345 EN 2015.03.05

(71)申请人 百奥马克科技有限公司

地址 加拿大不列颠哥伦比亚

(72)发明人 布莱恩·郑

权利要求书1页 说明书5页 附图5页

(54)发明名称

一种检测和定量乙酰金刚烷胺的免疫学检测方法

(57)摘要

一种检测和定量接受小剂量的金刚烷胺的人的尿液或其他体液中的乙酰金刚烷胺的免疫学检测方法。乙酰金刚烷胺的定量能被用来定量SSAT活性,并且升高的SSAT活性是包括但不限于炎症和癌症的疾病的指征。

1. 一种检测哺乳动物的体液中的乙酰金刚烷胺的方法,所述方法包括:
对所述哺乳动物剂量给药金刚烷胺;
从所述哺乳动物中获取体液样品;
将所述体液样品和已知浓度的乙酰金刚烷胺特异性抗体温育;以及
基于抗-乙酰金刚烷胺抗体对结合在底物上的乙酰金刚烷胺的结合的抑制来检测所述
体液样品中的乙酰金刚烷胺。
2. 一种定量哺乳动物的体液中的乙酰金刚烷胺的方法,所述方法包括:
对所述哺乳动物剂量给药金刚烷胺;
从所述哺乳动物中获取体液样品;
将所述体液样品和已知浓度的乙酰金刚烷胺特异性抗体温育;以及
基于抗-乙酰金刚烷胺抗体对结合在底物上的乙酰金刚烷胺的结合的抑制来定量所述
体液样品中的乙酰金刚烷胺。

一种检测和定量乙酰金刚烷胺的免疫学检测方法

背景技术

技术领域

[0001] 本发明涉及定量精胺/亚精胺^N¹-乙酰基转移酶(SSAT)酶活性的方法和组合物。

[0002] 相关技术说明

[0003] 亚精胺/精胺^N¹-乙酰基转移酶(SSAT)普遍分布在哺乳动物组织中,并在聚胺在细胞中的分解代谢和消除中起作用。SSAT是一种催化乙酰基从乙酰辅酶A转移到聚胺的氨丙基部分的诱导酶。SSAT的这一行为促进了聚胺的降解、排泄以及循环和/或细胞内循环。SSAT以这种方式参与维持哺乳动物细胞中聚胺的体内平衡。然而,在正常的或未经诱导的哺乳动物组织中,SSAT以非常低的水平存在。

[0004] 可以通过不同的药物、生长因子、聚胺、聚胺类似物、有毒物质、激素和生理刺激物诱导SSAT的表达。虽然所有上述化合物可以诱导SSAT的表达,但是对于每个单独的化合物,诱导发生的时间不同。SSAT表达的调节在转录、mRNA稳定、mRNA翻译和蛋白质稳定的水平发生。在体外实验能成功地进行前,为使细胞中或100,000×g的上清液中存在足够的SSAT酶,通常需要SSAT的诱导或过表达。

[0005] 目前的文献教导SSAT是一种对包括精胺和亚精胺或其类似物在内的底物有特异性的乙酰化酶,然而SSAT作用于SSAT的非精胺/亚精胺底物的SSAT活性、SSAT的酶动力学以及测定方法还是没有被理解。现在有定量SSAT活性的方法。然而,这些技术都依赖于技术高度熟练的人员和复杂的实验方法。更具体地说,存在对一种测定方法的需求,这种测定方法通过检测非精胺的乙酰化形式来定量SSAT的活性。包括金刚烷胺在内的SSAT的亚精胺底物可以被用来检测不同的病理状况。

[0006] 传统的方法,比如单独的气液色谱法(GLC)、高压液相色谱法(HPLC),或与质谱法联用,已被用来测定乙酰化代谢物例如乙酰金刚烷胺。检测灵敏度需要目标分析物的十亿分之几,这是一个挑战。GLC和HPLC已被证明对体外测定有效,但是对体内测定可能不实用。使用氘代分析物作为HPLC-MS-MS方法的内标来测定乙酰金刚烷胺是成功的。

[0007] 这些传统的方法需要劳动力集中的分析服务,这导致高的操作成本和资本成本。所有这些都增加了医疗保健经济的低效率。此外,生物样品必须有物流处理并运送至集中的实验室进行测定。这些操作可能会导致样品质量改变以及可能会导致结果的错误解读。

发明内容

[0008] 本发明的一个目的是提供一种免疫学检测方法,其检测并优选地定量接受小剂量的金刚烷胺的哺乳动物或患者的尿液或其他体液中的乙酰金刚烷胺。

[0009] 本文公开了利用含有乙酰金刚烷胺的尿液样品,能够抑制抗-乙酰金刚烷胺多克隆抗体与结合在底物上的乙酰金刚烷胺的结合。特异性识别乙酰金刚烷胺的多克隆抗体是通过使用免疫原乙酰金刚烷胺免疫温血动物产生的,该免疫原乙酰金刚烷胺与载体蛋白质或与通用T细胞表位、优选地和佐剂一起交联。交联蛋白、通用T细胞表位和佐剂的方法是常

规的。特异性识别乙酰金刚烷胺的多克隆抗体被金刚烷胺吸附,因为在接受了小剂量的金刚烷胺的哺乳动物和患者的尿液中有高浓度的金刚烷胺。这可以通过常规的方法完成,比如将抗体加入到共价结合了金刚烷胺的琼脂糖珠的柱子上,并收集来自该柱子的流穿液。还提供了一种使用被测数量的乙酰金刚烷胺的标准曲线的定量分析。

[0010] 基于本公开的体外测试诊断(IVD)的形式是一种免疫学检测方法,其在临床办公室检测并可以定量乙酰金刚烷胺。这可允许快速医疗决策以及可间接地测量身体中的SSAT活性。因此,在护理现场(point of care)的测试方法有益于最小化样品不稳定性和减少医疗成本。在医疗办公室的IVD的形式可允许快速医疗决策。

[0011] 基于本公开的测量接受了小剂量的金刚烷胺的哺乳动物的尿液中的乙酰金刚烷胺的免疫学检测方法,可以有多种IVD的设计。

[0012] 对被金刚烷胺吸附的乙酰金刚烷胺有特异性的多克隆抗体可以被用来检测或定量有过量金刚烷胺存在时的乙酰金刚烷胺。

[0013] 对被金刚烷胺吸附的乙酰金刚烷胺有特异性的多克隆抗体可以被用来检测或定量身体中的精胺/亚精胺^{N¹}-乙酰基转移酶(SSAT)活性。

附图说明

[0014] 通过以下给出的具体实施方式的描述,仅以实施例的方式,并参照附图,本发明将更容易理解,其中:

[0015] 图1是显示了针对吸附有金刚烷胺的乙酰金刚烷胺的多克隆亲和纯化抗体被低浓度乙酰金刚烷胺抑制的标准曲线的图;

[0016] 图2是显示了针对吸附有金刚烷胺的乙酰金刚烷胺的多克隆亲和纯化抗体被低浓度乙酰金刚烷胺和高浓度的金刚烷胺抑制的图;

[0017] 图3是显示了针对乙酰金刚烷胺的多克隆亲和纯化抗体被低浓度乙酰金刚烷胺和高浓度的金刚烷胺抑制的图;

[0018] 图4是显示了来自兔子的血清被低浓度乙酰金刚烷胺和高浓度的金刚烷胺抑制的图;以及

[0019] 图5是显示了乙酰金刚烷胺竞争性ELISA的结果的图,信号是针对乙酰金刚烷胺的竞争性浓度读取的。

具体实施方式

[0020] 本文公开的是一种免疫学检测方法,该免疫学检测方法可被用来检测或定量接受了小剂量的金刚烷胺的哺乳动物中的乙酰金刚烷胺。

[0021] 从哺乳动物中获取体液样品,并与已知浓度的对乙酰金刚烷胺特异性的多克隆抗体温育。样品中的乙酰金刚烷胺将抑制乙酰金刚烷胺特异性的多克隆抗体对连接在底物上的乙酰金刚烷胺的结合。有许多方法能将乙酰金刚烷胺连接到底物上,在底物上抗体信号被检测。本文公开的实施例中,生物素化的乙酰金刚烷胺连接到连接至底物的链霉亲和素上。如果抗-乙酰金刚烷胺抗体没有被样品中的乙酰金刚烷胺抑制,当抗-乙酰金刚烷胺抗体结合了乙酰金刚烷胺,通过底物来检测信号。如果样品中的乙酰金刚烷胺浓度超过了异常浓度的阈值,底物的信号可能被完全的抑制。本领域技术人员可知,可以使用许多检测样

品中乙酰金刚烷胺的体外检测诊断(IVD)设计。比如,有色颗粒,如金颗粒,连接到乙酰金刚烷胺上,样品中异常浓度的乙酰金刚烷胺抑制有色颗粒和结合有抗-乙酰金刚烷胺抗体的检测线的结合。

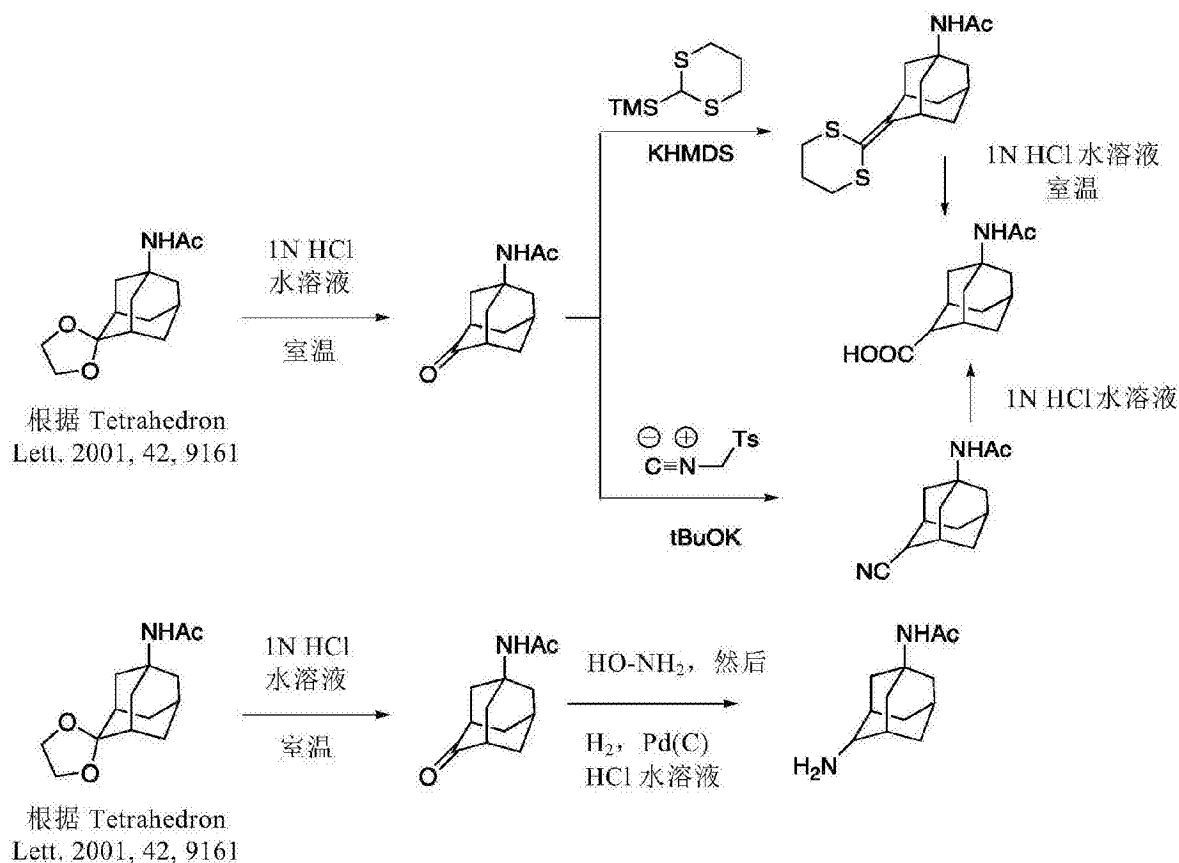
[0022] 制备乙酰金刚烷胺蛋白缀合物

[0023] 载体蛋白质卵白蛋白的缀合物是使用生产商使用说明,通过1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳化二亚胺(EDC)连接到乙酰金刚烷胺的胺衍生物形成的。在这个实施例中,生产商是美国,61101,伊利诺斯州,罗克福德的马莉甸路3747N的赛默飞世尔科技公司。另一个用于免疫兔子的免疫原是通过甲醛连接到乙酰金刚烷胺的胺衍生物的匙孔血蓝蛋白的缀合物。另一个用于免疫兔子的免疫原是生物素-结合蛋白亲和素偶联过量的生物素化4-氨基-1-N-乙酰金刚烷胺的缀合物。使用生产商的标准方法和使用说明进行生物素化,在本实施例中,生产商是美国,61101,伊利诺斯州,罗克福德的马莉甸路3747N的赛默飞世尔科技公司。

[0024] 乙酰金刚烷胺的胺衍生物如下方合成方案中描述的合成。

[0025] 金刚烷基胺衍生物的合成

[0026]



[0027] 免疫兔子:

[0028] 使用250μg乳化在完全弗氏佐剂中的乙酰金刚烷胺-卵白蛋白缀合物免疫新西兰白兔。该兔子用乙酰金刚烷胺-卵白蛋白缀合物增强多次,用100μg乙酰金刚烷胺-缀合物匙孔血蓝蛋白增强两次,并用偶联有过量的生物素化的乙酰金刚烷胺并以明矾作为佐剂的4μg亲和素增强一次。在兔子被安乐死并放血前的14天,该兔子使用100μg乙酰金刚烷胺-卵白

蛋白缀合物进行增强。

[0029] 免疫球蛋白G(IgG)的制备:

[0030] 使兔子的血液凝固并收集血清。使用包被了蛋白A的珠子收集IgG,并用pH 2的甘氨酸缓冲液将IgG从柱子上洗脱,并中和到pH 7.2。

[0031] 柱子的制备:

[0032] 溴化氰偶联的琼脂糖珠与乙酰金刚烷胺的胺衍生物或金刚烷胺的胺衍生物进行结合。

[0033] 针对乙酰金刚烷胺的亲纯化抗体:

[0034] 使IgG流动穿过结合有乙酰金刚烷胺的溴化氰偶联的琼脂糖珠的柱子,针对乙酰金刚烷胺的抗体结合到柱子上。柱子用磷酸盐缓冲盐水充分洗涤。针对乙酰金刚烷胺的亲纯化的抗体用pH 2的甘氨酸缓冲液从柱子上洗脱,并中和至pH 7.2。

[0035] 吸附有金刚烷胺的针对乙酰金刚烷胺的亲纯化的抗体:

[0036] 针对乙酰金刚烷胺的亲纯化的抗体流动穿过结合有金刚烷胺的溴化氰偶联的琼脂糖珠的柱子,并采集IgG的峰。

[0037] 用吸附有金刚烷胺的针对乙酰金刚烷胺的亲纯化的抗体定量乙酰金刚烷胺:

[0038] 酶联免疫吸附测定(ELISA)板用2ug/mL生物素结合蛋白链霉亲和素包被,并用脱脂牛奶封闭。然后使用自动洗涤器采用磷酸盐缓冲盐水洗涤ELISA板。将2ng/mL的生物素化乙酰金刚烷胺加入链霉亲和素包被的ELISA板中,使得乙酰金刚烷胺结合到链霉亲和素上。然后洗涤ELISA板以去除未结合的生物素化乙酰金刚烷胺。将可溶性的乙酰金刚烷胺或金刚烷胺滴定到单独的96孔板中,并和小量的、事先测定浓度的吸附有金刚烷胺的抗-乙酰金刚烷胺亲和纯化的抗体温育一小时,该小量的、事先测定浓度的吸附有金刚烷胺的抗-乙酰金刚烷胺亲和纯化的抗体在包被有乙酰金刚烷胺的ELISA板中给出明显的信号。吸附有金刚烷胺的针对乙酰金刚烷胺的亲纯化的抗体的最小量给出了乙酰金刚烷胺的最大灵敏度。之后,将与恒定数量的吸附有金刚烷胺的抗-乙酰金刚烷胺亲和纯化的抗体温育一小时的乙酰金刚烷胺和金刚烷胺滴定液加入乙酰金刚烷胺包被的ELISA板中。

[0039] ELISA温育两小时,然后ELISA通过加入针对兔IgG的结合有碱性磷酸酶的羊抗体进行显影。加入底物,通过标准方法对ELISA显影,通过ELISA检测仪测定光密度,光密度如图1所示。特别地,图1示出了表示从100pg/mL到10ng/mL的抑制的标准曲线。若对尿液样品进行一式四份的测定,可以在该检测方法中准确地定量乙酰金刚烷胺。如果尿液100%抑制,可以将样品稀释,并在该检测方法中准确地定量乙酰金刚烷胺。将~400pg/mL可溶的乙酰金刚烷胺加入吸附有金刚烷胺的抗-乙酰金刚烷胺亲和纯化抗体中,在EILSA中有明显的结合的抑制(50%),如图2所示。相比之下,使用仅40μg/mL金刚烷胺会有明显的抑制(50%),如图2所示。

[0040] 用针对乙酰金刚烷胺的亲纯化的抗体定量乙酰金刚烷胺:

[0041] 来自这个单独的兔子的亲和纯化的抗体结合到乙酰金刚烷胺上,并且没有吸附金刚烷胺,也能在这个免疫学检测方法中工作,如图3所示。将~1.3ng/mL可溶的乙酰金刚烷胺加入吸附有金刚烷胺的抗-乙酰金刚烷胺亲和纯化抗体中,在EILSA中有明显的结合的抑制(50%),如图2所示。相比之下,使用仅100μg/mL金刚烷胺会有明显的抑制(50%),如图2所示。

[0042] 用针对乙酰金刚烷胺的重复免疫的兔子的血清定量乙酰金刚烷胺：

[0043] 来自这个单独的兔子的血清也能在这个定量乙酰化金刚烷胺的免疫学检测方法中工作，如图4所示。将~300pg/mL可溶的乙酰金刚烷胺加入血清的稀释液中，在EILSA中有明显的结合的抑制(50%)，如图2所示。相比之下，使用100μg/mL金刚烷胺会有明显的抑制(50%)，如图2所示。

[0044] 本领域技术人员相应地也可以知道，本文公开的免疫学检测方法可以用于检测和定量接受小剂量的金刚烷胺的患者中的乙酰金刚烷胺。这表示在图5中，其显示了乙酰金刚烷胺竞争性ELISA的结果，针对乙酰金刚烷胺的竞争性浓度读取信号。ELISA板的包被物是2ug/mL链霉亲和素和6ng/mL生物素化的乙酰金刚烷胺。竞争性ELISA使用针对乙酰金刚烷胺的1:200稀释的血清，范围从0.025ng/mL到250ng/mL。完全抑制抑制出现在100ng/mL可溶的乙酰金刚烷胺附近。检测限(灵敏度)在0.5ng/mL到1.0ng/mL附近。乙酰金刚烷胺的定量能被用来定量SSAT活性，并且升高的SSAT活性是包括但不限于炎症和癌症的疾病的指征。

[0045] 本领域技术人员还可知，上述提供的许多细节仅仅是作为实施例，并无意限缩本发明的保护范围，本发明的保护范围是参考权利要求得出的。

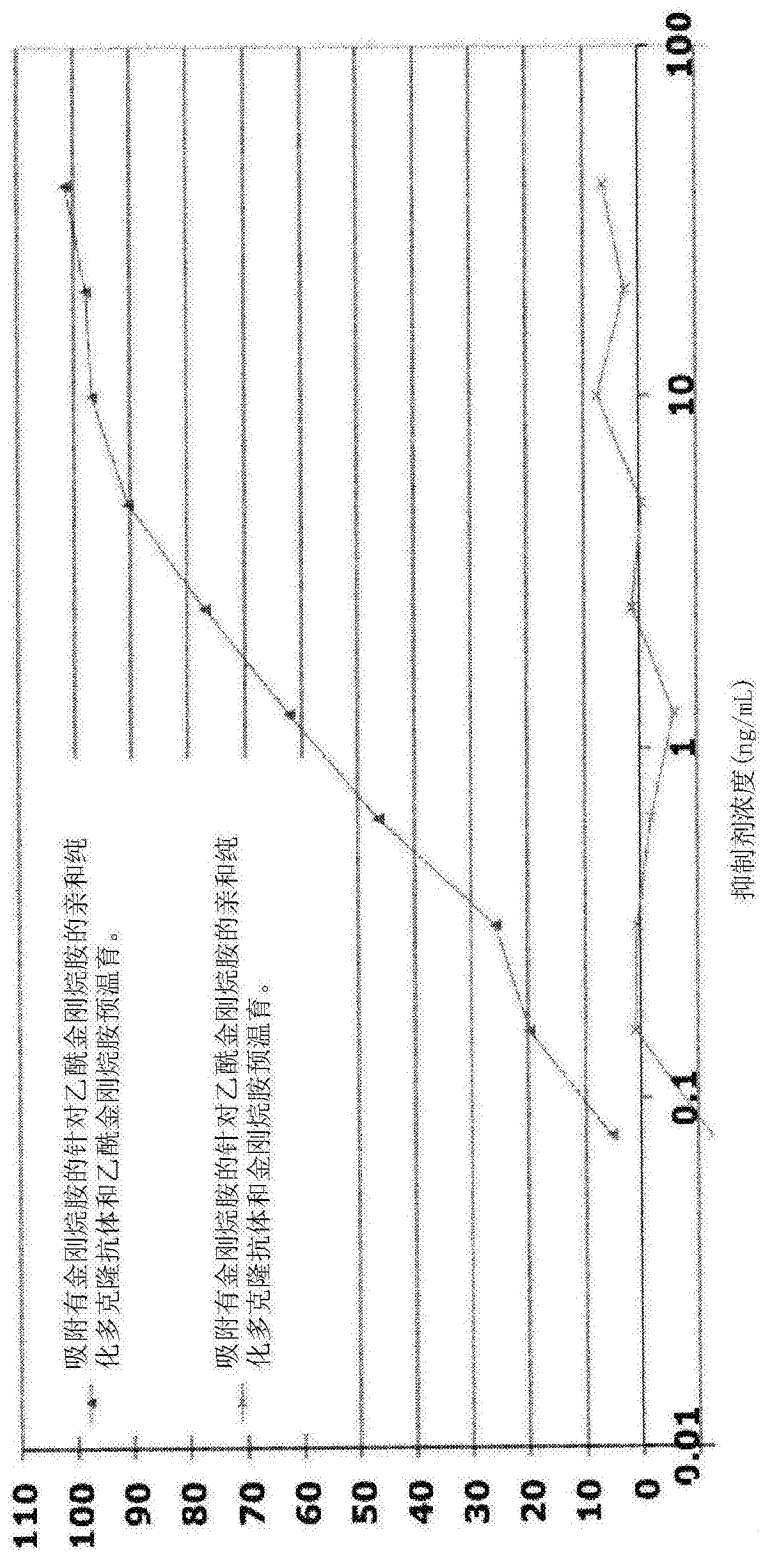


图1吸附有金刚烷胺的针对乙酰金刚烷胺的多克隆亲和纯化抗体被低浓度的乙酰金刚烷胺抑制的标准曲线

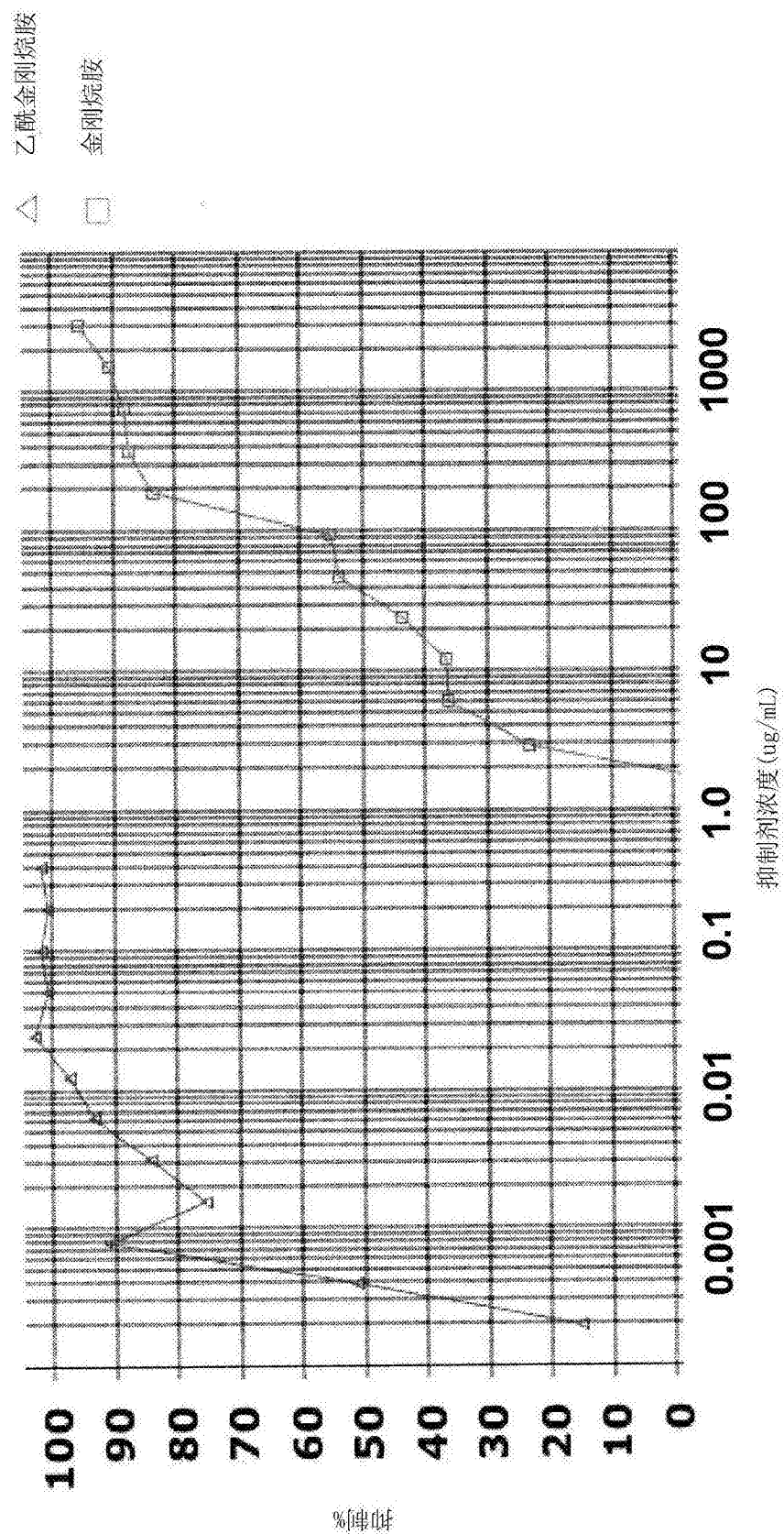


图2吸附有金刚烷胺的针对乙酰金刚烷胺的多克隆亲和纯化抗体被低浓度的乙酰金刚烷胺和高浓度的金刚烷胺抑制

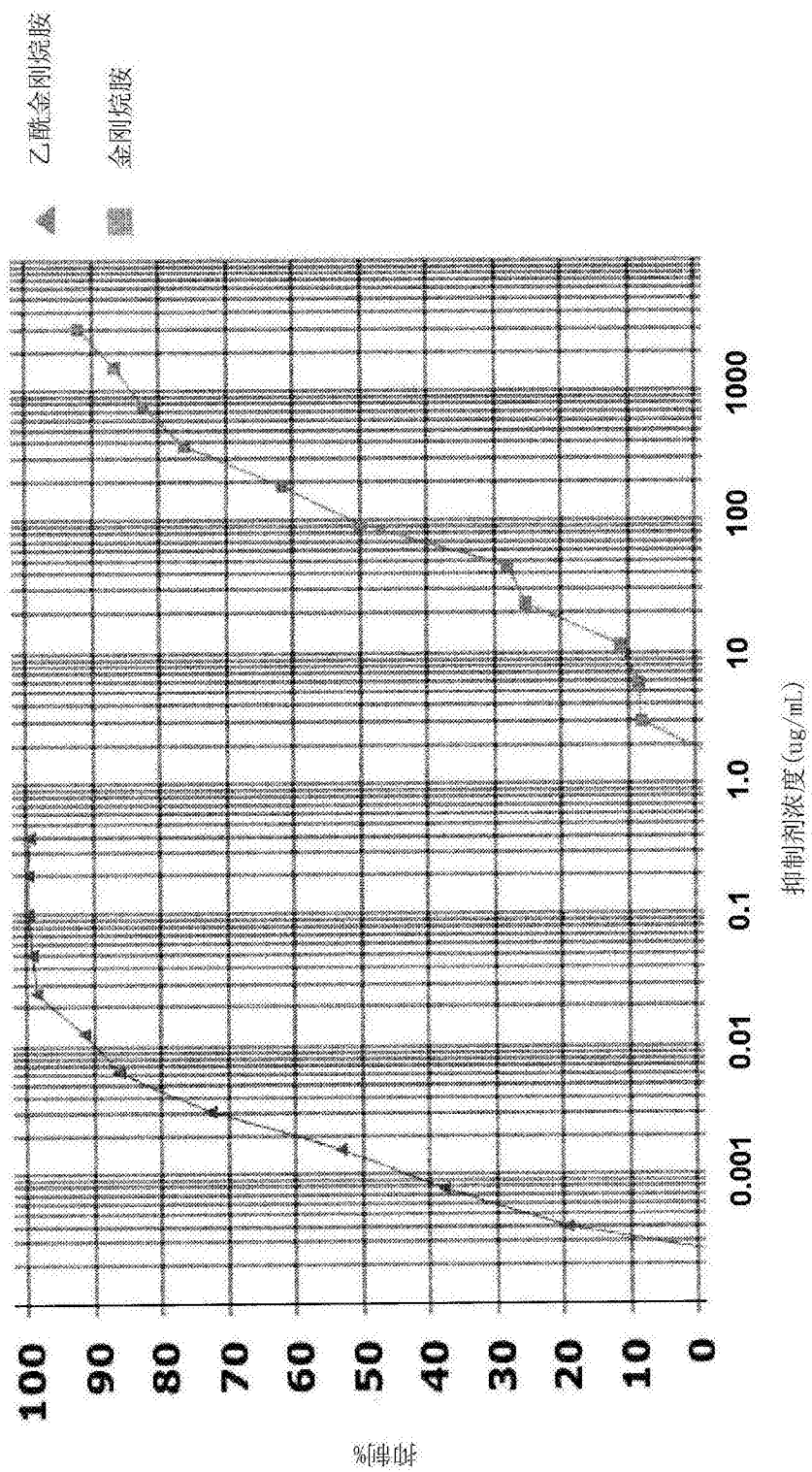


图3针对乙酰金刚烷胺的多克隆亲和纯化抗体被低浓度的乙酰金刚烷胺和高浓度的金刚烷胺抑制

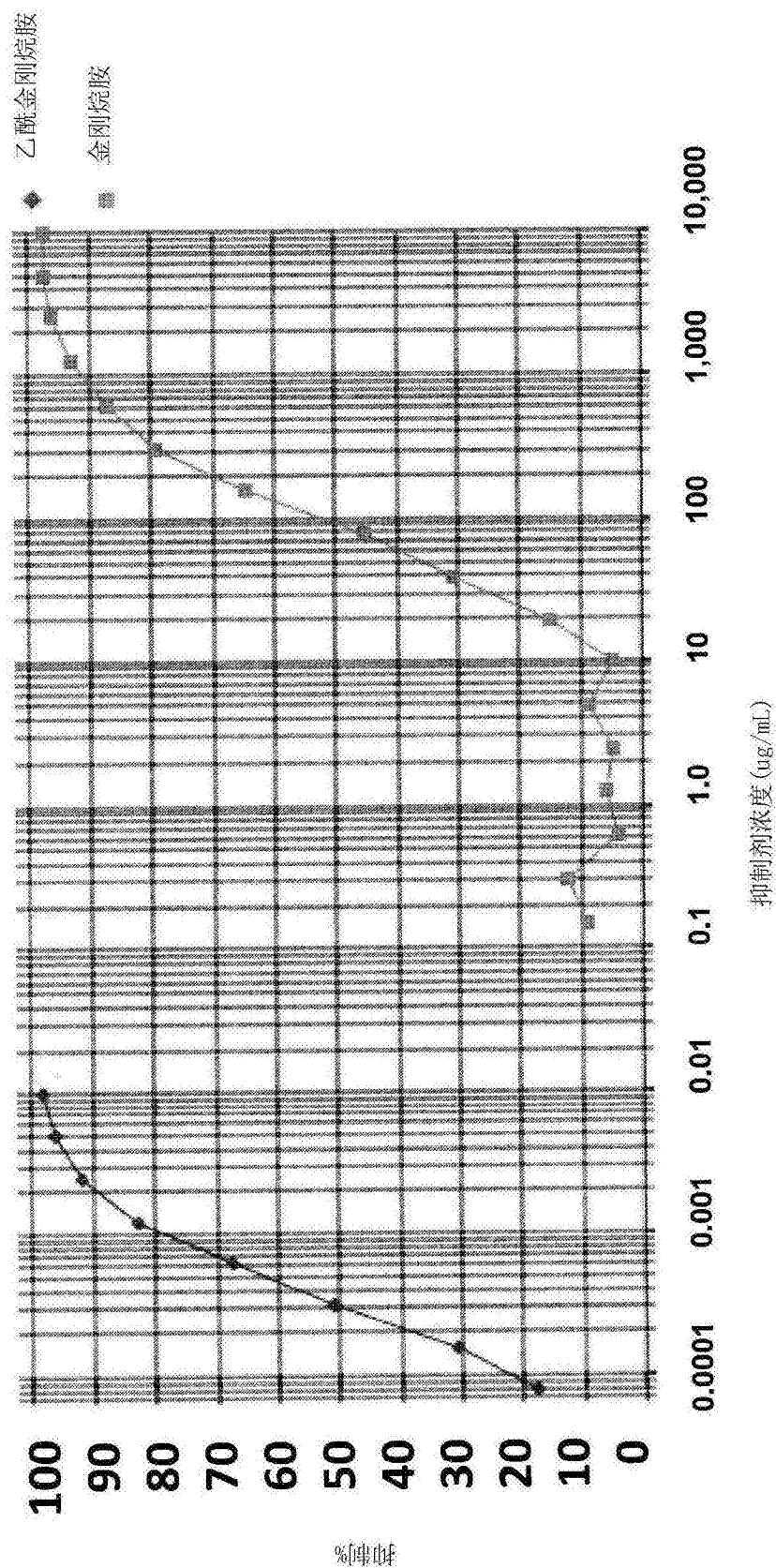


图4来自同一只兔子的血清被低浓度的乙酰金刚烷胺和高浓度的金刚烷胺抑制

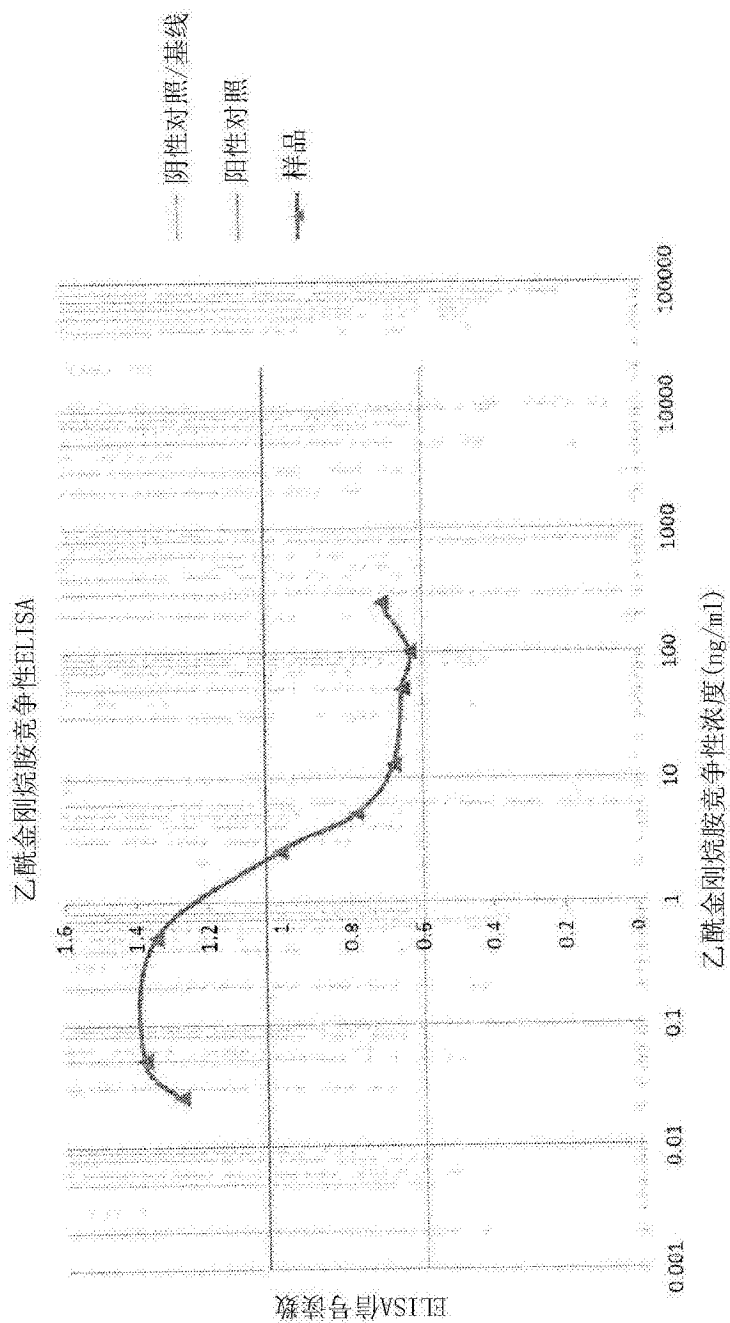


图5乙酰胆碱竞争性ELISA的结果,信号是针对乙酰胆碱的竞争性浓度读取的

专利名称(译)	一种检测和定量乙酰金刚烷胺的免疫学检测方法		
公开(公告)号	CN105899952A	公开(公告)日	2016-08-24
申请号	CN201480059861.5	申请日	2014-08-29
[标]申请(专利权)人(译)	百奥马克科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	百奥马克科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	百奥马克科技有限公司		
[标]发明人	布莱恩郑		
发明人	布莱恩·郑		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5308 C12Q1/48		
代理人(译)	郑立		
优先权	61/871642 2013-08-29 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种检测和定量接受小剂量的金刚烷胺的人的尿液或其他体液中的乙酰金刚烷胺的免疫学检测方法。乙酰金刚烷胺的定量能被用来定量SSAT活性，并且升高的SSAT活性是包括但不限于炎症和癌症的疾病的指征。

