[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410102759.7

[45] 授权公告日 2009 年 8 月 19 日

[11] 授权公告号 CN 100529757C

[22] 申请日 2004.12.28
[21] 申请号 200410102759.7
[73] 专利权人 中国人民解放军军事医学科学院毒物药物研究所
地址 100850 北京市海淀区太平路 27 号
[72] 发明人 董泗建 郑健全 池木根 张振清 魏淑香 王晓英 梁远军 刘克良
[56] 参考文献
WO2004016083A1 2004.2.26
CN1555886A 2004.12.22
审查员 边 昕

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所
代理人 程 泳

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种测定微量醋酸亮丙瑞林的方法及其应用

[57] 摘要

本发明涉及一种新型微量醋酸亮丙瑞林的测定方法，其采用酶联免疫吸附测定法其中利用抗醋酸亮丙瑞林抗血清完成测定，血清样品中醋酸亮丙瑞林含量的有效检测范围为 0.025 – 1000ng/ml。 本发明还涉及所述测定方法用于定性或定量检测生物样品中的醋酸亮丙瑞林含量、醋酸亮丙瑞林新药开发及其药代动力学研究的用途。

1. 一种测定微量醋酸亮丙瑞林的方法，其特征在于采用酶联免疫测定技术，其中利用抗醋酸亮丙瑞林抗血清完成测定，血清样品中醋酸亮丙瑞林含量的有效检测范围为0.025-1000 ng/ml，其中所述抗醋酸亮丙瑞林抗血清通过醋酸亮丙瑞林小肽与载体蛋白牛血清白蛋白偶连成复合物作为人工抗原免疫大白兔制备，其中所述抗醋酸亮丙瑞林抗血清的效价为1:50万。

2. 权利要求1所述的方法用于检测哺乳动物在施用醋酸亮丙瑞林微球制剂后，体内醋酸亮丙瑞林的含量变化及代谢研究的用途。

3. 权利要求2所述的用途，其中所述哺乳动物为人。

一种测定微量醋酸亮丙瑞林的方法及其应用

技术领域

本发明涉及一种新型微量醋酸亮丙瑞林的测定方法，其采用酶联免疫吸附测定法其中利用抗醋酸亮丙瑞林抗血清完成测定，血清样品中醋酸亮丙瑞林含量的有效检测范围为 0.025-1000 ng/ml。本发明还涉及所述测定方法用于定性或定量检测生物样品中的醋酸亮丙瑞林含量、醋酸亮丙瑞林新药开发及其药代动力学研究的用途。

背景技术

醋酸亮丙瑞林（Leuprorelin acetate，以下简称为 LA）是一种强效促性腺激素释放激动剂。使用初期可刺激垂体分泌促性腺激素，诱导生殖器官生成类固醇。长期使用会使垂体促性腺激素受体脱敏和/或下调，减少促性腺激素的释放，从而抑制卵巢或睾丸的性腺激素释放。临床上醋酸亮丙瑞林被用于治疗各种激素依赖性疾病如前列腺癌、子宫内膜异位、子宫肌瘤和性早熟。

醋酸亮丙瑞林是人工合成的九肽，为天然的促性腺激素释放激素（GnRH 或 LH-RH）的类似物。化学命名为：5－氧－L－丙基－L－组氨酰－L－色氨酰—L－丝氨酰－L－酪氨酰－D－亮氨酰—L－亮氨酰－L－精氨酰－N－乙基－L－脯氨酰胺乙酸（盐）。

文献研究表明，目前血清及排泄物等生物样品中微量醋酸亮丙瑞林的检测，主要采用双抗体放射免疫法来测定。Harish B.等人曾提及 Primedica 公司的 Worcester,MA 建立了一个 LC/MS/MS 方法，包括使用内源性 LH-RH 多肽作标准，用乙腈沉淀蛋白， HPLC 提取分离以及用质谱分析多肽等，但未见文献详细报道。1991 年 Hayao Ueno 等人建立起一个 HPLC-RIA 法测定醋酸亮丙瑞林。虽然这些检测方法灵敏度比较高，但均有一个共同的缺点，即：采用同位素，容易造成环境污染，

且操作复杂，价格昂贵，必须配备高级仪器设备，不适合临床使用。因此，建立一种操作简单，价兼，特异性好及高灵敏的微量醋酸亮丙瑞林检测技术有着很重要的临床应用价值。

发明内容

本发明涉及一种测定微量醋酸亮丙瑞林的方法，其特征在于采用酶联免疫测定技术，其中利用抗醋酸亮丙瑞林抗血清完成测定。在本发明的一个实施方案中，所述抗醋酸亮丙瑞林抗血清通过醋酸亮丙瑞林小肽与载体蛋白偶连成复合物之人工抗原免疫大白兔制备。在本发明的一个具体实施方案中，所述载体蛋白为牛血清白蛋白（BSA），所得复合物为 LA－BSA，所得醋酸亮丙瑞林抗血清的效价为 1:50 万。在本发明的一个实施方案中，血清样品中醋酸亮丙瑞林含量的有效检测范围为 0.025-1000 ng/ml。本发明的又一方面还涉及本发明所述的测定微量醋酸亮丙瑞林的方法用于检测哺乳动物（优选为人）在使用醋酸亮丙瑞林微球制剂体内醋酸亮丙瑞林的含量及其变化过程的用途。

具体的，本发明涉及一种用于测定微量醋酸亮丙瑞林的新方法，其中采用酶联免疫测定技术，利用抗醋酸亮丙瑞林抗血清完成测定，其中所述抗醋酸亮丙瑞林抗血清是通过将醋酸亮丙瑞林小肽在偶连剂戊二醛的作用下与载体蛋白（BSA）偶连成 LA-BSA 复合物，将所得复合物作为人工抗原，制成乳化佐剂，免疫大白兔，获得高效价(1:50 万)的抗醋酸亮丙瑞林抗血清。

本发明的完成基于如下工作：采用如上述所得抗醋酸亮丙瑞林抗血清建立醋酸亮丙瑞林酶联免疫吸附测定方法，测定结果使用单位点的竞争性结合模型方程拟合。统计分析结果显示本发明检测血清样品中醋酸亮丙瑞林含量的有效检测范围为 0.025-1000 ng/ml。通过本发明所述的方法能够成功检测哺乳动物，优选为人，在使用醋酸亮丙瑞林微球制剂后，其体内醋酸亮丙瑞林的含量及其变化过程。

本发明所建立的酶联免疫吸附测定方法主要采用 96 孔酶标板，辣根过氧化物酶-羊抗兔免疫球蛋白、抗抗醋酸亮丙瑞林抗血清，标准醋

酸亮丙瑞林、3，3'，5，5'－四甲基联苯胺、酶标仪、包被液、洗涤液、封闭液、样品稀释液、终止液等来完成。

本发明所述方法作为一种新型微量醋酸亮丙瑞林酶联免疫吸附测定法，具有优于现有检测技术的灵敏度和特异性，可用于样品中微量醋酸亮丙瑞林的检测，为醋酸亮丙瑞林微球制剂在哺乳动物，尤其是人体内的药物代谢研究提供了有效的检测手段。本发明所述方法也可用于醋酸亮丙瑞林微球制剂的开发，同时可用于临床上测定使用醋酸亮丙瑞林患者体内药物浓度的变化，通过连续观察其动态变化能够为指导临床醋酸亮丙瑞林的合理使用提供实验依据。

以下结合说明书附图和实施例对本发明所述方法进一步予以阐明。所述实施例作为示例并不意在限制本发明所要求保护的范围。

附图说明

图 1. 不同抗原与抗体的特异性结合实验。

图 2. 醋酸亮丙瑞林在比格犬血清中的标准曲线（n =5）

实施例 1 醋酸亮丙瑞林抗血清的制备

1 材料与试剂

1.1 动物：大白兔，2.5 公斤，雄性，本院提供。

1.2 0.1M pH 7.0 磷酸缓盐冲液

取 0.2M NaH_2PO_4 39ml， 0.2M Na_2HPO_4 61ml，加蒸馏水到 200ml。

1.3 0.021M 戊二醛溶液

取 50%戊二醛 0.042ml，加 0.1M 磷酸盐缓冲液 pH 7.0 到 10ml。

1.4 2%牛血清白蛋白溶液：

取 100mg 牛血清白蛋白(BSA)溶于 5ml 0.1M pH 7.0 磷酸盐缓冲液

1.5 0.4%醋酸亮丙瑞林溶液：

取 20mg 醋酸亮丙瑞林溶于 5ml 0.1M pH 7.0 磷酸盐缓冲液。

1.6 福氏不完全佐剂：

羊毛脂 1 份，液体石蜡 4 份，高压灭菌 20min。

1.7 卡介苗 80mg。

2 人工抗原（LA-BSA）合成

分别取 2%牛血清白蛋白 5 ml，0.4%亮并瑞林溶液 5 ml，在 4℃搅拌下将两者逐滴混匀，慢慢滴入 0.021 M 戊二醛溶液 4 ml，在冷库中于 10℃条件下继续搅拌 7 小时，溶液为淡黄色，然后用 0.01 M PBS pH 7.2 缓冲液透析，每天早晚换透析液一次，共 5 次，将透析后的人工抗原加生理盐水到 20 ml，此时醋酸亮丙瑞林浓度为 1mg/ml，分装，-20℃冰箱保存备用。

3 免疫抗原的制备

取福氏不完全佐剂 5 ml，加卡介苗 80 mg/ml，1 mg/ml 醋酸亮丙瑞林人工抗原 4 ml，共 10 ml，置入 10 ml 注射器内，由一端推向另一端，开始时要轻、慢，往复操作，直到很难推得动为止，即为免疫抗原，用于初次免疫，以后免疫抗原不加卡介苗。

4 动物免疫

第一次免疫采用福氏完全佐剂制成的抗原，每只兔子皮下注射 2 ml， 20 天后，进行第二次免疫为福氏不完全佐剂，免疫量相同，以后，每隔一个月免疫一次，一直到免疫 12 次，第 13 次时动脉给人工抗原 0.4ml(1mg/ml)，5 天动脉采血。

5 收集抗血清

动脉采血后，室温放置 2 小时，然后放 4℃冰箱，次日，以 3000 rpm 离心 5min，收集上清，共 37ml，分装 1ml/管，-70℃冰箱保存备用。

实施例 2 醋酸亮丙瑞林酶联免疫吸附测定法

1 仪器及试剂

1.1 仪器

微量移液器（GILSON），酶标仪（BIO-RAD），-70℃冰箱（Forma Scientific, INC），96 孔酶标板（江苏海门市三和亚美玻璃制品厂），37℃孵箱(天津医疗器械厂)，4℃、-20℃冰箱(青岛海尔股份有限公司)，LD5-2A 型医用离心机（北京医用离心机厂）等。

1.2 试剂

抗醋酸亮丙瑞林抗血清，醋酸亮丙瑞林（批号：011008，纯度为99.57％，本所七室提供），羊抗兔辣根过氧化酶（批号：56403，北京中山生物技术有限公司公司），3，3'，5，5'－四甲基联苯胺（Sigma），脱脂奶粉（批号：8631550，内蒙古伊利实业集团股份有限公司），其它试剂均为国产，分析纯。

1.3 试剂制备

1.3.1 包被稀释液(碳酸盐缓冲液，pH9.6)

Na_2CO_3 1.59g，$NaHCO_3$ 2.93g，加双蒸水溶解至 1000ml。

1.3.2 磷酸盐缓冲液（PBS，pH7.4)

NaCl 8.1816g，KCl 0.2013g，KH_2PO_4 0.245 g，无水 Na_2HPO_4 1.434 g，加双蒸水溶解至 1000ml。

1.3.3 洗涤液（PBS-Tween20）

吐温 Tween20 1.0ml，加 PBS 缓冲液溶解至 1000ml 。

1.3.4 样品稀释液（1%脱脂奶粉-PBS）：脱脂奶粉 1g，加 PBS 缓冲液溶解至 100ml 。

1.3.5 封闭液(10%脱脂奶粉-PBS)：脱脂奶粉 10g，加 PBS 缓冲液溶解至 100ml。

1.3.6 底物显色液

A 液：柠檬酸 0.32 g，醋酸钠 2.72 g，30%过氧化氢 0.6ml，加双蒸水溶解至 1000ml;

B 液：EDTA2Na 0.4g，柠檬酸 1.9 g，甘油 150 ml，加双蒸水溶解至 1000ml;

临用前取 A 液：B 液（1：1）混合。

1.3.7 终止液（2M 硫酸）

取 445 ml 双蒸水，缓慢滴加浓硫酸 56ml。

1.3.8 醋酸亮丙瑞林标准样品（1mg/ml）

用万分之一电子天平称取醋酸亮丙瑞林 10mg，溶于 10ml 生理盐水容量瓶，分装，-20℃冰箱保存备用。

1.3.9 醋酸亮丙瑞林样品

1.3.10 比格犬正常血清

2 操作

2.1 包被抗原

用包被液(pH 9.6)稀释醋酸亮丙瑞林贮备液至终浓度 15μg /ml，加到酶标板孔中，0.1 ml /孔，4℃孵育 5 天。

2.2 封闭:

用洗涤液洗涤已包被抗原酶标板，0.2 ml/孔，3 min/次，洗涤三次，0.2 ml/孔 10%脱脂奶粉 PBS (pH 7.4)，37℃孵育 1.5 小时，用洗涤液洗二次，甩干。

2.3 标准样品或待测样品的制备

2.3.1 标准样品

分别取 0.125-5000ng/ml 不同浓度的醋酸亮丙瑞林 0.07ml（终浓度为 0.025-1000ng/ml），加 1: 3428 兔抗醋酸亮丙瑞林抗血清 0.08 mL（终滴度为 1: 15000），加正常比格犬血清 0.2 mL，同时做空白对照，总反应体积为 0.35ml，置 37℃孵箱反应 2 小时。

2.3.2 待测样品

分别取待测样品 0.2 ml，加 1: 3428 兔抗醋酸亮丙瑞林抗血清 0.08 ml（终滴度为 1: 15000），加 1%脱脂奶粉 PBS pH 7.4 缓冲液 0.07 ml，同时做给药前空白对照，总反应体积为 0.35 mL，置 37℃孵箱反应 2 小时。

2.4 加样

把已制备好的标准样品和待测样品分别加入酶标板，0.1ml/孔，置 37℃孵箱反应 1 小时，用洗涤液洗三次，甩干。

2.5 加酶标二抗

在酶标板的每个孔中加入 1: 7000 酶标二抗（羊抗兔-HRP）0.1 ml，置 37℃孵箱反应 1 小时，用洗涤液洗五次，甩干。

2.6 显色

加底物显色液 0.1 ml/孔， 反应 10 min。

2.7 终止反应

加 2 mol/LH_2SO_4溶液 0.05 ml/孔。

2.8 测定

在 450nm 处测定光密度值。

2.9 计算

以醋酸亮丙瑞林浓度为横坐标， 光密度值为纵坐标，绘制标准曲线，并依此计算待测样品的含量。

实施例 3 标准曲线的制作

分别取不同浓度的醋酸亮丙瑞林 0.07mL（终浓度为 0.04375-8750 ng/mL），加 1: 3428 稀释的如实施例 1 所制备的兔抗醋酸亮丙瑞林抗血清 0.08 mL（终滴度为 1: 15000），加正常比格犬血清 0.2 mL，同时做空白对照，总反应体积为 0.35 mL，按“酶免测定方法”所述进行测定，以测定的 O.D.450 nm 值为纵坐标，以标准样品浓度的对数值为横坐标作图，使用一个位点的竞争性抑制方程（SigmaPlot 2000）对实验数据进行拟合以获得标准曲线（参见图 2）。其方程为:

$$y = \min + \frac{\max - \min}{1 + 10^{(x - \log EC50)Hillslope}}$$

标准曲线所选用浓度范围（0.04375-8750 ng/mL）内具有较好的量效关系，相关系数为 0.9998; 血清样品中醋酸亮丙瑞林的最低检测下限为 0.025ng/mL。

实施例 4. 酶联免疫吸附测定法对抗醋酸亮丙瑞林抗体的特异性

本发明所述酶联免疫吸附测定法对所制备的抗醋酸亮丙瑞林抗体具有很好的特异性（如图 1 所示）。

抗醋酸亮丙瑞林抗体分别与相同浓度（0.01，0.1，1，10，100，1000ng/mL）的醋酸亮丙瑞林和 LH-RH 及 Tα1 进行竞争抑制结合实验（参见图 1）。结果表明：该抗体只能和醋酸亮丙瑞林抗原有结合，并且表现出良好的量效关系。而抗体与 LH-RH，Tα1 没有结合。表明我们制备的醋酸亮丙瑞林抗体具有很好的特异性。

实施例 5 酶联免疫吸附测定方法测定醋酸亮丙瑞林在比格犬血清中的回收率研究

如表 1 所示，空白比格犬血清加入不同浓度的醋酸亮丙瑞林标准液，使血清样品浓度分别为 0.88， 1.75，8.75，17.5，43.75 和 87.5 ng/mL。按“酶免检测方法”所述测定，以加入量数值作为对照，计算血清样品中醋酸亮丙瑞林的回收率，表 1 为醋酸亮丙瑞林在比格犬血清中的回收率。试验结果表明：比格犬血清中各不同浓度的回收率均在 98％以上。

表 1 ELISA 法测定醋酸亮丙瑞林在比格犬血清中的回收率

加入量(ng/ml)	检出量 (ng/ml)	回收率 (%)	RSD (%)
0.88	0.89±0.34	102.17±38.32	37.51
1.75	2.18±0.80	124.33±45.95	36.96
8.75	8.42±0.99	96.21±11.31	11.75
17.5	18.17±2.38	103.85±13.57	13.07
43.75	37.42±4.01	85.53±9.16	10.71
87.5	98.83±21.45	112.95±24.51	21.70

n=6, X±SD

实施例 6 酶联免疫吸附测定方法测定醋酸亮丙瑞林在比格犬血清中精密度研究

空白比格犬血清加入不同浓度的醋酸亮丙瑞林标准液，使血清样品浓度分别为 0.1，5 和 100 ng/mL 。按“酶免检测方法”所述，在同一批内进行样品测定，以考察方法的批内精密度（ n = 6）。实验结果表明，各不同浓度样品批内精密度的 RSD 均小于 23.5％，结果见表 2。

空白比格犬血清加入不同浓度的醋酸亮丙瑞林标准液，使血清样品浓度分别为 0.5， 5， 50 和 500 ng/mL。按“酶免检测方法”所述，分析

不同批次（n =6）。表 3 为醋酸亮丙瑞林在比格犬血清中的批间精密度。实验结果表明，各不同浓度样品批间精密度的 RSD 均小于 22.7%（详见表 3）。

表 2. 醋酸亮丙瑞林批内精密度

加入量 (ng/mL)	检出量 (ng/mL)	RSD (%)
0.1	0.17±0.03	19.0
5	3.56±0.44	12.5
100	109.70±25.75	23.5

n=6, $\bar{X}$±SD

表 3. 醋酸亮丙瑞林批间精密度

加入量 (ng/mL)	检出量 (ng/mL)	RSD (%)
0.5	0.49±0.11	22.69
5	5.06±0.61	12.04
50	47.33±3.60	7.61
500	468.48±73.08	15.60

n=6, $\bar{X}$±SD

实施例 7 酶联免疫吸附测定方法测定醋酸亮丙瑞林在比格犬血清中稳定性研究

空白比格犬血清 1.0 mL，加入不同浓度的醋酸亮丙瑞林标准液，使血清样品浓度为 0.4375， 8.75， 175ng/mL。于－20℃放置不同时间后，按“酶免测定方法”所述进行样品测定，并与加入量进行比较。表 4 为样品放置不同时间后所测定的药物浓度，结果表明，样品的实测值与加入量的平均偏差均在±8.6％以内，说明醋酸亮丙瑞林在比格犬血清中于－20℃放置 35 天是稳定的（详见表 4）。

表 4. 醋酸亮丙瑞林在比格犬血清中的放置稳定性

放置时间（天）	加入量（ng/mL）	检出量（ng/mL）	检出率（%）
0	5	4.79±0.94	95.83
	100	99.11±28.04	99.1
3	5	7.42±0.62	148.3
	100	107.11±13.79	107.11
6	5	6.41±0.79	128.1
	100	107.28±15.41	107.3
12	5	6.37±0.42	127.4
	100	165.53±7.46	165.5
35	5	6.86±0.42	137.3
	100	141.60±13.48	141.6

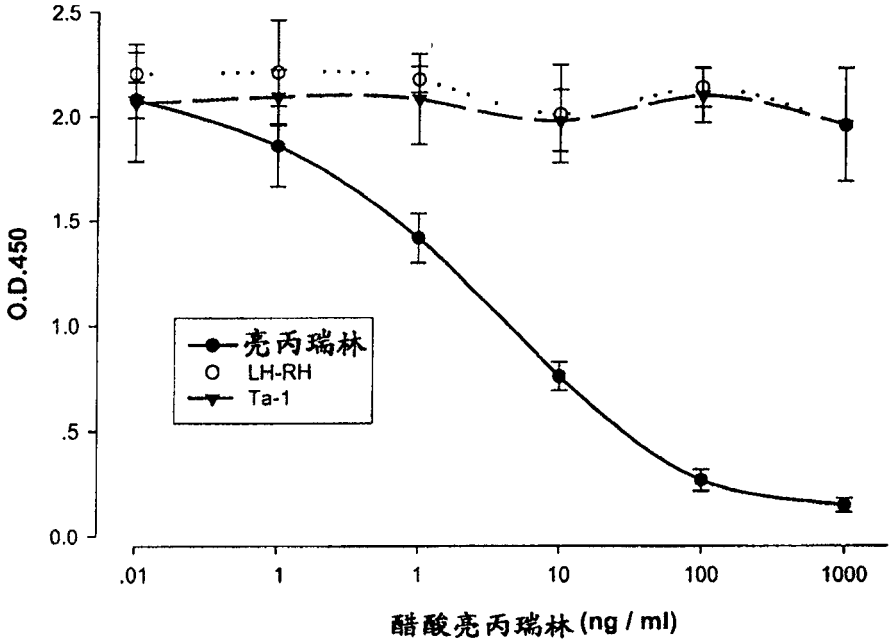
2.5
2.0
1.5
1.0
.5
0.0
O.D.450
亮丙瑞林
LH-RH
Ta-1
.01
1
1
10
100
1000
醋酸亮丙瑞林(ng / ml)

图1

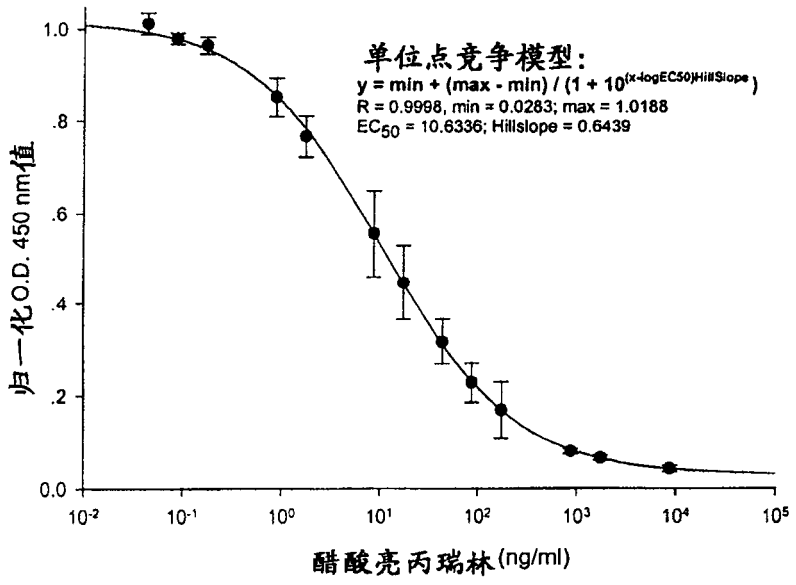
1.0
.8
.6
.4
.2
0.0
归一化O.D. 450 nm值
单位点竞争模型:
y = min + (max - min) / (1 + 10^(x-logEC50)HillSlope)
R = 0.9998, min = 0.0283; max = 1.0188
EC50 = 10.6336; Hillslope = 0.6439
10-2
10-1
100
101
102
103
104
105
醋酸亮丙瑞林(ng/ml)

图2

专利名称(译)	一种测定微量醋酸亮丙瑞林的方法及其应用		
公开(公告)号	CN100529757C	公开(公告)日	2009-08-19
申请号	CN200410102759.7	申请日	2004-12-28
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院毒物药物研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院毒物药物研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院毒物药物研究所		
[标]发明人	董泗建 郑健全 池木根 张振清 魏淑香 王晓英 梁远军 刘克良		
发明人	董泗建 郑健全 池木根 张振清 魏淑香 王晓英 梁远军 刘克良		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535		
代理人(译)	程泳		
其他公开文献	CN1796996A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种新型微量醋酸亮丙瑞林的测定方法，其采用酶联免疫吸附测定法其中利用抗醋酸亮丙瑞林抗血清完成测定，血清样品中醋酸亮丙瑞林含量的有效检测范围为0.025-1000ng/ml。本发明还涉及所述测定方法用于定性或定量检测生物样品中的醋酸亮丙瑞林含量、醋酸亮丙瑞林新药开发及其药代动力学研究的用途。