



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102621299 B

(45) 授权公告日 2014. 10. 22

(21) 申请号 201210098330. X

(22) 申请日 2012. 04. 06

(73) 专利权人 苏州博源医疗科技有限公司

地址 215000 江苏省苏州市苏州高新技术产业
业开发区科灵路 78 号

(72) 发明人 虞留明 田军 袁红霞 蔡江丽

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102368054 A, 2012. 03. 07, 说明书第 28
段、第 48-49 段、第 50-54 段、58-59 段。

US 2005/0176080 A1, 2005. 08. 11, 说明书第
4 段、第 19 段、第 28 段、第 33-37 段, 附图 1-3.

CN 102095865 A, 2011. 06. 15, 全文。

US 2009/0087865 A1, 2009. 04. 02, 说明书第
84-85 段、147-148 段。

文爱东等. 酶联免疫法与微粒子酶免疫法检

测全血他克莫司浓度的比较. 《中国医院药学杂
志》. 2002, 第 22 卷(第 6 期), 第 346 页“1. 3 试
剂与仪器”和 347 页“2. 1 测试原理和程序”。

审查员 贾静

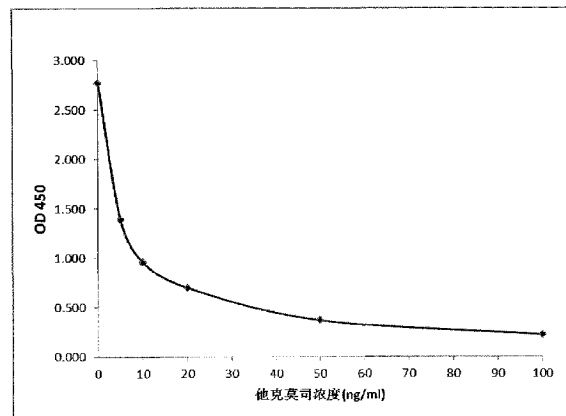
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54) 发明名称

他克莫司检测方法

(57) 摘要

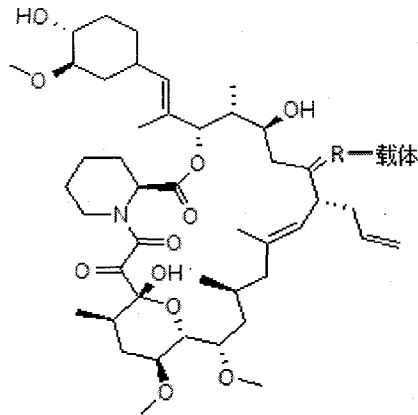
本发明公开了一种他克莫司检测方法, 包括
以下步骤: 将抗他克莫司特异性抗体包被在固相
支持物上, 加入待测样本和他克莫司酶标偶联物;
使所述待测样本中他克莫司与所述他克莫司酶
标偶联物竞争性地结合抗所述他克莫司特异性
抗体; 经固相 ELISA 洗涤步骤后, 加入对应酶的底物
显色, 测量相应的吸光值, 对照他克莫司 ELISA 检
测标准曲线, 获取待测样本中他克莫司的含量。本
发明的检测方法, 特异性强, 可以准确的确定待测
样本中是否存在他克莫司, 同样可以准确地确定
他克莫司的含量。



1. 一种他克莫司检测方法,其特征在于:包括以下步骤:

将抗他克莫司特异性抗体包被在固相支持物上,加入待测样本和他克莫司酶标偶联物;使所述待测样本中他克莫司与所述他克莫司酶标偶联物竞争性地结合所述抗他克莫司特异性抗体;经固相 ELISA 洗涤步骤后,加入对应酶的底物显色,测量相应的吸光值,对照他克莫司 ELISA 检测标准曲线,获取待测样本中他克莫司的含量,

其中,所述抗他克莫司特异性抗体由他克莫司免疫原免疫动物得到,所述他克莫司免疫原的结构式如(I)所示:



式 (I)

式 (I) 中, R 为 $N-O-(CH_2)_3-COO-$, 载体具有免疫原性, 其选自牛血清白蛋白。

2. 根据权利要求 1 所述的他克莫司检测方法,其特征在于:所述他克莫司 ELISA 检测标准曲线的制备方法包括:

(1) 将他克莫司粉末溶解于甲醇溶液,制备成 1mg/ml 的储存液,用 ELISA 缓冲液将储存液依次稀释为 100ng/ml 、 50ng/ml 、 20ng/ml 、 10ng/ml 、 5ng/ml 和 0ng/ml 的标准样品,其中, ELISA 缓冲液含有 50.0mM Tris, 145mM NaCl 和 0.25% 的 BSA;

(2) 将抗他克莫司特异性抗体包被在固相支持物上,加入所述标准样品和他克莫司酶标偶联物,使标准样品的他克莫司与他克莫司酶标偶联物竞争性地结合抗他克莫司特异性抗体,经固相 ELISA 洗涤步骤后,加入对应酶的底物显色,测量相应的吸光值;

(3) 以各标准样品中他克莫司的吸光值和他克莫司含量为坐标获取他克莫司 ELISA 检测标准曲线。

3. 根据权利要求 1 所述的他克莫司检测方法,其特征在于:所述步骤包括:

用 PBS 将上述抗他克莫司特异性抗体稀释成 $1:1000$ – $1:10000$ 的终浓度溶液, $100\mu\text{L}$ /孔包被在 96 孔酶联板上, 4°C 放置 12–24h;

用 PBS 将上述包被有所述抗他克莫司特异性抗体的 96 孔酶联板洗涤 3 次后,加入 $200\mu\text{L}$ /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 $20\mu\text{L}$ /孔的标准品,再加入 $100\mu\text{L}$ /孔工作浓度的他克莫司衍生物酶标偶联物;室温下孵育 30min 后 PBS 洗板 5 次;然后每孔加入 $100\mu\text{L}$ TMB 底物,室温孵育 30min 再每孔加入 $100\mu\text{L}$ 2M 硫酸。

4. 根据权利要求 3 所述的他克莫司检测方法,其特征在于:所述他克莫司衍生物酶标偶联物中酶包括:辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或葡萄糖-6-磷酸脱氢酶。

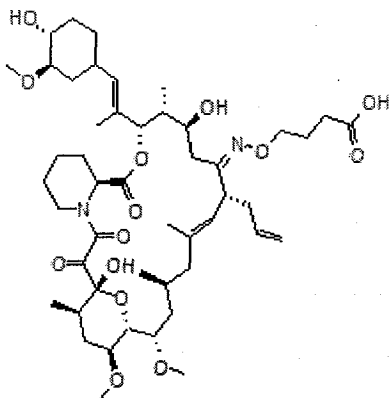
5. 据权利要求 4 所述的他克莫司检测方法,其特征在于:所述他克莫司衍生物酶标偶联物的制备方法包括:

(1) 制备酶溶液:将酶在室温条件下溶解于磷酸缓冲液中,终浓度为 2-10mg/mL;

(2) 使具有式 (III) 中结构的他克莫司衍生物活化及偶联物的合成:

用有机溶剂溶解具有式 (III) 中结构的他克莫司衍生物,使其终浓度为 1-50mg/mL,通过 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺的方法或 EDAC 和 N-羟基琥珀酰亚胺联合使用的方法进行活化,并与所述酶溶液进行交联反应,经纯化和透析后得到他克莫司衍生物酶标偶联物,所述的有机溶剂为二甲基亚砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO)、二甲基甲酰胺 (N,N-Dimethylformamide, DMF)、甲醇或乙醇,

所述具有式 (III) 结构的他克莫司衍生物的结构式为:



式 (III)。

6. 根据权利要求 5 所述的他克莫司检测方法,其特征在于:所述待测样本为生理样本。

7. 根据权利要求 6 所述的他克莫司检测方法,其特征在于:所述生理样本为血液样本。

他克莫司检测方法

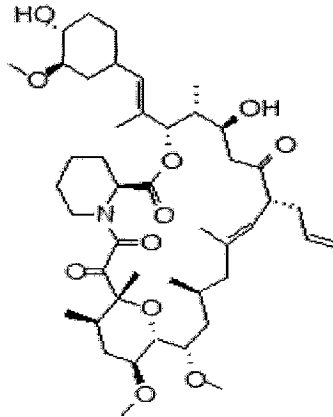
技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,特别涉及一种他克莫司检测方法。

背景技术

[0002] 他克莫司 (Tacrolimus, FK506),其结构式如式 (I) 所示。

[0003]



[0004] 式 (II)

[0005] 他克莫司是一种免疫抑制剂,是器官移植,特别是肾脏移植患者的常用药物,移植后合理服用他克莫司可使器官免遭排斥。剂量不足会导致机体对移植器官产生排斥反应;而剂量过高又会引起严重的副反应,包括肾脏毒性,肝脏毒性和其他一系列的并发症。通过检测病人全血中的他克莫司的浓度,结合其它临床指征来合理用药,是确保器官移植接受者获得免疫抑制的最有效方法。

[0006] 现有检测他克莫司的方法主要是高效液相色谱法 (High performance liquid chromatography, HPLC)、液相色谱串联质谱联用法 (Liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC/MS/MS)、放免法和荧光偏振法。HPLC 及 LC/MS/MS 方法前处理复杂,耗时,费用及对人员操作要求高;放免法对操作人员有放射性危害;而荧光偏振法的试剂主要依赖进口,费用极其昂贵。

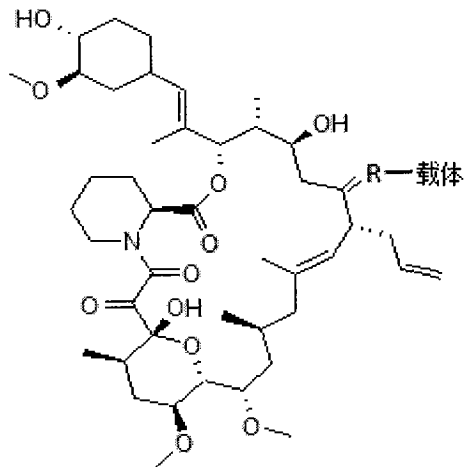
发明内容

[0007] 本发明就是为了弥补上述方法存在的缺陷,研制出了一种含有他克莫司特异性抗体的免疫检验方法。本发明利用一种他克莫司的检测试剂,建立了一种他克莫司的酶免疫检测方法,为他克莫司的临床样本检测带来便利。

[0008] 本发明的目的在于提供一种他克莫司检测方法。本发明所采取的技术方案是:将抗他克莫司特异性抗体包被在固相支持物上,加入待测样本和他克莫司酶标偶联物;使待测样本中他克莫司与他克莫司酶标偶联物竞争性地结合抗他克莫司特异性抗体;经固相 ELISA 洗涤步骤后,加入对应酶的底物显色,测量相应的吸光值,对照他克莫司 ELISA 检测标准曲线,获取待测样本中他克莫司的含量,

[0009] 其中抗他克莫司特异性抗体由他克莫司免疫原免疫动物得到,他克莫司免疫原的结构式如式(I)所示:

[0010]



[0011] 式(I)

[0012] 式中,R为连接基团,载体具有免疫原性。

[0013] 优选的,上述具有免疫原性的载体采用足够大的具备免疫原性的物质即可,通常采用的免疫原性载体包括蛋白质和多肽。在本发明中载体优选为具有免疫原性的蛋白质,最常用的免疫原性载体包括血清蛋白,血蓝蛋白(KLH)和甲状腺球蛋白等。载体的选择是本领域技术人员的基本常识,在此不再赘述。

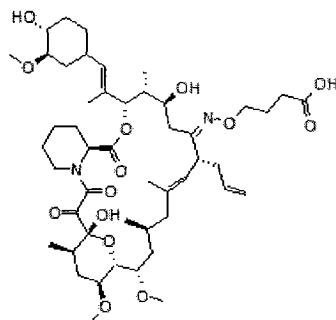
[0014] 在本发明的一种优选实施例中,上述他克莫司免疫原中R为 $N-(CH_2)_n-COO^-$ 或 $N-O-(CH_2)_n-COO^-$,n是1至20之间的整数。优选R为 $N-O-(CH_2)_n-COO^-$,n是1至10。更优选的R为 $N-O-(CH_2)_3-COO^-$ 。具有这种结构的他克莫司免疫原免疫原性高,可以诱导得到高效价的抗他克莫司特异性抗体。

[0015] 本发明所提供的他克莫司免疫原可以采用多种常规方法制备而得,对于这些常规的制备方法本领域技术人员在本发明所提供的他克莫司免疫原的结构式的基础上能够经过合理分析进而制备获得。

[0016] 以下将给出一种他克莫司免疫原的制备方法,以供参考,具体制备方法如下:

[0017] (1)、制备具有式(III)中结构的他克莫司衍生物;

[0018]



[0019] 式(III)

[0020] (2)、将具有免疫原性的载体溶解形成具有免疫原性的载体溶液;

[0021] (3)、将具有式(III)中结构的他克莫司衍生物加入到上述具有免疫原性的载体溶液中,使具有式(III)中结构的他克莫司衍生物中连接基团所在部分和具有免疫原性的

载体发生缩聚反应,形成他克莫司免疫原。

[0022] 当 R 为 $N-O-(CH_2)_3-COO-$ 时,上述他克莫司免疫原的合成途径和方法如下:

[0023] (1)、具有式 (III) 中结构的他克莫司衍生物的合成

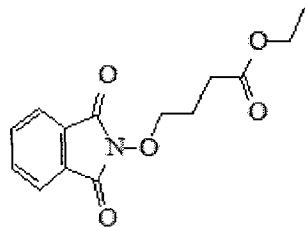
[0024] ①、制备具有连接基团 ($N-O-(CH_2)_3-COO-$ 基团) 的盐酸盐:

[0025] 用有机溶剂 A 溶解 10-50g 的 N-羟基-邻苯二甲酰亚胺、10-50g 的 5-溴戊酸乙酯,其中有机溶剂 A 的使用量根据需要在 100-500mL 左右。使其在第一催化剂的作用下进行加热反应,此时第一催化剂的使用量根据实际需要在 1-10g 左右,加热反应生成物经有机溶剂 B 萃取,干燥得到 4-邻苯二甲酰亚胺氧基丁酸乙酯 (Ethy4-(1,3-dioxoisindolin-2-yloxy)butanoate),即如下结构式 (IV) 中的化合物。

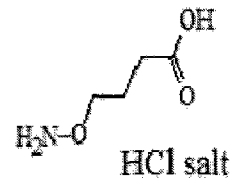
[0026] 用无机酸 C 溶解具有式 (IV) 中结构的化合物,无机酸 C 的使用量根据需要在 100-400mL 左右,经有机溶剂 D 萃取,干燥得到 4-胺氧基丁酸 (4-(amino oxy)butanoic acid) 的盐酸盐,即如下结构式 (V) 中化合物,也就是具有连接基团 ($=N-O-(CH_2)_3-COO-$ 基团) 的盐酸盐:

[0027] 其中,具有式 (IV) 中结构的化合物和具有式 (V) 中结构的化合物结构如下:

[0028]



式 (IV)

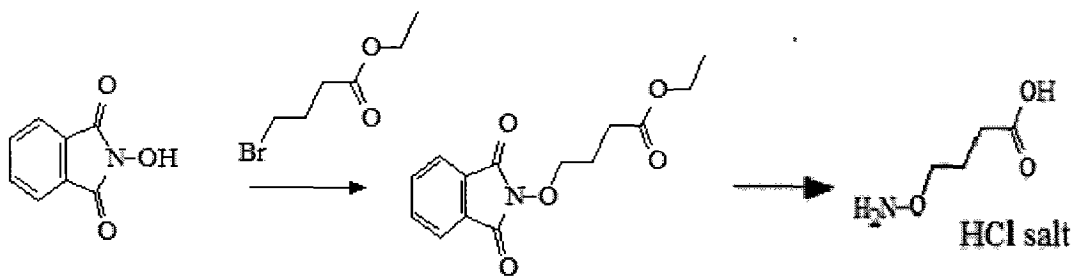


式 (V)

[0029]

[0030] 制备具有连接基团 ($N-O-(CH_2)_3-COO-$ 基团) 的盐酸盐化学反应式如下:

[0031]

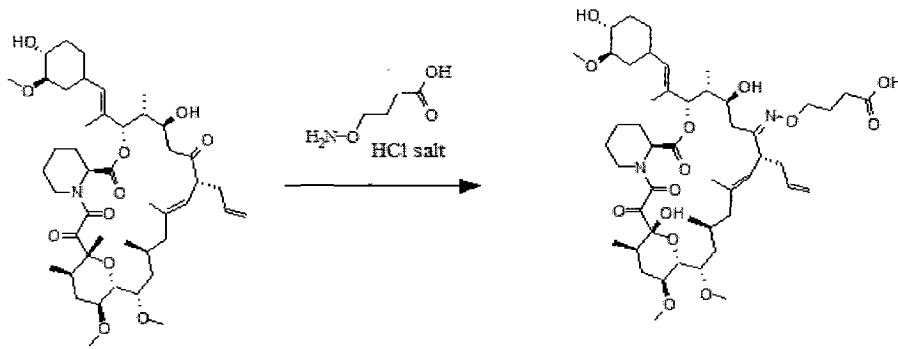


[0032] ②、利用具有连接基团 ($N-O-(CH_2)_3-COO-$ 基团) 的盐酸盐制备具有式 (III) 中结构的他克莫司衍生物。

[0033] 用有机溶剂 D 溶解 0.5-5.0g 的他克莫司、0.5-10g 的具有式 (V) 中结构的化合物 4-胺氧基丁酸的盐酸盐,其中有机溶剂 D 的使用量根据实际情况可以在 10-50mL 左右。使其在第二催化剂的作用下发生反应,此处第二催化剂的使用量根据实际需要可以在 1.0-5.0g 之间,反应后经浓缩,加水用有机溶剂 E 萃取,经干燥、浓缩和纯化得到具有式 (III) 中结构的他克莫司的衍生物。

[0034] 利用具有连接基团 ($N-O-(CH_2)_3-COO-$ 基团) 的盐酸盐制备具有式 (III) 中结构的他克莫司衍生物的化学反应式如下:

[0035]



[0036] (2)、载体溶液的制备：将具有免疫原性的蛋白质 100-300mg 溶于 10-100ml 的 0.2M, pH 8.5 磷酸盐缓冲液中。

[0037] (3)、他克莫司衍生物的活化及免疫原的合成：用有机溶剂 A 溶解 50-500mg 的具有式 (III) 中结构的他克莫司衍生物，此处有机溶剂 A 的使用量根据需求为 5-50ml 左右，通过 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺 (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) Carbodiimide, EDAC) 的方法或 EDAC 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (N-hydroxysuccinimide, Sulfo-NHS) 联合使用的方法进行活化的方法进行活化并与载体溶液进行交联反应，经透析纯化后得到具有免疫原性的他克莫司免疫原。

[0038] 上述方法中所述的 EDAC 的方法是现有技术已知的，如文献 Hermanson. Bioconjugate techniques. 2nd edition, 215-221.，中所记载的方法。

[0039] 上述方法中可选的有机溶剂 A 包括但不限于二甲基亚砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO)、二甲基甲酰胺 (N, N-Dimethylformamide, DMF)、甲醇或乙醇，优选 DMF；可选的有机溶剂 B 包括但不限于乙酸乙酯 (Ethyl acetate, EtOAc)，乙醚或氯仿，优选乙醚；可选的无机酸溶液 C 包括但不限于盐酸溶液或硫酸溶液，优选盐酸溶液。可选的有机溶剂 D 包括但不限于乙酸乙酯或乙醚，优选乙酸乙酯；可选的有机溶剂 E 包括但不限于乙酸乙酯，乙醚或氯仿，优选乙醚；可选的第一催化剂包括但不限于甲醇钠 (NaOMe)，氧化钾或氧化钠，优选甲醇钠；可选的第二催化剂包括但不限于醋酸钠、对甲苯磺酸。

[0040] 当 R 为 $N-(CH_2)_n-COO^-$ 时，除了制备具有连接基团 ($N-(CH_2)_3-COO^-$ 基团) 的盐酸盐的步骤不同外，他克莫司免疫原的合成途径与 R 为 $N-O-(CH_2)_n-COO^-$ 时基本相同。

[0041] 在本发明中还提供了一种抗他克莫司特异性抗体，由上述他克莫司免疫原免疫动物后生产得到。

[0042] 本发明的抗体可以通过现有技术制备得到。在本发明中优选采用以下方法获得抗他克莫司特异性抗体：

[0043] (1) 用磷酸盐缓冲液将合成的他克莫司免疫原稀释至 0.5-5.0mg/mL；

[0044] (2) 经常规弗氏佐剂法对动物进行注射，注射后抽取动物特异性抗血清，得到有效的抗体。

[0045] 上述方法中，优选用磷酸盐缓冲液将他克莫司免疫原稀释至 1.0-2.0mg/mL。本发明中所指的“抗体”不仅仅指完整的抗体分子，也包括保留完整抗体特异性结合能力的抗体片断或者衍生物。本发明的抗体可以是多克隆抗体也可以是单克隆抗体，优选为多克隆抗体。

[0046] 本发明的抗体可以通过现有技术制备得到。获得多克隆抗体的典型方法是使用单一的免疫原，可选地加入佐剂后，在动物的一个或者多个部位进行免疫，宿主动物包括：兔，

山羊,小鼠,绵羊,豚鼠或马。优选为家兔。动物定时采血得到适量的特异抗血清,抗血清可以纯化。单克隆抗体可通过体细胞杂交技术来制作。

[0047] 优选地,上述他克莫司 ELISA 检测标准曲线的制备方法包括:

[0048] (1) 将他克莫司粉末溶解于甲醇溶液,制备成 1mg/ml 的储存液,用 ELISA 缓冲液将储存液依次稀释为 100ng/ml、50ng/ml、20ng/ml、10ng/ml、5ng/ml 和 0ng/ml 的标准样品,其中,ELISA 缓冲液含有 50.0mM Tris,145mM NaCl 和 0.25% 的 BSA;

[0049] (2) 将抗他克莫司特异性抗体包被在固相支持物上,加入标准样品和他克莫司酶标偶联物,使标准样品的他克莫司与他克莫司酶标偶联物竞争性地结合抗他克莫司特异性抗体,经固相 ELISA 洗涤步骤后,加入对应酶的底物显色,测量相应的吸光值;

[0050] (3) 利用 ELISA 检测法获取所述他克莫司的吸光值,以他克莫司的吸光值和他克莫司含量为坐标获取他克莫司 ELISA 检测标准曲线。

[0051] 优选地,在本发明中一种他克莫司检测方法中抗他克莫司特异性抗体、待测样本以及他克莫司酶标偶联物通过固相 ELISA 洗涤处理的方法显色并进行吸光值的测定,,固相 ELISA 洗涤处理的具体步骤包括:用 PBS 将上述抗他克莫司抗体稀释成 1:1000-1:10000 的终浓度溶液,100 μ L/孔包被在 96 孔酶联板上,4 $^{\circ}$ C 放置 12-24h;用 PBS 将上述包被有所述抗他克莫司抗体的 96 孔酶联板洗涤 3 次后,加入 200 μ L/孔的 0.5% 的 BSA 溶液,4 $^{\circ}$ C 封闭放置 8-16h。然后用 PBS 洗涤 3 次,加入 20 μ L/孔的标准品。再加入 100 μ L/孔工作浓度的他克莫司衍生物酶标偶联物;室温下孵育 30min 后 PBS 洗板 5 次;然后每孔加入 100 μ L TMB 底物,室温孵育 30min 再每孔加入 100 μ L 终止液(2M 硫酸)。

[0052] 由上述内容可知,在本发明中他克莫司检测方法中是使用酶免疫测定法对他克莫司进行测量。在使用酶免疫检测法时,向反应体系中加入酶标偶联物及底物:酶标偶联物的酶可以是辣根过氧化物酶(Horse radish peroxidase, HRP)、碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase, AP)或葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(Glucose-6-phosphate Dehydrogenase, G6PDH)等,底物为对应酶的底物。

[0053] 酶免疫检测方法的原理如下:

[0054] 将待测样本与抗他克莫司的特异性抗体接触,采用制得的抗体进行他克莫司的酶联免疫吸附检验(Enzyme-linked Immunosorbant assay, ELISA)。该检验是一种固相竞争性 ELISA 反应。该检验的基本原理是:液体样本中游离的他克莫司与辣根过氧化物酶(Horse Radish Peroxidase, HRP)标记的他克莫司衍生物对包被在固相支持物上的特异性抗体的结合位点进行竞争,通过洗涤去掉未结合的分子,再加入 HRP 酶的底物进行显色反应。液体样本中他克莫司的含量越多,与固相支持物上的抗体结合的他克莫司衍生物-HRP 酶偶联物就越少,显色越浅。因此可以通过制作标准曲线来定量样本中的他克莫司的浓度。

[0055] 本发明他克莫司检测方法中上述酶标偶联物可以通过以下方法制备:

[0056] (1) 酶溶液制备:称取选自 HRP、AP 或 G6PDH 的酶,在室温条件下溶解于磷酸缓冲液中,终浓度为 2-10mg/mL;

[0057] (2) 使上述具有式(III)中结构的他克莫司衍生物活化及偶联物的合成:

[0058] 用有机溶剂溶解上文所示的具有式(III)中结构的他克莫司衍生物,使其终浓度为 1-50mg/mL,通过 EDAC 的方法或 EDAC 和 N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, Sulfo-NHS)联合使用的方法进行活化,并与酶溶液进行交联反应,经纯化和透析后得到他

克莫司衍生物酶标偶联物。

[0059] 上述步骤 (2) 中所使用的有机溶剂为 :DMF、DMSO、甲醇或乙醇。

[0060] 在本发明中,优选采用如下制备方法获取酶标偶联物 :

[0061] (1) 酶溶液制备 :称取 HRP 在室温条件下溶解于磷酸缓冲液中,终浓度为 3-5mg/mL ;

[0062] (2) 他克莫司衍生物的活化及偶联物的合成 :用 DMF 溶解他克莫司衍生物,浓度为 1-20mg/mL,通过 EDAC 的方法进行活化,并与 HRP 溶液进行交联反应,经纯化和透析后得到 HRP- 他克莫司偶联物。

[0063] 更为优选地,酶免疫测定法为酶联免疫吸附剂测定法。优选地,本发明他克莫司检测方法中待测样本为生理样本。更为优选地待测样本为血液样本。本发明的检测方法,特异性强,可以准确的确定待测样本中是否存在他克莫司,同样可以准确地确定他克莫司的含量。

附图说明

[0064] 图 1 是他克莫司 ELISA 检测标准曲线。

[0065] 实施方式

[0066] 下面结合实施例,进一步说明本发明。

[0067] 实施例 1

[0068] 他克莫司免疫原,其中 R 为 N-O-(CH₂)₃-COO-,载体为牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA)。

[0069] 制备方法如下 :

[0070] 步骤一、具有式 (III) 结构的他克莫司衍生物的合成

[0071] (1) 制备具有式 IV 化合物 4- 邻苯二甲酰亚胺氧基丁酸乙酯 :

[0072] 先用 200mL 二甲基甲酰胺 (DMF) 溶解 15.0g,93mmol N- 羟基 - 邻苯二甲酰亚胺,得到 N- 羟基 - 邻苯二甲酰亚胺溶液,再加入 4.97g,92mmol 甲醇钠 (NaOMe) 和 17.9g,92mmol 5- 溴戊酸乙酯,得到第一混合溶液,将第一混合溶液在 100℃ 温度下搅拌 8-16 小时,降温后加入水,得到第二混合溶液,将第二混合溶液用乙醚萃取,萃取后加浓碳酸钠洗涤,得到第一萃取物,并将第一萃取物在硫酸钠上干燥后得到 20g,78% 黄色油状物。

[0073] 利用 Bruker Avance III plus 400MHz 对该黄色油状物质进行核磁共振光谱扫描,采用 TMS 作为内标。结果如下 :NMR(400MHz, CDCl₃) :1.24-1.29(3H, m), 2.06-2.12(2H, m), 2.62-2.65(2H, m), 4.13-4.19(2H, m), 4.25-4.28(3H, m), 7.74-7.77(2H, m), 7.81-7.85(2H, m)。表征为式 (IV) 所示的化学物质,即 4- 邻苯二甲酰亚胺氧基丁酸乙酯。

[0074] (2) 制备具有连接基团 (N-O-(CH₂)₃-COO- 基团) 的盐酸盐

[0075] 用 150mL 3N 盐酸溶解 10.0g,36mmol 上述制得的 4- 邻苯二甲酰亚胺氧基丁酸乙酯,回流 8-16h。降温后过滤,并用乙酸乙酯萃取,得到第二萃取物。将第二萃取物干燥,获得 5g 干燥物。

[0076] 利用 Bruker Avance III plus 400MHz 对上述所获取的 5g 干燥物行核磁共振光谱扫描,采用 TMS 作为内标。结果如下 :NMR(400MHz, DMSO-d₆) :1.81-1.88(2H, m), 2.34(2H, t, J = 7.2Hz), 4.05(2H, t, J = 6.4Hz), 11.06(3H, brs)。表征为式 (V) 所示的化学物,即

4- 胺氧基丁酸的盐酸盐。

[0077] (3) 利用他克莫司制备具有 $=N-O-(CH_2)_3-COO-$ 基团的他克莫司衍生物

[0078] 他克莫司衍生物的制备方法如下：用 25mL 甲醇溶解 2.7g, 3.4mmol 他克莫司，加入 5.23g 33.6mmol 上述制备的 4- 胺氧基丁酸的盐酸盐和 3.09g, 37.7mmol 醋酸钠，形成第三混合物。将第三混合物搅拌 8-16h，搅拌后浓缩，并加入水后用乙酸乙酯萃取，得到第三萃取物。将第三萃取物用浓碳酸钠洗涤后在硫酸钠上干燥，过滤和浓缩，得到浓缩物。用 Prep-HPLC 提纯该浓缩物，获得 1.41g 白色物质。

[0079] 利用 Bruker Avance III plus 400MHz 对上述所获取的 1.41g 白色物质进行核磁共振光谱扫描，采用 TMS 作为内标。结果如下：¹H NMR (400MHz, CDCl₃) : 0.69-0.89 (11H, m), 1.27-1.63 (17H, m), 1.90-2.33 (16H, m), 2.93-3.02 (2H, m), 3.19-3.45 (13H, m), 3.68-3.80 (1H, m), 3.96-4.06 (3H, m), 4.28-4.40 (2H, m), 4.45-5.00 (7H, m), 5.14-5.30 (1H, m), 5.53-5.64 (1H, m)。其表征为式 (III) 所示的化学物，即具有式 (III) 结构的他克莫司衍生物。

[0080] (4) 利用色谱/质谱技术 (LCMS) 对得到的具有式 (III) 结构的他克莫司衍生物进行分析鉴定

[0081] 仪器：安捷伦公司的串联四级杆质谱仪 LC/MSD1200 系列，离子源采用正离子或负离子化模式。色谱柱规格为：Welchrom XB-C18 (50×4.6mm, 5 μm)，柱温为 30℃，流速为 1.5mL/min，流动相为乙腈-水，比例为 60%-95%。

[0082] 鉴定结果：该具有式 (III) 结构的他克莫司衍生物纯度 > 98%，分子量为 904，保留时间为 2.8min，分子离子为 905 (M+1)。

[0083] 步骤二、将具有免疫原性的载体溶解形成具有免疫原性的载体溶液：

[0084] 将牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA) (200mg) 溶解于 50ml 0.2M, pH 8.5 的磷酸缓冲液中，得到 BSA 溶液；

[0085] 步骤三、将 BSA 与他克莫司衍生物通过 $N-O-(CH_2)_3-COO-$ 基团连接形成所述的他克莫司免疫原

[0086] 他克莫司免疫原的合成方法如下：将如下化学品加入到小烧杯中搅拌溶解：200mg 合成的他克莫司衍生物、3.5ml DMF、3.5ml 乙醇、7.0ml 10mM, pH5.0 的磷酸钾缓冲液、200mg EDAC、50mg N- 羟基琥珀酰亚胺 (N-hydroxysuccinimide, Sulfo-NHS)，将这些化学品在室温下搅拌溶解反应 30min，得到第四混合溶液；将溶解好的第四混合溶液滴加至 BSA 溶液中，并在 2 ~ 8℃ 下搅拌 8-16h，得到抗原；将合成好的抗原经过透析进行纯化，得到他克莫司免疫原。

[0087] 实施例 2

[0088] 抗他克莫司特异性抗体的制备，制备方法如下：

[0089] (1) 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 将由实施例 1 合成的他克莫司免疫原稀释至 1.5mg/ml，得到抗原溶液，然后用抗原溶液与弗氏完全佐剂混合，对家兔进行注射；

[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混合后对家兔注射一次，之后每隔四周一次，共两次，抽取家兔的抗血清，获得有效的抗体。

[0091] 实施例 3 他克莫司检测方法：

[0092] 1.1、所使用的原料：上述实施例 2 中的抗他克莫司的特异性抗体、他克

莫司酶标偶联物和含有常规的 ELISA 检测用 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺 (3,3' 5,5' -Tetramethylbenzidine, TMB) 的底物溶液。

[0093] 1.2、他克莫司酶标偶联物的制备方法如下：

[0094] 称取 20mg HRP 在室温条件下溶解于 5ml 0.2M, pH 8.5 的磷酸缓冲液中；称取 5mg 的具有式 (IV) 结构的他克莫司衍生物于小烧杯中，并依次加入 350 μ L DMF、350 μ L 无水乙醇、700 μ L 10mM, pH 5.0 的磷酸钾缓冲液、20mgEDAC 和 3mg Sulfo-NHS，在室温条件下搅拌反应 30min；随后将活化的他克莫司衍生物滴加到 HRP 溶液中，在 2-8 $^{\circ}$ C 条件下搅拌 8-16h，并将偶联的抗原进行透析纯化得到 HRP- 他克莫司偶联物。

[0095] 1.3、他克莫司准 ELISA 检测标准曲线的建立

[0096] (1) 标准品的制备：

[0097] 将他克莫司粉末（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 100ng/ml、50ng/ml、20ng/ml、10ng/ml、5ng/ml 和 0ng/ml 的标准溶液。其中，ELISA 缓冲液含有 50.0mM Tris, 145mM NaCl 和 0.25% 的 BSA。

[0098] (2) 利用他克莫司的 ELISA 检验方法制备标准曲线：

[0099] 用 PBS 将实施例 2 中所制备的抗他克莫司抗体稀释成 1 : 8000 的终浓度溶液，100 μ L/ 孔包被在 96 孔酶联板上，4 $^{\circ}$ C 放置 12-24h；

[0100] 用 PBS 将上述包被有抗他克莫司抗体的 96 孔酶联板洗涤 3 次后，加入 200 μ L/ 孔的 0.5% 的 BSA 溶液，4 $^{\circ}$ C 封闭放置 8-16h。然后用 PBS 洗涤 3 次，加入 20 μ L/ 孔的标准品。再加入 100 μ L/ 孔工作浓度的 HRP- 他克莫司偶联物；室温下孵育 30min 后 PBS 洗板 5 次；然后每孔加入 100 μ L TMB 底物，室温孵育 30min。再每孔加入 100 μ L 终止液 (2M 硫酸)。测定 450nm 的吸光值。

[0101] 根据各标准品的所对应的 450nm 的吸光值定标，制作标准曲线，结果如附图 1 所示。

[0102] 1.4、待测样品中他克莫司含量的检测

[0103] 1.4.1、制作待测样品

[0104] 制备方法：将他克莫司粉末（购于 Sigma 公司）溶解于甲醇溶液制成 1mg/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, 10.00, 50.00ng/mL，形成空白、低、中、高浓度的全血样本。该空白全血为不含他克莫司的健康人血液。

[0105] 1.4.2、测试方法：

[0106] 利用上述他克莫司的 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 条件下的吸光值。

[0107] 1.4.3、测试结果：对照图 1 中所示的他克莫司 ELISA 检验的标准曲线，计算每个样本中他克莫司含量，并对每个样本进行 3 个复孔测定，根据上述样本中他克莫司的实际含量计算回收率，结果如表 1 所示。

[0108] 表 1 他克莫司的 ELISA 检测回收实验

[0109]

血清样品	空白	低	中	高
样品浓度 (ng/ml)	0.00	5.00	10.00	50.00

测试 1	0.15	4.92	9.66	46.65
测试 2	0.06	4.56	8.95	48.92
测试 3	0.18	5.24	11.00	46.05
平均值 (ng/ml)	0.13	4.91	9.87	47.21
回收率 (%)	-	98.20	98.70	94.42

[0110] 由表 1 中结果可知:采用本发明他克莫司检测试剂测定不同浓度的样品中的他克莫司回收率都较高,均 > 90%,说明本发明所述的他克莫司检测试剂可以用于样本中他克莫司的检测,并且结果准确,可信。

[0111] 本发明的检测方法,特异性强,可以准确的确定待测样本中是否存在他克莫司,同样可以准确地确定他克莫司的含量。

[0112] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

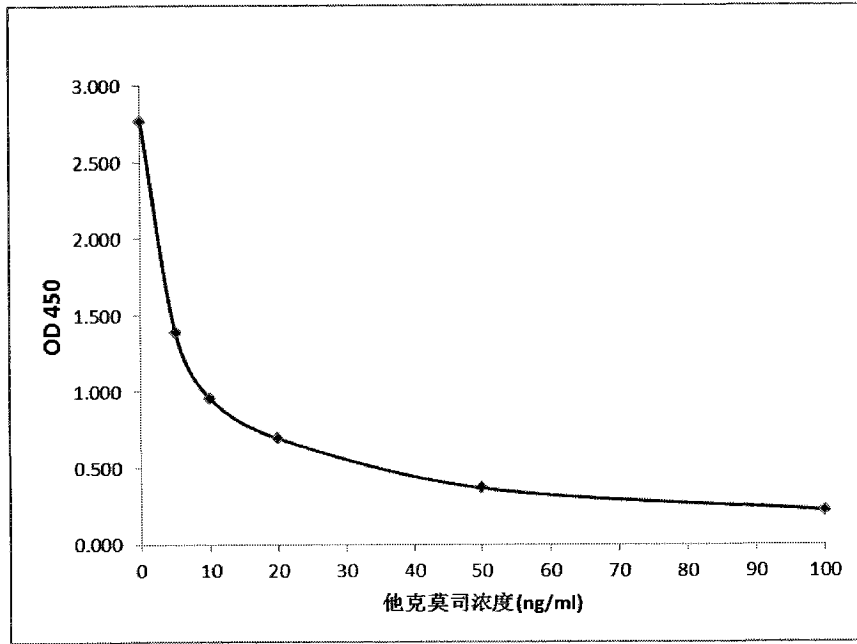


图 1

专利名称(译)	他克莫司检测方法		
公开(公告)号	CN102621299B	公开(公告)日	2014-10-22
申请号	CN201210098330.X	申请日	2012-04-06
[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 田军 袁红霞 蔡江丽		
发明人	虞留明 田军 袁红霞 蔡江丽		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/535		
审查员(译)	贾静		
其他公开文献	CN102621299A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种他克莫司检测方法，包括以下步骤：将抗他克莫司特异性抗体包被在固相支持物上，加入待测样本和他克莫司酶标偶联物；使所述待测样本中他克莫司与所述他克莫司酶标偶联物竞争性地结合抗所述他克莫司特异性抗体；经固相ELISA洗涤步骤后，加入对应酶的底物显色，测量相应的吸光值，对照他克莫司ELISA检测标准曲线，获取待测样本中他克莫司的含量。本发明的检测方法，特异性强，可以准确的确定待测样本中是否存在他克莫司，同样可以准确的确定他克莫司的含量。

