



(21)申请号 201811600848.2

G01N 33/53(2006.01)

(22)申请日 2018.12.26

(71)申请人 北京丹大生物技术有限公司

地址 101149 北京市通州区中关村科技园
区通州园光机电一体化产业基地嘉创
路5号1号楼301-303室

(72)发明人 许秀丽 王艳新 常缘荣 周建平

(74)专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569
代理人 刘奇

(51)Int.Cl.

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

C07K 14/435(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

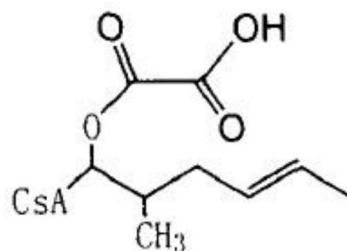
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

一种环孢霉素A免疫原的制备方法、环孢霉素A免疫原和抗环孢霉素A特异性抗体

(57)摘要

本发明提供了一种环孢霉素A免疫原的制备方法,属于酶联免疫检测技术领域,包括以下步骤:将环孢霉素A与草酰氯在氯仿中反应,得到环孢霉素A羧基衍生物;将得到的环孢霉素A羧基衍生物与碳二亚胺、载体蛋白混合、偶联,得到环孢霉素A免疫原。采用本发明的制备方法得到环孢霉素A免疫原,再将环孢霉素A免疫原制备成抗环孢霉素A特异性抗体,该特异性抗体能够特异性识别环孢霉素A,与去甲环孢素、羟化环孢素和二羟化环孢素等存在极微弱的交叉反应。



1. 一种环孢霉素A免疫原的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:
 - 1) 将环孢霉素A与草酰氯在氯仿中反应,得到环孢霉素A羧基衍生物;
 - 2) 将所述步骤1)得到的环孢霉素A羧基衍生物与碳二亚胺、载体蛋白混合、偶联,得到环孢霉素A免疫原。
2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述步骤1)环孢霉素A与草酰氯的质量比为(8~12):(7~7.5)。
3. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,所述步骤1)环孢霉素A与草酰氯的质量比为10:7.23。
4. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述步骤1)环孢霉素A的质量与氯仿的体积比为(8~12)g:(35~45)ml。
5. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述步骤1)反应的时间为4.5~5.5h,所述反应在搅拌下进行,所述搅拌的速度为450~550rpm。
6. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述步骤2)环孢霉素A羧基衍生物与碳二亚胺、载体蛋白的质量比为(90~110):(45~55):(90~110)。
7. 根据权利要求1或6所述的制备方法,其特征在于,所述步骤2)载体蛋白包括牛血清白蛋白、兔血清白蛋白、人血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白、鸡卵清蛋白或血蓝蛋白。
8. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述步骤2)偶联的时间为2.5~3.5h。
9. 一种环孢霉素A免疫原,其特征在于,所述环孢霉素A免疫原由权利要求1~8任一项所述的制备方法制备得到。
10. 一种抗环孢霉素A特异性抗体,其特征在于,将权利要求1~8任一项所述的制备方法制备得到的环孢霉素A免疫原或权利要求9所述的环孢霉素A免疫原免疫动物后得到。

一种环孢霉素A免疫原的制备方法、环孢霉素A免疫原和抗环孢霉素A特异性抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫检测技术领域,具体涉及一种环孢霉素A免疫原的制备方法、环孢霉素A免疫原和抗环孢霉素A特异性抗体。

背景技术

[0002] 环孢霉素A是一种高效免疫抑制剂,临床主要用于肝、肾、胰、心、肺、皮肤、角膜及骨髓移植,以减轻或防止排斥反应,提高患者的生存率和移植物的存活率。但由于其治疗窗狭窄,药动学参数个体差异大,低于有效浓度易引起排斥反应或诱发自身免疫性疾病,高于有效浓度则易引起感染或肝、肾及中枢神经系统损害。而且,CsA血药浓度水平易受性别、年龄、肥胖、肝功能、胃肠功能、药物相互作用以及饮食等众多因素的影响。因此,监测全血中CsA的血药浓度并调整其浓度在有效范围已成为临床合理使用CsA的重要方法。

[0003] 目前已知的环孢霉素A(cyclosporine A,CsA)在体内的代谢产物有15种之多,主要以去甲环孢素,羟化环孢素及二羟化环孢素三种代谢物为主。因此在环孢霉素A的血药浓度监测过程中,特异性的测定CsA不受其代谢物的影响,是准确反映CsA药代动力学过程及安全用药的重要前提。

[0004] 目前,体外测定环孢霉素A的方法主要高效液相色谱法,有放射免疫法(RIA),化学发光免疫法(CLIA),荧光偏振法(FPIA),酶联免疫吸附法(ELISA),胶乳增强比浊法。其中,高效液相色谱法,能够识别环孢霉素A及其类似物,但其设备昂贵,操作复杂,需要前处理,通量小,不适合在临床推广。而放射免疫法(RIA),化学发光免疫法(CLIA),荧光偏振法(FPIA),酶联免疫吸附法(ELISA),胶乳增强比浊法,均是基于抗原抗体的免疫反应原理,因此试剂使用的CsA抗体的特异性就决定了检测试剂对CsA药物监测的特异性。然而,目前已知多数商品化CsA测定试剂并不是特异性识别CsA,同CsA的主要代谢物,去甲环孢素、羟化环孢素和二羟化环孢素存在较大的交叉反应。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种环孢霉素A免疫原的制备方法,采用本发明的制备方法得到环孢霉素A免疫原,再将环孢霉素A免疫原制备成抗环孢霉素A特异性抗体,该特异性抗体能够特异性识别环孢霉素A,与去甲环孢素、羟化环孢素和二羟化环孢素等存在极微弱的交叉反应。

[0006] 本发明提供了一种环孢霉素A免疫原的制备方法,包括以下步骤:

[0007] 1) 将环孢霉素A与草酰氯在氯仿中反应,得到环孢霉素A羧基衍生物;

[0008] 2) 将所述步骤1)得到的环孢霉素A羧基衍生物与碳二亚胺、载体蛋白混合、偶联,得到环孢霉素A免疫原。

[0009] 优选的,所述步骤1)环孢霉素A与草酰氯的质量比为(8~12):(7~7.5)。

[0010] 优选的,所述步骤1)环孢霉素A与草酰氯的质量比为10:7.23。

- [0011] 优选的,所述步骤1) 环孢霉素A的质量与氯仿的体积比为(8~12) g:(35~45) ml。
- [0012] 优选的,所述步骤1) 反应的时间为4.5~5.5h,所述反应在搅拌下进行,所述搅拌的速度为450~550rpm。
- [0013] 优选的,所述步骤2) 环孢霉素A羧基衍生物与碳二亚胺、载体蛋白的质量比为(90~110):(45~55):(90~110)。
- [0014] 优选的,所述步骤2) 载体蛋白包括牛血清白蛋白、兔血清白蛋白、人血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白、鸡卵清蛋白或血蓝蛋白。
- [0015] 优选的,所述步骤2) 偶联的时间为2.5~3.5h。
- [0016] 本发明还提供了一种环孢霉素A免疫原,所述环孢霉素A免疫原由上述技术方案所述的制备方法制备得到。
- [0017] 本发明还提供了一种抗环孢霉素A特异性抗体,将上述技术方案所述的环孢霉素A免疫原免疫动物后得到。
- [0018] 本发明提供了一种环孢霉素A免疫原的制备方法,将环孢霉素A与草酰氯在氯仿中反应,将得到的环孢霉素A羧基衍生物与碳二亚胺、载体蛋白偶联,得到环孢霉素A免疫原。本发明在制备环孢霉素A免疫原的过程中引入的连接臂能够很好的暴露环孢霉素A分子,能够更好地呈现环孢霉素A的特征基团,再将免疫原制备成特异性抗体,能够与环孢霉素A特异性结合,实现检测环孢霉素A。
- [0019] 本发明实施例的结果显示:采用本发明的制备方法得到环孢霉素A免疫原,再将环孢霉素A免疫原制备成抗环孢霉素A特异性抗体,该特异性抗体能够特异性识别环孢霉素A,与去甲环孢素、羟化环孢素和二羟化环孢素等存在极微弱的交叉反应。

附图说明

- [0020] 图1为环孢霉素A的结构式;
- [0021] 图2为环孢霉素A羧基衍生物的结构式;
- [0022] 图3为环孢霉素A免疫原合成路线;
- [0023] 图4为本发明构建的环孢霉素A化学发光法同质谱法测定CSA样本的相关性。

具体实施方式

- [0024] 本发明提供了一种环孢霉素A免疫原的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:
- [0025] 1) 将环孢霉素A与草酰氯在氯仿中反应,得到环孢霉素A羧基衍生物;
- [0026] 2) 将所述步骤1) 得到的环孢霉素A羧基衍生物与碳二亚胺、载体蛋白混合、偶联,得到环孢霉素A免疫原。
- [0027] 本发明将环孢霉素A与草酰氯在氯仿中反应,得到环孢霉素A羧基衍生物。
- [0028] 在本发明中,所述环孢霉素A羧基衍生物引入的4原子长度的含酯键的连接臂能够很好的暴露环孢霉素A分子,能够更好地呈现环孢霉素A的特征基团。
- [0029] 在本发明中,所述环孢霉素A与草酰氯的质量比优选为(8~12):(7~7.5),更优选为(9~11):(7.1~7.3),最优选为10:7.23。
- [0030] 在本发明中,所述环孢霉素A的质量与氯仿的体积比优选为(8~12) g:(35~45) ml,更优选为10g:40ml。

- [0031] 本发明优选将所述环孢霉素A溶于氯仿后,再将草酰氯以滴加的方式缓慢加入。
- [0032] 在本发明中,所述反应的时间优选为4.5~5.5h,更优选为5h;所述反应优选在搅拌下进行,所述搅拌的速度优选为450~550rpm,更优选为500rpm。
- [0033] 本发明将得到的环孢霉素A羧基衍生物与碳二亚胺、载体蛋白混合、偶联,得到环孢霉素A免疫原。
- [0034] 在本发明中,所述环孢霉素A羧基衍生物与碳二亚胺、载体蛋白的质量比优选为(90~110):(45~55):(90~110),更优选为100:50:100。
- [0035] 在本发明中,所述载体蛋白优选包括牛血清白蛋白、兔血清白蛋白、人血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白、鸡卵清蛋白或血蓝蛋白。
- [0036] 在本发明中,所述混合优选包括:
- [0037] 将所述载体蛋白溶于MES缓冲液,得到载体蛋白溶液;
- [0038] 将所述碳二亚胺溶于水中,得到碳二亚胺溶液;
- [0039] 将所述环孢霉素A羧基衍生物溶于氯仿中,得到环孢霉素A羧基衍生物溶液;
- [0040] 将所述载体蛋白溶液与环孢霉素A羧基衍生物溶液混合后,再与碳二亚胺溶液混合。
- [0041] 在本发明中,所述载体蛋白的质量与MES缓冲液的体积比优选为(90~110)mg:(8~12)ml,更优选为100mg:10ml。在本发明中,所述MES缓冲液的浓度优选为0.1M;所述MES缓冲液的pH值优选为4.5。
- [0042] 在本发明中,所述碳二亚胺的质量与水的体积比优选为(45~55)mg:(4~6)ml,更优选为50mg:5ml。在本发明中,所述水优选为超纯水。
- [0043] 在本发明中,所述环孢霉素A羧基衍生物的质量与氯仿的体积比优选为(90~110)mg:(4~6)ml,更优选为100mg:5ml。
- [0044] 在本发明中,所述偶联的时间优选为2.5~3.5h,更优选为3h。在本发明中,所述偶联优选在搅拌下进行,所述搅拌的速度优选为1000rpm/min。
- [0045] 本发明优选将偶联后,得到的偶联物透析到0.01M的PBS缓冲液中,得到环孢霉素A免疫原。
- [0046] 本发明还提供了一种环孢霉素A免疫原,所述环孢霉素A免疫原由上述技术方案所述的制备方法制备得到。
- [0047] 本发明还提供了一种抗环孢霉素A特异性抗体,将上述技术方案所述的环孢霉素A免疫原免疫动物后得到。
- [0048] 在本发明中,所述动物优选包括兔、鸡、山羊、小鼠、绵羊、豚鼠或马。
- [0049] 本发明对所述免疫的方法没有特殊限定,采用本领域技术人员常规免疫的方法即可。
- [0050] 下面结合具体实施例对本发明所述的一种环孢霉素A免疫原的制备方法、环孢霉素A免疫原和抗环孢霉素A特异性抗体做进一步详细的介绍,本发明的技术方案包括但不限于以下实施例。
- [0051] 实施例1
- [0052] 1)称取10.0g的环孢霉素A溶于40ml氯仿中,缓慢滴加入7.23g草酰氯,室温500rpm/min搅拌5小时,得到合成溶液。

[0053] 2) 将上述合成溶液用水稀释后,分成上下两层,有机相在下层,分出有机层,使用100ml水洗涤有机层,减压蒸馏,去除溶剂,加入40ml 10 (W/V) %的K₂CO₃溶液中搅拌洗涤,再滴加10ml 10% (V/V) 的HCL溶液,酸化处理,有固体析出,过滤固体,用水淋洗。真空干燥烘干,得到环孢霉素A羧基衍生物,结构式如图2所示,质量为9.82g,收率92.7%,m.p:198~202℃。

[0054] 实施例2

[0055] 1) 将100mg牛甲状腺球蛋白溶解于10ml 0.1M,pH4.5MES缓冲液中,得到溶液A;

[0056] 2) 将100mg实施例1制备的环孢霉素A羧基衍生物溶解于5ml氯仿溶液中,得到溶液B,将溶液B加入到A溶液中,得到混合液;

[0057] 3) 将50mg碳二亚胺溶于5ml的超纯水中,立即加入到上述混合液中,室温搅拌反应3小时;

[0058] 4) 将得到的反应产物透析到0.01M PBS中,得到环孢霉素A免疫原。

[0059] 实施例3

[0060] 1) 用生理盐水将实施例2制备的环孢霉素A免疫原稀释到1mg/ml,取1ml免疫原溶液与1ml弗氏完全佐剂混合,采用摇床2000rp/min 2h震荡乳化,并对实验兔进行免疫,可选择颈部皮下多点免疫。

[0061] 2) 3~4周后,取1ml免疫原溶液同弗氏不完全佐剂混合乳化,对实验兔进行免疫,之后每三周免疫一次,均为免疫原溶液和弗氏不完全佐剂的混合物,共免疫4次。

[0062] 3) 四免后7~10天,对上述实验兔采血,离心取上清并用proteinA柱分离纯化得到抗环孢霉素A特异性抗体。

[0063] 通过间接ELISA测定抗环孢霉素A特异性抗体的效价,该抗体效价为1:512000。

[0064] 实施例4

[0065] 对实施例3制备的抗环孢霉素A抗体特异性分析

[0066] 利用竞争ELISA的方法对抗环孢霉素A特异性抗体的特异性进行测试。

[0067] 选取了3种环孢霉素A在体内的主要代谢产物,去甲环孢素、羟化环孢素、二羟化环孢素,2种常见衍生物环孢素17和环孢素18及10个临床常用药物。采用竞争ELISA的方法测定制备的抗环孢霉素A抗体对上述化合物的交叉反应率。结果见表1。

[0068] 表1测试结果

[0069]

编号	测试化合物	浓度	交叉反应率
1	环孢霉素 A	1ug/ml	100%
2	去甲环孢素	100ug/ml	0.020%
3	羟化环孢素	100ug/ml	0.010%
4	二羟化环孢素	100ug/ml	0.010%
5	环孢菌素 17	1000ug/ml	0.003%
6	环孢菌素 18	1000ug/ml	0.002%

[0070]

7	他克莫司	100ug/ml	0.000%
8	地高辛	50ug/ml	0.000%
9	丙戊酸	1000ug/ml	0.000%
10	苯妥英	1000ug/ml	0.000%
11	卡马西平	1000ug/ml	0.000%
12	茶碱	1000ug/ml	0.000%
13	霉酚酸	1000ug/ml	0.000%
14	甲氨蝶呤	1000ug/ml	0.000%
15	万古霉素	1000ug/ml	0.000%
16	巴比妥	1000ug/ml	0.000%

[0071] 从表1可以看出,抗环孢霉素A抗体仅对环孢霉素A高度相似物存在微弱的交叉反应;对其它的一些临床常用药物无交叉反应,证实了本发明制备的是高度特异性的抗环孢霉素A抗体,对于测定临床复杂样本具有重要意义。

[0072] 实施例5

[0073] 化学发光法测定血浆样本中环孢霉素A含量

[0074] 采用本发明中实施例2中的环孢霉素A免疫原和实施例3中的抗环孢霉素A特异性抗体构建板式化学发光法,测定临床血浆样本中的环孢霉素A含量。

[0075] 1) 包被板的准备:环孢霉素A免疫原用PBS稀释到1ug/mL,加入到聚苯乙烯96孔板中,放入37℃烘箱干燥2h,包被到板中,加入1%的BSA溶液,37℃烘箱干燥2h,封闭板上多余的位点,用含0.1%TW20的PBS洗涤3次,烘干,密封4℃保存。

[0076] 2) 抗环孢霉素A抗体-辣根过氧化物酶偶联物制备:

[0077] A.称取5mg HRP溶于1ml 0.1M PB pH6.0,加入2mg NaIO₄,室温搅拌反应1h;

[0078] B.加入100ul乙二醇,室温搅拌反应1h;

[0079] C.反应物用G25脱盐到PH8.00.1MNaHCO₃溶液,立即加入2mg抗环孢霉素A抗体,室温搅拌反应1h。

[0080] D.反应产物用G25脱盐到PBS,用20mM Tris 0.1%BSA 0.1%TW20,0.9%NaCl,0.05%NaN₃pH7.4缓冲液稀释到0.5ug/mL。

[0081] 3) 样本处理

[0082] 100ul环孢霉素A血浆样本,加入900ul甲醇,混合1min,离心12000rpm/min,取上清,加入等体积的PBS,混合均匀。

[0083] 4) 样本测定

[0084] 之前准备好的包被有环孢霉素A抗原的96孔板,加入50ul上述处理好的样本,再加入50ul稀释后的抗环孢霉素A抗体-辣根过氧化物酶溶液,37℃静置30min,用含0.1%TW20的PBS洗涤2次,加入100ul的鲁米洛化学法底物,并在化学发光检测仪中检测。

[0085] 选取20例样本,同时用本发明实例的化学发光法和质谱法测定,并计算相关性,结果如图4所示。

[0086] 从图4可以得出,相关性系数 $r=0.99$,表明化学发光法测定准确,说明本发明制备的抗环孢霉素A抗体性能优异,能够满足临床的需求。

[0087] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

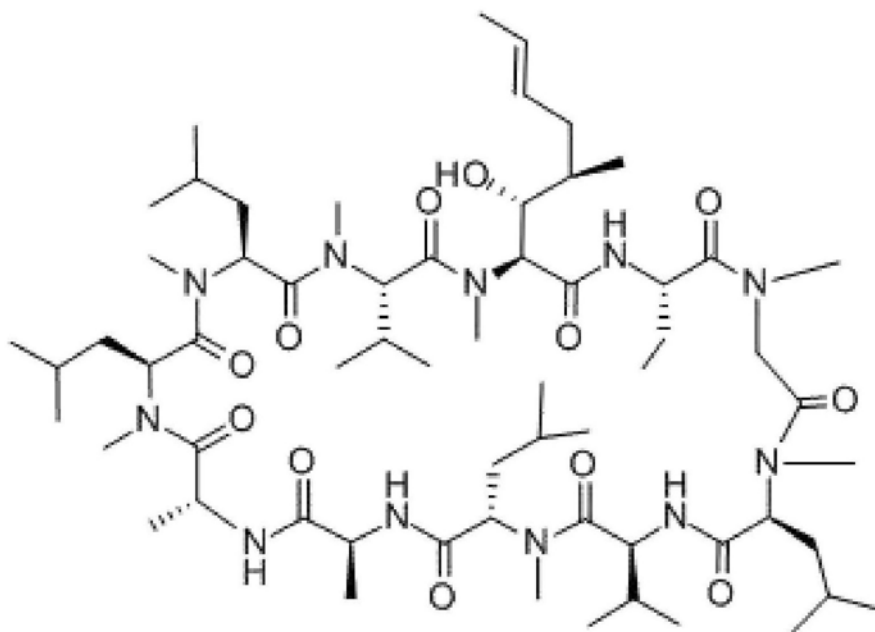


图1

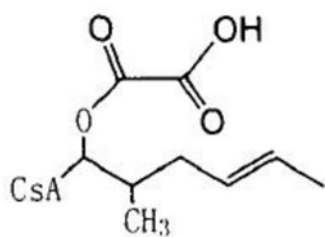


图2

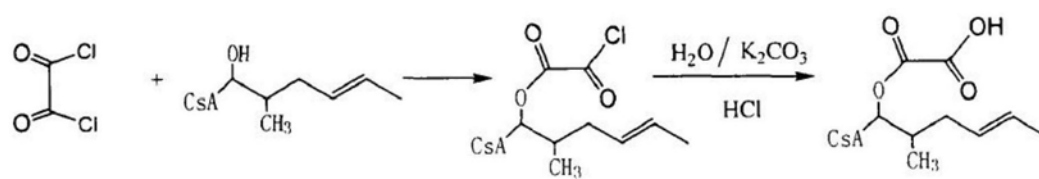


图3

相关性

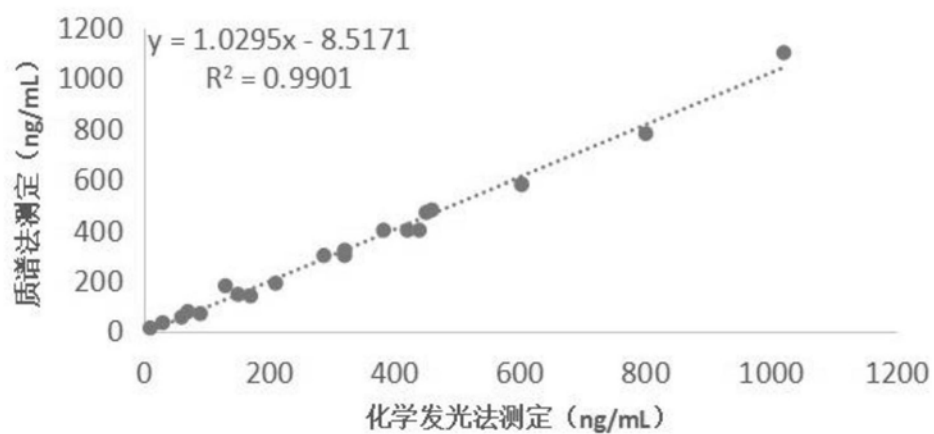


图4

专利名称(译)	一种环孢霉素A免疫原的制备方法、环孢霉素A免疫原和抗环孢霉素A特异性抗体		
公开(公告)号	CN109627321A	公开(公告)日	2019-04-16
申请号	CN201811600848.2	申请日	2018-12-26
[标]发明人	许秀丽 王艳新 周建平		
发明人	许秀丽 王艳新 常缘荣 周建平		
IPC分类号	C07K14/765 C07K14/77 C07K14/435 C07K14/795 C07K16/44 G01N33/53		
CPC分类号	C07K19/00 C07K14/435 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 C07K2317/33 C07K2317/35 G01N33/5308		
代理人(译)	刘奇		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种环孢霉素A免疫原的制备方法，属于酶联免疫检测技术领域，包括以下步骤：将环孢霉素A与草酰氯在氯仿中反应，得到环孢霉素A羧基衍生物；将得到的环孢霉素A羧基衍生物与碳二亚胺、载体蛋白混合、偶联，得到环孢霉素A免疫原。采用本发明的制备方法得到环孢霉素A免疫原，再将环孢霉素A免疫原制备成抗环孢霉素A特异性抗体，该特异性抗体能够特异性识别环孢霉素A，与去甲环孢素、羟化环孢素和二羟化环孢素等存在极微弱的交叉反应。

