

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102643341 A

(43) 申请公布日 2012. 08. 22

---

(21) 申请号 201210089894. 7

(22) 申请日 2012. 03. 30

(71) 申请人 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.

C07K 14/765(2006. 01)

C07K 14/795(2006. 01)

C07K 14/47(2006. 01)

C07K 1/113(2006. 01)

C07K 16/44(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

---

权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 1 页

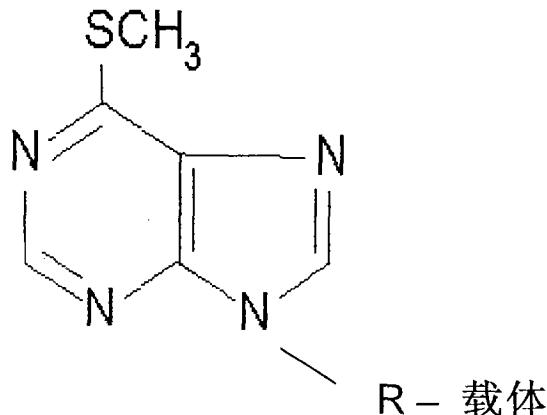
(54) 发明名称

6-(甲巯基)嘌呤免疫原和 6-(甲巯基)嘌  
呤检测试剂

(57) 摘要

本发明公开了一种 6-(甲巯基)嘌呤  
(6-Methylmercaptopurine, 6-MMP) 免疫原及其  
合成方法, 以及由该免疫原获得的抗 6-MMP 特异  
性抗体、检测试剂及其制备方法。本发明的高效价  
的 6-MMP 特异性抗体研制的免疫试剂可以精确地  
测定 6-MMP 的含量。与 HPLC 等传统方法相比, 本  
发明提供的免疫检测试剂灵敏度高、特异性强, 并  
具有操作简单、速度快、检测结果准确等优点, 对  
指导临床合理用药具有重要的意义。

1. 一种 6-( 甲巯基 ) 嘌呤免疫原, 其特征在于结构式如式 ( I ) 所示 :



式中, R 为连接基团, 载体具有免疫原性。

2. 根据权利要求 1 所述的 6-( 甲巯基 ) 嘌呤免疫原, 其特征在于 R 选自  $-(CH_2)_n-COO-$ 、 $-O-(CH_2)_n-COO-$ 、 $-S-(CH_2)_n-COO-$  或  $-NH-(CH_2)_n-COO-$  中的一种, n 是 1 至 20 之间的整数, 优选 n 值为 1 至 10。

3. 根据权利要求 2 所述的 6-( 甲巯基 ) 嘌呤免疫原, 其特征在于 R 为  $-(CH_2)_5-COO-$ 。

4. 根据权利要求 1 所述的 6-( 甲巯基 ) 嘌呤免疫原, 其特征在于载体为具有免疫原性的蛋白质, 选自血清蛋白, 血蓝蛋白或甲状腺球蛋白中的一种, 优选为牛血清蛋白。

5. 一种如权利要求 1-4 中任一项所述的 6-( 甲巯基 ) 嘌呤免疫原的制备方法, 其特征在于包含以下步骤 :

(1) 用 10-100ml 有机溶剂 A 溶解 1.0-10.0g 的 6-MMP 和 1.0-5.0g 的碳酸盐, 得到溶液 1; 将 1.0-5.0g 的 6- 溴己酸乙酯加入到 5-50ml 的有机溶剂 A 中, 得到溶液 2, 将溶液 1 和 2 合并进行搅拌反应。将反应后的溶液用无机酸溶液中和, 经有机溶剂 B 萃取分离后纯化、干燥, 得到白色固体状 6-( 甲巯基 ) 嘌呤衍生物。

(2) 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。

(3) 用 1.0-5.0ml 的有机溶剂 A 溶解 50-500mg 的 6-( 甲巯基 ) 嘌呤衍生物, 通过 1- 乙基 -3-(3- 二甲氨基丙基 ) 碳二亚胺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 6-( 甲巯基 ) 嘌呤免疫原,

所述的有机溶剂 A 选自二甲基亚砜、二甲基甲酰胺、甲醇或乙醇中的一种, 优选为二甲基甲酰胺;

所述的有机溶剂 B 选自乙酸乙酯, 乙醚或氯仿中的一种, 优选为乙酸乙酯,

所述的碳酸盐为  $Na_2CO_3$  或  $K_2CO_3$ , 优选为  $Na_2CO_3$ ;

所述的无机酸溶液为盐酸溶液或硫酸溶液, 优选为盐酸溶液。

6. 一种抗 6-( 甲巯基 ) 嘌呤特异性抗体, 由权利要求 1 ~ 5 任意一项所述的 6-( 甲巯基 ) 嘌呤免疫原免疫宿主动物后生产得到。

7. 根据权利要求 6 所述的 6-( 甲巯基 ) 嘌呤特异性抗体, 其特征在于所述的抗体为多克隆抗体或单克隆抗体, 优选为多克隆抗体。

8. 根据权利要求 7 所述的 6-( 甲巯基 ) 嘌呤特异性抗体, 其特征在于所述的宿主动物选自家兔, 山羊, 小鼠, 绵羊, 豚鼠或马中的一种, 优选为家兔。

9. 一种如权利要求 6-8 中任一项所述的 6-( 甲巯基 ) 嘌呤特异性抗体的制备方法, 其特征在于包含以下步骤 :

(1) 用磷酸盐缓冲液将合成的 6-( 甲巯基 ) 嘌呤免疫原稀释至 0.5-5.0mg/mL ;

(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抗血清, 得到有效的抗体。

10. 一种 6-( 甲巯基 ) 嘌呤检测试剂, 含有权利要求 6-8 所述的抗 6-( 甲巯基 ) 嘌呤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、荧光试剂或化学发光试剂中的一种。

11. 根据权利要求 10 所述的 6-( 甲巯基 ) 嘌呤检测试剂, 其特征在于所述的指示试剂为酶试剂, 由 6-( 甲巯基 ) 嘌呤酶标偶联物和酶底物所组成。

12. 根据权利要求 11 所述的 6-( 甲巯基 ) 嘌呤检测试剂, 其特征在于所述的 6-( 甲巯基 ) 嘌呤酶标偶联物的制备方法包含以下步骤 :

(1) 称取酶, 在室温条件下溶解于磷酸缓冲液中, 终浓度为 2-6mg/mL ;

(2) 用有机溶剂溶解 6-( 甲巯基 ) 嘌呤衍生物, 使其终浓度为 10-50mg/mL, 通过 EDAC 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 6-( 甲巯基 ) 嘌呤酶标偶联物,

所述的有机溶剂选自二甲基亚砜、二甲基甲酰胺、甲醇或乙醇中的一种。

13. 根据权利要求 12 所述的 6-( 甲巯基 ) 嘌呤检测试剂, 其特征在于所述的酶标偶联物的酶选自辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶中的一种, 优选为辣根过氧化物酶。

## 6-(甲巯基)嘌呤免疫原和6-(甲巯基)嘌呤检测试剂

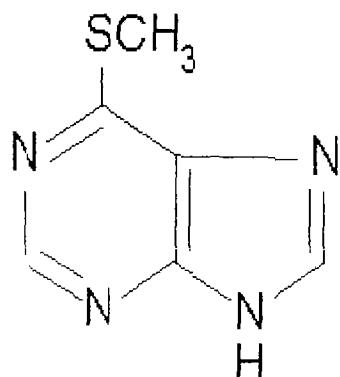
### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及6-(甲巯基)嘌呤免疫原、抗6-(甲巯基)嘌呤特异性抗体和6-(甲巯基)嘌呤检测试剂。

### 背景技术

[0002] 6-(甲巯基)嘌呤(6-Methylmercaptopurine, 6-MMP),其结构式如式(I)所示。

[0003]



式 (I)

[0004] 6-MMP是6-(巯基)嘌呤(6-Mercaptapurine, 6-MP)的代谢物。临幊上6-MP广泛用于多种重要疾病的治疗,包括:急性白血病、器官移植和一些自身免疫性疾病等,但此药物使用不当可产生严重的甚至可危及生命的血液毒性。Mardini<sup>[1]</sup>建议在使用6-MP时通过测定其代谢物6-MMP在病人血液中的浓度来决定6-MP的用药剂量,该文献结果显示,当血液中的6-MMP浓度<0.6 μg/mL时,用药剂量达不到相关疗效;而当6-MMP浓度>5.0 μg/mL时,则会对肝脏造成毒性。因此,一般需要将代谢物6-MMP的浓度控制在0.6 μg/mL~5.0 μg/mL之内。

[0005] 传统检验6-MMP使用的方法是高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)和液相色谱/质谱-质谱联用技术(LC/MS-MS)。这些方法操作复杂,费用高。美国专利(专利号US6946258)公开了一种6-MMP的抗体,但其设计的衍生物对6-MMP的结构改动太大,根据其专利中的衍生物很难获得特异性强和灵敏度高的抗体。

### 发明内容

[0006] 本发明就是为了克服现有技术存在的检测6-MMP的方法复杂的缺陷,采用6-MMP特异性抗体研制的免疫检测试剂弥补了这些缺点。本发明提供了一种检测方便、灵敏度高的检测试剂。本发明是通过以下技术方案实现的:

[0007] 本发明的一个目的在于提供一种6-MMP免疫原。

[0008] 本发明的另一个目的是提供一种6-MMP免疫原的合成方法。

[0009] 本发明的另一个目的在于提供使用本发明6-MMP免疫原制备得到的抗6-MMP特异性抗体。

[0010] 本发明的另一个目的是提供抗 6-MMP 特异性抗体的制备方法。

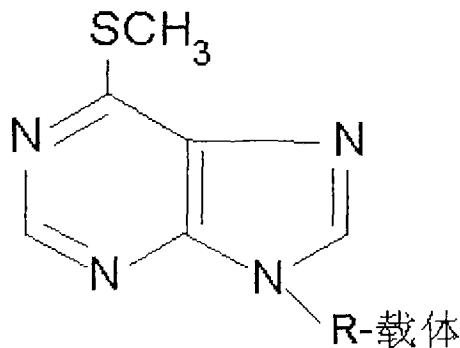
[0011] 本发明的再一个目的在于提供一种含有本发明抗 6-MMP 特异性抗体的检测试剂。

[0012] 本发明的 6-MMP 免疫原, 免疫原性高, 可以诱导得到高效价的抗 6-MMP 特异性抗体。高效价的 6-MMP 特异性抗体研制的免疫试剂可直接测定反应底物 6-MMP。该检测方法特异性高, 能够准确地确定待测样本中是否存在 6-MMP, 同样可以精确地测定 6-MMP 的含量。与 HPLC 等传统方法相比, 本发明提供的免疫检测试剂具有操作简单、速度快、检测结果准确等优点。

[0013] 本发明所采取的技术方案如下:

[0014] 一种 6-MMP 免疫原, 其结构式如式 (I) 所示:

[0015]



式 (I)

[0016] 式中, R 为连接基团, 载体具有免疫原性。

[0017] R 可以为  $-(CH_2)_n-COO-$ 、 $-O-(CH_2)_n-COO-$ 、 $-S-(CH_2)_n-COO-$  或  $-NH-(CH_2)_n-COO-$  等, n 是 1 至 20 之间的整数。优选 R 为  $-(CH_2)_n-COO-$ , n 值为 1 至 10。更优选 R 为  $-(CH_2)_5-COO-$ 。

[0018] 载体为具有免疫原性的物质, 常选用蛋白质。优选为血清蛋白, 血蓝蛋白和甲状腺球蛋白, 更优选为牛血清蛋白。

[0019] 当 R 为  $-(CH_2)_5-COO-$  时, 该 6-MMP 免疫原的合成途径和方法如下:

[0020] (1) 6-MMP 衍生物的合成:

[0021] 用 10-100ml 有机溶剂 A 溶解 1.0-10.0g 的 6-MMP 和 1.0-5.0g 的碳酸盐, 得到溶液 1; 将 1.0-5.0g 的 6-溴己酸乙酯加入到 5-50ml 的有机溶剂 A 中, 得到溶液 2, 将溶液 1 和 2 合并进行搅拌反应。将反应后的溶液用无机酸溶液中和, 经有机溶剂 B 萃取分离后纯化、干燥, 得到白色固体状 6-(甲巯基) 嘌呤衍生物。

[0022] (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。

[0023] (3) 6-MMP 衍生物的活化及免疫原的合成: 用 1.0-5.0ml 的有机溶剂 A 溶解 50-500mg 的 6-MMP 衍生物, 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<sup>[2]</sup> 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 6-MMP 免疫原。

[0024] 上述方法中所述的 EDAC 方法是现有技术已知的, 见下文参考文献, 也可将 EDAC 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (N-hydroxysuccinimide, Sulfo-NHS) 联合使用。

[0025] 上述方法中所述的有机溶剂 A 为二甲基亚砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO)、二甲

基甲酰胺 (N, N-Dimethylformamide, DMF)、甲醇或乙醇, 优选 DMF。所述的有机溶剂 B 为: 乙酸乙酯, 乙醚或氯仿, 优选乙酸乙酯; 所述的碳酸盐为  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  或  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , 优选  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; 所述的无机酸溶液为盐酸溶液或硫酸溶液, 优选盐酸溶液。

[0026] 当 R 为  $-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-\text{COO}-$ 、 $-\text{S}-(\text{CH}_2)_n-\text{COO}-$  或  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_n-\text{COO}-$  等时, 6-MMP 免疫原的合成途径与 R 为  $-(\text{CH}_2)_n-\text{COO}-$  时基本相同。

[0027] 本发明提供的一种抗 6-MMP 特异性抗体, 由上述 6-MMP 免疫原免疫宿主动物后生产得到。宿主动物包括: 家兔, 山羊, 小鼠, 绵羊, 豚鼠或马, 优选地, 上述宿主动物为家兔。

[0028] 所述的抗 6-MMP 特异性抗体的制备方法如下:

[0029] (1) 用磷酸盐缓冲液将合成的 6-MMP 免疫原稀释至 0.5-5.0mg/mL;

[0030] (2) 经常规弗氏佐剂法对宿主动物进行注射, 注射后抽取动物特异抗血清, 得到有效的抗体。

[0031] 上述方法中, 优选用磷酸盐缓冲液将 6-MMP 免疫原稀释至 1.0-2.0mg/mL。

[0032] 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。本发明的抗体可以为多克隆抗体也可以是单克隆抗体, 优选为多克隆抗体。

[0033] 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, 在加或者不加佐剂后, 在动物的一个或者多个部位进行免疫, 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。

[0034] 本发明提供一种 6-MMP 检测试剂, 由上述抗 6-MMP 特异性抗体和指示试剂组成。

[0035] 指示试剂可以是酶试剂、放射性同位素试剂、荧光试剂和化学发光试剂。优选地, 指示试剂是酶试剂, 由 6-MMP 酶标偶联物和酶底物所组成。

[0036] 酶标偶联物的酶可以选自辣根过氧化物酶 (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, 优选酶为 HRP。

[0037] 6-MMP 酶标偶联物的制备方法如下:

[0038] (1) 酶溶液制备: 称取酶, 选自 HRP、AP 或 G6PDH, 在室温条件下溶解于磷酸缓冲液中, 终浓度为 2-6mg/mL;

[0039] (2) 6-MMP 衍生物的活化及偶联物的合成: 用有机溶剂溶解上文所述的 6-MMP 衍生物, 使其终浓度为 10-50mg/mL, 通过 EDAC 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 6-MMP 酶标偶联物。

[0040] 酶标偶联物的制备方法还可以通过以下优选的技术方案实现:

[0041] (3) 酶溶液制备: 称取酶在室温条件下溶解于磷酸缓冲液中, 终浓度为 3-5mg/mL;

[0042] (4) 6-MMP 衍生物的活化及偶联物的合成: 用有机溶剂溶解 6-MMP 衍生物, 浓度为 10-20mg/mL, 通过 EDAC 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 6-MMP 酶标偶联物。

[0043] 上述制备方法中所述的有机溶剂选自 DMF、DMSO、甲醇或乙醇。优选地, 有机溶剂为 DMF。

[0044] 传统的 HPLC, 需要对标本进行复杂的前处理, 时间长, 费用高, 本发明的 6-MMP 检测试剂, 可以达到操作简便、周期短、成本低、灵敏度高的要求。

## 附图说明

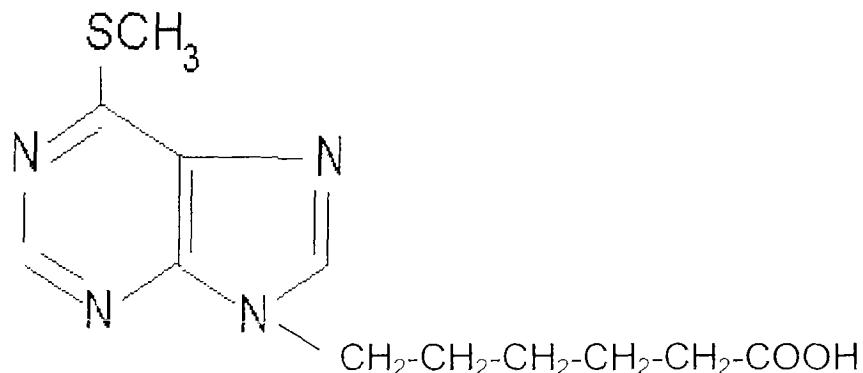
[0045] 图 1 是 6-MMP ELISA 检测反应曲线

## 具体实施方式

[0046] 实施例 1 6-MMP 免疫原的合成

[0047] 1. 6-MMP 衍生物的合成, 其化学结构如式 ( II ) 所示。

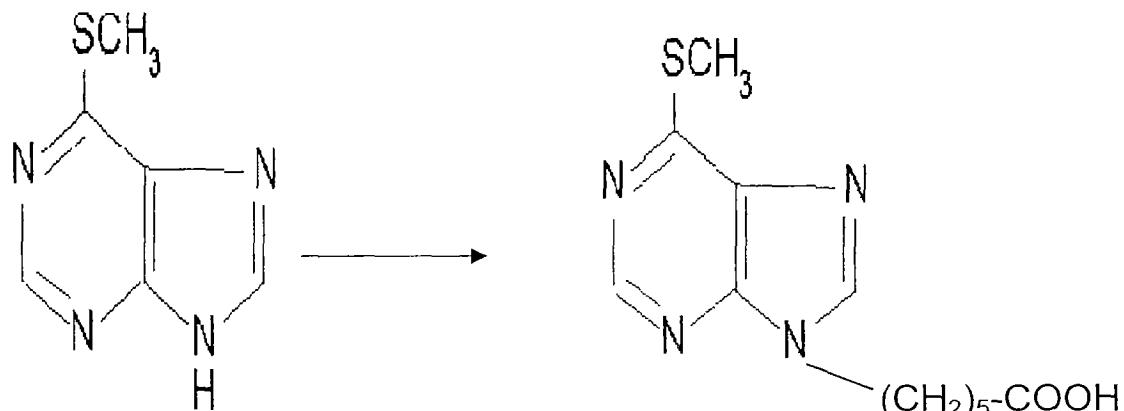
[0048]



[0049] 式 ( II )

[0050] 该 6-MMP 衍生物的合成途径和方法如下 :

[0051]



## 6-MMP

## 6-MMP 衍生物

[0052] (1) 用 30ml DMF 溶解 5.0g 6-MMP 和 4.45g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 加入 10ml 含 4.06g 6-溴己酸乙酯的 DMF 溶液, 在 40℃ 条件下搅拌反应 30min。

[0053] (2) 随后将反应后溶液用 1N HCl 溶液中和, 并用乙酸乙酯萃取。有机相经干燥、过滤、真空干燥以及正相硅胶纯化。用 25ml 甲醇溶解 1.5g 纯化产物, 随后加入含 600mg LiOH·H<sub>2</sub>O 的水溶液, 室温搅拌反应 4 小时。产物经浓缩后用水稀释、乙醚洗涤, 水相溶液用 1N HCl 溶液调整 pH 至 5.0。最后用二氯甲烷萃取, 有机相经 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥、过滤和浓缩后得到白色固体粉末状 6-MMP 衍生物。LCMS 结果显示: 纯度为 99.7%; 分子量为 281; 分子离子为 282(M+1)。

[0054] 2. 6-MMP 免疫原的合成

[0055] (1) 将 200mg 牛血清蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA) 溶解于 50ml 0.2M, pH 8.5 的磷酸缓冲液中；

[0056] (2) 将如下化学品加入到小烧杯中搅拌溶解：200mg 合成的 6-MMP 衍生物、3.5ml DMF、3.5ml 乙醇、7.0ml 10mM, pH 5.0 的磷酸钾缓冲液、200mg EDAC、50mg Sulfo-NHS，将其搅拌溶解，在室温下反应 30min；

[0057] (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纯化，得到 6-MMP 免疫原。

[0058] 实施例 2 抗 6-MMP 特异性抗体的制备

[0059] (1) 用 PBS 将合成的 6-MMP 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；

[0060] (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。

[0061] 实施例 3 6-MMP 检测试剂的制备，该检测试剂：

[0062] 1. 含有上述实施例 2 中的抗 6-MMP 特异性抗体

[0063] 2. 含有 6-MMP 酶标偶联物，以 HRP 为例，制备方法如下：

[0064] (1) 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；

[0065] (2) 活化 6-MMP 衍生物：称取 10mg 的 6-MMP 衍生物于小烧杯中，并依次加入 350 μL DMF、350 μL 无水乙醇、700 μL 10mM, pH 5.0 的磷酸钾缓冲液、40mg EDAC 和 5mg Sulfo-NHS，在室温条件下搅拌反应 30min；

[0066] (3) 随后将活化的 6-MMP 衍生物滴加到 HRP 溶液中，在 2~8℃ 条件下搅拌过夜，并将偶联的抗原进行透析纯化得到 HRP-6-MMP 偶联物。

[0067] 3. 含有常规的酶联免疫吸附试验 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA) 检测的 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB) 的底物溶液。

[0068] 实施例 4 6-MMP 的 ELISA 检验及定标结果

[0069] 1. 6-MMP 的 ELISA 检验

[0070] (1) 用 PBS 将实施例 2 的抗 6-MMP 抗体稀释成 1:5000 的终浓度溶液，100 μL/ 孔包被在 96 孔酶联板上，4℃ 过夜；

[0071] (2) PBS 洗涤 3 次后，加入 200 μL/ 孔的 0.5% 的 BSA 溶液，4℃ 封闭过夜。PBS 洗涤 3 次；

[0072] (3) 加入 20 μL/ 孔的标准品；

[0073] (4) 加入 100 μL/ 孔工作浓度的 HRP-6-MMP 偶联物；

[0074] (5) 室温下孵育 30min，PBS 洗板 5 次；

[0075] (6) 每孔加入 100 μL TMB 底物，室温孵育 30min。

[0076] (7) 每孔加入 100 μL 终止液 (2M 硫酸)。

[0077] (8) 测定 450nm 的吸光值。

[0078] 2. 定标结果如附图 1 所示。

[0079] 实施例 5 应用 6-MMP 检测试剂进行全血中 6-MMP 的回收试验

[0080] 该回收实验的目的是确定所述的 6-MMP 检测试剂可以用于全血样本中 6-MMP 的检测。

[0081] 1. 通过 6-MMP 的 ELISA 检验的定标曲线, 重复测定空白、低、中、高浓度全血样本 (将 6-MMP 标准品溶解于空白全血中, 至终浓度分别为 0, 0.6, 2.0, 4.0  $\mu\text{g/mL}$ ) 3 次, 结果样品的回收率高 (> 90%)。

[0082] 2. 测定方法: 如实施例 4 中的 6-MMP 的 ELISA 方法所述, 结果见表 1。

[0083] 表 1 6-MMP 的 ELISA 检测回收实验

[0084]

血清样品	空白	低	中	高
样品浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.0	0.60	2.0	4.0
测试 1	0.02	0.68	1.92	4.13
测试 2	0.10	0.61	2.27	3.84
测试 3	0.03	0.65	2.15	3.87
平均值 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.05	0.65	2.11	3.95
回收率 (%)	-	107	106	99

[0085] 该实验结果显示: 不同浓度的样品中的 6-MMP 回收率高, 均 > 90%, 说明所述的 6-MMP 检测试剂可以用于全血样本中 6-MMP 的检测, 并且结果准确, 可信。

[0086] 实施例 6 药物干扰检测

[0087] 选取 30 种常用化合物和药物进行药物干扰检测, 调整其浓度为 10.0  $\mu\text{g/mL}$ , 采用实施例 4 所述的 6-MMP 的 ELISA 检验方法进行复孔测定。

[0088] 干扰试验的具体步骤如下:

[0089] (1) 用 PBS 将实施例 2 的抗 6-MMP 抗体稀释成 1 : 5000 的终浓度溶液, 100  $\mu\text{L}$ /孔包被在 96 孔酶联板上, 4°C 过夜;

[0090] (2) PBS 洗涤 3 次后, 加入 200  $\mu\text{L}$ /孔的 0.5% 的 BSA 溶液, 4°C 封闭过夜。PBS 洗涤 3 次;

[0091] (3) 加入 20  $\mu\text{L}$ /孔的浓度为 10.0  $\mu\text{g/mL}$  的干扰药物;

[0092] (4) 加入 100  $\mu\text{L}$ /孔工作浓度的 HRP-6-MMP 偶联物;

[0093] (5) 室温下孵育 30min, PBS 洗板 5 次;

[0094] (6) 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  TMB 底物, 室温孵育 30min。

[0095] (7) 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  终止液 (2M 硫酸)。

[0096] (8) 测定 450nm 的吸光值。

[0097] 依据实施例 4 中的定标曲线结果, 将干扰物的 OD450 值换算成等价于 6-MMP 的浓度。结果如表 2 所示, 均 < 0.1  $\mu\text{g/mL}$ 。由此可见, 本发明的抗体是抗 6-MMP 的特异性抗体。

[0098] 表 2 6-MMP 的药物干扰检测结果

[0099]

ID#	化合物名称	等价于 6-MMP 的浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	乙酰水杨酸	< 0.1
2	异戊巴比妥	< 0.1
3	氨苄青霉素	< 0.1
4	苯乙胺	< 0.1
5	咖啡因	< 0.1
6	甲氨二氮卓	< 0.1
7	氯丙嗪	< 0.1
ID#	化合物名称	等价于 6-MMP 的浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )
8	氯氮卓	< 0.1
9	d- 甲基苯丙胺	< 0.1

10	非诺洛芬	< 0.1
11	吉非贝齐	< 0.1
12	龙胆酸	< 0.1
13	二氢可待因酮	< 0.1
14	布洛芬	< 0.1
15	丙咪嗪	< 0.1
16	(L)- 麻黄素	< 0.1
17	利多卡因	< 0.1
18	萘普生	< 0.1
19	烟酰胺	< 0.1
20	青霉素	< 0.1
21	苯肾上腺素	< 0.1
22	苯丙醇胺	< 0.1
23	普鲁卡因胺	< 0.1
24	普鲁卡因	< 0.1
25	奎尼丁	< 0.1
26	佐美酸	< 0.1
27	芽子碱甲基酯	< 0.1
ID#	化合物名称	等价于 6-MMP 的浓度 (μg/ml)
28	芽子碱	< 0.1
29	安定	< 0.1
30	可替宁	< 0.1

[0100]

[0101]

[0102] 参考文献

[0103] [1]Mardini et al. Utility of Measuring 6-Methylmercaptopurine and 6-Thioguanine Nucleotide Levels in Managing Inflammatory Bowel Disease Patients Treated With 6-Mercaptopurine in a Clinical Practice Setting. Journal of Clinical Gastroenterology, 2003, 36(5) :390-395.

[0104] [2]Hermanson. Bioconjugate techniques. 2<sup>nd</sup> edition, 215-221。

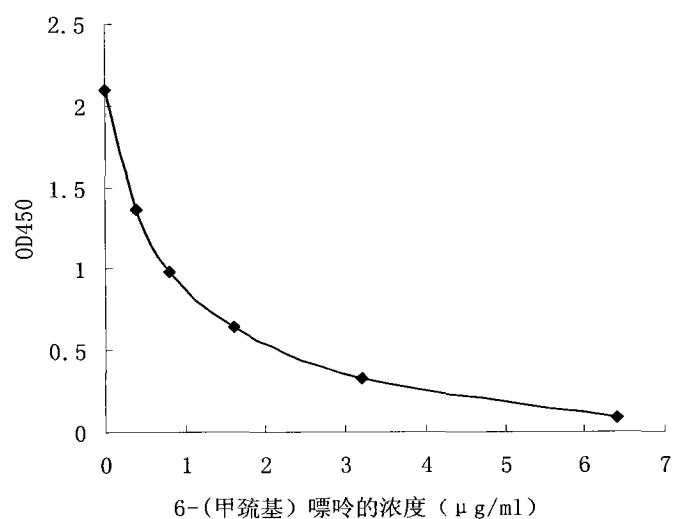


图 1

专利名称(译)	6-(甲巯基)嘌呤免疫原和6-(甲巯基)嘌呤检测试剂		
公开(公告)号	<a href="#">CN102643341A</a>	公开(公告)日	2012-08-22
申请号	CN201210089894.7	申请日	2012-03-30
[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	C07K14/765 C07K14/795 C07K14/47 C07K1/113 C07K16/44 G01N33/532 G01N33/535 G01N33/543		
其他公开文献	CN102643341B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

## 摘要(译)

本发明公开了一种6-(甲巯基)嘌呤(6-Methylmercaptopurine, 6-MMP)免疫原及其合成方法, 以及由该免疫原获得的抗6-MMP特异性抗体、检测试剂及其制备方法。本发明的高效价的6-MMP特异性抗体研制的免疫试剂可以精确地测定6-MMP的含量。与HPLC等传统方法相比, 本发明提供的免疫检测试剂灵敏度高、特异性强, 并具有操作简单、速度快、检测结果准确等优点, 对指导临床合理用药具有重要的意义。

