



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104774256 B

(45)授权公告日 2018.04.20

(21)申请号 201510236349.X

C07K 14/435(2006.01)

(22)申请日 2015.05.11

C07K 16/44(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

C07C 217/60(2006.01)

申请公布号 CN 104774256 A

C07C 213/02(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

(43)申请公布日 2015.07.15

(73)专利权人 苏州博源医疗科技有限公司
地址 215163 江苏省苏州市高新区锦峰路8号

(56)对比文件

CN 104530222 A, 2015.04.22,

CN 103804491 A, 2014.05.21,

CN 104557722 A, 2015.04.29,

CN 104535763 A, 2015.04.22,

(72)发明人 虞留明 颜光涛 洪天配 邱玲

吴乾虎等. 儿茶酚胺人工抗原的合成.《中国免疫学杂志》.1988,第4卷(第5期),

(74)专利代理机构 南京纵横知识产权代理有限公司 32224

审查员 程静之

代理人 董建林

(51)Int.Cl.

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

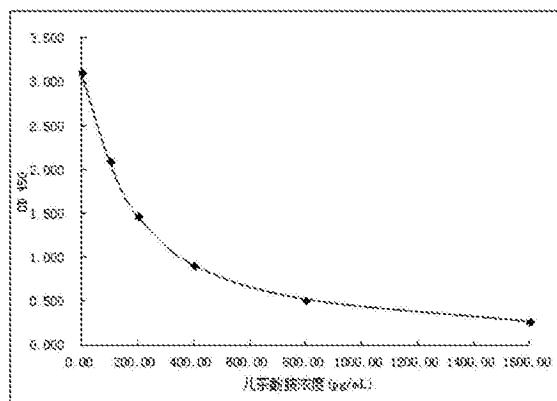
权利要求书2页 说明书16页 附图1页

(54)发明名称

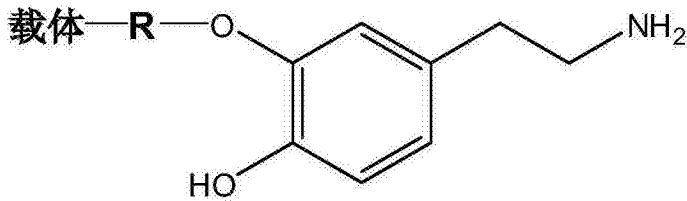
儿茶酚胺免疫原、衍生物及合成方法、特异性抗体和检测试剂及制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种儿茶酚胺免疫原、衍生物及合成方法、特异性抗体和检测试剂及制备方法。本发明制备的儿茶酚胺免疫原，免疫原性高，可以诱导得到高效价的抗儿茶酚胺特异性抗体，并且与常见的62种药物无任何交叉反应；由该抗体制备得到的儿茶酚胺检测试剂，可以精确快速地确定样品中的儿茶酚胺含量。与市场上现有的检测试剂比较，本发明检测试剂具有操作简便、灵敏度高、特异性强、结果准确等优点，还能有效降低儿茶酚胺检测成本，有利于临床大规模推广使用。



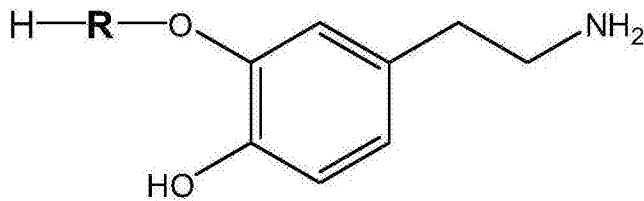
1. 一种儿茶酚胺免疫原,其结构式如式(I)所示:



式(I)

式中,R为连接基团-(CH₂)_n-COO-,n是3;载体为具有免疫原性的蛋白质或多肽,选自血清蛋白、血蓝蛋白或甲状腺球蛋白中的一种。

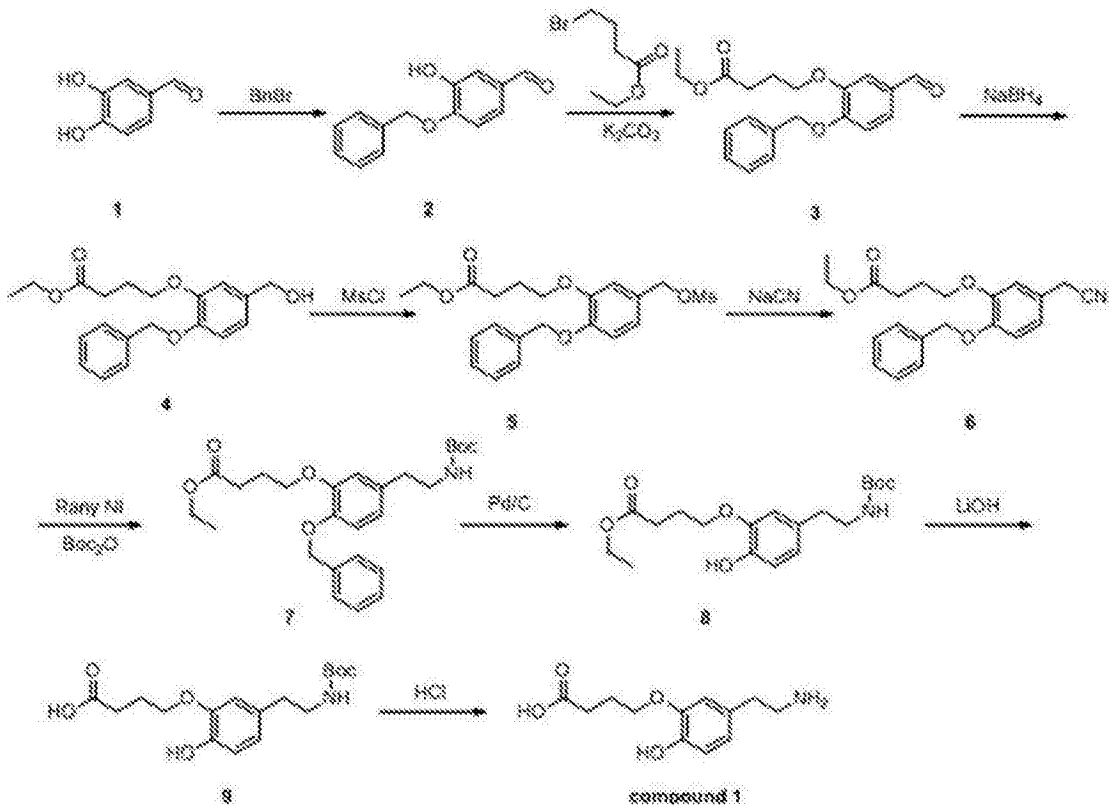
2. 一种儿茶酚胺衍生物,结构式如式(II)所示:



式(II)

上述R为连接基团-(CH₂)_n-COO-,n为3。

3. 根据权利要求2所述的儿茶酚胺衍生物的制备方法,其特征在于,儿茶酚胺衍生物的合成步骤如下:



4. 一种抗儿茶酚胺特异性抗体,由权利要求1所述的儿茶酚胺免疫原免疫实验动物后产生的完整抗体分子。

5. 根据权利要求4所述的一种抗儿茶酚胺特异性抗体,其特征在于所述的完整的抗体

分子,为采用单一的儿茶酚胺免疫原对动物加强免疫所获得的多克隆抗体,或者为免疫后经体细胞杂交获得的单克隆抗体;所述的实验动物为兔、山羊、小鼠、绵羊、豚鼠或马的一种。

6. 一种如权利要求4或5所述的抗儿茶酚胺特异性抗体的制备方法,其特征在于包含以下步骤:

(1) 用PBS将连接有牛血清白蛋白的儿茶酚胺免疫原稀释至1.0mg/ml,得到抗原溶液,然后用1.0ml抗原溶液与弗氏完全佐剂混合,对实验动物进行注射;

(2) 2~3周后,再用1.0ml相同的抗原溶液与弗氏不完全佐剂对上述实验动物注射一次,之后每隔四周注射一次,共计注射4次;

(3) 对步骤(2)的实验动物取血,分离纯化得到效价为1:30000-1:50000的抗儿茶酚胺特异性抗体。

7. 一种儿茶酚胺检测试剂,含有权利要求4或5所述的抗儿茶酚胺特异性抗体和指示试剂,所述的指示试剂选自酶试剂;所述的酶试剂由儿茶酚胺酶标偶联物和酶的底物组成,酶标偶联物为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物,酶的底物为葡萄糖-6-磷酸。

8. 一种如权利要求7所述的儿茶酚胺检测试剂的制备方法,其特征在于包含以下步骤:

(1) 试剂A:将4.036g、11.25mM氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和1.711g、11.25mM葡萄糖-6-磷酸用1L 55mM、pH=8.0的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物;将权利要求4-5中任一所述的抗儿茶酚胺特异性抗体加到上述均相酶底物中,抗儿茶酚胺特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:100~1:10000;

(2) 试剂B:将儿茶酚胺酶标偶联物加到120mM、pH=8.2的Tris缓冲液中,儿茶酚胺酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:100~1:10000。

9. 根据权利要求7所述的儿茶酚胺检测试剂的制备方法,其特征在于所述的儿茶酚胺酶标偶联物的制备方法包含以下步骤:

(1) 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液的制备:称取15mg规格为100KU的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,室温溶解于12mL含有72.6mg 0.05M Tris、8mg 3.3mM MgCl₂和100mg NaCl的溶液中,pH=9.0;在溶液中加入225mg还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、135mg葡萄糖-6-磷酸以及0.75mL卡必醇;再逐滴加入2mL二甲基亚砷;

(2) 儿茶酚胺衍生物的激活:在无水状态下称取10mg的权利要求2所述的儿茶酚胺衍生物,溶解于600μL二甲基甲酰胺中;使上述溶液温度降到-2~-8℃;加入3μL三丁胺;加入1.5μL氯甲酸异丁酯;-2~-8℃搅拌30分钟;

(3) 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与儿茶酚胺衍生物的连接:将步骤(2)激活的儿茶酚胺衍生物溶液逐滴加入到步骤(1)溶解的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中;2-8℃搅拌过夜;

(4) 纯化产物:通过G-25凝胶层析柱纯化连接产物,获得的最终产物为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物,于2-8℃下储存。

儿茶酚胺免疫原、衍生物及合成方法、特异性抗体和检测试剂及制备方法

技术领域

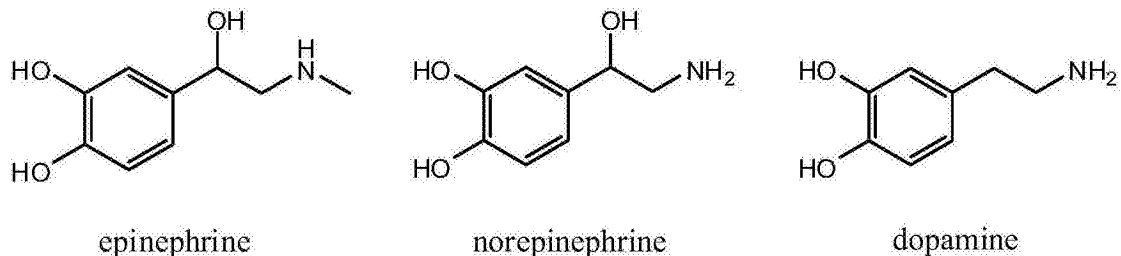
[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及儿茶酚胺免疫原、衍生物及合成方法、特异性抗体和检测试剂及制备方法。

背景技术

[0002] 儿茶酚胺(catecholamine)是一类由酪氨酸衍生而来,含有儿茶酚和胺基的小分子物质的统称,常见的儿茶酚胺类物质主要包括肾上腺素(epinephrine,E)、去甲肾上腺素(norepinephrine,NE)和多巴胺(dopamine,DA)等(结构式如式1所示)。在人体内,儿茶酚胺类物质主要由肾上腺髓质和交感神经元的嗜铬细胞所分泌,作为一类重要的神经递质和激素,在人体中具有重要的生理作用,对心血管系统、神经系统、内分泌腺、肾脏、平滑肌等组织器官具有广泛的调节作用。其中多巴胺在大脑和神经信号传导中起着十分重要的作用,可以提高神经系统反应速度,增强机体适应环境的能力。

[0003] 多种疾病会导致儿茶酚胺类物质的分泌和代谢异常,如嗜铬细胞瘤、副神经节瘤、神经母细胞瘤和肾上腺髓质增生等疾病。这些疾病患者体内儿茶酚胺的浓度会发生异常变化,进而影响与儿茶酚胺相关生理功能的正常实现。此外,体液中儿茶酚胺水平还与高血压、更年期综合征等有着密切的关系。因此,检测血浆和尿液中儿茶酚胺类物质的浓度对于这些疾病的临床诊断和治疗以及药物药理作用的研究均具有重要意义。

[0004]



式1 儿茶酚胺类物质的分子结构

[0005] 目前,国内外用于生物样品中儿茶酚胺类物质的分析方法主要有:高效液相色谱法(HPLC)、毛细管电泳法(CE)、毛细管电泳-激光诱导荧光法(CE-LIF)、荧光光度法(FL)、质谱法(MS)、气相色谱法(GC)、电化学分析法(ECD)及化学发光法(CL)等。这些方法各有其优劣之处,但是在临床大规模应用上都有一定的局限性。目前市场上缺乏稳定性好、灵敏度高、特异性强的儿茶酚胺检测试剂,尤其是质量好的自动化检验试剂,因此,研发生产质量达到临床要求、实用性强、性价比高,可应用于全自动生化分析仪的儿茶酚胺测定试剂已成为国内外体外诊断试剂行业的热点。

发明内容

[0006] 本发明为了克服现有技术存在的缺陷,采用全新的儿茶酚胺衍生物制备免疫原性

强的儿茶酚胺免疫原及其抗体,用该抗体制备的儿茶酚胺均相酶免疫检测试剂可以实现在全自动生化分析仪上对儿茶酚胺高通量、快速化的检测。该检测试剂具有操作简便、灵敏度高、特异性强、结果准确等优点,还能有效降低儿茶酚胺检测成本,有利于临床推广使用。

[0007] 本发明的一个目的在于提供一种儿茶酚胺衍生物。

[0008] 本发明的另一个目的在于提供一种免疫原性强的儿茶酚胺免疫原。

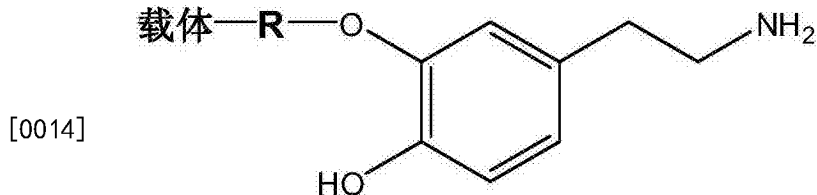
[0009] 本发明的另一个目的在于提供一种儿茶酚胺免疫原的制备方法。

[0010] 本发明的又一个目的在于提供使用本发明儿茶酚胺免疫原制备得到的特异性强的抗儿茶酚胺特异性抗体。

[0011] 本发明的再一个目的在于提供一种儿茶酚胺检测试剂。

[0012] 免疫原性与所合成的儿茶酚胺衍生物分子结构及所选载体种类有关,现有技术中儿茶酚胺免疫原的免疫原性较弱,所得到的抗体的特异性、与儿茶酚胺的结合力,敏感度都不如本发明。本发明的儿茶酚胺免疫原,免疫原性高,可以诱导得到高效价的抗儿茶酚胺特异性抗体。该抗体特异性高,与儿茶酚胺的结合力强。由该抗体制备得到的儿茶酚胺检测试剂,可以快速、准确地确定样品中的儿茶酚胺含量。本发明是通过以下技术方案实现的:

[0013] 一种儿茶酚胺免疫原,其结构式如式(I)所示:



式(I)

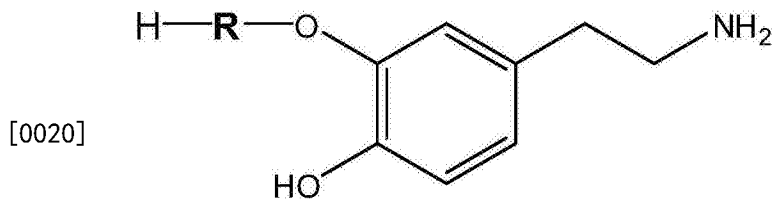
[0015] 式中,R为连接基团 $-(CH_2)_n-COO-$,n是1至20之间的整数,优选R为 $-(CH_2)_3-COO-$ 。

[0016] 载体为具有免疫原性的蛋白质或多肽,优选为血清蛋白、血蓝蛋白和甲状腺球蛋白,更优选为血清白蛋白,进一步优选为牛血清白蛋白。

[0017] 当R为 $-(CH_2)_n-COO-$ 时,该儿茶酚胺免疫原的合成途径和方法如下:

[0018] 1. 儿茶酚胺衍生物的制备方法:

[0019] 一种儿茶酚胺衍生物,其结构式如式(II)所示:

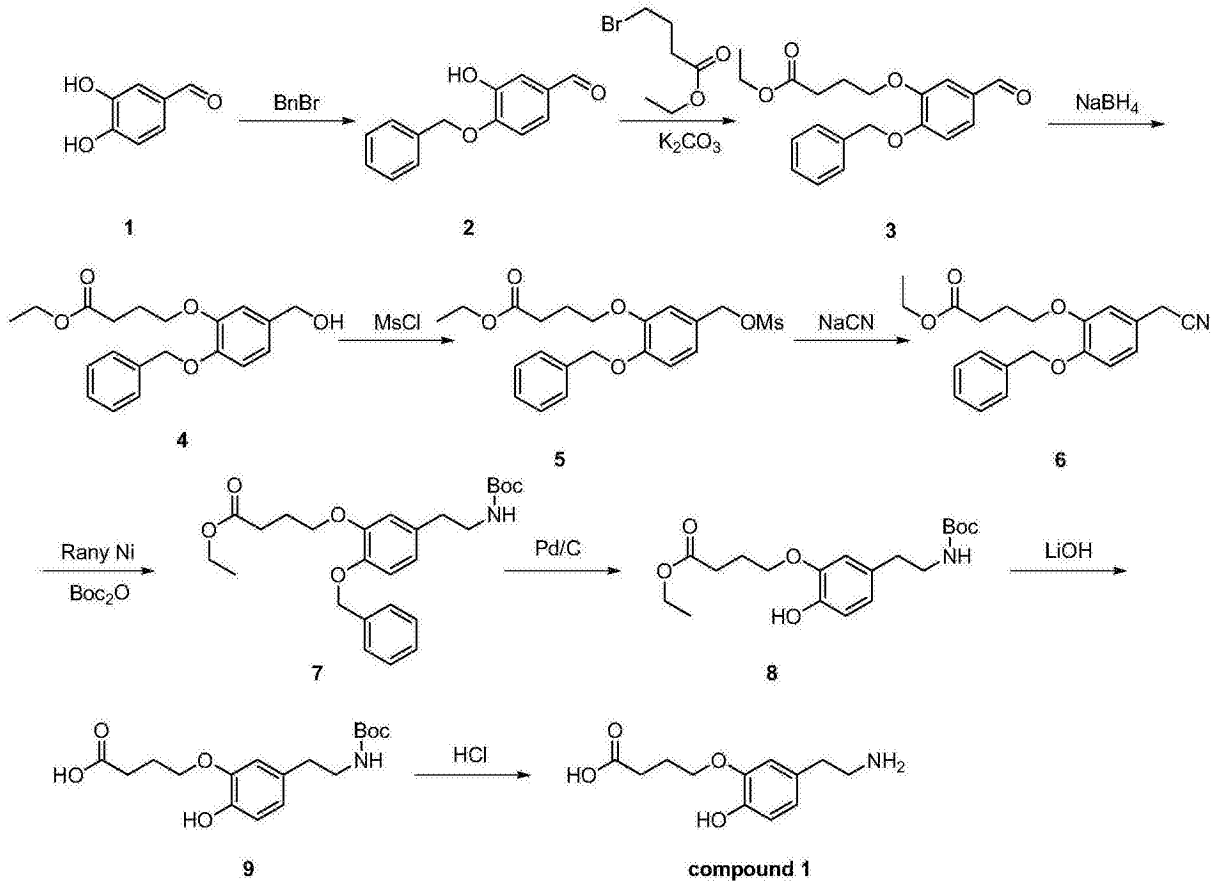


式(II)

[0021] 式中,R为连接基团 $-(CH_2)_n-COO-$,n是1至20之间的整数。

[0022] 取n=3时,该儿茶酚胺衍生物的合成步骤如下:

[0023]



[0024] 当n为3以外的其余整数时,儿茶酚胺衍生物的合成步骤的区别仅在于:由化合物2合成化合物3的步骤中,采用的原料4-溴丁酸乙酯替换为2-溴乙酸乙酯、3-溴丙酸乙酯或其余类似物。

[0025] 2. 儿茶酚胺免疫原的制备步骤:

[0026] (1) 将载体蛋白200mg溶解于50ml 0.2M, pH 8.5的磷酸缓冲液中;

[0027] (2) 将如下化学品加入到小烧杯中搅拌溶解:200mg本发明合成的儿茶酚胺衍生物、3.5ml二甲基甲酰胺、3.5ml乙醇、7.0ml 10mM, pH 5.0的磷酸钾缓冲液、200mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺、50mg N-羟基琥珀酰亚胺,将这些化学品在室温下搅拌溶解反应30min;

[0028] (3) 将溶解好的溶液滴加至载体蛋白溶液中,并在2~8℃下搅拌过夜,得到抗原;将合成好的抗原经过透析进行纯化,得到儿茶酚胺免疫原。

[0029] 本发明中当n取1~20范围内的其他整数时,用上述方法可以制备出如式(I)所示的儿茶酚胺免疫原。载体仍为具有免疫原性的蛋白质,可以是血清蛋白,血蓝蛋白和甲状腺球蛋白。优选的,载体为血清蛋白。更优选的,载体为牛血清白蛋白。

[0030] 由于连接基团主要起小分子衍生物与载体的连接作用,免疫原性强弱与所合成的儿茶酚胺衍生物分子结构及所选载体种类有关,因此理论上n取1至20之间的任意整数时,儿茶酚胺衍生物制备的儿茶酚胺免疫原无显著差异,均具备强免疫原性,都能制备高效价的特异性抗体。

[0031] 一种抗儿茶酚胺特异性抗体,由上述的儿茶酚胺免疫原免疫动物后生产得到。

[0032] 所述的抗儿茶酚胺特异性抗体由上述制得的儿茶酚胺免疫原采用常规方法接种实验动物,加强免疫后取抗血清,具体步骤如下:

[0033] (1) 用PBS将上述合成的连接BSA的儿茶酚胺免疫原稀释至1.0mg/ml,得到抗原溶液,然后用1.0ml抗原溶液与弗氏完全佐剂混合,对实验动物进行注射;

[0034] (2) 2~3周后,再用1.0ml相同的抗原溶液与弗氏不完全佐剂对上述实验动物注射一次,之后每隔四周注射一次,共计注射4次;

[0035] (3) 对上述实验动物取血,分离纯化得到效价为1:30000-1:50000的抗儿茶酚胺特异性抗体。

[0036] 本发明的抗儿茶酚胺特异性抗体为完整的抗体分子,也包括保留与儿茶酚胺特异性结合能力的抗体片段或抗体衍生物。

[0037] 本发明的抗体为采用单一的儿茶酚胺免疫原对动物加强免疫所获得的多克隆抗体,或者为免疫后经体细胞杂交获得的单克隆抗体;所述的实验动物为兔、山羊、小鼠、绵羊、豚鼠或马的一种,优选为兔。

[0038] 本发明提供一种儿茶酚胺检测试剂,含有上述抗儿茶酚胺特异性抗体和指示试剂。

[0039] 本发明指示试剂选自酶试剂、放射性同位素试剂、荧光试剂、发光试剂。优选的,指示试剂为酶试剂,由儿茶酚胺酶标偶联物和酶的底物所组成。

[0040] 上述酶标偶联物为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物;上述酶的底物为葡萄糖-6-磷酸。

[0041] 儿茶酚胺均相酶免疫检测试剂在使用之前,为了避免指示试剂中的酶标偶联物和酶的底物发生反应,酶标偶联物和酶的底物是不混合的且分开放置,所以将酶的底物与上述抗儿茶酚胺特异性抗体混合在一起。因此,儿茶酚胺均相酶免疫检测试剂包括两类试剂:

[0042] (1) 试剂A由抗儿茶酚胺特异性抗体和均相酶底物混合而成,具体制备步骤如下:

[0043] 1) 将4.036g (11.25mM) 氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)、1.711g (11.25mM) 葡萄糖-6-磷酸(G-6-P)用1L 55mM、pH=8.0的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物;

[0044] 2) 将制备的抗儿茶酚胺特异性抗体加到上述均相酶底物中,抗体与均相酶底物的体积比为1:100~1:10000;

[0045] (2) 试剂B由葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物与Tris缓冲液混合而成,制备方法如下:

[0046] 1) 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)溶液的制备:

[0047] a. 称取15mg规格为100KU的G6PDH,室温溶解于12mL含有72.6mg (0.05M) Tris、8mg $MgCl_2$ (3.3mM) 和100mg NaCl的溶液中,该溶液pH=9.0;

[0048] b. 加入225mg还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH),135mg葡萄糖-6-磷酸(G-6-P)以及0.75mL卡必醇;

[0049] c. 逐滴加入2mL二甲基亚砷;

[0050] 2) 儿茶酚胺衍生物的激活:

[0051] a. 在无水状态下称取10mg儿茶酚胺衍生物,溶解于600 μ L DMF中;

[0052] b. 使上述溶液温度降到-2~-8 $^{\circ}$ C;

[0053] c. 加入3 μ L三丁胺;

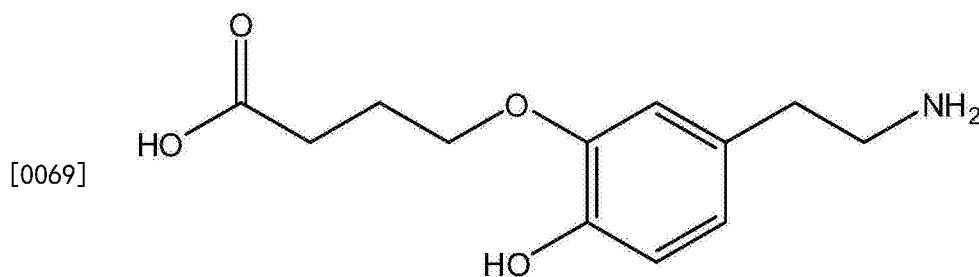
- [0054] d. 加入1.5 μ L氯甲酸异丁酯；
- [0055] e. -2~-8 $^{\circ}$ C搅拌30分钟；
- [0056] 3) G6PDH与儿茶酚胺衍生物的连接：
- [0057] a. 将上述激活的儿茶酚胺衍生物溶液逐滴加入到上述溶解的G6PDH溶液中；
- [0058] b. 2-8 $^{\circ}$ C搅拌过夜；
- [0059] 4) 纯化产物：
- [0060] 通过G-25凝胶层析柱纯化连接产物，获得的最终产物为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物，于2-8 $^{\circ}$ C下储存。
- [0061] 5) 将制备的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物加到120mM、pH=8.2的Tris缓冲液中，上述偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:100~1:10000。
- [0062] 所述的抗儿茶酚胺特异性抗体与均相酶底物的体积比优选为1:400；
- [0063] 所述的儿茶酚胺酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比优选为1:1500。
- [0064] 本发明的儿茶酚胺免疫原特异性强、免疫原性高，制备出的抗儿茶酚胺特异性抗体特异性强、效价高，并且与常见的62种药物无任何交叉反应；含有上述抗儿茶酚胺特异性抗体的均相酶免疫检测试剂可以方便、快速、准确地确定样品中的儿茶酚胺含量，并且可以在全自动生化分析仪上同时测定多个样品，实现儿茶酚胺的高通量快速化测定，准确度高，特异性强，精确度和检测效率相比之前都有了较大的提高，同时实现了检测过程的全自动化，对检测人员的要求不高，易于实现和推广使用。

附图说明

- [0065] 图1是儿茶酚胺的ELISA检测反应曲线；
- [0066] 图2是儿茶酚胺的均相酶免疫反应曲线。

具体实施方式

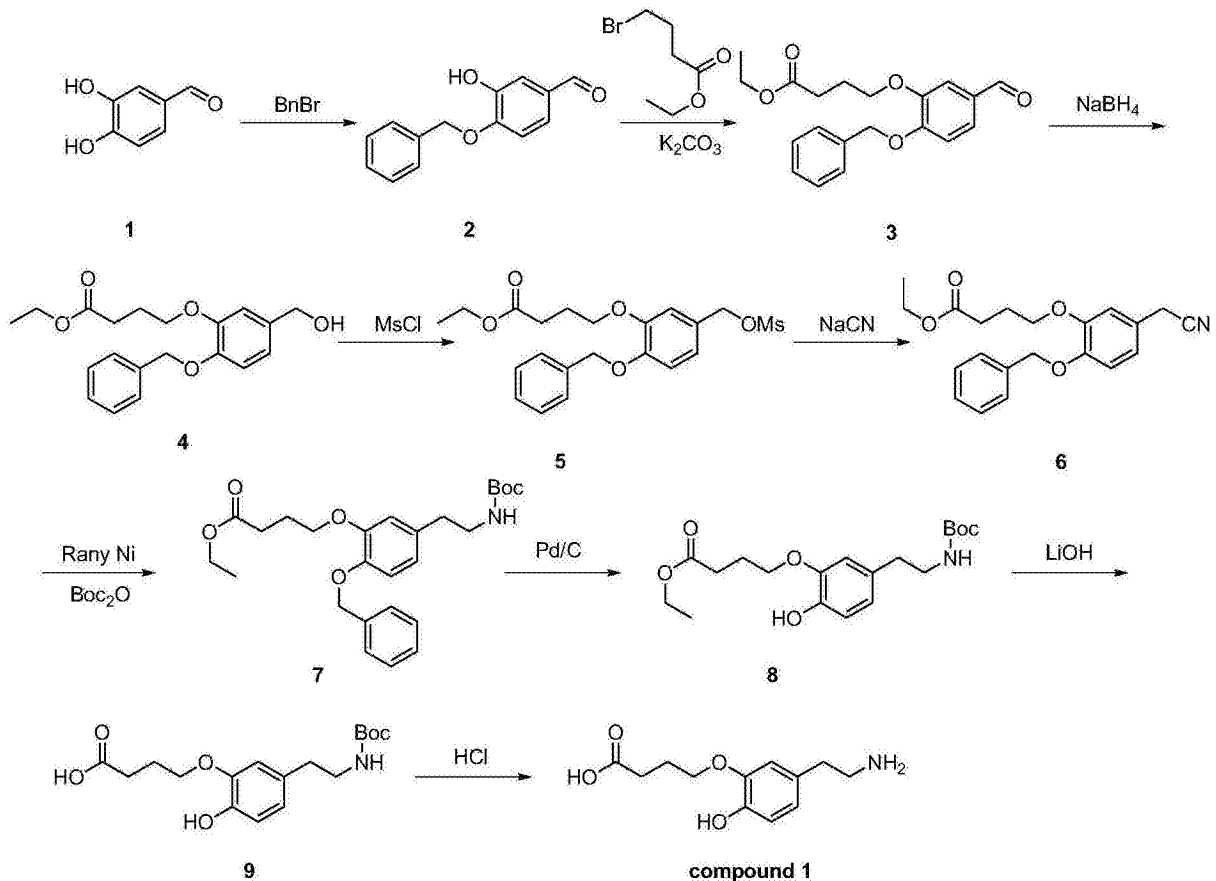
- [0067] 实施例一儿茶酚胺衍生物的合成及其定量检测
- [0068] 儿茶酚胺衍生物的化学结构如式(III)所示：



式(III) 其中 n=3

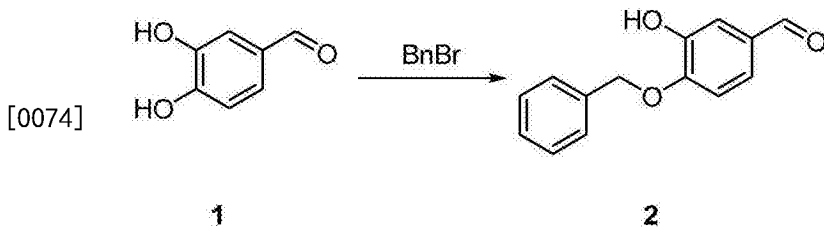
- [0070] 上述儿茶酚胺衍生物的合成路线及制备步骤如下：

[0071]



[0072] 具体的合成步骤如下：

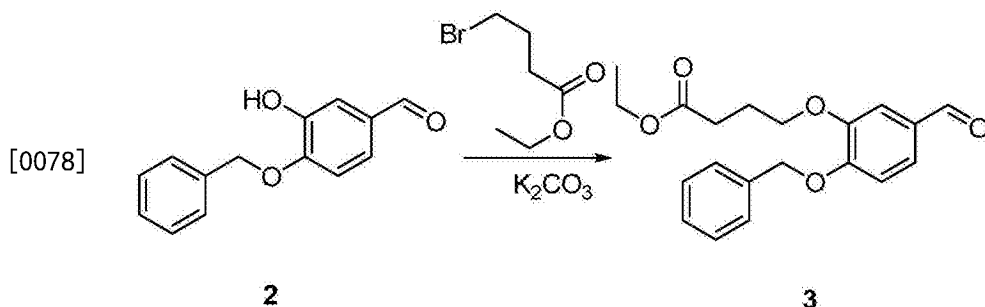
[0073] 化合物2的合成



[0075] 1) 称取20.41g (147.9mmol) 化合物1、25.29g (147.9mmol) 苄基溴以及30.62g (221.9mmol) K_2CO_3 ，共同溶解于200mL丙酮中，室温下搅拌过夜。薄层色谱(TLC)检测显示反应物已反应完全。将反应后的合成溶液进行过滤，将滤液在真空中进行浓缩，浓缩后得到的残留物用300mL的EA稀释。用200mL纯化水与200mL卤水冲洗有机层，通过 Na_2SO_4 进行干燥，然后在真空中进行浓缩得到最终产物的粗制品，最后将此粗制品通过硅胶柱进行纯化制得17g白色固体化合物2，产率50.4%。

[0076] 2) 利用Bruker Avance 111 plus 400MHz和VARIAN MERCURY plus 300M对上述白色固体化合物进行核磁共振光谱扫描，采用TMS作为内标。结果如下： 1H NMR ($CDCl_3$, 400MHz) : δ 5.19 (s, 2H) , 5.87 (s, 1H) , 7.02-7.04 (d, 1H) , 7.38-7.45 (t, 7H) , 9.82 (s, 1H)。表征为上所示的化合物2。

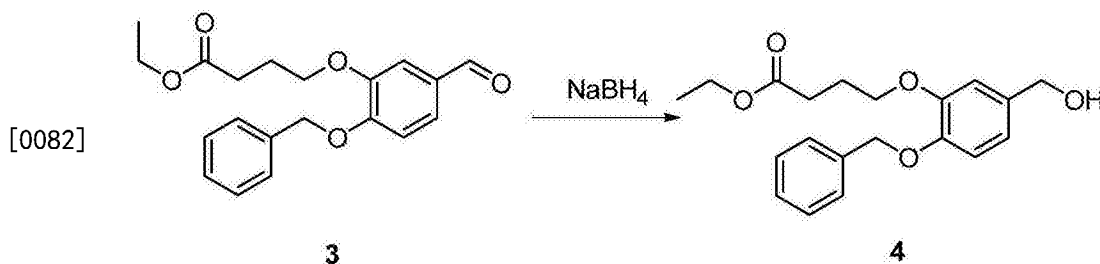
[0077] 化合物3的合成



[0079] 1) 称取17g (74.56mmol) 化合物2、43.39g (223.68mmol) 4-溴丁酸乙酯以及20.58g (149.12mmol) K_2CO_3 , 共同溶解与200mL乙腈中, 80°C下搅拌过夜。TLC检测显示反应物已反应完全。将反应后的合成溶液进行过滤, 将滤液在真空中进行浓缩得到最终产物的粗制品, 最后将此粗制品通过硅胶柱进行纯化制得21g黄色油状化合物3, 产率82.3%。

[0080] 2) 利用Bruker Avance 111 plus 400MHz和VARIAN MERCURY plus 300M对上述黄色油状化合物进行核磁共振光谱扫描, 采用TMS作为内标。结果如下: 1H NMR ($CDCl_3$, 400MHz): δ 1.23-1.27 (t, 3H), 2.16-2.20 (t, 2H), 2.53-2.57 (t, 2H), 4.11-4.16 (m, 4H), 5.22 (s, 2H), 6.98-7.00 (d, 1H), 7.32-7.44 (m, 7H), 9.82 (s, 1H)。表征为上所示的化合物3。

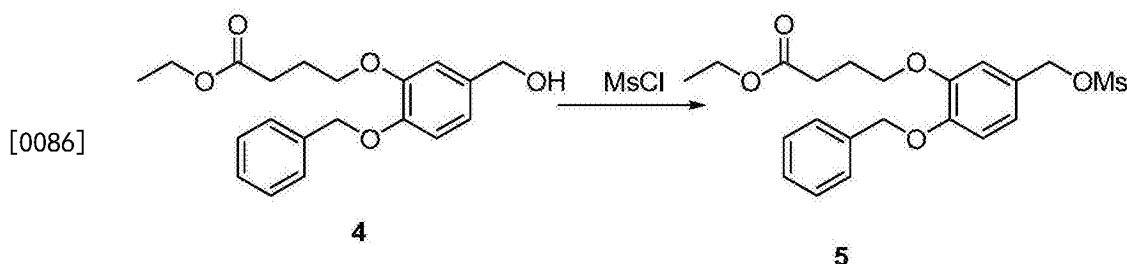
[0081] 化合物4的合成



[0083] 1) 称取21g (61.4mmol) 化合物3溶解于150mL乙醇中, 然后在0°C下分批加入 (3.5g, 92.1mmol) $NaBH_4$, 将此混合物在室温下搅拌0.5小时。将上述反应混合物在0°C下加入300mL纯化水终止反应, 然后使用3×300mL DCM进行萃取。最后将结合的有机层在真空中进行浓缩制得21g白色油状化合物4, 产率99.9%。

[0084] 2) 利用Bruker Avance 111 plus 400MHz和VARIAN MERCURY plus 300M对上述白色油状化合物进行核磁共振光谱扫描, 采用TMS作为内标。结果如下: 1H NMR ($CDCl_3$, 400MHz): δ 1.23-1.26 (t, 3H), 2.12-2.16 (t, 2H), 2.52-2.53 (t, 2H), 4.07-4.16 (m, 4H), 4.58-4.59 (d, 2H), 5.11 (s, 2H), 6.82-6.89 (q, 2H), 6.95 (s, 1H), 7.29-7.44 (m, 5H)。表征为上所示的化合物4。

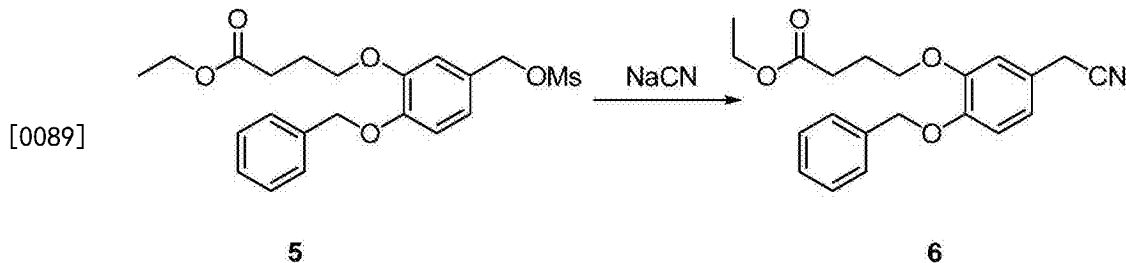
[0085] 化合物5的合成



[0087] 1) 称取21g (61mmol) 化合物4和12.33g (122mmol) 三乙胺, 共同溶解于200mL的DCM

中,制成混合溶液。将10.5g (91.5mmol) 甲磺酰氯溶解于20mL的DCM中,得到的溶液在0℃下逐滴加入上述混合溶液中。将此混合物在室温下搅拌2小时,在上述反应混合物中加入300mL纯化水终止反应,然后使用3×300mL的DCM进行萃取。将结合的有机层在真空中进行浓缩制得21g黄色油状化合物5粗品,产率81.5%。

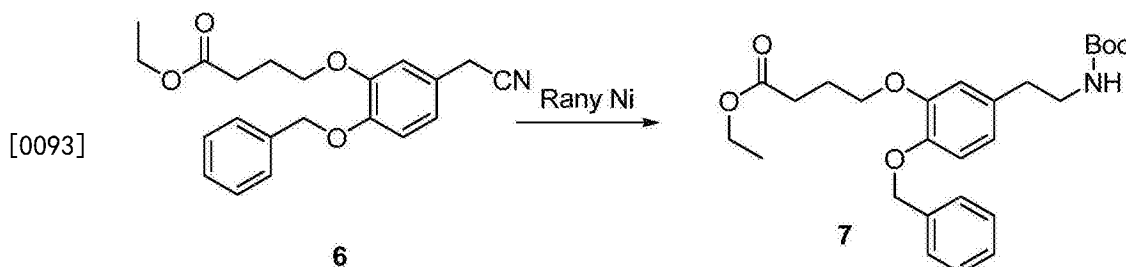
[0088] 化合物6的合成



[0090] 1) 称取21g (49.7mmol) 化合物5和3.7g (74.6mmol) NaCN,共同溶解于200mL的DMF中,然后在60℃下搅拌过夜。在上述反应混合物中加入300mL纯化水终止反应,然后使用3×300mL的EA进行萃取。将结合的有机层在真空中进行浓缩得到最终产物的粗制品,最后将此粗制品通过硅胶柱进行纯化制得12.8g白色固体化合物6,产率73.1%。

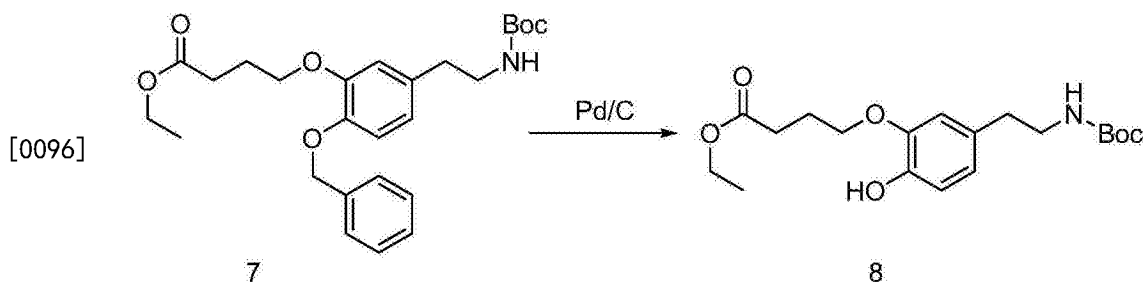
[0091] 2) 利用Bruker Avance 111 plus 400MHz和VARIAN MERCURY plus 300M对上述白色固体化合物进行核磁共振光谱扫描,采用TMS作为内标。结果如下: ^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz): δ 1.23-1.27 (t, 3H), 2.13-2.16 (t, 2H), 2.52-2.55 (t, 2H), 3.65 (s, 2H), 4.06-4.16 (m, 4H), 5.11 (s, 2H), 6.79-6.89 (m, 3H), 7.30-7.43 (m, 5H)。表征为上所示的化合物6。

[0092] 化合物7的合成



[0094] 1) 称取8g (22.66mmol) 化合物6和10g (45.3mmol) Boc_2O ,共同溶解于100mL乙醇中,然后加入8g雷尼镍 (Rany Ni)。将此混合物在50Psi的氢气 (H_2) 保护下于室温下搅拌5小时。将反应后的合成溶液进行过滤,将得到的滤液在真空中进行浓缩得到最终产物的粗制品,最后将此粗制品通过硅胶柱进行纯化制得8.4g白色固体化合物7,产率81.2%。

[0095] 化合物8的合成

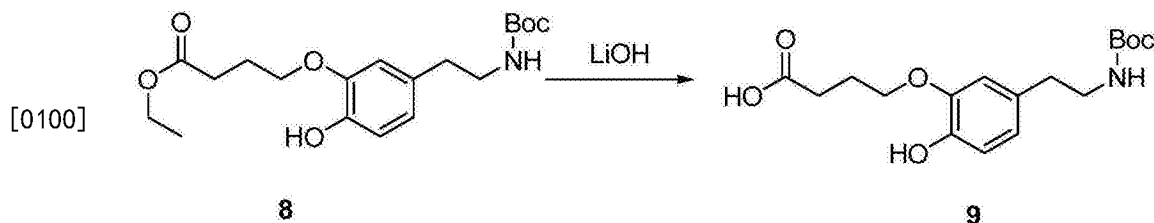


[0097] 1) 称取8.4g (18.4mmol) 化合物7和2g Pd/C催化剂,共同溶解于100mL乙醇中,然后在室温下搅拌2小时。将反应后的合成溶液进行过滤,将得到的滤液在真空中进行浓缩得到

最终产物的粗制品,最后将此粗制品通过硅胶柱进行纯化制得6.1g白色固体化合物8,产率91%。

[0098] 2) 利用Bruker Avance 111 plus 400MHz和VARIAN MERCURY plus 300M对上述白色固体化合物进行核磁共振光谱扫描,采用TMS作为内标。结果如下: ^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz): δ 1.23-1.27 (t, 3H), 1.43 (s, 9H), 2.07-2.11 (t, 2H), 2.48-2.52 (t, 2H), 2.74-2.77 (t, 2H), 3.34-3.36 (t, 2H), 4.02-4.05 (t, 2H), 4.11-4.16 (m, 2H), 6.73-6.77 (m, 2H), 7.02-7.04 (d, 1H)。表征为上所示的化合物8。

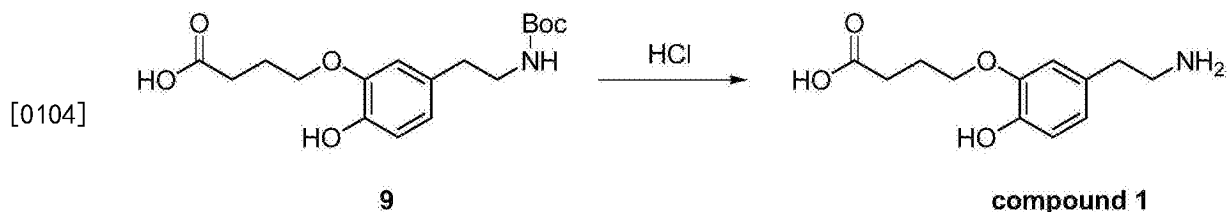
[0099] 化合物9的合成



[0101] 1) 称取6.1g (16.6mmol) 化合物8和3.5g (83mmol) LiOH,共同溶解于60mL甲醇中,然后在50°C下搅拌2小时。将此反应混合物在0°C下用100mL纯化水稀释,然后用HCl (2N) 调节至PH=3。将反应后的混合物用3×100mL的DCM进行萃取。将结合的有机层在真空中进行浓缩得到最终产物的粗制品,最后将此粗制品通过硅胶柱进行纯化制得5.2g白色固体化合物9,产率92.9%。

[0102] 2) 利用Bruker Avance 111 plus 400MHz和VARIAN MERCURY plus 300M对上述白色固体化合物进行核磁共振光谱扫描,采用TMS作为内标。结果如下: ^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz): δ 1.43 (s, 9H), 2.16 (s, 2H), 2.54-2.56 (d, 2H), 2.69 (s, 2H), 3.32-3.33 (d, 2H), 4.08-4.11 (t, 2H), 6.66-6.69 (m, 2H), 6.82-6.54 (d, 1H)。表征为上所示的化合物9。

[0103] 儿茶酚胺衍生物的合成



[0105] 1) 称取2.2g (16.6mmol) 化合物9,溶解于25mL HCl/EA中,然后在室温下搅拌2小时。将搅拌后得到的沉淀物进行过滤,过滤后得到的滤饼用EA进行冲洗,最终得到1.4g白色固体化合物(compound 1),即儿茶酚胺衍生物,产率78.65%。

[0106] 2) 利用Bruker Avance 111 plus 400MHz和VARIAN MERCURY plus 300M对上述白色固体化合物进行核磁共振光谱扫描,采用TMS作为内标。结果如下: ^1H NMR (DMSO , 400MHz): δ 1.93 (s, 2H), 2.44-2.45 (d, 2H), 2.75 (s, 2H), 2.95 (s, 2H), 3.95 (s, 2H), 6.61-6.63 (d, 1H), 6.69-6.74 (t, 1H), 6.80 (s, 1H), 7.99 (s, 3H), 8.77-8.78 (s, 1H)。表征为上所示的化合物(compound 1),即儿茶酚胺衍生物。

[0107] 3) 利用色谱/质谱技术(LC/MS)对得到的衍生物进行分析鉴定,确定该最终所得化合物(compound 1)为式(III)所示的儿茶酚胺衍生物。

[0108] 本实施例中,儿茶酚胺衍生物的制备过程中,化合物3的合成步骤选用了4-溴丁酸

乙酯为合成原料,故所得的最终产物儿茶酚胺衍生物的链接基团R为 $-(CH_2)_3-COO-$ 。当n取其他数值时,选用其他4-溴丁酸乙酯类似物进行实验,合成方法完全一致。4-溴丁酸乙酯类似物包括2-溴乙酸乙酯、3-溴丙酸乙酯、5-溴戊酸乙酯、6-溴己酸乙酯等等。

[0109] 实施例二儿茶酚胺免疫原的合成

[0110] 儿茶酚胺免疫原由牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin,BSA)与式(II)所示的儿茶酚胺衍生物的 $-(CH_2)_n-COO-$ 基团连接而成,在本实施例中,以 $n=3$ 为例详细说明该免疫原的合成方法,具体步骤如下:

[0111] 1.将牛血清白蛋白200mg溶解于50ml 0.2M,pH 8.5的磷酸缓冲液中;

[0112] 2.将如下化学品加入到小烧杯中搅拌溶解:200mg合成的儿茶酚胺衍生物、3.5ml二甲基甲酰胺、3.5ml乙醇、7.0ml 10mM,pH 5.0的磷酸钾缓冲液、200mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺、50mg N-羟基琥珀酰亚胺,将这些化学品在室温下搅拌溶解反应30min;

[0113] 3.将溶解好的溶液滴加至BSA溶液中,并在 $2\sim 8^\circ\text{C}$ 下搅拌过夜,得到抗原;将合成好的抗原经过透析进行纯化,得到儿茶酚胺免疫原。

[0114] 实施例三:抗儿茶酚胺特异性抗体的制备

[0115] 将实施例二制备得到的儿茶酚胺免疫原采用常规方法接种实验动物兔,加强免疫后取抗血清,具体步骤如下:

[0116] 1.用PBS将上述合成的儿茶酚胺免疫原稀释至 1.0mg/ml ,得到抗原溶液,然后用 1.0ml 抗原溶液与弗氏完全佐剂混合,对实验动物兔进行注射。

[0117] 2. $2\sim 3$ 周后,再用 1.0ml 相同的抗原溶液与弗氏不完全佐剂对上述实验动物兔注射一次,之后每隔四周注射一次,共计注射4次。

[0118] 3.对步骤2的实验动物兔取血,分离纯化得到效价为 $1:30000\sim 1:50000$ 的抗儿茶酚胺特异性抗体。

[0119] 实施例四:儿茶酚胺ELISA检验

[0120] 1.儿茶酚胺ELISA检测标准曲线的建立

[0121] (1)标准品的制备

[0122] 将儿茶酚胺粉末(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 1600.00pg/mL 、 800.00pg/mL 、 400.00pg/mL 、 200.00pg/mL 、 100.00pg/mL 和 0.00pg/mL 的标准溶液。其中,ELISA缓冲液含有 50.0mM Tris, 145mM NaCl和 0.25% 的BSA。

[0123] (2)利用儿茶酚胺的ELISA检验方法制备标准曲线

[0124] 用PBS将实施例三中所制备的抗儿茶酚胺抗体稀释成 $1:8000$ 的终浓度溶液, $100\mu\text{L}$ /孔包被在96孔酶联板上, 4°C 放置 $12\sim 24\text{h}$;用PBS将上述包被有抗儿茶酚胺抗体的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 $8\sim 16\text{h}$ 。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HRP-儿茶酚胺偶联物;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 $100\mu\text{L}$ 终止液(2M硫酸)。测定 450nm 的吸光值。根据各标准品所对应的 450nm 的吸光值定标,制作标准曲线,结果如附图1所示。

[0125] 2.待测样品中儿茶酚胺含量的检测

[0126] (1) 制作待测样品

[0127] 制备方法:将儿茶酚胺粉末(购于Sigma公司)溶解于甲醇溶液制成1 μ g/mL的储存液,并将此储存液稀释于空白血浆中,至终浓度分别为0.00,50.00,500.00,1500.00pg/mL,形成空白、低、中、高浓度的血浆样本。该空白血浆为不含儿茶酚胺的健康人血浆。

[0128] (2) 测试方法

[0129] 利用上述儿茶酚胺的ELISA检验方法,将上述空白、低、中、高浓度的血浆样本代替标准品,测试上述空白、低、中、高浓度的血浆样本在450nm的吸光值。

[0130] (3) 测试结果

[0131] 对照图1中所示的儿茶酚胺ELISA检验的标准曲线,计算每个样本中儿茶酚胺含量,并对每个样本进行3个复孔测定,根据上述样本中儿茶酚胺的实际含量计算回收率,结果如表1所示。

[0132] 表1儿茶酚胺的ELISA检测回收实验

血清样品	空白	低	中	高
样品浓度 (pg/mL)	0.00	50.00	500.00	1500.00
[0133] 测试 1	0.04	51.33	511.81	1515.66
测试 2	0.01	49.50	502.26	1527.51
测试 3	0.00	50.09	499.95	1509.00
平均值 (pg/mL)	0.02	50.31	504.67	1517.39
回收率 (%)	-	100.6	100.9	101.2

[0134] 由表1中结果可知:采用本发明儿茶酚胺ELISA检测试剂测定不同浓度样品中的儿茶酚胺回收率都较高,均>90%,说明本发明所述的抗儿茶酚胺特异性抗体可以用于样本中儿茶酚胺的检测,并且结果准确度高。

[0135] 实施例五:葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物的制备

[0136] 1. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)溶液的制备:

[0137] (1) 准确称取15mg规格为100KU的G6PDH,室温溶解于12mL含有72.6 mg (0.05M) Tris、8mg MgCl₂ (3.3mM) 和100mg NaCl的溶液中,该溶液pH=9.0,本步骤在烧杯C中进行。

[0138] (2) 在上述烧杯C中加入225mg还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH),135mg葡萄糖-6-磷酸(G-6-P)以及0.75mL卡必醇(Carbitol)。

[0139] (3) 在上述烧杯C中再逐滴加入2mL二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide,DMSO)。

[0140] 2. 儿茶酚胺衍生物的激活:

[0141] (1) 在无水状态下称取10mg上述儿茶酚胺衍生物,溶解于600 μ L DMF中。

[0142] (2) 使上述溶液温度降到-2~-8 $^{\circ}$ C。

[0143] (3) 加入3 μ L三丁胺(tributylamine)。

[0144] (4) 加入1.5 μ L氯甲酸异丁酯(isobutylchloroformate)。

[0145] (5) -2~-8 $^{\circ}$ C搅拌30分钟。

[0146] 3. G6PDH与儿茶酚胺衍生物的连接:

[0147] (1) 将上述激活的儿茶酚胺衍生物溶液逐滴加入到上述溶解的G6PDH溶液中。

[0148] (2) 2-8 $^{\circ}$ C搅拌过夜。

[0149] 4.纯化产物:

[0150] 通过G-25凝胶层析柱纯化步骤3中的溶液,获得的最终产物为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物,于2-8℃下储存。

[0151] 实施例六:儿茶酚胺均相酶免疫检测试剂的制备

[0152] 1. 试剂A的制备:将4.036g (11.25mM) 氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD)、1.711g (11.25mM) 葡萄糖-6-磷酸 (G-6-P) 置于烧杯D中,用1L 55mM、pH=8.0的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物;将上述制备的抗儿茶酚胺特异性抗体加到上述均相酶底物中,抗体与均相酶底物的体积比可以为1:100~1:10000,在本实施例中的比例为1:400。

[0153] 2. 试剂B的制备:将实施例五制备的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物加到120mM、pH=8.2的Tris缓冲液中,上述偶联物与Tris缓冲液的体积比可以为 1:100~1:10000,在本实施例中的比例为1:1500。

[0154] 实施例七:儿茶酚胺均相酶免疫检验及结果

[0155] 1. 获得标准曲线:

[0156] (1) 设置迈瑞BS200全自动生化分析仪反应参数(见表2)。

[0157] (2) 操作步骤为:先加试剂A,再加入标准品,最后加入试剂B。加入试剂B后,测定不同时间点的OD₃₄₀吸光值,算出不同标准品浓度时的反应速率,实际操作过程中需不断调整试剂A和试剂B的体积比例,同时调整测光点,最后得出较理想的反应标准曲线图,如图2所示。

[0158] 表2迈瑞BS200全自动生化分析仪反应参数

迈瑞 BS-200 参数	
项目名称	儿茶酚胺
试剂 1	200 μl
试剂 2	50 μl
样本量	12 μl
分析方法	终点法
主波长	340 nm
次波长	405 nm
反应时间	5 - 15 mins
孵育时间	5 mins
反应方向	上升
结果	ng/ml
结果精度	0.01
定标方法	Logistic-Log 5P
标准品浓度	0.00, 50.00, 100.00, 200.00, 400.00, 800.00 ng/ml

[0160] 2. 样本检测:通过本发明的均相酶免疫检测试剂得到的标准曲线,重复测定低、中、高浓度质控样本10次,上述质控样本为:将儿茶酚胺标准品溶解于人血浆中,至浓度分别为50.00,300.00,800.00ng/ml。检测数据及数据分析见表3。

[0161] 表3样品测定及精密度和回收率评估

血液样品	低	中	高
[0162] 样品浓度 (ng/ml)	50.00	300.00	800.00
1	51.27	307.40	815.26
2	50.79	305.83	809.11
3	49.30	296.55	786.78
4	51.04	303.50	795.31
5	48.99	299.59	812.90
6	50.72	294.47	801.22
7	52.01	309.56	816.50
[0163] 8	49.53	307.20	797.43
9	50.80	296.52	810.09
10	51.41	300.05	804.92
平均值(ng/ml)	50.59	299.37	804.95
标准差 (SD)	0.9890	11.5964	9.6619
精密度 (CV%)	1.95	3.87	1.20
回收率 %	101.2	100.7	100.6

[0164] 检测结果:本发明的均相酶免疫检测试剂测定的准确度高,回收率达到95%–105%,精密度高,CV均低于5%。

[0165] 实施例八:药物干扰试验

[0166] 选取62种常见药物进行干扰检测,调整浓度至1.00 μ g/ml,采用实施例七的均相酶免疫方法进行测定:

[0167] 1.将待测干扰药物与实施例六制备的试剂A接触反应,再加入试剂B;

[0168] 2.检测上述混合溶液的OD₃₄₀吸光值,根据实施例七的标准曲线得到相应物质的浓度。

[0169] 常见的62种药物名称以及测定结果具体参见表4。

[0170] 表4常见干扰药物测定结果

[0171]

ID#	化合物名称	等价于儿茶酚胺的浓度 (µg/ml)	ID#	化合物名称	等价于儿茶酚胺的浓度 (µg/ml)
1	阿司匹林	0.0	32	苯丙醇胺	0.0
2	β-苯基乙胺	0.0	33	普鲁卡因酰胺	0.0
3	安非他命	0.0	34	普鲁卡因	0.0

[0172]

ID#	化合物名称	等价于儿茶酚胺的浓度 (µg/ml)	ID#	化合物名称	等价于儿茶酚胺的浓度 (µg/ml)
4	氨苄青霉素	0.0	35	奎尼丁	0.0
5	甲氨二氮卓	0.0	36	佐美酸	0.0
6	氯丙嗪	0.0	37	苯肾上腺素	0.0
7	氯拉卓酸	0.0	38	桂皮酰艾克宁	0.0
8	二甲苯氧庚酸	0.0	39	芽子碱	0.0
9	非诺洛芬	0.0	40	地西洋	0.0
10	甲基苯丙胺	0.0	41	可替宁	0.0
11	龙胆酸	0.0	42	阿替洛尔	0.0
12	吉非贝齐	0.0	43	心得安	0.0
13	氢可酮	0.0	44	苯乙哌啶酮	0.0
14	布洛芬	0.0	45	苯基丁氮酮	0.0
15	丙咪嗪	0.0	46	麦角酸二乙基酰胺	0.0
16	二氨基二苯砜	0.0	47	大麻酚	0.0
17	萘普生	0.0	48	洛哌丁胺	0.0
18	氢氯噻嗪	0.0	49	异克舒令	0.0
19	哌替啶	0.0	50	苯基丙氨酸	0.0
20	烯丙羟吗啡酮	0.0	51	盐酸氟西汀	0.0
21	麻黄素	0.0	52	柳丁氨醇	0.0
22	烟酰胺	0.0	53	青霉素	0.0
23	甲胺呋硫	0.0	54	甲基二乙醇胺	0.0
24	异戊巴比妥	0.0	55	二亚甲基双氧苯丙胺	0.0
25	甲撑二氧苯丙胺	0.0	56	琥珀酸多西拉敏	0.0
26	四氢大麻酚	0.0	57	纳布啡	0.0

[0173]

ID#	化合物名称	等价于儿茶酚胺的浓度 (µg/ml)	ID#	化合物名称	等价于儿茶酚胺的浓度 (µg/ml)
27	制霉菌素	0.0	58	去甲吗啡	0.0
28	乙酰吗啡	0.0	59	羟考酮	0.0
29	苯非他明	0.0	60	克他命	0.0
30	异丙嗪	0.0	61	苯海拉明	0.0
31	阿司帕坦	0.0	62	苯丁胺	0.0

[0174] 测定结果显示：上述62种常见药物等价于儿茶酚胺的浓度均小于0.01µg/ml。由此可见，本发明的抗体是抗儿茶酚胺的特异性抗体，与其它药物无交叉反应。

[0175] 需要说明的是，以上所述仅为本发明的实施例，并非因此限制本发明的专利范围，凡是利用本发明说明书及附图内容所做的等效结构或等效流程变换，或直接或间接运用在其他相关技术领域，均同理包括在本发明的专利保护范围内。

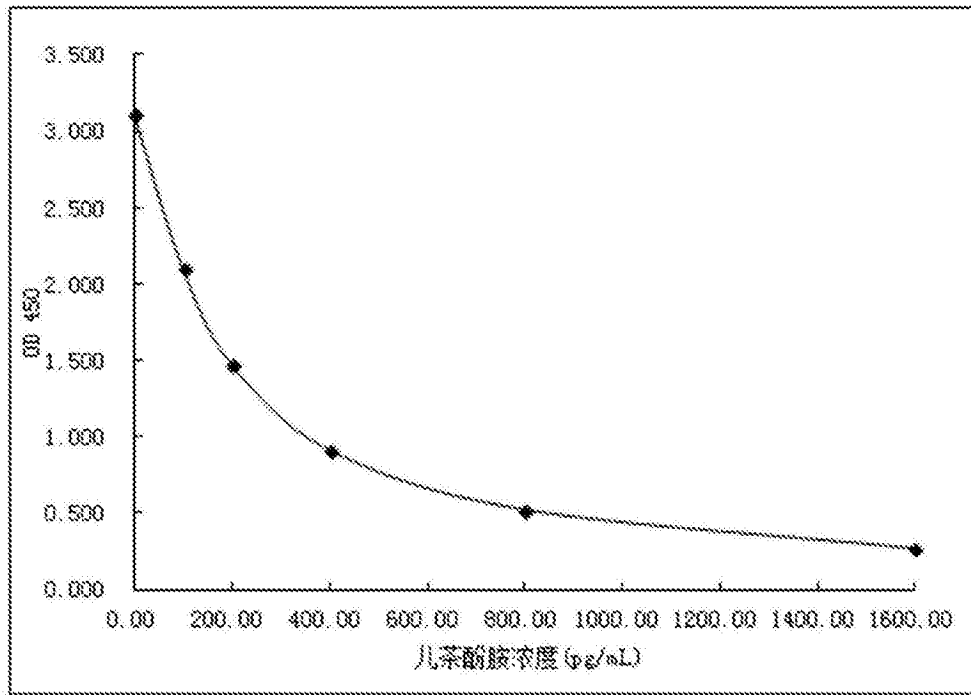


图1

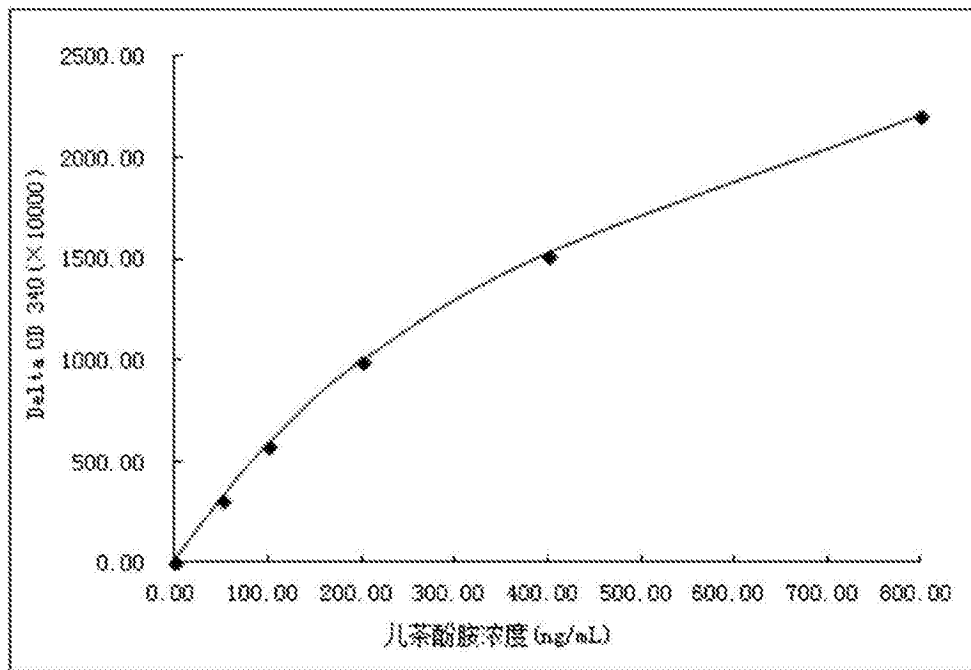


图2

专利名称(译)	儿茶酚胺免疫原、衍生物及合成方法、特异性抗体和检测试剂及制备方法		
公开(公告)号	CN104774256B	公开(公告)日	2018-04-20
申请号	CN201510236349.X	申请日	2015-05-11
[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 颜光涛 洪天配		
发明人	虞留明 颜光涛 洪天配 邱玲		
IPC分类号	C07K14/765 C07K14/795 C07K14/435 C07K16/44 C07C217/60 C07C213/02 G01N33/53		
CPC分类号	C07C213/08 C07C217/60 C07K14/435 C07K14/765 C07K14/795 C07K16/44 C07K19/00 G01N33/535		
代理人(译)	董建林		
其他公开文献	CN104774256A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种儿茶酚胺免疫原、衍生物及合成方法、特异性抗体和检测试剂及制备方法。本发明制备的儿茶酚胺免疫原，免疫原性高，可以诱导得到高效价的抗儿茶酚胺特异性抗体，并且与常见的62种药物无任何交叉反应；由该抗体制备得到的儿茶酚胺检测试剂，可以精确快速地确定样品中的儿茶酚胺含量。与市场上现有的检测试剂比较，本发明检测试剂具有操作简便、灵敏度高、特异性强、结果准确等优点，还能有效降低儿茶酚胺检测成本，有利于临床大规模推广使用。

