



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104804079 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 29

(21) 申请号 201510235969. 1

G01N 33/535(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 05. 11

(71) 申请人 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

(72) 发明人 虞留明 李振荣 曹永彤 王海滨

(74) 专利代理机构 南京纵横知识产权代理有限公司 32224

代理人 董建林

(51) Int. Cl.

C07K 14/765(2006. 01)

C07K 14/795(2006. 01)

C07K 14/435(2006. 01)

C07K 16/44(2006. 01)

C07D 401/04(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

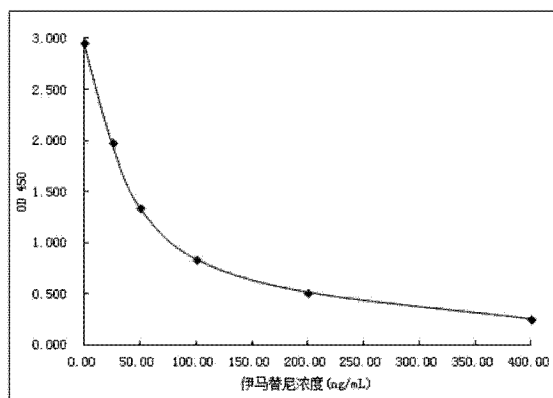
权利要求书3页 说明书14页 附图1页

(54) 发明名称

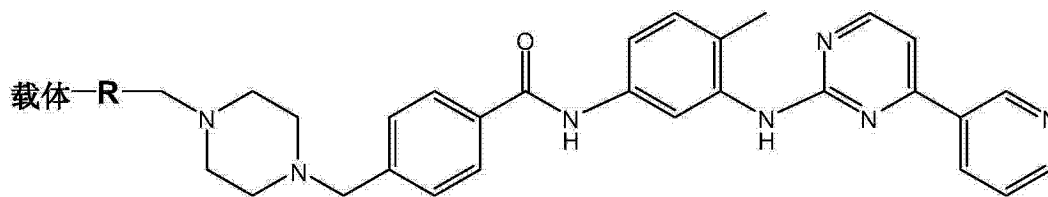
伊马替尼免疫原、衍生物及合成方法、特异性抗体和检测试剂及制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种伊马替尼免疫原、衍生物及合成方法、特异性抗体和检测试剂及制备方法。本发明制备的伊马替尼免疫原,免疫原性高,可以诱导得到高效价的抗伊马替尼特异性抗体,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伊马替尼检测试剂,可以精确快速地确定样品中的伊马替尼含量。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,还能有效降低伊马替尼检测成本,有利于临床大规模推广使用。



1. 一种伊马替尼免疫原, 其结构式如式 (I) 所示:



式 (I)

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

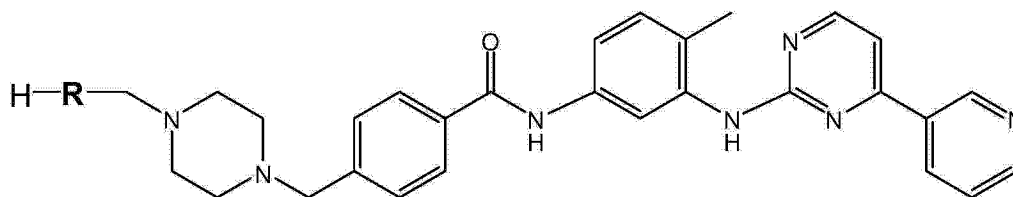
2. 一种如权利要求 1 所述的伊马替尼免疫原的制备方法, 其特征在于包含以下步骤:

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

(2) 将如下化学品加入到小烧杯中搅拌溶解: 200mg 伊马替尼衍生物、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;

(3) 将溶解好的溶液滴加至载体蛋白溶液中, 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, 得到伊马替尼免疫原。

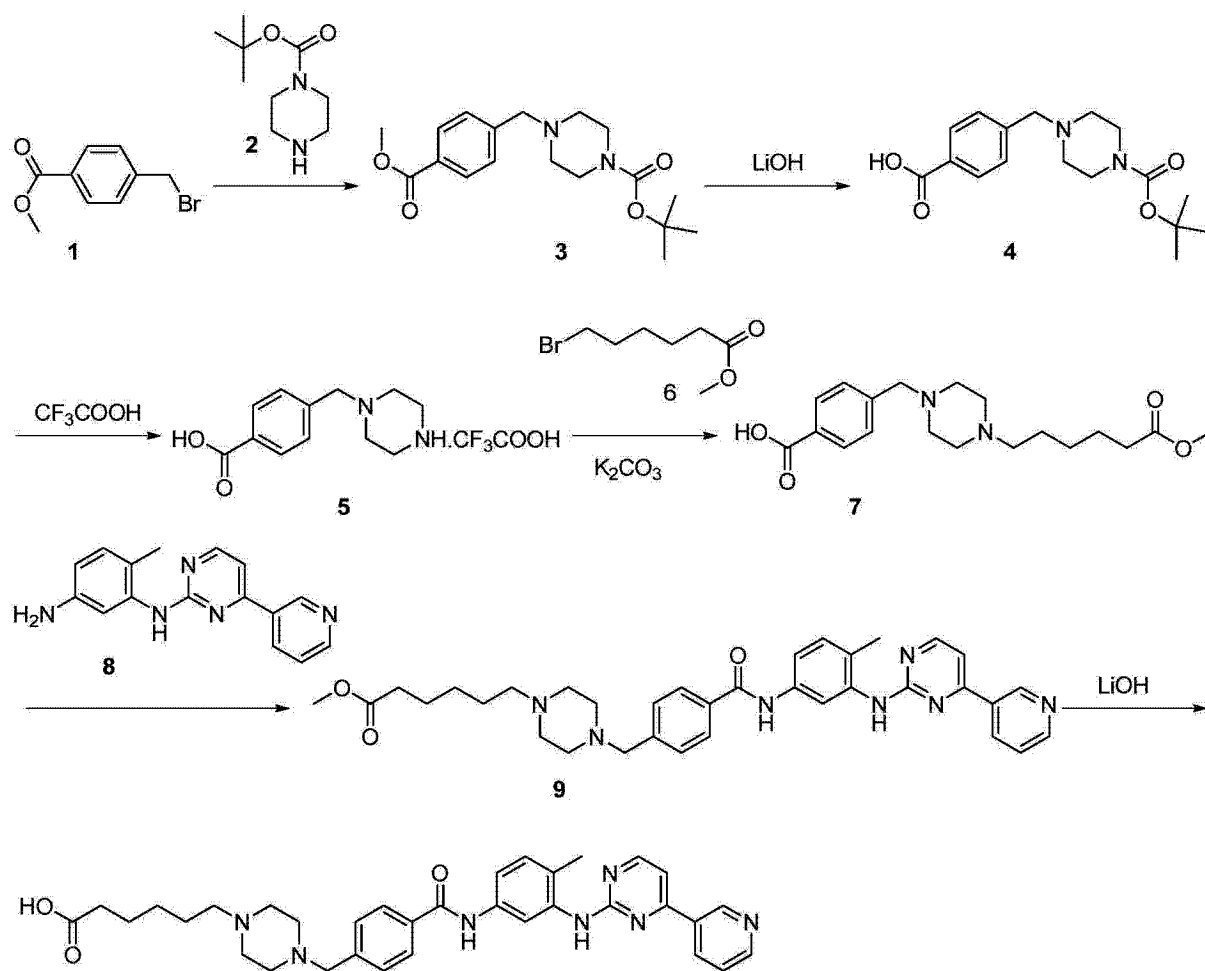
3. 一种伊马替尼衍生物, 结构式如式 (II) 所示:



式 (II)

上述 R 为连接基团 $-(CH_2)_n-COO-$, n 为 1 至 20 之间的整数。

4. 根据权利要求 3 所述的伊马替尼衍生物的制备方法, 其特征在于, 取 $n = 4$ 时, 伊马替尼衍生物的合成步骤如下:



Imatinib Derivative

或者当 n 为 4 以外的其余整数时,伊马替尼衍生物的合成步骤与上述合成步骤的区别仅在于:由化合物 5 合成化合物 7 的步骤中,采用的原料 6- 溴己酸甲酯替换为其类似物。

5. 一种抗伊马替尼特异性抗体,由权利要求 1 所述的伊马替尼免疫原免疫实验动物后产生的完整抗体分子,或者为保留与伊马替尼特异性结合能力的抗体片段或抗体衍生物。

6. 根据权利要求 5 所述的一种抗伊马替尼特异性抗体,其特征在于所述的完整的抗体分子、抗体片段或抗体衍生物,为采用单一的伊马替尼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。

7. 一种如权利要求 5 或 6 所述的抗伊马替尼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伊马替尼免疫原稀释至 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 的抗伊马替尼特异性抗体。

8. 一种伊马替尼检测试剂,含有权利要求 5 或 6 所述的抗伊马替尼特异性抗体和指示

试剂,所述的指示试剂选自酶试剂;所述的酶试剂由伊马替尼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。

9. 一种如权利要求8所述的伊马替尼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5-7中任一项所述的抗伊马替尼特异性抗体加到上述均相酶底物中,抗伊马替尼特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:100~1:10000;

(2) 试剂B:将伊马替尼酶标偶联物加到120mM、pH=8.2的Tris缓冲液中,伊马替尼酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:100~1:10000。

10. 根据权利要求8所述的伊马替尼检测试剂的制备方法,其特征在于所述的伊马替尼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 $MgCl_2$ 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) 伊马替尼衍生物的激活:在无水状态下称取10mg伊马替尼衍生物,溶解于600 μ L二甲基甲酰胺中;使上述溶液温度降到-2~-8℃;加入3 μ L三丁胺;加入1.5 μ L氯甲酸异丁酯;-2~-8℃搅拌30分钟;

(3) 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与伊马替尼衍生物的连接:将步骤(2)激活的伊马替尼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。

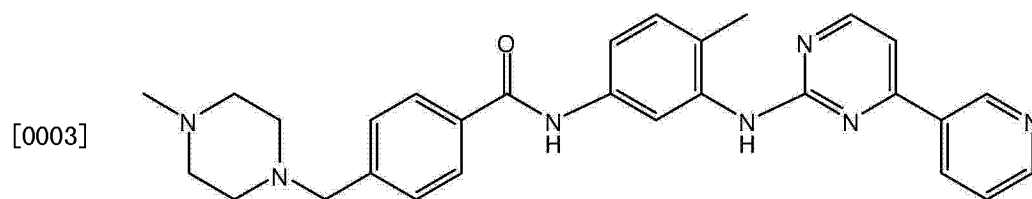
伊马替尼免疫原、衍生物及合成方法、特异性抗体和检测试剂及制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及伊马替尼免疫原、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] 伊马替尼 (Imatinib), 其结构式如式 (III) 所示:



式 (III)

[0004] 伊马替尼是一种抗癌药,其药理活性盐:甲磺酸伊马替尼(商品名 Gleevec),主要用于慢性粒细胞白血病的治理,尤其是用于治疗 α -干扰素治疗失败的胚细胞危象病期、加速病期或慢性病期的慢性骨髓性白血病患者。此外本品还可用于胃肠道间质细胞瘤、隆突性皮肤纤维肉瘤、费城染色体阳性的急性淋巴细胞白血病,嗜酸细胞增多症、系统性肥大细胞增多症等多种疾病的治疗。据报道,个体内和个体间的伊马替尼及其盐的药代动力学变异性程度较大,并受诸多因素影响,包括:器官功能、遗传调节、疾病状态、年龄、药物间相互作用、药物摄入时间、顺应性等,相同剂量的伊马替尼或其盐的有效性依据患者的个体药物清除率和最终血清药物浓度而有显著变化。因此,不同个体使用相同剂量的本品可导致显著不同的临床效果。监测血液中的该药物浓度能使临床医生及时了解药物施用过程中患者个体间的差异,并对不同患者的药物施用量进行个体化调整,能有效提高治疗效果,并显著降低药物毒副作用,对于临床合理用药具有重要意义。

[0005] 目前,国内外对于伊马替尼的分析方法研究主要集中在血药浓度及生物利用度上。伊马替尼的检测分析主要有 HPLC-UV、LC-MS-MS、MESED-LC-MS-MS、 C_{14} 放射能测定法、毛细管电泳分析法、HPLC-ESI-MS 和电化学分析法等,但是这些方法都不适合临床大规模应用,无法满足日益增长的临床检测需求。目前市场上缺乏稳定性好、灵敏度高、特异性强的伊马替尼检测试剂,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伊马替尼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,采用全新的伊马替尼衍生物制备免疫原性强的伊马替尼免疫原及其抗体,用该抗体制备的伊马替尼均相酶免疫检测试剂可以实现在全自动生化分析仪上对伊马替尼高通量、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,还能有效降低伊马替尼检测成本,有利于临床推广使用。

[0007] 本发明的一个目的在于提供一种伊马替尼衍生物。

[0008] 本发明的另一个目的在于提供一种免疫原性强的伊马替尼免疫原。

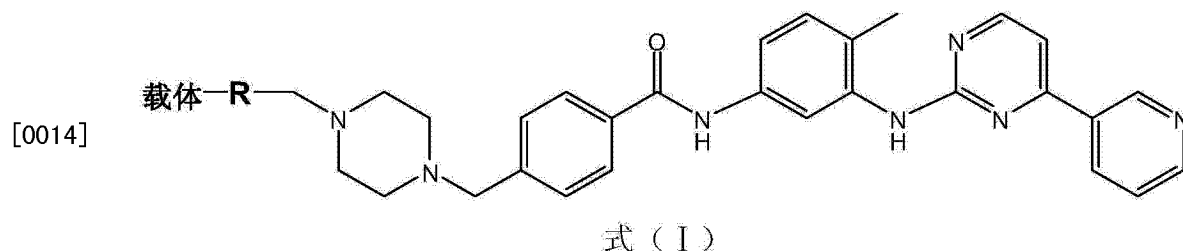
[0009] 本发明的另一个目的在于提供一种伊马替尼免疫原的制备方法。

[0010] 本发明的又一个目的在于提供使用本发明伊马替尼免疫原制备得到的特异性强的抗伊马替尼特异性抗体。

[0011] 本发明的再一个目的在于提供一种伊马替尼检测试剂。

[0012] 免疫原性与所合成的伊马替尼衍生物分子结构及所选载体种类有关,现有技术中伊马替尼免疫原的免疫原性较弱,所得到抗体的特异性、与伊马替尼的结合力,敏感度都不如本发明。本发明的伊马替尼免疫原,免疫原性高,可以诱导得到高效价的抗伊马替尼特异性抗体。该抗体特异性高,与伊马替尼的结合力强。由该抗体制备得到的伊马替尼检测试剂,可以快速、准确地确定样品中的伊马替尼含量。本发明是通过以下技术方案实现的:

[0013] 一种伊马替尼免疫原,其结构式如式(I)所示:



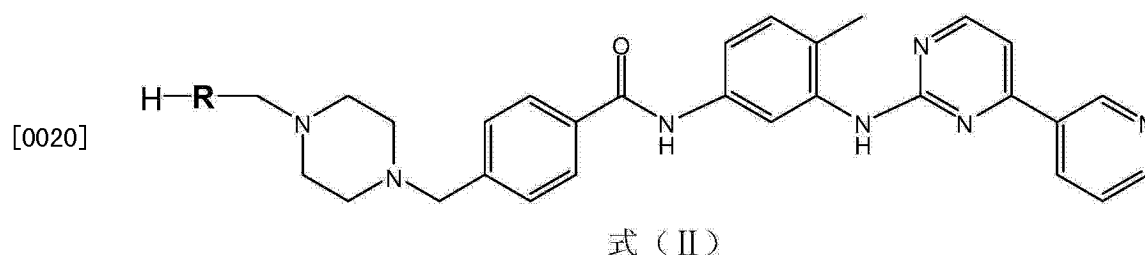
[0015] 式中,R为连接基团 $-(CH_2)_n-COO-$,n是1至20之间的整数,优选R为 $-(CH_2)_4-COO-$ 。

[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,该伊马替尼免疫原的合成途径和方法如下:

[0018] 1. 伊马替尼衍生物的制备方法:

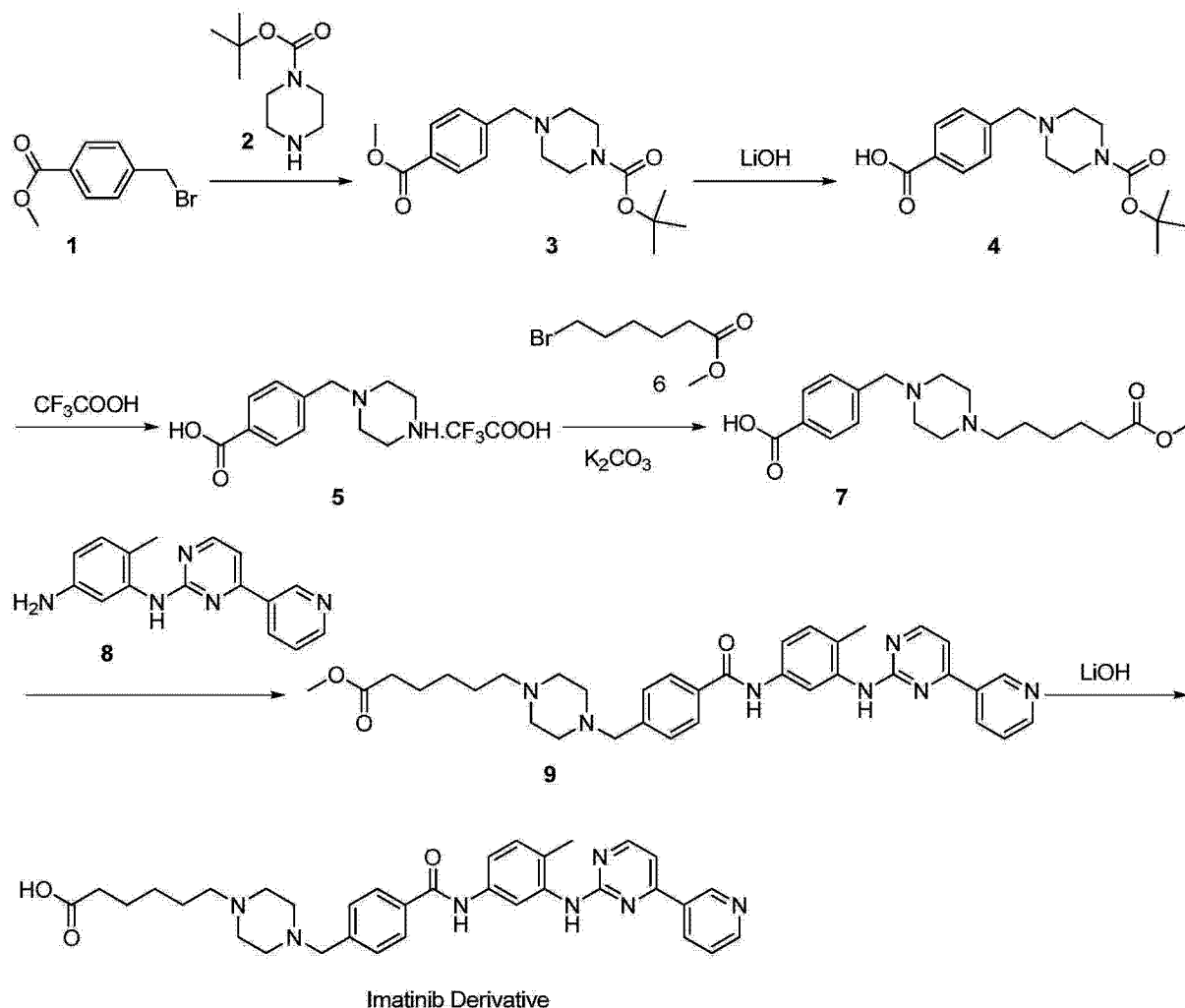
[0019] 一种伊马替尼衍生物,其结构式如式(II)所示:



[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 $n = 4$ 时,该伊马替尼衍生物的合成步骤如下:

[0023]



[0024] 或者当 n 为 4 以外的其余整数时,伊马替尼衍生物的合成步骤与上述合成步骤的区别仅在于:由化合物 5 合成化合物 7 的步骤中,采用的原料 6- 溴己酸甲酯替换为其类似物。

[0025] 2. 伊马替尼免疫原的制备步骤:

[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 本发明合成的伊马替尼衍生物、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 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 下搅拌过夜,得到抗原;将合成好的抗原经过透析进行纯化,得到伊马替尼免疫原。

[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) 所示的伊马替尼免疫原。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伊马替尼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,伊马替尼衍生物制备的伊马替尼免疫原无显著差异,均具备强免疫原性,都能制备高效

价的特异性抗体。

[0031] 一种抗伊马替尼特异性抗体,由上述的伊马替尼免疫原免疫动物后生产得到。

[0032] 所述的抗伊马替尼特异性抗体由上述制得的伊马替尼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 BSA-伊马替尼免疫原稀释至 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 的抗伊马替尼特异性抗体。

[0036] 本发明的抗伊马替尼特异性抗体为完整的抗体分子,也包括保留与伊马替尼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伊马替尼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] 本发明提供一种伊马替尼检测试剂,含有上述抗伊马替尼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,由伊马替尼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] 伊马替尼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伊马替尼特异性抗体混合在一起。因此,伊马替尼均相酶免疫检测试剂包括两类试剂:

[0042] (1) 试剂 A 由抗伊马替尼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) 将制备的抗伊马替尼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) 伊马替尼衍生物的激活:

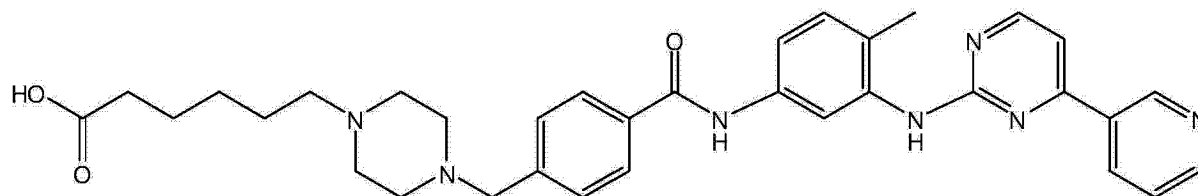
- [0051] a. 在无水状态下称取 10mg 伊马替尼衍生物, 溶解于 600 μ L DMF 中;
- [0052] b. 使上述溶液温度降到 $-2 \sim -8^{\circ}\text{C}$;
- [0053] c. 加入 3 μ L 三丁胺;
- [0054] d. 加入 1.5 μ L 氯甲酸异丁酯;
- [0055] e. $-2 \sim -8^{\circ}\text{C}$ 搅拌 30 分钟;
- [0056] 3) G6PDH 与伊马替尼衍生物的连接:
- [0057] a. 将上述激活的伊马替尼衍生物溶液逐滴加入到上述溶解的 G6PDH 溶液中;
- [0058] b. $2-8^{\circ}\text{C}$ 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 $2-8^{\circ}\text{C}$ 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 $\sim$ 1:10000。
- [0062] 所述的抗伊马替尼特异性抗体与均相酶底物的体积比优选为 1:400;
- [0063] 所述的伊马替尼酶标偶联物与 Tris 缓冲液的体积比优选为 1:1500。
- [0064] 本发明的伊马替尼免疫原特异性强、免疫原性高, 制备出的抗伊马替尼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; 含有上述抗伊马替尼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伊马替尼含量, 并且可以在全自动生化分析仪上同时测定多个样品, 实现伊马替尼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 是伊马替尼的 ELISA 检测反应曲线;
- [0066] 图 2 是伊马替尼的均相酶免疫反应曲线。

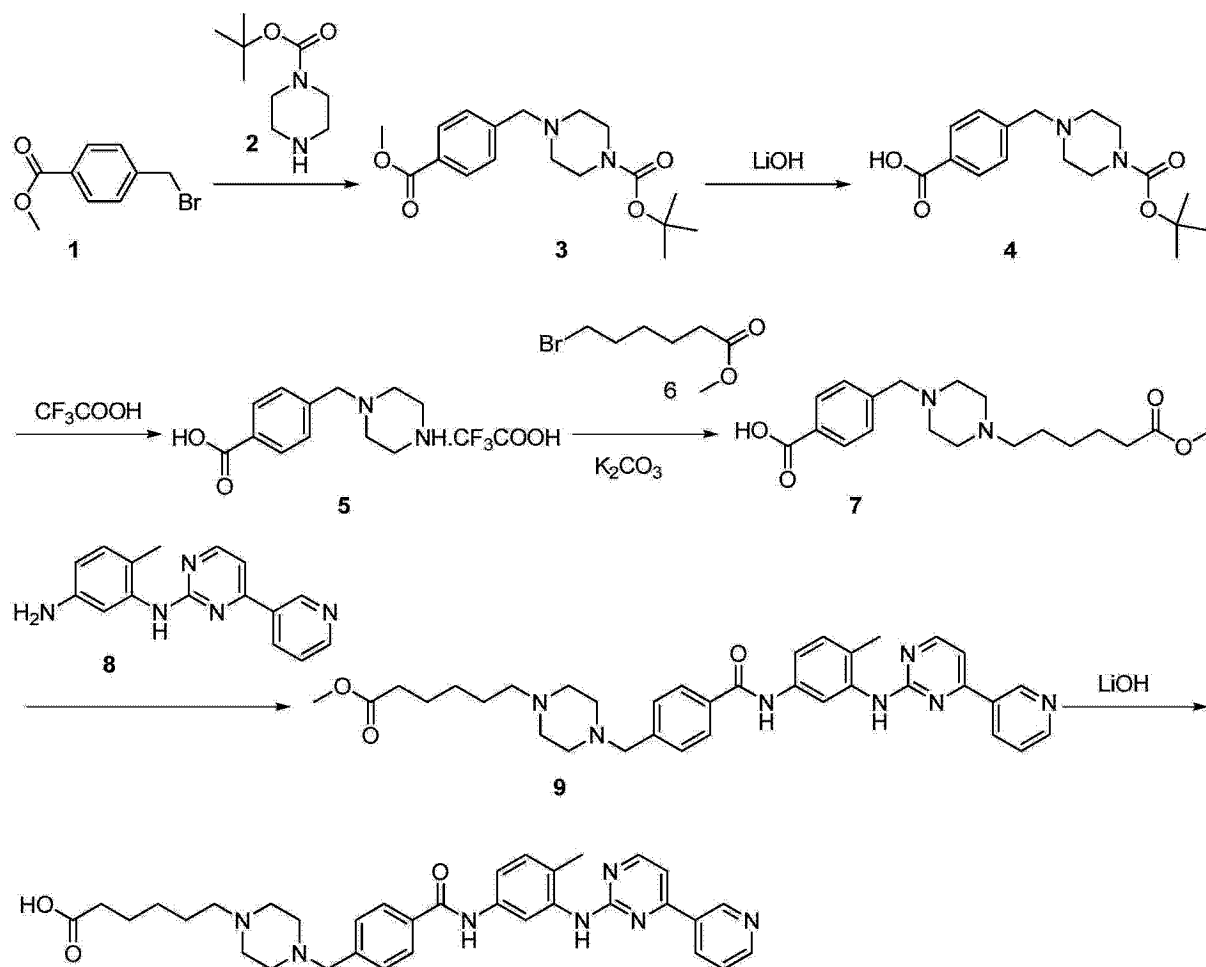
具体实施方式

- [0067] 实施例一伊马替尼衍生物的合成及其定量检测
- [0068] 伊马替尼衍生物的化学结构如式 (IV) 所示:
- [0069]



式 (IV) 其中 $n=4$

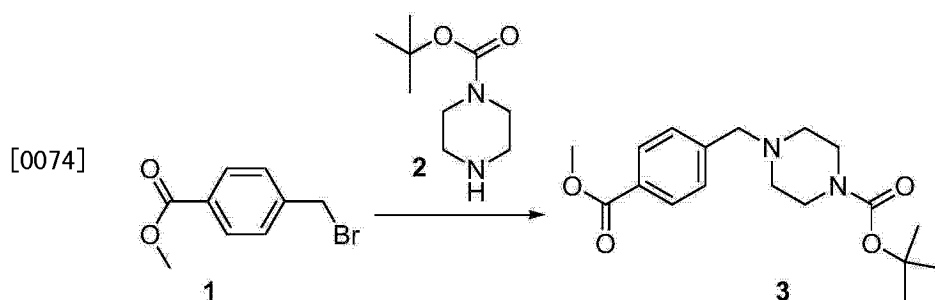
- [0070] 上述伊马替尼衍生物的合成路线及制备步骤如下:
- [0071]



Imatinib Derivative

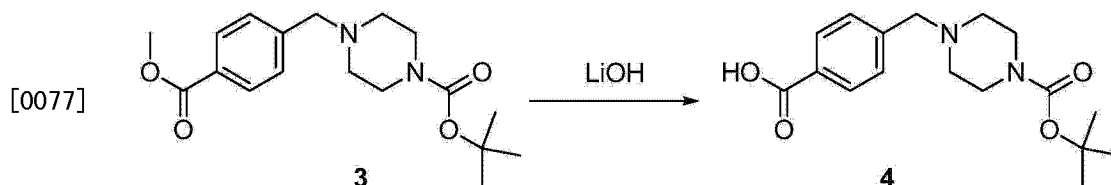
[0072] 具体的合成步骤如下：

[0073] 化合物 3 的合成



[0075] 称取 20g (87.31mmol) 化合物 1, 溶解于 CH_3CN 中, 然后称取 18g (130.96mmol) K_2CO_3 和 19.5g (104.77mmol) 化合物 2 (1-叔丁氧羰基哌嗪), 依次加入上述溶液中制成反应混合溶液。所有成分添加完成后, 将上述反应混合溶液在 60°C 下搅拌过夜。通过减压方法使溶剂蒸发, 然后将得到的残留物溶解于 300mLEA 中, 再用 60mL 卤水进行洗涤, 最后将有机相通过 Na_2SO_4 进行干燥, 浓缩后得到 28g 黄色油状的化合物 3, 产率 96%。

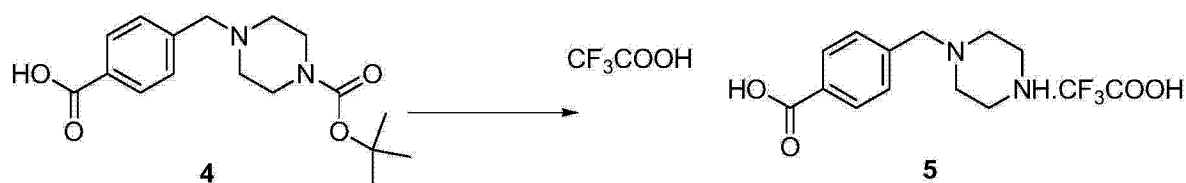
[0076] 化合物 4 的合成



[0078] 称取 28g (83.73mmol) 化合物 3, 溶解于 200mL 甲醇中, 然后依次加入 100mL H_2O 和 10.53g (251.18mmol) LiOH, 制成反应混合溶液。所有成分添加完成后, 将上述反应混合溶液在室温下搅拌过夜。通过减压方法使溶剂蒸发, 然后将得到的残留物溶解于 200mL 纯化水中, 再用 $3 \times 40mL$ EA 进行萃取。将萃取后分离出的水相用 2N 的盐酸进行酸化并过滤, 收集滤饼并进行干燥, 最终得到 25g 白色固体状的化合物 4, 产率 93%。

[0079] 化合物 5 的合成

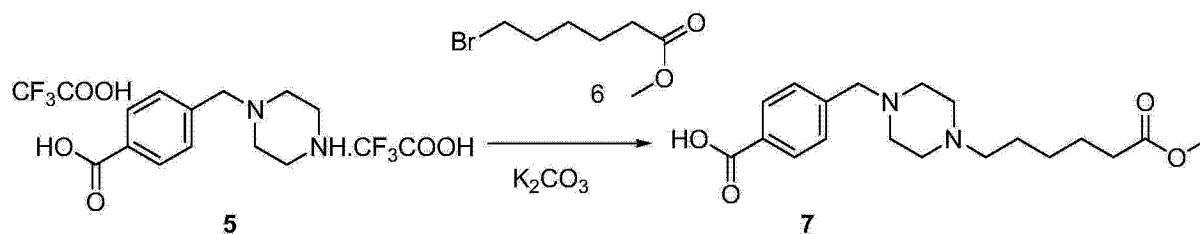
[0080]



[0081] 称取 10g (31.25mmol) 化合物 4, 溶解于 50mL DCM 中, 在 $0^\circ C$ 下加入 50mL CF_3COOH , 制成反应混合溶液, 然后将上述反应混合溶液在室温下搅拌过夜。将溶剂蒸发干, 然后将得到的残留物在 MTBE 中进行研磨, 过滤并收集滤饼, 得到 10g 白色固体状的化合物 5, 产率 71%。

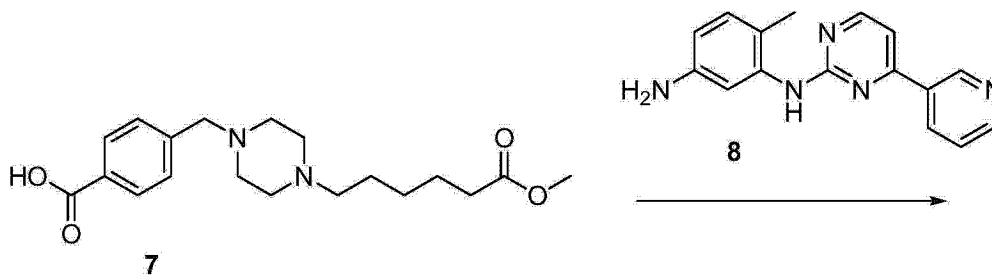
[0082] 化合物 7 的合成

[0083]

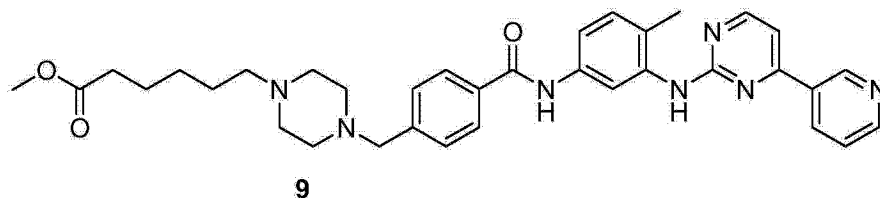


[0084] 称取 5g (11.15mmol) 化合物 5, 溶解于 50mL CH_3CN 中, 然后称取 2.8g (13.38mmol) 化合物 6 (6-溴己酸甲酯) 和 6.9g (50.18mmol) K_2CO_3 , 依次加入上述溶液中制成反应混合溶液。所有成分添加完成后, 将上述反应混合溶液在 $80^\circ C$ 下搅拌过夜。反应完成后将溶剂蒸发干, 然后将得到的残留物溶解于 100mL EA 中, 再将有机相用纯化水和卤水进行冲洗, 冲洗后通过 Na_2SO_4 进行干燥并进行浓缩。将浓缩后得到的残留物通过硅胶柱 ($DCM:MeOH = 20:1$) 进行纯化, 最终得到 1.3g 白色固体状的化合物 7, 产率 33%。

[0085] 化合物 9 的合成

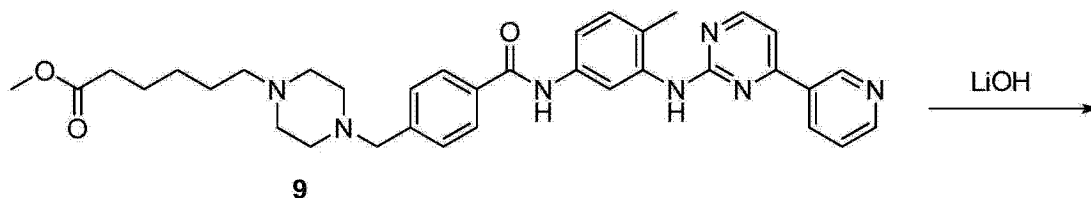


[0086]

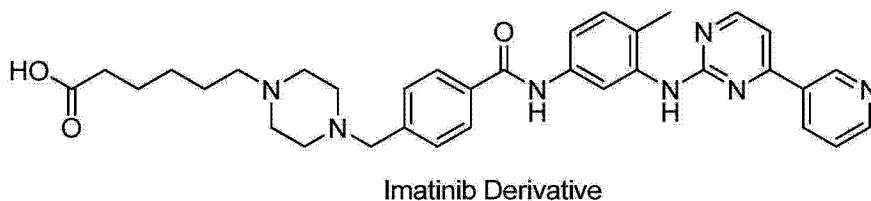


[0087] 称取 1.3g (3.73mmol) 化合物 7, 溶解于 10mL DMSO 中, 然后称取 1.7g (4.48mmol) HATU、1.1g (11.21mmol) TEA 及 1g (3.73mmol) 化合物 8 (N-(5-氨基-2-甲基苯基)-4-(3-吡啶基)-2-氨基嘧啶), 依次加入上述溶液中制成反应混合溶液。所有成分添加完成后, 将上述反应混合溶液在室温下搅拌过夜。将搅拌后的反应混合溶液注入 50mL 纯化水中, 然后用 3×30mL EA 进行萃取。萃取后将结合的有机相用卤水洗涤, 然后通过 Na₂SO₄ 进行干燥, 并进行浓缩。将浓缩后得到的残留物通过硅胶柱 (DCM:MeOH = 50:1 ~ 20:1) 进行纯化, 最终得到 1.3g 白色固体状的化合物 9, 产率 59%。

[0088] 伊马替尼衍生物的合成



[0089]



[0090] 称取 1.3g (2.14mmol) 化合物 9, 溶解于 13mL 甲醇中, 然后依次加入 6.5mL H₂O 和 269mg (6.42mmol) LiOH, 制成反应混合溶液。所有成分添加完成后, 将上述反应混合溶液在室温下搅拌过夜。通过减压方法使溶剂蒸发, 然后将得到的残留物溶解于 20mL 纯化水中, 再用 3×10mL EA 进行萃取。将萃取后分离出的水相用 2N 的盐酸进行酸化并过滤, 收集滤饼并进行干燥, 最终得到 1g 黄色固体状的化合物 (Imatinib Derivative), 即伊马替尼衍生物, 产率 97%。

[0091] 对上述黄色固体化合物 (Imatinib Derivative) 进行结构鉴定

[0092] 1、利用 Bruker Avance III plus 400MHz 和 VARIAN MERCURY plus 300M 对上述黄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 (400MHz, DMSO-

d6): δ 1.17-1.31 (m, 2H), 1.33-1.43 (m, 2H), 1.44-1.55 (m, 2H), 2.12-2.49 (m, 15H), 3.52 (s, 2H), 7.20 (d, 1H), 7.39-7.55 (m, 5H), 7.90 (d, 2H), 8.07 (d, 1H), 8.45-8.50 (m, 1H), 8.50 (d, 1H), 8.68 (dd, 1H), 8.97 (s, 1H), 9.27 (d, 1H), 10.15 (brs, 1H)。表征为式 (IV) 所示的伊马替尼衍生物。

[0093] 2、采用安捷伦公司的串联四级杆质谱仪 LC/MSD1200 对得到的衍生物进行分析鉴定, 可以确定该黄色固体化合物为式 (IV) 所示的伊马替尼衍生物。

[0094] 本实施例中, 伊马替尼衍生物的制备过程中, 化合物 7 的合成步骤选用了化合物 6 (6-溴己酸甲酯) 为合成原料, 故所得的最终产物伊马替尼衍生物的链接基团 R 为 $-(CH_2)_4-COO-$ 。当 n 取其他数值时, 选用其他 6-溴己酸甲酯的类似物 (比如 5-溴戊酸甲酯、4-溴丁酸甲酯、7-溴庚酸甲酯等等) 进行实验, 合成方法完全一致。

[0095] 实施例二伊马替尼免疫原的合成

[0096] 伊马替尼免疫原由牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA) 与式 (II) 所示的伊马替尼衍生物的 $-(CH_2)_n-COO-$ 基团连接而成, 在本实施例中, 以 $n = 4$ 为例详细说明该免疫原的合成方法, 具体步骤如下:

[0097] 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;

[0098] 2. 将如下化学品加入到小烧杯中搅拌溶解: 200mg 合成的伊马替尼衍生物、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;

[0099] 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, 得到伊马替尼免疫原。

[0100] 实施例三: 抗伊马替尼特异性抗体的制备

[0101] 将实施例二制备得到的伊马替尼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:

[0102] 1. 用 PBS 将上述合成的伊马替尼免疫原稀释至 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。

[0103] 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兔注射一次, 之后每隔四周注射一次, 共计注射 4 次。

[0104] 3. 对步骤 2 的实验动物兔取血, 分离纯化得到效价为 1:30000-1:50000 的抗伊马替尼特异性抗体。

[0105] 实施例四: 伊马替尼 ELISA 检验

[0106] 1. 伊马替尼 ELISA 检测标准曲线的建立

[0107] (1) 标准品的制备

[0108] 将伊马替尼粉末 (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 400.00ng/mL、200.00ng/mL、100.00ng/mL、50.00ng/mL、25.00ng/mL 和 0.00ng/mL 的标准溶液。其中, ELISA 缓冲液含有 50.0mM Tris, 145mM NaCl 和 0.25% 的 BSA。

[0109] (2) 利用伊马替尼的 ELISA 检验方法制备标准曲线

[0110] 用 PBS 将实施例三中所制备的抗伊马替尼抗体稀释成 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;用 PBS 将上述包被有抗伊马替尼抗体的 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-伊马替尼偶联物;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。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。

[0111] 2. 待测样品中伊马替尼含量的检测

[0112] (1) 制作待测样品

[0113] 制备方法:将伊马替尼粉末(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 0.00,10.00,100.00,350.00ng/mL,形成空白、低、中、高浓度的血浆样本。该空白血浆为不含伊马替尼的健康人血浆。

[0114] (2) 测试方法

[0115] 利用上述伊马替尼的 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。

[0116] (3) 测试结果

[0117] 对照图 1 中所示的伊马替尼 ELISA 检验的标准曲线,计算每个样本中伊马替尼含量,并对每个样本进行 3 个复孔测定,根据上述样本中伊马替尼的实际含量计算回收率,结果如表 1 所示。

[0118] 表 1 伊马替尼的 ELISA 检测回收实验

[0119]	血清样品	空白	低	中	高
[0120]	样品浓度 (ng/mL)	0.00	10.00	100.00	350.00
	测试 1	0.02	10.71	103.21	355.19
	测试 2	0.01	9.90	105.05	346.51
	测试 3	0.03	10.18	98.97	359.07
	平均值(ng/mL)	0.01	10.26	102.41	353.59
	回收率(%)	-	102.6	102.4	101.0

[0121] 由表 1 中结果可知:采用本发明伊马替尼 ELISA 检测试剂测定不同浓度样品中的伊马替尼回收率都较高,均 > 90%,说明本发明所述的抗伊马替尼特异性抗体可以用于样本中伊马替尼的检测,并且结果准确度高。

[0122] 实施例五:葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物的制备

[0123] 1. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)溶液的制备:

[0124] (1) 准确称取 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,本步骤在烧杯 C 中进行。

[0125] (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)。

[0126] (3) 在上述烧杯 C 中再逐滴加入 2mL 二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)。

[0127] 2. 伊马替尼衍生物的激活:

- [0128] (1) 在无水状态下称取 10mg 上述伊马替尼衍生物,溶解于 600 μ L DMF 中。
- [0129] (2) 使上述溶液温度降到 $-2 \sim -8^{\circ}\text{C}$ 。
- [0130] (3) 加入 3 μ L 三丁胺 (tributylamine)。
- [0131] (4) 加入 1.5 μ L 氯甲酸异丁酯 (isobutylchloroformate)。
- [0132] (5) $-2 \sim -8^{\circ}\text{C}$ 搅拌 30 分钟。
- [0133] 3. G6PDH 与伊马替尼衍生物的连接:
- [0134] (1) 将上述激活的伊马替尼衍生物溶液逐滴加入到上述溶解的 G6PDH 溶液中。
- [0135] (2) $2-8^{\circ}\text{C}$ 搅拌过夜。
- [0136] 4. 纯化产物:
- [0137] 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 $2-8^{\circ}\text{C}$ 下储存。
- [0138] 实施例六:伊马替尼均相酶免疫检测试剂的制备
- [0139] 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;将上述制备的抗伊马替尼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。
- [0140] 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。
- [0141] 实施例七:伊马替尼均相酶免疫检验及结果
- [0142] 1. 获得标准曲线:
- [0143] (1) 设置迈瑞 BS-480 全自动生化分析仪反应参数 (见表 2)。
- [0144] (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 OD_{340} 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。
- [0145] 表 2 迈瑞 BS-480 全自动生化分析仪反应参数

[0146]

迈瑞 BS-480 参数	
项目名称	伊马替尼
试剂 1	200 μ l
试剂 2	50 μ l
样本量	12 μ l
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

[0147]	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

[0148] 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 :将伊马替尼标准品溶解于人血清中,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。

[0149] 表 3 样品测定及精密度和回收率评估

[0150]

血液样品	低	中	高
样品浓度 (ng/ml)	50.00	300.00	800.00
1	50.83	304.46	815.26
2	51.01	293.33	809.41
3	50.00	305.51	789.98
4	52.09	301.80	805.33
5	51.08	304.69	812.95
6	50.25	310.47	793.11
7	48.04	295.52	808.50
8	49.19	301.60	800.33
9	52.50	300.52	795.90
10	49.93	307.75	814.92
平均值 (ng/ml)	50.49	302.57	804.57
标准差 (SD)	1.3182	5.2363	9.2401
精密度 (CV%)	2.61	1.73	1.15
回收率%	101.0	100.9	100.6

[0151] 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%。

[0152] 实施例八 :药物干扰试验

[0153] 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：

- [0154] 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 ;
- [0155] 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。
- [0156] 常见的 62 种药物名称以及测定结果具体参见表 4。
- [0157] 表 4 常见干扰药物测定结果

[0158]

ID#	化合物名称	等价于伊马替尼的浓度 (μg/ml)	ID#	化合物名称	等价于伊马替尼的浓度 (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
4	氨基青霉素	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	二氨基二苯砒	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

ID#	化合物名称	等价于伊马替尼的浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	ID#	化合物名称	等价于伊马替尼的浓度 ($\mu\text{g/ml}$)
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
[0159] 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
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

[0160] 测定结果显示：上述 62 种常见药物等价于伊马替尼的浓度均小于 $0.01 \mu\text{g/ml}$ 。由此可见，本发明的抗体是抗伊马替尼的特异性抗体，与其它药物无交叉反应。

[0161] 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。

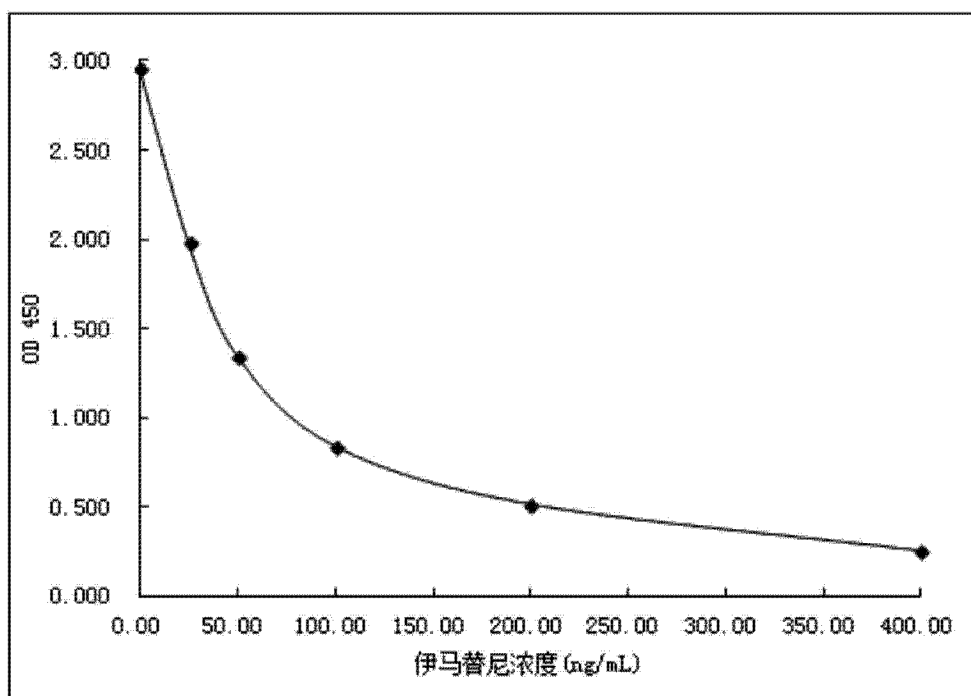


图 1

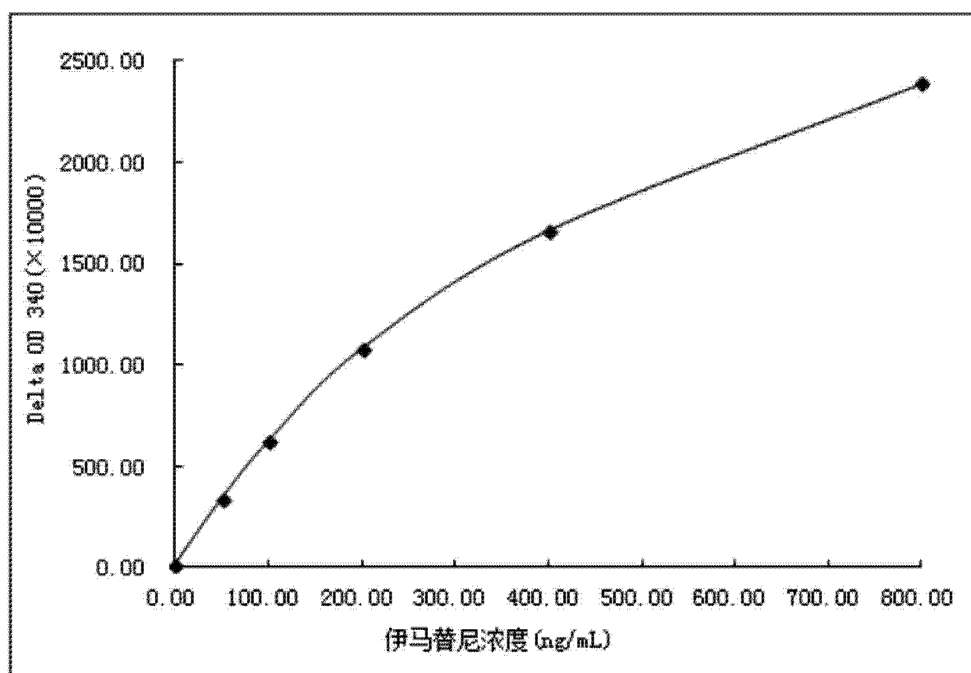


图 2

专利名称(译)	伊马替尼免疫原、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	CN104804079A	公开(公告)日	2015-07-29
申请号	CN201510235969.1	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 李振荣 曹永彤 王海滨		
发明人	虞留明 李振荣 曹永彤 王海滨		
IPC分类号	C07K14/765 C07K14/795 C07K14/435 C07K16/44 C07D401/04 G01N33/53 G01N33/535		
CPC分类号	C07D401/04 C07K14/435 C07K14/765 C07K14/795 C07K16/44 C07K19/00 G01N33/535 G01N33/94 G01N2500/04		
代理人(译)	董建林		
其他公开文献	CN104804079B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种伊马替尼免疫原、衍生物及合成方法、特异性抗体和检测试剂及制备方法。本发明制备的伊马替尼免疫原，免疫原性高，可以诱导得到高效价的抗伊马替尼特异性抗体，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伊马替尼检测试剂，可以精确快速地确定样品中的伊马替尼含量。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，还能有效降低伊马替尼检测成本，有利于临床大规模推广使用。

