



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102180965 A

(43) 申请公布日 2011.09.14

(21) 申请号 201110049828.2

(22) 申请日 2011.03.02

(71) 申请人 广州金域医学检验中心有限公司  
地址 510330 广东省广州市海珠区新港东路  
2429 号三楼

(72) 发明人 虞留明 梁耀铭 李洪波

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有  
限公司 44205

代理人 李柏林

(51) Int. Cl.

*C07K 14/765* (2006.01)

*C07K 14/795* (2006.01)

*C07K 14/435* (2006.01)

*C07K 16/44* (2006.01)

*G01N 33/53* (2006.01)

*G01N 33/543* (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 2 页

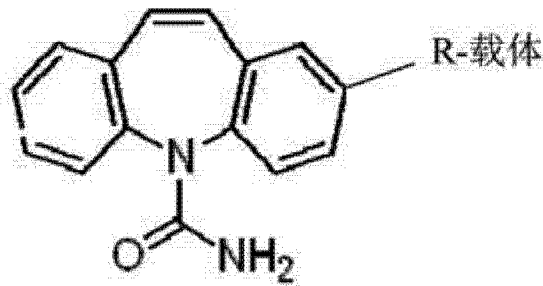
(54) 发明名称

卡马西平免疫原、抗卡马西平特异性抗体、检测试剂及检测试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了卡马西平免疫原,以及由此得到的抗卡马西平特异性抗体、检测试剂及检测试剂盒。

1. 卡马西平免疫原,其结构式如式(I)所示:



式(I)

式中, R 为连接基团,载体具有免疫原性。

2. 根据权利要求 1 所述的卡马西平免疫原,其特征在于:载体为具有免疫原性的蛋白质。

3. 根据权利要求 1 所述的卡马西平免疫原,其特征在于:R 为  $-O-(CH_2)_n-COO-$ , n 是 1 至 20 之间的整数。

4. 根据权利要求 1 所述的卡马西平免疫原,其特征在于:R 为  $-O-(CH_2)_4-COO-$ 。

5. 一种抗卡马西平特异性抗体,由权利要求 1~4 任意一项所述的卡马西平免疫原免疫动物后生产得到。

6. 一种卡马西平检测试剂,含有权利要求 5 所述的抗卡马西平特异性抗体、卡马西平酶标偶联物和酶标底物。

7. 卡马西平检测试剂盒,含有权利要求 5 所述的抗卡马西平特异性抗体以及检测抗卡马西平特异性抗体和卡马西平复合物的指示试剂。

8. 根据权利要求 7 所述的卡马西平检测试剂盒,其特征在于:指示试剂选自酶试剂、放射性同位素试剂、荧光试剂、发光试剂和化学发光试剂。

9. 根据权利要求 8 所述的卡马西平检测试剂盒,其特征在于:指示试剂由卡马西平酶标偶联物和酶标底物所组成。

10. 根据权利要求 7 所述的卡马西平检测试剂盒,其特征在于:抗卡马西平特异性抗体结合在稳定的表面上,其指示试剂由卡马西平酶标偶联物和酶的底物所组成。

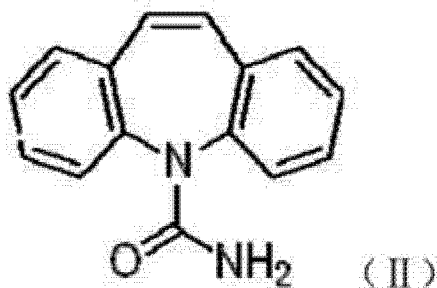
## 卡马西平免疫原、抗卡马西平特异性抗体、检测试剂及检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及卡马西平免疫原、抗卡马西平特异性抗体、检测试剂及检测试剂盒。

### 背景技术

[0002] 卡马西平(5*H*-dibenzo[*b, f*]azepine-5-carboxamide, 5*H*-二苯并[*b, f*]氮杂卓-5-甲酰胺),其结构式如式(II)所示。



[0003] 卡马西平是一类抗癫痫、稳定情绪类药物,主要用于癫痫症、躁郁症以及三叉神经痛的治疗。卡马西平具有很多副作用,包括:有可能危及生命的过敏反应;对三叉神经有毒可能导致皮肤及内脏器官严重损害。因此在治疗期间对病人的血液药物水平进行监测非常重要。

[0004] 利用抗卡马西平特异性抗体建立的免疫检验方法已经运用于病人血液中卡马西平的跟踪和监测。现有的抗卡马西平特异性抗体都是利用与卡马西平的氨基偶联的免疫原而获得的(即卡马西平通过其氨基基团与载体蛋白进行偶联)。但是通过这种衍生方法制备的抗体敏感度较低,难以满足临床的需要。

### 发明内容

[0005] 本发明的一个目的在于提供一种卡马西平免疫原。

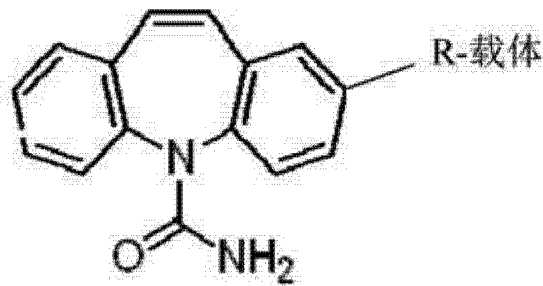
[0006] 本发明的另一个目的在于提供使用本发明卡马西平免疫原制备得到的抗卡马西平特异性抗体。

[0007] 本发明的再一个目的在于提供一种含有本发明抗卡马西平特异性抗体的检测试剂。

[0008] 本发明的又一个目的在于提供一种卡马西平检测试剂盒。

[0009] 本发明所采取的技术方案是:

卡马西平免疫原,其结构式如式(I)所示:



式 (I)

式中, R 为连接基团, 载体具有免疫原性。

[0010] 优选的, 载体为具有免疫原性的蛋白质。

[0011] R 优选为  $-O-(CH_2)_n-COO-$ , n 是 1 至 20 之间的整数, 特别的, R 为  $-O-(CH_2)_4-COO-$ 。

[0012] 一种抗卡马西平特异性抗体, 由上述卡马西平免疫原免疫动物后生产得到。

[0013] 一种卡马西平检测试剂, 含有上述抗卡马西平特异性抗体、卡马西平酶标偶联物和酶标底物。

[0014] 卡马西平检测试剂盒, 含有上述抗卡马西平特异性抗体以及检测抗卡马西平特异性抗体和卡马西平复合物的指示试剂。

[0015] 指示试剂选自酶试剂、放射性同位素试剂、荧光试剂、发光试剂和化学发光试剂。优选的, 指示试剂由卡马西平酶标偶联物和酶标底物所组成。

[0016] 优选的, 抗卡马西平特异性抗体结合在稳定的表面上, 其指示试剂由卡马西平酶标偶联物和酶的底物所组成。

[0017] 本发明的卡马西平免疫原, 免疫原性高, 可以诱导得到高效价的抗卡马西平特异性抗体。

[0018] 本发明的抗卡马西平特异性抗体, 特异性高, 与卡马西平的结合力强, 敏感度远高于现有的抗卡马西平抗体。

[0019] 本发明的卡马西平检测试剂和检测试剂盒, 可以方便、准确地确定样品中的卡马西平含量。

[0020] 本发明的卡马西平检测试剂盒可以在全自动生化分析仪上实现检验的快速化、批量化和自动化。

#### 附图说明

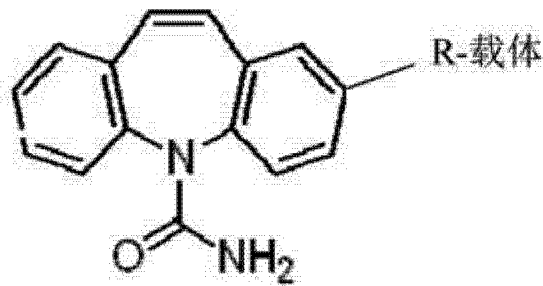
[0021] 图 1 是卡马西平 ELISA 检测反应曲线;

图 2 是卡马西平均相酶免疫反应曲线。

#### 具体实施方式

[0022] 本发明所采取的技术方案是:

卡马西平免疫原, 其结构式如式 (I) 所示:



式 (I)

式中,R为连接基团,载体具有免疫原性。优选的,载体为具有免疫原性的蛋白质。虽然其他足够大的具备免疫原性的物质也可以作为载体,但通常情况下选用蛋白质作为载体。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。载体的选择是本领域技术人员的基本常识。

[0023] R 优选为  $-O-(CH_2)_n-COO-$ , n 是 1 至 20 之间的整数,特别的, R 为  $-O-(CH_2)_4-COO-$ 。

[0024] 一种抗卡马西平特异性抗体,由上述卡马西平免疫原免疫动物后生产得到。

[0025] 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。

[0026] 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,宿主动物包括:兔,山羊,小鼠,绵羊,豚鼠或马。持续免疫一直进行,直至抗体效价达到最高。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。

[0027] 一种卡马西平检测试剂,含有上述抗卡马西平特异性抗体、卡马西平酶标偶联物和酶标底物。

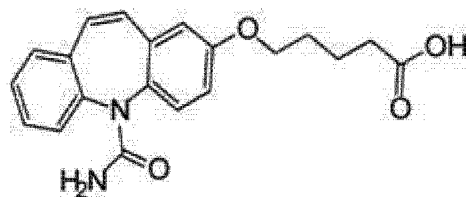
[0028] 卡马西平检测试剂盒,含有上述抗卡马西平特异性抗体以及检测抗卡马西平特异性抗体和卡马西平复合物的指示试剂。

[0029] 指示试剂选自酶试剂、放射性同位素试剂、荧光试剂、发光试剂和化学发光试剂。优选的,指示试剂由卡马西平酶标偶联物和酶标底物所组成。

[0030] 优选的,抗卡马西平特异性抗体结合在稳定的表面上,其指示试剂由卡马西平酶标偶联物和酶的底物所组成。

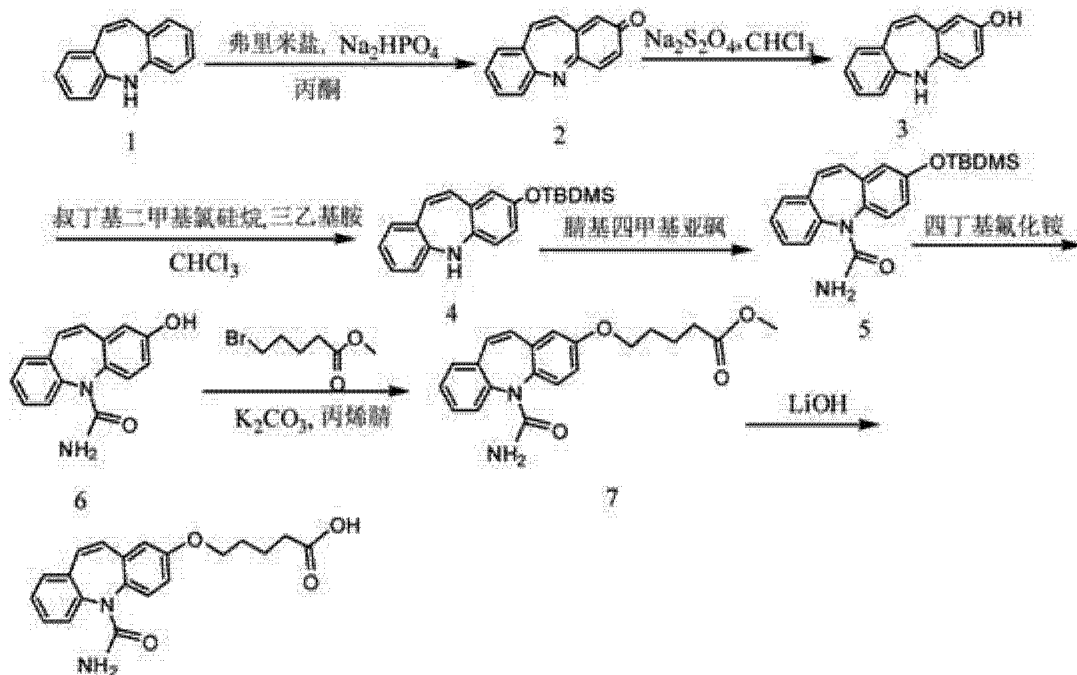
[0031] 下面结合实施例,进一步说明本发明。

[0032] 以下实施例中使用的卡马西平衍生物化学结构如式 (III) 所示。



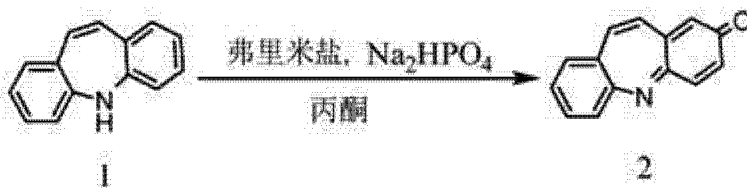
式 (III)

[0033] 该卡马西平衍生物的合成路线如下：



具体的合成步骤如下：

化合物 2 的合成：



1) 准确称取 2.5 g 的亚硝基二磺酸钾 ( $(\text{KS}_2\text{O}_5)_2\text{NO}$ , 弗里米盐 (Fremy's salt), 9.32 mmol) 和 1.8 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (12.7 mmol), 放入烧杯中, 加入 95ml 双蒸水溶解, 调节 pH 至 7.22 ; 称取 0.55g 化合物 1 (12.76 mmol) 至 60ml 丙酮溶液中 ;

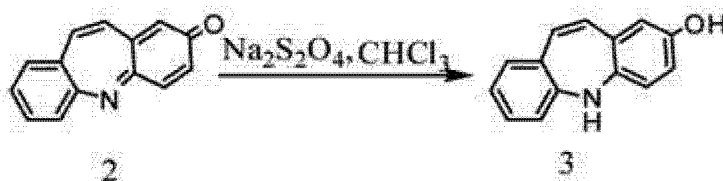
2) 将上述两种溶液混合, 剧烈搅拌, 得到紫色溶液 ;

3) 将上述紫色溶液加入到丙酮溶液中, 持续搅拌 10 分钟, 过滤, 并置于冰箱中过夜 ;

4) 将过夜的溶液经氙气旋转蒸发仪浓缩, 用 500ml 乙醚进行萃取, 萃取完后, 将有机相溶剂蒸发 ;

5) 将蒸发残留物用键合硅胶柱进行快速柱层析纯化, 洗脱剂为 4 : 1 比例混合的己烷 (Hexane) 和氯化四乙铵 (Tetraethoxypropane, TEAC) 溶液, 最后经乙醚 (Diethyl ether,  $\text{Et}_2\text{O}$ ) 重结晶得到的深红色晶体粉末状物质为亚胺基苯醌化合物 2 (0.12g, 21%)。

[0034] 化合物 3 的合成：



1) 准确称取 1.2 g 化合物 2 (5.8 mmol) 溶解于 50ml  $\text{CHCl}_3$  溶液, 将其置于分液漏斗中;

2) 称取 2.5 连二亚硫酸钠( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) (14.3 mmol) 溶于 20 ml 水中制成溶液;

3) 在上述分液漏斗中加入过量的  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  溶液, 轻轻振荡至有机溶液层的颜色由红色变为黄色, 并静置分层;

4) 将水相用  $\text{CHCl}_3$  进行萃取分离, 得到的有机相再用  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  进行吸水干燥, 通过旋转蒸馏的方法将溶剂蒸发。

[0035] 5) 经  $\text{CHCl}_3$  萃取后的残留物进行重结晶得到的淡黄绿色晶体为化合物 3 (1.1g, 92%)。

[0036] 化合物 4 的合成:



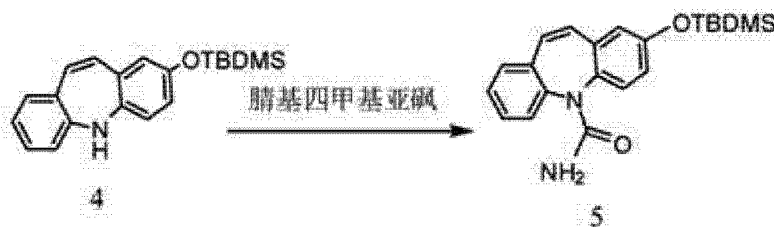
1) 准确称取 1.1g 的化合物 3 至 10 ml  $\text{CHCl}_3$  溶液中, 再加入 1ml 的三乙胺 (Triethylamine, TEA);

2) 向该溶液中加入 2 g 叔丁基二甲基氯硅烷 (tert-butylchlorodimethylsilane, TBDMSCl) (15.2 mmol), 于室温下搅拌 3 天, 再将溶剂蒸发;

3) 加入水溶解, 用氯仿( $\text{CHCl}_3$ ) 进行萃取分离, 得到的有机相用  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  吸水干燥, 通过旋转蒸馏的方法将溶剂蒸发。

[0037] 经过上述过程可以得到 1.6g 的粗提化合物 4。

[0038] 化合物 5 的合成:

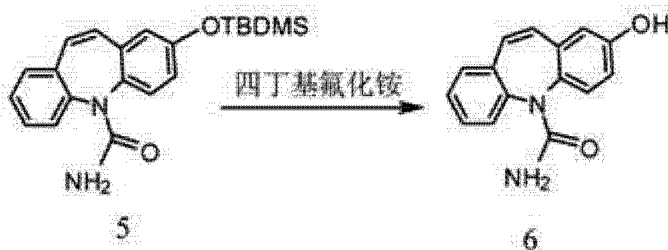


1) 称取 1.6 g 的化合物 4 至 10 ml 的  $\text{CHCl}_3$  溶液中, 再加入 2 ml  $\text{TMSOCN}$  (4.95 mmol), 于室温下搅拌 2 天, 将溶剂蒸发;

2) 加入水溶解, 用  $\text{CHCl}_3$  萃取, 得到的有机相先用盐水进行洗涤, 再加入  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  进行干燥, 最后通过旋转蒸馏的方法将溶剂蒸发。

[0039] 经过上述过程最终得到 1.6 g 黄色的粗提化合物 5。

[0040] 化合物 6 的合成:

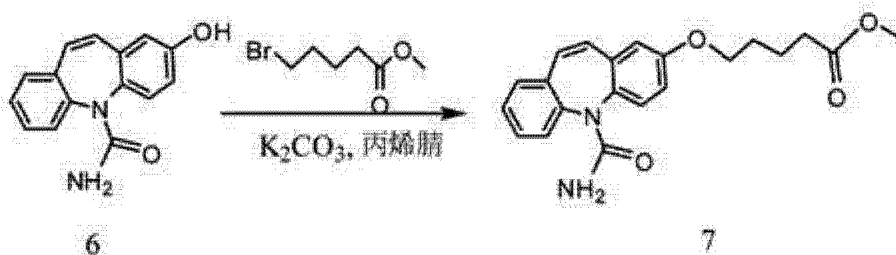


1) 称取 1.6g 化合物 5 (4.37 mmol) 和 2 g 四丁基氟化铵(Tetrabutylammonium fluoride, TBAF) (15.2 mmol) 于烧杯中, 加入 20 ml 四氢呋喃(Tetrahydrofuran, THF) 溶解, 于室温下搅拌 4 小时后, 将溶剂蒸发;

2) 加入蒸馏水溶解, 用丙烯酸乙酯(ethyl acrylate, EA) 萃取分离, 得到的有机相用  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  进行干燥, 通过旋转蒸馏将溶剂蒸发;

3) 粗提物经过色谱柱(EA/PE (丙烯酸乙酯 / 聚乙烯)=1:1) 纯化后, 得到 1.0g 的化合物 6。(从化合物 3 到化合物 6 的产率为 75%)

化合物 7 的合成:



1) 准确称取 1.0 g 的化合物 6 (4.0 mmol) 加入到 30 ml 的丙烯腈(Acrylonitrile, ACN)中, 向该溶液中加入 1.38 g  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (10.0 mmol) 和 1.16g 化合物 A (5- 溴正戊酸甲酯) (6.0 mmol), 室温下搅拌过夜;

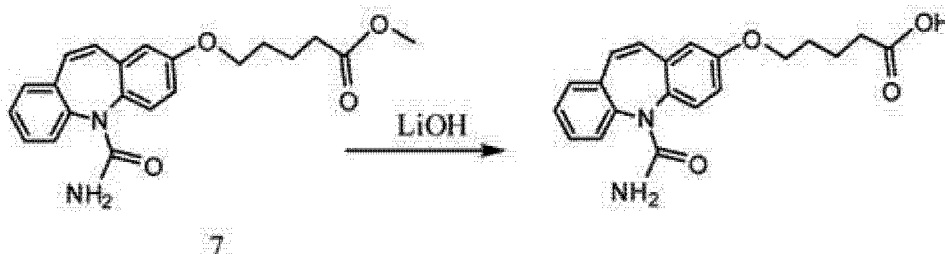
2) 溶液经真空抽滤方法浓缩, 再用乙酸乙酯(Acetoacetate, EtOAc) 萃取分离;

3) 得到的有机相加入  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  进行干燥, 再经抽真空过滤;

4) 粗提化合物用硅胶键合柱进行快速层析纯化, 洗脱剂为 1 :3 比例混合的 EA 和 PA 溶液 EA/PE (丙烯酸乙酯 / 聚乙烯), 最后得到 1.1 g 白色固体化合物 7, 产率为 76%。

[0041] 类似地, 通过改变化合物 A 中  $-\text{CH}_2-$  的数量, 可以得到化合物 7 的类似物。

[0042] 卡马西平衍生物的合成:



1) 称取 1.1 g 化合物 7 (3.0 mmol) 至 20 ml 四氢呋喃(Tetrahydrofuran, THF) 中溶解;

2) 再称取 0.48 g 的含结晶水的氢氧化锂( $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) (11.8mmol) 至 10ml 蒸馏水中

溶解；

3) 将上述两种溶液混合,于 50℃下搅拌 6 小时后,TLC 显示水解作用完成；

4) 将该混合溶液浓缩并酸化至水层 pH 值等于 3,经过滤将固液分离；

5) 将白色固体经甲醇(Methanol, MeOH)重结晶后得到 230mg 卡马西平衍生物,产率为 48%。

[0043] 类似的,可以得到如式(III)所示的类似物,其不同之处仅在于 $-\text{CH}_2-$ 个数的不同。

[0044] 利用 Bruker Avance III plus 400 MHz 对卡马西平衍生物进行核磁共振光谱扫描,内标采用 TMS。结果如下: $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400MHz): 12.04 (s, 1H), 7.37-7.45 (m, 3H), 7.29-7.35 (m, 2H), 5.53 (s, 1H), 3.98 (t, 2H,  $J = 6.4$  Hz), 2.28 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 1.63-1.75 (m, 4H)。表征为式(III)所示的卡马西平衍生物。

[0045] 利用色谱/质谱技术(LCMS)对得到的衍生物进行分析鉴定,仪器为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 (50×4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),柱温为 30℃,流速为 1.5 mL/min,流动相为乙腈-水比例为 5%-60%。

[0046] LCMS 结果显示:纯度 99.2%;保留时间为 2.769 min;分子量 352;分子离子为:353 (M+1)。

[0047] BSA-卡马西平衍生物免疫原的合成

免疫原由 BSA 与卡马西平通过  $-O-(\text{CH}_2)_4-\text{COO}-$  基团连接而成,具体的合成方法如下:

1) 将牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA) (200 mg) 溶解于 50 ml 0.2 M, 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:200 mg 合成的卡马西平衍生物、3.5 ml 二甲基酰胺(dimethylformamide, DMF)、3.5 ml 乙醇、7.0 ml 10mM, pH 5.0 的磷酸钾缓冲液、200 mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺、50 mg N-羟基硫代琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, Sulfo-NHS),将这些化学品在室温下搅拌溶解反应 30 min;

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进行纯化,得到卡马西平免疫原。

[0048] 抗卡马西平特异性抗体的制备

采用常规方法制备抗体,大致步骤如下:

用 PBS 将合成的卡马西平免疫原稀释至 1.0 mg/ml,然后用 1.0 ml 的抗原溶液与弗氏完全佐剂混合,对家兔进行注射;

2~3 周后,再用 1.0 ml 相同的抗原溶液与弗氏不完全佐剂对家兔注射一次,之后每隔四周一次,共两次,获得的抗体效价约为 1:3000。

[0049] 卡马西平 ELISA 检验

采用制得的抗体进行卡马西平的 ELISA 检验。

[0050] 该检验是利用竞争性免疫分析法来测定液体样本中的卡马西平含量。

[0051] 样本中的卡马西平与偶联的卡马西平衍生物(HRP-卡马西平衍生物酶偶联物)竞争结合包被在酶联板中抗体上的有限位点。如果液体样本中几乎没有或没有卡马西平,HRP 酶偶联的卡马西平衍生物就会与酶标板中的抗体结合。相反的,如果液体样本中含有大量或一定数量的卡马西平,那么酶-卡马西平衍生物偶联体就会减少与抗体的结合,从而使

显色信号减弱。因此,检验产生的吸光度与液体样本中的卡马西平含量成反比。其剂量效应曲线如图 1 所示。

#### [0052] 卡马西平均相酶免疫检验

采用制得的抗体进行卡马西平的的 EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique, 酶联扩大免疫测定) 检验。

[0053] 该检验是一种竞争性反应,反应体系中与抗体结合的卡马西平和游离的卡马西平不需要通过固相来分离。该检验的基本原理是,液体样本中游离的卡马西平与偶联在葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, G6PDH)上的卡马西平衍生物对特异性抗体的结合位点进行竞争。液体样本中的卡马西平竞争性的取代与抗体结合的卡马西平酶偶联物,并使其从抗体的结合位点上释放出来,从而使酶恢复活性。因此,液体样本中卡马西平的含量越多,游离的卡马西平衍生物-G6PDH 酶偶联物就越多,从而能得到更强的信号。

[0054] 其均相免疫检验得到的剂量效应曲线如图 2 所示。

#### [0055] 药物干扰试验

选取 30 种常用化合物和药物,调整其浓度为 10.0  $\mu\text{g/ml}$ ,进行干扰试验测定,试验结果如下表所示:

ID#	化合物名称	等价于卡马西平的浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ )
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
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
28	芽子碱	<0.1
29	安定	<0.1
30	可替宁	<0.1

按卡马西平 ELISA 检验的方法对上述化合物进行复孔测定,结果均为阴性。可见,本发明的抗体是抗卡马西平特异性抗体。

[0056] 使用本发明的抗卡马西平特异性抗体替换现有卡马西平检测试剂或试剂盒中的抗卡马西平抗体,即可得到本发明的卡马西平检测试剂或试剂盒。

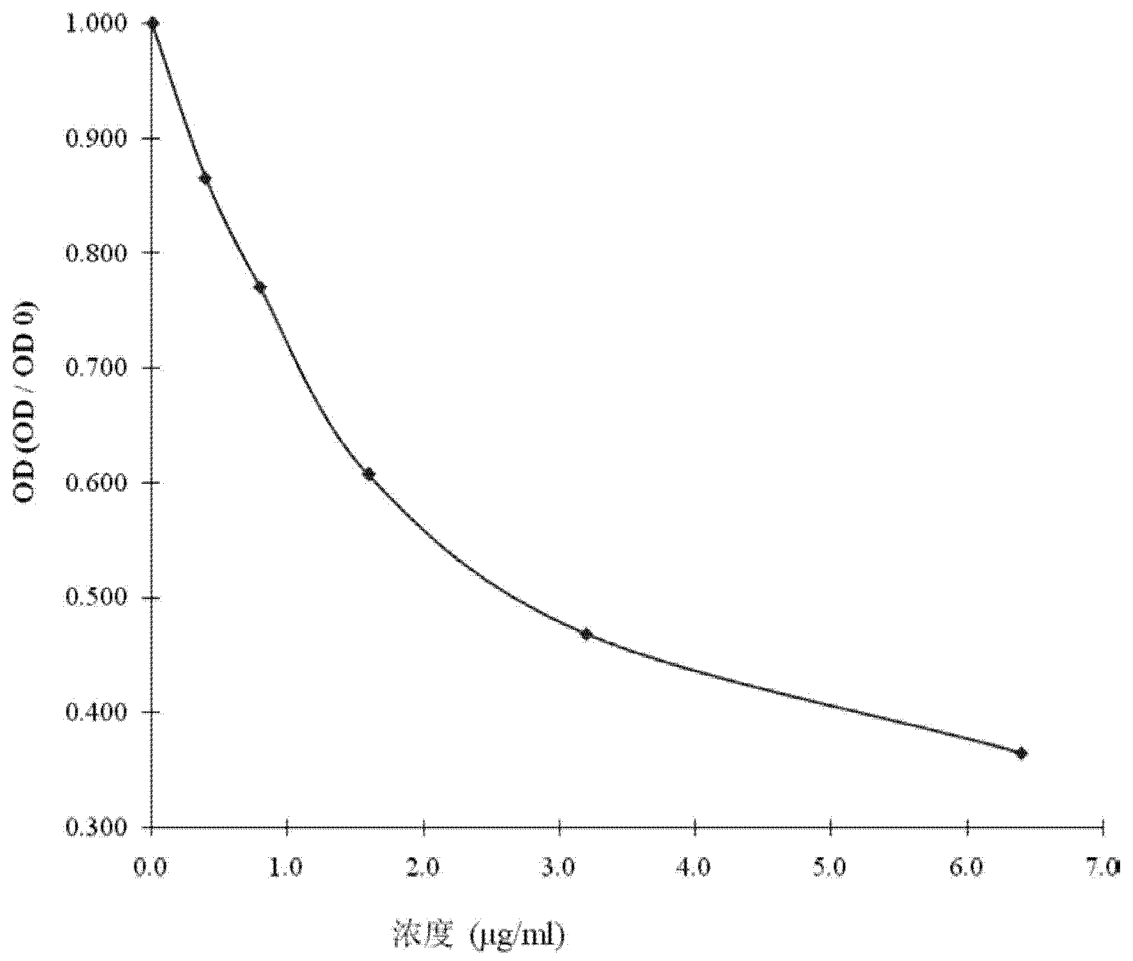


图 1

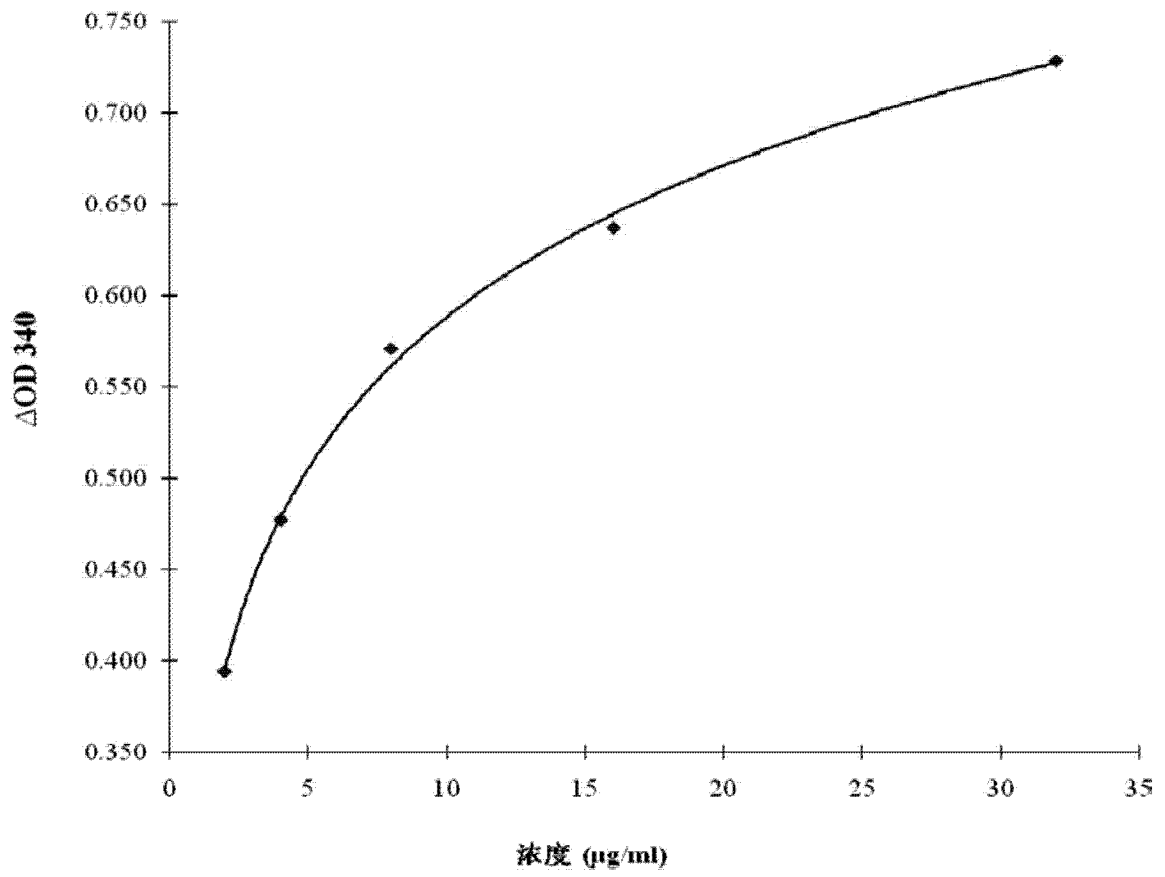


图 2

专利名称(译)	卡马西平免疫原、抗卡马西平特异性抗体、检测试剂及检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN102180965A</a>	公开(公告)日	2011-09-14
申请号	CN201110049828.2	申请日	2011-03-02
[标]申请(专利权)人(译)	广州金域医学检验中心有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州金域医学检验中心有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州金域医学检验中心有限公司		
[标]发明人	虞留明 梁耀铭 李洪波		
发明人	虞留明 梁耀铭 李洪波		
IPC分类号	C07K14/765 C07K14/795 C07K14/435 C07K16/44 G01N33/53 G01N33/543		
代理人(译)	李柏林		
其他公开文献	CN102180965B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了卡马西平免疫原，以及由此得到的抗卡马西平特异性抗体、检测试剂及检测试剂盒。

