



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105712987 A

(43)申请公布日 2016.06.29

(21)申请号 201610119590.9

(22)申请日 2016.03.03

(71)申请人 中国科学院大连化学物理研究所

地址 116023 辽宁省大连市中山路457号

(72)发明人 杨凌 邹立伟 葛广波 王丹丹

王平 于洋 杜逊甫

(74)专利代理机构 沈阳晨创科技专利代理有限

责任公司 21001

代理人 张晨

(51)Int.Cl.

C07D 417/04(2006.01)

C09K 11/06(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书2页 说明书6页 附图4页

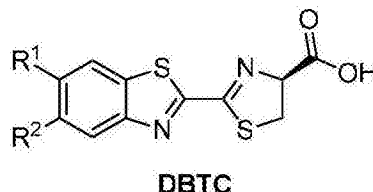
(54)发明名称

人羧酸酯酶1的生物发光探针底物及其制备方法与应用

(57)摘要

本发明提供了一类人羧酸酯酶1的生物发光探针底物及其制备方法与应用,属生物医药技术领域。该探针底物为(S)-4,5-二氢-2-(苯并噻唑-2-基)噻唑-4-甲酸酯衍生物(简称DBT-R),其可用于测定不同生物体系中hCE1的酶活。hCE1酶活性测定的具体流程如下:选择DBT-R化合物酯键水解反应为探针反应,在生理条件下定量检测单位时间内DBT-R水解生成羧酸产物DBTC的量来测定各类生物样品中hCE1的活性。本发明可用于检测各种生物样本(离体组织、细胞、血浆、在体及整体器官、甚至活体动物)中hCE1酶的实际活性。本发明不仅可用于不同来源生物样本中hCE1酶活性的定量评估,此外借助该探针反应还可用于体外快速筛选hCE1的诱导剂和抑制剂。

1. 一类人羧酸酯酶1的生物发光探针底物,其特征在于:该探针底物DBT-R可被人羧酸酯酶1(hCE1)特异性催化发生酯键水解反应并生成相应的羧酸产物DBTC,该探针底物如图1,水解产物的结构如下:



其中, R¹选自-NH₂、-N(CH₃)₂、-N(CH₂CH₃)₂、-N(CH₂CH₂CH₃)₂、-NHCH₃、-NHCH₂CH₃、-NHCH₂CH₂CH₃、-OH、-OCH₃、-OCH₂CH₃、-OCH₂CH₂CH₃;

R²选自H、C₁-C₃烷基、C₁-C₃亚烷基氨基；

R³选自C₁-C₁₀烷基、-(C₁-C₈亚烷基)-氨基、-(C₁-C₈亚烷基)-氰基、-(C₁-C₈亚烷基)-硝基、-(C₁-C₃亚烷基)-O-(C₁-C₃烷基)、环烷基、-(C₁-C₃亚烷基)-环烷基、芳基、-(C₁-C₃亚烷基)-芳基、杂芳基、-(C₁-C₃亚烷基)-杂芳基、杂环基或-(C₁-C₃亚烷基)-杂环基。

2.按照权利要求1所述人羧酸酯酶1的生物发光探针底物,一种定量检测水解产物DBTC的方法,其特征在于:所述DBTC是荧光素酶的底物,可采用生物发光检测器实现产物的快速灵敏检测,所述生物发光检测器为发光分析仪、酶标仪、显微镜或小动物成像仪。

3.按照权利要求1所述人羧酸酯酶1的生物发光探针底物的制备方法,其特征在于按照以下步骤进行:

将1.0eq的2-氰基苯并噻唑和1.1-1.5eq的D-半胱氨酸加入到甲醇/水的混合溶液中,加入1.1-1.5eq的碳酸钾,20-30℃搅拌反应1-3小时,生成(S)-4,5-二氢-2-(苯并噻唑-2-基)噻唑-4-甲酸化合物,简称DBTC:

将所得产物1.0eq的DBCT在0.1-0.5eq 4-N,N-二甲基吡啶和1.1-1.5eq的1-乙基-3(3-二甲基丙胺)碳二亚胺的存在下与醇(HOR³)缩合反应,20-30℃搅拌反应6-24小时生成(S)-4,5-二氢-2-(苯并噻唑-2-基)噻唑-4-甲酸酯衍生物简称,DBT-R。

4.按照权利要求1所述人羧酸酯酶1的生物发光探针底物的应用,其特征在于,该类底物可被hCE1特异性识别并催化发生水解反应,通过定量检测单位时间内水解产物的生成量即可测定不同生物来源中的hCE1活性,其检测步骤如下:

(1)预孵育:将待测样品在缓冲体系中,20~60度下孵育3~5分钟;

(2)起始反应:加入探针底物DBT-R混匀,20~60度下孵育2~120分钟;

(3)检测:加入荧光素酶检测试剂,混匀,37℃孵育20-30min,用酶标仪或化学发光分析仪测定样品。

5.按照权利要求4所述人羧酸酯酶1的生物发光探针底物的应用,其特征在于:所述水解反应体系为PBS缓冲液,探针底物的浓度介于 $1/10 \sim 10K_m$ 之间,孵育体系pH介于5.5-10.5之间,反应温度介于 $20 \sim 60^{\circ}\text{C}$ 之间。

6.按照权利要求4所述人羧酸酯酶1的生物发光探针底物的应用,其特征在于:所述不同生物来源为重组表达的hCE1、人或动物的细胞制备物、组织制备液、血浆等常见生物样本。

7.按照权利要求4所述人羧酸酯酶1的生物发光探针底物的应用,其特征在于:所述水

解产物的生成率在0.1%~20%之间。

8.按照权利要求1所述人羧酸酯酶1的生物发光探针底物的应用,其特征 在于:该探针用于人羧酸酯酶1抑制剂的快速筛选与评估,方法为:按照探针的使用方法,通过定量比较抑制剂存在与缺失状态下单位时间内水解产物的生成量评估该生物体系中hCE1的残余活性,进而实现hCE1抑制剂的快速筛选及抑制能力的定量评价。

人羧酸酯酶1的生物发光探针底物及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属医药生物技术领域,具体涉及一类一类人羧酸酯酶1(hCE1)的生物发光探针底物及其制备方法与应用。

背景技术

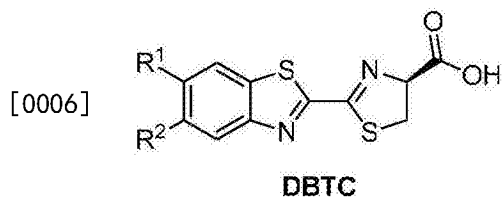
[0002] 作为脏器和组织的特征标志物,hCE1在人群的肝脏中含量很高,其蛋白表达量在肝脏分布蛋白中排前十位。hCE1是一种膜结合蛋白,定位于细胞内质网中【CANCER RESEARCH 1998;58:3627-32&Drug Metab.Pharmacokinet.2006;21:173-85】,同时也会分泌到细胞外进入血液循环系统【Proteomics 2009;9:3989-99】。hCE1的基本代谢反应是催化含较小醇基和较大酰胺基底物的水解。虽然,在多种组织的中都检测到hCE1的蛋白表达,但其在人肝脏组织含量远高于其它组织。hCE1参与多种外源性物质的代谢清除,例如药物奥司他韦、哌醋甲酯等。同时,hCE1在维持人体正常生理功能功能发挥不可忽视的作用,参与人体内胆固醇酯和游离脂肪酸的运输和代谢过程,维持脂质代谢平衡【Chemistry&Biology,Vol.10,341-349,April,2003】。在正常健康人体中,hCE1除了以较高的含量分布在肝组织的细胞中,也有少量hCE1在血浆中被检测到,更重要的是,肝细胞肝癌患者血浆中的hCE1是健康人群的2-5倍,因此hCE1被认为是肝细胞肝癌早期诊断的一种良好的潜在血清学标志物【Proteomics 2009,9,3989-3999】。此外,肝细胞破损相关的肝脏疾病患者也会有hCE1释放入血,引起血浆中hCE1浓度发生变化,因此,血浆中hCE1可作为肝脏急性损伤的标志物。hCE1的分布存在很大的个体差异,hCE1酶的表达和功能本身会受到人体遗传、年龄、疾病、性别、环境和共服药物等多种因素的影响。因此,hCE1酶的活性检测方法具有广阔的临床应用前景,可用于评价人体肝脏功能异常、药物及毒物导致的肝毒性、肝细胞癌早期诊断、肝功能个体化评估、以及部分前体药物的个性化使用等。此外,hCE1作为维持人体脂质代谢平衡的重要蛋白,其抑制剂可作为降血脂药物使用,hCE1也被FDA批准为重要的药物作用靶点。hCE1活性的快速表征方法也可用于新药研发早期发现及评估hCE1新型高效抑制剂。因此,开发高效、超灵敏、高特异性的hCE1活性检测方法对于临床样本中hCE1活性的检测,以及新药高内涵高通量筛选至关重要。

[0003] 本发明提供了(S)-4,5-二氢-2-(苯并噻唑-2-基)噻唑-4-甲酸酯衍生物(简称DBT-R)及其作为hCE1探针底物的应用,其经hCE1水解后可生成荧光素酶的底物(S)-4,5-二氢-2-(苯并噻唑-2-基)噻唑-4-甲酸化合物(简称DBTC),利用DBTC与荧光素酶反应产生生物发光进行检测。该酶促反应具有选择性高、代谢产物易检测、酶活性及抑制剂活性评价快速省时的特点。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供人羧酸酯酶1(hCE1)的特异性生物发光探针反应及其定量检测方法和应用,该类特异性探针的水解产物是荧光素酶的底物,易于检测。利用该探针反应可对多种生物体系中的hCE1的分布和功能进行定量评价。

[0005] 一类人羧酸酯酶1的生物发光探针底物,该探针底物DBT-R可被hCE1特异性催化发生酯键水解反应并生成相应的羧酸产物DBTC,该探针底物如图1,水解产物的结构如下:



[0007] 其中, R^1 选自 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{NHCH}_3$ 、 $-\text{NHCH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$; R^2 选自 H 、 C_1 - C_3 烷基、 C_1 - C_3 亚烷基氨基; R^3 选自 C_1 - C_{10} 烷基、 $-(\text{C}_1$ - C_8 亚烷基)-氨基、 $-(\text{C}_1$ - C_8 亚烷基)-氰基、 $-(\text{C}_1$ - C_8 亚烷基)-硝基、 $-(\text{C}_1$ - C_3 亚烷基)- O -(C_1 - C_3 烷基)、环烷基、 $-(\text{C}_1$ - C_3 亚烷基)-环烷基、芳基、 $-(\text{C}_1$ - C_3 亚烷基)-芳基、杂芳基、 $-(\text{C}_1$ - C_3 亚烷基)-杂芳基、杂环基或 $-(\text{C}_1$ - C_3 亚烷基)-杂环基。

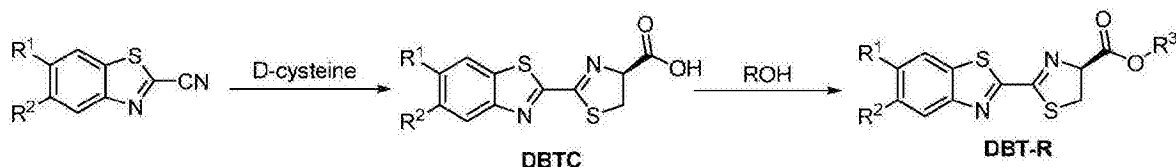
[0008] 所述DBTC是荧光素酶的底物,可采用生物发光检测器实现产物的快速灵敏检测,所述生物发光检测器为发光分析仪、酶标仪、显微镜或小动物成像仪。

[0009] 本发明还提供了一类人羧酸酯酶1的生物发光探针底物的制备方法,其特征在于:

[0010] 将2-氰基苯并噻唑(1.0eq)和D-半胱氨酸(1.1-1.5eq)加入到甲醇/水的混合溶液中,加入碳酸钾(1.1-1.5eq),20-30℃搅拌反应1-3小时,生成(S)-4,5-二氢-2-(苯并噻唑-2-基)噻唑-4-甲酸化合物(简称DBTC)。所得产物DBTC(1.0eq)在4-N,N-二甲基吡啶(0.1-0.5eq)和1-乙基-3(3-二甲基丙胺)碳二亚胺(1.1-1.5eq)的存在下与醇(HOR³)缩合反应,20-30℃搅拌反应6-24小时生成(S)-4,5-二氢-2-(苯并噻唑-2-基)噻唑-4-甲酸酯衍生物(简称DBT-R)。

[0011] 合成路线如下:

[0012]



[0013] 本发明还提供人羧酸酯酶1的生物发光探针底物的应用,该类底物可被hCE1特异性识别并催化发生水解反应,通过定量检测单位时间内水解产物的生成量即可测定不同生物来源(组织、细胞、血浆)中的hCE1活性;具体测定方法为:

[0014] (1)预孵育:将待测样品在缓冲体系中,20~60度下孵育3~5分钟;

[0015] (2)起始反应:加入式(1)化合物混匀,20~60度下孵育2~120分钟;

[0016] (3)检测:加入荧光素酶检测试剂,混匀,37℃孵育20-30min;用酶标仪或化学发光分析仪测定样品,检测波长620nm。

[0017] (4)测定单位时间内水解产物生成量作为hCE1活性的评价标准。

[0018] 本发明提供的一类人羧酸酯酶1的生物发光探针底物的应用,所述水解反应体系为PBS缓冲液,探针底物的浓度介于 $1/10 \sim 10K_m$ 之间,孵育体系pH介于5.5-10.5之间,反应温度介于 $20 \sim 60^{\circ}C$ 之间,底物消除率或水解产物的生成率介于 $0.1\% \sim 20\%$ 之间。

[0019] 所述不同生物来源为重组表达的hCE1、人或动物的细胞制备物、组织制备液、血浆等常见生物样本。

[0020] 一种人羧酸酯酶1的生物发光探针底物的应用,该探针用于人羧酸酯酶1抑制剂的快速筛选与评估,方法为:按照探针的使用方法,通过定量比较抑制剂存在与缺失状态下单位时间内水解产物的生成量评估该生物体系中hCE1的残余活性,进而实现hCE1抑制剂的快速筛选及抑制能力的定量评价。

[0021] 本发明提供的一类人羧酸酯酶1的生物发光探针底物的应用,探针水解产物均为荧光素酶的底物,可采用生物发光检测器实现底物的快速灵敏检测。

[0022] 本发明提供的人羧酸酯酶1的生物发光探针底物的应用,该特异性探针底物及相应hCE1活性检测过程不会受到生物体系基质及杂质的干扰,可用于重组表达的hCE1、人或动物的细胞制备物、组织制备液、血浆等各种生物体系中hCE1酶活性的定量检测。

[0023] 本发明提供了人羧酸酯酶1的生物发光探针底物的应用,该特异性探针底物用于重组表达的hCE1、人或动物的细胞制备物、组织制备液、血浆等常见生物样本中酶活性的定量测定,以及利用该探针反应快速筛选hCE1酶的抑制剂。

[0024] 本发明涉及的hCE1特异性探针反应具有如下优点:

[0025] 1. 廉价易得:(S)-4,5-二氢-2-(苯并噻唑-2-基)噻唑-4-甲酸酯衍生物(简称DBT-R)可经化学合成获得,合成工艺简单易行。

[0026] 2. 高特异性:(S)-4,5-二氢-2-(苯并噻唑-2-基)噻唑-4-甲酸酯衍生物(简称DBT-R)可被hCE1特异性代谢成一个代谢产物,即酯键断裂的水解产物,人体其余水解酶均不参与该反应。

[0027] 3. 高灵敏度:DBT-R可被hCE1快速水解释放出(S)-4,5-二氢-2-(苯并噻唑-2-基)噻唑-4-甲酸衍生物(简称DBTC),且产物为荧光素酶的底物,可利用生物发光检测器实现超灵敏检测,其对目标物的检测下限可达纳摩尔级。

[0028] 4. 易高通量检测:可在实验室常见各类荧光酶标仪及临床大生化仪上测定,可利用96或386微孔板进行批量检测。

附图说明

[0029] 图1.(S)-4,5-二氢-2-(苯并噻唑-2-基)噻唑-4-甲酸酯衍生物(简称DBT-R)结构通式;

[0030] 图2.(S)-4,5-二氢-2-(6-二甲氨基苯并噻唑-2-基)噻唑-4-甲酸甲酯合成路线;

[0031] 图3.(S)-4,5-二氢-2-(6-二甲氨基苯并噻唑-2-基)噻唑-4-甲酸甲酯¹H-NMR谱图;

[0032] 图4.(S)-4,5-二氢-2-(6-二甲氨基苯并噻唑-2-基)噻唑-4-甲酸甲酯的选择性;

[0033] 图5.hCE1的定量标准曲线;

[0034] 图6.hCE1的活性化学抑制实验

[0035] 图7.不同组织微粒体中hCE1的活性定量评估

具体实施方式

[0036] 下面的实施例将对本发明予以进一步的说明,但并不因此而限制本发明。(S)-4,5-二氢-2-(苯并噻唑-2-基)噻唑-4-甲酸酯衍生物(简称DBT-R)结构通式如图1所示。

[0037] 实施例1.(S)-4,5-二氢-2-(6-二甲氨基苯并噻唑-2-基)噻唑-4-甲酸甲酯的合成

[0038] 合成路线如图2所示。

[0039] (1)化合物2的合成

[0040] 室温,将化合物1(18.2g,107.3mmol,1.0eq)加入浓硫酸溶液中(90mL),搅拌溶解。将反应体系冷却到0-5℃,将硝酸钾(11.9g,118.0mmol,1.1eq)分批10次加入到上述反应体系中。加完室温反应,薄板层析(TLC)监测反应进程。反应完毕后将反应体系倾入冰水中(250mL),抽滤得粗产物经乙酸乙酯重结晶得黄色固体,产率80-90%,ESI-MS m/z 215.0[M+H]⁺

[0041] (2)化合物3的合成

[0042] 室温,将化合物2(6.0g,27.95mmol,1.0eq)和二氯化锡一水合物(18.9g,83.85mmol,3.0eq)加入乙醇溶液中(80mL),将体系升温回流反应,薄板层析(TLC)监测反应进程。反应完毕后,蒸除溶剂,加水(20mL),1N NaOH调pH=7-8,过滤,滤液乙酸乙酯萃取(50mL×3),合并有机相饱和氯化钠溶液洗(20mL×1)、无水硫酸钠干燥。蒸除溶剂,粗产物柱层析(石油醚/乙酸乙酯=3/1)得化合物3,黄色固体,产率40-50%,ESI-MS m/z 185.0[M+H]⁺。

[0043] (3)化合物4的合成

[0044] 室温,将化合物3(92.3mg,0.5mmol,1.0eq)和氰化钠(49.0mg,1mmol,2eq)加入二甲基亚砷(5mL)中,加热130℃反应,薄板层析(TLC)监测反应进程。反应完毕后,冷却到室温,加入水(30mL),乙酸乙酯萃取(30mL×3),合并有机相水洗(20mL×2),饱和氯化钠溶液洗(20mL×1)、无水硫酸钠干燥。蒸除溶剂,粗产物柱层析(石油醚/乙酸乙酯=3/1)得化合物4,黄色固体,产率30-50%,ESI-MS m/z 175.1[M+H]⁺。

[0045] (4)化合物5的合成

[0046] 室温,将化合物4(87.6mg,0.5mmol,1.0eq)和37%甲醛溶液(1mL)加入到二氯甲烷(5mL)中,滴加浓硫酸(0.1mL)后,分批10次加入硼氢化钠(75.6mg,2mmol,4.0eq)于上述反应体系中。加完室温反应1h,1N NaOH调pH=7-8,乙酸乙酯萃取(30mL×3),合并有机相饱和氯化钠溶液洗(20mL×1)、无水硫酸钠干燥。蒸除溶剂,粗产物柱层析(石油醚/乙酸乙酯=10/1)得化合物5,黄色固体,产率40-50%,ESI-MS m/z 204.1[M+H]⁺。

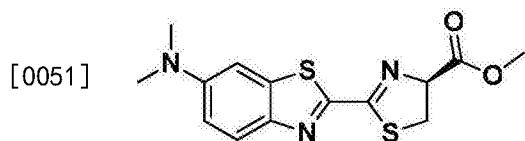
[0047] (5)化合物6的合成

[0048] 室温,氩气氛下,将化合物5(60.9mg,0.3mmol,1.0eq)和D-半胱氨酸(40.0mg,0.33mmol,1.1eq)加入到甲醇(5mL)/水(2.5mL)的混合液中,加入碳酸钾(45.6mg,0.33mmol,1.1eq)于反应体系中。加完室温反应1h,1N NaOH调pH=8,乙酸乙酯洗(30mL×3),水相1N HCl调pH=4-5,乙酸乙酯萃取(30mL×3),合并有机相饱和氯化钠溶液洗(20mL×1)、无水硫酸钠干燥。蒸除溶剂得化合物6,红褐色固体,产率50-60%,ESI-MS m/z 308.1[M+H]⁺。

[0049] (6)化合物(S)-4,5-二氢-2-(6-二甲氨基苯并噻唑-2-基)噻唑-4-甲酸甲酯的合成

[0050] 室温,氩气氛下,依次将化合物6(30.7mg,0.1mmol,1.0eq)、4-N,N-二甲基吡啶(1.3mg,0.01mmol,0.1eq)和1-乙基-3(3-二甲氨基丙胺)碳二亚胺(21.0mg,0.11mmol,1.1eq)加入到甲醇(2mL)/二氯甲烷(2mL)的混合液中。加完室温反应12h,反应完毕后,蒸出溶剂得粗产物柱层析(石油醚/乙酸乙酯=5/1)得化合物(S)-4,5-二氢-2-(6-二甲氨基苯并噻

唑-2-基)噻唑-4-甲酸甲酯,黄色固体,产率70-90%,ESI-MS m/z 322.1 $[M+H]^+$ 。其结构式为:



[0052] 制备的产物的核磁共振波谱如图3所示,具体如下:

[0053] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 7.95(d, $J=9.2\text{Hz}$, 1H), 7.05(s, 1H), 6.98(dd, $J=9.2$, 2.1Hz, 1H), 5.36(t, $J=9.1\text{Hz}$, 1H), 3.85(s, 3H), 3.81-3.63(m, 2H), 3.07(s, 6H).

[0054] 实施例2. 体外测定人重组单酶中hCE1的选择性

[0055] (1)预先准备30 μl hCE1代谢反应体系,包括pH 6.5的PBS缓冲液(100mM)、人重组各单酶(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$),于37 $^\circ\text{C}$ 条件下震荡预孵10分钟;

[0056] (2)向反应体系中加入30 μl 浓度为10 μM 的(S)-2-(2-(6-二甲氨基)-苯并噻唑)-4,5-二氢噻唑-4-甲酸甲酯起始反应;

[0057] (3)10分钟后,加入50 μl 的发光检测试剂,37 $^\circ\text{C}$ 孵育20min后,酶标仪检测发光。

[0058] 重组人hCE1特异性参与其水解,其它酯酶均不参与其水解,证实该类化合物具有非常好的选择性(图4)。

[0059] 实施例3.hCE1水解(S)-2-(2-(6-二甲氨基)-苯并噻唑)-4,5-二氢噻唑-4-甲酸甲酯的线性反应浓度

[0060] (1)预先准备30 μl hCE1代谢反应体系,包括pH 6.5的PBS缓冲液(100mM)、人重组单酶hCE1(系列浓度),于37 $^\circ\text{C}$ 条件下震荡预孵10分钟;

[0061] (2)向反应体系中加入30 μl 浓度为10 μM 的(S)-2-(2-(6-二甲氨基)-苯并噻唑)-4,5-二氢噻唑-4-甲酸甲酯起始反应;

[0062] (3)10分钟后,加入50 μl 的发光检测试剂,37 $^\circ\text{C}$ 孵育20min后,酶标仪检测发光。

[0063] 10 μM 的(S)-2-(2-(6-二甲氨基)-苯并噻唑)-4,5-二氢噻唑-4-甲酸甲酯最低能检测到0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的hCE1(图5)。

[0064] 实施例4.hCE1的活性化学抑制实验

[0065] (1)准备hCE1代谢反应体系,包括pH 6.5的PBS缓冲液(100mM)、人肝微粒体、不同酯酶特异性抑制剂(100 μM)于37 $^\circ\text{C}$ 条件下震荡预孵10分钟;

[0066] (2)向反应体系中加入30 μl 浓度为10 μM 的(S)-2-(2-(6-二甲氨基)-苯并噻唑)-4,5-二氢噻唑-4-甲酸甲酯起始反应;

[0067] (3)10分钟后,加入50 μl 的发光检测试剂,37 $^\circ\text{C}$ 孵育20min后,酶标仪检测发光。

[0068] 4,10 μM 的(S)-2-(2-(6-二甲氨基)-苯并噻唑)-4,5-二氢噻唑-4-甲酸甲酯在人肝微粒体中的水解活性能够被羧酸酯酶特异性抑制剂BNPP显著抑制,而其它酯酶抑制剂对其水解没有显著的抑制活性,证实10 μM 的(S)-2-(2-(6-二甲氨基)-苯并噻唑)-4,5-二氢噻唑-4-甲酸甲酯能够特异性检测复杂生物样本的hCE1的活性(图6)。

[0069] 实施例5.不同组织微粒体中hCE1的活性定量评估

[0070] (1)选取4种不同组织来源的微粒体(HLM),准备hCE1代谢反应体系,包括pH 6.5的PBS缓冲液(100mM)、组织微粒体、于37 $^\circ\text{C}$ 条件下震荡预孵3分钟;

[0071] (2)向反应体系中加入30 μl 浓度为10 μM 的(S)-2-(2-(6-二甲氨基)-苯并噻唑)-4,

5-二氢噻唑-4-甲酸甲酯起始反应；

[0072] (3)10分钟后,加入50 μ l的发光检测试剂,37℃孵育20min后,酶标仪 检测发光。

[0073] 检测到的发光信号强度代入标准曲线后得到4种组织微粒体对(S)-2-(2-(6-二甲氨基)-苯并噻唑)-4,5-二氢噻唑-4-甲酸甲酯的代谢速率,该测定结果与Western Blot测定的hCE1表达结果一致(图7)。

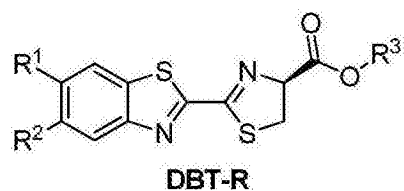
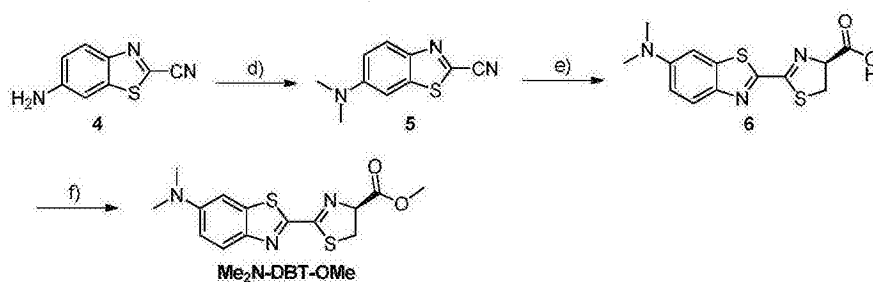


图1



a) KNO_3 , H_2SO_4 , $0\text{ }^\circ\text{C}$; b) SnCl_2 , EtOH , reflux; c) NaCN , DMSO , $130\text{ }^\circ\text{C}$; d) HCHO , H_2SO_4 , NaBH_4 , THF , rt; e) D-cysteine , K_2CO_3 , $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, rt; f) MeOH , DMAP , EDCI , CH_2Cl_2 , rt.

图2

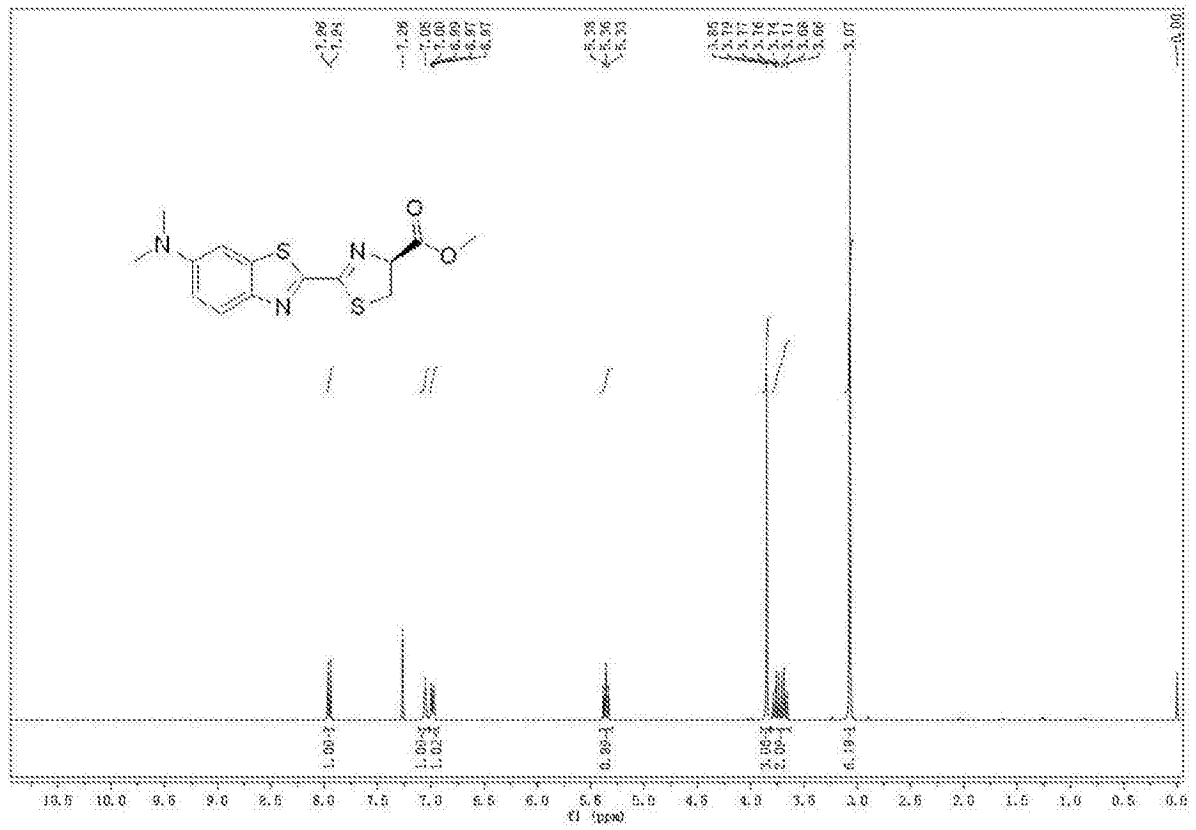


图3

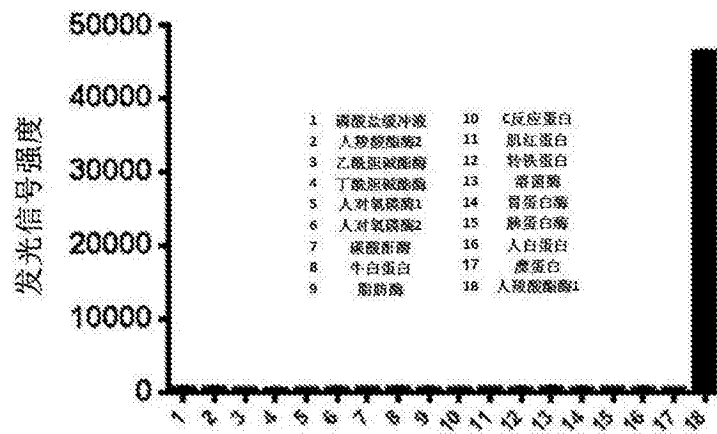


图4

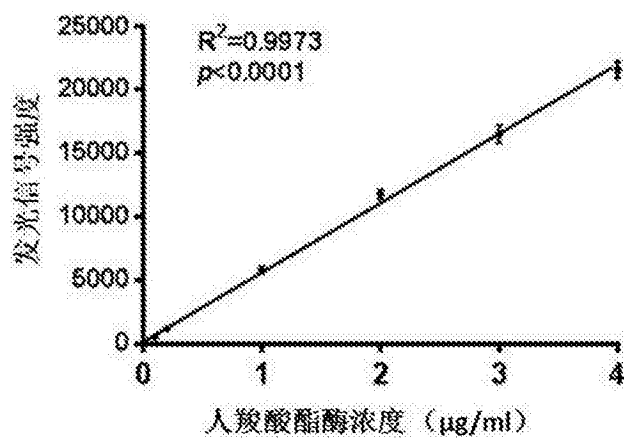


图5

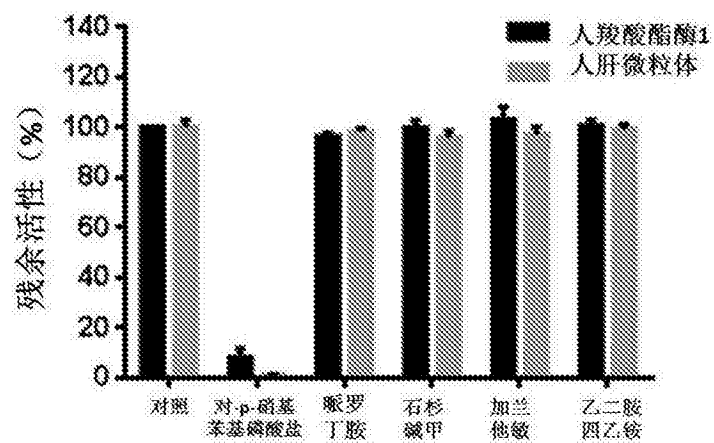


图6

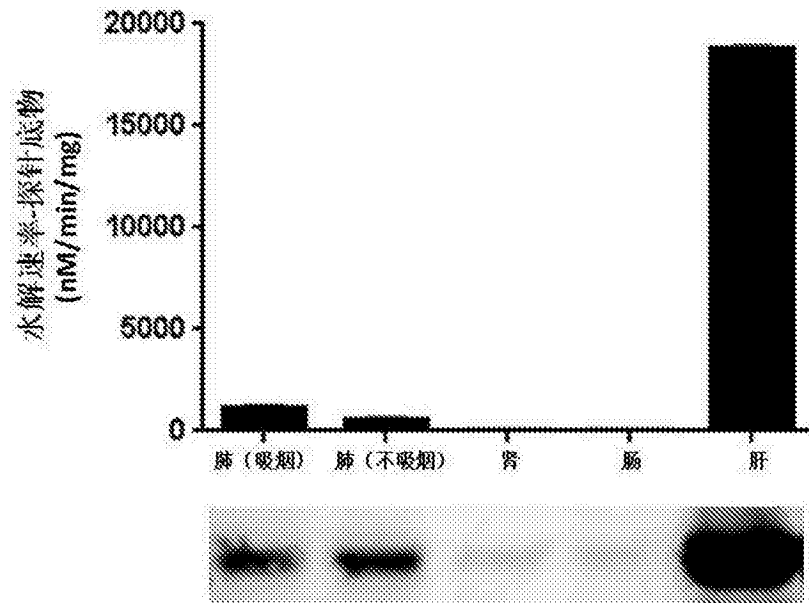


图7

专利名称(译)	人羧酸酯酶1的生物发光探针底物及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN105712987A	公开(公告)日	2016-06-29
申请号	CN201610119590.9	申请日	2016-03-03
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院大连化学物理研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院大连化学物理研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院大连化学物理研究所		
[标]发明人	杨凌 邹立伟 葛广波 王丹丹 王平 于洋 杜逊甫		
发明人	杨凌 邹立伟 葛广波 王丹丹 王平 于洋 杜逊甫		
IPC分类号	C07D417/04 C09K11/06 G01N33/533		
CPC分类号	C07D417/04 C09K11/06 C09K2211/1037 G01N33/533		
代理人(译)	张晨		
其他公开文献	CN105712987B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一类人羧酸酯酶1的生物发光探针底物及其制备方法与应用，属生物医药技术领域。该探针底物为(S)-4,5-二氢-2-(苯并噻唑-2-基)噻唑-4-甲酸酯衍生物(简称DBT-R)，其可用于测定不同生物体系中hCE1的酶活。hCE1酶活性测定的具体流程如下：选择DBT-R化合物酯键水解反应为探针反应，在生理条件下定量检测单位时间内DBT-R水解生成羧酸产物DBTC的量来测定各类生物样品中hCE1的活性。本发明可用于检测各种生物样本(离体组织、细胞、血浆、在体及整体器官、甚至活体动物)中hCE1酶的实际活性。本发明不仅可用于不同来源生物样本中hCE1酶活性的定量评估，此外借助该探针反应还可用于体外快速筛选hCE1的诱导剂和抑制剂。

