

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12P 21/08

A61K 47/48

G01N 33/577 A61K 39/385

C12N 5/16

[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 94191718.5

[45] 授权公告日 2002 年 3 月 6 日

[11] 授权公告号 CN 1080312C

[22] 申请日 1994.3.30 [24] 颁证日 2002.3.6

[21] 申请号 94191718.5

[30] 优先权

[32] 1993.4.8 [33] GB [31] 9307491.2

[86] 国际申请 PCT/EP94/01006 1994.3.30

[87] 国际公布 WO94/24304 英 1994.10.27

[85] 进入国家阶段日期 1995.10.6

[73] 专利权人 诺瓦蒂斯有限公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 R·塞兰尼 V·奎斯尼奥

[56] 参考文献

EP0450936 1991.1.1 _

EP0524832 1993.1.1 _

审查员 孙广秀

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 卢新华 姜建成

权利要求书 1 页 说明书 21 页 附图页数 8 页

[54] 发明名称 雷帕霉素检测法

[57] 摘要

本发明提供了雷帕霉素和 40-氧-烷基化的雷帕霉素衍生物的单克隆抗体、新型半抗原,致免疫轭合物,以及生产它们的方法和使用它们的检测试剂盒。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 一种能够专门识别雷怕霉素或 40-氧-(2-羟乙基)-雷怕霉素的单克隆抗体。
2. 权利要求 1 的单克隆抗体,它能够识别雷怕霉素或 40-氧-(2-羟乙基)-雷怕霉素的 FKBP-结合部位上的抗原决定基。
3. 权利要求 1 或 2 的单克隆抗体,它通过以下步骤得到或可以得到:
 - a) 使带有活化偶合基团的雷怕霉素或 40-氧-(2-羟乙基)-雷怕霉素与致免疫蛋白反应,生成致免疫轭合物,
 - b) 将上述致免疫轭合物给合适种类的动物服用,以产生致免疫激发,收集对上述轭合物敏感的产生抗体的细胞,
 - c) 使产生上述抗体的细胞无限增殖化,
 - d) 从上述建立的无限增殖化细胞系中收集单克隆抗体。
4. 一种致免疫轭合物,它由蛋白质和带有活化偶合基团的雷怕霉素或带有活化偶合基团的 40-氧-(2-羟乙基)-雷怕霉素反应得到。
5. 权利要求 4 的致免疫轭合物,其中带有活化偶合基团的雷怕霉素或 40-氧-(2-羟乙基)-雷怕霉素选自 40-氧-琥珀酰亚胺氧琥珀酰基-雷怕霉素、28-氧-琥珀酰亚胺氧琥珀酰基-雷怕霉素或 28-氧-(琥珀酰亚胺氧琥珀酰基)-40-氧-(2-羟乙基)-雷怕霉素。
6. 一种带有活化偶合基团的雷怕霉素,它选自 40-氧-琥珀酰亚胺氧琥珀酰基-雷怕霉素、28-氧-琥珀酰亚胺氧琥珀酰基-雷怕霉素或 28-氧-(琥珀酰亚胺氧琥珀酰基)-40-氧-(2-羟乙基)-雷怕霉素。
7. 一种能够产生权利要求 1 至 3 中任何一项的单克隆抗体的杂交瘤细胞系。
8. 一种用于检测血液中雷怕霉素或 40-氧-(2-羟乙基)-雷怕霉素浓度的免疫检测试剂盒,它含有权利要求 1 至 3 中任何一项的单克隆抗体。

说明书

雷伯霉素检测法

本发明涉及雷伯霉素及其衍生物的单克隆抗体，它们可用于例如检测血药浓度的检测试剂盒中。

雷伯霉素是由吸水链霉菌产生的大环内酯抗菌素，有广泛的制药学用途，尤其可作为一种免疫抑制剂，例如可应用于治疗和预防器官移植排斥和自身免疫疾病。但是，雷伯霉素在大剂量时会有副作用，并且它的生物利用度在一定程度上可变。在用雷伯霉素治疗的病人中，为了能够及时调整剂量以保持有足够药理作用的最低雷伯霉素含量，以及避免副作用产生的任何过度危害，监测患者血液中雷伯霉素浓度就变得尤为重要。但在临床中缺少能够快速简易操作的灵敏、可靠的检测方法，仍是目前雷伯霉素药物研究的一个主要障碍。

以前有关临床检测雷伯霉素的检测试剂盒的研究都不太成功。例如，EP 041795 描述了一种微生物学检测法，其中雷伯霉素浓度由其抗真菌活性函数来测定。WO 92/02946 提供了一种间接测定雷伯霉素的检测系统，即测定其与嗜巨噬因子 (macrophilin) 间的竞争结合。这两种测定方法都繁琐且不太灵敏。更重要的是，实验条件稍有不同，这两种方法的结果都会有很大变化，难以在不同医院间进行实验结果的比较。

在此之前还没有关于识别雷伯霉素的单克隆抗体的报导。由于雷伯霉素不是致免疫的，而且它自身是极强的免疫抑制剂，因此制备雷伯霉素的单克隆抗体非常困难。此外，由于在文献中雷伯霉素的代谢产物没有明显的特征，因此我们就很难发现能够区分雷伯霉素及其代

谢产物的单克隆抗体。

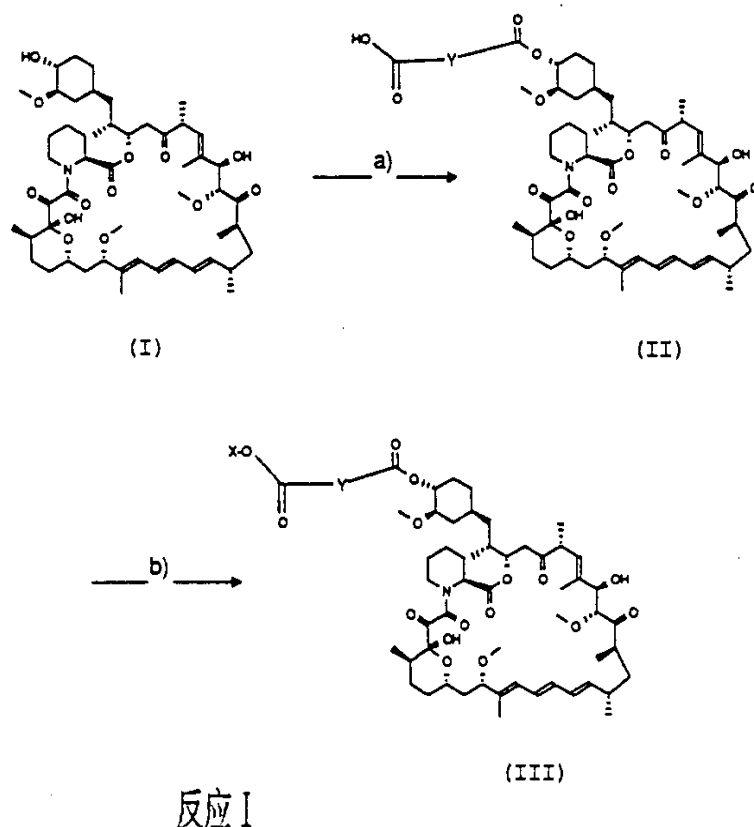
本发明提供的单克隆抗体对雷帕霉素有高度敏感性。用一个新的致免疫的轭合物进行接种可制得本发明的抗体，该致免疫的轭合物包括与致免疫蛋白连接的新的雷帕霉素衍生物。使用这些抗体的检测试剂盒适合于临床应用，它可以提供比以前更精确、可重复的结果。该抗体还可用于雷帕霉素的纯化和分离。

提供雷帕霉素的免疫抑制衍生物的检测方法面临同样的困难。让人特别感兴趣的是雷帕霉素的 40-氧-衍生物，即雷帕霉素环己基环（第 40 位）上羟基的氧被取代，如在 US 5 285 389 和 PCT/EP93/02604（氧-芳基雷帕霉素和氧-烷基雷帕霉素）中所述（在此引入作为参考）；尤其是 40-氧-烷基化的雷帕霉素，其中 40-氧-取代基为烷基或取代烷基，如羟烷基、羟烷氧烷基、酰氨烷基、氧烷基、这里“烷基”指支链或直链的 C_{1-8} 烷基，优选 C_{1-4} 烷基，其中碳链可被醚（-O-）键任意断开；最为特别的是 40-氧-（2-羟乙基）-雷帕霉素、40-氧-（3-羟丙基）-雷帕霉素、40-O-[2-（2-羟基）乙氧基]乙基-雷帕霉素，和 40-O-（2-乙酰氨基乙基）-雷帕霉素。因此，本发明的另一目的是提供上述 40-氧衍生物的单克隆抗体。这些抗体可用于诊断分析，还可用于纯化和生产上述雷帕霉素衍生物。

用于制备本发明新的致免疫轭合物的新的活化的雷帕霉素衍生物是：通过雷帕霉素上的一个羟基基团（优选位于雷帕霉素环己基部分（第 40 位）上的羟基或第 28 位上的羟基）使雷帕霉素与一个活化的偶合基团 [即该活化的偶合基团能够直接与蛋白质反应生成共价键而不需要应用偶合剂（如碳化二亚胺试剂）]，以实现、引起或促进

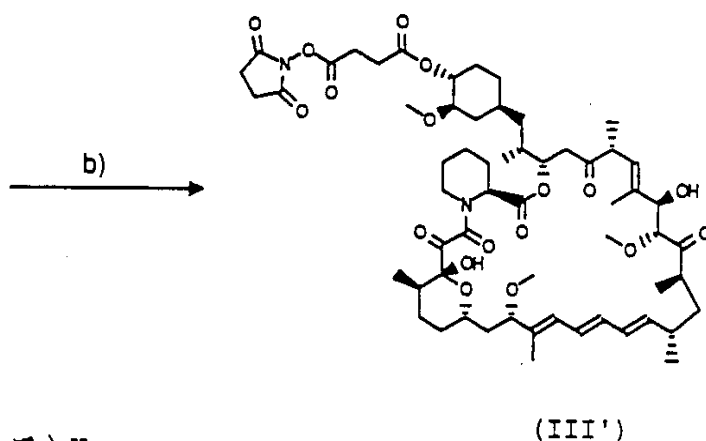
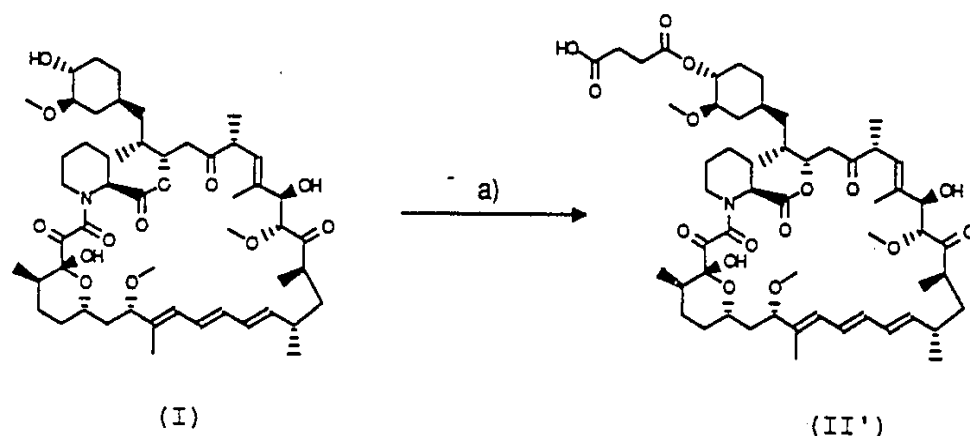
与蛋白质的反应。该活化的偶合基团最好有一个活化的酯或羧基基团，即，式 $-CO-O-X$ ，其中 X 是一个羧基活化的基团，如对-或邻-硝基苯基，1-苯并三唑，五氟苯基或尤其是 N -琥珀酰亚胺基。其它合适的活化偶合基团有例如 i) 可与雷帕霉素连接的活化的联硫基，如式 $-S-S-Z$ ，其中 Z 是联硫基活化的基团，如 2-吡啶基，或 ii) 环氧基，如环氧甲基。活化的偶合基团可以通过酯、醚、酰胺、硫或其它合适的键与雷帕霉素连接，但优选酯键。最优选的是带有双酯部分的活化的偶合基团，如琥珀酰，它的一端通过酯键与雷帕霉素连接，另一端有一活化的酯或活化的羧基。

本发明优选的雷帕霉素衍生物是按以下反应 I 得到的式 III：



其中式I为雷帕霉素，a) 在适当的条件下使式I与-酰化剂反应，并且如果需要脱去保护，得到式II的雷帕霉素，其中y是间隔基基团，优选低级亚烷基，如C₂₋₆亚烷基，最好是亚乙基，反应a)中的酰化剂可选用例如环酐或二羧酸（任意地以半-氧-保护的形式）。b) 式II的雷帕霉素与-羧基活化的基团反应，生成式III活化的雷帕霉素，其中羧基活化基团可为HO-X，这里x如前述定义。

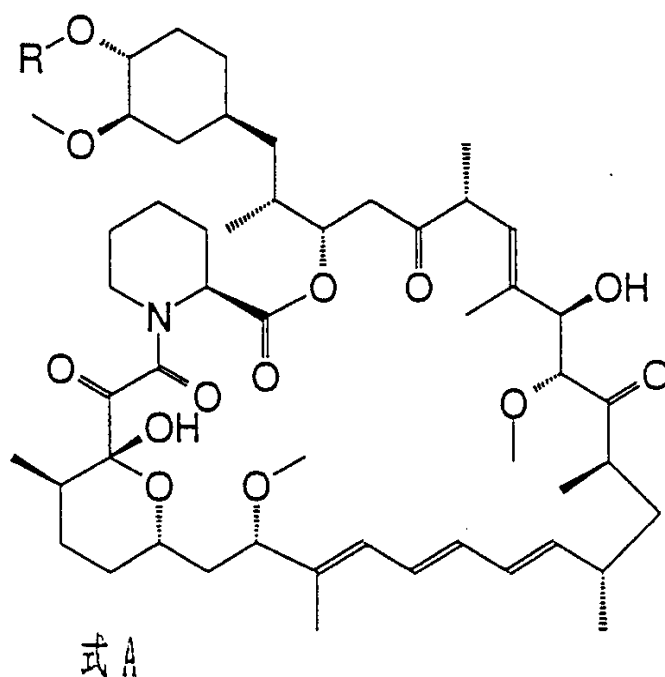
按照反应II可得到下式III'的琥珀酰亚氨基衍生物，它是优选的雷帕霉素活化衍生物，



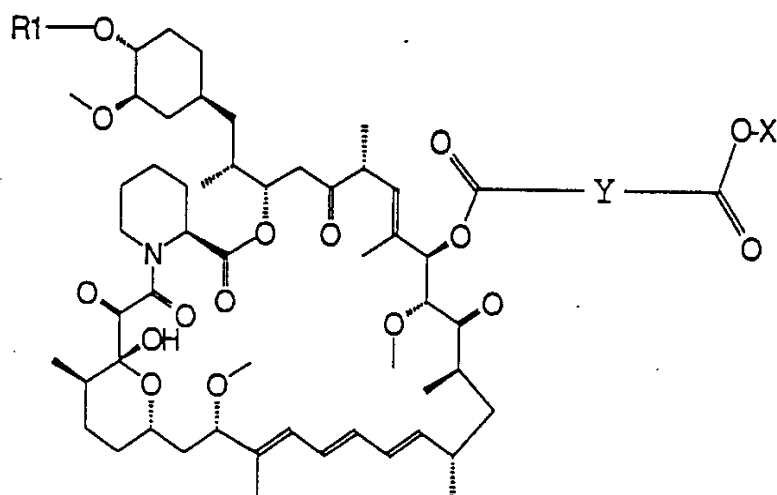
反应II

其中式 I 为雷帕霉素，反应 II 为：a) 在 DMAP 和吡啶存在下，用琥珀酐将雷帕霉素氧-酰化，得到式 II' 的雷帕霉素半琥珀酸酯（40-氧-（3-羧基）丙酰基-雷帕霉素）；b) 在 EDC、 $E_{t_3}N$ 和 CH_2Cl_2 存在下，用 N-羟基琥珀酰亚胺活化式 II'，得到式 III' 的 40-氧-琥珀酰亚胺氧琥珀酰雷帕霉素，该反应在实施例 1 中有详尽描述。用半抗原制备的单克隆抗体通常会在雷帕霉素和雷帕霉素的 40-氧-衍生物（如前所述）间发生交叉反应，该半抗原常被连接在第 40 位上。如以下所述，这些单隆抗体可被选为识别雷帕霉素或雷帕霉素 40-氧-衍生物的特殊部位（如在结合区或效应区）的化合物。

在某些情况下，要求单隆抗体对环己基部份的修饰有较好的敏感性，如为了区分雷帕霉素和雷帕霉素 40-氧-衍生物，或为了确定环己基部份的代谢产物。这时，半抗原优选连接在 28-氧位置，而不是连接在 40-氧位置。例如，式 A 的雷帕霉素衍生物，



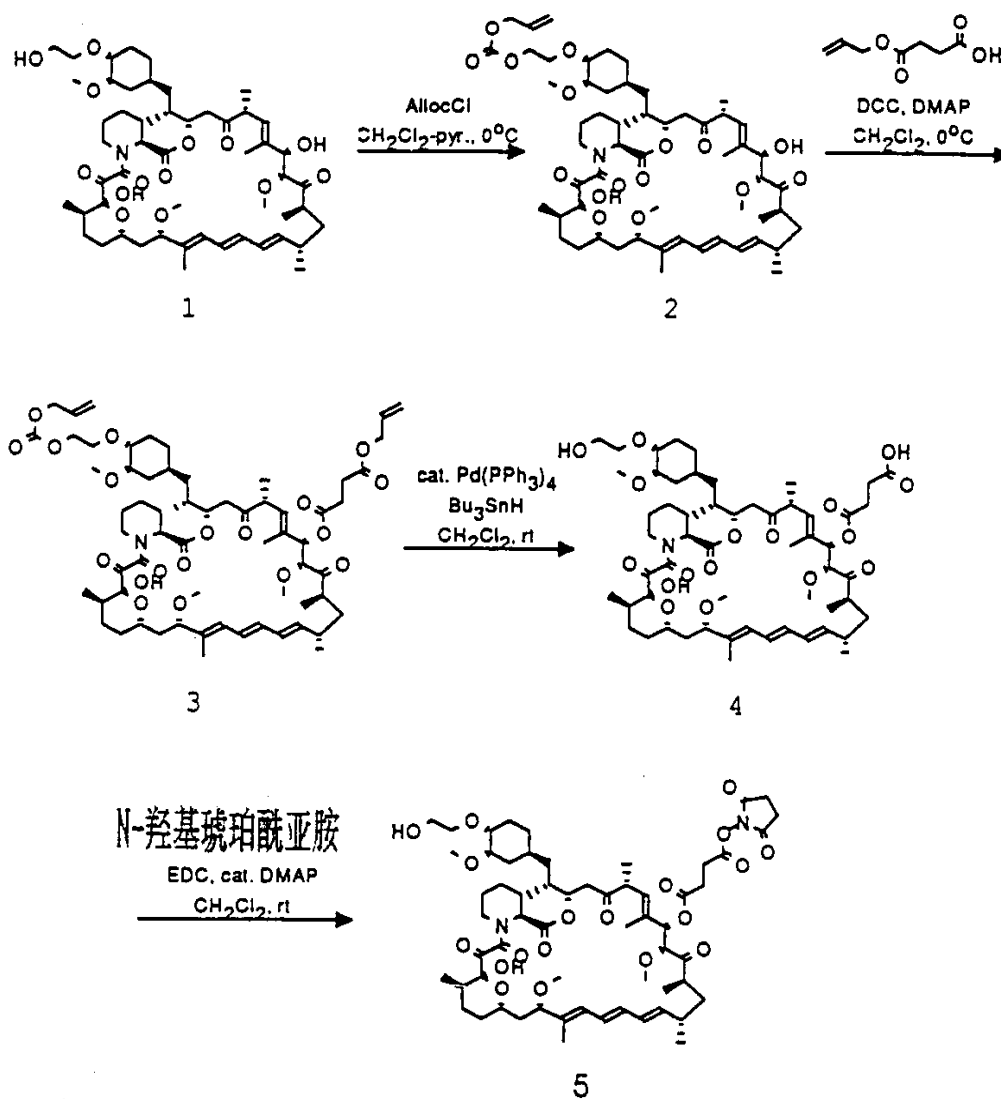
按照反应 I 进行反应（如果需要，脱去保护），生成类似的 28-氧活化的半抗原，如式 B 化合物；



式 B

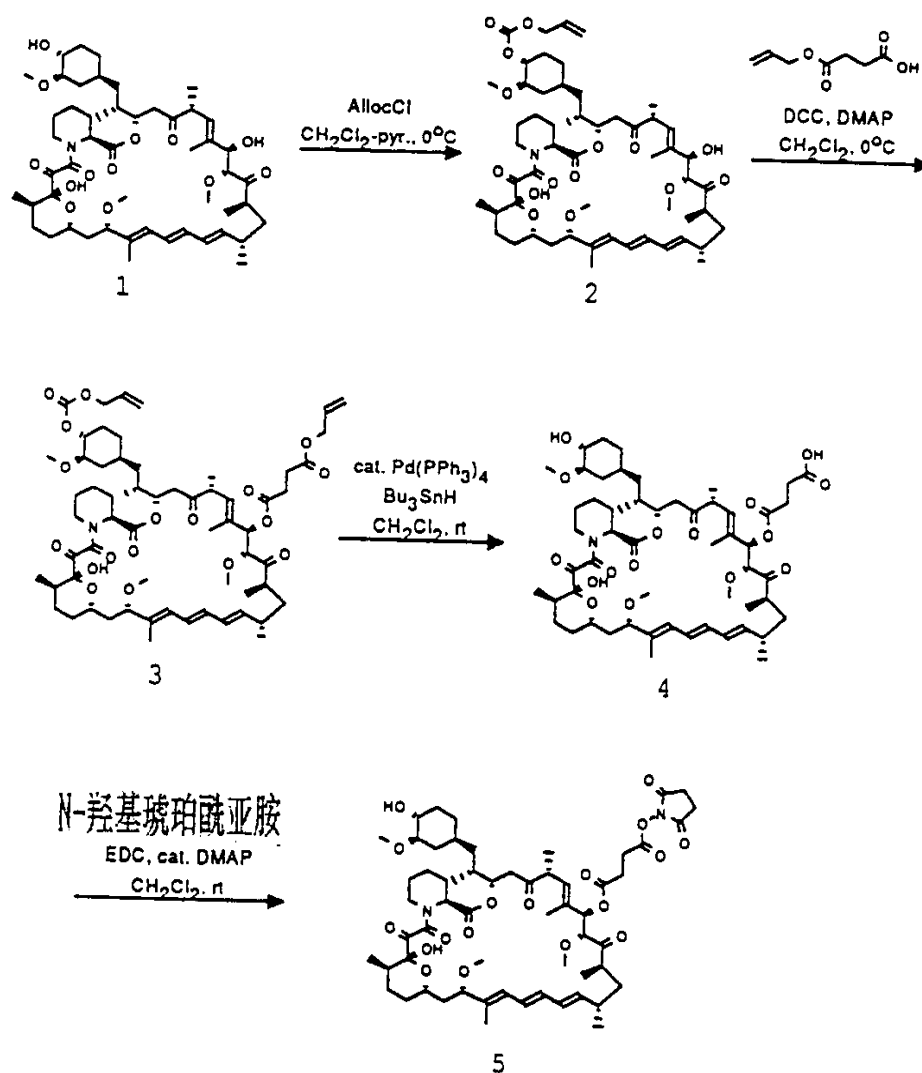
式 A 中 R 是氧-保护基团或如上所述的取代基，如羟烷基，羟烷氧烷基，酰氨烷基或氨烷基，它们任选被保护的形式，

式 B 中 R₁ 是氢或如前所述的氧-取代基，如羟烷基，羟烷氧烷基、酰氨烷基或氨烷基，Y 是如前所述的连接基团，X 是前述的羧基活化基团。制备上述半抗原时（其中 R 是氧-保护基团或氧-被护的取代基），酰化剂优选以半-氧被护形式的二羧酸，这样酰化过后，两个氧-保护基团在加入羧基活化基团之前可以一步脱去。例如，能够识别 40-氧-(2-羟乙基)-雷帕霉素单克隆抗体的半抗原可以按反应 III 制备：保护伯羟基，用半-氧被护形式的二羧酸酰化第 28 位上的羟基，脱去保护，活化羧基。



反应III

同样地，雷帕霉素自身也可以在第28-氧位而不是40-氧位被活化，其过程如反应IV所示：保护C₄₀羟基的氧，用半-氧-被保护的二羧酸酐化28位的羟基，脱去保护，活化羧基。



反应IV

然后将活化的雷帕霉素或雷帕霉素衍生物连接于一个合适的致免疫蛋白（例如牛血清白蛋白（B S A），卵清蛋白（O V A），钥孔贼血蓝素（K L H）等）上，以便形成致免疫轭合物。单克隆抗体可用常规方法制备，例如将此新的致免疫轭合物给予某种适合的动物，以产生致免疫的激发作用，收集被这种轭合物致敏的产生抗体的细胞；将产生该抗体的活存的细胞与合适的骨髓瘤细胞融合，从如此建立并选择的存活细胞系中收集单克隆抗体。

然后本发明的抗体可用于适合的检测方法中。熟悉本专业的技术人员都清楚有几种可能的方法供选择。一种方法为竞争性测定法，需使用抗体和一个雷帕霉素示踪物：如其中微量滴定板用抗体包被，在存在和不存在被认为可能含有雷帕霉素的待测液（如病人的血浆或全血）的情况下，暴露于一个竞争物，这里竞争物是一个被标记的雷帕霉素（如用荧光或放射性同位素标记，尤其是可用生物素标记）。清洗滴定板，测定结合于抗体的被标记的竞争物的量，这个量与待测液中雷帕霉素含量成反比。另一种方法是 ELISA 法，该法需用抗体、雷帕霉素蛋白轭合物和一个被标记的（例如酶标记的）示踪抗体，并且该抗体能识别小鼠 IgG，例如其中微量滴定板可用雷帕霉素-蛋白轭合物（如前所述的含有连接于雷帕霉素或 40-氧-烷基化雷帕霉素的一个蛋白质的致免疫轭合物）包被。然后在存在和不存在待测液的情况下暴露于抗体，清洗滴定板，结合于雷帕霉素轭合物的抗体通过把示踪抗体结合在已结合于雷帕霉素轭合物的抗体上来测定。同样，结合抗体的量与待测液中雷帕霉素的量成反比例。在上述两种方法中，测定均可用含有已知浓度雷帕霉素的待测液来使之标准化。本发明提供的检测试剂盒包括：(i) 本发明的单克隆抗体，最好以冷冻

干燥的形式或包被在微量滴定板上，(ii) 还可选择地包括一个雷帕霉素蛋白轭合物，（而此轭合物也可以是其包被在滴定板上），和/或一个被标记的雷帕霉素衍生物；(iii) 任选一个进而还可选择地包括一个用于标准化的雷帕霉素溶液和使用说明。这样一个试剂盒可以测定低于 10ng/ml 浓度的雷帕霉素，例如低于 1ng/ml，甚至低至 0.25-0.5 ng/ml。

本发明的抗体还可能具有对免疫抑制的子囊菌素（如 KF-506）相对结合亲和性的特征。FK-506 是一个具有免疫抑制作用的大环内酯，它与雷帕霉素在结合区有一定的结构相似性。雷帕霉素族（如雷帕霉素及其免疫抑制衍生物）和 FK-506 都可与嗜巨噬因子（FKBP）结合，对于两者，据信与嗜巨噬因子结合对其免疫抑制活性是一个必要的但不充分的条件。但是雷帕霉素的效应区与 FK-506 有很大的差别，而且确实这二个化合物具有完全不同的作用机理。（例如 FK-506 似乎主要通过抑制 IL-2 转录而引起免疫抑制作用，而雷帕霉素对 IL-2 转录没有明显的作用。）因此，雷帕霉素的特征可能是具有一个 FKBP 结合区和一个效应区，这样就可以将在 FKBP 结合区被修饰的雷帕霉素代谢产物和在效应区被修饰的雷帕霉素代谢产物区分开来，区分方法可通过用本发明的单克隆抗体测定本发明的单克隆抗体与 KF-506 的相对交叉反应性（例如用竞争性 ELISA 法测定交叉反应性）：具有高程度交叉反应性（例如大于 50%）的单克隆抗体可识别与 FK-506 类似的雷帕霉素 FKBP 结合区的抗原决定基。具有低程度交叉反应性（例如小于 20%，或者小于 10%）的单克隆抗体可识别雷帕霉素所特有的效应区的抗原决定基。

本发明的抗体还可以根据它们区分雷帕霉素和雷帕霉素的 40 -

氧衍生物（如前所述）的能力来筛选和鉴定。在此希望抗体不能识别雷伯霉素和雷伯霉素的 4-O-氧衍生物，可选择在雷伯霉素和其 4-O-氧衍生物间至少有 70%（最好大于 90%）交叉反应性的抗体。在这种情况下，用于制备单克隆抗体的半抗原最好是 4-O-氧活化的雷伯霉素，例如反应 I 中的式 III。在此希望抗体能识别雷伯霉素及其 4-O-氧衍生物或其代谢产物，可选择具有低于 30%（最好选低于 10%）的交叉反应性的抗体。这样，用于制备抗体的半抗原最好是 2,8-氧-活化的雷伯霉素或雷伯霉素衍生物，例如式 B。

实施例 1. 4-O-氧-活化的雷伯霉素的制备

a) 雷伯霉素的 4-O-氧-半琥珀酸酯的制备

向 1.5g (1.64 mmol) 雷伯霉素和 0.577g (5.77 mmol) 琥珀酐的 12 ml 吡啶的搅拌溶液中，加入 195 mg (1.64 mmol) DMAP。生成的混合物在环境温度下搅拌 19 小时，减压浓缩。剩余物溶于乙酸乙酯中，并用水洗涤 3 次。有机溶液用无水硫酸钠干燥、过滤并减压浓缩。剩余物用硅胶柱（9:1 CH_2Cl_2 -MeOH）层析纯化。收集含有产品的部分，并再次用硅胶柱层析（19:1 CH_2Cl_2 -MeOH）纯化。减压除去溶剂，得到 4-O-氧-（3-羧基）-丙酰基-雷伯霉素（即上述式 II' 所示的雷伯霉素半琥珀酸酯），为一白色泡沫状物质。有以下特征光谱学性质：

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 2.68 (7H, m, H33, H25 和 $\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 3.14 (3H, s 和 m, OCH_3 和 H39), 3.34 (3H, s, OCH_3), 3.38 (3H, s, OCH_3), 4.68 (1H, m, H40), 4.72 (1H, broad s, 10-OH); MS (FAB) m/z 1036 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), 982 ($[\text{M}-\text{CH}_3\text{O}]^+$), 964 ($[\text{M}-(\text{CH}_3\text{O}+\text{H}_2\text{O})]^+$), 946 ($[\text{M}-(\text{CH}_3\text{O}+2\text{H}_2\text{O})]^+$).

b) 40-氧-琥珀酰亚胺氧琥珀酰雷帕霉素的制备

向 120 mg (0.118 mmol) 雷帕霉素半琥珀酸酯 (步骤 a) 中的产物), 16.5 μ L (0.118 mmol) Et_3N 和 22.7 mg (0.118 mmol) EDC 的 8 mL CH_2Cl_2 的搅拌溶液中, 加入 13.6 mg (0.118 mmol) N-羧基琥珀酰亚胺。生成的混合物在室温下搅拌 18 小时, 用乙酸乙酯稀释, 用水洗涤 2 次。有机溶液用无水硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩。用硅胶柱层析 (乙酸乙酯) 纯化剩余物, 得到 40-氧-琥珀酰亚胺氧琥珀酰-雷帕霉素 (即反应 II 中的式 III'), 为一白色泡沫状物质, 有以下特征光谱学性质:

$^1\text{H NMR}$ (DMSO) δ 2.67 (2H, t, $\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2$), 2.81 (7H, s, CH_3O 和琥珀酰亚胺 CH_2), 2.92 (2H, t, $\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2$), 4.55 (1H, m, H40), 5.26 (1H, d, 28-OH), 6.43 (1H, s, 10-OH); MS (FAB) m/z 1133 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), 1111 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 1092 ($[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$), 1079 ($[\text{M}-\text{CH}_3\text{O}]^+$), 1061 ($[\text{M}-(\text{CH}_3\text{O}+\text{H}_2\text{O})]^+$), 1043 ($[\text{M}-(\text{CH}_3\text{O}+2\text{H}_2\text{O})]^+$).

实施例 2. 雷帕霉素的 28-氧-活化的 40-氧衍生物的制备

a) 40-氧-(2-羧乙基)-雷帕霉素的 28-氧-半琥珀酸酯

向搅拌和冷却 (0°C) 的 958 mg (1.00 mmol) 40-氧-(2-羧乙基)-雷帕霉素的 2.2 mL 10:1 二氯甲烷-吡啶溶液中加入 0.160 mL (1.50 mmol) 烯丙基氯甲酸酯。在 0°C 继续搅拌, 将 1 份 0.080 mL (1.00 mmol) 吡啶和 1 份 0.053 mL (0.50 mmol) 烯丙基氯甲酸酯分别于反应 3 小时后和 4 小时后加入。待全部加完后继续搅拌 1 个多小时, 用 1 M 碳酸氢钠水溶液终止反应。反应混合物用乙酸乙酯提取 3 次。有机溶液依次用 1 N 盐酸水溶液, 1 N 碳酸氢钠水

溶液和饱和食盐水洗涤，然后用无水硫酸钠干燥，减压过滤、浓缩。剩余物用硅胶柱层析（50 : 50 己烷 - 乙酸乙酯）纯化，得到烯丙氧羰基 - 被保护的化合物（如反应Ⅲ中式 2 所示），为一白色泡沫状物质。

向冷却（0℃）和搅拌的 208 mg（0.200 mmol）上述产物的 2ml 二氯甲烷溶液中，加入 2.4 mg（0.020 mmol）DMAP 和 82 mg（0.400 mmol）DCC，随后加入 63 mg（0.400 mmol）单烯丙基琥珀酸酯的 0.5 ml 二氯甲烷溶液。反应混合物在 0℃ 搅拌 14 小时，生成的悬浮液用多孔玻璃漏斗过滤，有机溶液经减压浓缩，剩余物用硅胶柱层析（30 : 70 己烷 - 乙酸乙酯）纯化，得到一白色泡沫状产物（如反应Ⅲ中式 3 所示）。

向 177 mg（0.150 mmol）上述产物的 5ml 二氯甲烷的搅拌溶液中加入 17.3 mg（0.015 mmol）四（三苯膦）钯和 0.08 mL（0.3 mmol）氢化三丁基锡。该黄色溶液在环境温度下搅拌 2 小时，用乙酸乙酯稀释，用 2 N 冷的柠檬酸水溶液洗涤 1 次，用饱和食盐水洗涤 3 次，用无水硫酸钠干燥，过滤，减压，浓缩。用硅胶柱层析（85 : 15 乙酸乙酯 - 甲醇）纯化，得到半琥珀酸酯（如反应Ⅲ中式 4 所示），为浅黄色油状物质。

b) 28 - 氧 - 琥珀酰亚胺基氧琥珀酰基 - 40 - 氧 - (2 - 羟乙基) - 雷帕霉素

将 53 mg（0.050 mmol）上述步骤 a) 的产物半琥珀酸酯的 2.5 mL 二氯甲烷溶液用 2 mg DMAP，24 mg（0.125 mmol）EDC 和 14 mg（0.125 mmol）N - 羟基琥珀酰亚胺处理。在环境温度下搅拌 2 小时之后，用 1 N 碳酸氢钠水溶液终止反应。用 3 份乙酸乙酯提取混合物。

有机溶液用碳酸氢钠水溶液和盐水洗涤，再用无水碳酸氢钠干燥，过滤，浓缩，得到标题活化的半抗原（如反应Ⅲ中式5所示化合物），它不用再纯化就可用于制备蛋白-半抗原复合物。它有以下特征光谱学性质：

^1H NMR (CDCl_3) δ 2.43 (1H, dd, H33a), 2.50-2.98 (10H, m, H25, H33b, 琥珀酸酯的氢, 琥珀酰亚胺的氢), 3.58 (2H, m, H6b, 1-羟乙基的氢), 3.68 (3H, m, H16, 2-羟乙基的氢), 3.81 (2H, m, H14, 1-羟乙基的氢), 3.93 (1H, d, H27), 5.28 (2H, m, H2, H30), 5.34 (1H, d, H28); MS (FAB) 1161 ($[\text{M}+\text{Li}]^+$).

实施例3. 28-氧活化的雷帕霉素的制备

a) 雷帕霉素的28-氧半琥珀酸酯

向搅拌、冷却（0℃）的 914 mg (1.00 mmol) 雷帕霉素的 2.2 mL 10 : 1 二氯甲烷-吡啶溶液中加入 0.212 mL (2.00 mmol) 烯丙基氯甲酸酯。3小时后加入 0.080 mL (1.000 mmol) 吡啶和 0.053 mL (0.50 mmol) 烯丙基氯甲酸酯。继续搅拌1个多小时，用1 M 碳酸氢钠水溶液中止反应。反应混合物用甲基-t-丁基醚提取3次。有机溶液依次用1 N 冷的盐酸水溶液，1 N 碳酸氢钠水溶液和饱和食盐水洗涤，用无水硫酸钠干燥，过滤，减压浓缩。剩余物用硅胶柱层析（70 : 30（正）己烷-乙酸乙酯）纯化，得到烯丙氧基羧基保护的化合物（反应Ⅳ中式2所示），为白色泡沫状物质。

向冷却（0℃）和搅拌的 400mg (0.400 mmol) 上述产物的 5mL 二氯甲烷溶液中加入 4.8 mg (0.040 mmol) DMAP 和 164 mg (0.800 mmol) DCC，再加入 127 mg (0.800 mmol) 单烯丙基琥珀酸酯的 1mL 二氯甲烷溶液。反应混合物在-15℃搅拌14小时，生成的悬浮液

用多孔玻璃漏斗过滤。有机溶液减压浓缩后，剩余物用硅胶柱层析（40 : 60 己烷-甲基-t-丁基醚）纯化，得到反应IV中式3化合物，为-白色泡沫状物质。

向 285 mg (0.250 mmol) 上述产物的 5 ml 二氯甲烷的搅拌溶液中加入 28.8 mg (0.025 mmol) 四(三苯膦)钯和 0.133 mL (0.5 mmol) 氢化三丁基锡。该黄色溶液在环境温度下搅拌 1 小时，用甲基-t-丁基醚稀释，用 2 N 冷的柠檬酸水溶液洗涤 2 次，用饱和食盐水洗涤 3 次，用无水硫酸钠干燥、过滤、减压浓缩。用硅胶柱层析（90 : 10 至 60 : 40 甲基-t-丁基醚-甲醇）纯化，得到 28-氧雷帕霉素半琥珀酸酯（反应IV中式4所示化合物，为-浅黄色油状物质。

b) 28-氧-琥珀酰亚胺氧琥珀酰基-雷帕霉素

将 51 mg (0.050 mmol) 上述步骤 a 产物的 2 ml 二氯甲烷溶液用 2 mg DMAP, 24 mg (0.125 mmol) EDC 和 14 mg (0.125 mmol) N-羧基琥珀酰亚胺处理。在环境温度下搅拌 4 小时，用 1 N 碳酸氢钠水溶液中止反应。用 3 份甲基-t-丁基醚提取混合物，有机溶液依次用碳酸氢钠水溶液和食盐水洗涤，用无水碳酸氢钠干燥，过滤，浓缩，得到活化的标题化合物，它不用再纯化就可用于制备蛋白-半抗原轭合物，它有以下特征光谱学性质：

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 2.43 (1H, dd, H33a), 2.55-3.02 (11H, m, H25, H33b, H39, 琥珀酸酯的氢, 琥珀酰亚胺的氢), 3.56 (1H, m, H6b), 3.68 (1H, dd, H16), 3.83 (1H, m, H14), 3.93 (1H, d, H27), 5.28 (2H, m, H2, H30), 5.34 (1H, d, H28); MS (FAB) 1117 ($[\text{M}+\text{Li}]^+$).

实施例4. 致免疫鞭合物的制备

a) 40-氧连接的雷帕霉素鞭合物

将 17.4 mg 实施例1中40-氧-活化的雷帕霉素溶于 400 μ l DMF 或 DMSO 中。将此溶液 120 μ l (即含 5.22 mg 活化的雷帕霉素) 在剧烈搅拌下滴入含有 8 mg KLH 的 2ml 0.1 M NaHCO₃ 缓冲液 (PH 7.7) 的溶液中。反应混合物在室温下搅拌 2 小时。将所得的雷帕霉素-KLH 鞭合物在 4 °C 时对 5l PBS 透析 48 小时以上, 换液 3 次, 使之纯化。鞭合物用微型浓缩试管通过离心进一步随意浓缩。雷帕霉素-BSA 和雷帕霉素-OVA 鞭合物可用同样的方法制备, 只需分别用 BSA 或 OVA 代替上述方法中的 KLH。

b) 28-氧-连接的 (任选 40-氧-烷基化的) 雷帕霉素鞭合物

将 5 mg 实施例2中28-氧-活化的化合物溶于 2ml DMSO 中, 并在剧烈搅拌下滴加到含有 5 mg KLH 的 1ml 50 mM 磷酸缓冲液 (pH 7.3) 中。反应混合物在室温下搅拌 2 小时。将所得鞭合物通过在 4 °C 下对 2l PBS 透析 48 小时以上, 换液 3 次, 使之纯化。与 BSA 的鞭合物和 OVA 鞭合物可用同样的方法制备。用实施例3中28-氧活化的化合物按同样的方法, 可使雷帕霉素通过第28位置与 KLH, BSA 和 OVA 鞭合。

实施例5. 单克隆抗体的制备

a) 雷帕霉素的单克隆抗体

单克隆抗体可用常规技术制备, 基本上按照 Köhler 和 Milstein 在 Nature 256 : 49 中的叙述。每只雌性 Balb/C 小白鼠 (20-25g) 各给予 10 或 50 μ g 用 0.2 ml 弗罗因德氏完全佐剂配制的实施例4

a) 的 40-氧-连接的雷帕霉素-KLH 致免疫鞭合物, 给药途径为在 4 个部位作皮下注射给药。二周后作第二次强化注射, 给予用 0.2 ml 弗罗因德氏完全佐剂乳化的、含有同样剂量致免疫鞭合物, 再次同样作皮下注射。可用下述实施例 6 中所述的直接 ELISA 法检测动物血清中是否出现了对抗原产生反应的抗体。对小鼠随意作进一步选择, 以获得对效应区的抗体 (与 FK-506 有低交叉反应性) 和对 FKBP 结合区的抗体 (与 FK-506 有高交叉反应性)。例如图 1 表示了二只小白鼠的抗体滴定曲线: 小鼠 (M_1) 对雷帕霉素的结合区具有了高水平的抗体, 另一只小鼠 (M_7) 对效应区具有较高水平的抗体。对表现出相当特异性最大血清抗体水平的小鼠给予强化注射: 每次 $10\text{ }\mu\text{g}$ 抗原, 在倒数第 3 天注射 (其中一半腹膜内注射另一半静脉内注射), 在倒数第 2 天和第 1 天腹膜内再注射一次。最后一天小鼠被处死, 分离其脾细胞并与 PAI-0 细胞或其它适合的骨髓瘤细胞系融合。培养产生的杂交瘤细胞, 并用 ELISA 法挑选出对雷帕霉素有高亲和性抗体的细胞。

b) 40-(羟乙基)-雷帕霉素的单克隆抗体

雌性 Balb/C 小鼠给予用 0.2 ml 弗罗因德氏完全佐剂配制的 10 或 $50\text{ }\mu\text{g}$ 40-(羟乙基)-雷帕霉素 KLH 致免疫鞭合物 (实施例 4 b)), 在 4 个部位作皮下注射。二周后, 以同样剂量的致免疫鞭合物用 0.2 ml 弗罗因德氏完全佐剂乳化后对鼠作第 2 次皮下注射 (强化注射)。用下述的直接 ELISA 法检测对抗原反应的抗体是否已在动物血清中出现。另外, 可对小鼠作进一步选择, 以获得针对雷帕霉素分子区域的抗体, 该分子已在 40-氧区内通过连接一个 BSA 雷帕霉素鞭合物而进行了修饰, 并与连接一个 BSA-40

- 氧 - (2 - 羟乙基) - 雷帕霉素甙合物相比较。得到了二种抗体, 其中一种只与 40 - 氧 - (2 - 羟乙基) - 雷帕霉素甙合物相结合但不与已甙合的雷帕霉素相结合, 另一种抗体既与 40 - 氧 - (2 - 羟乙基) - 雷帕霉素相结合又与雷帕霉素甙合物结合。对出现相当特异性的最大血清抗体含量的小鼠给予强化注射, 每次注射 $10 \mu\text{g}$ 抗原, 在倒数第 3 天注射 (其中一半腹膜内注射, 另一半静脉内注射, 在倒数第 2 天和第 1 天腹膜内再注射一次)。最后一天将小鼠处死, 分离其脾细胞并与 PAI-0 细胞融合。培养所得到的杂交瘤细胞并用 ELISA 法进行选择, 得到对 40 - 氧 - (2 - 羟乙基) - 雷帕霉素具有高亲和力的抗体。

实施例 6 . 酶联免疫吸附测定法 (ELISA)

a) 雷帕霉素的 BLISA 法

于 37°C , 将微量滴定板用在 PBS 中的 $1-2 \mu\text{g/ml}$ 雷帕霉素 - BSA 甙合物包被 2 小时, 然后在 37°C 用含 2% BSA 的 PBS 将其饱和 1 小时, 并用 0.05% Tween - PBS 洗涤 3 次。将被筛选的杂交瘤细胞上清液用含 1% BSA 的 PBS 溶液稀释, 室温下培育过夜 (或 4°C 18 小时或 37°C 2 小时)。用以碱性磷酸酶偶联的抗小鼠 IgG 羊球蛋白来测定被结合抗体的量, 以对 - 硝基苯基磷酸盐作为底物。 37°C 时培育 2 小时后, 酶的底物被水解 (在室温 1 小时)、在 405 nm 处测光吸收值。挑选出产生高亲和力单克隆抗体的杂交瘤细胞。

用含已知浓度雷帕霉素的溶液 (如在血清中 $1-140 \text{ ng/ml}$) 来制作测定某一选择抗体与雷帕霉素相对亲合性的标准曲线。例如图 2 表示单克隆抗体 M7-91 的标准曲线, 它证明被选择对雷帕霉素有较高

专一性的单克隆抗体能够检测出低至 0.25 ng/ml 水平的雷帕霉素。

通过测定抗体与 FK-506 的交叉反应性可以进一步明确抗体的如下特征：它能与雷帕霉素的效应区或 FKBP 结合区相结合，即用一个类似的直接 ELISA 测定法用 FK506-BSA 轭合物包被微量滴定板，而该轭合物的制备方法与雷帕霉素-BSA 轭合物制备方法类似。例如在图 3 中比较了 17 种经选择的单克隆抗体对雷帕霉素-BSA 和 FK-506 的测定，图 4 表示了交叉反应性的百分率。可见在比较对雷帕霉素-BSA 和 FK506-BSA 的结合中，可检测出有极低亲合性的单克隆抗体。

上述直接 ELISA 测定法可以转化为竞争性 ELISA 测定法：只需将一个竞争物加到单克隆抗体溶液中，分别测定在加有竞争物和未加竞争物时单克隆抗体与轭合物的结合程度。在此竞争物为 FK506 或雷帕霉素，将竞争物的乙醇溶液如 (1mg/ml) 直接加入单克隆抗体溶液中（如，2 μ l/200 μ l/孔），并在微量滴定板中将其进一步稀释。例如在图 5 中给出了一条抑制曲线，显示在有不同浓度游离雷帕霉素存在时，M7-91 抗体 (M7.91.13) 对 BSA-雷帕霉素的结合作用。与直接 ELISA 测定法相比，在这种竞争性 ELISA 测定中比较单克隆抗体对游离的雷帕霉素以及对游离的 FK506 的结合作用，可见在雷帕霉素与 FK506 之间仅有很低的交叉反应性。这种竞争性测定法在用于选择单克隆抗体时是较好的，因为据信在溶液中游离状态下一些单克隆抗体可能由于亲和力太低，以至于往往不能与抗原相结合，但这些抗体仍然显示对多价抗原有二价或多价结合，这种抗原含有许多半抗原，它们在一个大的蛋白质分子上彼此紧密结合。竞争性测定法可排除这种低亲合性抗体。图 6 显示了这种竞争性测定法的结果：将

具有较低交叉反应性的 M7-91 抗体 (M7.91.13) 与具有较高交叉反应性的 M1-303 (M1.303.3) 抗体进行了比较。

b) 40-氧-(2-羟乙基)-雷帕霉素的 ELISA 测定法

该 ELISA 测定法与 a) 中所述的程序相似。用 40-氧-(2-羟乙基)-雷帕霉素-BSA 包被微量滴定板, 用 BSA 饱和并洗涤。需筛选的杂交瘤细胞上清液在 4℃ 培育 18 小时或 37℃ 时培育 2 小时。用以碱性磷酸酶偶联的抗小鼠 IgG 羊球蛋白来测定被结合抗体的量, 以对-硝基苯基磷酸盐作底物。用结合的雷帕霉素-BSA 作平行 ELISA 测定, 用以选择能区别雷帕霉素和 40-氧-(2-羟乙基)-雷帕霉素的单克隆抗体。如图 7 所示, 杂交瘤细胞 B3-203 的上清液可选择性地结合于 40-氧-(2-羟乙基)-雷帕霉素-BSA (在图中被标为 BSA-28-RAD) (图 7 A), 杂交瘤细胞 B3-113 的上清液能识别 40-氧-(2-羟乙基)-雷帕霉素-BSA 和由第 28 位置共轭结合的雷帕霉素-BSA (图 7 B), 杂交瘤细胞 B3-164 的上清液还能识别由第 40 位置与 BSA 偶合的雷帕霉素 (图 7 C)。

抗体对 40-氧-(2-羟乙基)-雷帕霉素和对雷帕霉素的相对亲合性, 还可由下述方法进一步测定: 即通过对已包被的 40-氧-(2-羟乙基)-雷帕霉素-BSA 复合物和对溶液中游离的 40-氧-(2-羟乙基)-雷帕霉素或雷帕霉素的竞争性的结合来测定。如图 8 表明, 由杂交瘤细胞 B3-203 产生的抗体对 40-氧-(2-羟乙基)-雷帕霉素具有很强的反应, 而对雷帕霉素只有弱交叉反应性 (图 8 A), 由杂交瘤细胞 B3-113 和 B3-164 产生的抗体对 40-氧-(2-羟乙基)-雷帕霉素和雷帕霉素有同样较强的结合活性

(图 8 B 和 8 C)。其它杂交瘤细胞，包括 B3-22, B3-127 和 B3-156 产生的抗体，对 4-O-（2-羟乙基）-雷帕霉素的结合作用比对雷帕霉素的结合作用至少强 10 - 100 - 倍。另几株杂交瘤细胞 B3-29, B3-265 和 B3-539 产生的抗体对 4-O-（2-羟乙基）-雷帕霉素和雷帕霉素的亲和力相同。

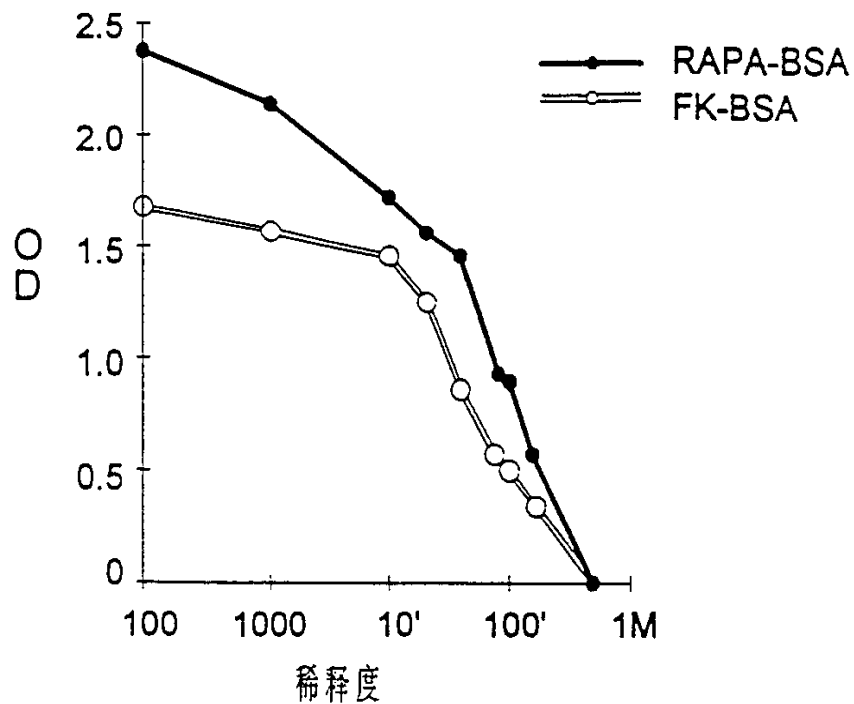
一旦所希望的抗体被选出，相同的 ELISA 测定法可用于测定病人血液中的雷帕霉素浓度。按照本实施例制得的检测试剂盒将提供下列试剂：一个或多个被选用的抗体（冷冻干燥形式）一块以雷帕霉素衍生物（如雷帕霉素-BSA 衍生物和 4-O-（2-羟乙基）-雷帕霉素-BSA 衍生物）包被的微量滴定板，一份雷帕霉素标准和使用说明。本试剂盒还包括一个供选用的标记的雷帕霉素衍生物以用于竞争性测定，还可以另外提供上述的抗鼠 IgG-酶衍生物和底物。客户也可以将本发明的抗体用于他们自己建立的 ELISA 测定或其它测定系统。

说明书附图

图 1

小鼠 M 1 滴定曲线 (RAPA/FK)

OVA - 靶抗原



小鼠 M 7 滴定曲线 (RAPA/FK)

KLH - 靶抗原

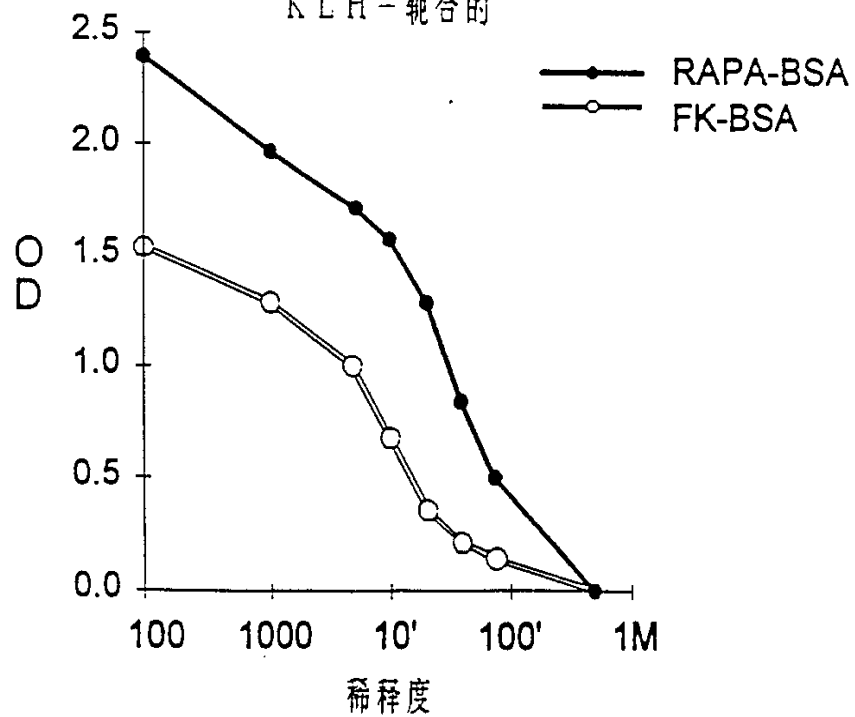


图 2

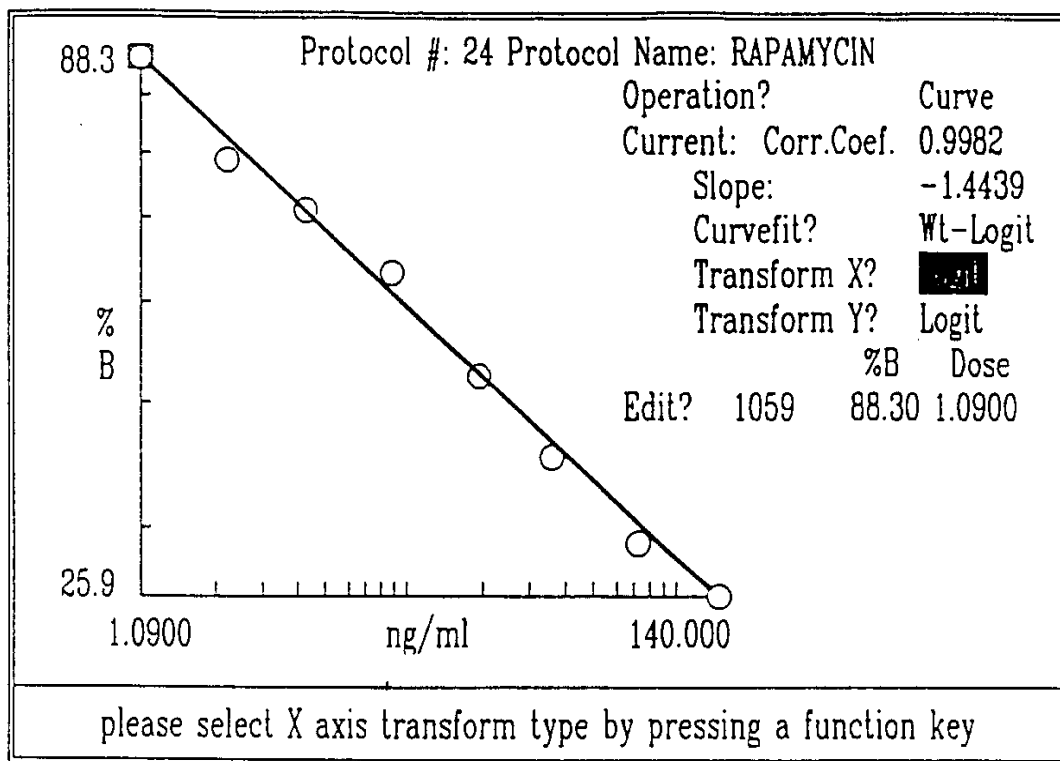


图 3

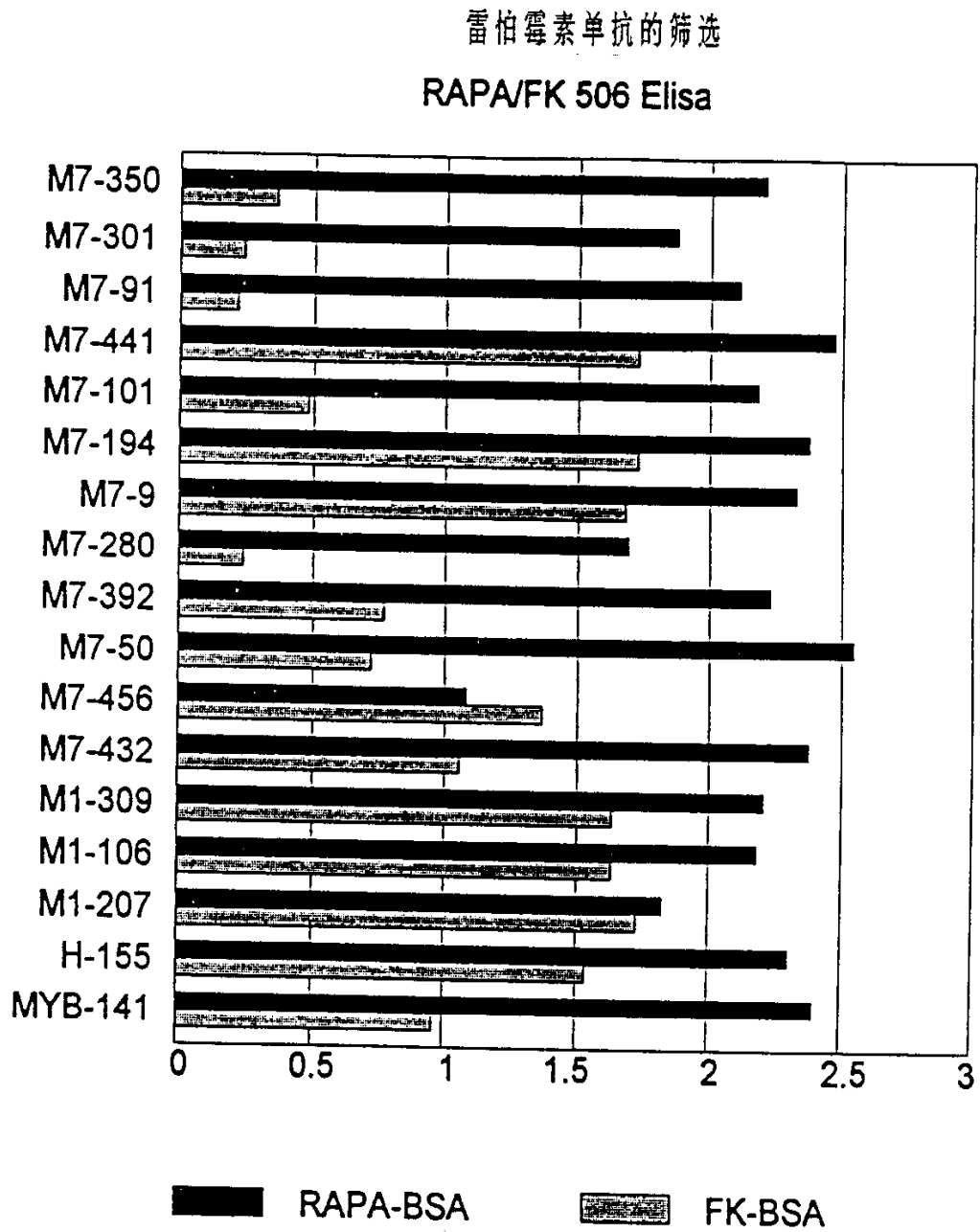


图 4

雷帕霉素单抗的筛选
RAPA/FK 506 Elisa

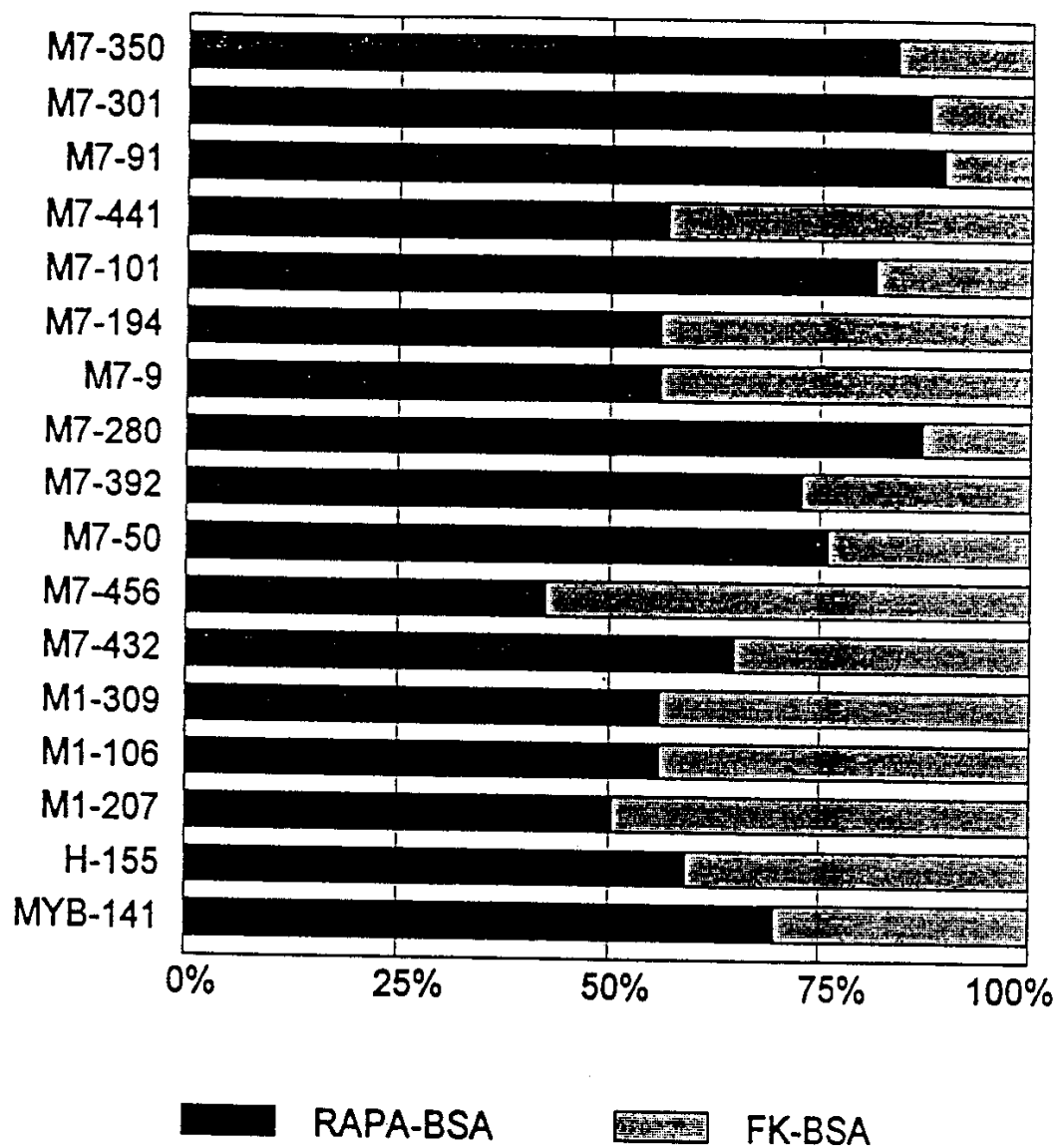


图 5

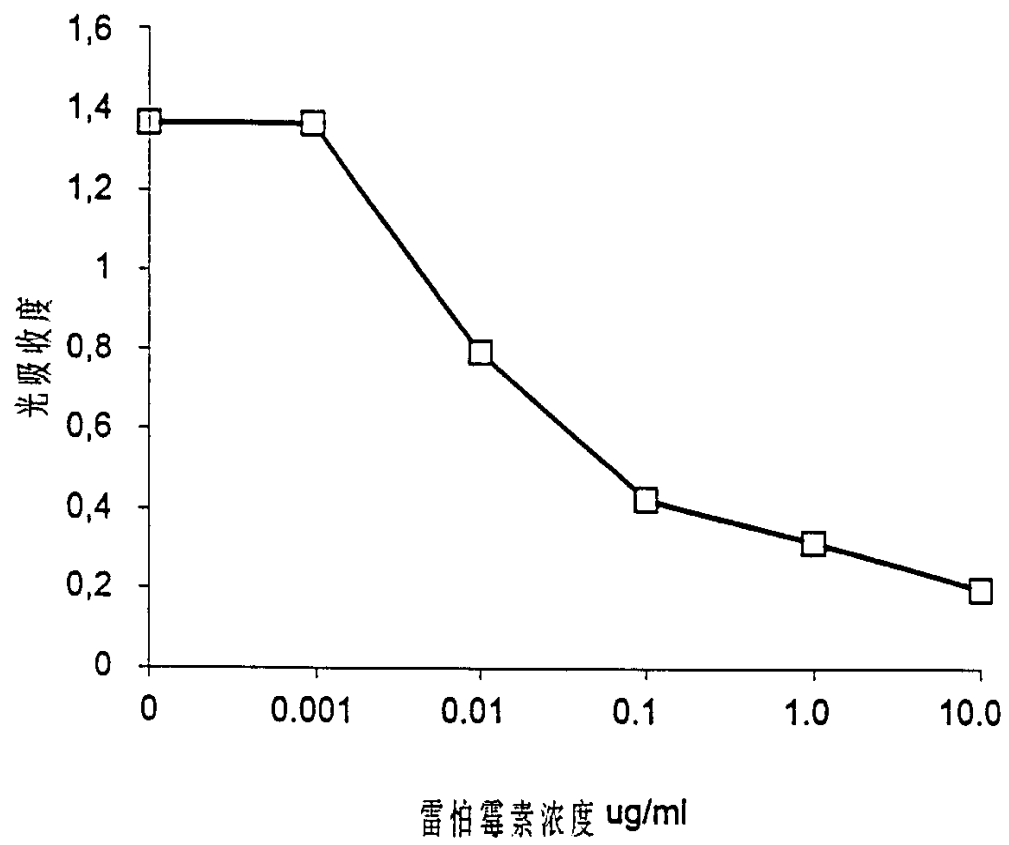
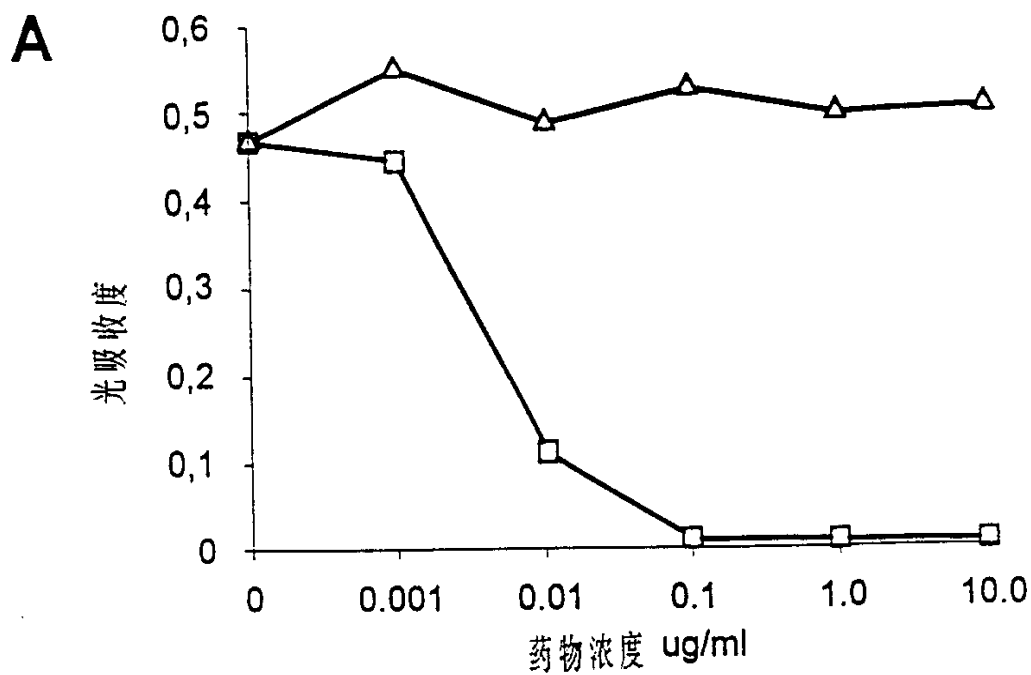


图 6: 在竞争 ELISA 法中单抗对雷
帕霉素 和 F K 506 的特异性的比较

MAb M7.91.13



MAb M1.303.3

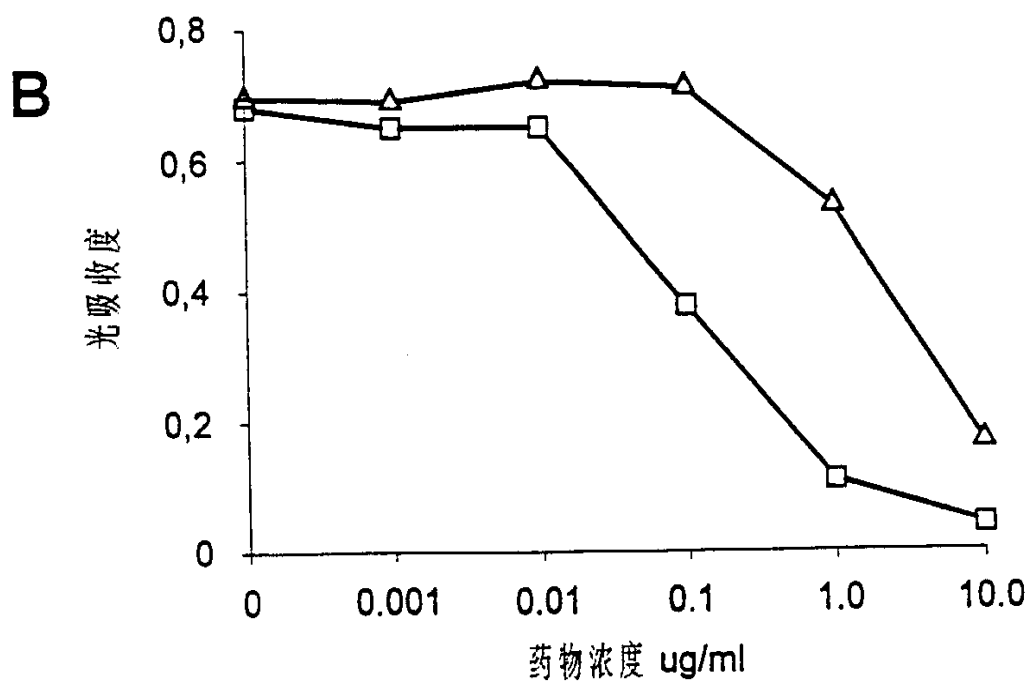


图 7

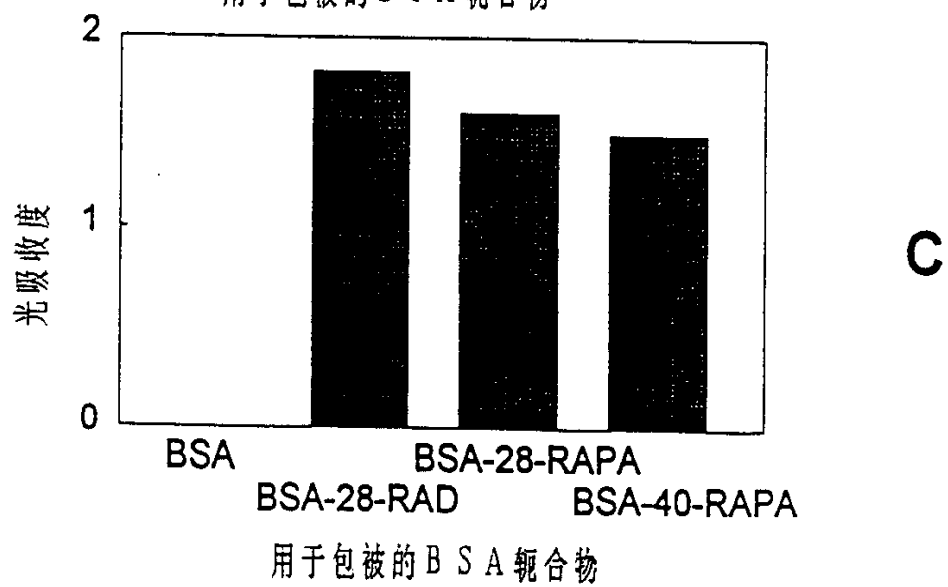
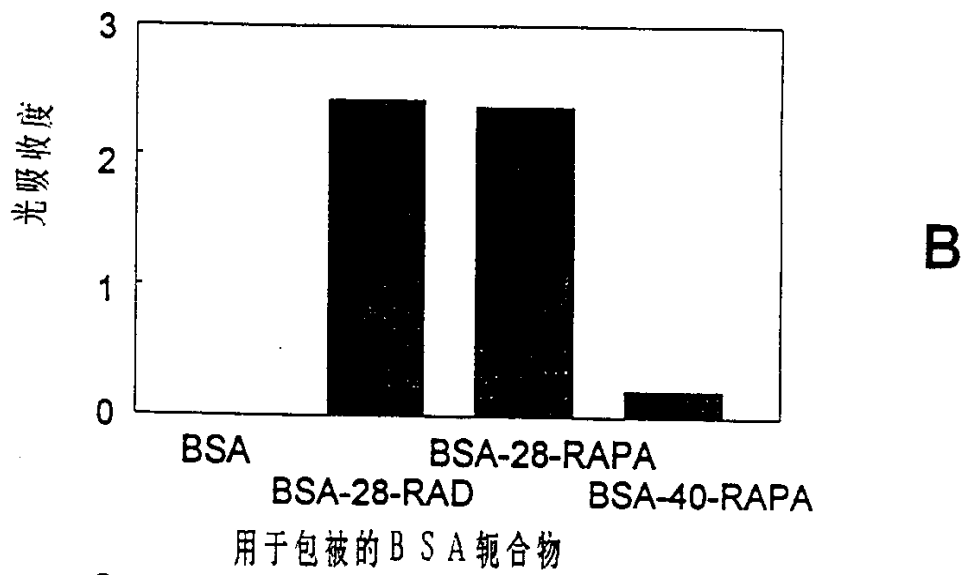
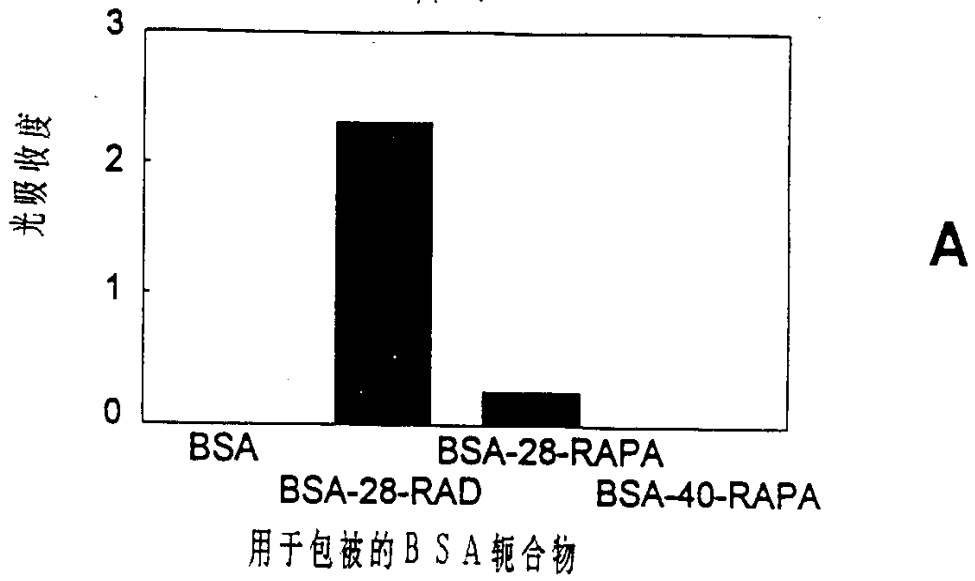
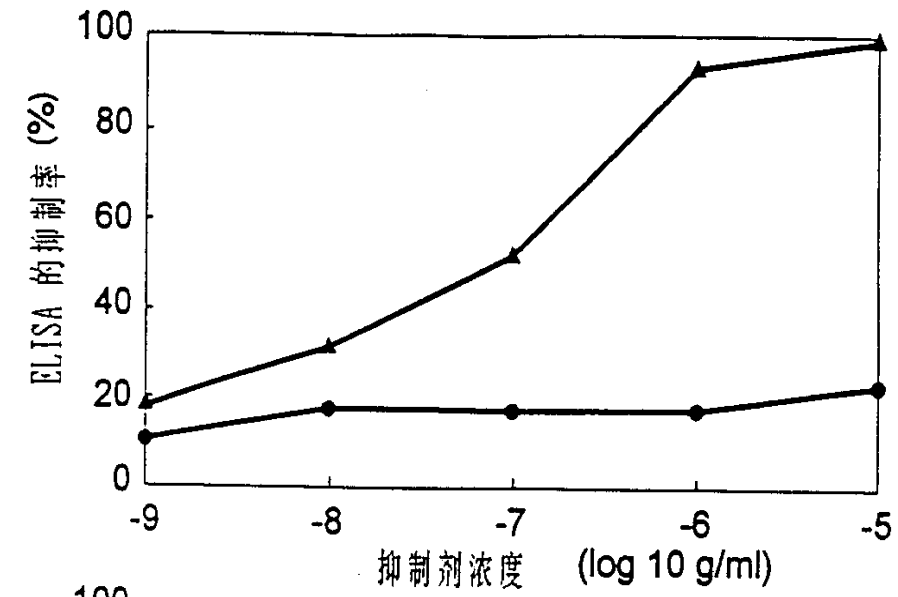
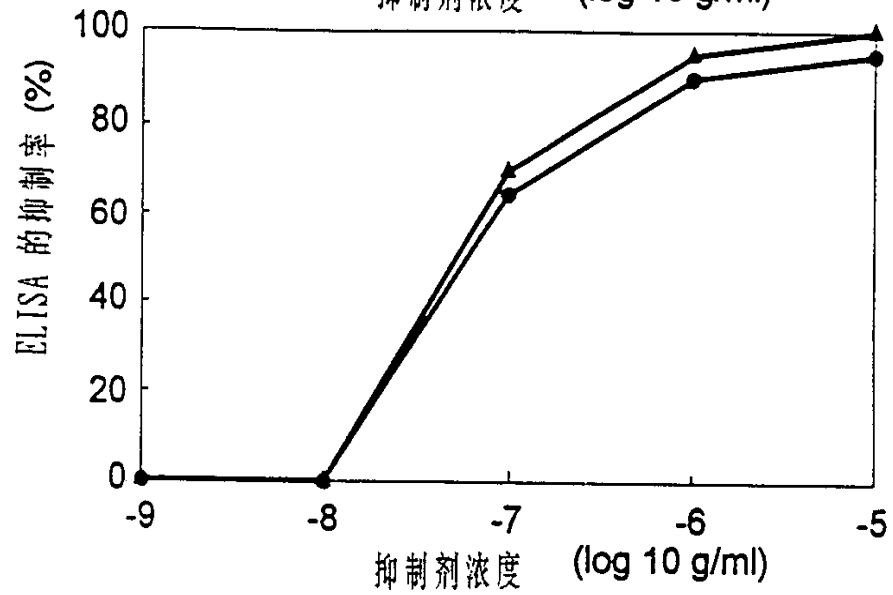


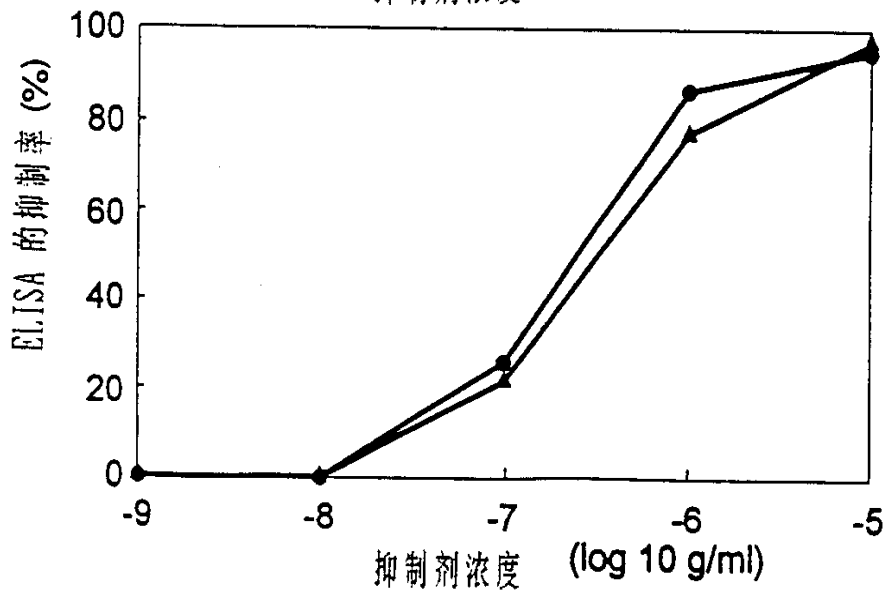
图 8



A



B



C