



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 109824673 A

(43)申请公布日 2019.05.31

(21)申请号 201910070891.0

(22)申请日 2019.01.25

(71)申请人 杭州同舟生物技术有限公司

地址 310018 浙江省杭州市经济技术开发区
白杨街道银海街550号2幢第二层B
区

(72)发明人 邵越水 王镇

(74)专利代理机构 杭州千克知识产权代理有限公司 33246

代理人 黎双华

(51)Int.Cl.

C07D 487/04(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书2页 说明书10页 附图10页

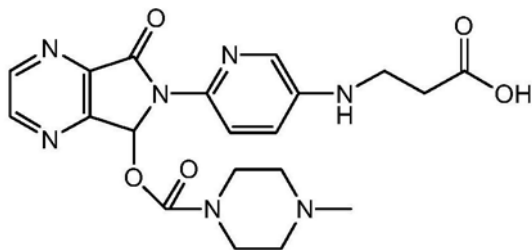
(54)发明名称

一种佐匹克隆人工半抗原、人工抗原及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种佐匹克隆人工半抗原、人工抗原及其制备方法和应用。佐匹克隆人工半抗原的分子结构式如式(I)，佐匹克隆人工抗原的分子结构式如式(II)。所述应用是所述佐匹克隆人工抗原在制备抗佐匹克隆抗体中的应用。本发明的佐匹克隆人工半抗原最大程度地保留了佐匹克隆的特征结构，且具有可以与载体蛋白发生偶联的活性基团，可作为抗原决定簇；进一步制备获得的佐匹克隆人工抗原可免疫获得亲和力高、灵敏度高、特异性强的抗佐匹克隆抗体，经免疫新西兰白兔获得的免疫血清的效价高达1:70000，可用于对佐匹克隆进行快速、准确的免疫检测和免疫分析。

1. 一种佐匹克隆人工半抗原,其特征在于,其分子结构式如(I)所示:



(I)。

2. 如权利要求1所述佐匹克隆人工半抗原的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将6-(5-氨基-2-吡啶基)-6,7-二氢-7-羟基-5H-吡咯并[3,4-b]吡嗪-5-酮与二碳酸二叔丁酯和碳酸氢钠按摩尔比1:1~1.1:1混合,加入体积比为4:1的四氢呋喃和水的混合溶液,室温下搅拌反应2~3小时,反应结束,将溶剂减压蒸干,加入一定量的水,用1N的盐酸调pH=3,再用乙酸乙酯萃取,收集有机相,干燥过滤减压蒸干得淡黄色油状产物A;

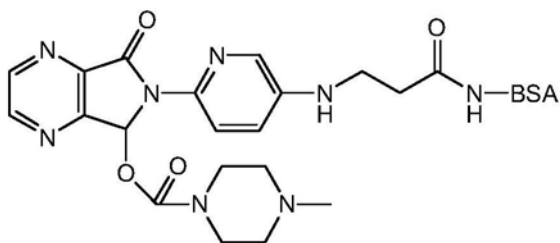
(2) 将淡黄色油状产物A、4-甲基-1-哌嗪甲酰氯盐酸盐按摩尔比1:1.5~2.0混合,加入吡啶溶解,在-10℃冰浴中搅拌反应3小时,然后缓慢升温至室温,减压蒸干溶剂,倒入冰水,静置析出固体,过滤,烘干得灰白色固体B;

(3) 将灰白色固体B溶于体积比为1:1的三氟乙酸和二氯甲烷的混合溶液,室温下搅拌反应16小时,结束反应,减压蒸干溶剂,加入10%的碳酸钾溶液,用6N的盐酸调pH=6,用二氯甲烷洗涤两次,收集水相用1N的氢氧化钠调pH=10,再用二氯甲烷萃取,收集有机相,干燥、过滤、减压蒸干得黄色油状物C;

(4) 将黄色油状物C溶于无水乙醇中,置于0℃冰水浴中,再加入乙醇钠和丙烯酸叔丁酯,室温下搅拌反应18小时,结束反应,减压蒸干溶剂,加入水溶解,用乙酸乙酯萃取,收集有机相,再分别用纯化水和饱和的食盐水洗涤,取有机相干燥、过滤、减压蒸干得棕色油状物D;

(5) 将棕色油状物D溶于体积比为1:1的三氟乙酸和二氯甲烷的混合溶液,室温下搅拌反应16小时,结束反应,减压蒸干溶剂,加入双蒸水,加入碳酸钠固体至没有气泡为止,用6N的盐酸调pH=6,用二氯甲烷洗涤两次,收集水相用1N的氢氧化钠调pH=10,再用二氯甲烷萃取,收集有机相,干燥、过滤、减压蒸干得棕色油状物I,即权利要求1所述的佐匹克隆人工半抗原。

3. 一种佐匹克隆人工抗原,其特征在于,其分子结构式如(II)所示:



(II)

式(II)中,BSA为牛血清蛋白。

4. 权利要求3所述佐匹克隆人工抗原的制备方法,其特征在于,所述佐匹克隆人工抗原

通过活泼酯法使权利要求1所述的佐匹克隆人工半抗原与牛血清蛋白结合,获得佐匹克隆人工抗原。

5.如权利要求4所述佐匹克隆人工抗原的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(a) 将权利要求1所述佐匹克隆人工半抗原、N-羟基琥珀酰亚胺、二环己基碳二亚胺按摩尔比1:1.35~1.5:1.35~1.5混合于N,N-二甲基甲酰胺中,20~30℃下搅拌反应18小时,反应结束后离心取上清液;

(b) 将上述上清液滴加到牛血清蛋白溶液中,混合液置于4℃下静置过夜,经透析、离心取上清,获得佐匹克隆人工抗原。

6.如权利要求5所述佐匹克隆人工抗原的制备方法,其特征在于,步骤(b)中,所述牛血清蛋白溶液的浓度为5mg/mL,上清液与牛血清蛋白溶液的体积比为1:5。

7.权利要求3所述佐匹克隆人工抗原在制备抗佐匹克隆抗体中的应用。

8.一种抗佐匹克隆抗体,其特征在于,是由权利要求3所述佐匹克隆人工抗原经动物免疫得到的、可与佐匹克隆发生特异性免疫反应的球蛋白。

9.权利要求8所述抗佐匹克隆抗体在检测佐匹克隆中的应用。

一种佐匹克隆人工半抗原、人工抗原及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物化工技术领域,具体涉及一种佐匹克隆人工半抗原、人工抗原及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 佐匹克隆(Zopiclone)作为第三代镇静催眠药物,它既能够缩短睡眠潜伏期、增加慢波睡眠、延长睡眠时间、提高睡眠质量以及睡眠深度、减少夜间觉醒和早醒次数,又不会引起精神运动性障碍。佐匹克隆具有抗焦虑、抗肌肉松弛和抗惊厥等作用,次日晨时残余作用低,清醒后无宿醉反应,可用于各种原因引起的失眠,尤其适用于入睡困难和睡眠维持困难的患者。本品口服吸收快,半衰期为3.5~5小时,连续多次给药无蓄积作用;具有高效、低毒、成瘾性小的特点。

[0003] 然而经调查报告显示,服用佐匹克隆也会伴随着一定的不良现象,比如服药当夜会对患者造成不同程度的记忆损伤、运动损伤和行为损伤、次日思睡、次日神运动性损害、不同程度的药物依赖和滥用、口苦、急性间质性肾炎、致畸、乳汁中含量太高和中毒等。

[0004] 目前,对佐匹克隆的检测主要依靠高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱法(GC)、薄层色谱法(TLC)、质谱法(MS)等,但是存在仪器昂贵,检测费时,并且需要专业技术人员进行操作,不能达到现代检测对快速、准确的要求。因此建立快速、灵敏、准确的检测技术是很有必要的。

[0005] 免疫分析法可以弥补以上所有缺点,免疫分析法是一种利用抗原抗体特异性结合反应检测各种物质(药物、激素、蛋白质、微生物等)的分析方法,建立小分子化合物的免疫分析方法的关键是能够制造出对小分子化合物具有高亲和力和高特异性的抗体。但是,由于包括佐匹克隆在内的大多数小分子化合物(分子量小于1000),不具有免疫原性,即缺乏T细胞表位而无法直接诱导动物机体产生特异性抗体,故小分子物质被称为半抗原。通过适当的化学修饰,在半抗原分子结构的某个位置上带上端部为活性基团的连接臂,再与大分子载体结合,生成半抗原-载体偶联物(即人工抗原),人工抗原可以借助T细胞表位来间接诱导B细胞的增殖和分化,继而产生特异性抗体。

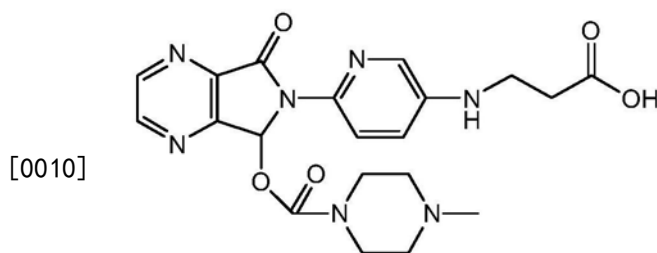
[0006] 现有技术中还未有佐匹克隆人工半抗原、人工抗原的相关报道。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于克服现有技术中存在的缺陷与不足,提供一种佐匹克隆-牛血清蛋白人工抗原的制备方法,所制备的佐匹克隆-牛血清蛋白人工抗原可进行动物免疫,取得相应的佐匹克隆抗体,可用于各种佐匹克隆类免疫分析法的研究,为佐匹克隆的检测提供更加方便快捷准确的途径。

[0008] 本发明首先提供了一佐匹克隆人工半抗原,该佐匹克隆人工半抗原最大程度的保留了佐匹克隆的特征结构,且具有可以与载体蛋白发生偶联的活性基团,可作为抗原决定簇。

[0009] 一种佐匹克隆人工半抗原,其分子结构式如(I)所示:



[0011] 本发明公开了一种佐匹克隆人工半抗原的制备方法,该方法包括以下步骤:

[0012] (1) 将6-(5-氨基-2-吡啶基)-6,7-二氢-7-羟基-5H-吡咯并[3,4-b]吡嗪-5-酮与二碳酸二叔丁酯和碳酸氢钠按摩尔比1:1~1.1:1混合,加入体积比为4:1的四氢呋喃和水的混合溶液,室温下搅拌反应2~3小时,反应结束,将溶剂减压蒸干,加入一定量的水,用1N的盐酸调pH=3,再用乙酸乙酯萃取,收集有机相,干燥过滤减压蒸干得淡黄色油状产物A;

[0013] 在步骤(1)的反应条件下,淡黄色油状物A的得率较高,后处理程序较为简单,较易提纯。步骤(1)的反应物碳酸氢钠可以替换成碳酸钠、三乙胺、氢氧化钠。

[0014] (2) 将淡黄色油状产物A、4-甲基-1-哌嗪甲酰氯盐酸盐按摩尔比1:1.5~2.0混合,加入吡啶溶解,在-10℃冰浴中搅拌反应3小时,然后缓慢升温至室温,减压蒸干溶剂,倒入冰水,静置析出固体,过滤,烘干得灰白色固体B;

[0015] 在该反应条件下,灰白色固体B的得率较高,后处理程序较为简单,较易提纯。

[0016] (3) 将灰白色固体B溶于体积比为1:1的三氟乙酸和二氯甲烷的混合溶液,室温下搅拌反应16小时,结束反应,减压蒸干溶剂,加入10%的碳酸钾溶液,用6N的盐酸调pH=6,用二氯甲烷洗涤两次,收集水相用1N的氢氧化钠调pH=10,再用二氯甲烷萃取,收集有机相,干燥、过滤、减压蒸干得黄色油状物C;

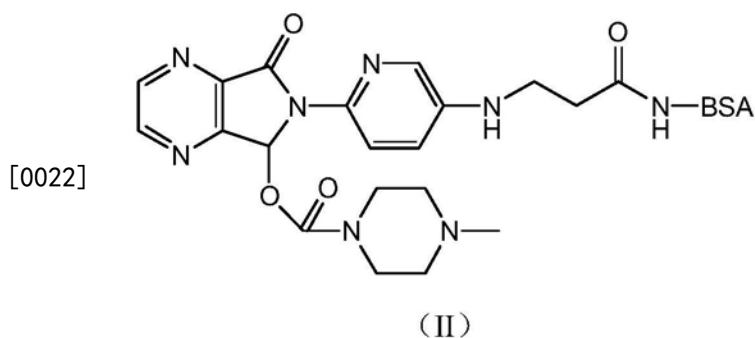
[0017] (4) 将黄色油状物C溶于无水乙醇中,置于0℃冰水浴中,再加入乙醇钠和丙烯酸叔丁酯,室温下搅拌反应18小时,结束反应,减压蒸干溶剂,加入水溶解,用乙酸乙酯萃取,收集有机相,再分别用纯化水和饱和的食盐水洗涤,取有机相干燥、过滤、减压蒸干得棕色油状物D;

[0018] (5) 将棕色油状物D溶于体积比为1:1的三氟乙酸和二氯甲烷的混合溶液,室温下搅拌反应16小时,结束反应,减压蒸干溶剂,加入双蒸水,加入碳酸钠固体至没有气泡为止,用6N的盐酸调pH=6,用二氯甲烷洗涤两次,收集水相用1N的氢氧化钠调pH=10,再用二氯甲烷萃取,收集有机相,干燥、过滤、减压蒸干得棕色油状物I,即权利要求1所述的佐匹克隆人工半抗原。

[0019] 通过上述方法,在佐匹克隆的卤素位上引入连接臂,在该修饰位点上引入连接臂能较大程度地保留佐匹克隆的特征结构,又提供了可以与载体蛋白偶联的活性位点。

[0020] 与采用环状的连接臂相比,本发明所采用的连接臂为链状,可以尽可能的降低免疫时T细胞对连接臂识别度,这样免疫得到的抗体对佐匹克隆的特异性和亲合力更强。

[0021] 本发明还提供了一种佐匹克隆人工抗原,其分子结构如(II)所示:



[0023] 式(II)中,BSA为牛血清蛋白。

[0024] 本发明还提供了一种所述佐匹克隆人工抗原的制备方法,所述佐匹克隆人工抗原是通过活泼酯法使所述佐匹克隆人工半抗原与牛血清蛋白结合,获得所述佐匹克隆人工抗原。

[0025] 具体地,采用活泼酯法制备佐匹克隆人工抗原时,包括以下步骤:

[0026] (a) 将佐匹克隆人工半抗原I与N-羟基琥珀酰亚胺、二环己基碳二亚胺以摩尔比为1:1.35~1.5:1.35~1.5溶解于N,N-二甲基甲酰胺中,室温搅拌反应18小时,反应结束后离心取上清液;

[0027] (b) 将上清液滴加到牛血清蛋白溶液中,混合液置于4℃下静置过夜,经透析、离心取上清液,获得佐匹克隆人工抗原。

[0028] 本发明中牛血清蛋白溶液是将牛血清蛋白溶于磷酸根离子浓度为0.01mol/L的PBS (pH=7.2-7.4) 缓冲液中制成的。

[0029] 步骤(b)中,所述牛血清蛋白溶液的浓度为5mg/ml,上清液与牛血清蛋白溶液的体积比为1:5。

[0030] 本发明选用的牛血清蛋白(BSA)作为大分子载体,与其他载体蛋白相比,具有以下优点:①BSA具有583个氨基酸残基,较容易与佐匹克隆半抗原发生偶联,可制得不同偶联比的佐匹克隆人工抗原,且具有较高的免疫原性;②BSA经济实惠,成本低;③BSA的化学性质比较稳定,在酸性和弱碱性的环境下也有很好的溶解度和稳定性,适合长期储存。

[0031] 本发明还提供了所述佐匹克隆人工抗原在制备抗佐匹克隆抗体中的应用。

[0032] 本发明还提供了一种抗佐匹克隆抗体,是由所述佐匹克隆人工抗原经动物免疫得到的、可与佐匹克隆发生特异性免疫反应的球蛋白。

[0033] 本发明还提供了所述抗佐匹克隆抗体在检测佐匹克隆中的应用。

[0034] 试验发现,将所述佐匹克隆人工抗原免疫新西兰白兔,获得的免疫血清的效价为1:70000。表明本发明的佐匹克隆人工抗原可免疫获得亲和力高、灵敏度高、特异性强的抗佐匹克隆抗体,该抗佐匹克隆抗体可用于佐匹克隆的免疫检测和分析。

[0035] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0036] 本发明的佐匹克隆人工半抗原最大程度地保留了佐匹克隆的特征结构,且具有可以与载体蛋白发生偶联的活性基团,可作为抗原决定簇;进一步制备获得的佐匹克隆人工抗原可免疫获得亲和力高、灵敏度高、特异性强的抗佐匹克隆抗体,经免疫新西兰白兔获得的免疫血清的效价高达1:70000,可用于对佐匹克隆进行快速、准确的免疫检测和免疫分析。

附图说明

- [0037] 图1为本发明佐匹克隆人工抗原的制备流程图；
- [0038] 其中，TFA表示三氟乙酸，DCM表示二氯甲烷，DCC表示二环己基碳二亚胺，DMF表示N,N-二甲基甲酰胺，Et₃N表示三乙胺，BSA表示牛血清蛋白，BGG表示牛丙种球蛋白，下同；
- [0039] 图2为本发明佐匹克隆人工半抗原的液相色谱图；
- [0040] 其中，mAU表示毫吸光度单位，min表示分钟；
- [0041] 图3为本发明佐匹克隆半抗原的质谱图；
- [0042] 其中，Relative Abundance表示相对丰度；m/z表示荷质比；
- [0043] 图4为牛血清蛋白、佐匹克隆人工半抗原、佐匹克隆人工抗原的紫外扫描图；
- [0044] 其中，A表示紫外-可见吸收光谱，λ (nm) 表示波长 (nm) ；
- [0045] 图5为对比例1佐匹克隆人工抗原的制备流程图；
- [0046] 图6为对比例2佐匹克隆人工抗原的制备流程图；
- [0047] 其中，BGG表示牛丙种球蛋白；
- [0048] 图7为对比例3佐匹克隆人工抗原的制备流程图；
- [0049] 图8为对比例4佐匹克隆人工抗原的制备流程图；
- [0050] 图9为对比例5佐匹克隆人工抗原的制备流程图；
- [0051] 图10为对比例6佐匹克隆人工抗原的制备流程图；
- [0052] 图11为对比例7佐匹克隆人工抗原的制备流程图。

具体实施方式

[0053] 下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步详细说明。

[0054] 实施例1

[0055] 本实施一种佐匹克隆人工抗原的制备方法(反应历程如图1)，包括以下步骤：

[0056] (1) 人工半抗原的制备：

[0057] ①称取6-(5-氨基-2-吡啶基)-6,7-二氢-7-羟基-5H-吡咯并[3,4-b]吡嗪-5-酮500mg (2.06mmol) 于50ml圆底烧瓶中，加入20ml四氢呋喃和5ml水溶解，再加入二碳酸二叔丁酯519μL (2.26mmol) 和碳酸钠240mg (2.26mmol)，放入搅拌子，室温下搅拌反应3小时，反应结束，将溶剂减压蒸干，加入30ml纯化水，用1N的盐酸调pH=3，再用30ml乙酸乙酯萃取两次，收集有机相，用无水硫酸镁干燥、过滤、减压蒸干得淡黄色油状产物A548mg (1.60mmol)；

[0058] 对该淡黄色油状产物A进行TLC检测，层析液为乙酸乙酯：石油醚=10:3 (v/v)，产物R_f=0.8；

[0059] ②将上步淡黄色油状物A548mg (1.60mmol) 与4-甲基-1-哌嗪甲酰氯盐酸盐636mg (3.20mmol) 置于50ml单口圆底烧瓶中，加入32ml无水吡啶溶解，在-10℃冰浴中搅拌反应3小时，然后缓慢升温至室温，减压蒸干溶剂，加入30ml纯化水和30ml二氯甲烷萃取，水相再用30ml二氯甲烷萃取两次，收集有机相，分别用50ml纯化水和饱和食盐水洗，取有机相，用无水硫酸镁干燥、过滤、转干得灰白色固体B424mg (0.9mmol)；

[0060] 对该灰白色固体B进行TLC检测，层析液为乙酸乙酯：石油醚=10:3 (v/v)，产物R_f=0.3；

[0061] ③将灰白色固体B424mg (0.9mmol) 溶于20ml三氟乙酸和二氯甲烷的混合溶液 (v/v

=1/1)中,室温下搅拌反应16小时,结束反应,减压蒸干溶剂,加入15ml 10%的碳酸钾水溶液,然后用6N的盐酸调pH=6,用20ml二氯甲烷洗涤两次,收集水相再用1N的氢氧化钠溶液调pH=10,再用30ml二氯甲烷萃取两次,收集有机相,用无水硫酸镁干燥、过滤、转干得黄色油状物C302mg (0.82mmol)。

[0062] 对该黄色油状物C进行TLC检测,层析液为乙酸乙酯:石油醚=10:3 (v/v),产物 R_f =0.1;

[0063] ④将黄色油状物C302mg (0.82mmol)溶于8ml无水乙醇中,置于0℃冰水浴中,再加入67mg (0.98mmol)乙醇钠和267 μ L (1.85mmol)丙烯酸叔丁酯,室温下搅拌反应18小时,结束反应,减压蒸干溶剂,加入20ml纯化水溶解,用20ml乙酸乙酯萃取两次,收集有机相,再分别用30ml纯化水和30ml饱和的食盐水洗涤,取有机相,干燥、过滤、减压蒸干得棕色油状物D286mg (0.58mmol)。

[0064] 对该棕色油状物D进行TLC检测,层析液为二氯甲烷:95%乙醇:1,4-二氧六环:氨水=10:8:1:1 (v/v),产物 R_f =0.8;

[0065] ⑤将棕色油状物D286mg (0.58mmol)溶于20ml三氟乙酸和二氯甲烷的混合溶液 (v/v=1/1),室温下搅拌反应16小时,结束反应,减压蒸干溶剂,加入20ml双蒸水,再加入碳酸钠固体至没有气泡为止,用6N的盐酸调pH=6,用20ml二氯甲烷洗涤两次,收集水相用1N的氢氧化钠调pH=10,再用20ml二氯甲烷萃取两次,收集有机相,用无水硫酸镁干燥、过滤、转干得棕色油状物I212mg (0.48mmol),即佐匹克隆人工半抗原。

[0066] 对该棕色油状物I进行TLC检测,层析液为二氯甲烷:95%乙醇:1,4-二氧六环:氨水=10:8:1:1 (v/v),产物 R_f =0.4;

[0067] 佐匹克隆人工半抗原的液相色谱图见图2(紫外检测器,波长215nm)。从图2可以看出经过纯化得到的佐匹克隆人工半抗原的纯度达到99.9%以上。

[0068] 佐匹克隆半抗原的质谱图见图3。从图3可以看出本实施例得到的佐匹克隆人工半抗原的分子离子峰的质荷比 (m/z) 为441,与其理论分子量吻合,它的五个主要碎片离子峰的质荷比 (m/z) 分别为298、165、353、210、127,与其五个主要碎片的理论分子量吻合,可以确定步骤⑤得到的最终化合物就是本发明所设计的佐匹克隆人工半抗原。

[0069] (2) 佐匹克隆人工抗原的制备:

[0070] ⑥将212mg (0.48mmol) 佐匹克隆人工半抗原置于50ml圆底烧瓶中,加入10.6ml N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 溶解,再加入75mg (0.65mmol) N-羟基琥珀酰亚胺和133mg (0.65mmol) 二环己基碳二亚胺,20℃搅拌反应18小时,反应结束后离心,取上清液,备用。

[0071] ⑦称取14.5g (0.0405mol) 十二水磷酸氢二钠,43.875g (0.75mol) 氯化钠,1.495g (0.00958mol) 二水磷酸二氢钠用双蒸水溶解定容至5.0L,得到磷酸根离子浓度为0.01mol/L,钠离子浓度为0.17mol/L的PBS缓冲液,pH为7.4。

[0072] ⑧称取0.265g牛血清蛋白溶于53ml步骤⑦的PBS缓冲液中,得到浓度为5mg/ml的牛血清蛋白溶液。

[0073] ⑨在快速搅拌下,将步骤⑥的上清液缓慢滴加到⑧的牛血清蛋白溶液中,上清液与牛血清蛋白溶液的体积比为1:5,得到的混合液在4℃条件下静置保存过夜,得到人工抗原混合液。

[0074] ⑩将人工抗原混合液移入透析袋中,用步骤⑦的PBS缓冲液透析5次,透析结束后,

离心取上清液即得到人工抗原：佐匹克隆-牛血清蛋白偶联物(如式 II)。

[0075] 佐匹克隆人工抗原制备前后的紫外扫描图见图4。其中，曲线a为佐匹克隆人工半抗原的紫外扫描图，曲线b为佐匹克隆人工抗原的紫外扫描图，曲线c为牛血清蛋白的紫外扫描图。佐匹克隆人工半抗原的最大吸收波长为273nm，佐匹克隆人工抗原的最大吸收波长为275nm，与佐匹克隆半抗原、牛血清蛋白相比，佐匹克隆人工抗原的最大吸收波长和吸光度都出现明显变化，说明佐匹克隆半抗原与牛血清蛋白偶联成功。

[0076] 对比例1

[0077] 本实施一种佐匹克隆人工抗原的制备方法(反应历程如图5)，包括以下步骤：

[0078] (1) 人工半抗原的制备：

[0079] ①称取6-(5-氨基-2-吡啶基)-6,7-二氢-7-羟基-5H-吡咯并[3,4-b]吡嗪-5-酮500mg (2.06mmol) 于50ml圆底烧瓶中，加入20ml四氢呋喃和5ml水溶解，再加入二碳酸二叔丁酯519 μ L (2.26mmol) 和碳酸钠240mg (2.26mmol)，放入搅拌子，室温下搅拌反应3小时，反应结束，将溶剂减压蒸干，加入30ml纯化水，用1N的盐酸调pH=3，再用30ml乙酸乙酯萃取两次，收集有机相，用无水硫酸镁干燥、过滤、减压蒸干得淡黄色油状产物A510mg (1.49mmol)；

[0080] 对该淡黄色油状产物A进行TLC检测，层析液为乙酸乙酯：石油醚=10:3 (v/v)，产物 R_f =0.8；

[0081] ②将上步淡黄色油状物A510mg (1.49mmol) 与4-甲基-1-哌嗪甲酰氯盐酸盐592mg (3.20mmol) 置于50ml单口圆底烧瓶中，加入30ml无水吡啶溶解，在-10℃冰浴中搅拌反应3小时，然后缓慢升温至室温，减压蒸干溶剂，加入30ml纯化水和30ml二氯甲烷萃取，水相再用30ml二氯甲烷萃取两次，收集有机相，分别用50ml纯化水和饱和的食盐水洗，取有机相，用无水硫酸镁干燥、过滤、转干得灰白色固体B389mg (0.83mmol)；

[0082] 对该灰白色固体B进行TLC检测，层析液为乙酸乙酯：石油醚=10:3 (v/v)，产物 R_f =0.3；

[0083] ③将灰白色固体B389mg (0.83mmol) 溶于20ml三氟乙酸和二氯甲烷的混合溶液(v/v=1/1)中，室温下搅拌反应16小时，结束反应，减压蒸干溶剂，加入15ml10%的碳酸钾溶液，然后用6N的盐酸调pH=6，用20ml二氯甲烷洗涤两次，收集水相再用1N的氢氧化钠溶液调pH=10，再用30ml二氯甲烷萃取两次，收集有机相，用无水硫酸镁干燥、过滤、转干得黄色油状物C277mg (0.75mmol)。

[0084] 对该黄色油状物C进行TLC检测，层析液为乙酸乙酯：石油醚=10:3 (v/v)，产物 R_f =0.1；

[0085] ④将黄色油状物C277mg (0.75mmol) 溶于16ml无水吡啶中，再加入113mg (1.13mmol) 丁二酸酐，置于100℃油浴中搅拌回流反应20小时，结束反应，减压蒸干溶剂，加入20ml水，用20ml二氯甲烷萃取三次，收集有机相，再分别用30ml纯化水和30ml饱和的食盐水洗涤，取有机相用无水硫酸镁干燥、过滤、转干得棕黑色油状物III268mg (0.57mmol) 即佐匹克隆人工半抗原(如式 III)；

[0086] 对该棕黑色油状物进行TLC检测，层析液为二氯甲烷:95%乙醇:1,4-二氧六环:氨水=10:8:1:1 (v/v)，产物 R_f =0.5；

[0087] (2) 佐匹克隆人工抗原的制备：

[0088] ⑤将268mg (0.57mmol) 佐匹克隆人工半抗原置于50ml圆底烧瓶中，加入13.4ml N，

N-二甲基甲酰胺 (DMF) 溶解, 再加入 88mg (0.77mmol) N-羟基琥珀酰亚胺和 159mg (0.77mmol) 二环己基碳二亚胺, 20℃ 搅拌反应 18 小时, 反应结束后离心, 取上清液, 备用。

[0089] ⑥称取 14.5g (0.0405mol) 十二水磷酸氢二钠, 43.875g (0.75mol) 氯化钠, 1.495g (0.00958mol) 二水磷酸二氢钠用双蒸水溶解定容至 5.0L, 得到磷酸根离子浓度为 0.01mol/L, 钠离子浓度为 0.17mol/L 的 PBS 缓冲液, pH 为 7.4。

[0090] ⑦称取 0.335g 牛血清蛋白溶于 67ml 步骤⑥的 PBS 缓冲液中, 得到浓度为 5mg/ml 的牛血清蛋白溶液。

[0091] ⑧在快速搅拌下, 将步骤⑤的上清液缓慢滴加到牛血清蛋白溶液中, 上清液与牛血清蛋白溶液的体积比为 1:5, 得到的混合液在 4℃ 条件下静置保存过夜, 得到人工抗原混合液。

[0092] ⑨将人工抗原混合液移入透析袋中, 用步骤⑥的 PBS 缓冲液透析 5 次, 透析结束后离心取上清液即得到人工抗原: 佐匹克隆-牛血清蛋白偶联物 (如式 IV)。

[0093] 对比例 2

[0094] 本实施一种佐匹克隆人工抗原的制备方法 (反应历程如图 6), 包括以下步骤:

[0095] (1) 佐匹克隆人工半抗原的制备:

[0096] ①~④分别与对比例 1 相同。

[0097] (2) 佐匹克隆人工抗原的制备:

[0098] 采用牛丙种蛋白作载体, 与佐匹克隆人工半抗原 III 进行偶联, 偶联步骤与对比例 1 相同, 得到佐匹克隆人工抗原 V。

[0099] 对比例 3

[0100] 本实施一种佐匹克隆人工抗原的制备方法 (反应历程如图 7), 包括以下步骤:

[0101] (1) 佐匹克隆人工半抗原的制备:

[0102] ①~④分别与对比例 1 相同。

[0103] (2) 佐匹克隆人工抗原的制备:

[0104] ⑤称取 200mg (0.43mmol) 佐匹克隆人工半抗原 III 置于 50ml 圆底烧瓶中, 加入 10ml N,N-二甲基甲酰胺 (DMF), 再加入 59μL (0.43mmol) 三乙胺和 56μL (0.43mmol) 氯甲酸异丁酯, 室温搅拌反应 18 小时, 反应结束后离心, 取上清液, 备用。

[0105] ⑥-⑨分别与对比例 1 相同; 得到佐匹克隆人工抗原 VI。

[0106] 对比例 4

[0107] 本实施一种佐匹克隆人工抗原的制备方法 (反应历程如图 8), 包括以下步骤:

[0108] (1) 佐匹克隆人工半抗原的制备:

[0109] ①~④分别与对比例 1 相同。

[0110] (2) 佐匹克隆人工抗原的制备:

[0111] ⑤与对比例 3 相同。

[0112] ⑥称取 14.5g (0.0405mol) 十二水磷酸氢二钠, 43.875g (0.75mol) 氯化钠, 1.495g (0.00958mol) 二水磷酸二氢钠用双蒸水溶解定容至 5.0L, 得到磷酸根离子浓度为 0.01mol/L, 钠离子浓度为 0.17mol/L 的 PBS 缓冲液, pH 为 7.4。

[0113] ⑦称取 0.25g 牛丙种球蛋白溶于 50ml 步骤⑥的 PBS 缓冲液中, 得到浓度为 5mg/ml 的牛血清蛋白溶液。

[0114] ⑧在快速搅拌下,将步骤⑤的上清液缓慢滴加到牛丙种球蛋白溶液中,上清液与牛丙种球蛋白溶液的体积比为1:5,得到的混合液在4℃条件下静置保存过夜,得到人工抗原混合液。

[0115] ⑨将人工抗原混合液移入透析袋中,用步骤⑥的PBS缓冲液透析5次,透析结束后离心取上清液即得到佐匹克隆人工抗原Ⅶ。

[0116] 对比例5

[0117] 本实施一种佐匹克隆人工抗原的制备方法(反应历程如图9),包括以下步骤:

[0118] (1) 佐匹克隆人工半抗原的制备:

[0119] ①~⑤分别与实施例1相同。

[0120] (2) 佐匹克隆人工抗原的制备:

[0121] ⑥采用牛丙种蛋白作载体,与佐匹克隆人工半抗原I进行偶联,偶联步骤与实例1相同,得到佐匹克隆人工抗原Ⅷ。

[0122] 对比例6

[0123] 本实施一种佐匹克隆人工抗原的制备方法(反应历程如图10),包括以下步骤:

[0124] (1) 佐匹克隆人工半抗原的制备:

[0125] ①~⑤分别与实施例1相同。

[0126] (2) 佐匹克隆人工抗原的制备:

[0127] ⑥称取200mg (0.45mmol) 佐匹克隆人工半抗原Ⅲ置于50ml圆底烧瓶中,加入10ml N,N-二甲基甲酰胺(DMF),再加入62μL (0.45mmol) 三乙胺和59μL (0.45mmol) 氯甲酸异丁酯,室温搅拌反应18小时,反应结束后离心,取上清液,备用。

[0128] ⑦称取14.5g (0.0405mol) 十二水磷酸氢二钠,43.875g (0.75mol) 氯化钠,1.495g (0.00958mol) 二水磷酸二氢钠用双蒸水溶解定容至5.0L,得到磷酸根离子浓度为0.01mol/L,钠离子浓度为0.17mol/L的PBS缓冲液,pH为7.4。

[0129] ⑧称取0.25g牛血清蛋白溶于50ml步骤⑥的PBS缓冲液中,得到浓度为5mg/ml的牛血清蛋白溶液。

[0130] ⑨在快速搅拌下,将步骤⑥的上清液缓慢滴加到牛血清蛋白溶液中,上清液与牛血清蛋白溶液的体积比为1:5,得到的混合液在4℃条件下静置保存过夜,得到人工抗原混合液。

[0131] ⑩将人工抗原混合液移入透析袋中,用步骤⑦的PBS缓冲液透析5次,透析结束后离心取上清液即得到佐匹克隆人工抗原Ⅸ。

[0132] 对比例7

[0133] 本实施一种佐匹克隆人工抗原的制备方法(反应历程如图11),包括以下步骤:

[0134] (1) 佐匹克隆人工半抗原的制备:

[0135] ①~⑤分别与实施例1相同。

[0136] (2) 佐匹克隆人工抗原的制备:

[0137] ⑥采用牛丙种蛋白作载体,与佐匹克隆人工半抗原I进行偶联,偶联步骤与对比例6相同,得到佐匹克隆人工抗原X。

[0138] 实施例2佐匹克隆人工抗原的性能测定

[0139] (1) 佐匹克隆人工抗原的鉴定:

[0140] 摩尔吸收系数 ϵ :用PBS缓冲液配制浓度为0 $\mu\text{g/ml}$ 、5 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ 、20 $\mu\text{g/ml}$ 、30 $\mu\text{g/ml}$ 、40 $\mu\text{g/ml}$ 的佐匹克隆人工半抗原溶液,通过紫外扫描图可知佐匹克隆半抗原的最大吸收波长为273nm,在273nm处测吸光值,每个浓度做平行样。摩尔吸光系数(即摩尔吸收系数)的计算公式为: $\epsilon = \text{吸光值} / \text{摩尔浓度}$ 。

[0141] 偶联物蛋白浓度的测定:用PBS缓冲液配制浓度为0 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ 、20 $\mu\text{g/ml}$ 、30 $\mu\text{g/ml}$ 、40 $\mu\text{g/ml}$ 、60 $\mu\text{g/ml}$ 、80 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ 、120 $\mu\text{g/ml}$ 的牛血清蛋白溶液各1ml,加入3ml考马斯亮蓝染色液,立即混匀,30℃水浴温热5分钟,每个浓度做平行样,在655nm处测吸光值,绘制蛋白浓度与吸光值的关系曲线。将人工抗原溶液(用PBS缓冲液配制)按一定比例稀释,在655nm处测得人工抗原的吸光值,从曲线上读取人工抗原溶液的相应蛋白浓度值。

[0142] 偶联比测定:配制100 $\mu\text{g/ml}$ 的牛血清蛋白PBS溶液,将偶联物(即佐匹克隆人工抗原)用PBS稀释到100 $\mu\text{g/ml}$,在275nm处测得吸光值 A_1 ,以PBS为空白测得吸光值 A_2 ,则偶联比率 γ 为: $\gamma = [(A_1 - A_2) / \epsilon] / (100 \times 10^{-3} / 65000)$ 。

[0143] 其中 ϵ 为摩尔吸光系数(L/mol),65000为牛血清蛋白的分子量,100 $\times 10^{-3}$ 为牛丙种球蛋白浓度(g/L)。

[0144] 采用牛丙种球蛋白作为载体时,偶联比的计算式为: $\gamma = [(A_1 - A_2) / \epsilon] / (100 \times 10^{-3} / 150000)$,其中,150000为牛丙种球蛋白的分子量,100 $\times 10^{-3}$ 为牛丙种球蛋白浓度(g/L)。

[0145] 表1各佐匹克隆人工抗原的偶联比和摩尔吸收系数

[0146]

编号	人工抗原	偶联比	偶联物蛋白浓度	摩尔吸收系数
实施例1	II	24	3.627mg/ml	5932.28
对比例1	IV	15	2.650mg/ml	5216.97
对比例2	V	32	4.357mg/ml	5216.97
对比例3	VI	16	2.785mg/ml	5216.97
对比例4	VII	20	3.059mg/ml	5216.97
对比例5	VIII	18	2.876mg/ml	5932.28
对比例6	IX	12	2.033mg/ml	5932.28
对比例7	X	8	1.475mg/ml	5932.28

[0147] 由表1可见,人工半抗原的结构,人工半抗原的活化方法以及载体蛋白的结构对人工半抗原与载体蛋白交联时的结合比都是有影响的。

[0148] (2) 动物免疫

[0149] 将制备的各佐匹克隆人工抗原免疫新西兰白兔,得到的免疫血清经ELISA方法检测其效价,检测结果见表2。

[0150] 表2各免疫血清的效价检测结果

[0151]

编号	佐匹克隆人工抗原	免疫血清效价
实施例1	II	1:70000
对比例1	IV	1:60000
对比例2	V	1:22000
对比例3	VI	1:30000

对比例4	VII	1:3400
对比例5	VIII	1:30000
对比例6	IX	1:6000
对比例7	X	1:2000

[0152] 由表2可见,与实施例1和实施例2相比,利用各对比例佐匹克隆人工抗原进行动物免疫获得的免疫血清,其效价均偏低,不能用于免疫分析中。而利用佐匹克隆人工抗原Ⅱ进行动物免疫获得的免疫血清,其效价达1:70000,完全可用于免疫分析中,能为佐匹克隆的检测提供更加方便快捷准确的途径。

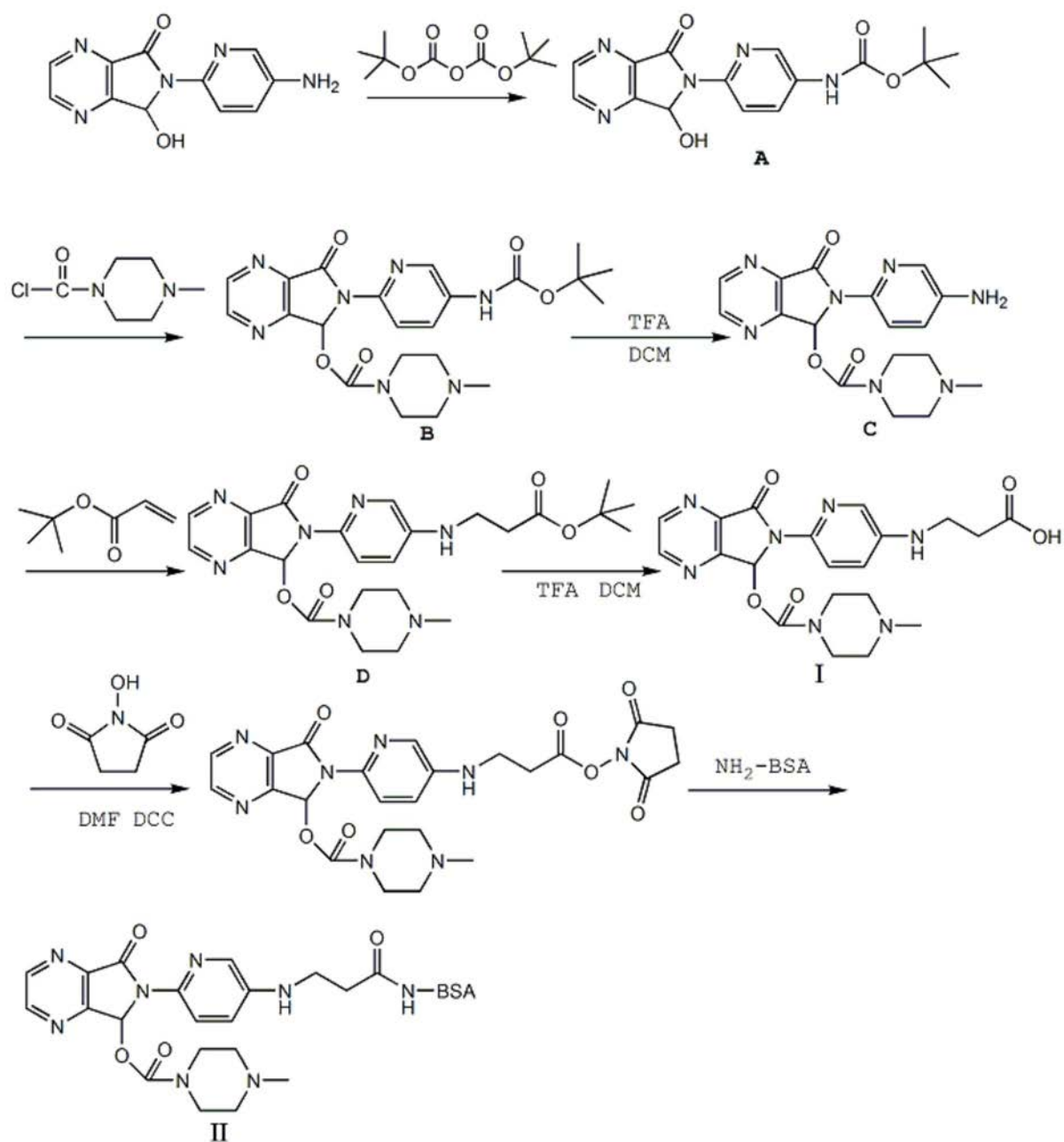


图1

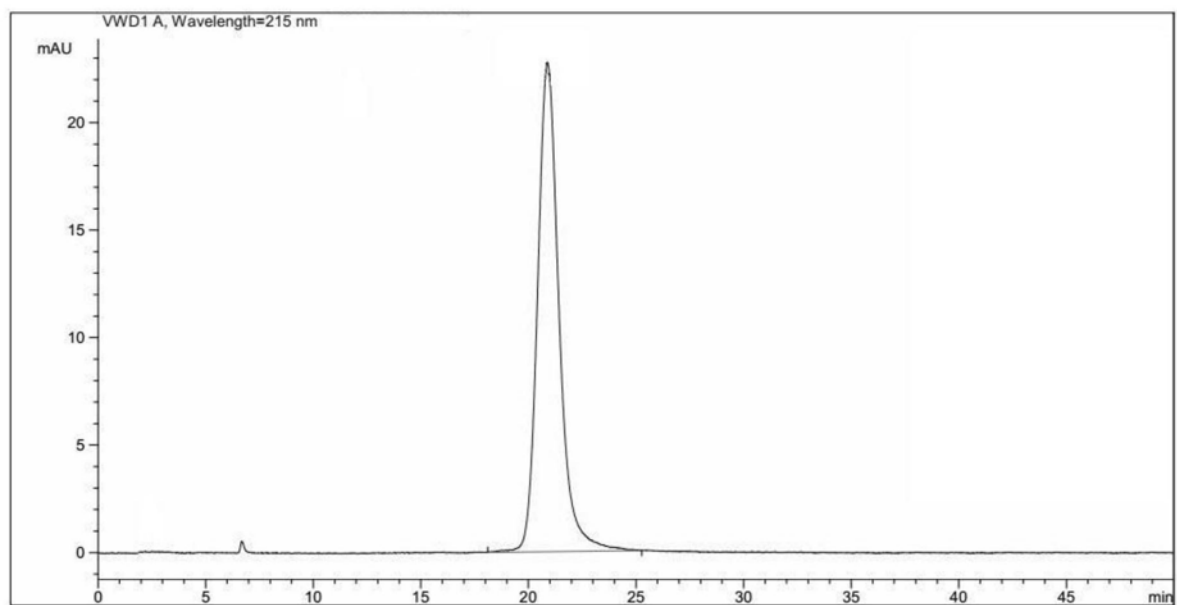


图2

ZPN-2 #184-187 RT: 2.62-2.66 AV: 4 SR: 61 2.64-2.95, 1.64-2.14 NL: 1.99E9
T: + cESI Full ms [20.00-500.00]

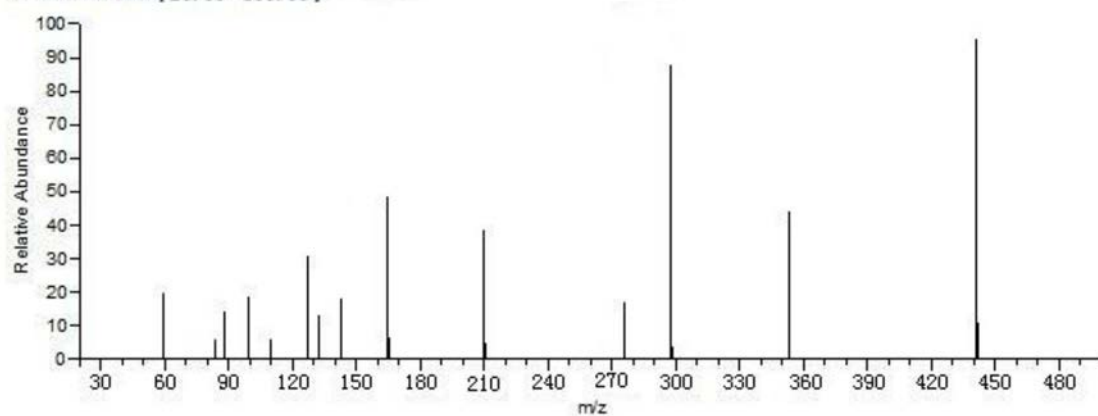


图3

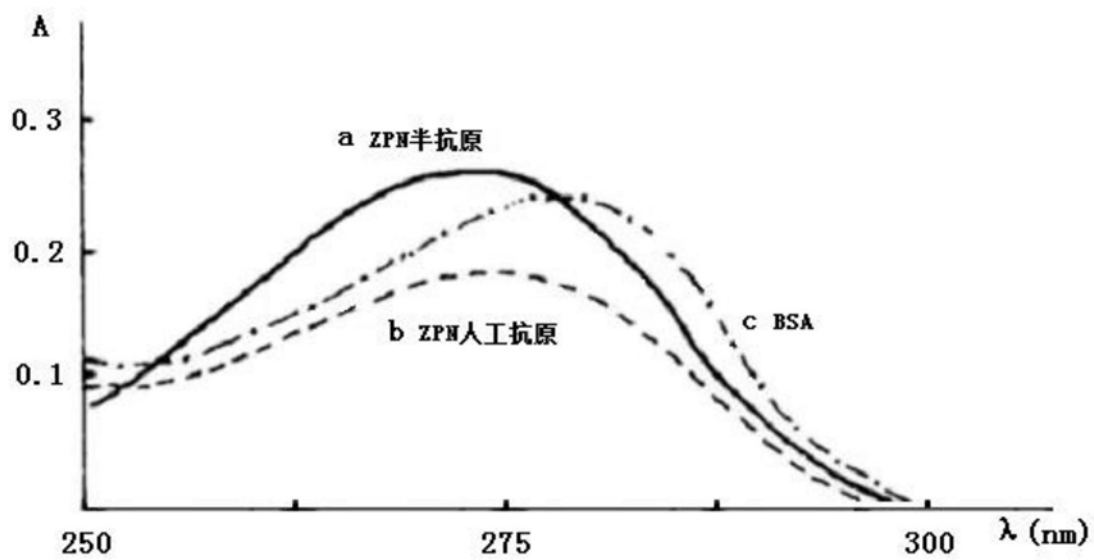


图4

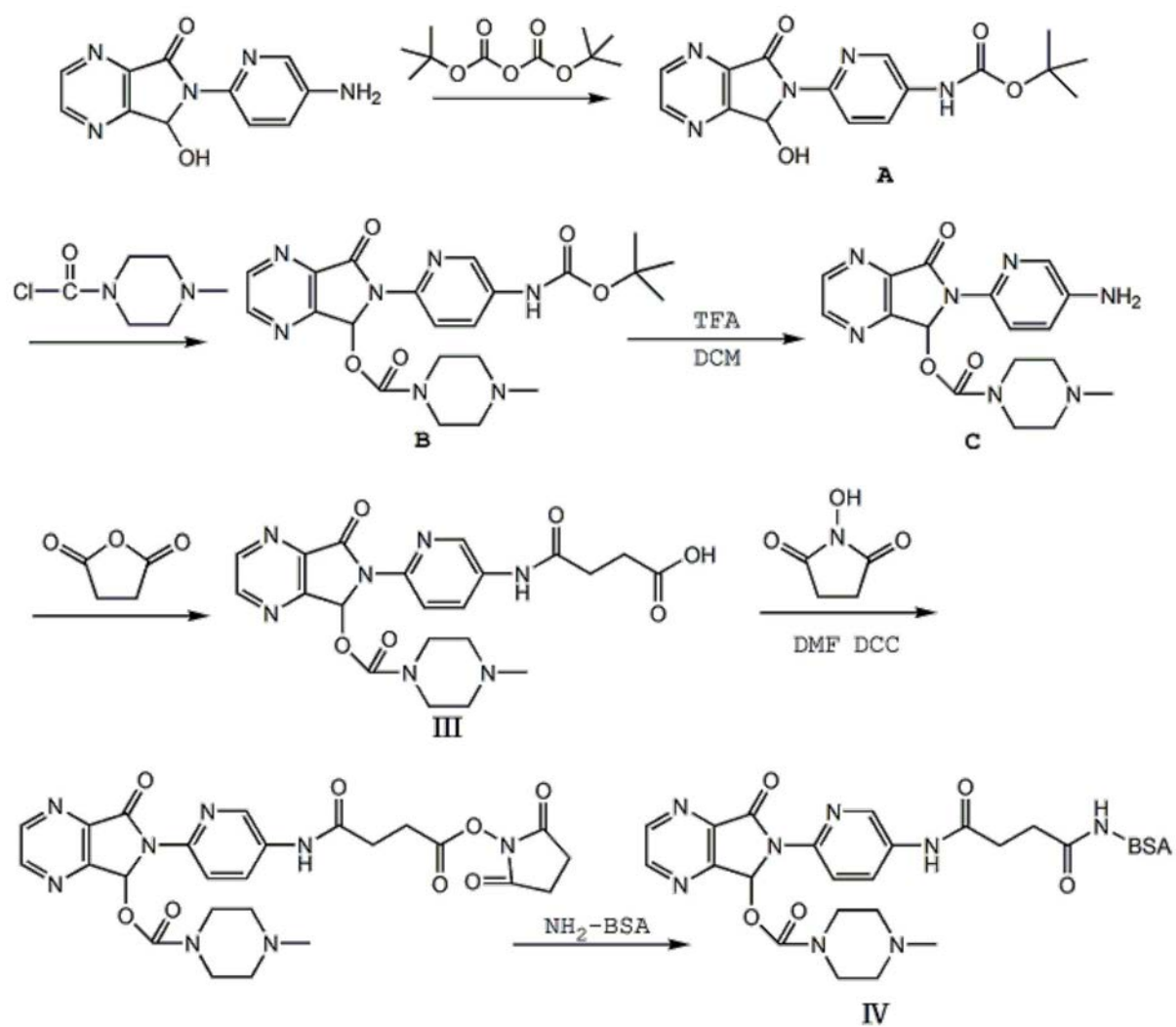


图5

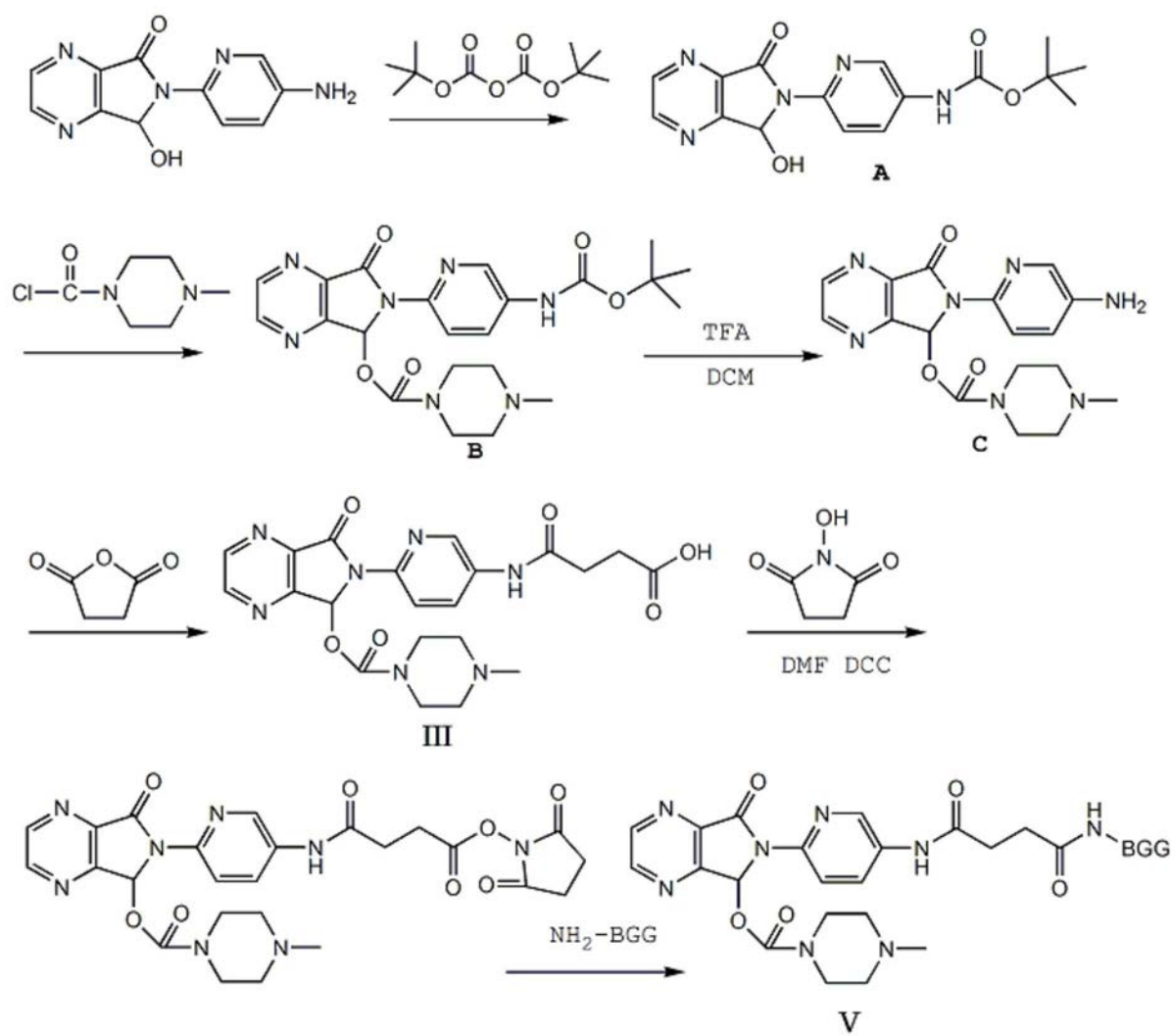


图6

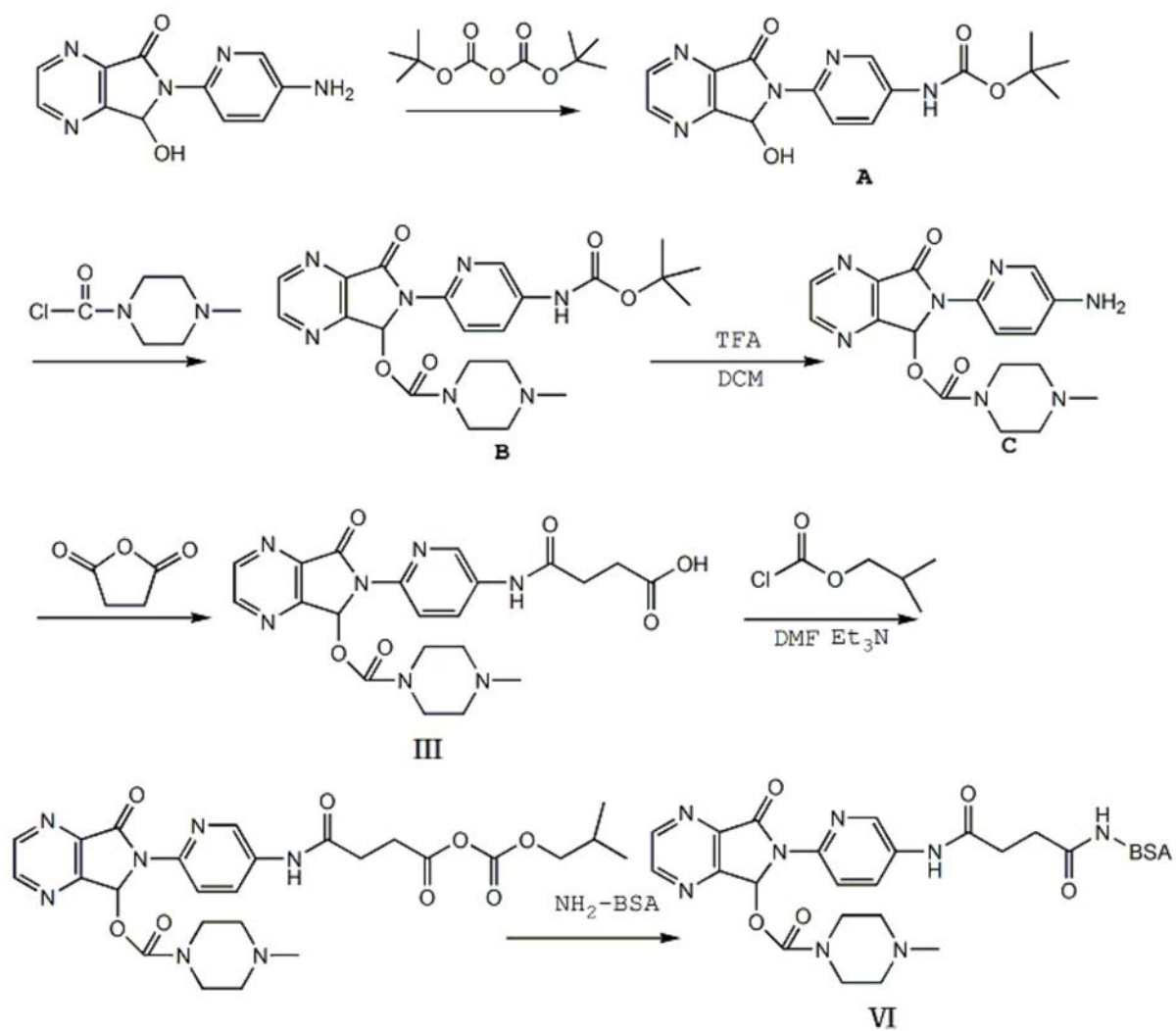


图7

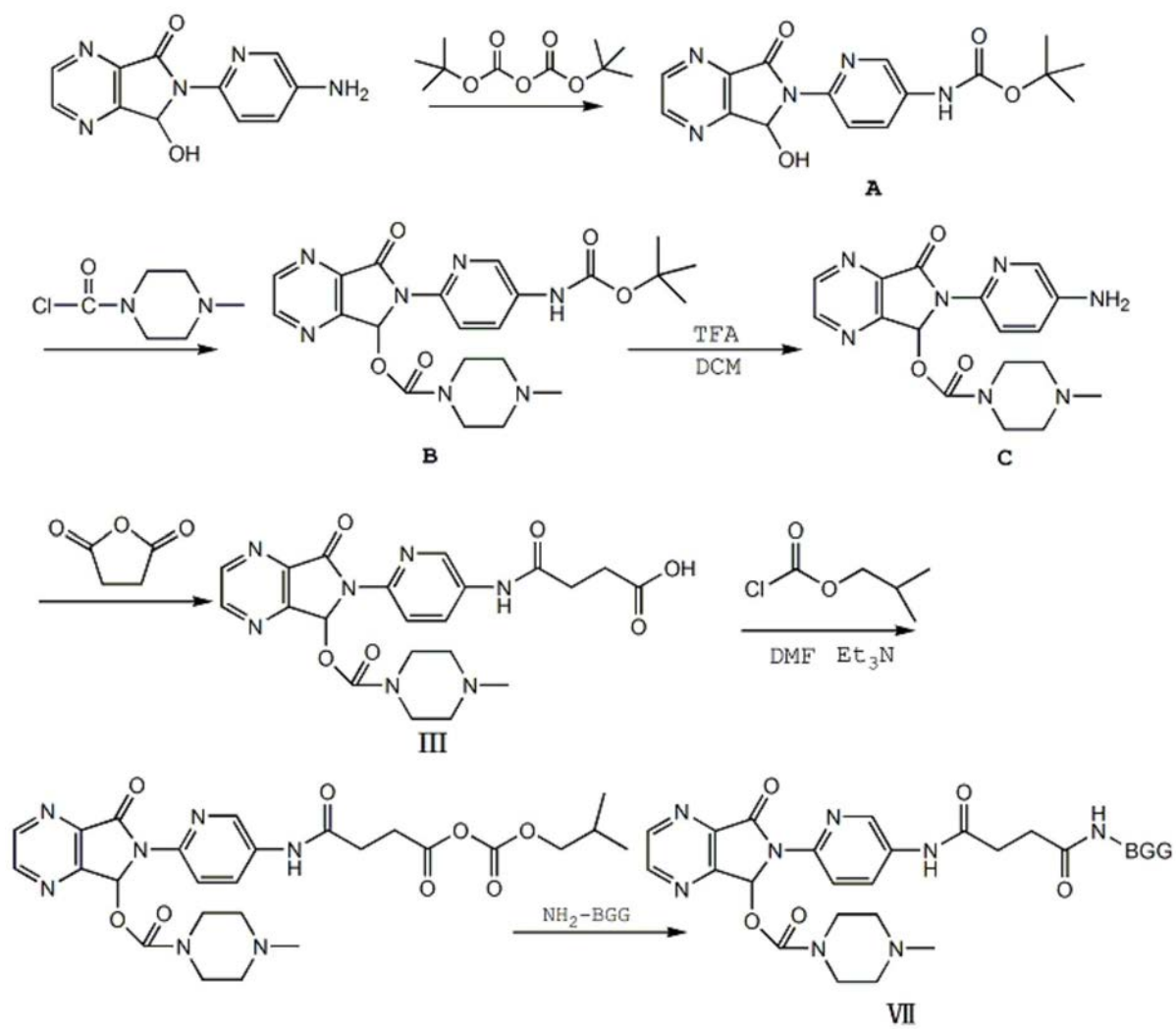


图8

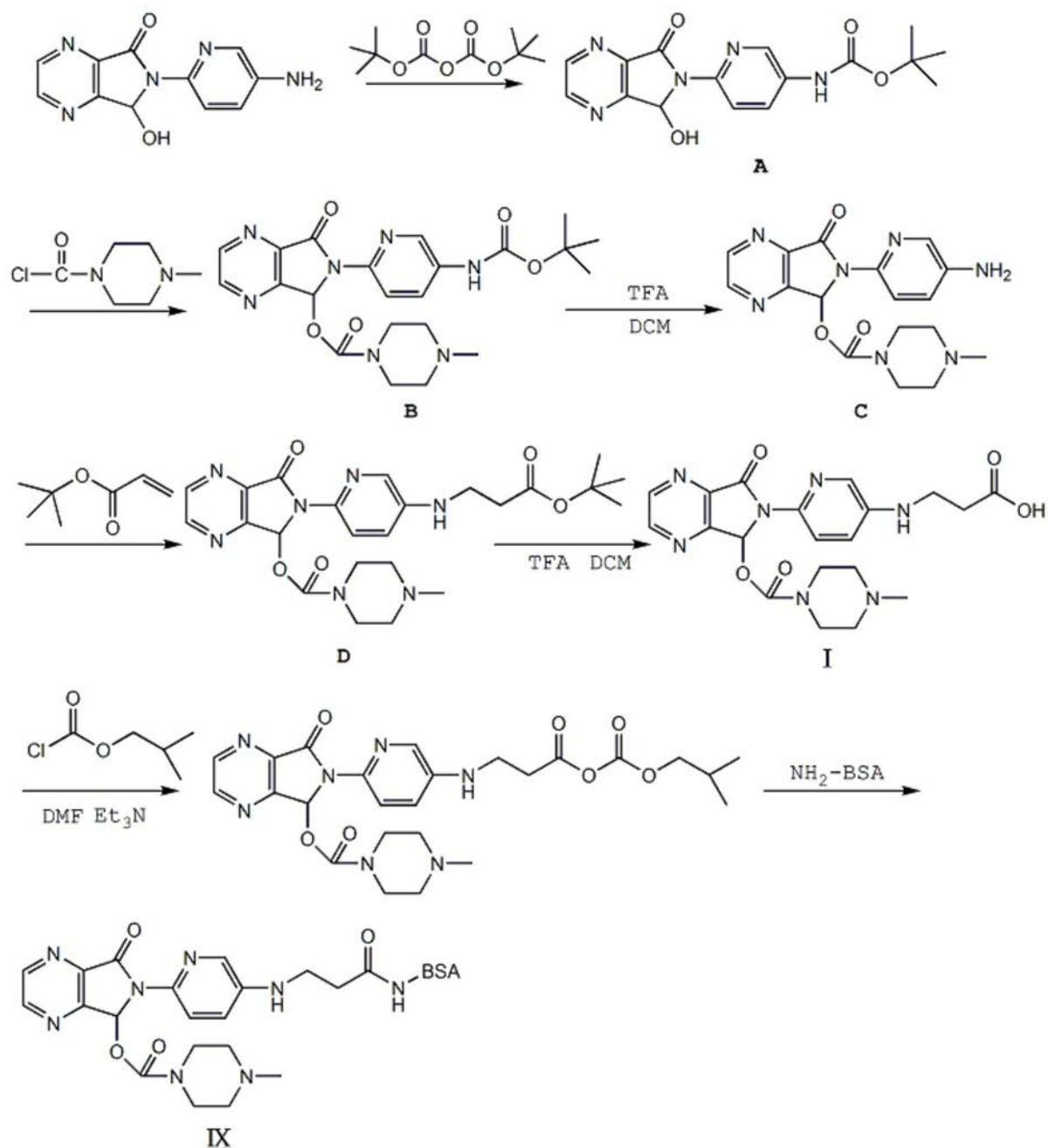


图10

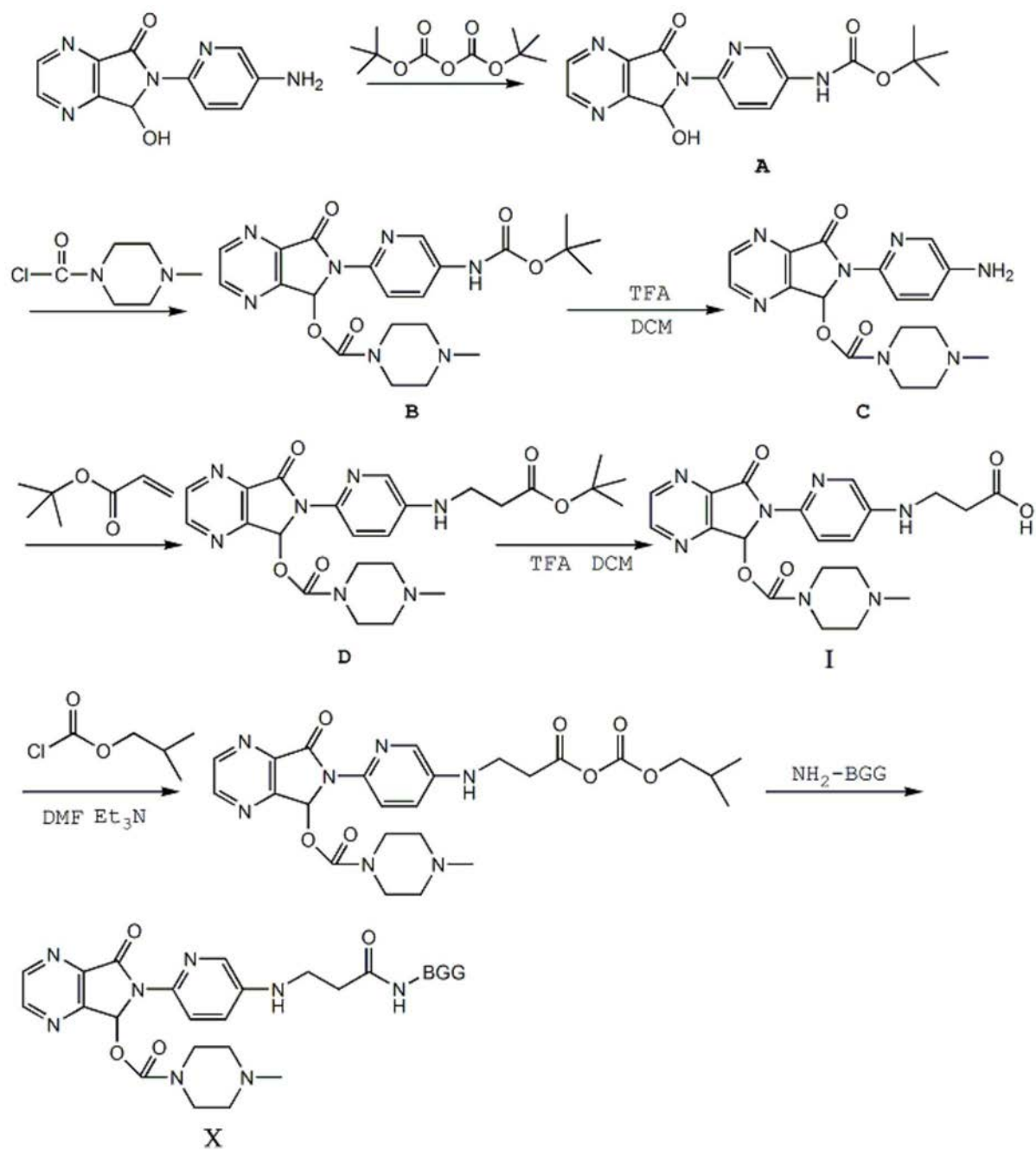
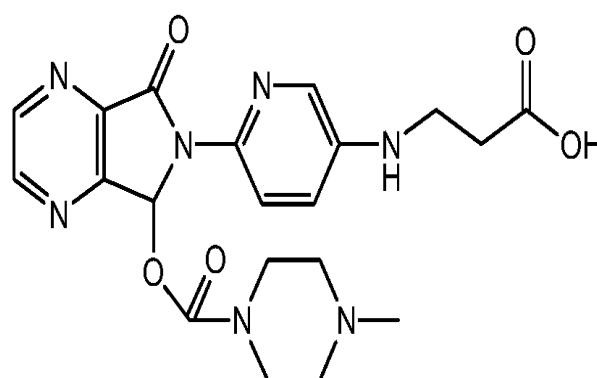


图11

专利名称(译)	一种佐匹克隆人工半抗原、人工抗原及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN109824673A	公开(公告)日	2019-05-31
申请号	CN201910070891.0	申请日	2019-01-25
[标]发明人	邵越水 王镇		
发明人	邵越水 王镇		
IPC分类号	C07D487/04 C07K14/765 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种佐匹克隆人工半抗原、人工抗原及其制备方法和应用。佐匹克隆人工半抗原的分子结构式如式(I)，佐匹克隆人工抗原的分子结构式如式(II)。所述应用是所述佐匹克隆人工抗原在制备抗佐匹克隆抗体中的应用。本发明的佐匹克隆人工半抗原最大程度地保留了佐匹克隆的特征结构，且具有可以与载体蛋白发生偶联的活性基团，可作为抗原决定簇；进一步制备获得的佐匹克隆人工抗原可免疫获得亲和力高、灵敏度高、特异性强的抗佐匹克隆抗体，经免疫新西兰白兔获得的免疫血清的效价高达1:70000，可用于对佐匹克隆进行快速、准确的免疫检测和免疫分析。



(I)。