



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104402753 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 11

(21) 申请号 201410652826. 6

*C07K 16/44*(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 11. 17

*G01N 33/53*(2006. 01)

(71) 申请人 浙江省农业科学院

地址 310021 浙江省杭州市石桥路 198 号

申请人 杭州傲锐生物医药科技有限公司

(72) 发明人 杨华 邵越水 张巧艳 钱鸣蓉

汪建妹 吴俐勤 肖英平

(74) 专利代理机构 杭州天勤知识产权代理有限

公司 33224

代理人 胡红娟

(51) Int. Cl.

*C07C 233/47*(2006. 01)

*C07C 231/02*(2006. 01)

*C07K 14/47*(2006. 01)

权利要求书2页 说明书10页 附图9页

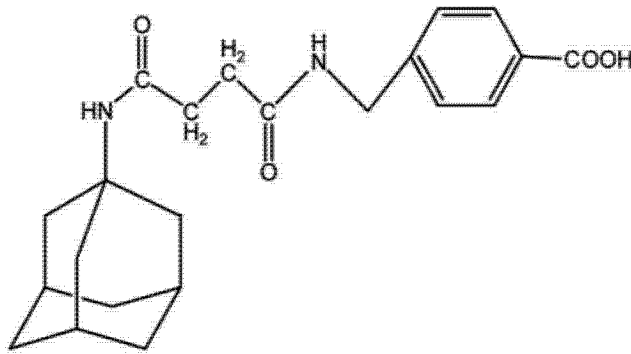
(54) 发明名称

一种金刚烷胺人工半抗原、人工抗原及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种金刚烷胺人工半抗原、人工抗原及其制备方法和应用。金刚烷胺人工半抗原的分子结构式如式(I)，金刚烷胺人工抗原的分子结构式如式(II)。所述应用是所述金刚烷胺人工抗原在制备抗金刚烷胺抗体中的应用。本发明的金刚烷胺人工半抗原最大程度地保留了金刚烷胺的特征结构，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；进一步制备获得的金刚烷胺人工抗原可免疫获得亲和力高、灵敏度高、特异性强的抗金刚烷胺抗体，经免疫新西兰白兔获得的免疫血清的效价高达1:70000，可用于对金刚烷胺进行快速、准确的免疫检测和免疫分析。

1. 一种金刚烷胺人工半抗原,其特征在于,其分子结构式如( I )所示:



( I )。

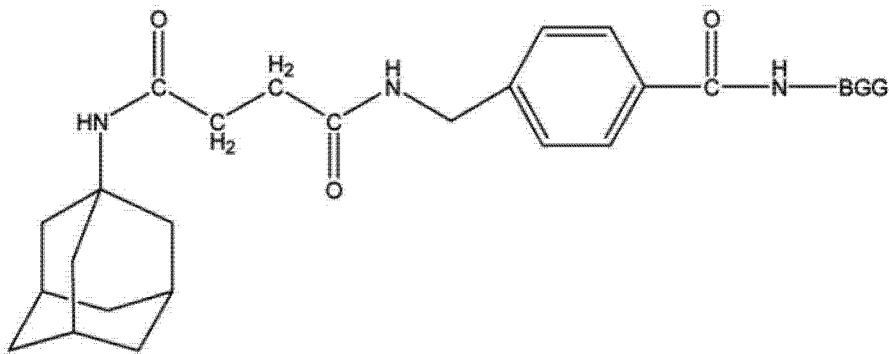
2. 如权利要求 1 所述金刚烷胺人工半抗原的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将金刚烷胺与丁二酸酐按摩尔比 1:1.1 ~ 1.5 混合,于 100 ~ 105℃ 下搅拌反应 16 ~ 17h,反应产物经水-二氯甲烷萃取,取有机相,得无色油状产物 A;

(2) 将无色油状产物 A、N-羟基琥珀酰亚胺、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐按摩尔比 1:1.35 ~ 1.5:1.35 ~ 1.5 混合,于 20 ~ 30℃ 下搅拌反应 18 ~ 20h,反应产物经洗涤、旋蒸后,得无色油状产物 B;

(3) 将无色油状产物 B 与对氨基苯甲酸按摩尔比 1:1 混合,于 pH9 ~ 10、20 ~ 30℃ 下搅拌反应 3 ~ 3.5h,反应结束后调节 pH 至 5 ~ 6、用乙酸乙酯萃取,取有机相,获得如权利要求 1 所述的金刚烷胺人工半抗原。

3. 一种金刚烷胺人工抗原,其特征在于,其分子结构式如( II )所示:



( II );

式( II )中,BGG 为牛丙种球蛋白。

4. 如权利要求 3 所述金刚烷胺人工抗原的制备方法,其特征在于,包括:通过混合酸酐法使权利要求 1 所述的金刚烷胺人工半抗原与牛丙种球蛋白结合,获得如权利要求 3 所述的金刚烷胺人工抗原。

5. 如权利要求 4 所述金刚烷胺人工抗原的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(a) 将所述金刚烷胺人工半抗原、三乙胺、氯甲酸异丁酯按摩尔比 1:1 ~ 1.2:1 ~ 1.3 混合,20 ~ 30℃ 下搅拌反应 18 ~ 19h,反应结束后离心取上清液;

(b) 将所述上清液滴加到牛丙种蛋白溶液中,将所得混合液置于 3 ~ 5℃ 下静置过夜,经透析、离心取上清,获得如权利要求 3 所述的金刚烷胺人工抗原。

6. 如权利要求 5 所述金刚烷胺人工抗原的制备方法,其特征在于,步骤 (b) 中,所述牛丙种蛋白溶液的浓度为 5mg/mL,上清液与牛丙种蛋白溶液的体积比为 1:5 ~ 6。
7. 如权利要求 3 所述金刚烷胺人工抗原在制备抗金刚烷胺抗体中的应用。
8. 一种抗金刚烷胺抗体,其特征在于,是由权利要求 3 所述金刚烷胺人工抗原经动物免疫得到的、可与金刚烷胺发生特异性免疫反应的球蛋白。
9. 如权利要求 8 所述抗金刚烷胺抗体在检测金刚烷胺中的应用。

## 一种金刚烷胺人工半抗原、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，具体涉及一种金刚烷胺人工半抗原、人工抗原及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 金刚烷胺可以抑制病毒穿入宿主细胞，并影响病毒的脱壳，抑制其繁殖，在临床上用于预防和治疗人流感病毒的感染，具有价格低廉、药效明显等特点，同时也曾是帕金森综合症的治疗药物。但金刚烷胺蓄积会对人体造成嗜睡、失眠、眩晕、抑郁、恶心、食欲减退等多种不良反应，具有一定的毒副作用。长期使用金刚烷胺还可使病毒产生不同程度的耐药性，诱导产生新型耐药病毒。

[0003] 然而，2012年11月媒体曝出国内养殖的“速生鸡”从孵出到端上餐桌只需45天，不法商贩为了保证其存活，给鸡喂养了大剂量人用药物来抑制禽类的禽流感等病症。2012年12月，央视调查中称，一些养殖户为进一步缩短养殖周期，让原本已经是速成品种的白羽鸡长得更快，偷偷喂食违禁药物，其中包括金刚烷胺等抗病毒药品和地塞米松等激素类药品。“速成鸡”事件的爆发引发了全国消费者对禽肉食品安全的广泛关注和担忧，对建立快速、灵敏、准确的检测技术提出了迫切需求。

[0004] 目前，对金刚烷胺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。

[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，由于包括金刚烷胺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。

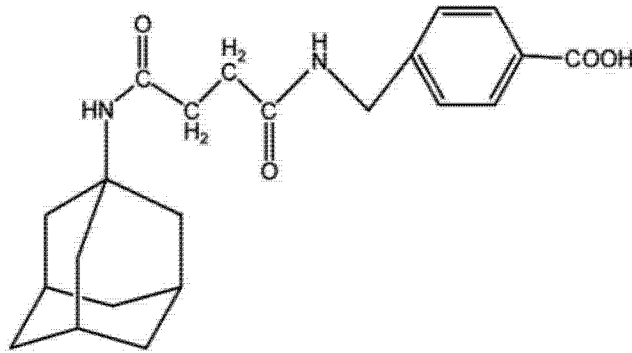
[0006] 现有技术中还未有金刚烷胺人工半抗原、人工抗原的相关报道。

### 发明内容

[0007] 本发明提供了一种金刚烷胺人工半抗原，该金刚烷胺人工半抗原最大程度地保留了金刚烷胺的特征结构，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。

[0008] 一种金刚烷胺人工半抗原，其分子结构式如（I）所示：

[0009]



( I )。

[0010] 本发明还提供了该金刚烷胺人工半抗原的制备方法,包括以下步骤:

[0011] (1) 将金刚烷胺与丁二酸酐按摩尔比 1:1.1 ~ 1.5 混合,于 100 ~ 105°C 下搅拌反应 16 ~ 17h,反应产物经水-二氯甲烷萃取,取有机相,得无色油状产物 A;

[0012] 在该反应条件下,无色油状产物 A 的得率较高,后处理程序较为简单,较易提纯。步骤 (1) 的反应可在吡啶中进行。

[0013] (2) 将无色油状产物 A、N-羟基琥珀酰亚胺、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐按摩尔比 1:1.35 ~ 1.5:1.35 ~ 1.5 混合,于 20 ~ 30°C 下搅拌反应 18 ~ 20h,反应产物经洗涤、旋蒸后,得无色油状产物 B;

[0014] 在该反应条件下,无色油状产物 B 的得率较高,后处理程序较为简单,较易提纯。步骤 (2) 的反应可在二氯甲烷中进行。

[0015] 优选地,反应产物依次用 0.1mol/L 盐酸水溶液、双蒸水、饱和碳酸氢钠溶液、饱和氯化钠溶液洗涤。采用如上酸洗、水洗、碱洗、再盐洗的程序可以除去反应体系中偏碱,偏酸的副产物或者杂质,以达到大致提纯的目的。

[0016] (3) 将无色油状产物 B 与对氨基苯甲酸按摩尔比 1:1 混合,于 pH9 ~ 10、20 ~ 30°C 下搅拌反应 3 ~ 3.5h,反应结束后调节 pH 至 5 ~ 6、用乙酸乙酯萃取,取有机相,获得所述的金刚烷胺人工半抗原。

[0017] 优选地,先将无色油状产物 B 溶于四氢呋喃中,得到产物 B 溶液;将等摩尔量的对氨基苯甲酸溶于四氢呋喃与双蒸水的混合液中,得到对氨基苯甲酸溶液,然后将对氨基苯甲酸溶液滴加到产物 B 溶液中,混合。

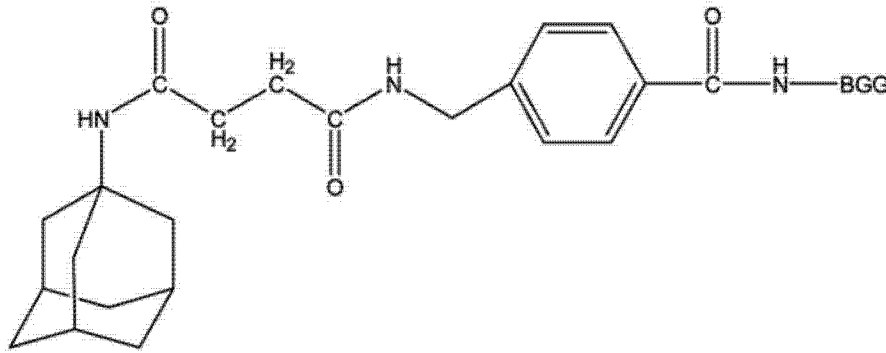
[0018] 更优选地,四氢呋喃与双蒸水的混合液中,四氢呋喃与双蒸水的体积比为 2 ~ 4:1,最优选为 2:1。

[0019] 通过上述方法,在金刚烷胺的 N 位上引入连接臂,在该修饰位点上引入连接臂能最大程度地保留金刚烷胺的特征结构。

[0020] 与采用一般的饱和链烃作为连接臂相比,本发明所采用的连接臂中含有苯环结构,可使人工半抗原的特异性增强,在溶液中保持构象稳定,提高所形成的人工抗原 (II) 的免疫特性。

[0021] 本发明还提供了一种金刚烷胺人工抗原,其分子结构式如 (II) 所示:

[0022]



( II );

[0023] 式 ( II ) 中, BGG 为牛丙种球蛋白。

[0024] 本发明还提供了一种所述金刚烷胺人工抗原的制备方法, 包括: 通过混合酸酐法或 N- 羟基琥珀酰亚胺活性酯法使所述金刚烷胺人工半抗原与牛丙种球蛋白结合, 获得所述金刚烷胺人工抗原。

[0025] 具体地, 采用混合酸酐法制备金刚烷胺人工抗原时, 包括以下步骤:

[0026] (a) 将所述金刚烷胺人工半抗原、三乙胺、氯甲酸异丁酯按摩尔比 1:1 ~ 1.2:1 ~ 1.3 混合 20 ~ 30℃ 下搅拌反应 18 ~ 19h, 反应结束后离心取上清液;

[0027] (b) 将所述上清液滴加到牛丙种蛋白溶液中, 将所得混合液置于 3 ~ 5℃ 下静置过夜, 经透析、离心取上清, 获得所述的金刚烷胺人工抗原。

[0028] 如未作特殊说明, 本发明中所述牛丙种蛋白溶液是将牛丙种蛋白溶于钠离子浓度为 0.1 ~ 0.2mol/L 的 PBS 缓冲液 (pH 7.2 ~ 7.4) 中制成的。

[0029] 步骤 (b) 中, 所述牛丙种蛋白溶液的浓度为 5mg/mL, 上清液与牛丙种蛋白溶液的体积比为 1:5 ~ 6。

[0030] 本发明选用牛丙种球蛋白 (BGG) 作为大分子载体, 与牛血清蛋白 (BSA) 相比具有以下优点: ①牛丙种球蛋白能够结合更多的金刚烷胺人工半抗原, 免疫原性较好; ②从实验看, 牛丙种球蛋白与金刚烷胺人工半抗原的结合更稳定, 牛血清蛋白与金刚烷胺人工半抗原结合后, 金刚烷胺人工半抗原容易在后续处理中脱离, 从而使最终的人工抗原在长期保存中容易产生沉淀, 稳定性差; ③用牛丙种球蛋白与金刚烷胺人工半抗原结合后形成的金刚烷胺人工抗原, 经动物免疫得到的抗金刚烷胺抗体的特异性更好。

[0031] 本发明还提供了所述金刚烷胺人工抗原在制备抗金刚烷胺抗体中的应用。

[0032] 本发明还提供了一种抗金刚烷胺抗体, 是由所述金刚烷胺人工抗原经动物免疫得到的、可与金刚烷胺发生特异性免疫反应的球蛋白。

[0033] 本发明还提供了所述抗金刚烷胺抗体在检测金刚烷胺中的应用。

[0034] 试验发现, 将所述金刚烷胺人工抗原免疫新西兰白兔, 获得的免疫血清的效价为 1:70000。表明本发明的金刚烷胺人工抗原可免疫获得亲和力高、灵敏度高、特异性强的抗金刚烷胺抗体, 该抗金刚烷胺抗体可用于金刚烷胺的免疫检测和分析。

[0035] 与现有技术相比, 本发明的有益效果为:

[0036] 本发明的金刚烷胺人工半抗原最大程度地保留了金刚烷胺的特征结构, 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; 进一步制备获得的金刚烷胺人工抗原可免疫获得亲和力高、灵敏度高、特异性强的抗金刚烷胺抗体, 经免疫新西兰白兔获得

的免疫血清的效价高达 1:70000,可用于对金刚烷胺进行快速、准确的免疫检测和免疫分析。

#### 附图说明

- [0037] 图 1 为本发明金刚烷胺人工抗原的制备流程图；
- [0038] 其中,Pyridine 表示吡啶,NHS 表示 N-羟基琥珀酰亚胺,EDC.HCl 表示 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,THC 表示四氢呋喃,Et<sub>3</sub>N 表示三乙胺,DMF 表示 N,N-二甲基甲酰胺,BGG 表示牛丙种球蛋白,下同；
- [0039] 图 2 为本发明金刚烷胺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 为本发明金刚烷胺半抗原的质谱图；
- [0042] 其中,Relative Abundance 表示相对丰度;m/z 表示荷质比；
- [0043] 图 4 为牛丙种球蛋白、金刚烷胺人工半抗原、金刚烷胺人工抗原的紫外扫描图；
- [0044] 其中,Abs 表示紫外-可见吸收光谱,WL(nm) 表示波长(nm)；
- [0045] 图 5 为对比例 1 金刚烷胺人工抗原的制备流程图；
- [0046] 其中,DCC 表示环己基碳酰二亚胺,BSA 表示牛血清蛋白；
- [0047] 图 6 为对比例 2 金刚烷胺人工抗原的制备流程图；
- [0048] 图 7 为对比例 3 金刚烷胺人工抗原的制备流程图；
- [0049] 图 8 为对比例 4 金刚烷胺人工抗原的制备流程图；
- [0050] 图 9 为对比例 5 金刚烷胺人工抗原的制备流程图；
- [0051] 图 10 为对比例 6 金刚烷胺人工抗原的制备流程图；
- [0052] 图 11 为对比例 7 金刚烷胺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] 本实施一种金刚烷胺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 200mg 金刚烷胺(1.322mmol),198mg 丁二酸酐(1.980mmol)于 100ml 单口圆底烧瓶中,加入 10ml 吡啶,加入搅拌子,将油浴升温至 100℃搅拌回流反应 16 小时;反应结束后减压蒸干溶剂,残液用 15ml 双蒸水溶解,水溶液用 3×15ml 二氯甲烷萃取,合并有机相,并用 15ml 双蒸水洗涤,有机相经无水硫酸镁干燥,过滤,转干后得到 252mg 无色油状产物 A;

[0058] 对该无色油状产物 A 进行 TLC 检测,层析液为质量百分浓度 95%的乙醇水溶液,产物 R<sub>f</sub> = 0.3。

[0059] ②在 50ml 单口圆底烧瓶中,将 252mg(1.0mmol)无色油状产物 A 溶于 12.6ml 的二氯甲烷中,加入 155mg 的 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,1.35mmol)和 258mg 的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC.HCl,1.35mmol),20℃搅拌反应 18 小时;反应结束后,将反应液转入 125ml 的分液漏斗中,依次用 12.6ml 浓度为 0.1mol/L 的盐酸水溶液,12.6ml

的双蒸水, 12.6ml 的饱和碳酸氢钠溶液和 12.6ml 的饱和氯化钠溶液洗涤, 有机相经无水硫酸镁干燥, 过滤, 转干后得 288mg (0.827mmol) 无色油状产物 B;

[0060] 对该无色油状产物 A 进行 TLC 检测, 层析液为质量百分浓度 95% 的乙醇水溶液, 产物  $R_f = 0.9$ ;

[0061] ③将 125mg (0.827mmol) 对甲氨基苯甲酸溶于 5ml 双蒸水和 10ml 四氢呋喃的混合液中, 获得对甲氨基苯甲酸溶液, 待用; 将 288mg 无色油状产物 B (0.827mmol) 溶于 10ml 的四氢呋喃溶液中, 获得产物 B 溶液; 将对甲氨基苯甲酸溶液缓慢滴入产物 B 溶液中, 5min 滴加完毕, 加入 1.2ml 浓度为 1mol/L 的氢氧化钠水溶液, 此时溶液  $pH = 9$ ,  $20^{\circ}C$  搅拌反应 3 小时; 反应结束后滴加 6mol/L 的盐酸水溶液调  $pH = 5$ , 用  $2 \times 15ml$  乙酸乙酯萃取, 合并有机相, 经干燥, 过滤, 转干后得到白色泡状固体, 将该白色泡状固体溶于 5ml 无水乙醇中, 用薄层层析法纯化得到金刚烷胺半抗原 (如式 I) 220mg (0.572mmol)。薄层层析法采用的层析液为质量百分浓度 95% 的乙醇水溶液, 产物  $R_f = 0.6$ 。

[0062] 金刚烷胺人工半抗原的核磁数据为:

[0063]  $^1H-NMR$  (400MHz):  $\delta$  1.16-1.20 (m, 3H),  $\delta$  1.36-1.56 (m, 10H),  $\delta$  1.71-1.74 (m, 2H),  $\delta$  2.40-2.50 (t, 4H),  $\delta$  4.46 (s, 2H),  $\delta$  7.27 (d, 2H),  $\delta$  8.01 (d, 2H);

[0064]  $^{13}C-NMR$  (100MHz):  $\delta$  28.1 (3CH),  $\delta$  32.0 ( $CH_2$ ),  $\delta$  32.6 ( $CH_2$ ),  $\delta$  36.8 (C),  $\delta$  37.8 (3 $CH_2$ ),  $\delta$  41.2 (3 $CH_2$ ),  $\delta$  44.1 ( $CH_2$ ),  $\delta$  126.9 (2CH),  $\delta$  128.1 (C),  $\delta$  130.1 (2CH),  $\delta$  146.9 (C),  $\delta$  169.4 (C),  $\delta$  172.8 (C),  $\delta$  173.7 (C)。

[0065] 金刚烷胺人工半抗原的液相色谱图见图 2 (紫外检测器, 波长 210nm), 金刚烷胺半抗原的质谱图见图 3。

[0066] 从图 2 可以看出经过纯化得到的金刚烷胺人工半抗原的纯度达到 99.9% 以上, 从图 3 可以看出本实施例得到的金刚烷胺人工半抗原的分子离子峰的质荷比 ( $m/z$ ) 为 386.4, 与其理论分子量 384.5 吻合, 它的四个主要碎片离子峰的质荷比 ( $m/z$ ) 分别为 95.41、136.23、151.25、235.32, 与其四个主要碎片的理论分子量 96、135、152、234 吻合, 结合核磁共振数据可以确定步骤③得到的最终化合物就是本发明所设计的金刚烷胺人工半抗原。

[0067] (2) 金刚烷胺人工抗原的制备:

[0068] ④将 220mg (0.572mmol) 金刚烷胺人工半抗原置于 50ml 圆底烧瓶中, 加入 11ml N,N-二甲基甲酰胺 (DMF), 再加入 58mg (0.572mmol) 三乙胺和 78.1mg (0.572mmol) 氯甲酸异丁酯,  $20^{\circ}C$  搅拌反应 18 小时, 反应结束后离心, 取上清液, 备用。

[0069] ⑤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, 得到钠离子浓度为 0.17mol/L 的 PBS 缓冲液,  $pH$  为 7.4。

[0070] ⑥称取 0.30g 牛丙种球蛋白溶于 60ml 步骤⑤的 PBS 缓冲液中, 得到浓度为 5mg/ml 的牛丙种球蛋白溶液。

[0071] ⑦在快速搅拌下, 将步骤④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  $4^{\circ}C$  条件下静置保存过夜, 得到人工抗原混合液。

[0072] ⑧将人工抗原混合液移入透析袋中, 用步骤⑤的 PBS 缓冲液透析 9 次, 透析结束后离心取上清液即得到人工抗原: 金刚烷胺-牛丙种球蛋白偶联物 (如式 II)。金刚烷胺人

工抗原制备前后的紫外扫描图见图 4。

[0073] 图 4 中, 曲线 a 为金刚烷胺人工半抗原的紫外扫描图, 曲线 b 为金刚烷胺人工抗原的紫外扫描图, 曲线 c 为牛丙种球蛋白的紫外扫描图。金刚烷胺人工半抗原的最大吸收波长为 290nm, 金刚烷胺人工抗原的最大吸收波长为 278nm, 与金刚烷胺半抗原、牛丙种球蛋白相比, 金刚烷胺人工抗原的最大吸收波长出现明显变化。

[0074] 实施例 2

[0075] 本实施一种金刚烷胺人工抗原的制备方法 (反应历程如图 1), 包括以下步骤:

[0076] (1) 人工半抗原的制备:

[0077] ①称取 200mg 金刚烷胺 (1.322mmol), 145.6mg 丁二酸酐 (1.455mmol) 于 100ml 单口圆底烧瓶中, 加入 10ml 吡啶, 加入搅拌子, 将油浴升温至 105℃ 搅拌回流反应 17 小时; 反应结束后减压蒸干溶剂, 残液用 15ml 双蒸水溶解, 水溶液用 3×15ml 二氯甲烷萃取, 合并有机相, 并用 15ml 双蒸水洗涤, 有机相经无水硫酸镁干燥, 过滤, 转干后得到 251.5mg 无色油状产物 A;

[0078] 对该无色油状产物 A 进行 TLC 检测, 层析液为质量百分浓度 95% 的乙醇水溶液, 产物  $R_f = 0.3$ ;

[0079] ②在 50ml 单口圆底烧瓶中, 将 251.5mg (1.0mmol) 无色油状产物 A 溶于 12.6ml 的二氯甲烷中, 加入 172.6mg 的 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS, 1.5mmol) 和 287.55mg 的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC·HCl, 1.5mmol), 30℃ 搅拌反应 20 小时; 反应结束后, 将反应液转入 125ml 的分液漏斗中, 依次用 12.6ml 浓度为 0.1mol/L 的盐酸水溶液, 12.6ml 的双蒸水, 12.6ml 的饱和碳酸氢钠溶液和 12.6ml 的饱和氯化钠溶液洗涤, 有机相经无水硫酸镁干燥, 过滤, 转干后得 285.6mg (0.82mmol) 无色油状产物 B;

[0080] 对该无色油状产物 A 进行 TLC 检测, 层析液为质量百分浓度 95% 的乙醇水溶液, 产物  $R_f = 0.9$ ;

[0081] ③将 123.9mg (0.82mmol) 对甲氨基苯甲酸溶于 5ml 双蒸水和 20ml 四氢呋喃的混合液中, 获得对甲氨基苯甲酸溶液, 待用; 将 285.6mg 无色油状产物 B (0.82mmol) 溶于 10ml 的四氢呋喃溶液中, 获得产物 B 溶液; 将对甲氨基苯甲酸溶液缓慢滴入产物 B 溶液中, 5min 滴加完毕, 加入 1.2ml 浓度为 1mol/L 的氢氧化钠水溶液, 此时溶液  $pH = 10$ , 30℃ 搅拌反应 3.5 小时; 反应结束后滴加 6mol/L 的盐酸水溶液调  $pH = 6$ , 用 2×15ml 乙酸乙酯萃取, 合并有机相, 经干燥, 过滤, 转干后得到白色泡状固体, 将该白色泡状固体溶于 5ml 无水乙醇中, 用薄层层析法纯化得到金刚烷胺半抗原 (如式 I) 217.2mg (0.565mmol)。薄层层析法采用的层析液为质量百分浓度 95% 的乙醇水溶液, 产物  $R_f = 0.6$ 。

[0082] 金刚烷胺半抗原的核磁数据为:

[0083]  $^1H-NMR$  (400MHz):  $\delta$  1.16-1.20 (m, 3H),  $\delta$  1.36-1.56 (m, 10H),  $\delta$  1.71-1.74 (m, 2H),  $\delta$  2.40-2.50 (t, 4H),  $\delta$  4.46 (s, 2H),  $\delta$  7.27 (d, 2H),  $\delta$  8.01 (d, 2H);

[0084]  $^{13}C-NMR$  (100MHz):  $\delta$  28.1 (3CH),  $\delta$  32.0 (CH<sub>2</sub>),  $\delta$  32.6 (CH<sub>2</sub>),  $\delta$  36.8 (C),  $\delta$  37.8 (3CH<sub>2</sub>),  $\delta$  41.2 (3CH<sub>2</sub>),  $\delta$  44.1 (CH<sub>2</sub>),  $\delta$  126.9 (2CH),  $\delta$  128.1 (C),  $\delta$  130.1 (2CH),  $\delta$  146.9 (C),  $\delta$  169.4 (C),  $\delta$  172.8 (C),  $\delta$  173.7 (C)。

[0085] 金刚烷胺人工半抗原的液相色谱和质谱结果同实施例 1。表明步骤③得到的最终化合物就是本发明所设计的金刚烷胺人工半抗原。

[0086] (2) 金刚烷胺人工抗原的制备：

[0087] ④将 217.2mg (0.565mmol) 金刚烷胺人工半抗原置于 50ml 圆底烧瓶中,加入 11ml N,N-二甲基甲酰胺 (DMF),再加入 68.6mg (0.678mmol) 三乙胺和 100.3mg (0.73mmol) 氯甲酸异丁酯,30℃搅拌反应 19 小时,反应结束后离心,取上清液。

[0088] ⑤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,得到钠离子浓度为 0.17mol/L 的 PBS 缓冲液, pH 为 7.2。

[0089] ⑥称取 0.30g 牛丙种球蛋白溶于 60ml 步骤⑤的 PBS 缓冲液中,得到浓度为 5mg/ml 的牛丙种球蛋白溶液。

[0090] ⑦在快速搅拌下,将步骤④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 1:6,得到的混合液在 5℃条件下静置保存过夜,得到人工抗原混合液。

[0091] ⑧将人工抗原混合液移入透析袋中,用上述 PBS 缓冲液透析 10 次,透析结束后离心取上清液即得到人工抗原:金刚烷胺-牛丙种球蛋白偶联物(如式 II)。金刚烷胺人工抗原制备前后的紫外扫描结果同实施例 1。

[0092] 对比例 1

[0093] 本实施一种金刚烷胺人工抗原的制备方法(反应历程如图 5),包括以下步骤:

[0094] (1) 金刚烷胺人工半抗原的制备:

[0095] ①称取 200mg 金刚烷胺 (1.322mmol), 198mg 丁二酸酐 (1.980mmol) 于 100ml 单口圆底烧瓶中,加入 10ml 吡啶,加入搅拌子,将油浴升温至 100℃搅拌回流反应 16 小时;反应结束后减压蒸干溶剂,残液用 15ml 双蒸水溶解,水溶液用 3×15ml 二氯甲烷萃取,合并有机相,并用 15ml 双蒸水洗涤,有机相经无水硫酸镁干燥,过滤,转干后得到 244mg 无色油状产物 A,经过柱分离后得 160mg 金刚烷胺人工半抗原(如式 III);

[0096] 对式 III 的金刚烷胺人工半抗原进行 TLC 检测,层析液为 95%乙醇,产物  $R_f = 0.3$ 。

[0097] (2) 金刚烷胺人工抗原的制备:

[0098] ②称取 80mg (0.317mmol) 人工半抗原 III 于 50ml 圆底烧瓶中,加入 4ml N,N-二甲基甲酰胺 (DMF),再加入 55mg (0.476mmol) N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和 98mg (0.476mmol) 环己基碳酰二亚胺 (DCC),室温搅拌反应过夜,反应结束后离心,取上清液,备用。

[0099] ③称取 14.5g 十二水磷酸氢二钠,43.875g 氯化钠,1.495g 二水磷酸二氢钠用双蒸水溶解定容至 5.0L,得到 PBS 缓冲液, pH 为 7.2 ~ 7.4。

[0100] ④称取 100mg 牛血清蛋白溶于 20ml PBS 缓冲液中,得牛血清蛋白溶液。

[0101] ⑤在快速搅拌下,将上清液缓慢滴加到牛血清蛋白溶液,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,既得到人工抗原混合液。

[0102] ⑥将人工抗原混合液移入透析袋中,用上述 PBS 缓冲液透析 7 次,透析结束后离心取上清液,即得到金刚烷胺人工抗原 IV。

[0103] 对比例 2

[0104] 本实施一种金刚烷胺人工抗原的制备方法(反应历程如图 6),包括以下步骤:

[0105] (1) 金刚烷胺人工半抗原的制备:

[0106] 与对比例 1 相同。

[0107] (2) 金刚烷胺人工抗原的制备：

[0108] 采用牛丙种蛋白作载体，与金刚烷胺人工半抗原III进行偶联，偶联步骤与对比例 1 相同，得到金刚烷胺人工抗原 V。

[0109] 对比例 3

[0110] 本实施一种金刚烷胺人工抗原的制备方法（反应历程如图 7），包括以下步骤：

[0111] (1) 金刚烷胺人工半抗原的制备：

[0112] ①与对比例 1 相同。

[0113] (2) 金刚烷胺人工抗原的制备：

[0114] ②称取 80mg (0.317mmol) 金刚烷胺人工半抗原III置于 50ml 圆底烧瓶中，加入 4ml N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)，再加入 32mg (0.317mmol) 三乙胺和 43mg (0.317mmol) 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。

[0115] ③ - ⑥与对比例 1 相同；得到金刚烷胺人工抗原 VI。

[0116] 对比例 4

[0117] 本实施一种金刚烷胺人工抗原的制备方法（反应历程如图 8），包括以下步骤：

[0118] (1) 金刚烷胺人工半抗原的制备：

[0119] ①与对比例 1 相同。

[0120] (2) 金刚烷胺人工抗原的制备：

[0121] ②与对比例 3 相同。

[0122] ③ - ⑥与对比例 2 相同；得到金刚烷胺人工抗原 VII。

[0123] 对比例 5

[0124] 本实施一种金刚烷胺人工抗原的制备方法（反应历程如图 9），包括以下步骤：

[0125] (1) 金刚烷胺人工半抗原的制备：

[0126] ① - ③与实施例 1 相同。

[0127] (2) 金刚烷胺人工抗原的制备：

[0128] ④称取 55mg (0.143mmol) 金刚烷胺人工半抗原 I 置于 50ml 圆底烧瓶中，加入 2.75ml N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)，再加入 25mg (0.215mmol) N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和 44mg (0.215mmol) 环己基碳酰二亚胺 (DCC)，室温搅拌反应 18 小时，反应结束后离心，取上清液，备用。

[0129] ⑤称取 14.5g 十二水磷酸氢二钠，43.875g 氯化钠，1.495g 二水磷酸二氢钠用双蒸水溶解定容至 5.0L，得到 PBS 缓冲液，pH 为 7.4。

[0130] ⑥称取 70mg 牛血清蛋白溶于 14ml PBS 缓冲液中，得到牛血清蛋白溶液。

[0131] ⑦在快速搅拌下，将上清液缓慢滴加到牛血清蛋白溶液，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，既得到人工抗原混合液。

[0132] ⑧将人工抗原混合液移入透析袋中，用上述 PBS 缓冲液透析 9 次，透析结束后离心，取上清液，即得金刚烷胺人工抗原 VIII。

[0133] 对比例 6

[0134] 本实施一种金刚烷胺人工抗原的制备方法（反应历程如图 10），包括以下步骤：

[0135] (1) 金刚烷胺人工半抗原的制备：

[0136] ① - ③与实施例 1 相同。

[0137] (2) 金刚烷胺人工抗原的制备：

[0138] 采用牛丙种蛋白作载体，与金刚烷胺人工半抗原 I 进行偶联，偶联步骤与对比例 5 相同，得到金刚烷胺人工抗原 IX。

[0139] 对比例 7

[0140] 本实施一种金刚烷胺人工抗原的制备方法（反应历程如图 11），包括以下步骤：

[0141] (1) 金刚烷胺人工半抗原的制备：

[0142] ① - ③ 与实施例 1 相同。

[0143] (2) 金刚烷胺人工抗原的制备：

[0144] ④ - ⑤ 与实施例 1 相同。

[0145] ⑥ 称取 0.30g 牛血清蛋白溶于 60ml PBS 缓冲液中，得到牛血清蛋白溶液，备用。

[0146] ⑦ - ⑧ 与对比例 5 相同，得金刚烷胺人工抗原 X。

[0147] 检测例 金刚烷胺人工抗原的性能测定

[0148] (1) 金刚烷胺人工抗原的鉴定：

[0149] 摩尔吸收系数  $\epsilon$ ：用步骤⑤的 PBS 缓冲液配制配制浓度为  $0 \mu\text{g/ml}$ 、 $5 \mu\text{g/ml}$ 、 $10 \mu\text{g/ml}$ 、 $20 \mu\text{g/ml}$ 、 $30 \mu\text{g/ml}$ 、 $40 \mu\text{g/ml}$  的金刚烷胺人工半抗原溶液，通过紫外扫描图可知金刚烷胺半抗原的最大吸收波长为 290nm，在 290nm 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： $\epsilon = \text{吸光值} / \text{摩尔浓度}$ 。

[0150] 偶联物蛋白浓度的测定：用步骤⑤的 PBS 缓冲液配制浓度为  $0 \mu\text{g/ml}$ 、 $10 \mu\text{g/ml}$ 、 $20 \mu\text{g/ml}$ 、 $30 \mu\text{g/ml}$ 、 $40 \mu\text{g/ml}$ 、 $60 \mu\text{g/ml}$ 、 $80 \mu\text{g/ml}$ 、 $100 \mu\text{g/ml}$ 、 $120 \mu\text{g/ml}$  的牛丙种球蛋白溶液各 1ml，加入 3ml 考马斯亮蓝染色液，立即混匀， $30^\circ\text{C}$  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。

[0151] 偶联比测定：配制  $100 \mu\text{g/ml}$  的牛丙种球蛋白 PBS 溶液，将偶联物（即金刚烷胺人工抗原）用 PBS 稀释到  $100 \mu\text{g/ml}$ ，在 278nm 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  $\gamma$  为： $\gamma = [(A_1 - A_2) / \epsilon] / (100 \times 10^{-3} / 150000)$ 。

[0152] 其中  $\epsilon$  为摩尔吸光系数 (L/mol)，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 ( $\mu\text{g/ml}$ )。

[0153] 采用牛血清蛋白作载体时，偶联比的计算式为： $\gamma = [(A_1 - A_2) / \epsilon] / (100 \times 10^{-3} / 65000)$ ；其中，65000 为牛血清蛋白的分子量。

[0154] 表 1 各金刚烷胺人工抗原的偶联比和摩尔吸收系数

[0155]

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 或 2	II	19	3.230mg/ml	5225.46
对比例 1	IV	15	2.650mg/ml	5311.45
对比例 2	V	26	3.357mg/ml	5311.45

对比例 3	VI	17	2.985mg/ml	5311.45
对比例 4	VII	23	3.186mg/ml	5311.45
对比例 5	VIII	18	2.743mg/ml	5225.46
对比例 6	IX	21	3.036mg/ml	5225.46
对比例 7	X	2	0.189mg/ml	5225.46

[0156] 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。

[0157] (2) 动物免疫

[0158] 将制备的各金刚烷胺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。

[0159] 表 2 各免疫血清的效价检测结果

[0160]

编号	金刚烷胺人工抗原	免疫血清效价
实施例 1 或 2	II	1:70000
对比例 1	IV	1:2000
对比例 2	V	1:2200
对比例 3	VI	1:3000
对比例 4	VII	1:3400
对比例 5	VIII	1:5000
对比例 6	IX	1:6000
对比例 7	X	/

[0161]

[0162] 由表 2 可见,与实施例 1 和实施例 2 相比,利用各对比例金刚烷胺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。其中对比例 7 得到的金刚烷胺人工抗原 X 较为浑浊,冷冻保存后出现大量沉淀,稳定性很差,故不能作为免疫抗原。而利用金刚烷胺人工抗原 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,能为金刚烷胺的检测提供更加方便快捷准确的途径。

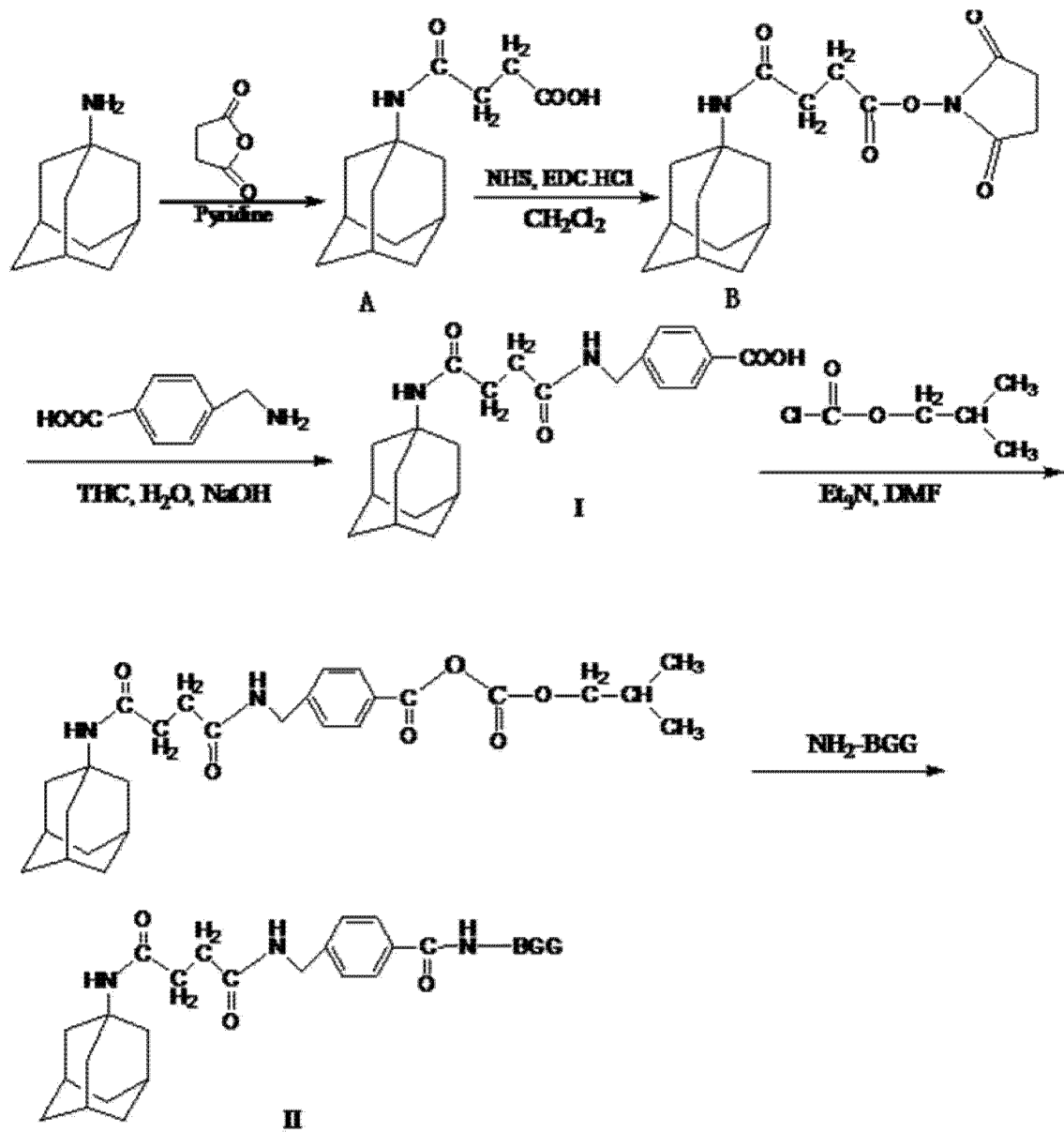


图 1

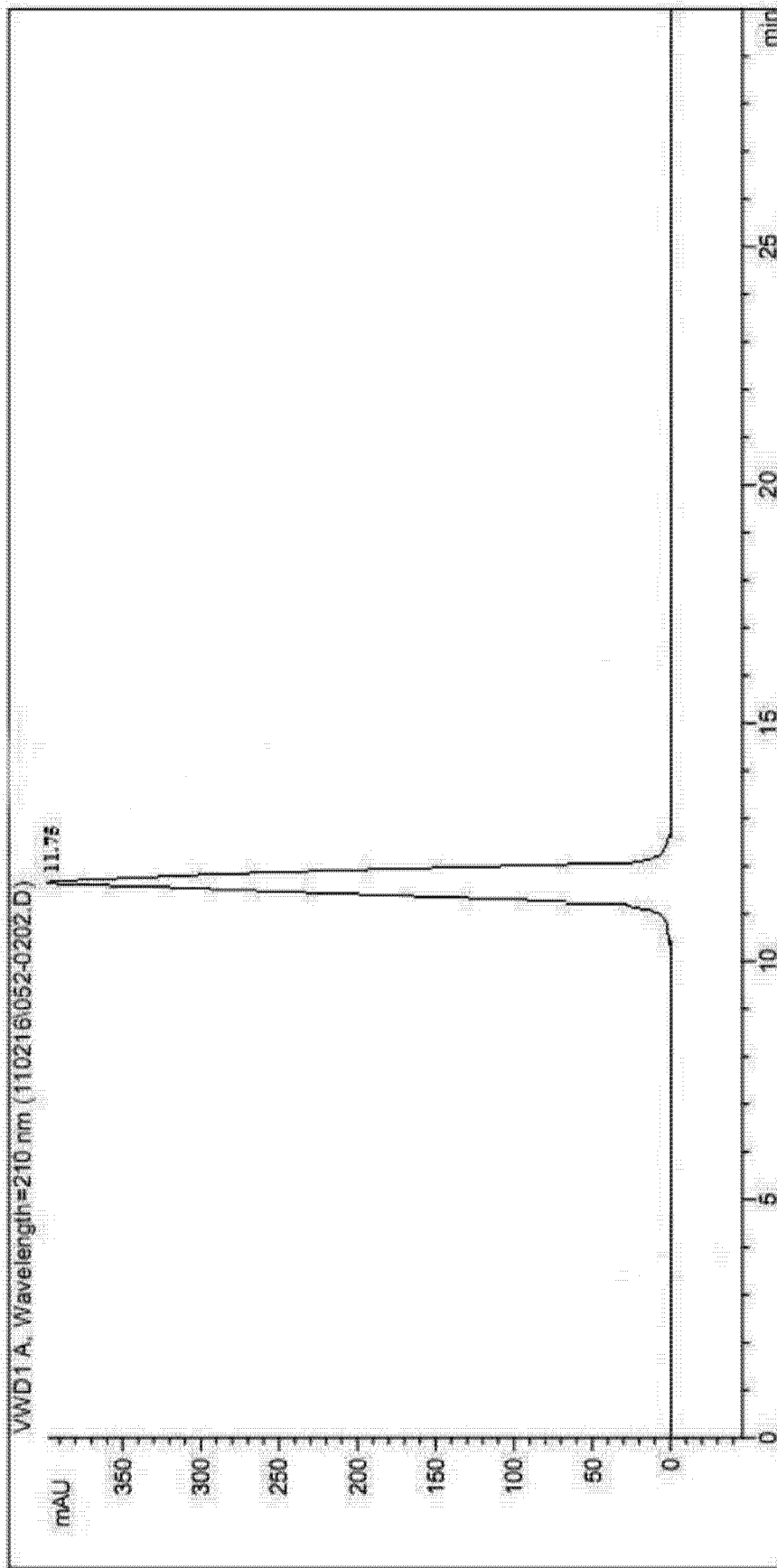


图 2

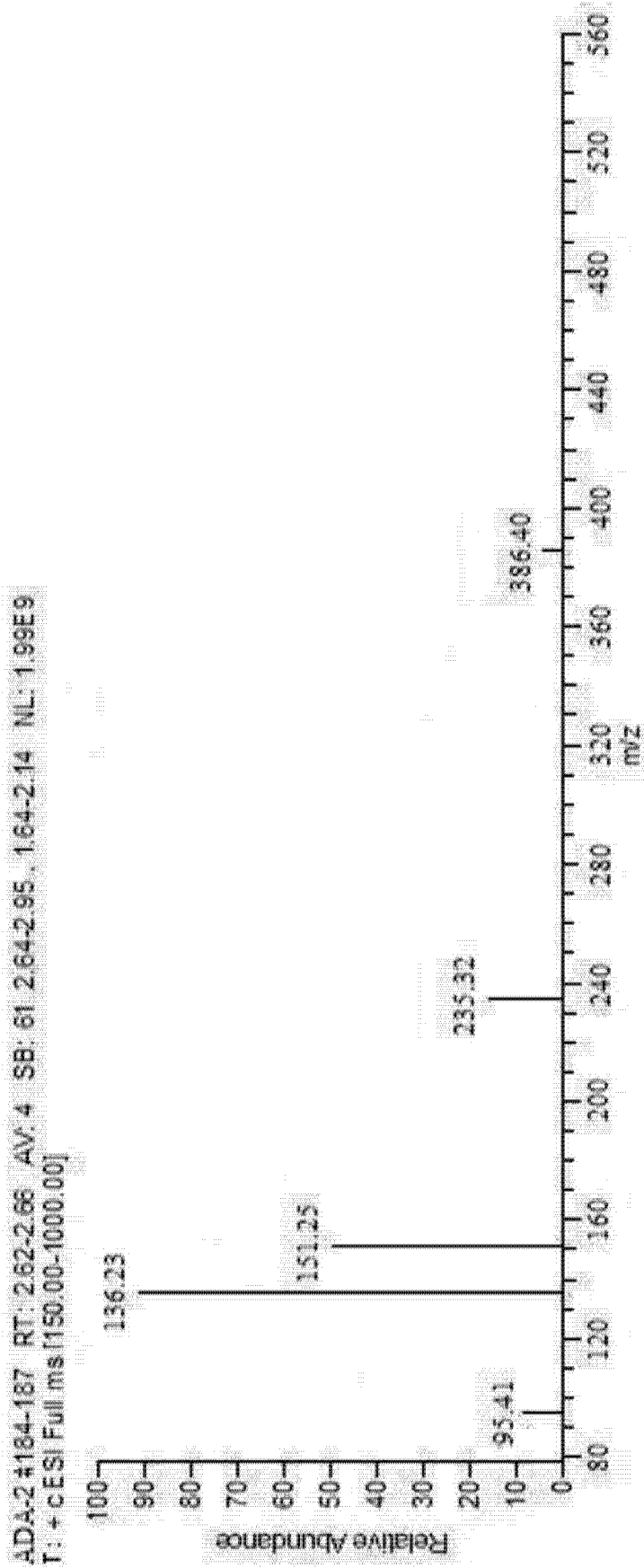


图 3

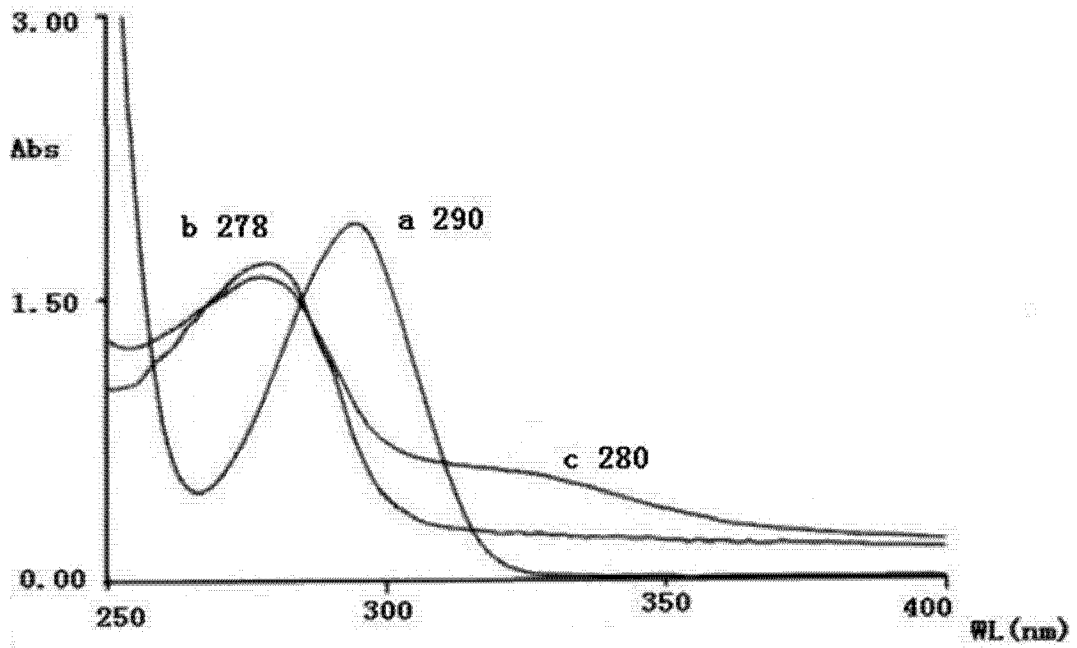


图 4

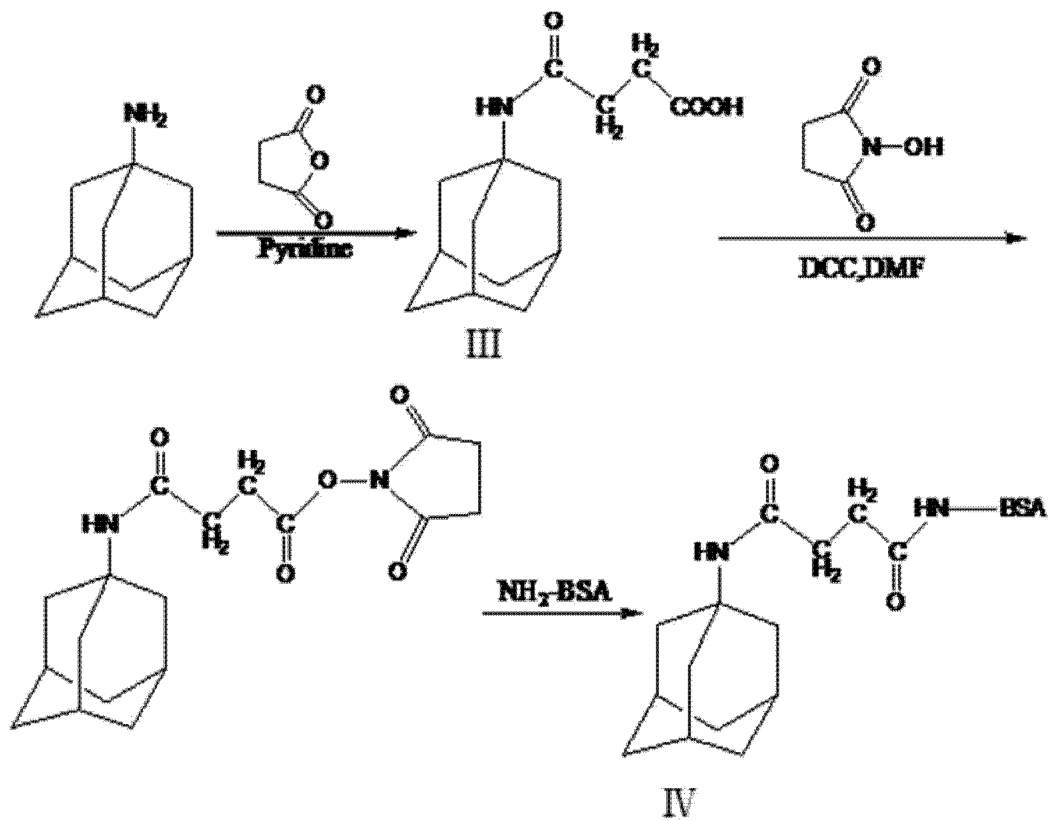


图 5

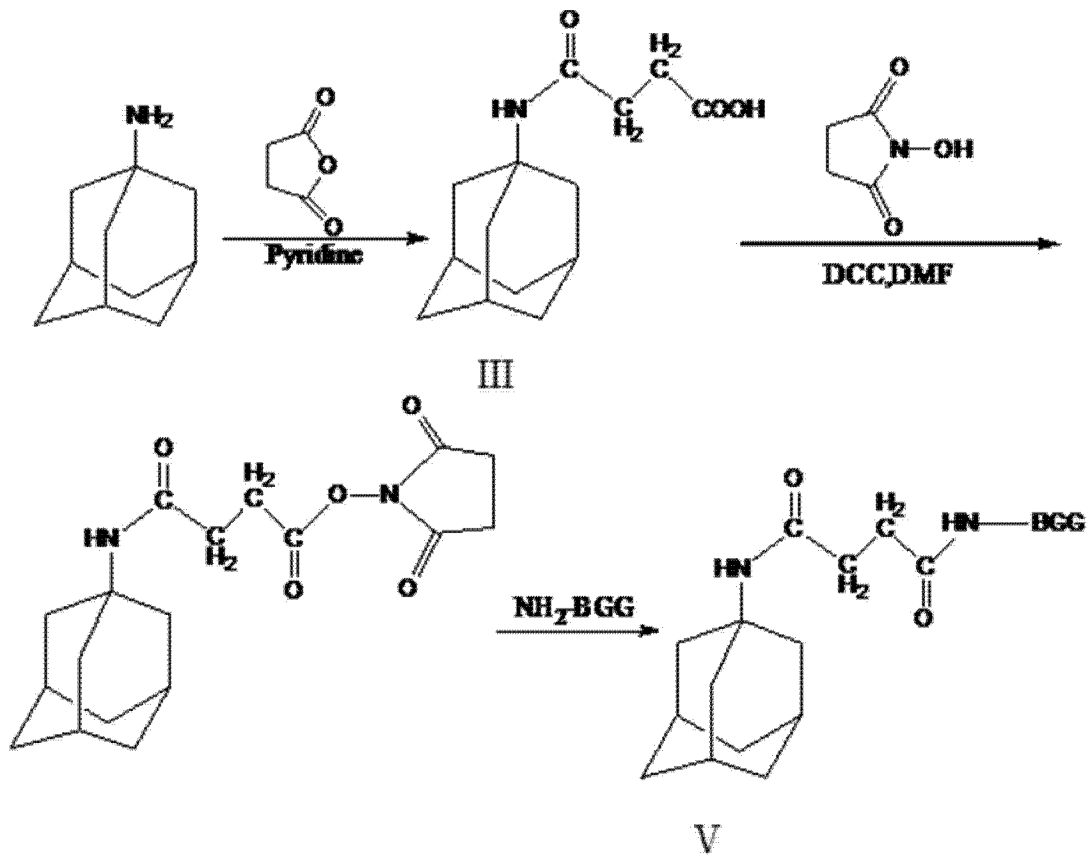


图 6

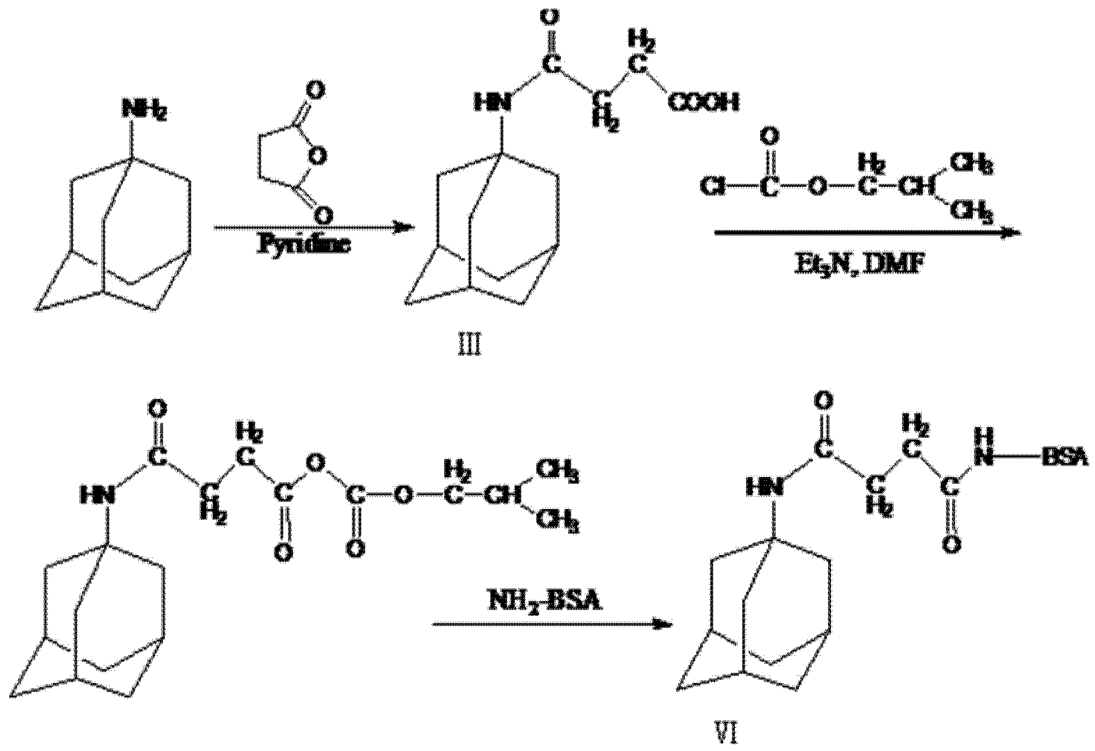


图 7

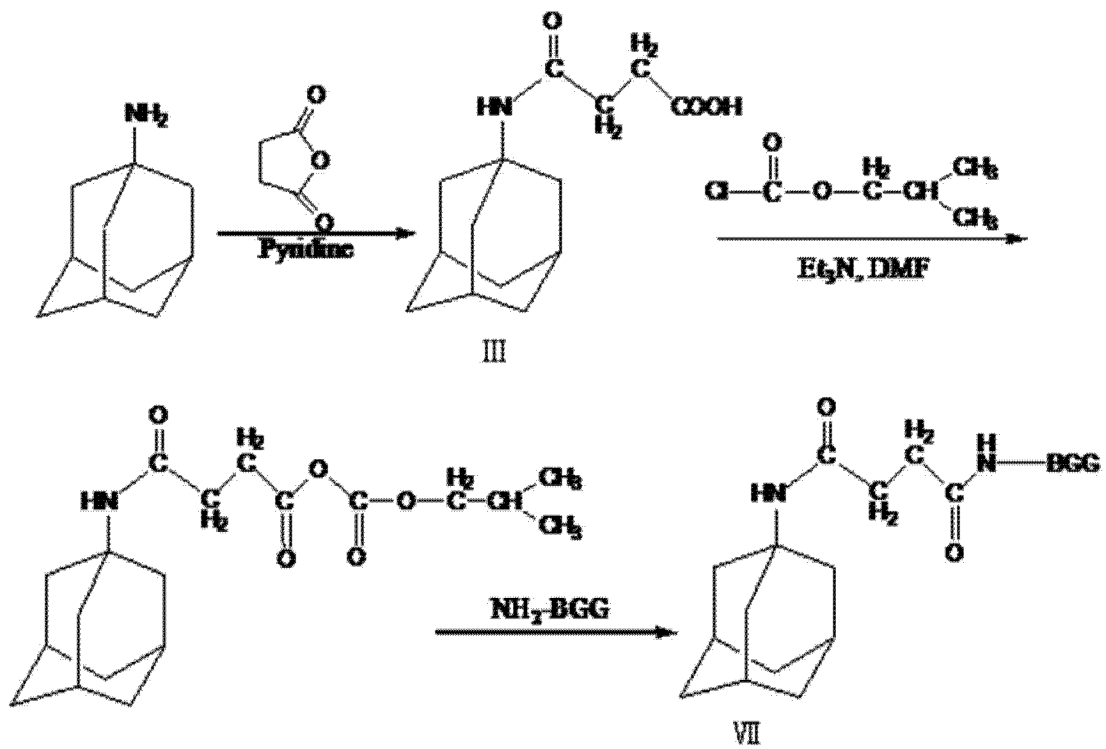


图 8

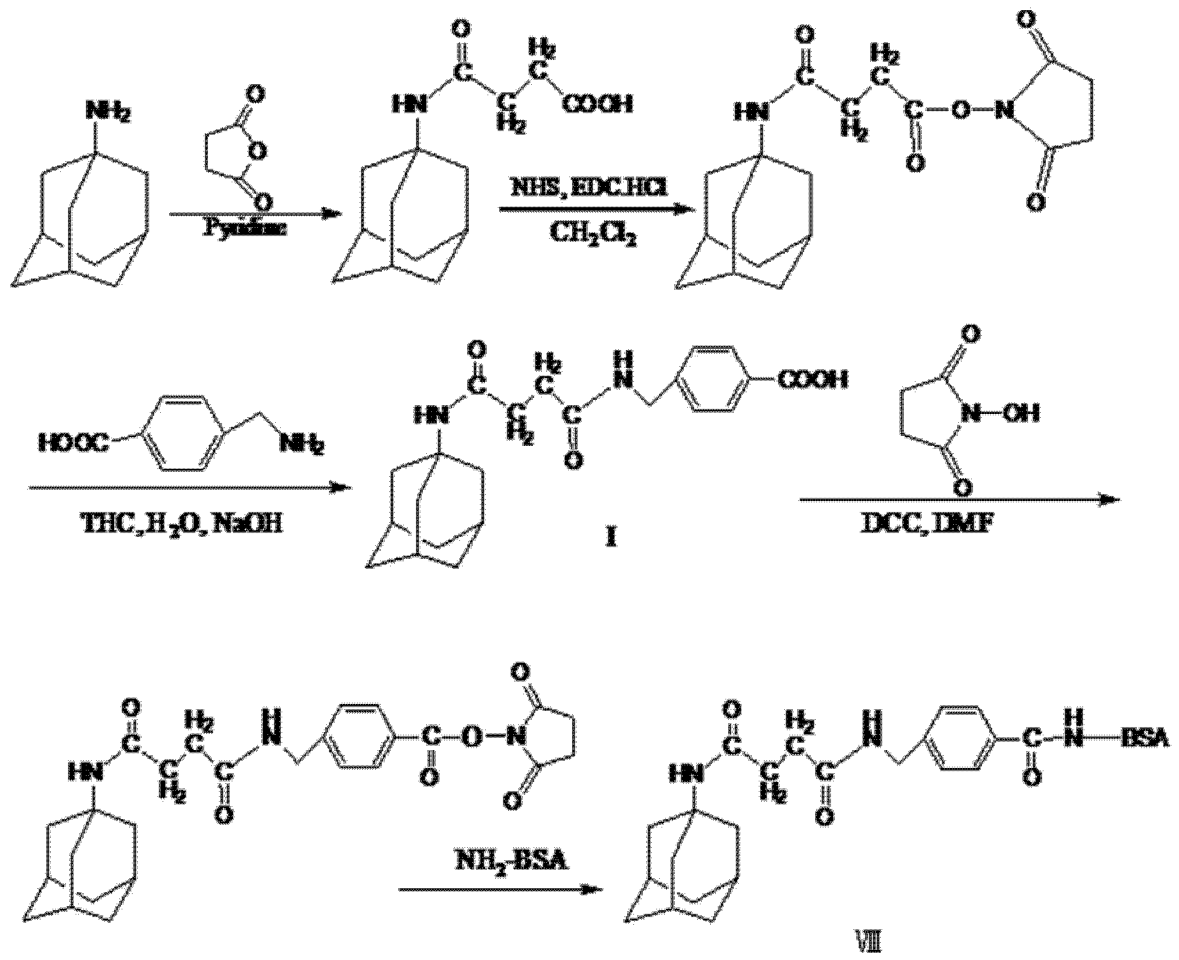


图 9

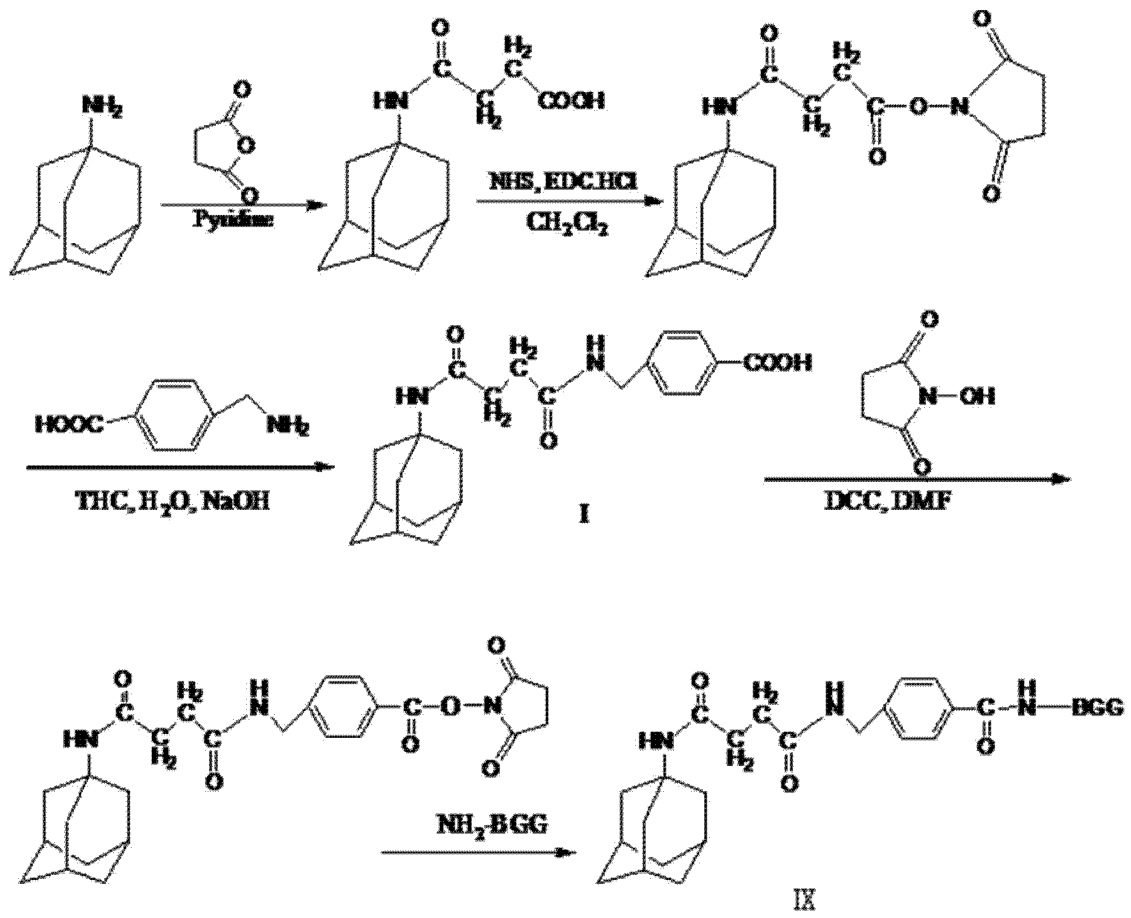


图 10

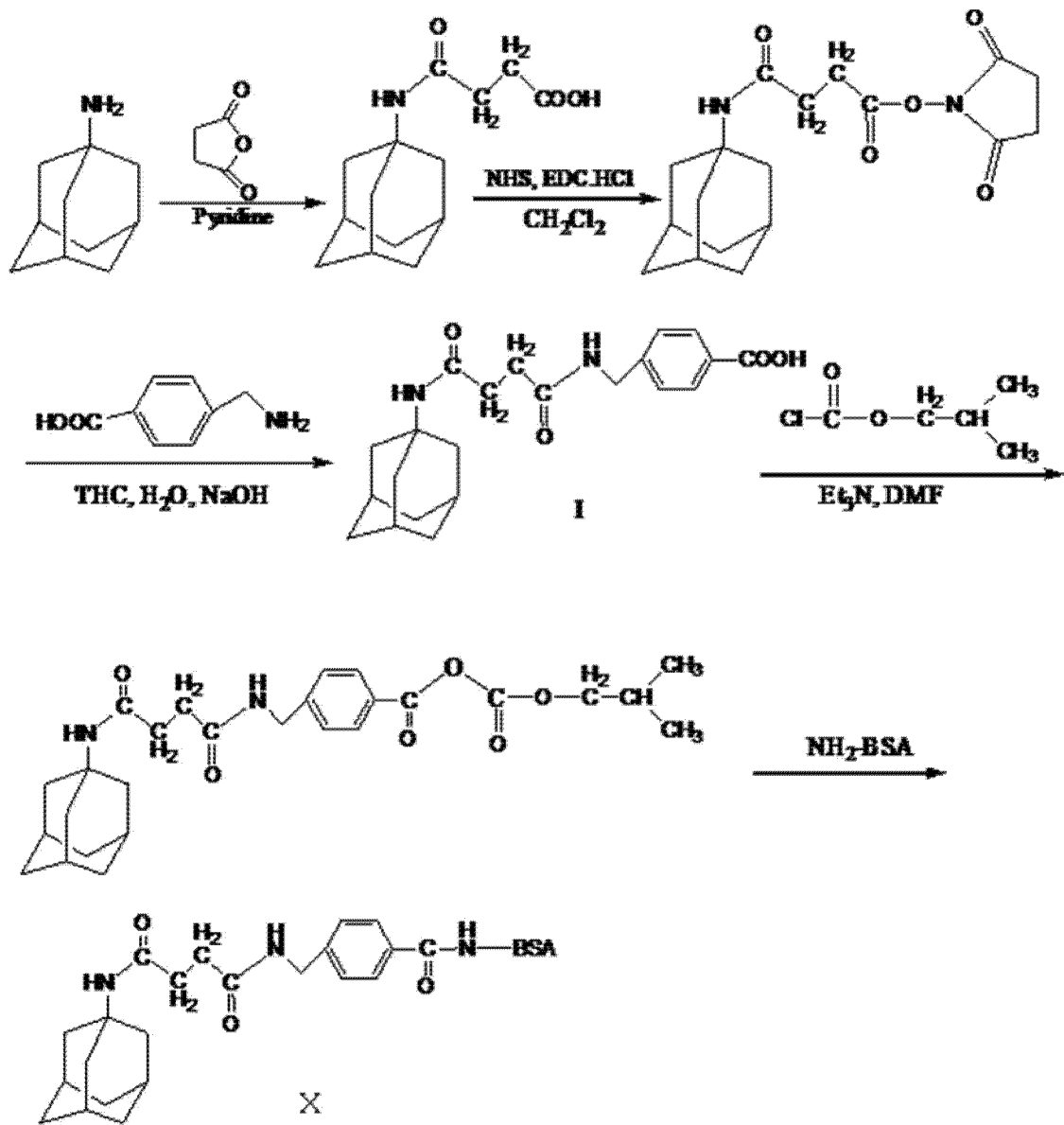
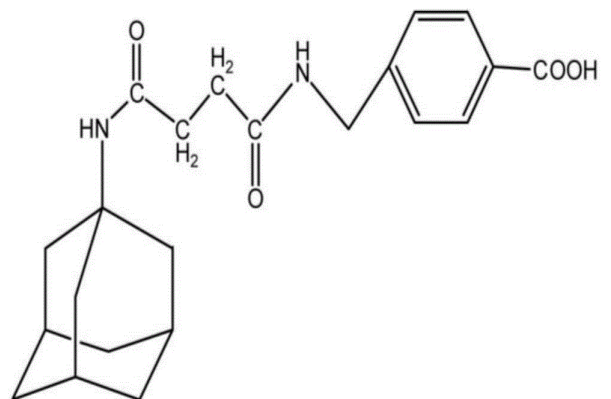


图 11

专利名称(译)	一种金刚烷胺人工半抗原、人工抗原及其制备方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN104402753A</a>	公开(公告)日	2015-03-11
申请号	CN201410652826.6	申请日	2014-11-17
[标]申请(专利权)人(译)	浙江省农业科学院 杭州傲锐生物医药科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	浙江省农业科学院 杭州傲锐生物医药科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	浙江省农业科学院 杭州傲锐生物医药科技有限公司		
[标]发明人	杨华 邵越水 张巧艳 钱鸣蓉 汪建妹 吴俐勤 肖英平		
发明人	杨华 邵越水 张巧艳 钱鸣蓉 汪建妹 吴俐勤 肖英平		
IPC分类号	C07C233/47 C07C231/02 C07K14/47 C07K16/44 G01N33/53		
代理人(译)	胡红娟		
其他公开文献	CN104402753B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种金刚烷胺人工半抗原、人工抗原及其制备方法和应用。金刚烷胺人工半抗原的分子结构式如式(I)，金刚烷胺人工抗原的分子结构式如式(II)。所述应用是所述金刚烷胺人工抗原在制备抗金刚烷胺抗体中的应用。本发明的金刚烷胺人工半抗原最大程度地保留了金刚烷胺的特征结构，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；进一步制备获得的金刚烷胺人工抗原可免疫获得亲和力高、灵敏度高、特异性强的抗金刚烷胺抗体，经免疫新西兰白兔获得的免疫血清的效价高达1:70000，可用于对金刚烷胺进行快速、准确的免疫检测和免疫分析。



( I )。