



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108017631 A

(43)申请公布日 2018.05.11

(21)申请号 201711012835.9

(22)申请日 2017.10.26

(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 高飞

(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 471/04(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

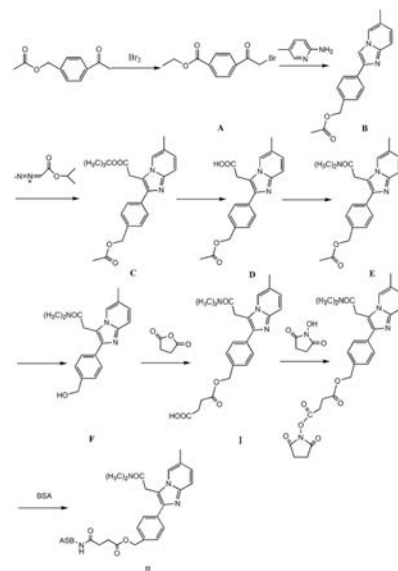
权利要求书2页 说明书10页 附图10页

(54)发明名称

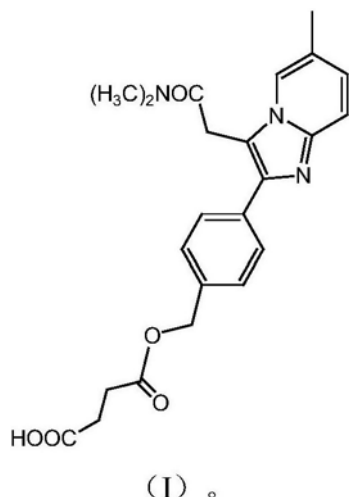
一种唑吡坦人工半抗原、人工抗原及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种唑吡坦人工半抗原、人工抗原及其制备方法和应用。唑吡坦人工半抗原的分子结构如式(I)，唑吡坦人工抗原的分子结构如式(II)。所述应用是唑吡坦人工抗原在制备抗唑吡坦抗体中的应用。本发明的唑吡坦人工半抗原最大程度的保留了唑吡坦的特征结构，且在远离这些特征结构的端位上引入了能与载体蛋白发生偶联的活性基团，可作为抗原决定簇；进一步制备获得的唑吡坦人工抗原可进行免疫获得高亲和力、高灵敏度、强特异性的抗唑吡坦抗体，经免疫Balb/c小鼠获得的免疫腹水的效价高达1:80000，可用于对唑吡坦进行快速、准确的免疫检测和免疫分析。



1.一种唑吡坦人工半抗原,其特征在于,其分子结构如(I)所示:



2. 权利要求1所述唑吡坦人工半抗原的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

(1) 将4-乙酰基苯甲醇乙酸酯和溴以摩尔比为1:1.2混合加入烧瓶中,加入乙酸进行溶解,在室温避光条件下搅拌反应18小时;反应结束后,先将反应液转干,再加入水和二氯甲烷萃取,取有机相,浓缩后得白色晶体A;

(2) 将白色晶体A和2-氨基-5-甲基吡啶以摩尔比为1.2:1加入烧瓶中,同时烧瓶中加入无水乙醇,在80℃油浴中回流搅拌反应20小时;反应结束后,自然冷却至室温经抽滤、烘干后得到淡黄色粉末状固体,用无水乙醇对淡黄色粉末状固体进行重结晶得到白色粉末状固体B;

(3) 将白色粉末状固体B溶于苯中, 80℃加热溶解, 然后加入铜粉, 然后在20分钟内用注射器逐滴滴加重氮基乙酸叔丁酯, 继续回流反应3小时; 其中白色粉末状固体B、铜粉和重氮基乙酸叔丁酯之间的摩尔比为1:2.2:2; 反应结束后自然冷却至室温, 反应产物经过滤、旋蒸、柱色谱分离得到红棕色油状物C;

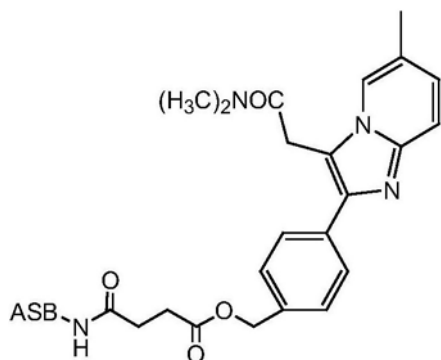
(4) 将红棕色油状物C用二氯甲烷溶解,再加入三氟乙酸,二氯甲烷、三氟乙酸的体积比为1:2,室温搅拌反应6小时;反应结束,先转干,再加入10%的碳酸钾水溶液,用乙醚萃取,取水相,水相经过酸化,再用乙酸乙酯萃取,取有机相,经干燥、过滤、旋蒸得到红棕色油状物D:

(5) 将红棕色油状物D与苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯和N,N-二异丙基乙胺以摩尔比为1:1.5:2加入烧瓶中,用二氯甲烷溶解,室温搅拌反应0.5小时,然后再加入33%的二甲胺水溶液,继续室温搅拌反应3小时;反应产物经洗涤、干燥、过滤、旋蒸、柱色谱分离得红棕色油状物E;

(6) 将红棕色油状物E溶于四氢呋喃中,再逐滴加入0.1N的LiOH水溶液配制成混合溶液,其中红棕色油状物E、四氢呋喃和0.1N的LiOH水溶液的配比为1g:64ml:64ml;将混合溶液在室温下搅拌反应24小时;反应结束后调节pH值为5,用乙酸乙酯萃取,取有机相,得到白色粉末状固体F;

(7) 将白色粉末状固体F溶于吡啶中,再加入丁二酸酐,在100℃油浴中搅拌回流反应15小时;反应结束,转干得到棕色油状物,再经过薄层色谱分离得到淡黄色油状物I,即权利要求1所述的唑吡坦人工半抗原。

3. 一种唑吡坦人工抗原, 其特征在于, 其分子结构如(II)所示:



(II)。

4. 如权利要求3所述唑吡坦人工抗原, 其特征在于, 所述唑吡坦人工抗原是通过活泼酯法使唑吡坦人工半抗原与牛血清蛋白结合获得。

5. 权利要求4所述的唑吡坦人工抗原的制备方法, 其中特征在于, 包括以下步骤:

(a) 将唑吡坦人工半抗原I与N-羟基琥珀酰亚胺、二环己基碳二亚胺以摩尔比为1:1.5:1.5共溶于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;

(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, 获得唑吡坦人工抗原。

6. 如权利要求5所述的制备方法, 其特征在于, 步骤(b)中牛血清蛋白溶液的浓度为10mg/ml, 上清液与牛血清蛋白溶液的体积比为1:5。

7. 如权利要求3所述唑吡坦人工抗原在制备抗唑吡坦抗体中的应用。

8. 一种抗唑吡坦抗体, 其特征在于, 是由权利要求3所述唑吡坦人工抗原经动物免疫得到、可与唑吡坦发生特异性免疫反应的球蛋白。

9. 如权利要求8所述抗唑吡坦抗体在检测唑吡坦中的应用。

一种唑吡坦人工半抗原、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,具体涉及一种唑吡坦人工半抗原、人工抗原及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 唑吡坦(Zolpidem)名称N,N,6-三甲基-2-(4-甲基苯基)咪唑并[1,2-a]吡啶-3-乙酰胺,又称左吡登,唑比坦,是新一代非苯二氮卓类镇静催眠药。它是一种咪唑吡啶衍生物,有很强的睡眠诱导作用,作用快,半衰期短,副作用小,无反跳性和成瘾性。

[0003] 自从上个世纪90年代在我国上市以来,它以特殊的无成瘾性和安全性,越来越受到人们的喜爱。但是长时间服用该药会有眩晕、嗜睡、倦睡、恶心、呕吐、头痛、夜寝不安、摔倒等副作用。较少出现过敏反应、皮疹、心率增快、面部水肿、呼吸困难、昏倒(以老年人多见)、低血压(表现为头晕、头昏眼花、晕倒)、短暂性易激惹、不明原因的兴奋或神经紧张、幻觉(视、听等)等症状。在我国因为服用唑吡坦而导致不良反应的现象也时有发生,例如2009年发现3例唑吡坦导致睡眠行为障碍患者,2010年报道1例唑吡坦致人尿失禁患者和1例唑吡坦致人精神错乱患者,2013年报道1例唑吡坦致人死亡病人等,因此很有必要建立快速、灵敏、准确的检测技术来检测唑吡坦。

[0004] 目前,对唑吡坦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。而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,该方法的关键就是需要制备出该小分子化合物对应的完全抗原和对该抗原具有高特异性高亲和力的抗体。由于大多数小分子化合物(分子量小于1000),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,因此不具有免疫原性,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点上连接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(即完全抗原,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。

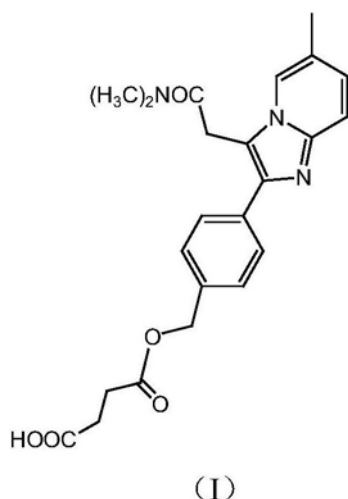
[0005] 因此有必要提供一种有效的唑吡坦人工抗原的制备方法,制备的唑吡坦人工抗原可用于免疫制备具有特异性的抗唑吡坦抗体,进一步用于检测。

发明内容

[0006] 本发明提供了一唑吡坦人工半抗原,该唑吡坦人工半抗原最大程度的保留了唑吡坦的特征结构,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。

[0007] 一种唑吡坦人工半抗原,其分子结构式如(I)所示:

[0008]



[0009] 本发明还提供了该唑吡坦人工半抗原的制备方法,包括以下步骤:

[0010] (1) 将4-乙酰基苯甲醇乙酸酯和溴以摩尔比为1:1.2混合加入烧瓶中,加入乙酸进行溶解,在室温避光条件下搅拌反应18小时;反应结束后,先将反应液转干,再加入水和二氯甲烷萃取,取有机相,浓缩后得白色晶体A;

[0011] (2) 将白色晶体A和2-氨基-5-甲基吡啶以摩尔比为1.2:1加入烧瓶中,同时烧瓶中加入无水乙醇,在80℃油浴中回流搅拌反应20小时;反应结束后,自然冷却至室温经抽滤、烘干后得到淡黄色粉末状固体,用无水乙醇对淡黄色粉末状固体进行重结晶得到白色粉末状固体B;

[0012] (3) 将白色粉末状固体B溶于苯中,80℃加热溶解,然后加入铜粉,然后在20分钟内用注射器逐滴滴加重氨基乙酸叔丁酯,继续回流反应3小时;其中白色粉末状固体B、铜粉和重氨基乙酸叔丁酯之间的摩尔比为1:2.2:2;反应结束后自然冷却至室温,反应产物经过滤、旋蒸、柱色谱分离得到红棕色油状物C;

[0013] (4) 将红棕色油状物C用二氯甲烷溶解,再加入三氟乙酸,二氯甲烷、三氟乙酸的体积比为1:2,室温搅拌反应6小时;反应结束,先转干,再加入10%的碳酸钾水溶液,用乙醚萃取,取水相,水相经过酸化,再用乙酸乙酯萃取,取有机相,经干燥、过滤、旋蒸得到红棕色油状物D;

[0014] (5) 将红棕色油状物D与苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸酯和N,N-二异丙基乙胺以摩尔比为1:1.5:2加入烧瓶中,用二氯甲烷溶解,室温搅拌反应0.5小时,然后再加入33%的二甲胺水溶液,继续室温搅拌反应3小时;反应产物经洗涤、干燥、过滤、旋蒸、柱色谱分离得红棕色油状物E;

[0015] (6) 将红棕色油状物E溶于四氢呋喃中,再逐滴加入0.1N的LiOH水溶液配制成混合溶液,其中红棕色油状物E、四氢呋喃和0.1N的LiOH水溶液的配比为1g:64ml:64ml;将混合溶液在室温下搅拌反应24小时;反应结束后调节pH值为5,用乙酸乙酯萃取,取有机相,得到白色粉末状固体F;

[0016] (7) 将白色粉末状固体F溶于吡啶中,再加入丁二酸酐,在100℃油浴中搅拌回流反应15小时;反应结束,转干得到棕色油状物,再经过薄层色谱分离得到淡黄色油状物I,即权利要求1所述的唑吡坦人工半抗原。

[0017] 在步骤(1)的反应条件下,白色晶体A的得率较高,后处理过程比较简单,较易提

纯。4-乙酰基苯甲醇乙酸酯和溴的摩尔比为1:1.2,这样既可以达到比较高的产率,也比较节约原料。

[0018] 步骤(2)的反应条件下,白色粉末状固体B的得率较高,后处理过程比较简单,较易提纯。白色晶体A与2-氨基-5-甲基吡啶摩尔比为1.2:1,该比例可以得到较高的产率。反应结束的混合液经过抽滤可以去掉大部分杂质,然后在经过重结晶进一步提纯得到纯度很高的白色粉末状固体B,该步骤用了极为经济简单的处理手段得到了较理想的效果。

[0019] 步骤(3)中白色粉末状固体B、铜粉和重氮基乙酸叔丁酯摩尔比为1:2.2:2,该比例有较高的反应产率。反应产物经过滤可以除去铜和其他不溶物质达到大致提纯的目的,再经过柱色谱可以有效的除去绝大部分副产物,可以得到理想纯度的主产物。

[0020] 步骤(4)中二氯甲烷、三氟乙酸的体积比为1:2。用乙醚萃取是为了洗去不溶于碱液的杂质,用乙酸乙酯萃取是为了提取出不溶于酸液的产物,从而达到提纯分离的效果。

[0021] 步骤(5)中,红棕色油状物D、苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯和N,N-二异丙基乙胺的摩尔比为1:1.5:2。

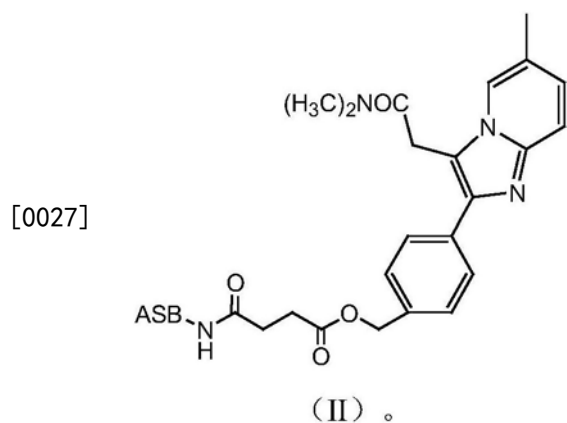
[0022] 步骤(6)中,红棕色油状物E、四氢呋喃和0.1N的LiOH水溶液的配比为1g:64ml:64ml。

[0023] 步骤(7)中白色粉末状固体F与丁二酸酐的摩尔比为1:2。

[0024] 通过上述方法,对唑吡坦结构的改造,在其远离其现有的活性基团的端位上引入了新的活性基团,这样既可以最大限度的保留其特征结构,又提供了可以与载体蛋白偶联的活性位点。

[0025] 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唑吡坦的特异性和亲合力更强。

[0026] 本发明还提供了一种唑吡坦人工抗原,其分子结构如(II)所示:



[0028] 式(II)中,BSA为牛血清蛋白。

[0029] 本发明还提供了一种所述唑吡坦人工抗原的制备方法,所述唑吡坦人工抗原是通过活泼酯法使所述唑吡坦人工半抗原与牛血清蛋白结合,获得所述唑吡坦人工抗原。

[0030] 具体地,采用活泼酯法制备唑吡坦人工抗原时,包括以下步骤:

[0031] (a) 将唑吡坦人工半抗原I与N-羟基琥珀酰亚胺、二环己基碳二亚胺以摩尔比为1:1.5:1.5共溶于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;

[0032] (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,获得唑吡坦人工抗原。

[0033] 本发明中牛血清蛋白溶液是将牛血清蛋白溶于钠离子浓度为0.1mol/L的PBS (pH=7.2-7.4) 缓冲液中制成的。

[0034] 步骤(b)中,所述牛血清蛋白溶液的浓度为10mg/ml,上清液与牛血清蛋白溶液的体积比为1:5。

[0035] 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,较容易与唑吡坦半抗原发生偶联,可制得不同偶联比的唑吡坦人工抗原,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。

[0036] 本发明还提供了所述唑吡坦人工抗原在制备抗唑吡坦抗体中的应用。

[0037] 本发明还提供了一种抗唑吡坦抗体,是由所述的唑吡坦人工抗原经动物免疫得到的,可与唑吡坦发生特异性免疫反应的球蛋白。

[0038] 实验发现,将所述唑吡坦人工抗原免疫Balb/c小鼠,得到含单克隆抗体的腹水的效价是1:80000。表明本发明的唑吡坦人工抗原可免疫获得高亲和力,高灵敏度,强特异性的抗唑吡坦抗体,该抗唑吡坦抗体可用于唑吡坦的免疫检测和分析。

[0039] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0040] 本发明的唑吡坦人工抗原最大程度地保留了唑吡坦的特征结构,且在远离这些特征结构的端位上引入了可以与载体蛋白发生偶联的活性基团,可作为抗原决定簇;进一步制备获得的唑吡坦人工抗原可免疫获得高亲和力,高灵敏度,强特异性的抗唑吡坦抗体,经免疫Balb/c小鼠获得的腹水效价高达1:80000,可用于对唑吡坦进行快速、准确的免疫检测和免疫分析。

附图说明

[0041] 图1为本发明唑吡坦人工抗原的制备流程图;

[0042] 图2为本发明唑吡坦人工半抗原的液相色谱图;

[0043] 其中,mAU表示毫吸光度单位,min表示分钟;

[0044] 图3为本发明唑吡坦人工半抗原的质谱图;

[0045] 其中,纵坐标表示相对丰度;m/z表示荷质比;

[0046] 图4为牛血清蛋白、唑吡坦人工半抗原、唑吡坦人工抗原的紫外扫描图;

[0047] 其中,Abs表示紫外-可见吸收光谱,WL (nm) 表示波长 (nm);

[0048] 图5为对比例1唑吡坦人工抗原的制备流程图;

[0049] 图6为对比例2唑吡坦人工抗原的制备流程图;

[0050] 图7为对比例3唑吡坦人工抗原的制备流程图;

[0051] 图8为对比例4唑吡坦人工抗原的制备流程图;

[0052] 图9为对比例5唑吡坦人工抗原的制备流程图;

[0053] 图10为对比例6唑吡坦人工抗原的制备流程图;

[0054] 图11为对比例7唑吡坦人工抗原的制备流程图。

具体实施方式

[0055] 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。

[0056] 实施例1

[0057] 本实施一种唑吡坦人工抗原的制备方法(反应历程如图1),包括以下步骤:

[0058] (1) 制备唑吡坦人工半抗原:

[0059] ①称取4-乙酰基苯甲醇乙酸酯1.5g (7.81mmol) 于50ml圆底烧瓶中,加入20ml乙酸溶解,再加入溴0.481ml (9.37mmol),放入搅拌子,室温避光搅拌反应18小时;反应结束,将反应液转干,加入50ml水和20ml二氯甲烷萃取,水相再用20ml二氯甲烷萃取两次,合并有机相并用无水硫酸镁干燥、过滤、转干得白色晶体A2.053 (7.58mmol);

[0060] 对该白色晶体A进行TLC检测,层析液为乙酸乙酯:环己烷=7:3 (v/v),产物 R_f =0.8;

[0061] ②将上步白色晶体A2.053g (7.58mmol) 与2-氨基-5-甲基吡啶0.682g (6.32mmol) 置于50ml单口圆底烧瓶中,加入26ml无水乙醇,80℃油浴中回流搅拌反应20小时;反应结束后自然冷却至室温,用布氏漏斗抽滤,并用5ml无水乙醇洗涤滤渣,将滤渣在50℃的烘箱中烘干得到淡黄色粉末状固体,用无水乙醇重结晶得到白色粉末状固体B1.27g (4.54mmol);

[0062] 对该白色粉末状固体B进行TLC检测,层析液为乙酸乙酯:环己烷=7:3 (v/v),产物 R_f =0.6;

[0063] ③将上步得到的白色粉末状固体B1.27g (4.54mmol) 置于100ml三口圆底烧瓶中,加入38ml苯,80℃加热溶解,然后加入铜粉639mg (9.98mmol),然后在20分钟内用注射器逐滴滴加重氮基乙酸叔丁酯1.26ml (9.10mmol),继续回流反应3小时;反应结束后自然冷却至室温,用硅藻土过滤,滤液经转干得到棕黑色粘稠物,该物质经柱色谱(淋洗剂为乙酸乙酯:环己烷=3:10,4:10…)分离得到红棕色油状物C1.54g (3.91mmol);

[0064] 对该红棕色油状物C进行TLC检测,层析液为乙酸乙酯:环己烷=3:2 (v/v),产物 R_f =0.5;

[0065] ④将上步红棕色油状物C1.54g (3.91mmol) 用10ml二氯甲烷溶解,再加入20ml三氟乙酸,室温搅拌反应6小时;反应结束,转干,加入40ml10%的碳酸钾水溶液,用30ml乙醚萃取两次,收集水相,水相用6N的盐酸调pH=6,再用50ml乙酸乙酯萃取3次,收集有机相,用无水硫酸镁干燥,过滤转干得到红棕色油状物D682mg (2.02mmol);

[0066] 对该红棕色油状物D进行TLC检测,层析液为95%乙醇:1,4-二氧六环:二氯甲烷:氨水=8:1:10:1 (v/v),产物 R_f =0.55;

[0067] ⑤将上步红棕色油状物D682mg (2.02mmol) 与苯并三氮N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯1.147g (3.03mmol) 和N,N-二异丙基乙胺521mg (4.04mmol) 加入50ml圆底烧瓶中,加入24ml二氯甲烷溶解,室温搅拌反应0.5小时,然后再加入33%的二甲胺水溶液0.62ml,继续室温搅拌反应3小时;反应结束加入0.5N的盐酸30ml进行萃取,分离出有机相,分别用30ml饱和的食盐水和30ml10%的NaHCO₃水溶液洗涤有机相,收集有机相,用无水硫酸镁干燥,过滤转干得到红棕色固油混合物,经柱色谱(淋洗剂为二氯甲烷:甲醇=15:1,10:1…)分离得红棕色油状物E412mg (1.13mmol);

[0068] 对该红棕色油状物E进行TLC检测,层析液为乙酸乙酯:环己烷=4:1 (v/v),产物 R_f =0.15;

[0069] ⑥将上步红棕色油状物E412mg (1.13mmol) 溶于26ml四氢呋喃中,再逐滴加入0.1N的LiOH水溶液26ml,此反应混合溶液在室温下搅拌反应24小时;反应结束,用1N的盐酸溶液调

pH=5,用20ml乙酸乙酯萃取3次,合并有机相,用无水硫酸钠干燥,过滤转干得到白色粉末状固体F305mg (0.91mmol);

[0070] 对该白色粉末状固体进行TLC检测,层析液为二氯甲烷:甲醇=8:2 (v/v),产物 $R_f=0.45$;

[0071] ⑦将上步白色粉末状固体F305mg (0.94mmol)溶于10ml吡啶中,再加入丁二酸酐141mg (1.41mmol),在100℃油浴中搅拌回流反应15小时;反应结束,转干得到棕色油状物,再经过薄层色谱分离得到淡黄色油状物I352mg (0.83mmol)即唑吡坦人工半抗原;对该淡黄色油状物I进行TLC检测,层析液为二氯甲烷:甲醇=8:2 (v/v),产物 $R_f=0.3$;

[0072] 唑吡坦人工半抗原的液相色谱图见图2(紫外检测器,波长215nm),唑吡坦半抗原的质谱图见图3。

[0073] 从图2可以看出经过纯化得到的唑吡坦人工半抗原的纯度达99.9%以上,从图3可以看出本实施例得到的唑吡坦人工半抗原的分子离子峰的质荷比(m/z)为338,与其理论分子量337吻合,它的六个主要碎片离子峰的质荷比(m/z)分别为45、76、121、206、249、293与其主要碎片的理论分子量基本吻合,可以确定步骤⑦得到的最终化合物就是本发明所设计的唑吡坦人工半抗原。

[0074] (2) 制备唑吡坦人工抗原:

[0075] ⑧取唑吡坦半抗原I131mg (0.31mmol)与N-羟基琥珀酰亚胺53mg (0.46mmol)、环己基碳酰二亚胺95mg (0.46mmol)置于25ml的单口圆底烧瓶中,加入6.6mlN,N-二甲基甲酰胺溶解,室温下搅拌反应18小时,反应结束后离心取上清液,备用;

[0076] ⑨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;

[0077] ⑩称取330mg牛血清蛋白溶于33mlPBS缓冲液中,搅拌均匀,得到浓度为10mg/ml的牛血清蛋白溶液;

[0078] ⑪再快速搅拌下,将⑧的上清液缓慢滴加到⑩的溶液中,上清液与牛血清蛋白溶液的体积比为1:5,滴加完毕继续搅拌反应0.5小时,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;

[0079] ⑫将人工抗原混合液移入透析袋中,用步骤⑨的PBS缓冲液透析6次,透析结束后离心取上清液即得到人工抗原:唑吡坦-牛血清蛋白偶联物(如式II)。图4是唑吡坦人工抗原制备前后的紫外扫描图。

[0080] 图4中,曲线a为牛血清蛋白的紫外扫描图谱,曲线b为唑吡坦人工半抗原的紫外扫描图谱,曲线c为唑吡坦人工抗原的紫外扫描图谱。唑吡坦人工半抗原的最大吸收波长是292nm,唑吡坦人工抗原的最大吸收波长是289nm,与唑吡坦人工半抗原、牛血清蛋白相比明显不同,说明唑吡坦人工半抗原与牛血清蛋白成功的进行偶联。

[0081] 对比例1

[0082] 本实施一种唑吡坦人工抗原的制备方法(反应历程如图5),包括以下步骤:

[0083] (1) 唑吡坦人工半抗原的制备:

[0084] ①-⑥与实施例1相同。

[0085] ⑦将上步白色粉末状固体F305mg (0.94mmol)溶于15ml丙酮中,再加入390mg (2.82mmol)无水碳酸钾粉末,在室温下搅拌0.5小时,然后加入208μL溴乙酸乙酯

(1.88mmol),随后置于70℃油浴中搅拌回流反应16小时;反应结束,过滤、转干得到430mg棕色油状物,经过薄层色谱分离后得到282mg淡黄色油状物G;

[0086] 对该淡黄色油状物进行TLC检测,层析液为层析液为二氯甲烷:甲醇=8:2(v/v),产物 $R_f=0.8$;

[0087] ⑧将上步淡黄色油状物G282mg(0.69mmol)溶于5ml四氢呋喃和8ml无水甲醇中,再加入23ml1N的氢氧化钠水溶液,室温搅拌反应5小时;反应结束,用1N的盐酸调pH=5-6,用30ml*3的乙酸乙酯萃取,合并有机相,分别用50ml纯化水、50ml饱和的食盐水洗涤,取有机相,干燥、过滤、转干后得到淡黄色油状物220mg即唑吡坦人工半抗原(如式III);

[0088] (2) 唑吡坦人工抗原的制备:

[0089] ⑨取唑吡坦半抗原III131mg(0.34mmol)与N-羧基琥珀酰亚胺60mg(0.52mmol)、环己基碳酰二亚胺107mg(0.52mmol)置于25ml的单口圆底烧瓶中,加入6.6ml1N,N-二甲基甲酰胺溶解,室温下搅拌反应18小时,反应结束后离心取上清液,备用;

[0090] ⑩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;

[0091] ⑪称取330mg牛血清蛋白溶于33mlPBS缓冲液中,搅拌均匀,得到浓度为10mg/ml的牛血清蛋白溶液;

[0092] ⑫再快速搅拌下,将⑨的上清液缓慢滴加到⑪的溶液液中,上清液与牛血清蛋白溶液的体积比为1:5,滴加完毕继续搅拌反应0.5小时,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;

[0093] ⑬将人工抗原混合液移入透析袋中,用步骤⑫的PBS缓冲液透析6次,透析结束后离心取上清液即得到唑吡坦人工抗原IV。

[0094] 对比例2

[0095] 本实施一种唑吡坦人工抗原的制备方法(反应历程如图6),包括以下步骤:

[0096] (1) 唑吡坦人工半抗原的制备:

[0097] 与对比例1相同。

[0098] (2) 唑吡坦人工抗原的制备:

[0099] 采用牛丙种球蛋白作载体,与唑吡坦人工半抗原III进行偶联,偶联步骤与对比例1相同,得到唑吡坦人工抗原V。

[0100] 对比例3

[0101] 本实施一种唑吡坦人工抗原的制备方法(反应历程如图7),包括以下步骤:

[0102] (1) 唑吡坦人工半抗原的制备:

[0103] ①—⑧分别与对比例1相同。

[0104] (2) 唑吡坦人工抗原的制备:

[0105] ⑨取唑吡坦半抗原III131mg(0.34mmol)与1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐100mg(0.52mmol)、环己基碳酰二亚胺107mg(0.52mmol)置于25ml的单口圆底烧瓶中,加入6.6ml1N,N-二甲基甲酰胺溶解,室温下搅拌反应18小时,反应结束后离心取上清液,备用;

[0106] ⑩—⑬分别与对比例1相同,得到唑吡坦人工抗原VI。

[0107] 对比例4

[0108] 本实施一种唑吡坦人工抗原的制备方法(反应历程如图8),包括以下步骤:

[0109] (1) 唑吡坦人工半抗原的制备:

[0110] ①—⑧分别与对比例1相同。

[0111] (2) 唑吡坦人工抗原的制备:

[0112] ⑨与对比例3相同;

[0113] ⑩—⑬与对比例2相同,得到唑吡坦人工抗原Ⅶ。

[0114] 对比例5

[0115] 本实施一种唑吡坦人工抗原的制备方法(反应历程如图9),包括以下步骤:

[0116] (1) 唑吡坦人工半抗原的制备:

[0117] ①—⑦分别与实施例1相同。

[0118] (2) 唑吡坦人工抗原的制备:

[0119] ⑧取唑吡坦半抗原I131mg (0.30mmol) 与1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐86mg (0.45mmol)、环己基碳酰二亚胺93mg (0.45mmol) 置于25ml的单口圆底烧瓶中,加入6.6mlN,N-二甲基甲酰胺溶解,室温下搅拌反应18小时,反应结束后离心取上清液,备用;

[0120] ⑨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;

[0121] ⑩称取330mg牛血清蛋白溶于33mlPBS缓冲液中,搅拌均匀,得到浓度为10mg/ml的牛血清蛋白溶液;

[0122] ⑪再快速搅拌下,将⑨的上清液缓慢滴加到⑩的溶液液中,上清液与牛血清蛋白溶液的体积比为1:5,滴加完毕继续搅拌反应0.5小时,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;

[0123] ⑫将人工抗原混合液移入透析袋中,用步骤⑩的PBS缓冲液透析6次,透析结束后离心取上清液即得到唑吡坦人工抗原Ⅷ。

[0124] 对比例6

[0125] 本实施一种唑吡坦人工抗原的制备方法(反应历程如图10),包括以下步骤:

[0126] (1) 唑吡坦人工半抗原的制备:

[0127] ①—⑦分别与实施例1相同。

[0128] (2) 唑吡坦人工抗原的制备:

[0129] 采用牛丙种球蛋白作载体,与唑吡坦人工半抗原I进行偶联,偶联步骤与对比例5相同,得到唑吡坦人工抗原Ⅸ。

[0130] 对比例7

[0131] 本实施一种唑吡坦人工抗原的制备方法(反应历程如图11),包括以下步骤:

[0132] (1) 唑吡坦人工半抗原的制备:

[0133] ①—⑦分别与实施例1相同。

[0134] (2) 唑吡坦人工抗原的制备:

[0135] 采用牛丙种球蛋白作载体,与唑吡坦人工半抗原I进行偶联,偶联步骤与实施例1

相同,得到唑吡坦人工抗原X。

[0136] 检测例唑吡坦人工抗原的性能测试

[0137] (1) 唑吡坦人工抗原的鉴定

[0138] 摩尔吸收系数 ϵ :配制唑吡坦半抗原浓度为0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的PBS溶液,通过紫外扫描图可知唑吡坦半抗原的最大吸收波长为292nm,在292nm处测吸光值,每个浓度做平行样。摩尔吸光系数计算为: $\epsilon = \text{吸光值} / \text{摩尔浓度}$ 。

[0139] 偶联物蛋白浓度的测定:分别配制浓度为0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的牛血清蛋白的PBS溶液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。将抗原溶液按一定比例吸收,在655处测得抗原的吸光值,从曲线上得到抗原溶液的相应蛋白浓度值。

[0140] 偶联比测定:配制100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 牛血清蛋白的PBS溶液,将唑吡坦人工抗原用PBS稀释到100 $\mu\text{g}/\text{ml}$,在289处测得吸光值,以PBS为空白,测得吸光值 A_1, A_2 ,则偶联比率 γ 为: $\gamma = [(A_1 - A_2) / \epsilon] / (100 \times 10^{-3} / 65000)$ 。

[0141] 其中 ϵ 为摩尔吸光系数(L/mol),65000为牛血清蛋白的分子量,100 $\times 10^{-3}$ 为牛血清蛋白浓度(g/L)。

[0142] 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)。

[0143] 表1各唑吡坦人工抗原的偶联比和摩尔吸收系数

[0144]

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	23	3.69mg/ml	6217.35
对比例1	IV	31	6.78mg/ml	6072.08
对比例2	V	24	3.57mg/ml	6072.08
对比例3	VI	28	5.62mg/ml	6072.08
对比例4	VII	22	3.24mg/ml	6072.08
对比例5	VIII	26	4.32mg/ml	6217.35
对比例6	IX	19	3.36mg/ml	6217.35
对比例7	X	15	2.18mg/ml	6217.35

[0145] 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。

[0146] (2) 动物免疫

[0147] 将制备的各唑吡坦人工抗原免疫Balb/c小鼠,得到含单克隆抗体的免疫腹水经ELISA方法检测其效价,检测结果见表2。

[0148] 表2各免疫腹水的效价检测结果

[0149]

编号	唑吡坦人工抗原	腹水效价
实施例1	II	1:80000
对比例1	IV	1:60000

对比例2	V	1:40000
对比例3	VI	1:50000
对比例4	VII	1:40000
对比例5	VIII	1:70000
对比例6	IX	1:30000
对比例7	X	1:60000

[0150] 由表2可见,与实施例1相比,利用各对比例唑吡坦人工抗原进行动物免疫获得的免疫血清,其效价均没有实施例1高,不能用于免疫分析中。而利用唑吡坦人工抗原Ⅱ进行动物免疫获得的免疫腹水,其效价达1:80000,完全可用于免疫分析中,能为唑吡坦的检测提供更加方便快捷准确的途径。

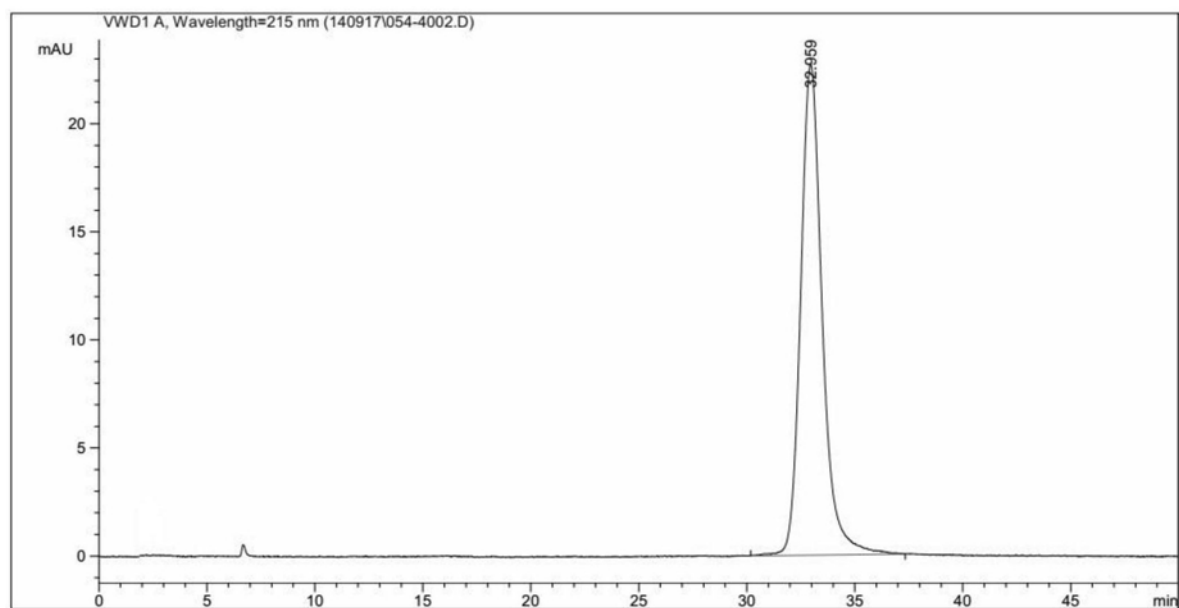


图2

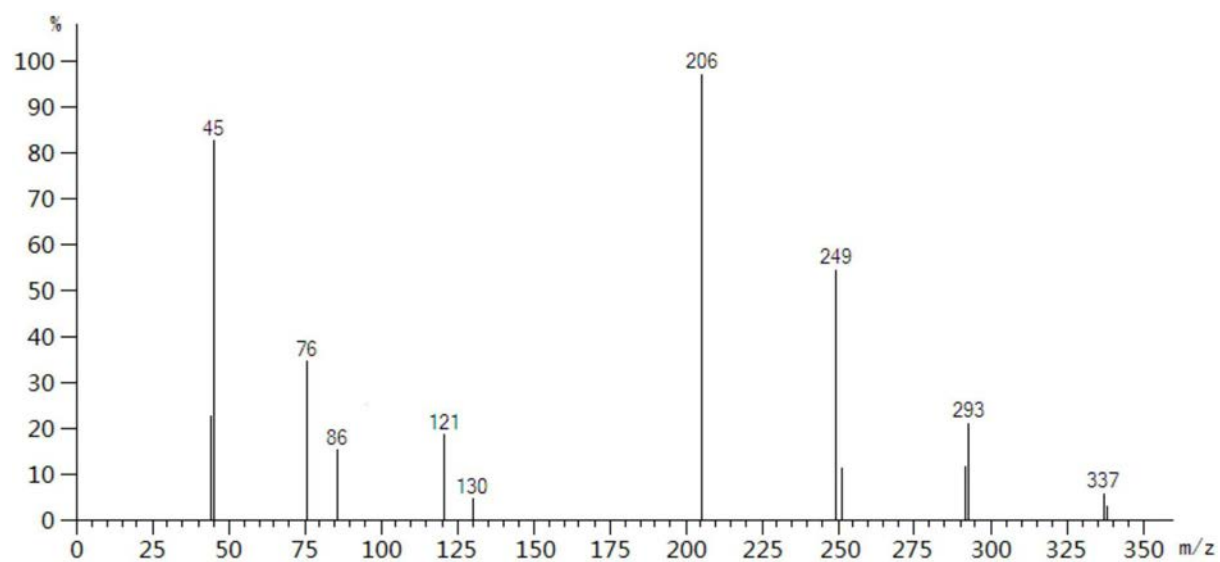


图3

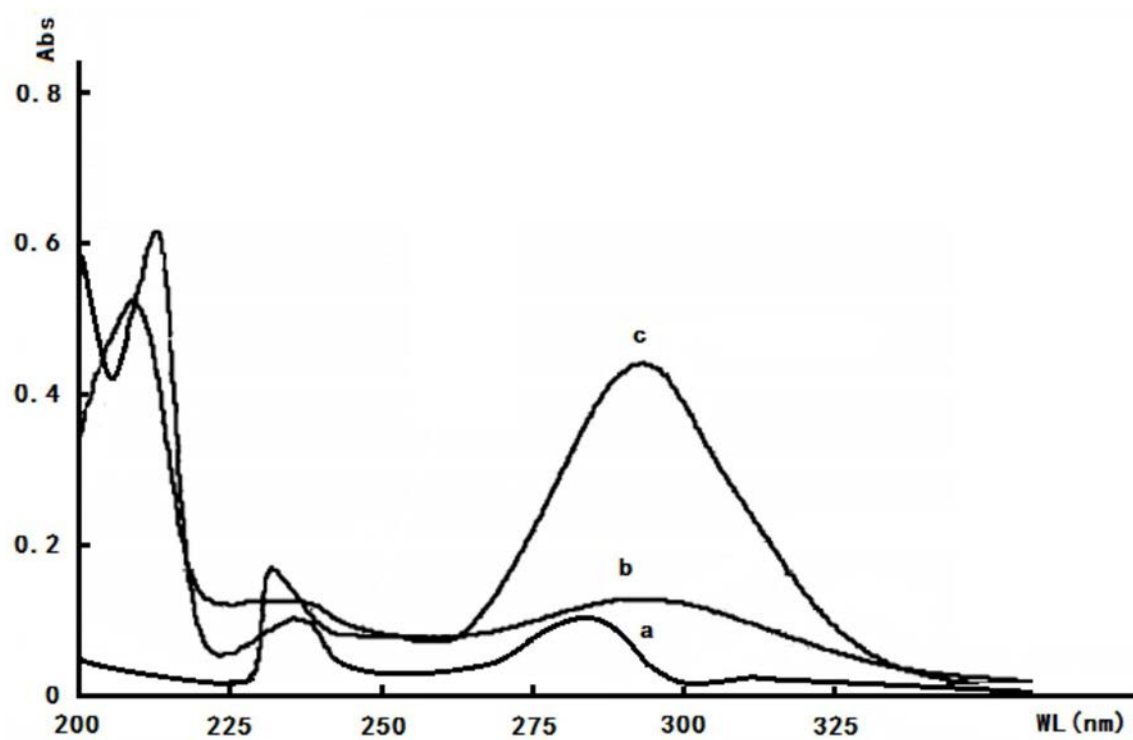


图4

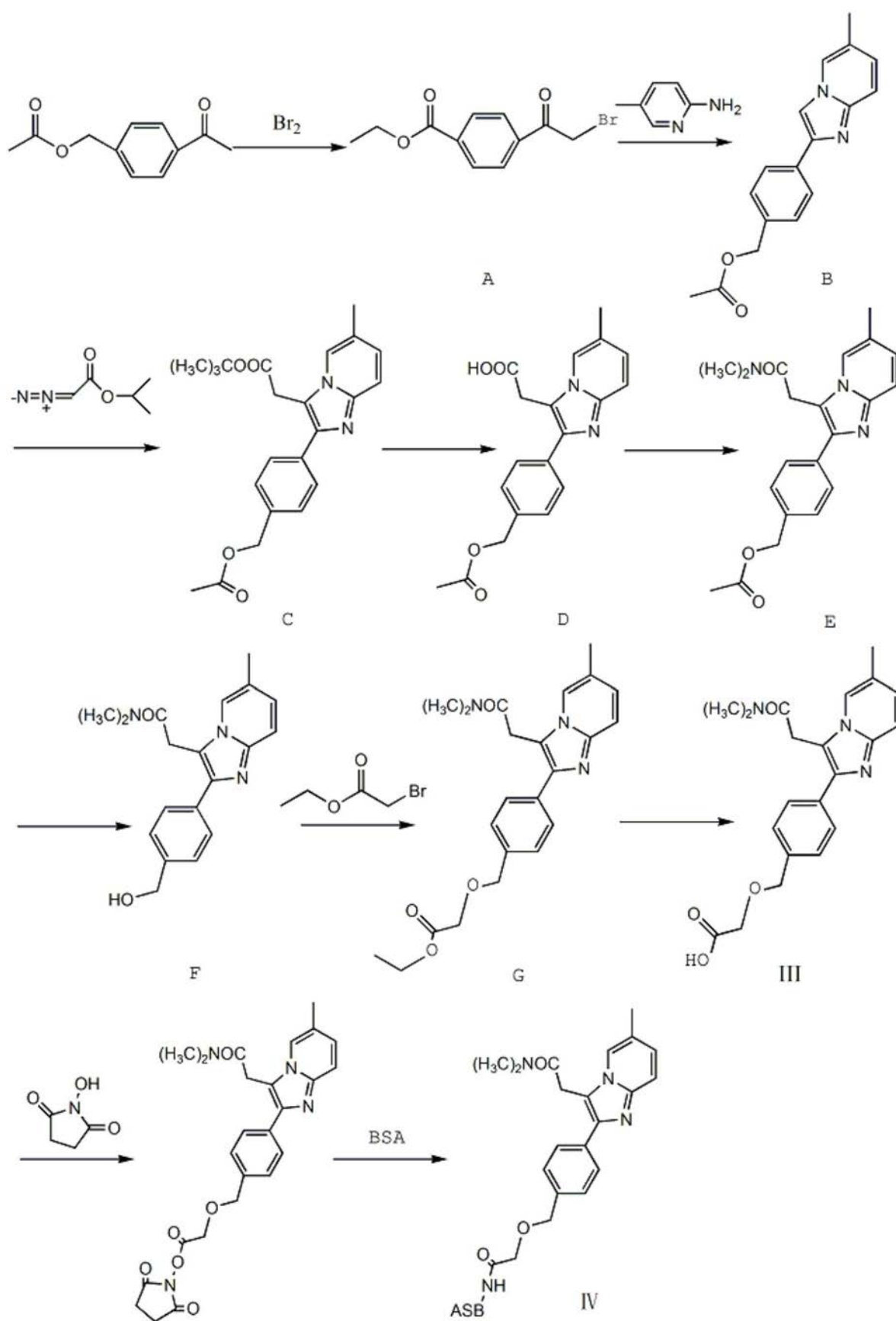


图5

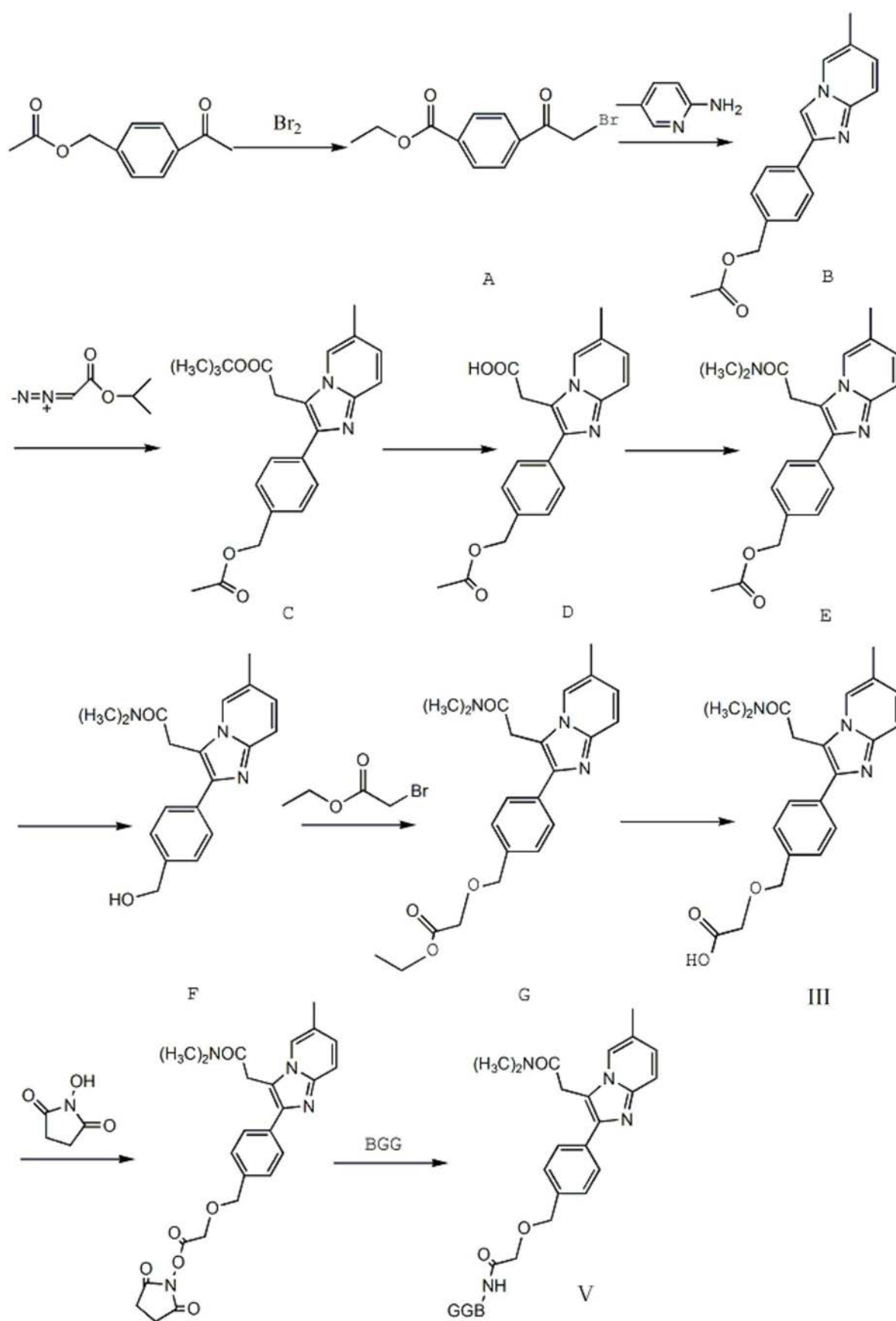


图6

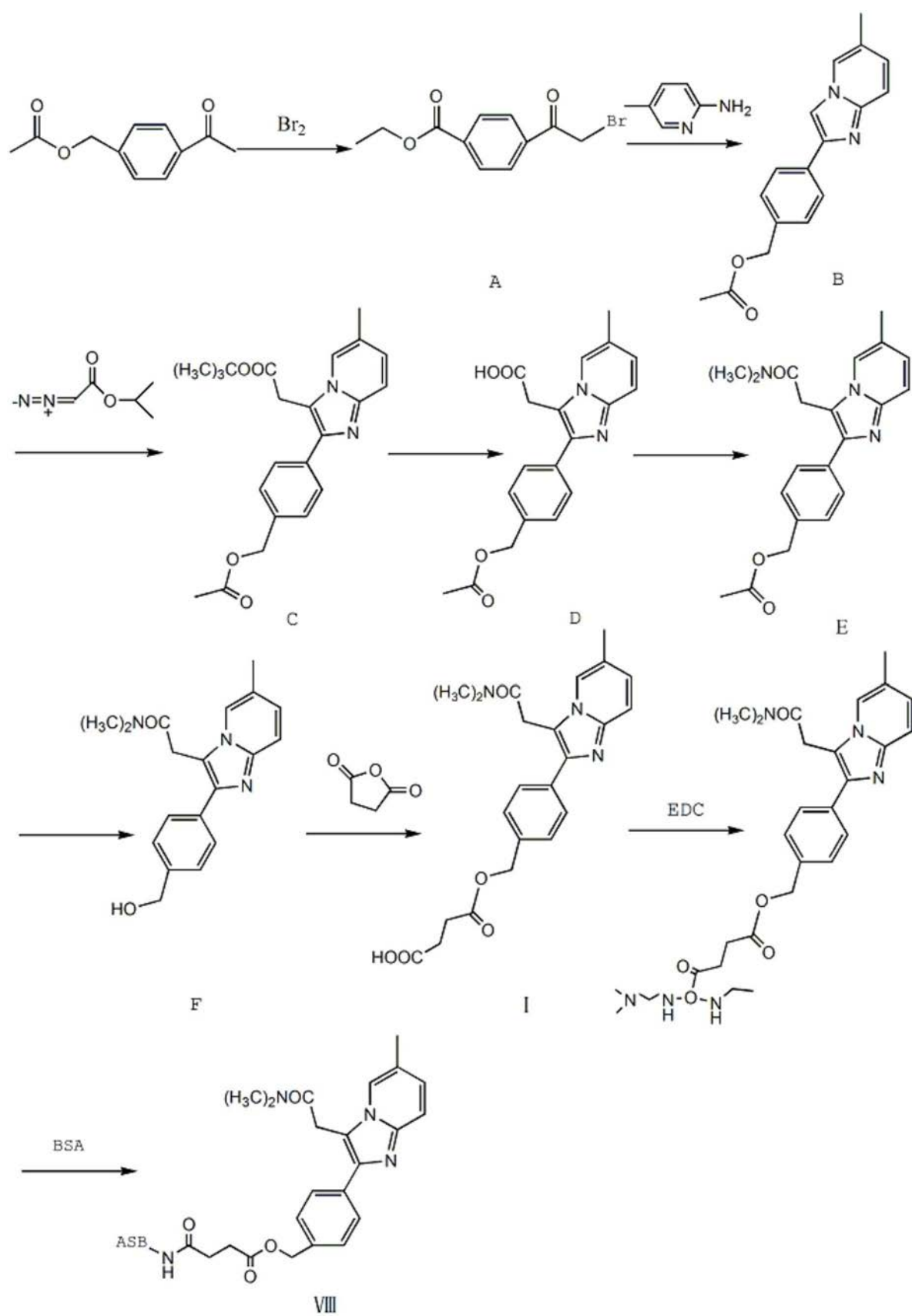


图9

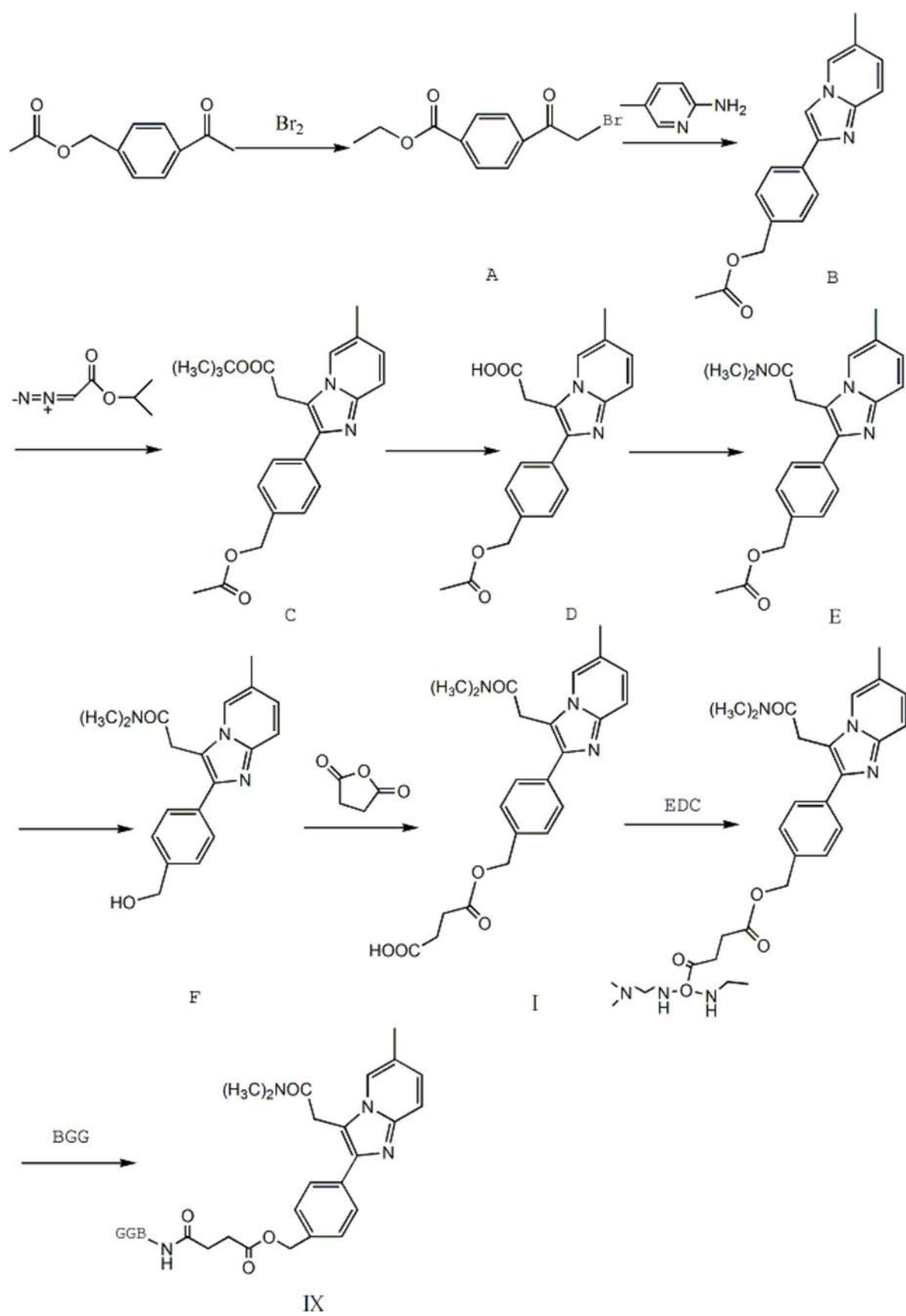


图10



专利名称(译)	一种唑吡坦人工半抗原、人工抗原及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN108017631A	公开(公告)日	2018-05-11
申请号	CN2017111012835.9	申请日	2017-10-26
[标]发明人	邵越水 王镇 高飞		
发明人	邵越水 王镇 高飞		
IPC分类号	C07D471/04 C07K14/765 C07K16/44 G01N33/531		
CPC分类号	C07D471/04 C07K14/765 C07K16/44 G01N33/531		
其他公开文献	CN108017631B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种唑吡坦人工半抗原、人工抗原及其制备方法和应用。唑吡坦人工半抗原的分子结构如式(I)，唑吡坦人工抗原的分子结构如式(II)。所述应用是唑吡坦人工抗原在制备抗唑吡坦抗体中的应用。本发明的唑吡坦人工半抗原最大程度的保留了唑吡坦的特征结构，且在远离这些特征结构的端位上引入了能与载体蛋白发生偶联的活性基团，可作为抗原决定簇；进一步制备获得的唑吡坦人工抗原可进行免疫获得高亲和力、高灵敏度、强特异性的抗唑吡坦抗体，经免疫Balb/c小鼠获得的免疫腹水的效价高达1:80000，可用于对唑吡坦进行快速、准确的免疫检测和免疫分析。

