

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07C223/04



[12] 发明专利申请公开说明书

C07C323/24 C07C327/40

C07K 14/765 C07K 16/00

G01N 33/53 G01N 33/531

G01N 33/532

[21] 申请号 03136682.1

[43] 公开日 2004 年 5 月 19 日

[11] 公开号 CN 1496974A

[22] 申请日 2003.1.31 [21] 申请号 03136682.1

[30] 优先权

[32] 2002. 1. 31 [33] EP [31] 02075445.3

[71] 申请人 兰多克斯实验室有限公司

地址 英国北爱尔兰

[72] 发明人 罗伯特·I·麦康奈尔

埃尔·O·本奇克

斯蒂芬·P·菲茨杰拉德

约翰·V·拉蒙特

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图 12 页

[54] 发明名称 氯胺酮和其代谢物的半抗原、免疫原、抗体和偶联物

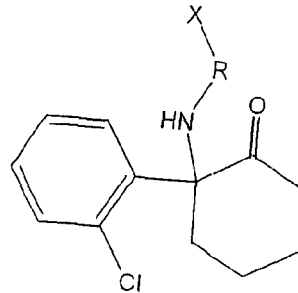
[57] 摘要

本发明公开了在去甲氯胺酮的 N 位置或在羟基去甲氯胺酮或羟基氯胺酮的 O 位置用交联剂衍生的半抗原。本发明也提供了包括所述半抗原与产生抗原性的载体物质结合的免疫原，以及抗所述半抗原的抗体。另外，本发明涉及包括所述半抗原与可检测的标记试剂共价结合的半抗原偶联物。本发明也提供了利用了本发明的偶联物和抗体检测或测定氯胺酮和它的初级代谢物，去甲氯胺酮的方法和试剂盒。

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

1. 在去甲氯胺酮的 N 位置用交联剂衍生的半抗原。
2. 根据权利要求 1 所述的半抗原，其中半抗原具有下面的结构式：

5



10 其中 R 是二价键，X 是末端基团。

3. 根据权利要求 2 所述的半抗原，其中 R 选自取代或未取代的、直链或支链、饱和或不饱和的亚烷基成分；X 选自羧酸或其酯；胺，马来酰亚胺，卤代羧酸或其酯，醛，二硫吡啶成分，乙烯砜成分或硫代羧酸或其酯。

4. 根据权利要求 3 所述的半抗原，其中 R 是 C₁₋₅，最优选地 C₃，被取代
15 或未被取代的，直链，饱和亚烷基成分。

5. 根据权利要求 3 或 4 所述的半抗原，其中 X 选自羧酸，硫代羧酸，二硫吡啶，马来酰亚胺，或醛成分；优选地 X 是羧基(COOH)或硫代乙酰基(SCOCH₃)成分。

6. 根据前述权利要求中的任一项所述的半抗原，其中半抗原选自下面的
20 去甲氯胺酮半抗原衍生物：N-(4'-羧丙基)去甲氯胺酮；N-(3'-乙酰基硫代丙基)去甲氯胺酮；和 N-(3'-乙酰基硫代丙酰胺基)去甲氯胺酮。

7. 包括前述权利要求中的任一项所述半抗原与产生抗原性的载体物质结合的免疫原，所述载体物质优选地选自蛋白质、蛋白质片段、合成多肽或半合成多肽。

25 8. 权利要求 7 所述的免疫原的抗体，所述抗体能够结合至少一个去甲氯胺酮或氯胺酮的结构表位。

9. 根据权利要求 8 所述的抗体，其中结构表位是芳基环己酮成分，优选地是氯苯基环己酮成分，最优选地是邻-氯苯环己酮成分。

10. 含有权利要求 1-6 中的任一项所述的半抗原与可检测的标记试剂共
30 价结合的偶联物，所述标记试剂优选地选自酶、发光物质、放射活性物质或其混合物。

11.制备权利要求8或9所述的抗体的方法,所述方法包括步骤:免疫接种动物,优选地是脊椎动物,最优选地是哺乳动物,方法是重复给予权利要求7所述的免疫原,并且从免疫接种的动物回收血清。

5 12.检测或测定样品中的氯胺酮和去甲氯胺酮的方法,所述方法包括将样品与权利要求10所述的偶联物或其混合物接触,和与权利要求8或9的抗体或其混合物接触;检测或测定结合的偶联物;和从校准曲线推测样品中氯胺酮和去甲氯胺酮的存在或数量。

13.检测或测定氯胺酮和去甲氯胺酮的试剂盒,所述试剂盒包括权利要求10所述的偶联物或其混合物,和权利要求8或9所述的抗体或其混合物。

10 14.权利要求10的偶联物或其混合物和权利要求8或9的抗体或其混合物在检测或测定样品如生物液体中氯胺酮和去甲氯胺酮的应用。

氯胺酮和其代谢物的半抗原、免疫原、抗体和偶联物

5 本发明涉及用于制备免疫原、抗体和偶联物的半抗原，用于竞争性免疫测试中检测氯胺酮[(±)-2-(邻-氯苯基)-2-(甲氧基)环己酮]和它的初级代谢物，去甲氯胺酮(norketamine)。

本发明也涉及检测或测定氯胺酮和去甲氯胺酮的方法和试剂盒。

“检测”是指定性分析物质的有无。

10 “测定”是指定量分析物质的数量。

氯胺酮(参见附图-1)是已经在临床上使用了30年的短效肠胃外麻醉剂。该药物在亚麻醉剂量时就引起深度镇痛，没有大多数其他常规麻醉剂相关的心脏呼吸受抑作用。尽管存在这些重要的临床优点，但是，烦扰的应急反应，包括神志不清和恶梦经常伴随氯胺酮的治疗，限制它的临床应用。虽然这些
15 中枢神经系统(CNS)副作用的起源仍不清楚，已经有人推测，氯胺酮的代谢物可能在其中发挥重要作用，因为在氯胺酮诱导麻醉紧急情况中，母体药物的循环浓度非常低。氯胺酮通过肝酶进行了广泛的代谢，通过N去甲基化，主要产生了去甲氯胺酮(参见附图-1)。该一级胺进一步在环己酮环系统的4, 5 和/或6位产生羟基化的去甲氯胺酮家族而发生代谢，其中主要成份是6-
20 羟基去甲氯胺酮(参见附图-1)。

现有技术

目前，生物液体中氯胺酮和代谢物的测定主要是基于气相色谱质谱(GC-MS)和HPLC。这些色谱方法提供了良好的敏感度和选择性，但需要衍生氯胺酮和它的代谢物。另外，这些方法作为筛选工具，太昂贵且耗时。
25

特定的结合反应，如抗体-抗原反应已经广泛用于检测生物液体中存在的各种物质的免疫测试中。

所以，例如，可以用放射免疫测定来测定氯胺酮和它的代谢物。放射免疫测定非常敏感，但需要放射核素示踪物，例如 ^{125}I 和 ^3H ，在某些情况中，
30 还需要一个初级萃取步骤。对于氯胺酮，没有已知的RIA。

酶联免疫吸附测试(ELISA)是非放射性活性的或选方法，可以用于定性

和定量地测定氯胺酮和它的代谢物。另外，当 2002 年 1 月 31 日提交构成优先权的欧洲专利申请 02075445.3 时，还没有已知检测氯胺酮的 ELISA。从那时开始，Neogen 公司研制了针对氯胺酮的 ELISA 试剂盒，其与氯胺酮有 100% 的交叉反应性，与去甲氯胺酮有 4.6% 的交叉反应性。可以相信，Neogen 试剂盒应用了针对掺入至少氯胺酮甲氨基表位的氯胺酮半抗原研制的抗体和偶联物。

EP 0459 387 A2(Abbott 实验室)描述了对苯环利定和一些苯环利定衍生物的荧光极化测试。将苯环己胺衍生物与载体物质偶联以产生免疫原，与荧光素衍生物偶联产生示踪物。抗体，优选单克隆抗体是免疫原产生的。利用了前面提到的抗体和示踪物研制了苯环利定和苯环利定衍生物的免疫测定方法。所述免疫测定方法对苯环利定、苯环利定代谢物和苯环利定类似物具有高度的特异性。它与氯胺酮没有明显的交叉反应(参见第 8 页表 3(c))。虽然苯环己胺衍生物与本发明的半抗原具有结构相似性，但 Abbott 免疫测试中缺乏与氯胺酮的交叉反应性证实，在苯环上缺少氯和在环己基环上缺少羰基都是显著的。

Owens 等('Antibodies against arylcyclohexylamines and their similarities in binding specificity with the phencyclidine receptor'(J. Pharmacol. Exp. Ther. (1988), 246(2),472-478))描述了针对苯环利定(PCP)类似分子 5 个表位的抗体，以确定与 PCP 受体结合的芳基环己胺的分子需求。从 PCP 衍生物和 TCP 类似物合成 4 个半抗原，即 PCHP; PCHBA; tPPC 和 TCHP。从苯环己胺制成第 5 个半抗原 PCHAP。这些半抗原与 BSA 结合产生用于制备抗体的免疫原。所产生的抗体对于 PCP 和一些相关化合物是高度特异的，但与氯胺酮具有非常低的交叉反应性(<0.6%)(表 2, 第 475 页)。半抗原 PCHAP 与本发明的半抗原不同之处在于苯环上没有氯，环己环上没有羰基。与氯胺酮没有交叉反应性再次证实这两个部分的缺失是显著的。

Owens 等人('Molecular requirements for an immunological model of the phencyclidine receptor', 生物学中作为分子探针的 Sigma 和 PCP 类似化合物, 1988)描述了针对 PCP 和其他芳基环己胺的半抗原、免疫原和抗体的制备(表 1, 第 667 页)。制备了 4 个半抗原: PCHP; tPPC; PCHBA 和 PCHAP(参见图 1, 第 665 页)。产生的抗体显示对 PCP 和相关化合物的高水平交叉反应性，但对氯胺酮的低水平交叉反应性，如高 IC50 值所示(表 1, 第 667 页)。

氯胺酮的交叉反应性，又一次证实缺少氯和羰基是有意义的。

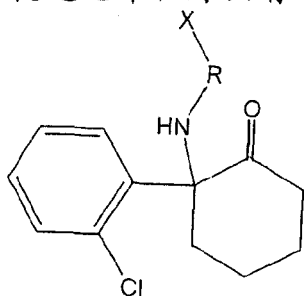
Leung 等(Comparative pharmacology in the rat of ketamine and its two principal metabolites, norketamine and (z)-6-hydronorketamine, J Med Chem (1986), 29(11), 2396-2399)描述了从氯胺酮的初级代谢物，去甲氯胺酮合成 (z)-6-羟基去甲氯胺酮(一种氯胺酮的次级代谢物)。他们也进行了氯胺酮、去甲氯胺酮和(z)-6-羟基去甲氯胺酮在大鼠上比较药理学研究。Leung 等人既没有公开也没有建议怎样制备针对氯胺酮或去甲氯胺酮的半抗原、免疫原和抗体。

10 发明详述

在第一方面，本发明提供了在去甲氯胺酮的 N 位置用交联剂派生半抗原。

优选地半抗原具有下面的结构式：

15



其中 R 是二价键，X 是末端基团。

20 最优选地，R 包括取代的或未取代的、直链的或支链的、饱和的或未饱和的亚烷基成分；和 X 包括羧酸或其酯；一种胺、马来酰亚胺、卤代羧酸或其酯、醛、二硫吡啶成分、乙烯砷成分或硫代羧酸或其酯。

所以，在优选的实施方案的通式中，交联剂包括-R-X。在本发明最广泛的方面中，交联剂也可以包括-R-X。

25 更优选地，R 是 C₁₋₅，最优选地 C₃，取代或未取代，直链，饱和的亚烷基成分。

最优选地，如果存在取代基时，取代基是羰基基团。

优选地，X 选自羧酸，硫代羧酸，二硫吡啶，马来酰亚胺，或醛成分。

最优选地，X 是羧基(COOH)或硫代乙酰基(SCOCH₃)成分。

30 最优选地，半抗原选自下面去甲氯胺酮半抗原衍生物：N-(4'-羧丙基)去甲氯胺酮(半抗原 A)；N-(3'-乙酰基硫代丙基)去甲氯胺酮(半抗原 B)；和 N-(3'-

乙酰基硫代丙酰氨基)去甲氯胺酮(半抗原 C)。

这些新型半抗原是通过利用适当的交联剂对去甲氯胺酮进行 N-衍生化, 优选 N 烷基化制备。

得到的半抗原进一步在这些功能化位置进行修饰, 以便与修饰或未修饰的载体物质结合提供生产抗体的免疫原, 和具有良好的敏感性和特异性的结
5 合物(示踪物), 以检测或测定氯胺酮和去甲氯胺酮。

本发明公开了去甲氯胺酮的第一半抗原衍生物的制备。通过将它们与修饰或未修饰的产生抗原性的载体物质结合, 来制备免疫原。然后, 对哺乳动物寄主注射得到的免疫原, 引发特异抗体的产生, 优选多克隆抗体, 然后
10 用来研发氯胺酮和去甲氯胺酮的竞争性免疫测定, 利用与标记试剂结合的半抗原作为检测试剂。

本发明也提供了包括本发明的半抗原与产生抗原性的载体物质结合的免疫原。优选载体物质是蛋白质、蛋白质片段、合成多肽或半合成多肽。

另一方面本发明涉及抗本发明免疫原的抗体, 抗体能够结合至少一个去
15 甲氯胺酮或去甲氯胺酮的结构表位。优选结构表位是氯胺酮和去甲氯胺酮的芳基环己酮成分, 更优选是氯苯基环己酮成分, 最优选是邻-氯苯基环己酮成分。

另一方面本发明涉及具有氯胺酮特异性的抗体, 特征是与去甲氯胺酮具有超过 100%, 优选地 100-175% 的交叉反应性。

另一方面本发明包括本发明的半抗原共价结合可检测的标记试剂的偶
20 联物。优选地, 该标记试剂选自酶、发光物质、放射活性物质或其混合物。更优选地, 该标记试剂是酶, 优选地是过氧化物酶, 最优选地是辣根过氧化物酶(HRP)。或者, 或另外, 发光物质可以是生物发光、化学发光或荧光物质。

本发明另外提供了制备抗体的方法, 该方法包括: 免疫(接种)动物, 优
25 选地是脊椎动物, 最优选地是哺乳动物, 重复注射本发明的免疫原, 和从被免疫(接种)的动物收集得到的血清。优选地, 该过程进一步包括将所述的血清抗体固定到载体上, 优选地是固体支持物, 最优选地是聚苯乙烯固体支持物。优选地, 该抗体是多克隆抗体。或者, 该抗体是单克隆抗体。

另一方面本发明包括检测或测定样品中氯胺酮和去甲氯胺酮的方法, 该
30 方法包括将样品与本发明的偶联物或其混合物接触, 和与本发明的抗体或其

混合物接触；检测或测定结合的偶联物；和从校正曲线推测样品中氯胺酮和去甲氯胺酮的存在或其数量。

另一方面本发明包括检测或测定氯胺酮和去甲氯胺酮的试剂盒，该试剂盒包括本发明的偶联物或其混合物；和本发明的抗体或其混合物。该试剂盒5 选择性地可以包括所述偶联物和所述抗体用于检测或测定样品中的氯胺酮和去甲氯胺酮的使用说明。

优选地，该样品是溶液，如生物液体。更优选地该样品是血清或尿。

在本发明的方法和试剂盒中，优选地，(免疫原和偶联物的)各个交联剂是不同的。

10 另一方面本发明包括本发明的偶联物或其混合物与本发明的抗体或其混合物在检测或测定样品中如生物液体中氯胺酮和去甲氯胺酮中的应用。

半抗原的制备

半抗原 N-(4'-羧丙基)去甲氯胺酮 A，N-(3'-乙酰基硫代丙基)去甲氯胺酮15 B 和 N-(3'-乙酰基硫代丙酰胺基)去甲氯胺酮 C 根据附图 2 制备。用溴在四氯化碳对(邻-氯苯)环戊酮 1 中进行溴化得到了 α -溴-(邻-氯苯)环戊酮 2。用液氨处理溴代酮 2 得到 1-[(邻-氯苯)亚胺甲基]环戊醇 3。去甲氯胺酮 4 是在 200 °C 时，醇亚胺 3 热重排后得到的。在氰氢化硼存在下，用琥珀醛酸(succinic semialdehyde)对去甲氯胺酮 4 进行 N-烷基化得到 N-(4'-羧丙基)去甲氯胺酮20 (半抗原 A)。在乙醇碱性溶液中，将去甲氯胺酮 4 与乙酸碘代丙硫酯(iodopropyl-thioacetate)反应得到 N-(3'-乙酰基硫代丙基)去甲氯胺酮(半抗原 B)。通过去甲氯胺酮 4 与 3-乙酰基硫代丙酸在 EDC 盐酸和吡啶存在时，在 DMF 中反应得到了 N-(3'-乙酰基硫代丙酰胺基)去甲氯胺酮(半抗原 C)。

根据附图 3，用 6 个步骤制备半抗原 6-O-(3'-乙酰基硫代丙基)去甲氯胺25 酮 D。首先，在苯中，在碳酸钠(Na_2CO_3)存在时，去甲氯胺酮 4 与氯甲酸甲酯回流，首先转化成氨基甲酸甲酯衍生物 5。用二异丙胺锂(LDA)和三甲基甲硅烷基氯(TMSCl)在四氢呋喃(THF)中，在-78 °C 处理氨基甲酸甲酯 5 得到相应的三甲基甲硅烷基烯醇醚 6。在 Na_2CO_3 存在下，用间-氯过苯甲酸(MCPBA)氧化 6 得到 N 保护的 6 羟基去甲氯胺酮 7。在碱性条件下用烯丙基溴对 6 进30 行 O-烷基化得到衍生物 8。利用三甲基甲硅烷基碘除去 8 的甲氧基羰基保护基团，接着在氯仿中，在 2',2'-偶氮二(2-甲基丙腈)(AIBN)催化剂存在下回流，

与硫代乙酸反应得到中等产量的半抗原 6-O-(3'-乙酰基硫代丙基)去甲氯胺酮 D。

免疫原和偶联物的制备

5 虽然本发明的半抗原提供了确定的结构表位,但它们本身不具备免疫原性,所以需要与载体物质结合,当对宿主动物给药时,将引发免疫原性应答。适当的载体物质通常含有聚(氨基酸)片段并且包括多肽、蛋白质和糖蛋白。有用载体物质的例证性实例是小牛血清白蛋白(BSA)、鸡蛋白蛋白、小牛γ球蛋白、甲状腺素结合球蛋白,钥孔戚血蓝蛋白(KLH)等。或者,可以利用具有足够数目氨基的合成聚(氨基酸),如赖氨酸,也可以是其他具有反应官能团的合成或天然多聚体物质。特定地,可以将碳水化合物、酵母或多糖可以与半抗原结合制备免疫原。

10 本发明的每个半抗原也可以与标记试剂,如酶(例如,辣根过氧化物酶),具有荧光特性的物质或放射活性标记物结合用于制备偶联物(或检测试剂),用于免疫测定。荧光物质可以是例如荧光素或其衍生物的单价残基。

15 在用本发明的半抗原制备免疫原或偶联物时,若其中存在硫代基团,如半抗原 B, C 和 D,首先可以利用杂双功能接头将马来酰亚胺,卤素或乙烯砷基团导入到载体物质或标记试剂(酶或标记物)中;这些杂双功能接头如: N-(g-马来酰亚胺基丁酰氧)琥珀酰亚胺酯(GMBS);琥珀酰亚胺基 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC);(m-马来酰亚胺基苯酰基)-N-羟基琥珀酰亚胺(MBS);琥珀酰亚胺基 4-(对-马来酰亚胺基苯基)丁酸酯(SMPB); N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(SIAB);溴乙酰基甘氨酸 N-羟基琥珀酰亚胺; N-琥珀酰亚胺基 3-(2-吡啶二硫)丙酸酯(SPDP);或乙烯砷(Pierce 化学公司,美国)。然后,这样修饰的载体物质,或标记试剂可以通过半抗原,例如半抗原 B, C 和 D 上的硫基团结合起来。对于没有硫基团的半抗原,如半抗原 A,结合是与没有预先修饰的载体物质或标记试剂,利用标准结合方法,如混合甲醛,EDC 或半抗原的琥珀酰亚胺活化来进行的。

20 为了证明半抗原与载体物质具有足够结合量,在免疫(接种)之前,利用基质辅助 UV 激光吸收/离子时间-飞行质谱(MALDI-TOF MS)对每个免疫原进行评估。本发明的各个免疫原适用于免疫接种,以便产生用于检测氯胺酮和去甲氯胺酮的抗体。

免疫原的 MALDI-TOF 分析的一般过程

利用 Voyager STR 生物光谱仪研究站激光吸收质谱仪结合延迟萃取进行 MALDI-TOF 质谱分析。用 0.1% 的三氟乙酸(TFA)水溶液稀释每个待分析样品，制备 1mg/ml 样品溶液。利用芥子酸作为基质分析等分试样(1 μ l)，小牛血清白蛋白(Fluka)用作外部校准样品。附图 5 显示 BSA 载体物质的分析结果。正如将要看到的，出现的主要信号显示这一样品的平均质子化质量是 m/z 66,404。在 m/z 33,200 的信号是与双电荷形式的主要成分一致。另外观察到的信号包括 m/z 13,605。

10

抗血清的制备

为了生产多克隆抗血清，将本发明的各个免疫原与弗氏佐剂混合，将混合物注射到宿主动物，如兔子、羊、小鼠、豚鼠或马体内。进一步注射(加强)，取血清样评估抗体效价。当获得了最佳效价时，取宿主动物血，生产适当体积的特异抗血清。抗体纯化程度取决于所应用目的。对于许多目的来说，不需要纯化。但是，在其他情况中，如在固体支持物上固定抗体，进行纯化步骤以除去不需要的物质和消除非特异的结合。

本发明中制备的特异抗体可用作免疫测定中的试剂，用于检测或测定生物液体中的氯胺酮和去甲氯胺酮。本发明的抗体能够与氯胺酮和去甲氯胺酮的芳基环己酮成分结合，优选地与氯苯环己酮成分结合，最优选地与邻-氯苯环己酮成分结合。

20

附图简要说明

通过详细描述典型技术方案及其附图，本发明的上面和其他的特征和优点将变得更为清晰。

25

图 1 例举说明氯胺酮和它的代谢物的结构；

图 2 例举说明制备半抗原 A, B 和 C 的反应路线；

图 3 例举说明制备半抗原 D 的化学反应；

图 4 例举说明氯胺酮和去甲氯胺酮的竞争性 ELISA 微量滴定板试验；

图 5 例举说明 BSA 载体物质的 MALDI-TOF 质谱图；

30

图 6 例举说明免疫原 A 的 MALDI-TOF 质谱图；

图 7 例举说明溴乙酰基甘氨酸修饰的 BSA 的 MALDI-TOF 质谱图;

图 8 例举说明免疫原 B 的 MALDI-TOF 质谱图;

图 9 例举说明免疫原 C 的 MALDI-TOF 质谱图;

图 10 例举说明去甲氯胺酮的 ^{13}C -NMR 图。

5 图 11 例举说明半抗原 A 的 ^{13}C -NMR 图。

图 12 例举说明半抗原 B 的 ^{13}C -NMR 图。

实施例

实施例 1: 制备 α -溴-(邻-氯苯)环戊酮 2

10 在惰性气体下向溶解在 25 毫升无水四氯化碳中的(邻-氯苯)环戊酮 1(21.0g, 0.1mol)的溶液中, 0°C 下, 在 30 分钟的时期内, 滴加溶于 100 毫升四氯化碳中的溴(16.17g, 0.1mol)。在加入所有溴后, 形成了橙色悬浮液。在室温下, 搅拌悬浮液 30 分钟, 然后用 10% (w/v)的二硫化钠(2X100ml)洗涤。在无水硫酸钠上干燥有机相, 过滤和在减压条件下蒸发至干, 得到黑棕色
15 油状的 α -溴-(邻-氯苯)环戊酮 2(24.0g, 83%), 不进行纯化用于实施例 2。

实施例 2: 1-[(邻-氯苯)亚胺甲基]环戊醇 3 的制备

在 -78°C 下, 向液氨溶液(100ml)用 1 小时分批加入粗制化合物 2(24.0g, 0.0834mol)。然后, 搅拌混合物 4 小时, 允许氨蒸发过夜。用四氢呋喃悬浮
20 得到的固体残留物, 过滤除去沉淀。在减压条件下浓缩滤液, 用石油醚研磨得到的残留物。滤出得到的沉淀, 在 P_2O_5 下干燥过夜得到白色固体的 1-[(邻-氯苯)亚胺甲基]环戊醇 3 的游离碱 (16.8g, 90%)。

IR(KBr): 3210.9; 1635.9; 763.3 cm^{-1}

25 NMR ^{13}C (CDCl_3): 183.4; 138.2; 130.3; 130.0; 129.8; 127.2; 84.9; 38.6(2C); 23.6(2C)ppm.

M.P.(石油醚): 88-90 $^{\circ}\text{C}$

将 20g(0.089mol)化合物 3 的游离碱溶解于 25ml 异丙醇中, 在该溶液中加入 100 毫升乙醚的盐酸溶液(2N)制备 1-[(邻-氯苯)亚胺甲基]环戊醇盐酸盐
30 3。然后, 搅拌混合物 10 分钟, 过滤得到的沉淀, 用乙醚洗涤, 干燥得到白色固体的混合物 3 的盐酸盐(23.14g, 100%)。

M.P.: 144-146°C

实施例 3: [2-氨基-2-(邻-氯苯基)]环己酮(去甲氯胺酮)4 的制备

在 200°C, 化合物 3 的盐酸盐(20g, 0.077mol)以一份一份地加入到 250ml
5 的 Dowtherm-A™ 中, 在 200°C 搅拌该混合物 15 分钟。在 10°C 冷却该反应混
合物, 除去形成的沉淀, 通过过滤丢弃。用醚中稀释滤液, 用水萃取(2X200ml)
。用醚洗涤合并的水相, 用 6N 氢氧化钠调节碱性, 用醚萃取(2X150ml)。
用水洗涤合并的醚层, 干燥和浓缩至干。在硅胶(70%己烷/30%乙酸乙酯)上
快速色谱纯化残留物, 得到去甲氯胺酮游离碱 4(13.75g, 80%), 无色油状物。
10 IR(薄膜): 3381.47; 3310.15; 3064.64; 1939.96; 2864.94; 1712.61 和 757.0。
NMR¹³C(CDCl₃): 212.85; 140.47; 133.11; 131.08; 129.01; 128.36; 127.24; 66.52
; 41.35; 39.06; 28.42; 22.23(图 10)。

实施例 4: N-(4'-羧丙基)去甲氯胺酮-半抗原 A 的制备

15 在 0°C 时向 15% 的琥珀醛酸溶液(5ml, 8.018mmol, 811.7mg)中加入四氢
呋喃(20ml)、去甲氯胺酮 4(1.38g, 6.17mmol 和 氰基硼氢化钠(388mg,
6.17mmol)。在室温下搅拌该混合物 2 小时, 薄层层析(10% 甲醇的氯仿液)
证明, 起始物质(去甲氯胺酮 4)不再存在。向这一溶液中, 加入 20ml 1N 盐
酸, 再搅拌该反应混合物 1 小时。在减压下蒸发四氢呋喃, 用氢氧化钠(1N)
20 将剩余水溶液中中和到 pH7, 并且用氯仿(3X50ml)萃取。用 5% 的碳酸氢钠溶
液(50ml)、水(50ml)洗涤合并的有机层, 在无水硫酸钠上干燥, 过滤和浓缩
至干。通过在硅胶上层析(10% 甲醇的氯仿液)纯化残留物, 得到 0.8g(38.8%)
的 N-(4'-羧丙基)去甲氯胺酮(半抗原 A)的白色吸湿泡沫。

IR(薄膜): 3354.76; 3056.10; 1721.05; 1265.70; 736.68。

25 NMR¹³C(CDCl₃): 208.26; 175.37; 135.33; 134.27; 131.47; 129.85; 129.76; 127.0
8; 70.49; 42.72; 39.02; 38.21; 34.7; 29.01; 24.54; 21.93(图 11)。

实施例 5: N-(3'-乙酰基硫代丙基)去甲氯胺酮-半抗原 B 的制备

30 在去甲氯胺酮 4(2.5g, 0.011mol) 50ml 无水乙醇溶液中加入三乙胺,
TEA, (2ml)和乙酸碘代丙基硫酯 (2.95g, 0.0121mol)。混合物搅拌回流 48 小
时 (TLC 显示反应完成)。蒸发溶液至干, 通过在硅胶(60%己烷/40%乙酸乙

酯)上层析纯化残留物, 获得 1.8g(48%)的 N-(3'-乙酰基硫代丙基)去甲氯胺酮(半抗原 B)的亮黄色油形式。

IR(薄膜):3354.33; 3063.62; 2937.2; 2863.86; 1692.95(br)和 757.97。

NMR¹³C(CDCI₃):209.27; 196.51; 138.84; 134.11; 131.6; 129.52;129.04;
5 127.06; 70.21; 41.2; 39.83; 39.6;30.99; 30.92; 28.22; 27.15 和 22.2(图 12)。

实施例 6: N-(3'-乙酰基硫代丙酰胺基)去甲氯胺酮-半抗原 C 的制备

向溶于 10ml 无水 DMF 的去甲氯胺酮 4(2.5g, 0.011mol)溶液中, 在氮气条件下加入 3-乙酰基硫代丙酸(1.79g, 0.012mol), EDC 盐酸盐(2.53g, 0.013mol)
10 和吡啶(1.9g, 0.024mol)。然后, 在室温下搅拌该混合物 2 小时(TLC 表明反应中没有起始物质)。将混合物蒸发至干, 在硅胶(50%己烷/50%乙酸乙酯)上快速层析纯化粗制产物, 得到 2.3g(62%)的 N-(3'-乙酰基硫代丙酰胺基)去甲氯胺酮(半抗原 C)的黄色油形式。

IR(薄膜):3353.79; 3066.59; 2944.2; 2867.78;1736.06; 1682(br)和 760.16。

15

实施例 7: 半抗原 A 与 BSA 的结合-免疫原 A

将在水(0.5ml)中溶解 104mg 的 EDC 盐酸盐, 立即加入到溶于 DMF (1ml)的半抗原 A 溶液(70mg, 0.22mmol)中。在混合后, 将这一溶液加入到溶于 10ml 水的 BSA(200mg)溶液中。立即加入 Sulfo-NHS(52mg), 在室温下搅拌过夜
20 温育反应混合物。然后, 用磷酸缓冲盐水溶液(PBS), pH7.2 透析混合物 24 小时(换液 3 次), 冷冻干燥。

根据 MALDI-TOF(参见附图 6), 出现的信号表明, 这一样品的平均质子化质量是 m/z 69,227。这些数据表明, 每分子 BSA 已经结合了平均 9.7 个分子的半抗原 A。

25

实施例 8: 溴代乙酰基甘氨酸修饰小牛血清白蛋白的制备

向 BSA(1g)的 0.1M 硼酸缓冲液(pH8.5, 45ml)中, 冷却到 0℃滴加溶于 DMF(5ml)的 N-琥珀酰亚胺溴乙酰基甘氨酸(0.375g, 0.13mmole)。在滴加过程中, 维持 pH 为 8.0, 在 0℃搅拌溶液 1 小时。调节 pH 到 7, 在 4℃下用蒸馏水透析该溶液 24 小时(换液 3 次)。冷冻干燥该溶液得到 990mg 溴乙酰基甘氨酸修饰的 BSA。
30

根据 MALDI-TOF(参见附图 7), 出现主要信号表明, 这一样品的平均质子化质量为 m/z 73,264。在 m/z 36,644 的信号是与双电荷形式的主要成分一致。这些数据表明, 溴乙酰基甘氨酸修饰了平均 38.6 个赖氨酸基团。

5 实施例 9: 半抗原 B 与溴乙酰基甘氨酸修饰 BSA 的结合-免疫原 B

将半抗原 B(70mg)溶解于 0.12M 碳酸钾的 80% 甲醇/20%水溶液中(1ml)。然后, 在氮气下放置混合物 10 到 15 分钟(TLC 表明没有半抗原 B, 形成新的化合物具更低的 Rf)。加入磷酸盐缓冲液(1ml-pH7)终止反应, 加入几滴 0.5M 盐酸, 将 pH 调节到 7。逐滴将该溶液加入修饰的 BSA 溶液(200mg 溶于 10 毫升水)中, 在 4℃ 搅拌过夜(避光保护)。用蒸馏水透析溶液 24 小时(换液 3 次), 冷冻干燥。

根据 MALDI-TOF(参见附图 8), 存在的主要信号表明, 这一样品的平均质子化质量 m/z 是 75,860。信号 m/z 38,077 是与双电荷形式的主要成分一致。这些数据表明, 平均 8.8 个分子的半抗原 B 结合到一个溴乙酰基甘氨酸修饰的 BSA 上。

15 实施例 10: 半抗原 C 与溴乙酰基甘氨酸修饰 BSA 的结合-免疫原 C

用与半抗原 B 相同的方法(实施例 9), 将半抗原 C 与溴乙酰基甘氨酸修饰的 BSA 结合。

20 根据 MALDI-TOF(参见附图 9), 存在的信号表明, 这一样品的平均质子化质量 m/z 76,424。信号 m/z 38,050 与双电荷形式的主要成分一致。这些数据表明, 平均 10.2 个半抗原 C 分子结合一个溴乙酰基甘氨酸修饰的 BSA。

25 实施例 11: 半抗原 A 与 HRP 的结合-偶联物 A

将 10mg 的 EDC 盐酸盐溶解于 800 μ l 的水中, 立即加入到溶于 200 μ l DMF 中的 2mg 半抗原 A 溶液中。混合后, 将这一溶液加入溶于 1ml 水的 HRP(20mg)中。立即加入 Sulfo-NHS(5mg), 在黑暗中室温下, 温育反应混合物过夜。通过用 pH7.2 PBS 预平衡的 2PD-10 柱(Pharmacia)系列进行脱盐除去过量的半抗原。然后用 10L PBS(pH7.2)4℃ 时透析半抗原-HRP 偶联物过夜

30 。

实施例 12: 溴乙酰基甘氨酸修饰 HRP 的制备

用实施例 8 描述的相同方法, 进行溴乙酰基甘氨酸修饰 HRP 的制备。

实施例 13: 半抗原 B 与溴乙酰基甘氨酸修饰 HRP 的结合-偶联物 B

- 5 将 10mg 半抗原 B 溶于 0.5ml 的 0.12M 碳酸钾溶液(80%甲醇/20%水)。在室温下维持得到的溶液 10 分钟。向溶液中加入 1ml 50mM 磷酸盐缓冲液(pH7)终止反应, 用 0.5M 盐酸调节 pH 到 7-7.5。逐滴将 500 μ l 该溶液加入实施例 12 的溴乙酰基甘氨酸修饰 HRP 溶液(20mg 溶于 1ml 水中)中, 在黑暗中 4 $^{\circ}$ C 下搅拌混合物过夜。然后, 利用两个 PD-10 柱(Pharmacia 生物技术公司)
- 10 纯化半抗原-HRP 偶联物, 用 PBS(pH7.2)洗脱, 用 10L 水透析过夜。

实施例 14: 半抗原 C 与溴乙酰基甘氨酸修饰 HRP 的结合-偶联物 C

用实施例 13 中半抗原 B 所用的同样方法将半抗原 C 与溴乙酰基甘氨酸修饰的 HRP 结合。

15

实施例 15: 实施例 10 中制备的免疫原 C 的抗体的制备

- 用弗氏完全佐剂(FCA)配制实施例 10 中制备的免疫原的水溶液, 形成溶于 50% (v/v)FCA 中 4mg/ml 免疫原的乳液。用这一乳液免疫接种三只绵羊(1次免疫接种), 在每个动物侧腹 4 个位置各进行 0.25ml 的皮下注射。第二次
- 20 免疫接种(加强 1)含有 2mg/ml 免疫原, 随后免疫接种(第 2 次到 11 次)含有 1mg/ml 免疫原。在 50% (v/v)弗氏不完全佐剂(FIA)中乳化所有的加强液, 并且以和第一次免疫接种相同的方法注射, 一个月一间隔连续一年。每次加强免疫接种后 7 到 14 天进行血液取样。处理每个样品得到抗血清, 进一步用辛酸和硫酸沉淀纯化得到免疫球蛋白 G(IgG)组分。通过竞争性 ELISA 微量
- 25 滴定板测试评估 IgG 组分, 如下面实施例 16 所述。

实施例 16: 氯胺酮和去甲氯胺酮的竞争性 ELISA 的研制

- 用免疫原 C(半抗原 C-BSA)(实施例 10)产生的抗血清 IgG 包被加强结合的 96 孔聚丙烯微量滴定板, 在 10mM Tris(pH8.5)中稀释(125 μ l/孔)。用标准
- 30 ELISA 检测板技术(checkerboard techniques)确定适当的包被抗体稀释倍数。在 37 $^{\circ}$ C 温育平板 2 小时, 用含有吐温 20 的 Tris 缓冲盐水(TBST)洗涤 4 次,

轻敲干燥。制备 0, 0.1, 0.5, 1.5, 25, 100 和 500ng/ml 的氯胺酮和去甲氯胺酮在 TBST 中的标准溶液, 并将 50 μ l 每个浓度的标准液加入到合适的孔(附图 4)。将在含有 EDTA、D-甘露醇、蔗糖、乙基汞硫代水杨酸钠(thimerosal)和 BSA 的 Tris 缓冲液(pH7.2)中稀释的 75 μ l 的偶联物(半抗原 A-HRP)(实施例 11)加入到各个孔中, 如附图 4 所示。也利用标准 ELISA 检测板技术测定合适稀释的偶联物。在 37 $^{\circ}$ C 温育平板 2 小时。在 10 分钟内用 TBST 洗涤 6 次除去过量、未结合的偶联物。

在平板的每个孔中加入 125 μ l 的四甲基联苯胺(TMB)底物溶液, 然后在黑暗中, 在室温下温育 15 到 20 分钟。每个孔中加入 125 μ l 0.2M H₂SO₄ 终止反应。然后, 利用微量滴定板读数器测量 450nm 处吸光值。试验数据见下表 1。

表 1: 氯胺酮和去甲氯胺酮的竞争性微量滴定板试验产生的数据, 利用了针对免疫原 C(半抗原 C-BSA)产生的抗血清 (实施例 10)和偶联物 A(半抗原 A-HRP)作为检测试剂(实施例 11)。

标准浓度 ng/ml	氯胺酮		去甲氯胺酮	
	A ₄₅₀	% B/B ₀	A ₄₅₀	% B/B ₀
0	2.194	100.0	2.121	100.0
0.1	2.02	92.1	1.843	86.9
0.5	1.817	82.8	1.416	66.8
1	1.489	67.9	1.368	64.5
5	0.935	42.6	0.961	45.3
25	0.548	25.0	0.482	22.7
100	0.404	18.4	0.320	15.1
500	0.254	11.6	0.222	10.5

IC ₅₀	2.9ng/ml	2.1ng/ml
%CR	100.0	138.1

A₄₅₀=450nm 处的吸光值

B= 450nm 处, xng/ml 标准浓度的吸光值

B_0 =450nm 处 0ng/ml 标准浓度的吸光值

IC_{50} = 产生 50 % B/B_0 的标准浓度

%CR=基于对氯胺酮的特异性的交叉反应百分数，这是本发明说明书中术语“交叉反应性”的含义。

5

实施例 17: 氯胺酮和去甲氯胺酮的竞争性 ELISA 的交叉反应性

为了确定氯胺酮和去甲氯胺酮的竞争性 ELISA 的特异性，制备溶于 TBST 中下面浓度的标准溶液：0, 0.1, 0.5, 1, 5, 25, 100 和 500ng/ml。利用每个氯胺酮竞争性 ELISA 标准系列，绘制校准曲线，利用这些来确定这些物质的免疫测试交叉反应性。这一研究结果表示在表 2 中，根据下式计算潜在的交叉反应剂苯环利定和右甲吗喃的交叉反应性：

$$\%CR = IC_{50, \text{氯胺酮}} / IC_{50, CR} \times 100$$

其中 %CR 是交叉反应性百分数， $IC_{50, \text{氯胺酮}}$ 是导致信号 50 % 置换的氯胺酮浓度， $IC_{50, CR}$ 是导致信号 50% 置换的潜在交叉反应试剂的浓度。

15

表 2: 氯胺酮和去甲氯胺酮的竞争性 ELISA 交叉反应性

交叉反应试剂	$IC_{50, CR}$ (ng/ml)	%CR
苯环利定	>500.0	< 0.58
右甲吗喃	>500.0	< 0.58

$IC_{50, CR}$ =导致 50 % 信号置换的潜在交叉反应试剂的浓度

%CR = 基于氯胺酮的特异性的交叉反应性百分数

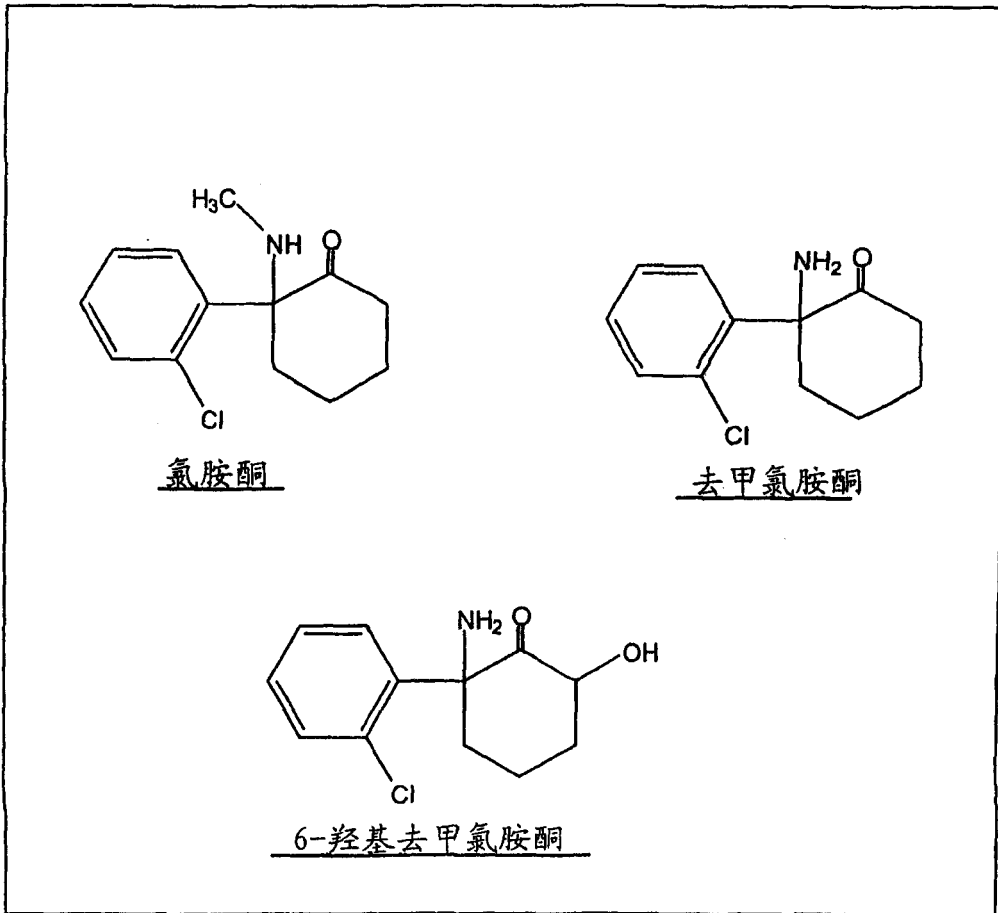


图 1

图 2

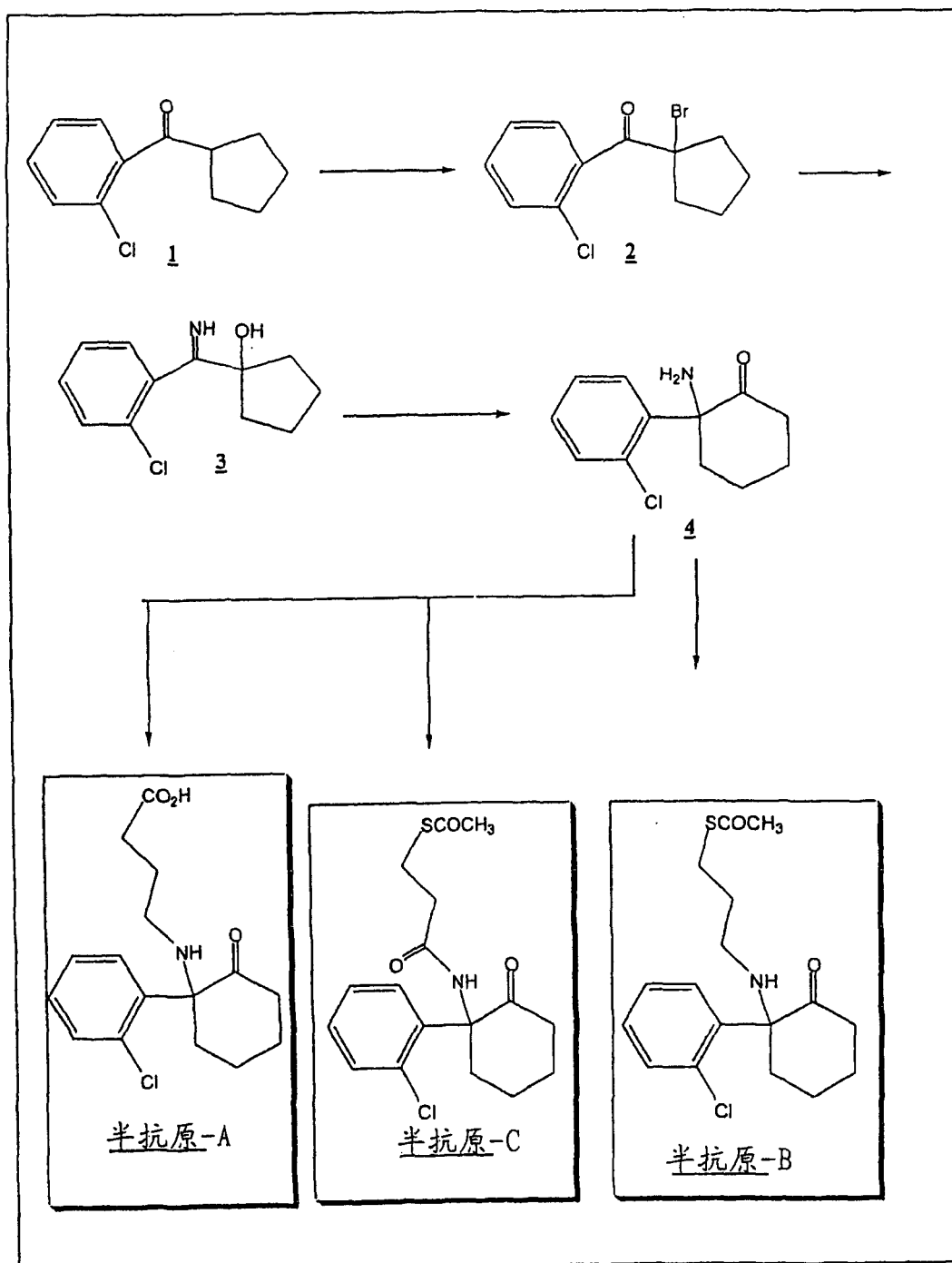


图 3

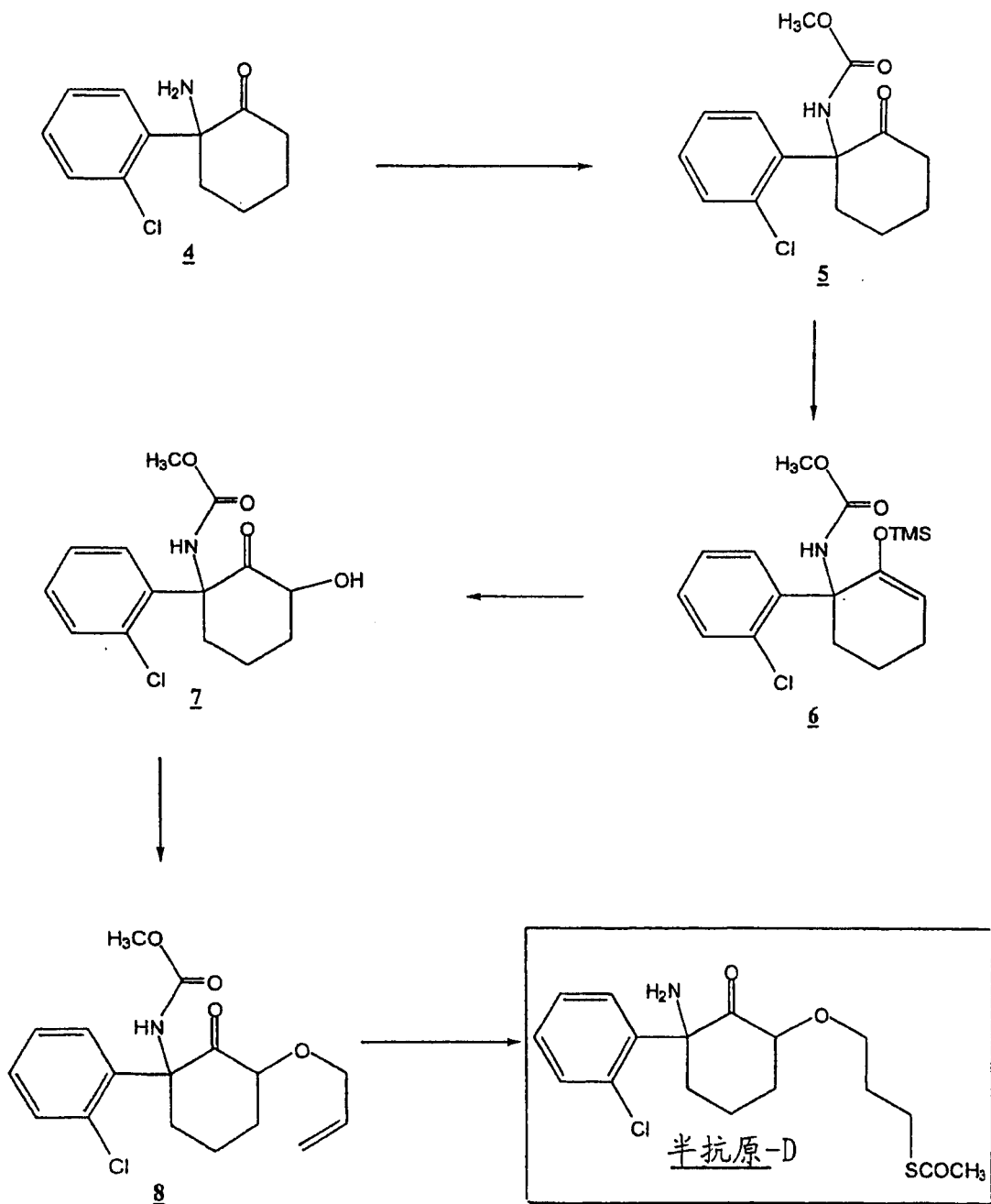
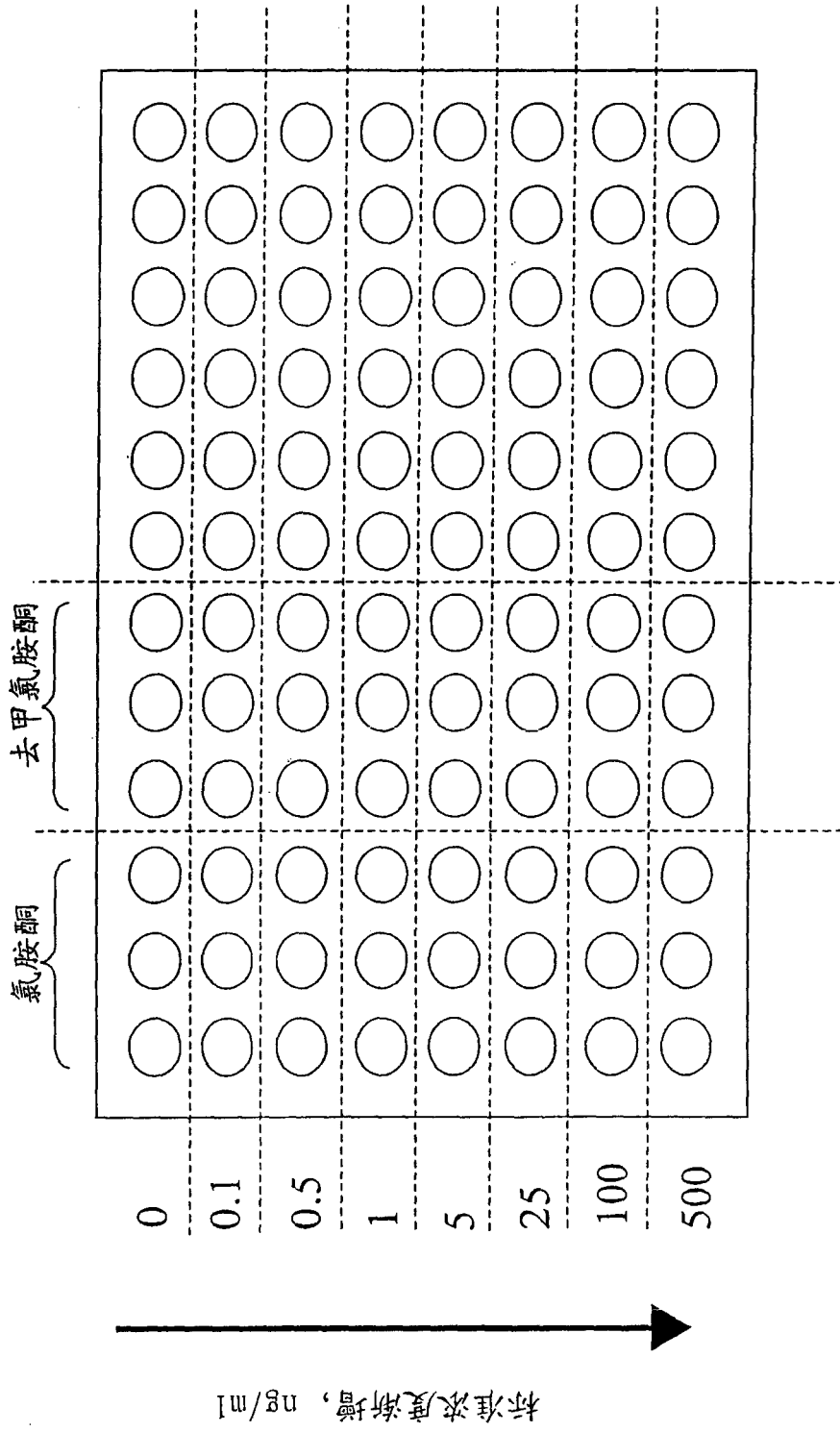


图 4



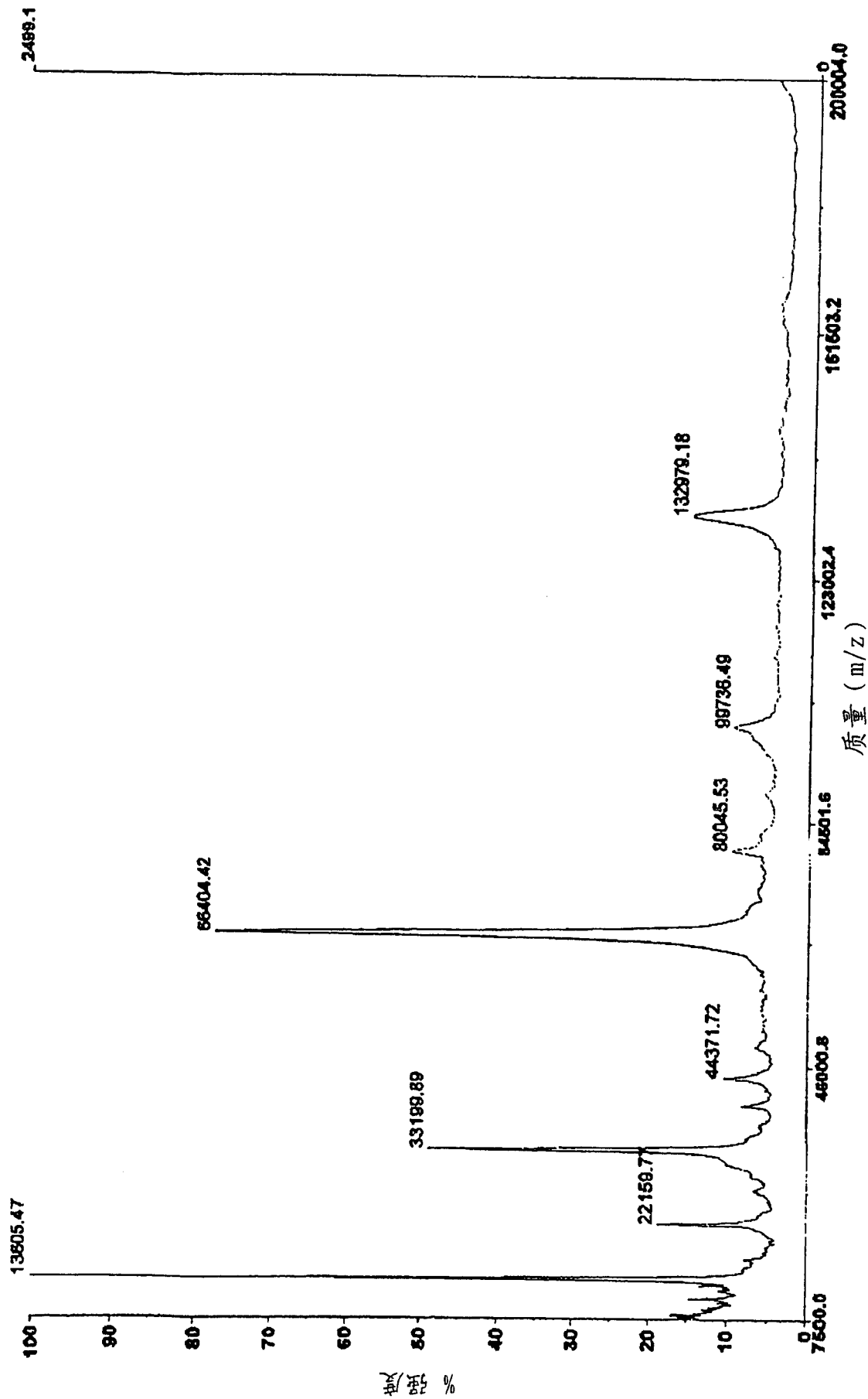


图 5

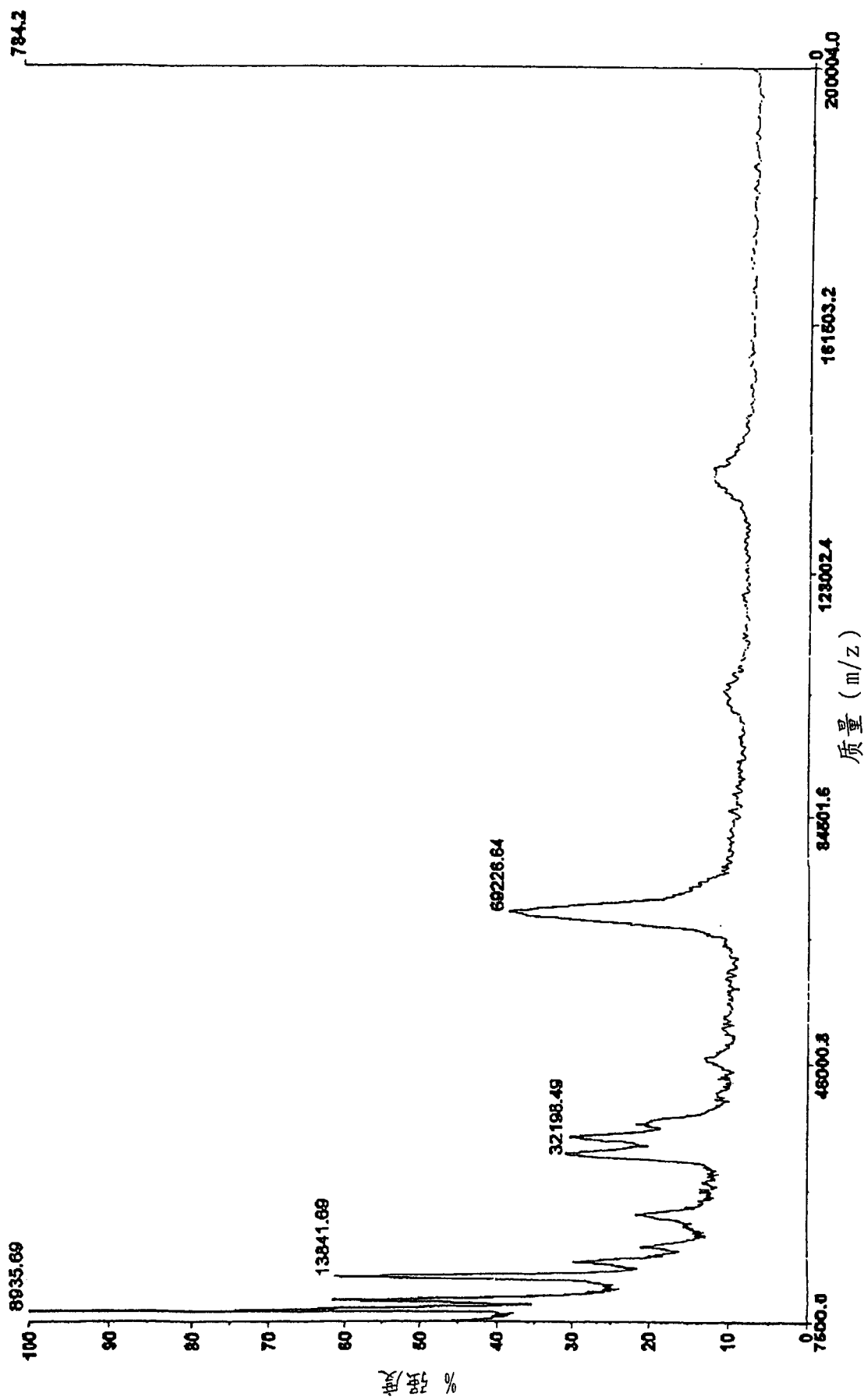


图 6

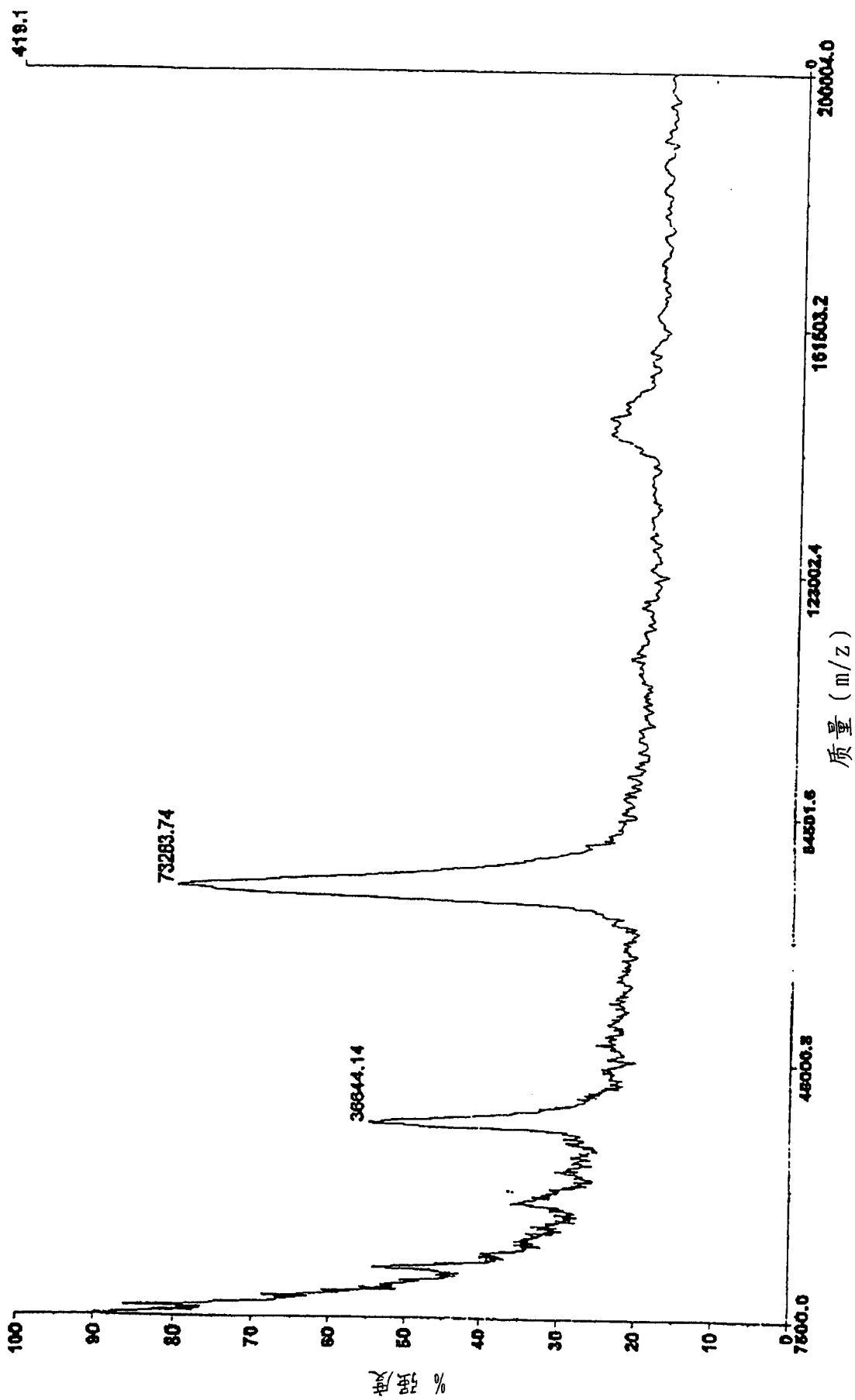


图 7

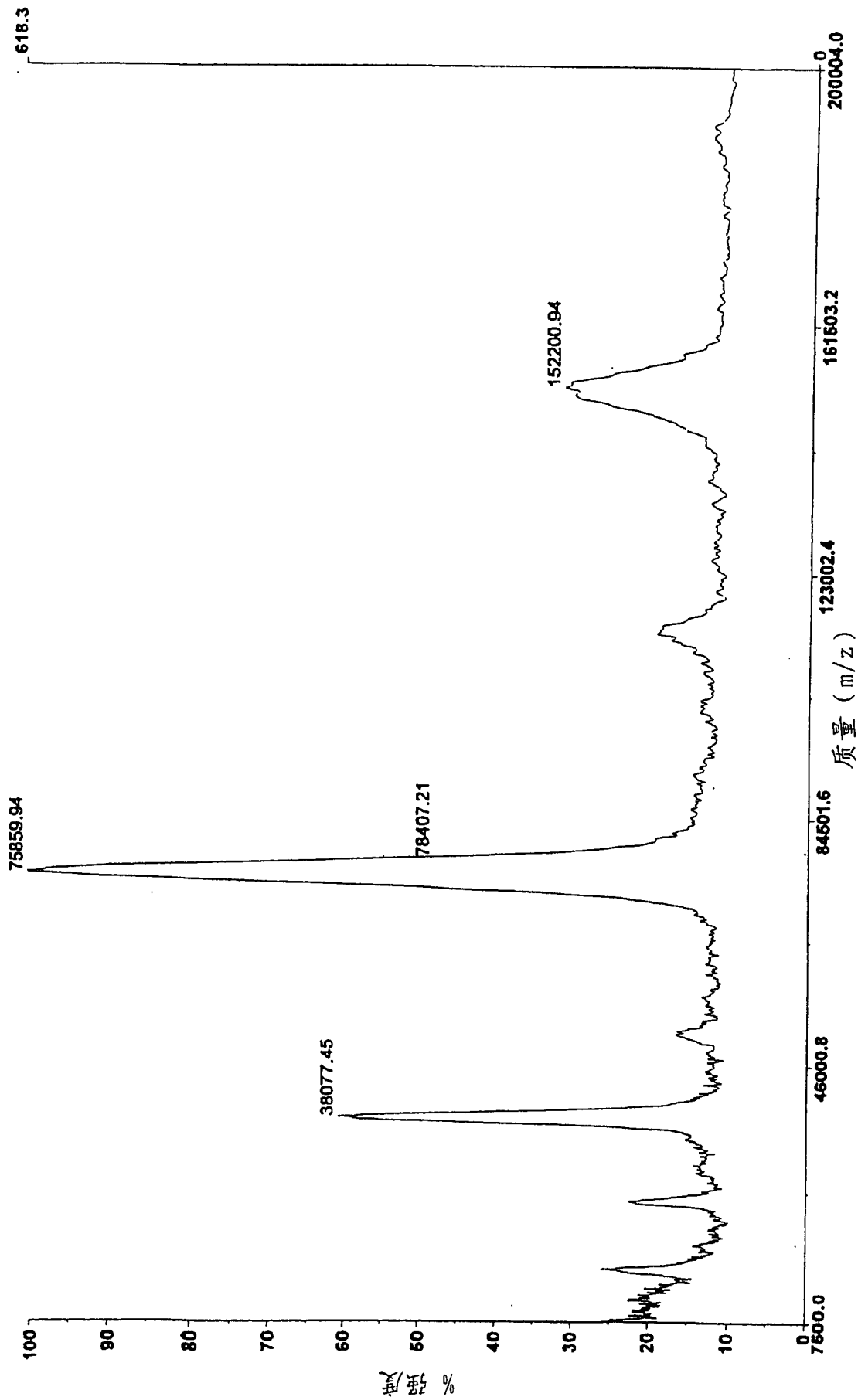


图 8

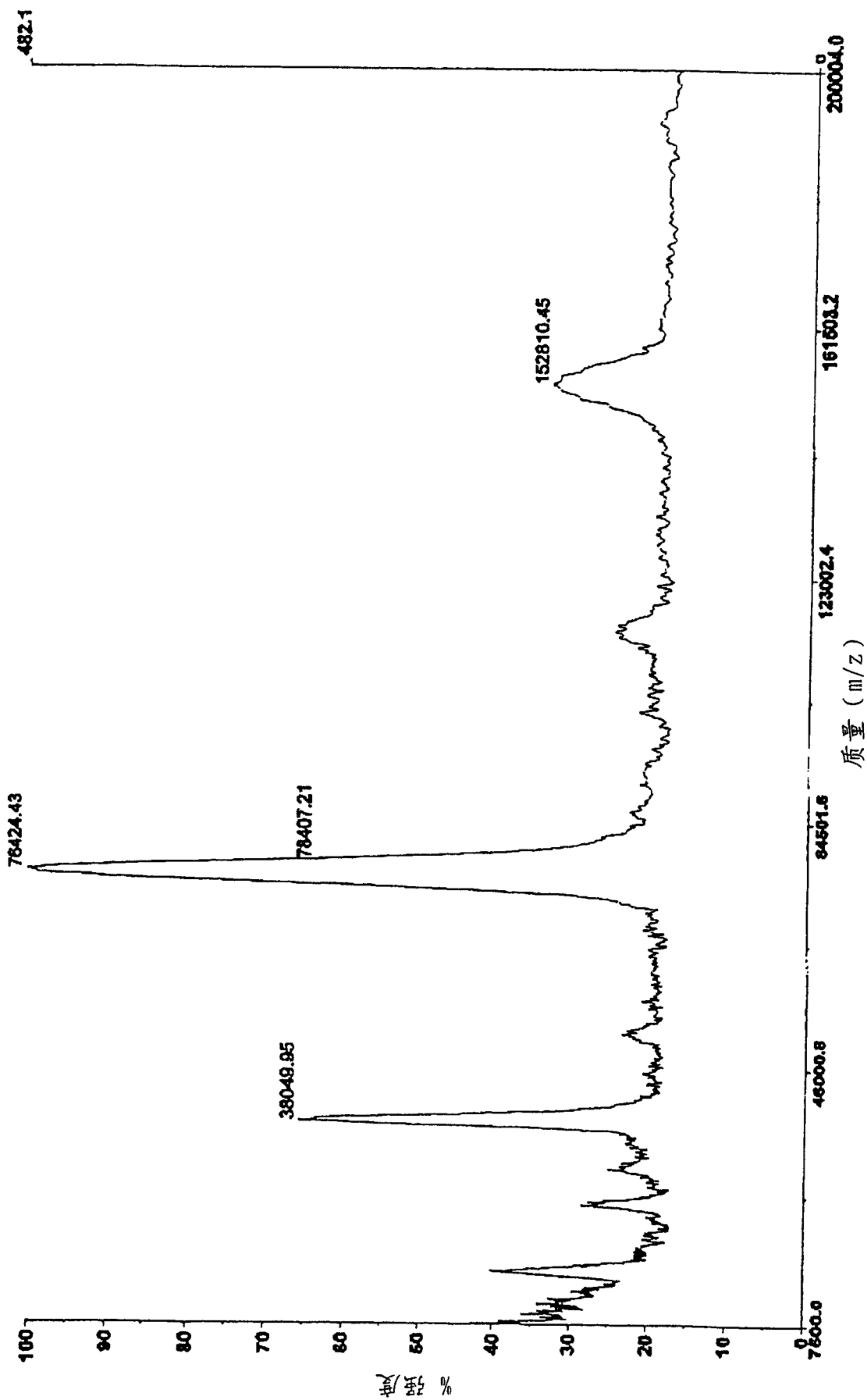


图 9

Current Data Parameters
 NAME JK/KA
 EXPNO 10
 PROCNO 1

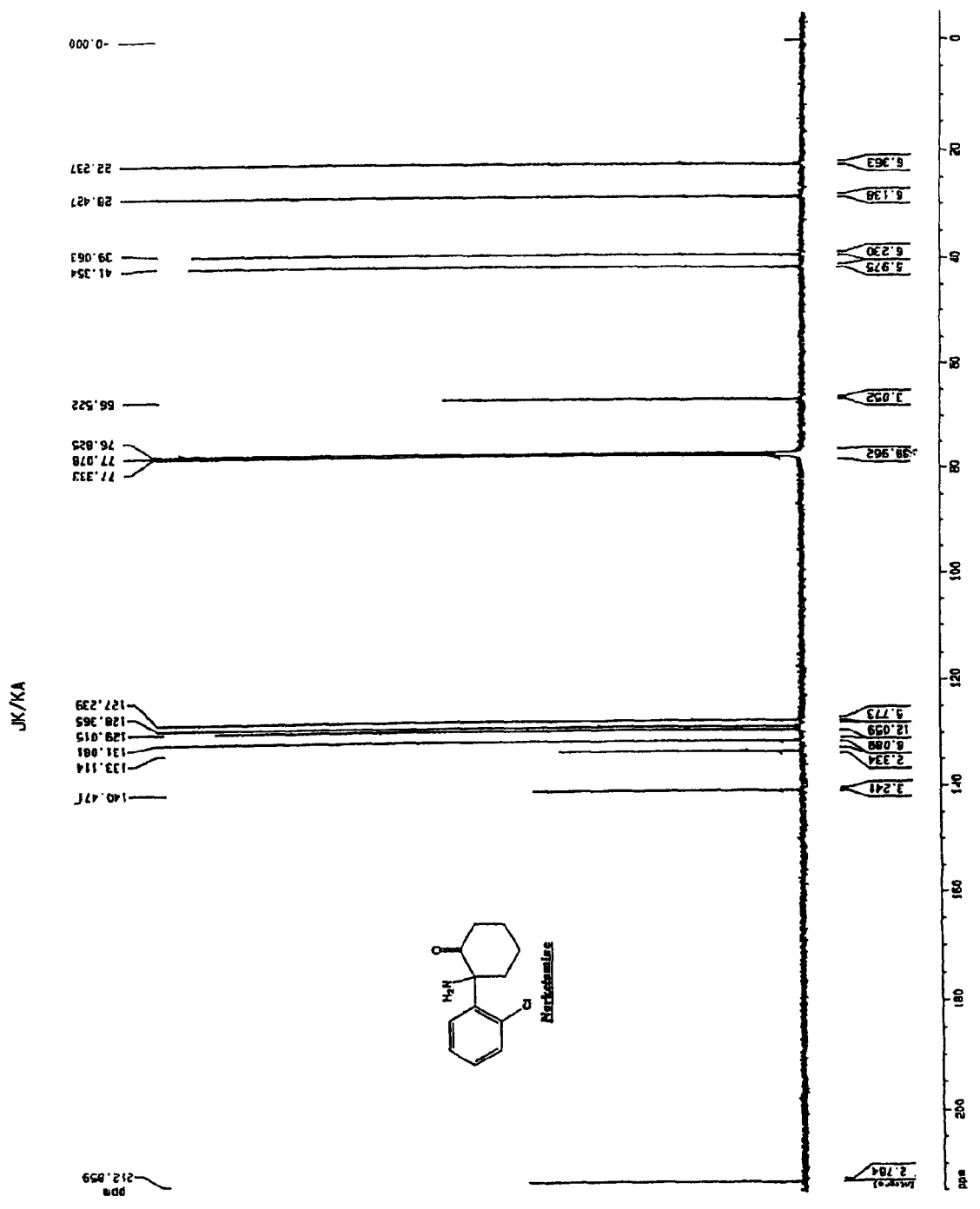
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20010605
 Time 7.48
 INSTRUM spect
 PRGNAME 1
 CHANID 001
 PULPROG zgpg30
 TD 65536
 SFO 400.136
 AQ 32.48
 F2 400.136
 P2 1.00
 T2 1.00
 FIDRES 0.000200
 AQ 0.000200
 CHANID 001

CH1 13C
 P1 0.08 sec
 PL 0.00
 PR 1.00
 SFO 125.770500 MHz

CH2 13C
 P1 0.08 sec
 PL 0.00
 PR 1.00
 SFO 125.770500 MHz

CH3 13C
 P1 0.08 sec
 PL 0.00
 PR 1.00
 SFO 125.770500 MHz

F2 - Processing Parameters
 SI 32768
 SF 400.136000 MHz
 DS 4
 SC 1
 EQ 1
 GB 0
 CB 0
 CD 0
 CE 0
 CF 0
 CG 0
 CH 0
 CI 0
 CJ 0
 CK 0
 CL 0
 CM 0
 CN 0
 CO 0
 CP 0
 CQ 0
 CR 0
 CS 0
 CT 0
 CU 0
 CV 0
 CW 0
 CX 0
 CY 0
 CZ 0
 DZ 0
 EZ 0
 FZ 0
 GZ 0
 HZ 0
 IZ 0
 JZ 0
 KZ 0
 LZ 0
 MZ 0
 NZ 0
 OZ 0
 PZ 0
 QZ 0
 RZ 0
 SZ 0
 TZ 0
 UZ 0
 VZ 0
 WZ 0
 XZ 0
 YZ 0
 ZY 0
 ZY 0
 ZY 0



10

JKK02H

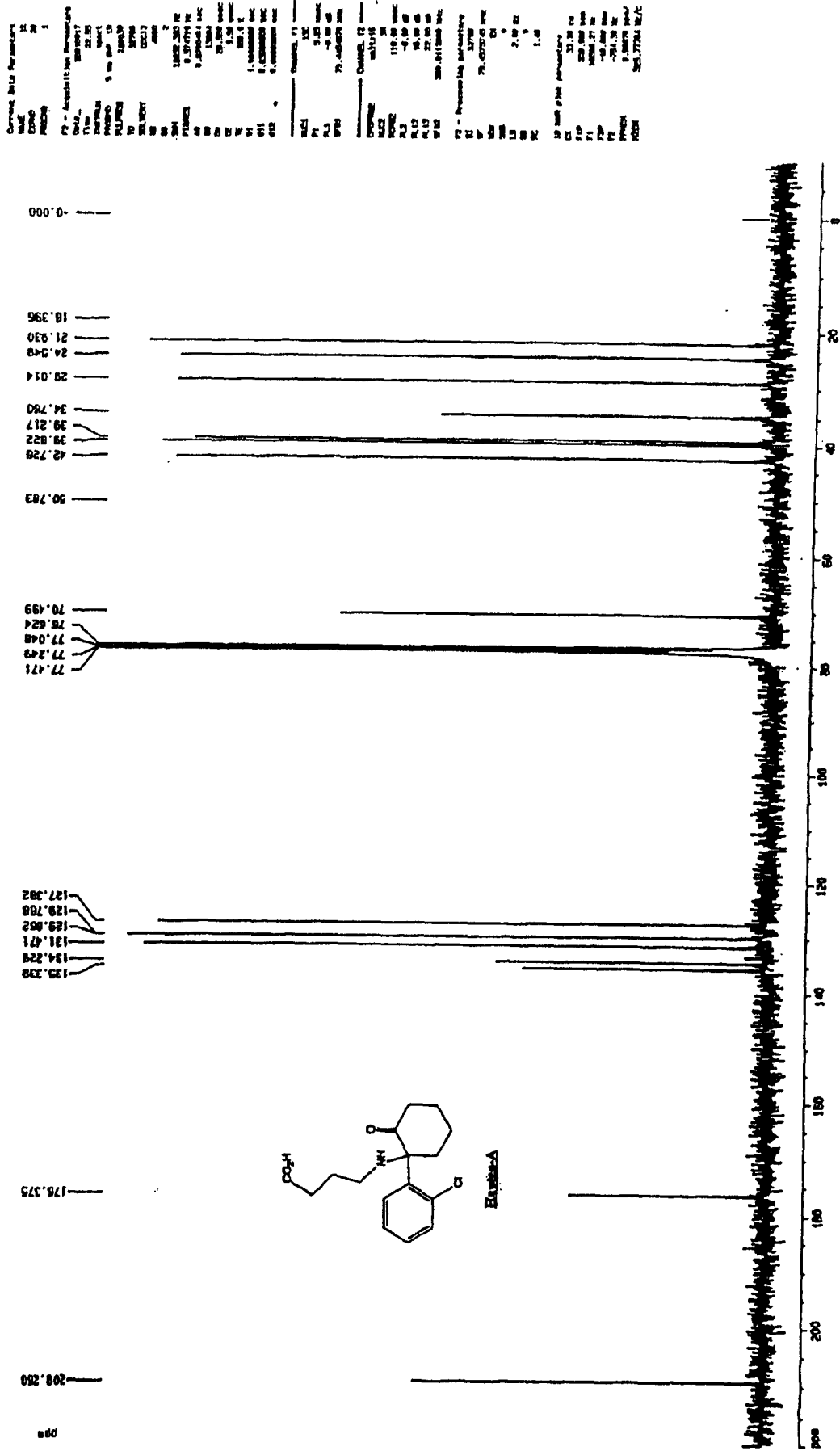


图 11

K/KSA

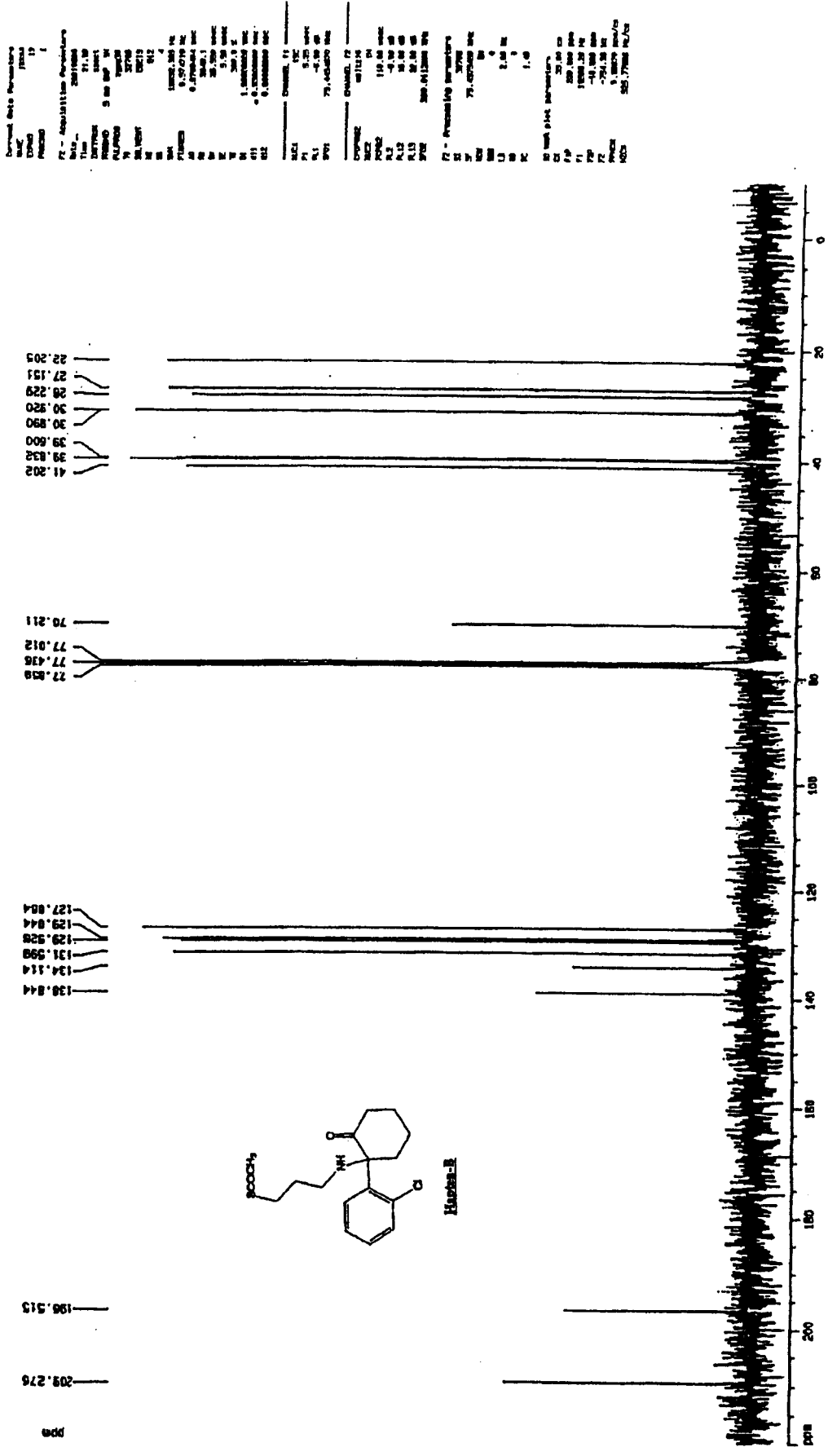


图 12

专利名称(译)	氯胺酮和其代谢物的半抗原、免疫原、抗体和偶联物		
公开(公告)号	CN1496974A	公开(公告)日	2004-05-19
申请号	CN03136682.1	申请日	2003-01-31
[标]发明人	罗伯特·麦康奈尔 埃尔·O·本奇克 斯蒂芬·P·菲茨杰拉德 约翰·V·拉蒙特		
发明人	罗伯特·I·麦康奈尔 埃尔·O·本奇克 斯蒂芬·P·菲茨杰拉德 约翰·V·拉蒙特		
IPC分类号	A61K47/48 C07K16/44 G01N33/94 C07C223/04 C07C323/24 C07C327/40 C07K14/765 C07K16/00 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/532		
CPC分类号	Y10S436/815 Y10T436/13 C07K16/44 A61K47/48246 Y10S530/807 A61K47/4833 G01N33/94 Y10T436/17 Y10S436/823 A61K47/64 A61K47/646		
优先权	2002075445 2002-01-31 EP		
其他公开文献	CN100519513C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了去甲氯胺酮的N位置或在羟基去甲氯胺酮或羟基氯胺酮的O位置用交联剂衍生的半抗原。本发明也提供了包括所述半抗原与产生抗原性的载体物质结合的免疫原，以及抗所述半抗原的抗体。另外，本发明涉及包括所述半抗原与可检测的标记试剂共价结合的半抗原偶联物。本发明也提供了利用了本发明的偶联物和抗体检测或测定氯胺酮和它的初级代谢物，去甲氯胺酮的方法和试剂盒。

