



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02150665.5

[43] 公开日 2003 年 7 月 9 日

[11] 公开号 CN 1428607A

[22] 申请日 2002.11.15 [21] 申请号 02150665.5

[30] 优先权

[32] 2001.11.16 [33] EP [31] 01204401.2

[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

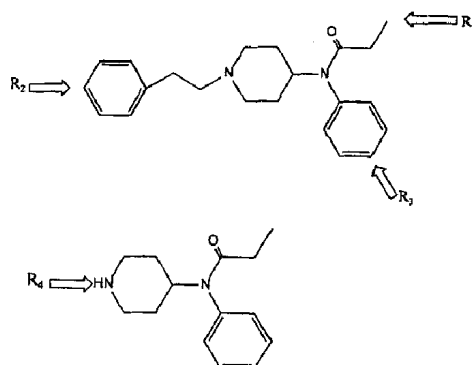
代理人 赵仁临 张平元

权利要求书 4 页 说明书 24 页 附图 16 页

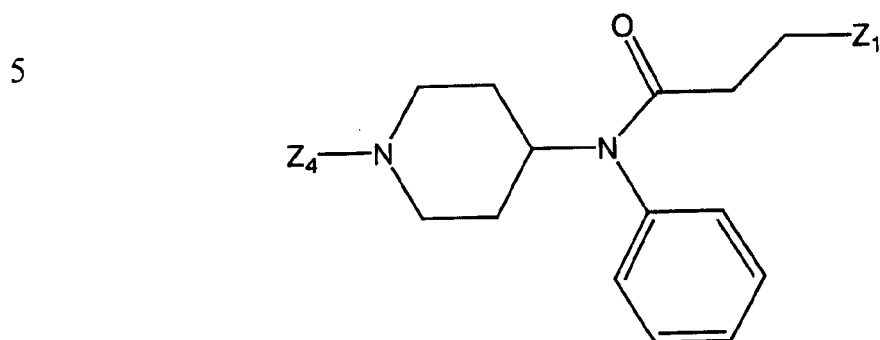
[54] 发明名称 检测或定量测定芬太尼的代谢物或芬太尼类似物的代谢物的方法和试剂盒

### [57] 摘要

本发明描述了可用交联剂衍生的半抗原，是在附图 1a 中 R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub> 和 R<sub>4</sub> 示意说明的位置衍生的，条件是 R<sub>1</sub> 不是羧基。另外，本发明要求保护一种含有某些结合具有抗原性载体物质的前述半抗原的免疫原；一种含有某些结合可检测的标示剂的前述半抗原的偶合物；以及抗前述免疫原而制备的和能够与至少一个芬太尼的代谢物和芬太尼类似物的代谢物的结构表位结合的抗体。本发明还提供了检测或定量测定芬太尼代谢物和芬太尼类似物的代谢物的方法和试剂盒，以及含有前述抗体的前述偶合物在检测或定量测定芬太尼代谢物和芬太尼类似物的代谢物的量的用途。本发明对芬太尼的各种代谢物和芬太尼类似物的各种代谢物都具有宽广特异性。



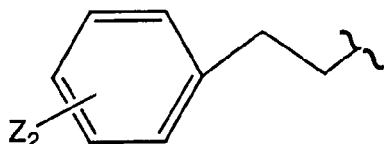
1. 一种如下通式的免疫原：



10

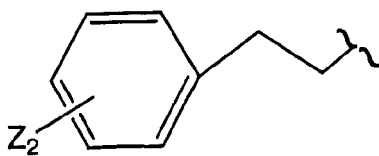
其中  $Z_1$  是结合具有抗原性的载体物质的交联剂或氢； $Z_4$  选自于 N-苯乙基、结合具有抗原性的载体物质的交联剂或

15



其中  $Z_2$  是在邻位、间位或对位结合具有抗原性的载体物质的交联剂，条件是当  $Z_1$  是氢时， $Z_4$  是结合具有抗原性的载体物质的交联剂或

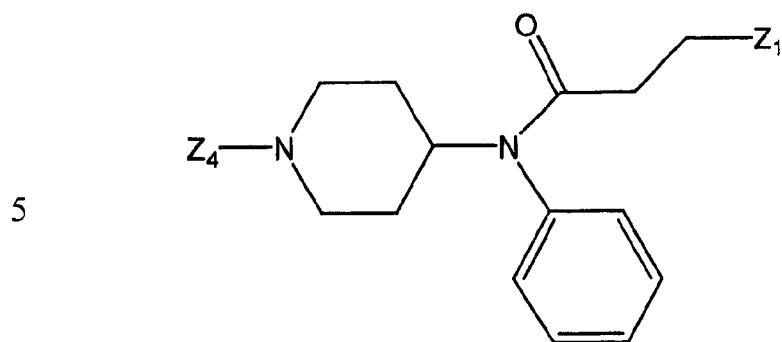
20



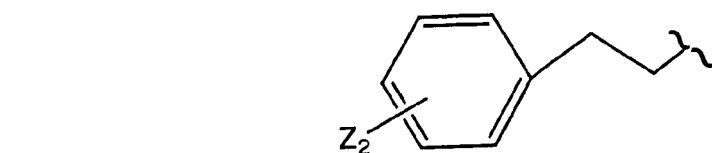
25

其中  $Z_2$  是在邻位、间位或对位结合具有抗原性的载体物质的交联剂，并且当  $Z_4$  是 N-苯乙基时， $Z_1$  是结合具有抗原性的载体物质的交联剂，该交联剂不是 -COOH。

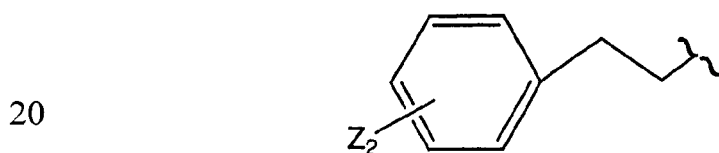
2. 一种如下通式的偶联物：



10 其中其中  $Z_1$  是共价结合有可检测的标示剂的交联剂或氢； $Z_4$  选自于 N-苯乙基、共价结合可检测标示剂的交联剂或



其中  $Z_2$  是在邻位、间位或对位共价结合可检测的标示剂的交联剂，条件是当  $Z_1$  是氢时， $Z_4$  是共价结合可检测的标示剂的交联剂或



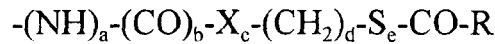
25 其中  $Z_2$  是在邻位、间位或对位共价结合可检测的标示剂的交联剂，并且当  $Z_4$  是 N-苯乙基时， $Z_1$  是共价结合可检测的标示剂的交联剂，该交联剂不是-COOH。

3.按照权利要求 1 或 2 中的任何一项所要求的免疫原或偶合物，其中  $Z_2$  的交联剂在对位。

4.按照前述权利要求中任何一项所要求的免疫原或偶合物，其中所述的交联剂在其游离端是用-CO-R 终止，其中 R 是羟基或短链的烷基( $C_{1-5}$ )，  
30 优选  $C_{1-2}$  烷基。

5.按照权利要求 1-3 的任何一项所要求的免疫原或偶联物：其中所述的

交联剂含有：



其中 a 是 0 或 1；b 是 0 或 1；X 是氧或硫；c 是 0 或 1；d 是选自 1-5 的整数；e 是 0 或 1 并且 R 是短链 ( $\text{C}_{1-5}$ ) 烷基，优选  $\text{C}_{1-2}$  烷基或羟基。

- 5           6.按照权利要求 6 所要求的免疫原或偶合物，其中 a 是 1；b 是 1；c 是 0 和 d 是 2。
- 7.按照权利要求 6 所要求的免疫原和偶合物，其中 e 是 1 而 R 是甲基。
- 8.按照权利要求 6 所要求的免疫原或偶合物，其中 e 是 0 和 R 是羟基。
- 9.按照权利要求 6-8 的任何一项所要求的免疫原或偶合物，其中  $\text{Z}_1$  是氢而  $\text{Z}_2$  交联剂是在对位。
- 10           10.按照权利要求 5 所要求的免疫原或偶合物，其中 a 是 0；b 是 0 而 c 是 0。
- 11.按照权利要求 10 所要求的免疫原和偶合物，其中 d 是 0；e 是 1 而 R 是甲基。
- 15           12.按照权利要求 10 所要求的免疫原和偶合物，其中 d 是 1；e 是 0 而 R 是羟基。
- 13.按照权利要求 10-12 的任何一项所要求的免疫原或偶合物，其中  $\text{Z}_1$  或  $\text{Z}_2$  是交联剂。
- 14.按照权利要求 1 和 3-13 中的任何一项所要求的免疫原，其中具有
- 20 抗原性的载体物质是选自于蛋白、蛋白片段、合成多肽或半合成多肽。
- 15.抗权利要求 1 和 3-14 中任何一项所要求的免疫原所制备的抗体，其中所述抗体是能够与至少一个芬太尼代谢物或芬太尼类似物的代谢物的结构表位结合。
- 16.一种制备权利要求 15 所述抗体的方法，该方法包括通过反复给药
- 25 权利要求 1 和 3-14 中任何一项所述免疫原来给动物免疫接种和收集所得到的免疫接种过的动物的血清的步骤。
- 17.按照权利要求 2-13 中任何一项所要求的偶合物，其中可检测的标示剂选自酶，优选是过氧化酶，更优选辣根过氧化物酶；发光的物质，优选选自生物发光、化学发光或荧光性物质；放射活性物质；或其混合物。
- 30           18.一种检测或定量测定样品中芬太尼的代谢物或芬太尼类似物的代谢物的方法，该方法包括将权利要求 2-13 和 17 所要求的偶合物或其混合物

以及权利要求 15 所要求的抗体或其混合物与样品接触；并且从样品中芬太尼代谢物和芬太尼类似物的代谢物的存在或含量的校准曲线推出。

19.一种检测或定量测定芬太尼代谢物和芬太尼类似物的代谢物的试剂盒，该试剂盒包括权利要求 2-13 和 17 中任何一项所要求的偶合物或其混合物和权利要求 15 所要求的抗体或其混合物。

20.按照权利要求 18 或 19 的方法或试剂盒，其中抗体是抗其中  $Z_1$  或  $Z_2$  是交联剂优选  $Z_2$  是交联剂的免疫原所制备的。

21.按照权利要求 18-20 中任何一项的方法或试剂盒，其中偶合物的  $Z_2$  或  $Z_4$  是交联剂，优选  $Z_4$  是交联剂。

检测或定量测定芬太尼的代谢物或芬太尼  
类似物的代谢物的方法和试剂盒

5

本发明涉及一种检测或定量测定芬太尼的代谢物或芬太尼类似物的代谢物优选去甲代谢物的方法和试剂盒，以及其中可用的免疫原、偶合物和抗体。

“检测”是指定性分析物质存在或不存在。

10

“测定”是指定量分析存在物质的量。

“芬太尼”是指 N-(1-苯乙基-4-哌啶基)-N-苯基丙酰胺。

15

“芬太尼类似物”是指具有类似于芬太尼的 N-苯基-N-(4-哌啶基)胺结构和具有芬太尼药理活性的物质。这类“芬太尼类似物”包括，但不限于，舒芬太尼、carfentanil、乙酰基芬太尼、p-氟芬太尼、苜基芬太尼、噻吩基芬太尼、 $\alpha$ -甲基噻吩基芬太尼、丁酰基芬太尼和盐酚芬太尼以及称之为设计药物 $\alpha$ -和 p-甲基芬太尼和 3-顺/反-甲基芬太尼。

20

“代谢物”是指芬太尼和芬太尼类似物的体内分解产物。这样，对芬太尼来说，它包括去甲-芬太尼(N-(丙酰基)-4-N-苯胺基哌啶)、去丙酰基芬太尼(N-(1-苯乙基-4-哌啶基)-苯胺)、对羟基芬太尼(N-(对羟基苯基)-N-[1-(2-苯乙基)-4-哌啶基]丙酰胺)和对羟基去甲芬太尼(N-丙酰基-4-N-(对羟基苯胺基)哌啶)。

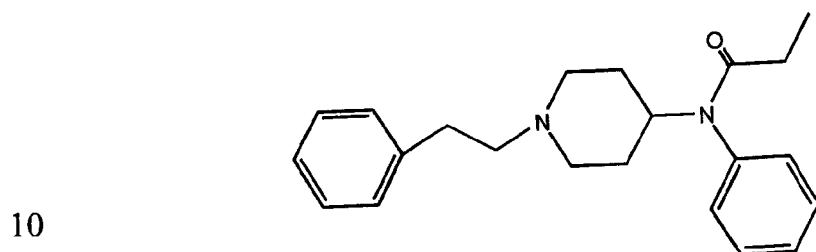
25

本发明的目的是使芬太尼和芬太尼类似物的所有代谢物具有广谱用途。本发明的目的是使芬太尼和芬太尼类似物的去甲代谢物具有特殊用途。本发明的目的是使芬太尼的去甲代谢物具有最佳用途。本发明的目的也是使芬太尼本身及其类似物具有广谱用途。

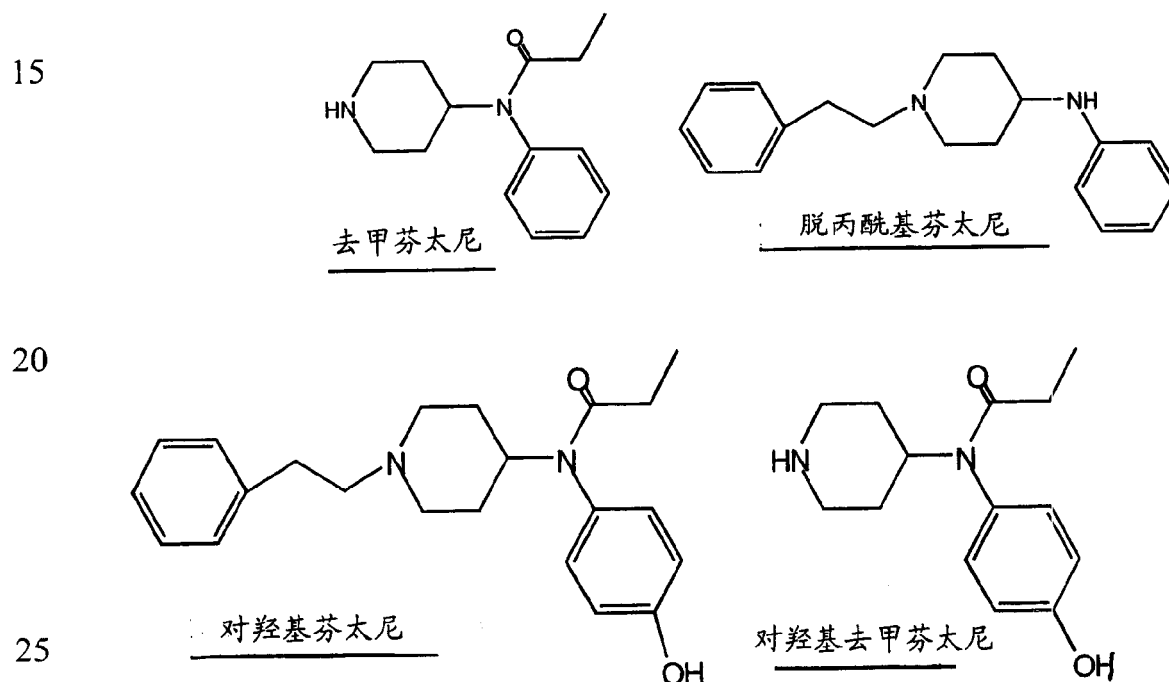
30

芬太尼是具有吗啡止痛剂功效至少 80 倍的有效合成的类吗啡物质。它通常在手术前后用于导入和维持麻醉和手术后止痛。为了增加芬太尼的止痛和欣快作用，现在已经合成了它的类似物。由于它们的高效和麻醉止痛的快速起效，芬太尼及其类似物具有滥用的趋势。芬太尼可以从血液中快速分布到肌体组织并且可以被全部代谢。在人体中，在 72 小时内大约 80% 的芬太尼剂量可以被分泌到尿液中，使尿液具有 92% 到 98% 的这种成分的

代谢物。芬太尼在人体中的主要代谢途径是氧化性 N-脱烷基以形成去甲芬太尼(Silverstein 等, 1993)。N-脱烷基也似乎是芬太尼类似物如盐酸芬太尼和舒芬太尼的特征(Camu 等(1982)和 Meuldermans 等(1982))。相对来说, 在  
 5 malonanilinic 酸(Frincker 等(1980))。芬太尼的化学结构表示如下:



具有 10 分钟半衰期的芬太尼至少在人体中的代谢主要得到:



现在已有各种方法用来测定样品中芬太尼及其类似物的代谢物的量。分析方法包括具有火焰离子化、电子捕获和氮气敏感性检测的气相色谱和  
 30 气相色谱/质谱(GC/MS)。例如, 分析尿液中的芬太尼和 3-甲基芬太尼的去甲代谢物的敏感性气相色谱法公开于 W.R. Hammargren 和 G.L.Henderson,

1988。所公开的方法包括电子捕获检测器或质谱的测定。但是，这种色谱法用作筛选工具太昂贵和费时。

用于测定芬太尼及其类似物量的放射性免疫测定法也是非常敏感的，但需要放射性核素示踪物例如  $^{125}\text{I}$  和  $^3\text{H}$ ，并且在一些情况下，需要初级的提取步骤。例如，使用各种不同类型的放射性免疫测定法(RIAs)包括固相 RIA 来检测芬太尼和相关类似物。Harnmargren 和 Henderson(1988)公开了使用由诊断产品所产生的  $^{125}\text{I}$  的 RIA。但是，发现使用该放射性免疫测定法去甲代谢物和脱丙酰基代谢物不能显著地交叉反应。此外，Watt 和 Caplan(1990)公开了芬太尼的 RIA(也是来自诊断产品的  $^{125}\text{I}$  的 RIA)，证实了 Harnmargren 和 Henderson(1988)的数据，也就是说，对于某些芬太尼代谢物交叉反应性差，具体来说对于去甲芬太尼小于 5%(表 IV 反映了类似物/芬太尼)和对于 2-羟基芬太尼 14-30%(表 IV 反映了类似物/芬太尼)。关于 2-羟基芬太尼，通常认为至少在人体中它不是芬太尼的主要代谢物，尽管参考于 Watt 和 Caplan. Michies 等(1977)公开了用羧基芬太尼作为半抗原在来自 Janssen 的芬太尼的  $^3\text{H}$  RIA 中没有观察到交叉反应的在人体中芬太尼的主要代谢物脱丙酰基芬太尼和去甲芬太尼。相似地，Henderson 等(1975)公开了 McNeil 实验室使用羧基芬太尼作半抗原的芬太尼 RIA，但是所有芬太尼的去甲-和脱丙酰基代谢物都没有显著交叉反应。

酶联免疫吸收测定法(ELISAs)是没有放射活性的另外一种选择，已知它也用于测定芬太尼及其类似物的量。例如，在 Werawan Ruangyuttikarn 等 1990 公开了原型的 ELISA 使用羧基芬太尼半抗原用于检测芬太尼的存在。当在抗芬太尼代谢物的交叉反应明显没有时，该公开教导了关于戏剧性地改变交叉反应性的哌啶部分的改良，它暗示了对去甲芬太尼可以预料到它的交叉反应性差。Gregory S. Makowski 等 1995 公开了抗脱丙酰基芬太尼和去甲芬太尼代谢物的交叉反应性差的 ELISA，具体来说，抗脱丙酰基芬太尼只有 0.53%的交叉反应性而抗去甲芬太尼则小于 0.03%的交叉反应性。

对发明人的知识而言，前面对芬太尼免疫测定法(不管是 RIA 还是 ELISA)所报道的工作已经完全集中于通过芬太尼的丙酰胺基的游离端衍生芬太尼衍生物(通过羧基)。用-COOH 作为交联剂的这种衍生得到了羧基芬太尼(N-苯基-N-[1-(2-苯乙基)-4-哌啶基]羧基丙酰胺)作为半抗原，该半抗原公开于 J. McDonald 等,1987。J. McDonald 等公开了用从羧基芬太尼-牛血清

白蛋白(BSA)免疫原所制备的抗血清和结合 b-藻红蛋白的羧基芬太尼的颗粒浓度荧光免疫测定法(PCFIA)。相似地, M. Michiels 等(1977)公开了羧基芬太尼-BSA 免疫原。抗羧基芬太尼-牛血清 $\gamma$ -球蛋白(BGG)免疫原制备的抗体公开于 GL Henderson 等 1975 的论文。但是, 抗羧基芬太尼半抗原所制备的抗体和偶合物具有缺点, 很少或没有检测芬太尼代谢物和/或芬太尼类似物代谢物的能力。

本发明描述了芬太尼或去甲芬太尼的新的半抗原衍生物的结合, 该半抗原是共价结合具有抗原性的载体物质从而生成免疫原或者结合可检测的标示剂从而生成偶合物(或检测剂)。本发明也描述了对这种免疫原所生产的抗体怎样用于开发一般的测定法, 该测定法能够用于测定体液中优选生物体液, 更优选人的生物体液中芬太尼代谢物和芬太尼类似物的代谢物的量。

#### 发明目的

本发明的一个目的是克服现有技术的一些或所有缺点或提供另外一种可供选择的方法。

本发明的优选实施方案的一个目的是提供一种检测或定量测定芬太尼代谢物和/或芬太尼类似物代谢物的方法和试剂盒。本发明更优选的实施方案的目的是提供一种检测或定量测定芬太尼代谢物和/或芬太尼类似物代谢物的方法和试剂盒, 相对于芬太尼本身来说, 对芬太尼代谢物和/或芬太尼类似物代谢物, 更优选去甲代谢物显示出 5% 以上、优选 25% 以上的交叉反应性。

本发明优选实施方案的另外一个目的是开发能够与作为结构表位的 N-苯基-N-(4-哌啶基)胺结合的抗体。

#### 25 附图的简要说明

图 1 是半抗原 A 和 B 的制备;

图 1a 示意说明用交联剂衍生半抗原的位置;

图 2 是半抗原 C、D 和 E 的制备;

图 3 和 4 是半抗原 F 和免疫原 F 的制备;

30 图 5 是半抗原 G 和免疫原 G 的制备;

图 6 是 BSA 载体物质的分析;

图 7 是 MALDI-TOF 分析；

图 8-11 是 MALDI 分析结果；

图 12 是去甲芬太尼和芬太尼竞争性 ELISA 的微量滴定板测定；

图 13-16 是化合物 6，半抗原 A，F 和 G 的 NMR 数据。

5

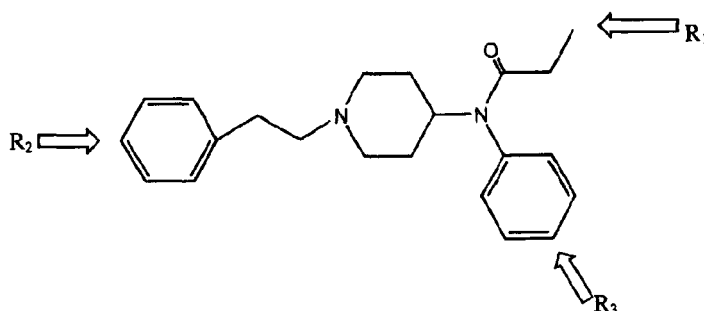
### 发明的详细描述

第一方面，本发明提供了含有结合具有抗原性载体物质的半抗原的免疫原，半抗原是在 1,2 或 4 位，优选 1 或 2 位用交联剂衍生的，条件是当半抗原是在 1 位衍生时，交联剂不是羧基。

10 1 位被定义为芬太尼的丙酰胺基的游离或终端。2 位被定义为芬太尼的苯乙基对位。3 位被定义为芬太尼的 N-苯基的对位。4 位被定义为去甲芬太尼的哌啶基-N 位。1-4 位在附图 1a 中分别被称为 R<sub>1</sub>-R<sub>4</sub>。

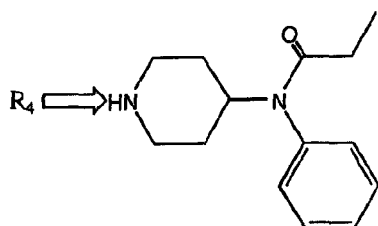
本发明所述的半抗原的 1、2、3 和 4 位衍生如下所示具有芬太尼或去甲芬太尼的结构通式：

15



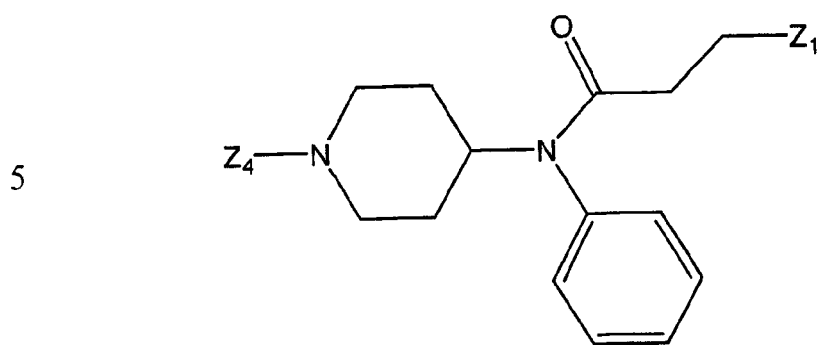
20

25

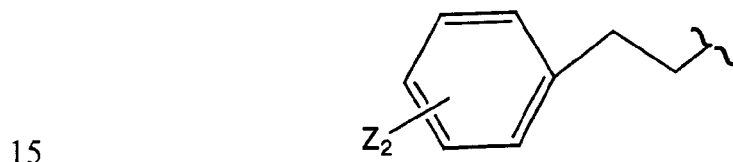


30

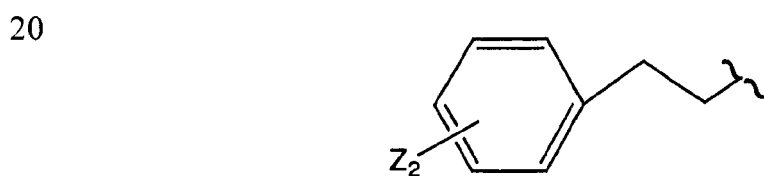
更具体地说，在第一方面，本发明提供了如下通式的免疫原：



10 其中  $Z_1$  是结合具有抗原性载体物质的交联剂或氢； $Z_4$  选自 N-苯乙基、结合具有抗原性载体物质的交联剂或

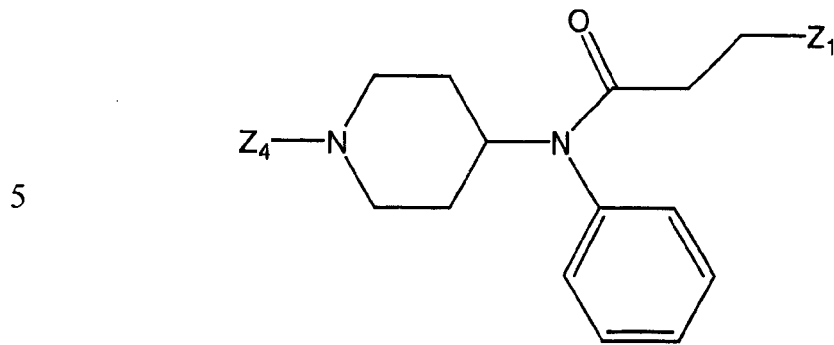


其中  $Z_2$  是在邻位、间位或对位结合具有抗原性的载体物质的交联剂，条件是当  $Z_1$  是氢时， $Z_4$  是结合具有抗原性的载体物质的交联剂或

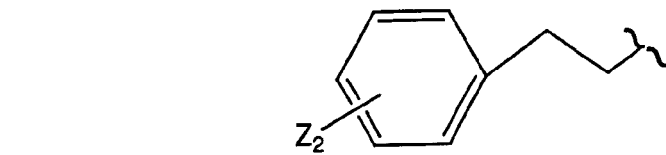


25 其中  $Z_2$  是在邻位、间位或对位结合具有抗原性的载体物质的交联剂，并且当  $Z_4$  是 N-苯乙基时， $Z_1$  是结合具有抗原性的载体物质的交联剂，该交联剂不是 -COOH。优选，该载体物质是蛋白、蛋白片段、合成多肽或半合成多肽。

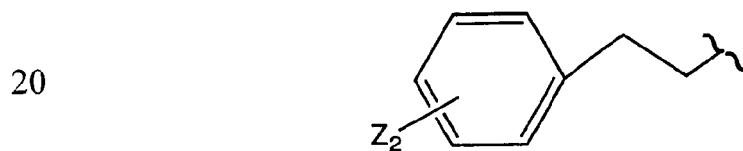
另一方面，本发明含有下列通式的偶合物：



其中  $Z_1$  是共价结合可检测的标示剂的交联剂或氢； $Z_4$  选自 N-苯乙基、共价  
10 结合可检测的标示剂的交联剂或



其中  $Z_2$  是在邻位、间位或对位共价结合可检测的标示剂的交联剂，条件是  
当  $Z_1$  是氢时， $Z_4$  是共价结合可检测的标示剂的交联剂或



其中  $Z_2$  是在邻位、间位或对位共价结合可检测的标示剂的交联剂，并且当  
 $Z_4$  是 N-苯乙基时， $Z_1$  是共价结合可检测的标示剂的交联剂，该交联剂不是-  
25 COOH。优选，该标示剂选自酶、发光物质、放射活性物质或其混合物。  
更具体地说，该标示剂是酶，优选是过氧化酶，最好优选辣根过氧化物酶。  
另外，发光物质可以是生物发光、化学发光或荧光性物质。

应该认识到在本发明所述的半抗原中  $Z_1$ 、 $Z_2$  和  $Z_4$  位中仅一个是交联剂  
并且在本发明的免疫原和偶合物中  $Z_1$ 、 $Z_2$  和  $Z_4$  位中仅一个包括分别共价结  
30 合具有抗原性载体物质或可检测的标示剂的交联剂。

应该认识到当  $Z_1$  是氢和  $Z_4$  是 N-苯乙基时，所得到的化合物是芬太尼，

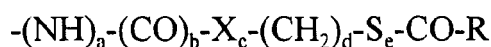
当  $Z_1$  和  $Z_4$  分别是氢时，所得到的化合物是去甲芬太尼。

以下表 1 总结了用于本发明所述的半抗原中的一些和用于本发明免疫原和偶合物中的一些交联剂和衍生位：

| 5  | 衍生物   | $Z_1$              | $Z_2$ | $Z_4$ |
|----|-------|--------------------|-------|-------|
|    | 半抗原 A | H                  |       |       |
| 10 | 半抗原 B | H                  |       |       |
|    | 半抗原 C |                    | H     |       |
| 15 | 半抗原 D | -CO <sub>2</sub> H | H     |       |
|    | 半抗原 E |                    | H     |       |
| 20 | 半抗原 G | H                  |       |       |

表 1：衍生于芬太尼和其代谢物去甲芬太尼的某些半抗原的化学结构优选， $Z_2$  的交联剂是在对位。

25 优选  $Z_1$ 、 $Z_2$  或  $Z_4$  的交联剂在其游离端用 -CO-R 终止，其中 R 是羟基或短链、直链或支链烷基。“短链烷基”是指  $C_{1-5}$  烷基。更具体地说，短链烷基是直链基团。更优选的是，短链烷基是  $C_{1-2}$  烷基，优选  $C_{1-2}$  直链烷基。更优选的是， $Z_1$ 、 $Z_2$  或  $Z_4$  的交联剂含有：



30 其中 a 是 0 或 1；b 是 0 或 1；X 是氧或硫；c 是 0 或 1；d 是选自 1-5 的整数；e 是 0 或 1 并且 R 是短链烷基，优选  $C_{1-5}$  直链或支链烷基，或羟基。更

优选，该烷基是  $C_{1-5}$  直链烷基。更优选的是，该烷基是  $C_{1-2}$  直链基团。最优选，该烷基是甲基。

在本发明描述的最广的方面中，对本发明的免疫原或偶合物，即  $Z_1$  交联剂不是共价结合具有抗原性的载体物质或可检测的标示剂的羧基(-COOH)来说最后的条件分别是指上述交联剂通式排除了当  $Z_1$  是交联剂时其中 a、b、c、d 和 e 是 0 而 R 是羟基的交联剂。

优选，当 e 是 1 时，c 是 0。

优选，a 是 0；b 是 0；而 c 是 0。更优选的是，d 是 0，e 是 1 而 R 是甲基，或者另外一种选择，d 是 1，c 是 0 而 R 是羟基。更优选， $Z_1$  或  $Z_4$  是这种交联剂。另外一种选择是  $Z_2$  是这种交联剂。

另外一种选择，a 是 1，b 是 1，c 是 0 并且 d 是 2。优选，e 是 1 而 R 是甲基，或另外一种选择，e 是 0 而 R 是羟基。更优选  $Z_2$  是在邻位、对位或间位优选对位的这类交联剂。另外一种选择， $Z_1$  或  $Z_4$  是这种交联剂。

还有一种选择是 a 是 0；b 是 0；e 是 0；X 是 0；而 c 是 1。优选 d 是 3 而 R 是羟基。 $Z_1$ 、 $Z_2$  或  $Z_4$  是这种交联剂。

本发明还提供了一种制备该抗体的方法，该方法包括通过反复将本发明第一方面所述的免疫原给药使动物，优选脊椎动物，最优选哺乳动物免疫接种并从免疫接种过的动物收集所得到的血清的步骤。优选，该方法还包括将所述血清抗体固定到本底，优选固体载体，更优选聚乙烯固体载体。按照该方法制备的抗体是多克隆。

在另外一方面，本发明涉及抗本发明的免疫原所制备的抗体，该抗体能够与芬太尼代谢物或其类似物的代谢物的至少一个结构表位结合。优选，至少一个结构表位包括芬太尼的 N-苯基-N-(4-哌啶基)胺结构。更优选，该抗体是固定在本底上。

本发明优选涉及芬太尼的代谢物和芬太尼类似物的代谢物所需的多克隆抗血清的生产，其中所述的抗血清最优选也具有一些与芬太尼及其类似物的交叉反应性。

在另一方面，本发明包括检测或定量测定样品中芬太尼代谢物和芬太尼类似物的代谢物的方法，该方法包括将样品与本发明的偶合物或其混合物以及本发明的抗体或其混合物接触；检测或定量测定结合的偶合物的量，并且从样品中存在芬太尼代谢物和芬太尼类似物的代谢物或其量的校准曲

线中推出。

在又一方面，本发明包括用于检测或定量测定芬太尼代谢物和芬太尼类似物的代谢物的量的试剂盒。该试剂盒包括本发明的偶合物或其混合物和本发明的抗体或其混合物。该试剂盒可以任选包括使用所述偶合物和所述抗体进行检测或定量测定样品中芬太尼的代谢物和芬太尼类似物的代谢物的说明书。

优选样品是溶液，如生理体液。更优选，样品是血清或尿液。最优选样品是来自人患者的溶液或悬浮液。

本发明的方法或试剂盒包括偶合物或其混合物，其中每个偶合物是由其中  $Z_1$ 、 $Z_2$  或  $Z_4$  之一优选  $Z_2$  或  $Z_4$  之一是交联剂的半抗原或其混合物制备的，其中各抗体是由其中  $Z_1$ 、 $Z_2$  或  $Z_4$  之一优选  $Z_2$  或  $Z_4$  之一是交联剂的半抗原或其混合物产生的。各组分的半抗原可以相同或者各组分的半抗原可以在相同位置使用不同交联剂衍生，后者是优选的。但是，优选各组分的半抗原优选是在不同位置使用相同交联剂或使用不同交联剂衍生。更优选的是源于其中  $Z_2$  是交联剂的半抗原的免疫原与源于其中  $Z_2$  或  $Z_4$  之一是交联剂的半抗原的偶合物用于本发明的方法或试剂盒，其中各交联剂(免疫原和偶合物中的)是相同的或者更优选是不同的。优选源于其中  $Z_2$  是交联剂的半抗原的免疫原与源于其中  $Z_4$  是交联剂的半抗原的偶合物用于本发明的方法或试剂盒，其中各交联剂(免疫原和偶合物中的)是相同的或者更优选是不同的。

同样包括了源于其中  $Z_2$  或  $Z_4$  是交联剂的半抗原的偶合物与源于其中  $Z_2$  或  $Z_4$  之一是交联剂的半抗原的免疫原用于本发明的方法或试剂盒，其中各交联剂(免疫原和偶合物中的)是相同的或者更优选是不同的。更为优选的是，源于其中  $Z_2$  或  $Z_4$  是交联剂的半抗原的偶合物与源于其中  $Z_2$  或  $Z_4$  之一是交联剂的半抗原的免疫原用于本发明的方法或试剂盒。最优选，源于其中  $Z_2$  或  $Z_4$  是交联剂的半抗原的偶合物与源于其中  $Z_2$  是交联剂的半抗原的免疫原用于本发明的方法或试剂盒，其中各交联剂(免疫原和偶合物中的)是相同的或者更优选是不同的。

在又一方面，本发明包括本发明偶合物或其混合物与本发明抗体或其混合物在测试样品如生物体液从而检测或定量测定芬太尼代谢物和芬太尼类似物的代谢物的量的用途。

本发明涉及了新的半抗原，它可通过与常规使具有抗原性的载体物质偶合来用于制备新的免疫原。然后将所得到的免疫原给药予动物，优选脊椎动物宿主，最优选哺乳动物宿主从而引起需要的多克隆抗血清的产生，然后将这种抗血清用于开发一种使用偶合物(半抗原-可检测的标示剂)作检测剂的芬太尼代谢物和芬太尼类似物的代谢物的一般免疫测定法。

本发明的重点是对芬太尼代谢物和芬太尼类似物的代谢物的特异性抗体的制备。为了实现这种广泛的特异性，用  $Z_1$  或  $Z_2$  作为交联剂改良芬太尼或者用  $Z_4$  作为交联剂改良去甲芬太尼来制备半抗原和免疫原。

#### 半抗原的制备

10 按照图 1 所示的反应图解 1 进行半抗原 A 的制备。按照图 2 所示的图解 2 进行半抗原 C、D 和 E 的制备。按照图 3 和 4 所示的图解 3 和 4 进行半抗原 F 和免疫原 F 的制备。并且按照图 5 所示的图解 5 进行半抗原 G 和免疫原 G 的制备。

参照图 1，按照图解 1 制备半抗原 N-[1-(对-乙酰硫基丙酰胺基)苯乙基-15 4-哌啶基]-N-苯基丙酰胺(A)和 N-[1-(对琥珀酰胺基)苯乙基-4-哌啶基]-N-苯基丙酰胺(B)。在 1,2-二氯乙烷、乙酸和  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$  存在下，通过 Schiff 碱在苯胺和 N-甲基-4-哌啶酮之间进行缩合反应生成化合物 1。在甲苯存在下并进行回流将该化合物与丙酸酐反应生成化合物 2。在两步工艺中，第一步在 1,2-二氯乙烷存在下用氯甲酸 1-氯乙基酯( $\text{ClCO}_2\text{CHClCH}_3$ )回流 2 小时，20 第二步用甲醇，通过化合物 2 的 N-去甲基化制备去甲芬太尼(化合物 4)。在 4-甲基-2-戊酮和  $\text{K}_2\text{CO}_3$  存在下并回流将对硝基苯基溴化物与化合物 4 反应；接着在  $\text{HCOONH}_4$  和  $\text{CH}_3\text{OH}$  存在下用 Pd-C 将硝基还原成氨基从而生成中间化合物 6。半抗原 A 是在 EDPA 和二恶烷存在下通过化合物 6 与 3-(乙酰硫基)丙酸 N-琥珀酰亚胺酯(SATP)反应生成的并且半抗原 B 是通过化合物 6 25 与琥珀酸酐反应生成的。

参考图 2，按照反应图解 2 制备半抗原 N-(1-苯乙基-4-哌啶基)-N-苯基(S-乙酰硫基丙酰胺)(C)、N-(1-苯乙基-4-哌啶基)-N-苯基琥珀酰胺(D)和 N-(1-苯乙基-4-哌啶基)-N-苯基戊二酰胺(E)。1-苯乙基-4-哌啶酮与苯胺反应接着还原 Schiff 碱来制备脱丙酰芬太尼(化合物 7)。然后在 EDPA 和二恶烷存在下将所产生的化合物与 N-琥珀酰亚胺基 3-(乙酰硫)丙酸酯(SATP)反应得到半30 抗原 C，与琥珀酸酐反应得到半抗原 D 或者与戊二酸酐反应得到半抗原

E.

参考图 3 和 4, 在制备半抗原 N-(1-苯乙基-4-哌啶基)-N-(对-O-羧基丙基)-苯基丙酰胺(F)前, 按照图 3 的反应图解 3 制备[乙基-对(O-羧基丙基)]苯胺(化合物 9)。在氯化钠存在下用 4-溴丁酸乙基酯将对硝基苯酚烷基化生成化合物 8。然后用 Pd-C 将化合物 8 的硝基还原成氨基, 得到化合物 9。

按照图 4 的反应图解 4 三步制备 N-(1-苯乙基-4-哌啶基)-N-(对-O-羧基丙基)-苯基丙酰胺(半抗原 F)。在 1,2-二氯乙烷中有三乙酰氧基氢硼化钠和醋酸存在下将 N-(1-苯乙基)-4-哌啶酮与[乙基-对-(O-羧基丙基)]苯胺(化合物 9)反应生成化合物 10。在甲苯中回流下将化合物 10 与丙酸酐反应得到化合物 11。半抗原 F 是在甲醇中由化合物 11 与 2N 氢氧化钠皂化生成的。

参照图 5, 按照反应图解 5 四步制备半抗原 N-(1-羧甲基-4-哌啶基)-N-苯基丙酰胺(G)。在 DMF 中在有氯化钠存在下 4-哌啶酮单水化合物单盐酸盐与溴乙酸乙酯反应得到乙基-N-羧甲基-4-哌啶酮(化合物 12)。然后在三乙酰氧基氢硼化钠和醋酸存在下将化合物 12 与苯胺反应生成 N-(乙基-1-羧甲基-4-哌啶基)-N-苯基丙氨酸(化合物 13)。

在甲苯中回流下用丙酸酐处理化合物 13 得到化合物 14。半抗原 G 是在甲醇中用氢氧化钠(2N)将化合物 14 皂化产生的。

#### 免疫原和偶联物的制备

尽管芬太尼半抗原提供了限定的结构表位, 但是它们不是自身免疫原, 所以需要结合到载体物质上, 当将其注射给宿主动物时, 它将引起免疫原反应。适当的载体物质包括蛋白质类如白蛋白、血清蛋白类如球蛋白、眼镜晶状体蛋白类和脂蛋白类。蛋白载体的例子包括牛血清蛋白、蛋卵清蛋白、牛 $\gamma$ 球蛋白、甲状腺素结合的球蛋白、锁眼纠缠的血蓝蛋白等。另外一种选择, 也可以使用具有足够数量的可用的氨基酸合成聚(氨基酸类)如赖氨酸, 这样可以使其他合成或天然聚合物具有反应性功能基团。尤其是, 可以将碳水化合物、酵母或多糖结合到半抗原上生成免疫原。

每个半抗原也能够共价结合到标记基团如酶(例如马辣根过氧化酶), 一种具有荧光特性或放射标记的物质从而生成用于免疫测定的偶联物(也称为检测剂)。例如荧光物质可以是荧光素或其衍生物的单价残基。

为了确认半抗原与载体物质足够的结合已经实现, 在免疫前, 用基质-辅助的 UV 激光解析/离子化时间-飞行质谱(MALDI-TOF MS)评价各免疫

原。在优选的载体物质牛血清蛋白中，优选每个载体分子最小 6 个分子半抗原。

在制备含半抗原的偶联物或免疫原中，交联剂中的 e 是 1 如半抗原 A 和 C，必须首先用不同的双功能结合剂分别将马来酰亚胺、卤素、巯基吡啶基或乙烯基砷导入标记的试剂或载体物质，其中的结合剂例如但不限于：  
5 N-( $\gamma$ -马来酰亚胺基丁酰氧基)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)；(间-马来酰亚胺基苯甲酰基)-N-羟基琥珀酰亚胺(MBS)；琥珀酰亚胺基 4-(对-马来酰亚胺苯基)丁酸酯(SMPB)；N-琥珀酰亚胺基(4-碘代乙酰基)氨基苯甲酸酯(SIAB)；溴代乙酰基甘氨酸 N-羟基琥珀酰亚胺；N-琥珀酰亚胺基 3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)；乙烯基砷(Pierce 化学公司，美国)。然后用硫羟基将这样改良的标示剂或载体物质结合在半抗原上，其中 e 是 1，如半抗原 A 和 C。对半抗原，其中在交联剂中 e 是 0，如半抗原 B、D、E、F 和 G 来说，进行结合时没有用前面改良的标示剂或载体物质，如果适当的话，使用标准的结合  
10 方法如 EDC 或混合酸酐。

#### 抗血清的制备

为了生成多克隆抗血清，将免疫原与 Freund 佐剂混合并且将混合物注射给宿主动物如兔、羊、小鼠、豚鼠或马。进一步注射(强化)并将血清取样用于评价抗体效价。当达到理想的效价时，然后将宿主动物放血得到适当  
20 体积的特殊抗血清。所需抗体纯化的程度取决于所要应用。对许多目的来说，全不需要纯化，但是，在另外情况，如抗体在固体支持物上固定时，进行纯化步骤除去不需要的物质和消除非特异性结合。

本发明的特殊抗体可用作生化测定试验的试剂或用于测定生物液体中芬太尼代谢物及其类似物代谢物的量。

25 在下表中，列出了下列实施例 4、6-11 和 13-15 中所制备的化合物的特征数据：

| 化合物           | 熔点(°C)    | FT IR(KBr, 扩散反射率, $\text{cm}^{-1}$ )    |
|---------------|-----------|---|
| 实施例 6         | 154 - 157 | 3479.64, 3360.85, 1648.53 和 1594.23     |
| 实施例 7(半抗原 A)  | 164 - 167 | 3322.61, 1687.21, 1627.29 和 1594.98     |
| 实施例 4         | 94 - 96   | 3426.96, 1648.67 和 1594.62              |
| 实施例 9         | 92 - 94   | 3286.45, 1601.08                        |
| 实施例 8(半抗原 B)  | 222 - 225 | 3244.1, 3180.1, 1677.7, 1648.7 和 1597.1 |
| 实施例 10(半抗原 C) |           | 1687.02, 1627.42 和 1536.36              |
| 实施例 11(半抗原 D) | 198 - 202 | 1714.06, 1650.94 和 1595                 |
| 实施例 11(半抗原 E) | 141 - 142 | 3442.02, 1654.13 和 1596.14              |
| 实施例 13        | 198 - 200 | 3330.98, 1735.92, 1614.7 和 1514.78      |
| 实施例 14        | 183 - 185 | 1730.99, 1654.98 和 1509.46              |
| 实施例 15(半抗原 F) | 113(分解)   | 3228, 1716.1, 1647.9 和 1510             |

#### 免疫原的 MALDI-TOF 分析的一般方法

使用联有延迟提取的 Voyager STR 生物光谱研究站激光解吸质谱仪进行 MALDI-TOF 质谱。被分析的各样品的等分试样用 0.1% 三氟乙酸(TFA)水溶液稀释制成 1mg/ml 的样品溶液。用 Sinapinic 酸基质分析等分试样(1 $\mu$ l)并用牛血清白蛋白(Fluka)作为外标。附图 6 显示了 BSA 载体物质的分析。正如所看到的, 出现的主要信号表示  $m/z$  66,525 样品的被质子化的平均质量。在  $m/z$  33,273 处的信号与双电荷形式的主要成分一致并且观察到其他信号包括  $m/z$  13,641 的信号。

在下列实施例中, 除非另外说明, 所有的百分数都是 v/v。

#### 10 实施例 1: 反应图解 1

##### N-(1-甲基)-4-(苯基胺)哌啶(化合物 1)的制备

向 100ml 无水二氯乙烷中的 4-N-甲基-1-哌啶酮(7g, 0.0062mol)溶液中加入苯胺(12.7g, 0.14mol)和醋酸(4ml), 接着加入三乙酰氧基氢硼化钠(13.1g, 0.062mol)。在室温氮气下搅拌混合物过夜。

15 减压蒸发溶剂后, 加水(100ml)并加 NaOH(1N)使该溶液成碱性到 pH 9。然后用甲苯(2 $\times$ 100ml)提取该溶液, 合并有机相并用水(150ml)、盐水(50ml)冲洗, 在硫酸钠上干燥, 过滤并减压浓缩。将残余物色谱纯化(硅胶, 5%MeOH/氯仿)并从乙酸乙酯中重结晶得到 9.4g(收率 80%)的化合物 1 白色固体。

#### 实施例 2: 反应图解 1

**N-(1-甲基-4-哌啶基)-N-苯基丙酰胺(化合物 2)的制备**

向实施例 1 的化合物 1(9.0g,0.047mol)的无水甲苯(150ml)溶液中加入丙酸酐(15.4g,0.118mol)。将该混合物回流搅拌过夜。真空除去溶剂并将残余物从乙酸乙酯/己烷中重结晶得到 10g 化合物 2 白色固体(收率 86%)。

**5 实施例 3: 反应图解 1****N-[1-(1'-乙基氯甲酸)-4-哌啶基]-N-苯基丙酰胺(化合物 3)的制备**

在氮气氛下将 10g(0.04mol)实施例 2 的化合物 2 溶于无水 1,2-二氯乙烷(100ml)，并在冰浴中冷却到 0℃。向该溶液滴加氯甲酸 1-氯乙基酯(6.6g,0.046mol)并将该溶液加热回流 2 小时(当反应完成时薄层色谱显示)。

10 将该溶液冷却到室温并减压除去溶剂。将粘稠的油状残余物通过柱色谱(硅胶，10%乙酸乙酯/90%正己烷)纯化得到题目化合物白色非晶形的固体(10g,收率 74%)。

**实施例 4: 反应图解 1****去甲芬太尼(化合物 4)的制备**

15 将 10g(0.03mol)实施例 3 的化合物 3 溶于无水甲醇(150ml)并在室温搅拌过夜。将该溶液减压浓缩得到定量收率的题目化合物白色粉末。

**实施例 5: 反应图解 1****N-[1-(对硝基苯乙基)-4-哌啶基]-N-苯基丙酰胺(化合物 5)的制备**

20 在氮气下，向实施例 4 的去甲芬太尼(6.71g,0.029mol)、对硝基苯乙基溴化物(7.178g,0.0372g)、碳酸钾(19g,0.14mol)和少许碘化钠结晶在 4-甲基-2-戊酮(200ml)中的悬浮液搅拌回流过夜。冷却到室温后，用过滤除去沉淀并将溶液减压浓缩。将暗色残余物溶于乙酸乙酯(200ml)并用水洗涤(2×100ml)，在硫酸钠上干燥，过滤并真空除去溶剂。将该残余物通过柱色谱(硅胶，10% MeOH/90%CHCl<sub>3</sub>,v/v)纯化得到题目的黄色固体标题化合物  
25 (5.33g,56%收率)。

**实施例 6: 反应图解 1****N-[1-(对氨基苯乙基)-4-哌啶基]-N-苯基丙酰胺(化合物 6)的制备**

30 在氮气氛下，在搅拌下向实施例 5 的化合物 5(5g,0.013mol)的无水甲醇(200ml)溶液加入 10% Pd-C(650mg)，接着加入甲酸铵(5g,0.063mol)。将该混合物在室温下搅拌 4 小时并通过 Celite™ 短柱滤除催化剂。减压除去溶剂并将残余物溶于水(100ml)。通过加入 1N 的 NaOH 使该水溶液成碱性并用乙

酸乙酯萃取(2 × 100ml)。合并有机层,用水(50ml)、盐水(50ml)冲洗并在无水硫酸钠上干燥。然后将该溶液减压浓缩得到化合物 6 的白色粉末,在薄层色谱层析上显示单一点(2.7g,60%收率)。

图 13 显示了化合物 6 的 NMR 数据。

#### 5 实施例 7: 反应图解 1

**N-[1-(对乙酰硫代丙酰胺)苯乙基-4-哌啶基]-N-苯基丙酰胺(半抗原 A)的制备**

在氮气下向搅拌着的实施例 6 的化合物 6(1g,0.0028mol)和 3-(乙酰硫)丙酸 N-琥珀酰亚胺酯(SATP)(0.824g,0.00336mol)的 25ml 无水二恶烷溶液中加入二异丙基乙胺(EDPA)(0.72ml,0.0042mol),搅拌该混合物并在 60℃加热 6 小时。然后真空浓缩该混合物,残余物用 10% v/v 甲醇的氯仿溶液通过快速硅胶柱色谱纯化并在冷的己烷/氯仿中重结晶得到半抗原 A 白色固体(835mg, 收率 62%)。

图 14 显示了半抗原 A 的 NMR 数据。

#### 15 实施例 8: 反应图解 1

**N-[1(对琥珀酰胺基)苯乙基-4-哌啶基]-N-苯基丙酰胺(半抗原 B)的制备**

向实施例 6 的化合物 6(1g,0.0028mol)的无水苯(75ml)溶液中加入琥珀酸酐(0.7007g,0.007mol)并将该混合物回流过夜。得到一种白色沉淀物并且 TLC 确认所有的起始物都已经消耗。滤除沉淀物、用苯冲洗并干燥。将该固体溶于水(20ml)并在 50℃加热 1 小时,过滤并完全干燥。将固体溶于乙腈(20ml)并在 60℃加热 1 小时,过滤,用少量冷乙腈冲洗并在真空下干燥过夜得到题目化合物白色固体(0.82g,60%收率)。

#### 实施例 9: 反应图解 2

**N-(1-苯乙基-4-哌啶基)-苯胺(脱丙酰基芬太尼)(化合物 7)**

25 题目化合物是使用 1-苯乙基-4-哌啶酮(5.3g,0.026mol)、苯胺(5.01ml, 0.55mol)、乙酸(3ml)、1,2-二氯乙烷(100ml)和三乙酰氧基氢硼化钠(5.82g, 0.027mol)按照实施例 1 所述的方法制备。得到题目化合物白色固体(收率 74%)。

#### 实施例 10: 反应图解 2

30 **N-(1-苯乙基-4-哌啶基)-N-苯基-(S-乙酰硫基丙酰胺)(半抗原 C)**

用实施例 7 所述的相同方法制备半抗原 C, 收率 55%, 即在水二噁

烷中使用 3-(乙酰硫代)丙酸 N-琥珀酰亚胺酯(SATP)，向其中加入二异丙基乙胺(EDPA)。

#### 实施例 11：反应图解 2

##### 半抗原 D 和 E 的制备

- 5 用实施例 8 所述的相同方法制备半抗原 D 和 E。用琥珀酸酐(2 当量)制备半抗原 D 并用戊二酸酐(2 当量)制备半抗原 E。

#### 实施例 12：反应图解 3

##### [乙基-对-(O-羧基丙基)]苯胺(化合物 9)的制备

- 在氮气下，向氢氧化钠(3.696g, 0.11mol)的 100ml 无水二甲酰胺悬浮液中滴加对硝基苯酚(13.911g, 0.1mol)的 100ml 的 DMF 溶液。将该混合物在 60 °C 加热 1 小时(没有逸出氢气)，然后冷却到室温。向该混合物中滴加 4-溴代丁酸乙基酯(23.4g, 0.12mol)的 50ml 的 DMF 溶液 15 分钟。再将混合物加热到 60 °C 并搅拌 4 小时。冷却到室温后，减压蒸发溶剂。向粗产物中加入 150ml 的水，然后用乙酸乙酯萃取(2×150ml)。用盐水冲洗合并的有机层、干燥并  
15 过滤。真空除去溶剂，残余物用快速色谱法(90% 己烷/10% 乙酸乙酯)纯化得到 21.7g(收率 86%)的[乙基-对-(O-羧丙基)-1-硝基苯基](化合物 8)白色固体。

- 在氮气下，向搅拌着的化合物 8(9.87g, 0.039mol)的 400ml 无水甲醇溶液中加入 10% Pd-C(10%)(1.95g)，接着加入甲酸铵(15g, 0.189mol)。在 TLC 确认所有起始物都已经消耗后，将该混合物在室温下搅拌 2 小时。通过  
20 Celite™ 滤除催化剂。然后真空除去溶剂并将残余物溶于水(150ml)。通过加入 2N 的 NaOH 使该水溶液成碱性并用乙醚萃取(2×150ml)。合并有机层，用水(100ml)、盐水(100ml)冲洗并在无水硫酸钠上干燥。然后将该溶液减压浓缩得到化合物 9 的白色粉末(6.52g, 收率 75%)。

#### 实施例 13：反应图解 4

- 25 N-[(1-苯乙基-4-哌啶基)-N-(乙基-对-(O-羧丙基))]苯胺(化合物 10)的制备

在无水 1,2-二氯乙烷、醋酸和三乙氧基氢硼化钠存在下，用化合物 9 替代苯胺和 1-苯乙基-4-哌啶酮按照实施例 1 所列的相同方法制备化合物 10。得到结晶形式的化合物 10(收率 65%)。

- 30 实施例 14：反应图解 4

##### [乙基对-(O-羧丙基)]芬太尼(化合物 11)的制备

在回流下使用无水甲苯和丙酸酐中的化合物 10 按照实施例 2 所述的相同方法制备题目化合物。得到题目化合物 11 白色固体，收率 80%。

#### 实施例 15: 反应图解 4

##### 对-[(O-羧丙基)]芬太尼(半抗原 F)的制备

- 5 向化合物 11(3.5g,7.5mol)的甲醇(80ml)溶液中加入 2N 的氢氧化钠(20ml)并在室温下将该混合物搅拌 4 小时(TLC 显示没有剩余起始物)。将该混合物真空干燥，加水(50ml)并将所得到的溶液 pH 调节到 6。用氯仿萃取该溶液(2 × 100ml)，用盐水(1 × 50ml)冲洗合并的有机萃取液，在硫酸钠上干燥，过滤并真空浓缩。用乙醚研磨所得到的固体，过滤并干燥过夜得到 2.1g(收率 10 64%)的半抗原 F。

图 15 显示了半抗原 F 的 NMR 数据。

#### 实施例 16: 反应图解 5

##### 乙基(1-羧甲基)-4-哌啶酮(化合物 12)的制备

- 15 在氮气下向 4-哌啶酮单水合物单盐酸盐(12g,78.12mmol)的无水二甲基甲酰胺(120ml)溶液分小份加入氢化钠[60%w/w 矿物油分散液](5.25g, 156mmol)。加完后，将该混合物在 60℃加热 1 小时(再看不到氢气逸出)，冷却到室温并在 15 分钟内滴加溴代乙酸乙酯(19.6g,177mmol)的 DMF(50ml)溶液。将所得到的混合物在 60℃加热过夜。加入几滴水终止反应并真空除去溶剂。加水(100ml)并用乙酸乙酯(2 × 100ml)萃取该混合物。用水(1 × 20 100ml)、盐水(1 × 100ml)冲洗合并的有机层，在硫酸钠上干燥并真空除去溶剂。残余物用柱色谱法(50% 乙酸乙酯/50% 己烷, v/v)纯化得到题目化合物 12 透明油状物(3.4g,65%收率)。

#### 实施例 17: 反应图解 5

##### N-[乙基-1-羧甲基]-4-(苯基氨基)]哌啶(化合物 13)的制备

- 25 在三乙氧基氢硼化钠(8.5g, 0.04mol)和乙酸(4ml)存在下使用乙基(1-羧甲基)-4-哌啶酮(化合物 12)(7.4g, 0.04mol)和苯胺(8.2g, 0.14mol)的 1,2-二氯乙烷(120ml)溶液按照实施例 1 所述的相同方法制备化合物 13。在柱色谱层析法(硅胶, 10% v/v 甲醇氯仿溶液)纯化后得到题目化合物(8.4g, 收率 80%)。

#### 实施例 18: 反应图解 5

- 30 N-(乙基-羧甲基)-去甲芬太尼(化合物 14)的制备

使用实施例 2 所述的相同方法从化合物 13(7.86g,0.03mol)在无水甲苯

和丙酸酐(8.59g, 0.066mol)中制备化合物 14。在从乙酸乙酯/己烷重结晶后得到化合物 14(7.15g, 收率 75%)。

#### 实施例 19: 反应图解 5

##### N-(羧甲基)-去甲芬太尼(半抗原 G)的制备

- 5 向化合物 14(3.78g, 10mmol)的甲醇(80ml)溶液中加入 2N 氢氧化钠(20ml)并将该混合物在室温搅拌 4 小时(TLC 显示没有起始物存在)。将该混合物减压干燥, 加水(50ml)并加 1N HCl 调节 pH 到 5。所形成的沉淀过滤收集, 用少量冷水冲洗并在五氧化二磷存在下干燥过夜。所得到的白色固体就是相应的半抗原 G(1.38g, 收率 50%)。
- 10 图 16 显示了半抗原 G 的 NMR 数据。

#### 实施例 20

##### 牛血清白蛋白(BSA) - 溴代乙酰基甘氨酸的制备

- 15 向冷却到 0°C 的 BSA(1g)的 0.1M 硼酸盐缓冲液(pH8.5, 45ml)溶液中滴加溴代乙酰基甘氨酸 N-琥珀酰亚胺酯(0.375g, 0.13mmol)的 DMF(5ml)溶液。在加入过程中, 保持 pH 在 8。加完后, pH 稳定在 8 并将该溶液在 0°C 搅拌 1 小时。然后调节 pH 大约为 7 并对着 4°C 蒸馏水将该溶液透析过夜(交替 2 次)。然后将该溶液冷冻干燥得到大约 1g 的溴代乙酰基甘氨酸所修饰的 BSA。

- 20 MALDI-TOF 分析(见图 7)显示了存在主要的信号, 这表明 m/z 为 73,818 的该样品的平均质子化质量。在 m/z 24,564, 36,897 和 147,713 处的信号分别与三电荷、双电荷和二聚物形式的主要成分一致。而且在 m/z 14,927, 49,425 和 111,425 处还观察到了其他信号。

这些数据表明溴代乙酰基甘氨酸已经修饰成每分子 BSA 的 40.3 个赖氨酸基团。

#### 实施例 21

- 25 用溴代乙酰基甘氨酸修饰的 BSA 制备免疫原 A

- 30 将半抗原 A(58.15mg, 0.12mmol)溶于无水 DMF(100 $\mu$ L)中并向该溶液中加入羟胺溶液(900 $\mu$ L, pH12)。将该混合物放置 10 - 15 分钟(TLC 显示没有半抗原 A 和形成较低 Rf 的的新化合物)。加入磷酸盐缓冲液终止反应并加入 0.5M HCl 调节 pH 到 7。将该溶液滴加到实施例 20 的修饰过的 BSA 溶液(10ml 水中 200mg)并在 4°C 将溶液搅拌过夜(避光保护)。然后将该溶液对着蒸馏水透析 24 小时(交替 3 次)并冷冻干燥。

MALDI 结果(见附图 8)显示了 12.5 个分子的半抗原 A 已经结合到 1 分

子的修饰过的 BSA 上。具体来说, 该样品在  $m/z$  79,795 处存在显示平均质子化质量的信号。在  $m/s$  39,759 处的信号与双电荷形式的主要成分一致。在  $m/z$  15,654 还观察到其他信号。

#### 实施例 22

#### 5 用溴化乙酰基甘氨酸修饰的 BSA 制备免疫原 C

使用半抗原 C 按照实施例 21 给出的方法进行结合。

MALDI 结果(见附图 9)显示了 7.2 个分子的半抗原 C 已经结合到 1 分子的修饰过的 BSA 上。具体来说, 该样品在  $m/z$  76,770 处存在显示平均质子化质量的主要信号。在  $m/s$  38,367 处的信号与双电荷形式的主要成分一致。在  $m/z$  15,514 还观察到其他信号。

#### 10 实施例 23: 反应图解 4

#### 用 BSA 制备免疫原 F

将 50mg 的 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)溶于 600 $\mu$ l 水中并迅速加入到 100mg BSA(1.5 $\mu$ mol)的 4ml 水溶液中。边搅拌边滴加已溶于 2ml 无水 DMF 的半抗原 F(19.7mg,45 $\mu$ mol)。加入 5mg 的磺基-NHS 并在 37 $^{\circ}$ C 温育所得到的溶液过夜。然后对着 4 $^{\circ}$ C 5L 磷酸盐缓冲盐水 (PBS)pH7.2 边搅拌边透析该溶液。

MALDI 结果(见附图 10)显示了 17.1 个分子的半抗原 F 已经结合到 1 分子的 BSA 上。具体来说, 该样品在  $m/z$  73,590 处存在显示平均质子化质量的主要信号。在  $m/s$  69,870 处的信号与双电荷形式的主要成分一致。在  $m/z$  14,177 还观察到其他信号。

#### 20 实施例 24: 反应图解 5

#### 用 BSA 制备免疫原 G

使用半抗原 G(12.57mg,43 $\mu$ mol)按照实施例 23 所述的方法进行结合。

MALDI 结果(见附图 11)显示了 10.4 个分子的半抗原 G 已经结合到 1 分子的修饰过的 BSA 上。具体来说, 该样品在  $m/z$  69,355 处存在显示平均质子化质量的主要信号。在  $m/s$  34,971 处的信号与双电荷形式的主要成分一致。在  $m/z$  13,924 还观察到其他信号。

#### 实施例 25

#### 30 半抗原 B 和 E 与标示剂(辣根过氧化物酶(HRP))的结合

将 10mg 的 EDC 溶于 800 $\mu$ l 水中并迅速加入半抗原(1mg)的 200 $\mu$ l DMF 溶液中。轻轻混合所得到的溶液, 然后加入 HRP(20mg)的 1ml 水溶液中。

混合后，加 5mg 的磺基-NHS 并在 37°C 黑暗处将整个反应温育过夜。所得到偶合物通过两个 PD10 柱(Pharmacia Biotech)用 20mM PBS, pH7.2 洗脱来纯化，然后对着 4°C 20mM PBS, pH 7.2, 透析一夜。

### 实施例 26

#### 5 半抗原 G 与标示剂(HRP)结合

将 10 $\mu$ l 三乙胺(TEA)加入半抗原 G(1mg)的 400 $\mu$ l 的 DMF 溶液中并在室温将所得到的溶液混合 10 分钟。然后加 4 $\mu$ l 氯甲酸异丁基酯(BCF)并使反应在室温下再进行 10 分钟。将激活的半抗原迅速加入 HRP(20mg)的 2ml 水溶液中并将该反应物在室温黑暗处搅拌下温育过夜。所得到偶合物通过  
10 两个 PD10 柱(Pharmacia Biotech)用 20mM PBS, pH7.2, 洗脱来纯化，然后对着 4°C 20mM PBS, pH 7.2, 透析一夜。

### 实施例 27

#### 免疫接种和取血

将实施例 21、22、23 和 24 中制备的每个免疫原水溶液与弗氏完全佐剂(FCA)配制成由 2mg/ml 免疫原的 50% (v/v)FCA 组成的乳液。用该乳液给  
15 三只羊免疫接种，在每只动物的肋腹四个部位中的每个皮下注射 0.25ml。接着免疫接种(强化)包括在 50% (v/v)弗氏不完全佐剂(FIA)中乳化的 1mg/ml 免疫原并每隔 1 月以相同方法给药共 1 年。在每次强化后 7 到 14 天，取血样。将每个样品处理生成抗血清，再通过辛酸纯化和硫酸铵沉淀纯化得到  
20 免疫球蛋白 G(IgG)部分。用如下所述的竞争性 ELISA 微量滴定板测定法评估 IgG 部分。

### 实施例 28

#### 去甲芬太尼和芬太尼的竞争性 ELISA 微量滴定板测定

(a)用对免疫原 A 所制备的抗血清(半抗原 A-BSA)(实施例 21)的 IgG 部  
25 分涂覆提高结合 96 孔聚乙烯微量滴定板的孔，并用 10mM Tris, pH 8.5 (125 $\mu$ l/孔)稀释。用标准的 ELISA 方格盘技术测定适当抗体包覆的稀释液。将平板在 37°C 温育 2 小时，用含吐温 20(TBST)的 Tris 缓冲盐水冲洗 4 次并干燥。在 TBST 中以 0、1、5、10、50 和 500ng/ml 制备芬太尼和去甲芬太尼的标准溶液并向适当孔中各加 25 $\mu$ l(见图 12)。向图 12 所示的各孔中加入  
30 100 $\mu$ l 的稀释于含 EDTA、D-甘露糖醇、蔗糖、硫汞撒和 BSA 的 tris 缓冲液的偶合物 B(半抗原 B-HRP)(实施例 25)。也用标准 ELISA 方格盘技术测定

5 偶合物的适当稀释液。将该平板在 37°C 温育 2 小时。用 TBST 在 10 分钟内冲洗 6 次来除去剩余的没有结合的偶合物。向平板的每孔中加入 125 $\mu$ l 的四甲基联苯胺(TMB)底物溶液,然后在室温黑暗处将其温育 15 到 20 分钟。向每孔中加入 125 $\mu$ l 0.2M 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 来终止反应。然后使用微量滴定板计数器在 450nm 测定吸收值。下表 1 显示了测定中得到的数据。

表 1: 使用对免疫原 A 制备的抗血清 (半抗原 A-BSA)(实施例 21)和作为检测剂的偶合物 B(半抗原 B-HRP) (实施例 25)的去甲芬太尼和芬太尼的竞争性微量滴定板测定法中得到的数据

| 标准浓度 ng/ml       | 芬太尼              |                   | 去甲芬太尼            |                   |
|------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|
|                  | A <sub>450</sub> | %B/B <sub>0</sub> | A <sub>450</sub> | %B/B <sub>0</sub> |
| 0                | 2.3              |                   | 2.29             |                   |
| 0.05             | 2.07             | 90.15             | 2.18             | 94.94             |
| 0.1              | 1.84             | 80.2              | 2.11             | 91.83             |
| 0.5              | 1.26             | 54.91             | 1.94             | 84.57             |
| 1                | 0.87             | 38.01             | 1.77             | 77.27             |
| 5                | 0.27             | 11.74             | 1.37             | 59.8              |
| 25               | 0.08             | 3.68              | 0.76             | 33.32             |
| 250              | 0.08             | 3.53              | 0.24             | 10.57             |
|                  |                  |                   |                  |                   |
| IC <sub>50</sub> | 0.61ng/ml        |                   | 9.07ng/ml        |                   |

A<sub>450</sub>=在 450nm 处的吸收值

10 B=在 450nm 处 xng/ml 标准浓度的吸收值

B<sub>0</sub>=在 450nm 处 0ng/ml 标准浓度的吸收值

IC<sub>50</sub>=产生 50%B/B<sub>0</sub> 的标准浓度

15 (b)用与实施例 28(a)所述的相似方式并使用对 A<sub>450</sub>、B、B<sub>0</sub> 和 IC<sub>50</sub> 的相同定义,用对免疫原 A 制备的抗血清(半抗原 A-BSA)(实施例 21)的 IgG 部分包覆 96 孔的微量滴定板的孔并用偶合物 G(半抗原 G-HRP)(实施例 26)作为测定试剂。下表 2 中显示了所得到的数据。

表 2: 使用对免疫原 A 制备的抗血清(半抗原 A-BSA)(实施例 21)和偶合物 G(半抗原 G-HRP)作检测剂(实施例 26)对去甲芬太尼和芬太尼的竞争性微量滴定板测定法中得到的数据

| 标准浓度 ng/ml       | 芬太尼              |                   | 去甲芬太尼            |                   |
|------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|
|                  | A <sub>450</sub> | %B/B <sub>0</sub> | A <sub>450</sub> | %B/B <sub>0</sub> |
| 0                | 1.99             |                   | 1.94             |                   |
| 0.05             | 1.94             | 97.09             | 1.85             | 95.69             |
| 0.1              | 1.94             | 97.54             | 1.82             | 93.93             |
| 0.5              | 1.71             | 85.9              | 1.67             | 86.31             |
| 1                | 1.47             | 73.66             | 1.52             | 78.48             |
| 5                | 0.4              | 19.97             | 1.03             | 53.04             |
| 25               | 0.07             | 3.54              | 0.56             | 29.14             |
| 250              | 0.03             | 143               | 0.14             | 7.05              |
|                  |                  |                   |                  |                   |
| IC <sub>50</sub> | 2.03ng/ml        |                   | 6.41ng/ml        |                   |

(c) 以与实施例 28(a)所述的相似方法，用对免疫原 C 制备的抗血清(半抗原 C-BSA)(实施例 22)的 IgG 部分和用偶合物 E(半抗原 E-HRP)(实施例 25)作为检测剂包覆 96 孔的微量滴定板的孔。下表 3 中显示了所得到的数据。

5 表 3: 使用对免疫原 C 制备的抗血清(半抗原 C-BSA)(实施例 22)和偶合物 E(半抗原 E-HRP)作检测剂(实施例 25)对去甲芬太尼和芬太尼的竞争性微量滴定板测定法中得到的数据

| 标准浓度 ng/ml       | 芬太尼              |                   | 去甲芬太尼            |                   |
|------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|
|                  | A <sub>450</sub> | %B/B <sub>0</sub> | A <sub>450</sub> | %B/B <sub>0</sub> |
| 0                | 2.3              |                   | 2.2              |                   |
| 0.05             | 1.9              | 82.2              | 2.1              | 94.3              |
| 0.1              | 1.6              | 68.2              | 2.0              | 90.8              |
| 0.5              | 0.8              | 34.4              | 1.9              | 88.5              |
| 1                | 0.5              | 23.4              | 1.9              | 88.6              |
| 5                | 0.2              | 8.4               | 1.9              | 89.2              |
| 25               | 0.1              | 2.8               | 2.0              | 90.1              |
| 250              | 0.0              | 1.0               | 2.0              | 89.6              |
|                  |                  |                   |                  |                   |
| IC <sub>50</sub> | 0.24ng/ml        |                   | >250ng/ml        |                   |

## 参考文献

- Camu 等; 麻醉与止痛(*Anesth. Analg.*); 61; pp657-61(1982).
- Frincke, J.M. & Henderson, G.L.; 药物代谢与处置(*Drug Metab. Dispos.*);  
5 8(6); pp425-7 (1980).
- Hammargren, W.R. & Henderson, G.L.; 分析毒理学杂志(*J. Anal. Toxicol.*); 12; pp183-191 (1988).
- Henderson 等; 药理学与实验治疗学杂志(*J. Pharmacol. Exp. Ther.*);  
192(2); pp489-96 (1975).
- 10 Makowski 等; 临床与实验科学年刊(*Annals of Clinical and Laboratory Science*); 25(2); pp169-177 (1995).
- McDonald 等; 化学病理学与药理学研究通讯(*Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*); 57(3); pp389-407 (1987).
- Meuldermans 等; *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*; 257; pp4-19 (1982).
- 15 Michiels 等; 欧洲临床药理学杂志(*Eur. J. Clin. Pharmacol.*); 12(2); pp153-8 (1977).
- Ruangyuttikam 等; 分析毒理学杂志(*J. Anal. Toxicol.*); 14; pp160-164 (1990).
- Silverstein 等; 麻醉与止痛(*Anesthesia and Analgesia*); 76; pp618-621  
20 (1993).
- Watts, V.W. & Caplan, Y.H.; 分析毒理学杂志(*J. Anal. Toxicol.*); 14; pp266-272 (1990).

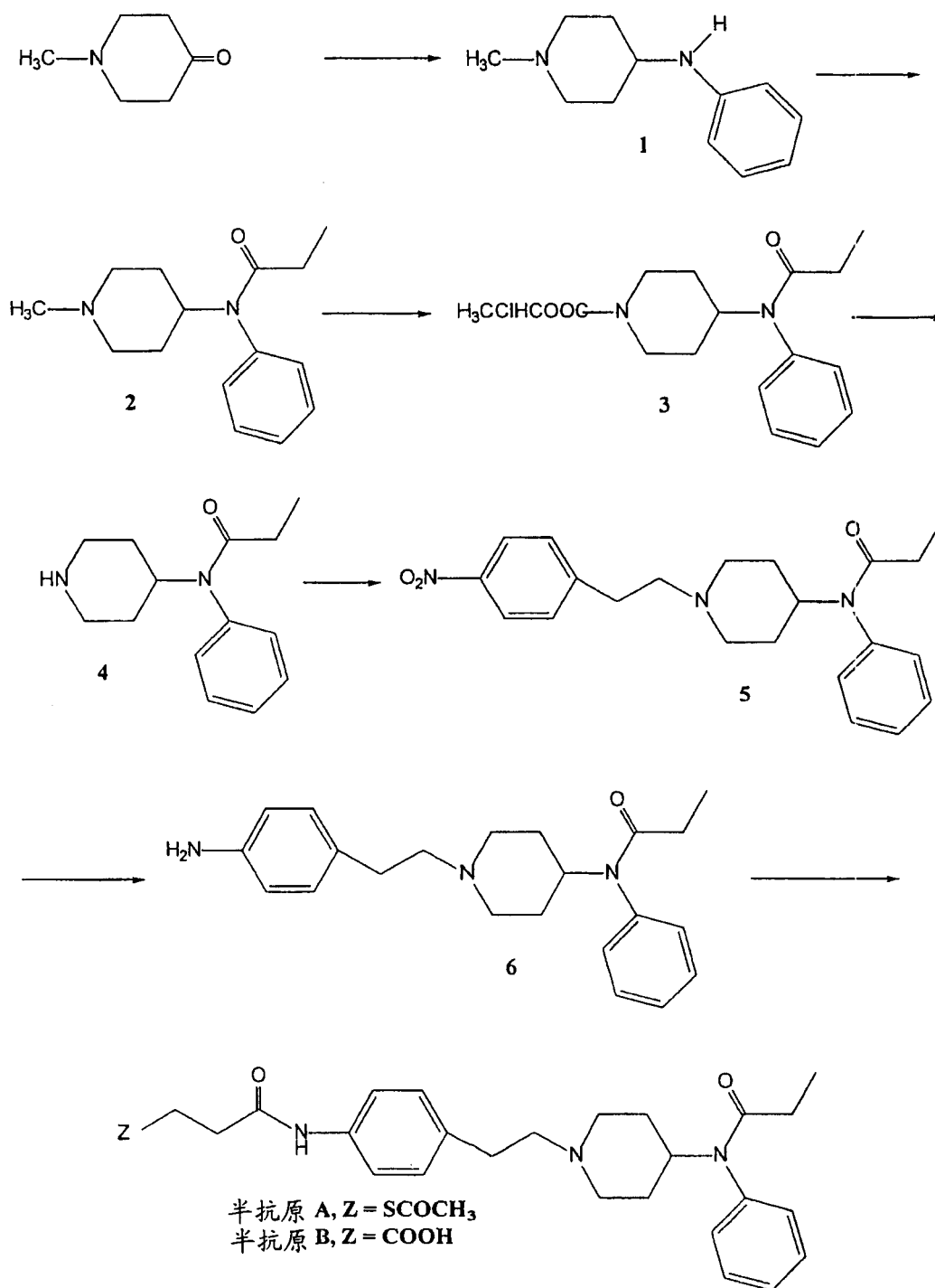


图 1

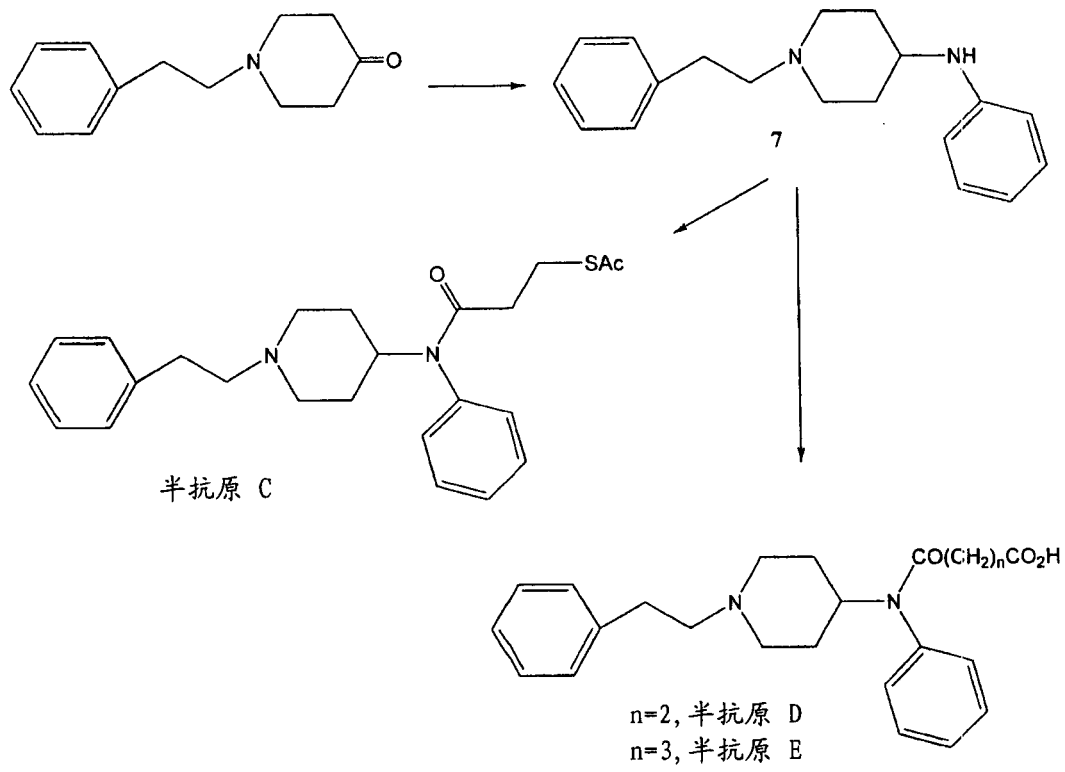


图 2

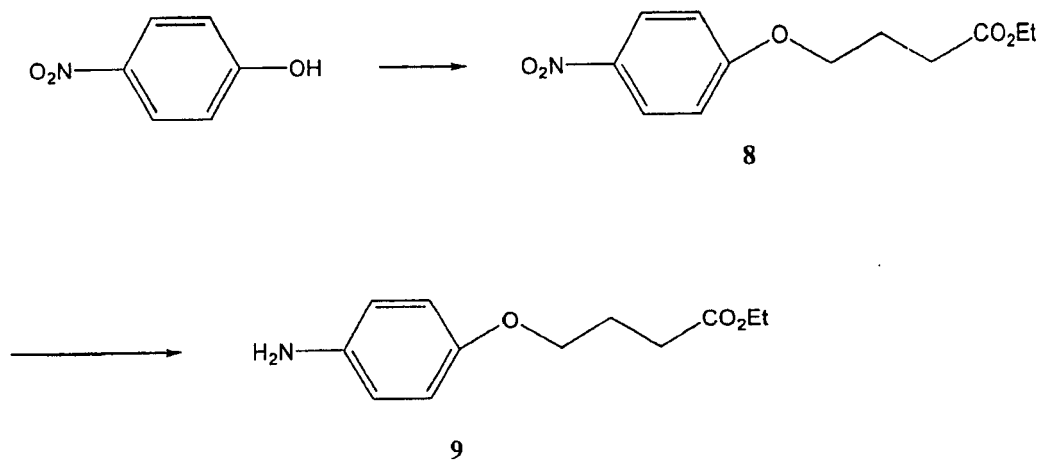


图 3

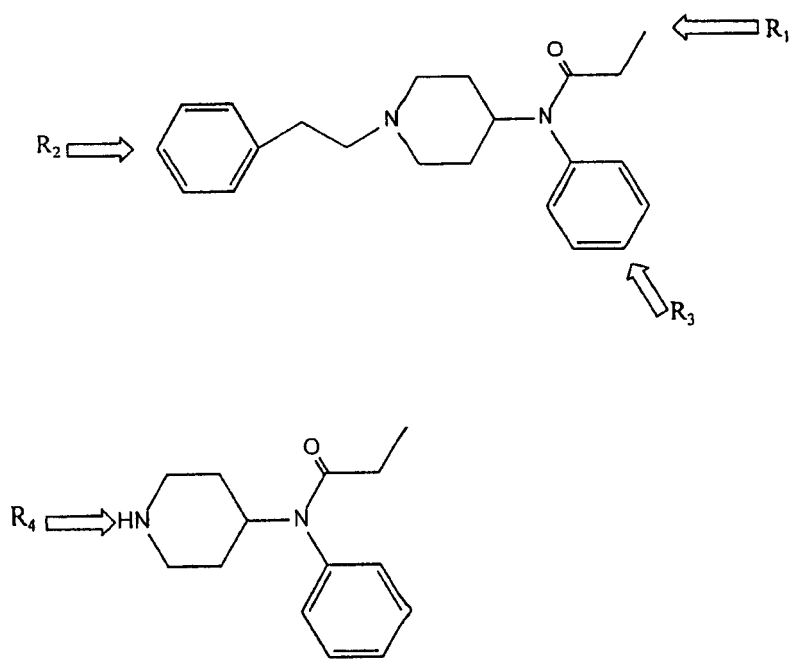


图 1a

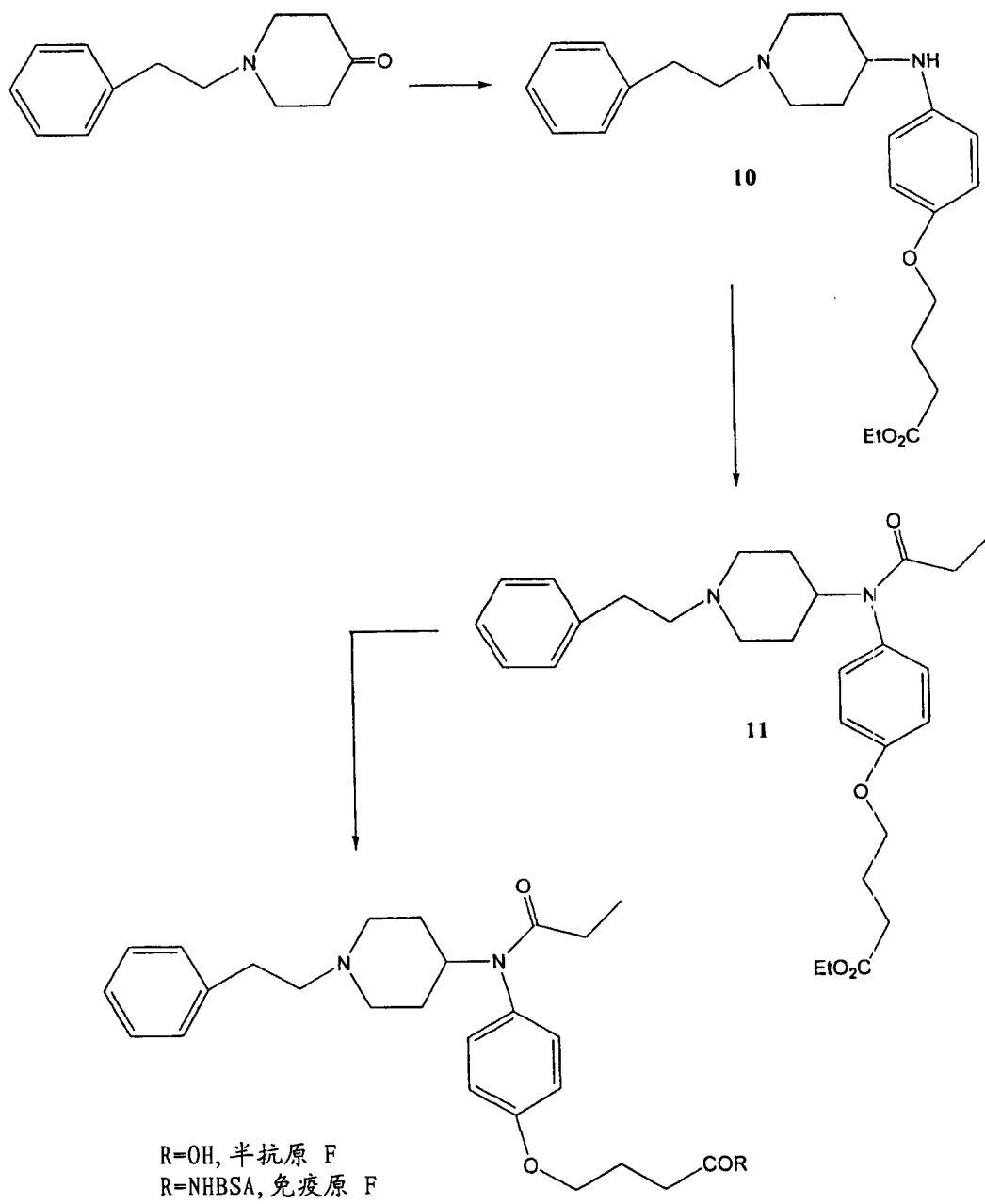


图 4

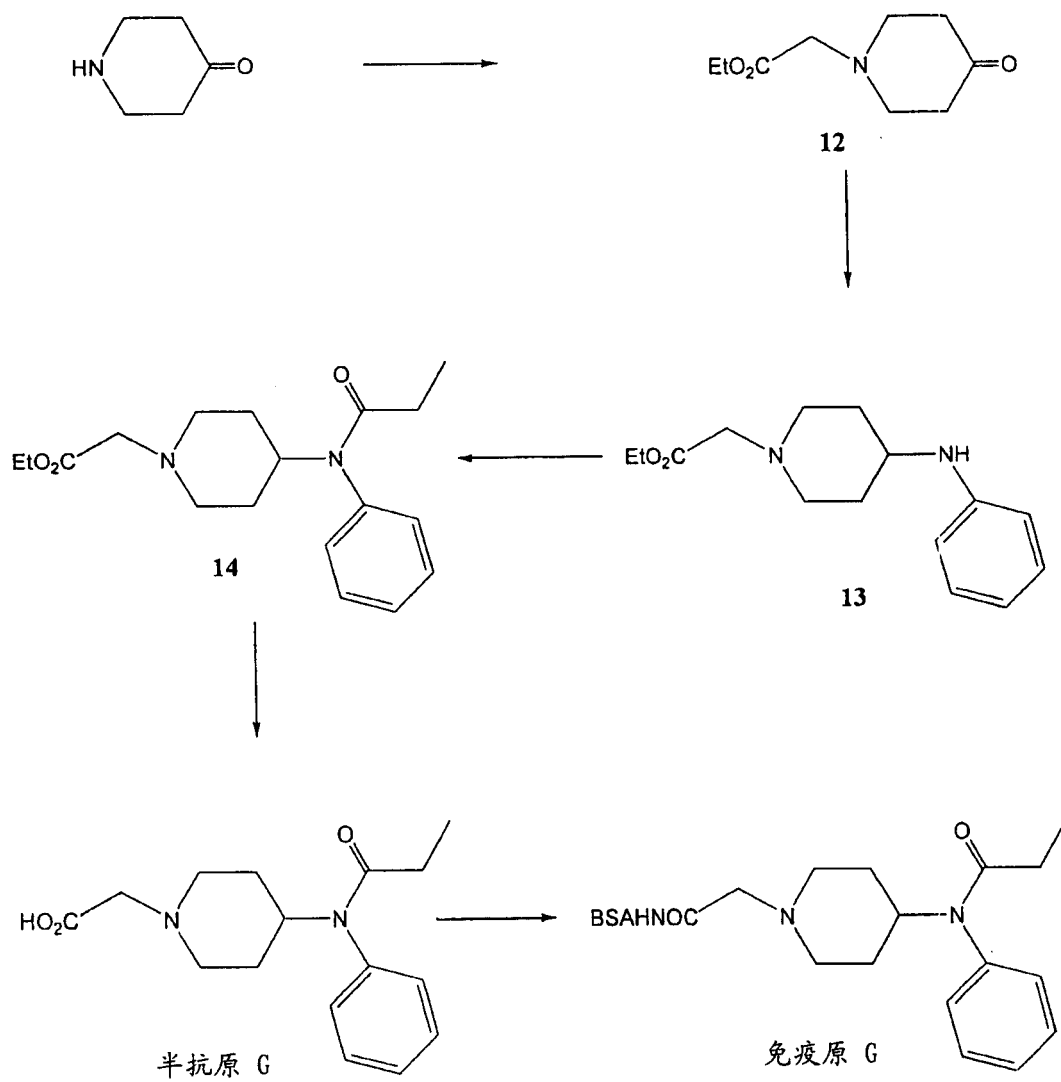


图 5

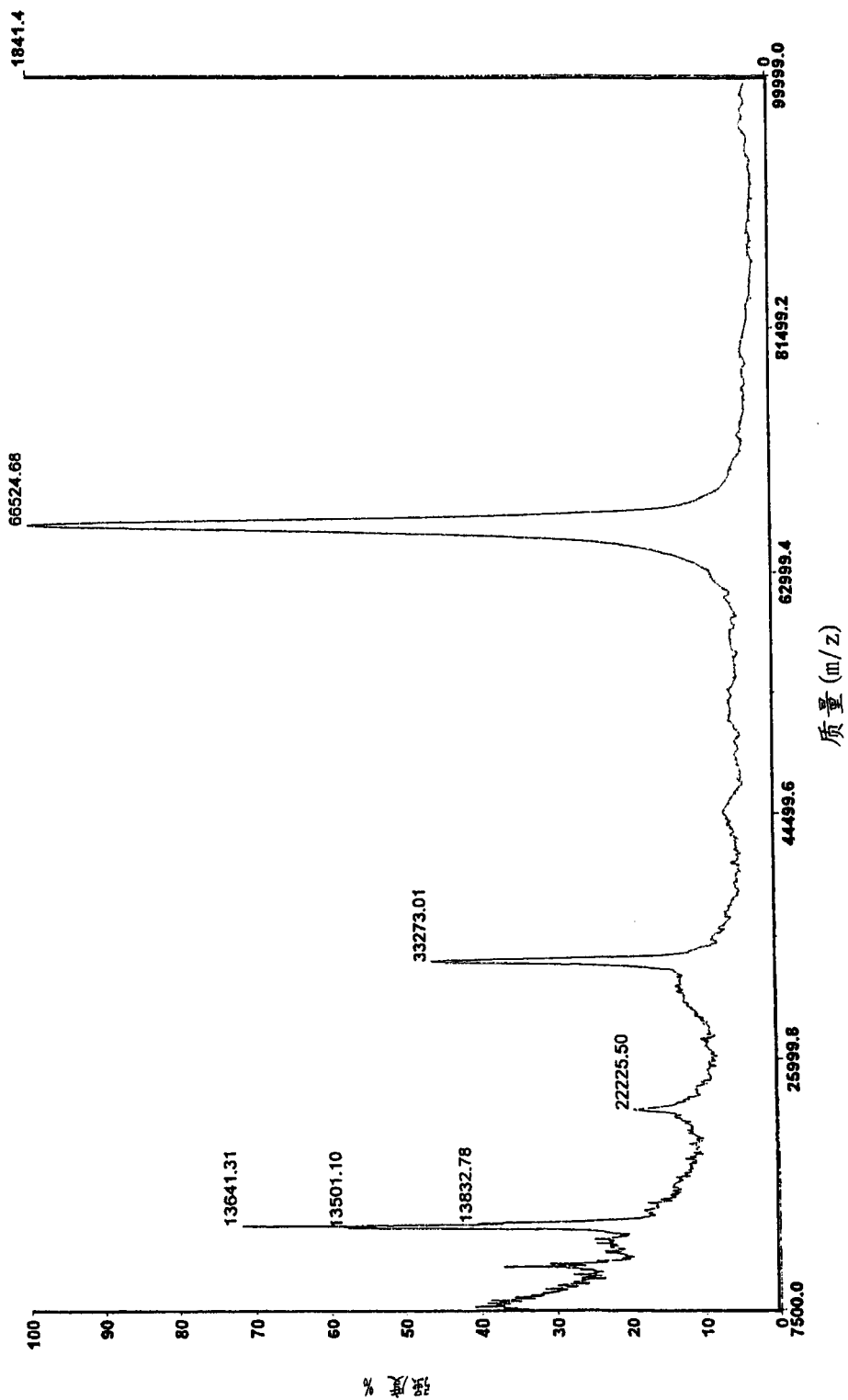


图 6

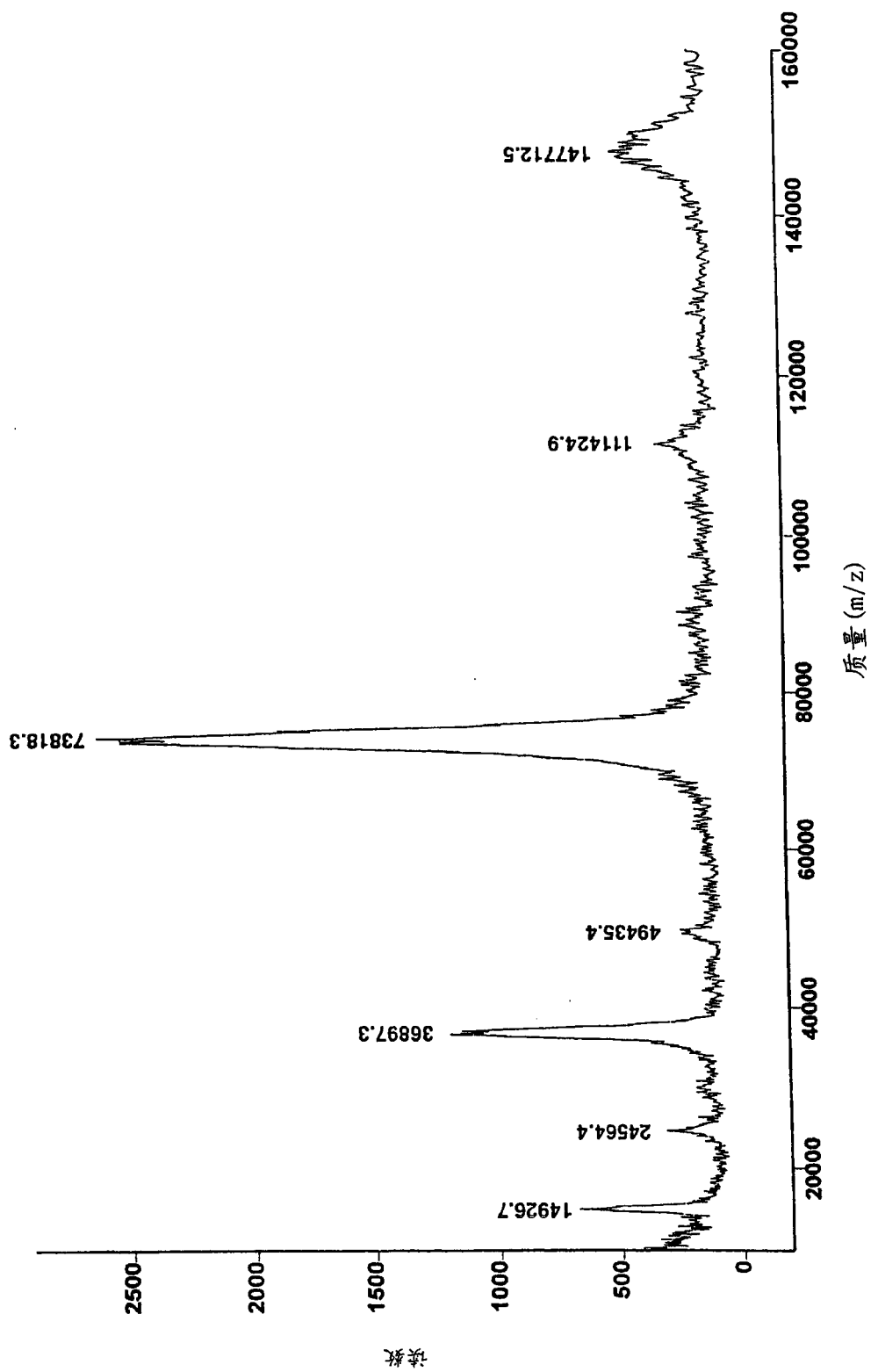


图 7

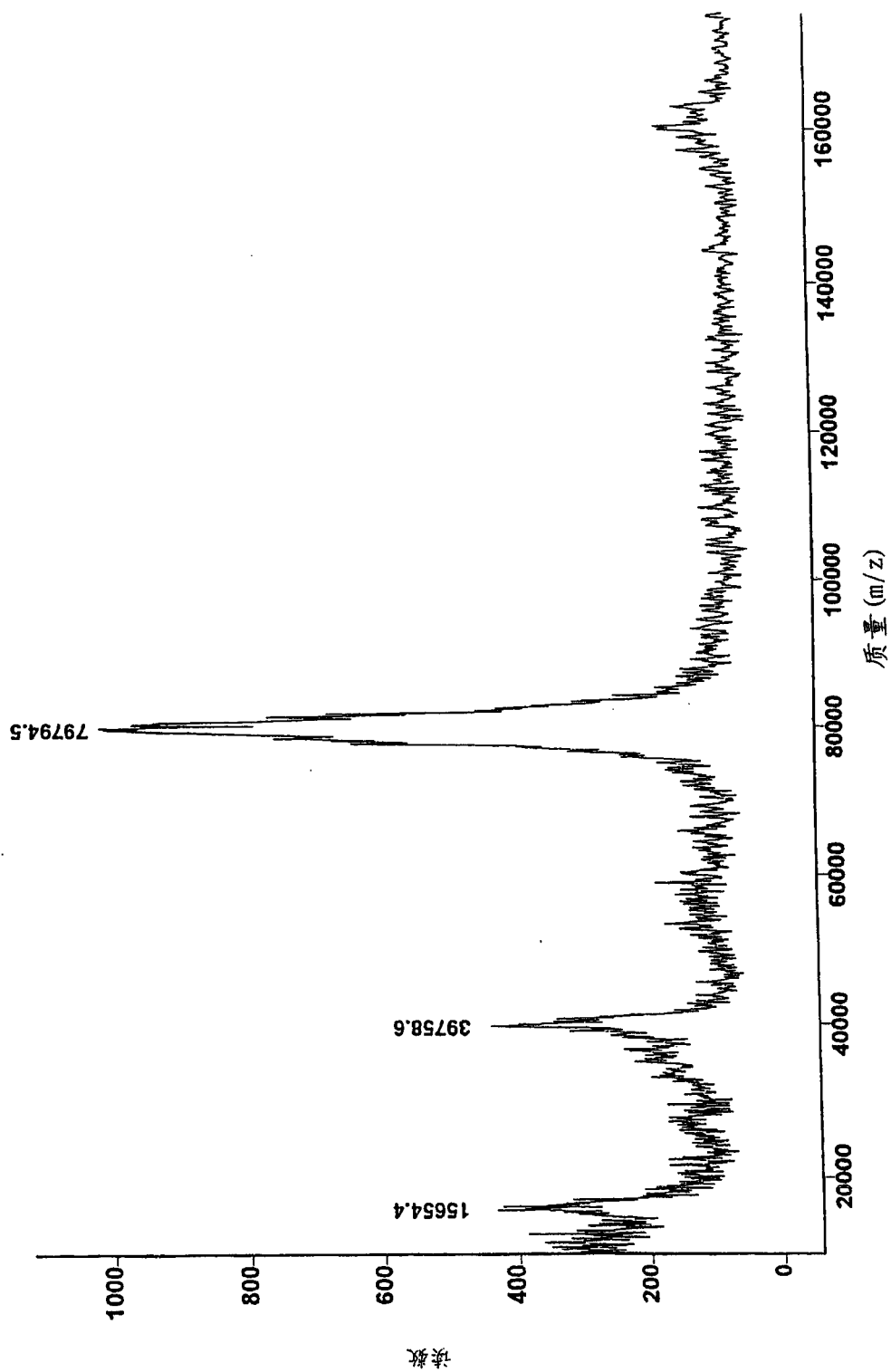


图 8

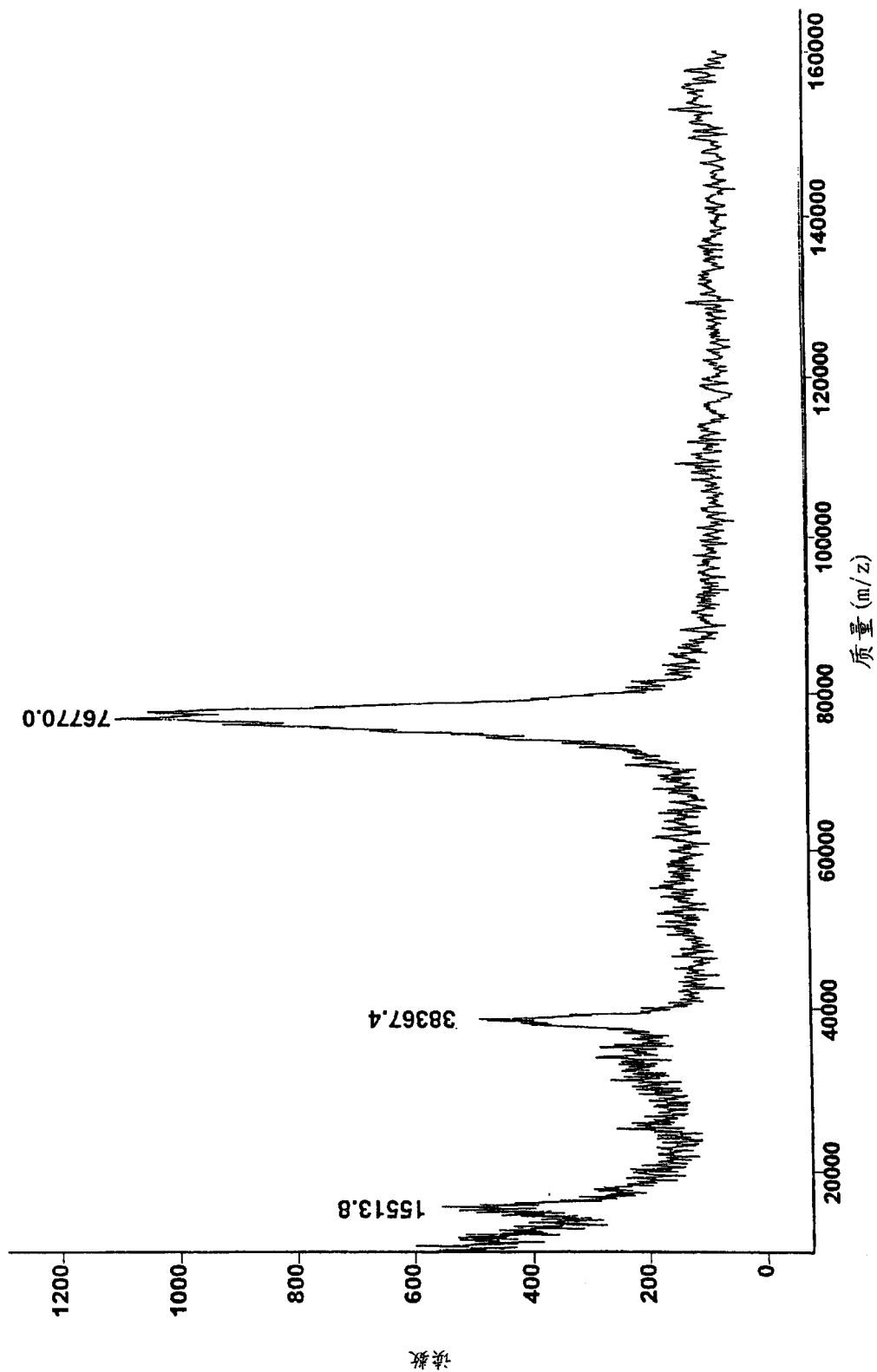


图 9

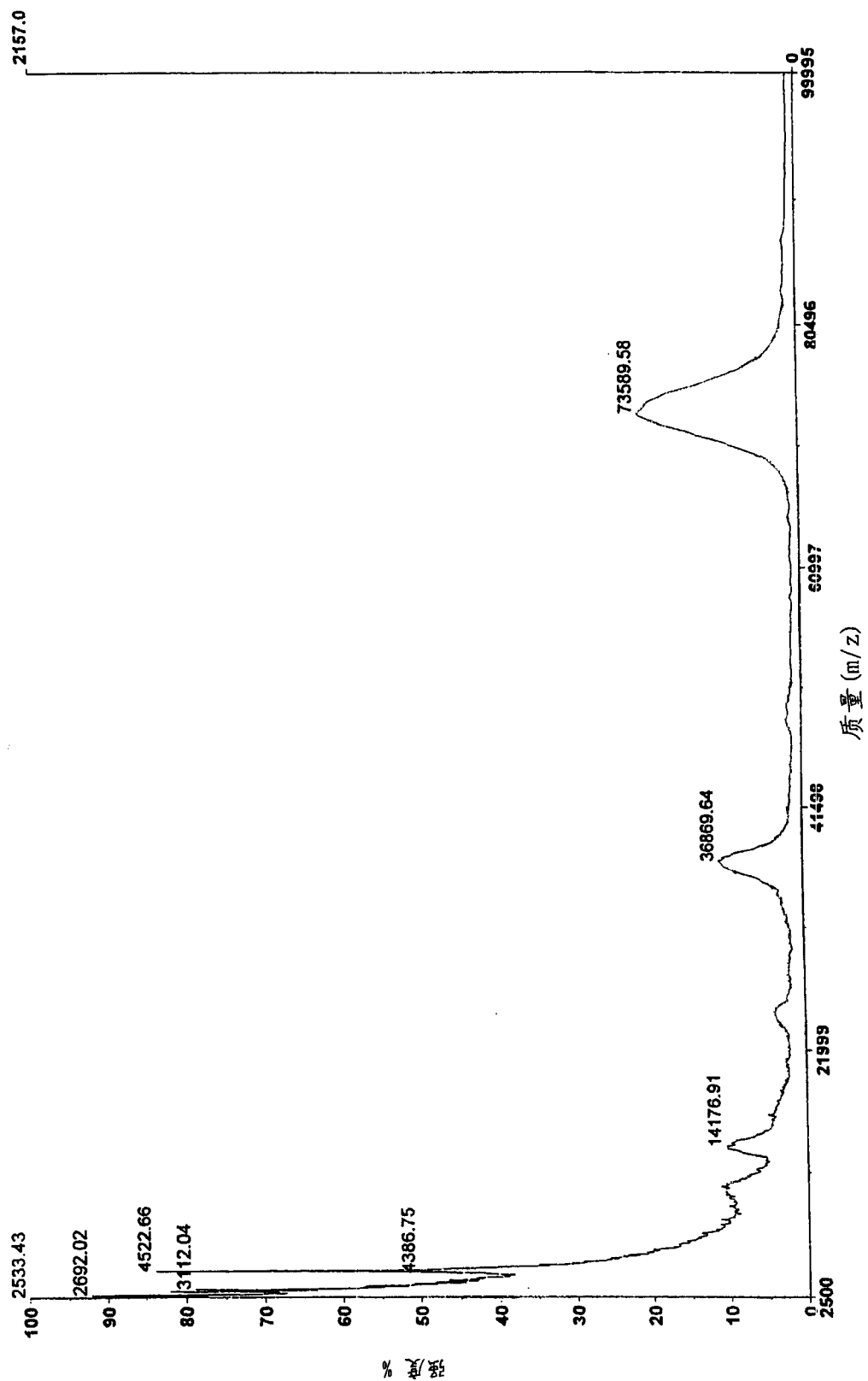


图 10

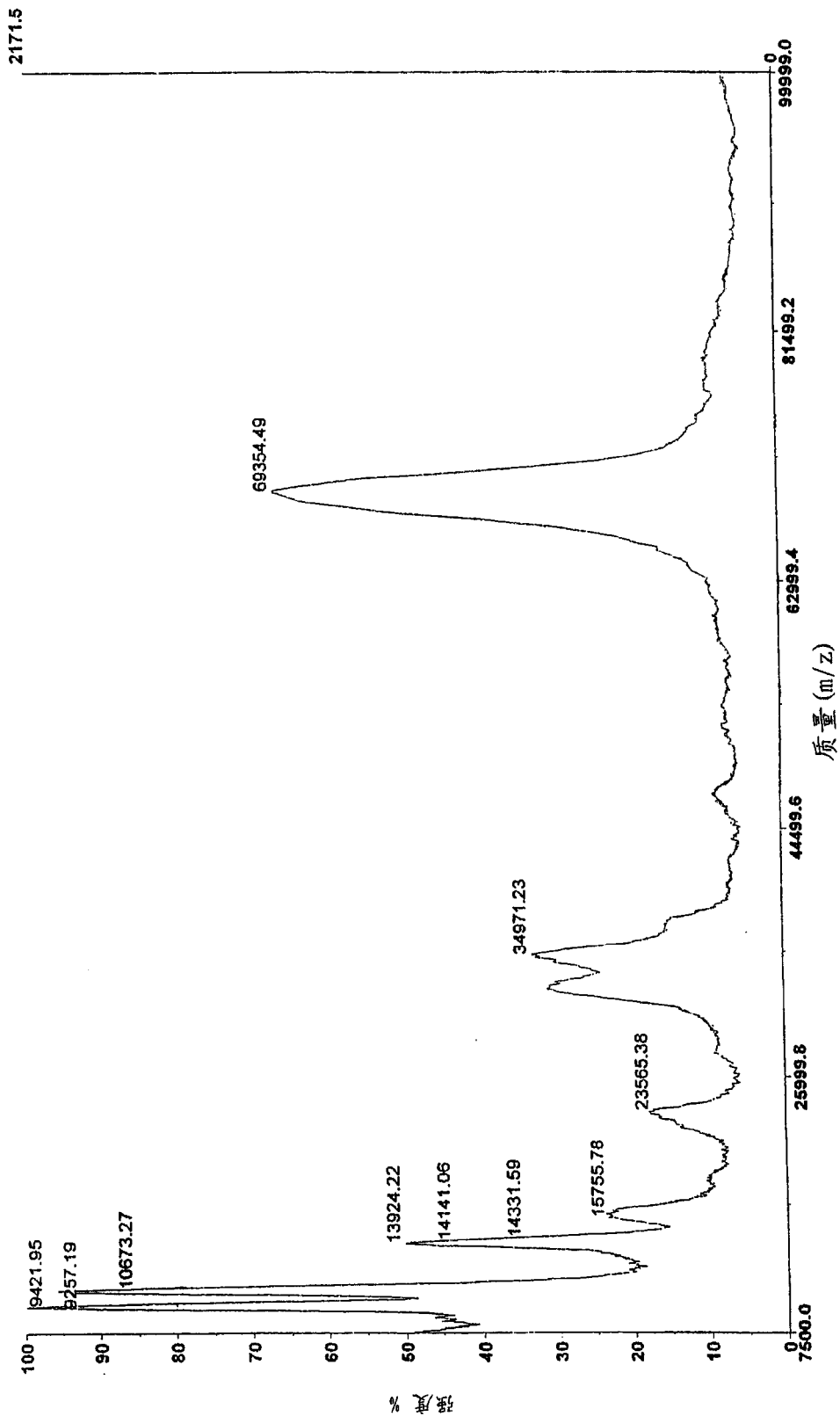


图 11

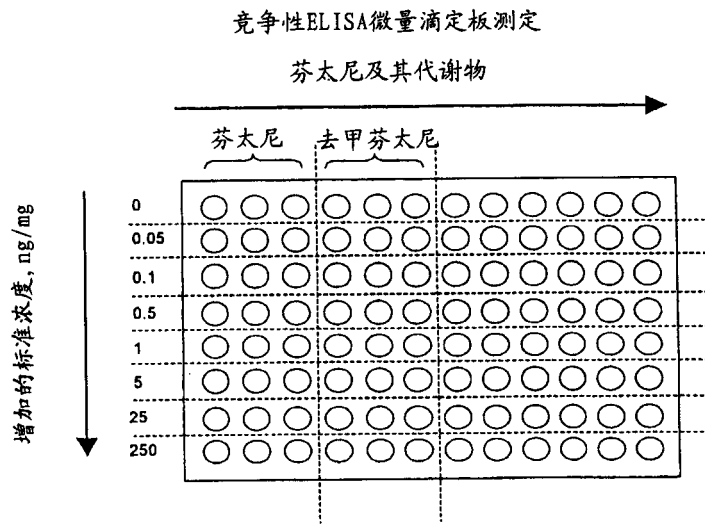


图 12

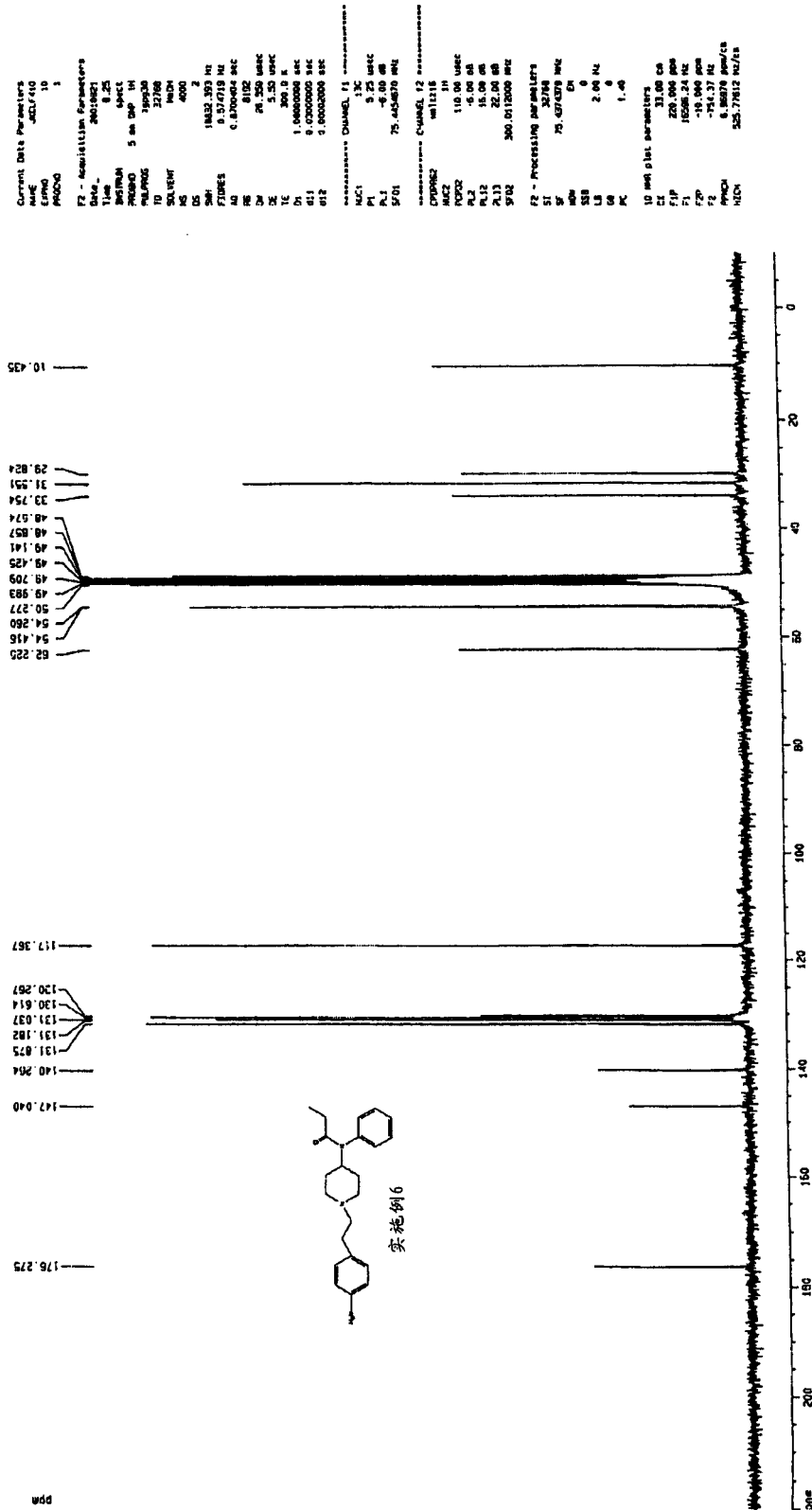


图 13

```

Current Date: 08/15/2007
NAME: JCELF104
EXPNO: 10
PROCNO: 1
PROCAM: 1
F2 - Acquisition Parameters
=====
Date_   : 20070814
Time    : 21:14
INSTRUM : spect
PROBHD  : 5 mm QNP 1H
PULPROG : zgpg30
TD       : 65536
SOLVENT : DMSO
NS       : 4000
DS       : 2
SWH      : 18633.263 MHz
FIDRES  : 0.374718 MHz
AQ       : 0.819666 sec
RG       : 327.5
DM       : 28.552 umsec
DC       : 5.150 umsec
TE      : 300.2 K
SI      : 1.0000000 sec
SF      : 400.1464010 MHz
AQ2     : 0.10000000 sec
===== CHANNEL f1 =====
NUC1    : 13C
P1      : 12.00 nsec
PL1     : -1.50 dB
SFO1    : 75.4654670 MHz
===== CHANNEL f2 =====
CPROG2  : zgpg30
NUC2    : 1H
P2      : 110.00 nsec
PL2     : -1.50 dB
SFO2    : 400.1464010 MHz
===== Processing parameters =====
SI      : 32768
SF      : 75.4374373 MHz
WDW     : EM
SSB     : 0
LB      : 3.00 Hz
GB      : 0
PC      : 1.40
===== 1D NMR list parameters =====
EX      : 37.00 cm
AQ       : 0.819666 sec
RG       : 327.5
SI      : 32768
SF      : 400.1464010 MHz
FIDRES  : -10.000 MHz
F2      : -75.437 MHz
PPOACH  : 8.98979 MHz/cm
NSCH    : 525.77512 MHz/cm
    
```

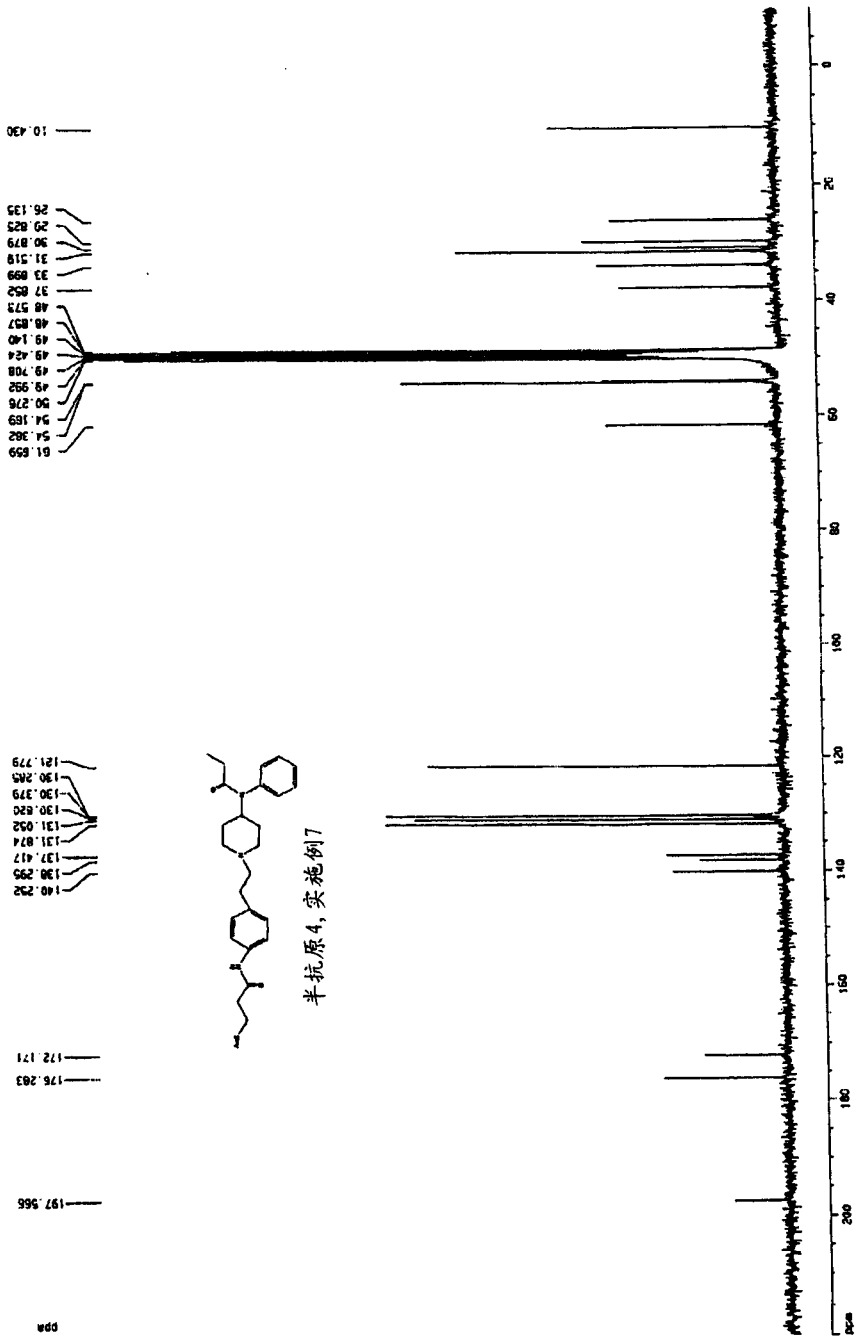


图 14





|         |   |         |            |
|---------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 检测或定量测定芬太尼的代谢物或芬太尼类似物的代谢物的方法和试剂盒                          |         |            |
| 公开(公告)号 | <a href="#">CN1428607A</a>                                | 公开(公告)日 | 2003-07-09 |
| 申请号     | CN02150665.5  | 申请日     | 2002-11-15 |
| [标]发明人  | 罗伯特 麦康奈尔<br>埃尔O本奇克<br>斯蒂芬P菲茨杰拉德<br>约翰V拉蒙特                 |         |            |
| 发明人     | 罗伯特· I· 麦康奈尔<br>埃尔· O· 本奇克<br>斯蒂芬· P· 菲茨杰拉德<br>约翰· V· 拉蒙特 |         |            |
| IPC分类号  | C07D211/58 G01N33/531 G01N33/94 C07K16/44                 |         |            |
| CPC分类号  | C07D211/58 G01N2430/00 G01N33/531 G01N33/9486             |         |            |
| 优先权     | 2001204401 2001-11-16 EP                                  |         |            |
| 其他公开文献  | CN100402084C  |         |            |
| 外部链接    | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>            |         |            |

摘要(译)

本发明描述了可用交联剂衍生的半抗原，是在附图1a中R1、R2、R3和R4示意说明的位置衍生的，条件是R1不是羧基。另外，本发明要求保护一种含有某些结合具有抗原性载体物质的前述半抗原的免疫原；一种含有某些结合可检测的标示剂的前述半抗原的偶合物；以及抗前述免疫原而制备的和能够与至少一个芬太尼的代谢物和芬太尼类似物的代谢物的结构表位结合的抗体。本发明还提供了检测或定量测定芬太尼代谢物和芬太尼类似物的代谢物的方法和试剂盒，以及含有前述抗体的前述偶合物在检测或定量测定芬太尼代谢物和芬太尼类似物的代谢物的量的用途。本发明对芬太尼的各种代谢物和芬太尼类似物的各种代谢物都具有宽广特异性。

