

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02139960.3

[51] Int. Cl.

C07K 17/02 (2006.01)
C07K 14/765 (2006.01)
C07K 16/44 (2006.01)
C07D 317/48 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 10 月 25 日

[11] 授权公告号 CN 1281626C

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/532 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61K 47/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

[22] 申请日 2002.12.20 [21] 申请号 02139960.3

[30] 优先权

[32] 2001.12.20 [33] EP [31] 01205058.9

[71] 专利权人 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

伊尔·O·本齐克

斯蒂芬·P·菲茨杰拉德

约翰·V·拉蒙特

审查员 葛永奇

[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 3 页 说明书 15 页 附图 11 页

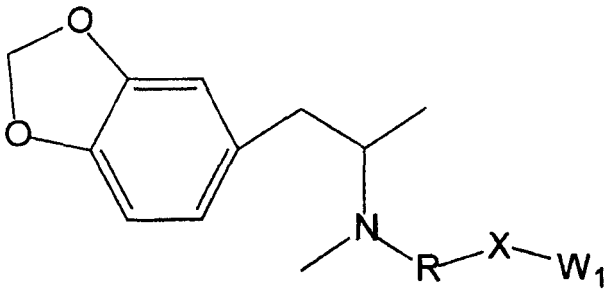
[54] 发明名称

检测或测定 3,4 - 亚甲基二氧基脱氧麻黄碱
(MDMA) 的方法和试剂盒

[57] 摘要

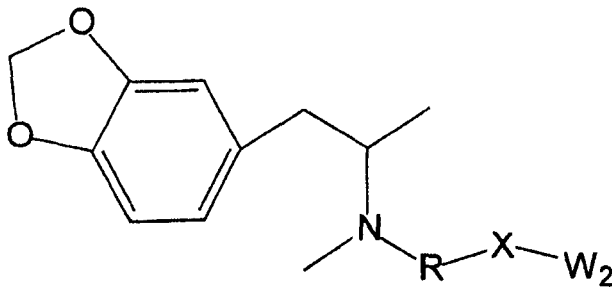
本发明描述一种在 MDMA 的 N 位置上用交联剂衍生的半抗原。本发明提供一种含有前述结合剂赋予抗原性载体物质上的半抗原，和含有前述的与可检测试剂共价结合的半抗原的缀合物。另外，本发明还涉及对抗前述免疫原产生抗体。最后，本发明涉及检测或测定生物流体中 MDMA 和 N - 烷基化的亚甲基二氧基苯异丙胺的方法和试剂盒。本发明的抗体不与苯异丙胺和脱氧麻黄碱发生明显的交叉反应。

1. 一种如下通式的免疫原:



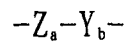
其中, 交联剂为-R-X, R 是二价连接基团和 X 是末端基团, 且其中 W_1 是赋予抗原性载体物质。

2. 一种如下通式的缀合物:



其中, 交联剂为-R-X, R 是二价连接基团和 X 是末端基团, 且其中 W_2 是可检测的标记试剂。

3. 根据权利要求 1 或 2 的免疫原或缀合物, 其中 R 是:



其中 Z 是取代的或未取代的、直链或支链的、饱和或不饱和的亚烷基基团或取代或未取代的亚芳基; Y 是取代或未取代的、直链或支链的、饱和或不饱和的亚烷基基团; a 是 0 或 1 且 b 是 0 或 1, 条件是 a 和 b 不能同时为 0。

4. 根据权利要求 3 的免疫原或缀合物, 其中 b 是 0, a 是 1, 和 Z 是 C_{1-6} 取代或未取代的、直链或支链的、饱和或不饱和的亚烷基基团。

5. 根据权利要求3的免疫原或缀合物, 其中Z是C₃₋₄未取代的、直链、饱和的亚烷基基团。

6. 根据权利要求3的免疫原或缀合物, 其中Z是未取代的丙烯基团并且b是0。

7. 根据权利要求3的免疫原或缀合物, 其中X选自羧酸或其酯、胺、马来酰亚胺、卤代羧酸或其酯、硫代羧酸或其酯、醛、吡啶基二硫代或乙烯基砷基团。

8. 根据权利要求7的免疫原或缀合物, 其中X选自羧酸、胺或硫代羧酸酯。

9. 根据权利要求6的免疫原或缀合物, 其中X选自羧酸、胺或硫代羧酸。

10. 根据权利要求1的免疫原, 其中载体物质是蛋白质、蛋白质片段、合成的多肽或半合成的多肽。

11. 对抗根据权利要求1的免疫原产生的抗体, 所述抗体能够与3,4-亚甲基二氧基脱氧麻黄碱的至少一个结构表位结合, 并且对MDMA和其它亚甲基二氧基类似物具有特异性。

12. 对抗根据权利要求9的免疫原产生的抗体, 所述抗体能够与3,4-亚甲基二氧基脱氧麻黄碱的至少一个结构表位结合, 并且对MDMA和其它亚甲基二氧基类似物具有特异性。

13. 制备权利要求11的抗体的方法, 该方法包括通过重复给予根据权利要求1的免疫原免疫动物和收集从免疫动物得到的血清的步骤。

14. 根据权利要求2的缀合物, 其中标记试剂选自酶、发光物质、放射性物质或它们的混合物。

15. 检测或测定试样中MDMA及其亚甲基二氧基类似物的方法, 该方法包括用根据权利要求2或14的缀合物或其混合物和用根据权利要求11的抗体或其混合物接触试样; 检测或测定结合缀合物的数量; 以及从标准曲线推算样品中MDMA及其亚甲基二氧基类似物的存在或者数量。

16. 检测或测定试样中MDMA及其亚甲基二氧基类似物的方法, 该方法包括用根据权利要求9的缀合物或其混合物, 和用根据权利要求12的抗体或其混合物接触试样; 检测或测定结合缀合物的数量; 以及从标准曲线推算样品中MDMA及其亚甲基二氧基类似物的存在或者数量。

17. 一种检测或测定 MDMA 及其亚甲基二氧基类似物的试剂盒，该试剂盒包括根据权利要求 2 或 14 的缀合物或其混合物以及根据权利要求 11 的抗体或其混合物。

18. 一种检测或测定 MDMA 及其亚甲基二氧基类似物的试剂盒，该试剂盒包括根据权利要求 9 的缀合物或其混合物以及根据权利要求 12 的抗体或其混合物。

19. 根据权利要求 2 或 14 的缀合物或其混合物的用途，用根据权利要求 11 的抗体或其混合物检测或测定试样中 MDMA 及其亚甲基二氧基类似物。

20. 根据权利要求 9 的缀合物或其混合物的用途，用根据权利要求 12 的抗体或其混合物检测或测定试样中 MDMA 及其亚甲基二氧基类似物。

检测或测定 3, 4-亚甲基二氧基脱氧麻黄碱 (MDMA) 的方法和试剂盒

本发明涉及一种检测或测定 MDMA (3, 4-亚甲基二氧基脱氧麻黄碱 (methylenedioxyamphetamine)) 及其亚甲基二氧基 (methylenedioxy) 类似物的方法和试剂盒。

“检测”的意思是对物质存在或不存在的定性分析。

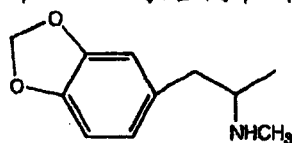
“测定”的意思是对物质的量的定量分析。

“亚甲基二氧基类似物”的意思是亚甲基二氧基苯异丙胺 (MDA) 的 N-(一-或二-) 烷基化 (例如, N-甲基化或 N-乙基化) 衍生物。

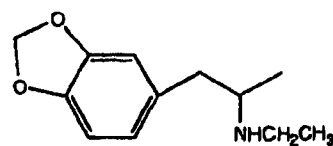
本发明描述新型 MDMA 半抗原衍生物的缀合 (conjugation), 与赋予抗原性的载体物质 (antigenicity-conferring carrier material) 或标记剂共价连接的半抗原, 以便分别产生本发明的免疫原或缀合物 (conjugate)。本发明还描述了对于这些免疫原产生的抗体如何用于展开特异性试验, 该试验用于检测或测定生物流体中的 MDMA 或亚甲基二氧基 (methylenedioxy) 类似物鉴定研制中。

本发明的方法和试剂盒对于 MDMA 具有高度特异性, 但是用于除了与亚甲基二氧基类似物如 3, 4-亚甲基二氧基乙基苯异丙胺 (methylenedioxyethylamphetamine) (MDEA) 有交叉反应。本发明的方法和试剂盒对于与结构相关的苯异丙胺 (amphetamine) 和脱氧麻黄碱 (methamphetamine) 的交叉反应是不明显的。

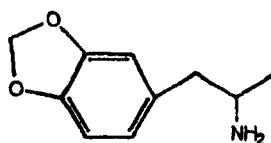
MDMA、MDEA 和 MDA 的结构在下面给出:



1 MDMA (Ecstasy)



2 MDEA (Eve)



3 MDA

MDMA 及其亚甲基二氧基类似物是日益滥用的对神经起显著作用的药物。MDMA 的主要代谢物是 MDA。但是，以尿的形式排泄的 65% 的 MDMA 没有变化。极其频繁地使用的各种秘密产品的化合物是 3, 4-亚甲基二氧基脱氧麻黄碱 (MDMA, 1), 也称为 Ecstasy, 3, 4-亚甲基二氧基乙基苯异丙胺 (MDEA, 2), 也称为 Eve, 和 3, 4-亚甲基二氧基苯异丙胺 (MDA, 3)。这些化合物主要对 5-羟色胺系统, 其次对多巴胺系统发挥它们的作用。亚甲基二氧基苯异丙胺衍生物的流行可归因于它们作用于神经上的作用。

虽然 MDMA、MDEA 和 MDA 通常认为是相对安全的消遣药物, 但是使用它们能引起许多不利作用和并发症已经逐渐显著, 它们中的一些能够导致致命的结果。此外, 已经发现 MDMA 和 MDA 会损害迄今为止所有经过实验的实验动物的 5-羟色胺神经元, 且更严重的是人类使用者有 5-羟色胺神经毒性的危险, 特别是在大剂量重复使用药物之后。

迄今为止, 测定生物流体中 MDMA 及其亚甲基二氧基类似物主要基于气相色谱-质谱 (GC-MS) 和 HPLC。这些色谱法能够提供很好的灵敏度和选择性, 但是需要对 MDMA 及其亚甲基二氧基类似物进行衍生化。另外, 这些方法太昂贵且作为筛选工具使用消耗时间。

特异性的结合反应, 如抗体-抗原相互作用, 已经广泛地用于免疫测定来检测生物流体中存在的各种物质。

因此, 例如, 放射免疫测定能够用于测定 MDMA 及其亚甲基二氧基类似物的量。放射免疫测定非常灵敏, 但是需要放射性核素示踪剂, 例如 ^{125}I 和 ^3H , 以及在某些情况, 需要预先提取步骤。没有已知的 RIAs 用于测定 MDMA 及其亚甲基二氧基类似物。

酶联免疫吸附测定 (ELISA) 是一种已知的用于各种苯异丙胺衍生物定性和半定量测定的非放射性替代方法。但是, 技术人员能够理解苯异丙胺衍生物没有 MDMA 的亚甲基二氧基环。因此例如, EP0 399 184 A2 (Abbott 实验室) 描述了通过荧光偏振免疫测定检测和测定苯异丙胺的试剂、方法和试剂盒。EP0 399 184 A2 由各种苯异丙胺制备半抗原, 免疫原和抗体, 它们都没有 MDMA 的亚甲基二氧基环。EP 0 399 184A2 的实施例 20 证实这些试剂以高于加入的 MDMA、MDEA 和 MDA 的浓度计算所表现的交叉反应性低于 30% (见表 2)。另外, EP-A-820984 描述的制备苯异丙胺和脱氧麻黄碱的半

抗原、免疫原和抗体，它们的半抗原没有 MDMA 的亚甲基二氧基环。甚至，EP-A-820984 中的半抗原衍生自苯异丙胺的未稠合苯环，然而，相反地，MDMA 及其亚甲基二氧基类似物含有与苯环稠合的亚甲基二氧基环。

酶联免疫吸附测定 (ELISA) 是一种已知的用于苯异丙胺类的一般测定的非放射性替代方法。特别地，Emit (注册商标) II Plus Monoclonal (Syva 公司供给) 和 Cedia (注册商标) DUA (Microgenetics/Roche 供给) 皆为对苯异丙胺的 EIAs。当相对 D-脱氧麻黄碱 100% 时，对于 MDMA (Cedia) 各自的交叉反应性为 69%，对于 MDMA 为 14.3% (当相对于 D, L-脱氧麻黄碱 (Emit) 为 100% 时)。

酶联免疫吸附测定 (ELISA) 也是一种已知的用于 MDMA 及其亚甲基二氧基类似物的定性和半定量测定方法。

以前从 Cozart Bioscience Limited (45 Milton Park, Abingdon, Oxfordshire, OX14 4RU, 英国) 获得的 MDMA 只是筛选检测，它需要通过 Cozart 称为“更特异性的”的化学替代方法——优选气相色谱/质谱 (GC-MS) 而确认。因此，当与相对脱氧麻黄碱为 100% 比较，对于 MDMA (758-1250%)，MDEA (50-100%) 和 N-甲基-1-(3,4-亚甲基二氧基苯基)-2-丁胺 (MBDB) (150-200%)，Cozart 脱氧麻黄碱 EIA (2001 年 10 月得到，now withdrawn) 显示出明显的交叉反应活性，而当与相对 MDMA 为 100% 来比较，用 D-脱氧麻黄碱 (52-80%) 和 DL-MBDB (10.4-20%) Cozart MDMA EIA (2001 年 10 月得到，now withdrawn) 显示明显的交叉反应活性。这两种 Cozart 检测方法现在已经被单独的 Cozart 脱氧麻黄碱试剂盒代替，该试剂盒当与脱氧麻黄碱显示 100% 交叉反应活性相比时，相对于 MDMA 显示 43-49% 的交叉反应活性。

对于各种上文提到的检测方法的交叉反应活性数据已经相对于 MDMA 为 100% 重新计算，并且这些数据按照图表的形式在下表中给出：

化合物	Cozart 苯异丙胺	Cozart 脱 氧麻黄碱 和 MDMA	Cozart 脱氧麻 黄碱	Cozart MDMA	CEDIA	Emit
MDMA	100	100	100	100	100	100
D-苯异丙胺	1,428	1.52	1	0.2-0.43	146.5	917
D,L-苯异丙胺	-	-	-	-	84.1	545.6
L-苯异丙胺	-	-	-	-	4.35	120.13
D-脱氧麻黄碱	-	217	10	52-80	145	-
D,L-脱氧麻黄碱	-	-	-	-	94.25	699.7
L-脱氧麻黄碱	-	-	-	4-22	17.4	378.7
MDA	208488-304164	0.87	0.36	0.3-0.74	2.76	430.1
MDEA	228.5	10.85	5-10	7.0-13.0	-	-
MBDB	-	319-334.2	15-20	10.4-20	-	-

发明目的:

本发明的目的在于克服现有技术的一些或全部缺点，或者另外提供一种替代物。

本发明优选的具体例子的目的在于提供一种检测或测定 MDMA 及其亚甲基二氧基类似物数量的方法和试剂盒。

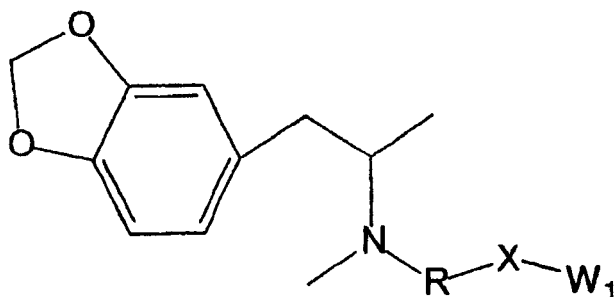
本发明的目的是通过制备对 MDMA 及其亚甲基二氧基类似物高度特异性的、对 d-苯异丙胺和 (+)-脱氧麻黄碱的交叉反应不明显的抗体，克服缺乏与已知的 MDMA 的免疫测定方法相关的特异性问题。“不明显”的意思是(对于 d-苯异丙胺和 (+)-脱氧麻黄碱任何一个)的交叉反应活性当相对于 MDMA 为 100% 时相比，少于大约 7.5%，优选低于大约 5%，较优选低于大约 1%，更优选低于大约 0.5%，最优选低于大约 0.25%。为了达到这样的特异性，本发明描述的半抗原通过在 MDMA 的 N 位上衍生 (derivatisation) 生成。

本发明优选的具体例子的进一步目的在于研制能够结合结构上的表位，MDMA 及其亚甲基二氧基类似物的完整的亚甲基二氧基环的抗体。

发明详述:

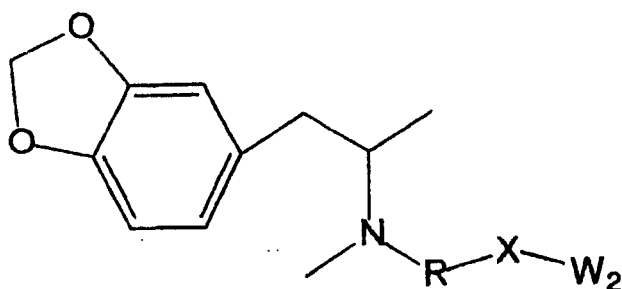
本发明描述了一种半抗原,其中与 MDMA 的 N 结合的氢原子被交联剂 (crosslinker) 置换 (换句话说, 衍生)。

第一方面, 本发明提供一种如下结构的免疫原:



其中, R 是二价连接基团和 X 是末端基团 (或 W_1 衔接物 (linker)), 且其中 W_1 是赋予抗原性的载体物质。优选地, 载体物质是蛋白质、蛋白质片段、合成的多肽或半合成的多肽。

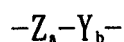
第二方面, 本发明提供一种如下结构的缀合物;



其中 R 是二价连接基团和 X 是末端基团 (或 W_2 衔接物), 且其中 W_2 是可检测的标记试剂。优选地, 标记试剂选自酶、发光物质、放射性物质或它们的混合物。更优选地, 标记试剂是酶, 优选过氧化物酶, 最优选辣根过氧化物酶 (HRP)。换句话说, 或者附加地, 发光物质可以是生物发光物质、化学发光物质或荧光物质。

在第一和第二方案中的交联剂是 $-R-X-$ 。

优选地, R 包含:



其中 Z 是取代的或未取代的、直链或支链的、饱和或不饱和的亚烷基部分 (moiety) 或取代或未取代的亚芳基, 优选亚苯基部分; Y 是取代或未取代的、直链或支链的、饱和或不饱和的亚烷基部分; a 是 0 或 1 且 b 是 0 或

1, 条件是 a 和 b 不能同时为 0。换句话说, Z 和 Y 中的一个或者 Z 和 Y 一起必须出现在 R 中。更优选地, b 是 0, a 是 1, 和 Z 是 C₁₋₆ 取代或未取代的、直链或支链的、饱和或不饱和的亚烷基部分。

最优选地, Z 是 C₃₋₄ 未取代的、直链、饱和的亚烷基部分。

有利地, X 在与 W₁ 或 W₂ 反应前选自羧酸或其酯、胺、马来酰亚胺、卤代羧酸或其酯、硫代羧酸或其酯、醛、吡啶基二硫代或乙烯基砷部分。

更有利地, X 在与 W₁ 或 W₂ 反应前选自羧酸(-COOH)、胺(-NH₂)和硫代羧酸酯(-S-CO-CH₃)。

另一方面, 本发明涉及对于本发明第一方面的免疫原产生的抗体, 这些抗体能够至少与一个 MDMA 结构上的表位结合, 优选与完整的亚甲基二氧基环结构表位相结合。抗体具有对 MDMA 和其它亚甲基二氧基类似物的特异性。抗体对于结构上相关的苯异丙胺和脱氧麻黄碱的交叉反应活性应低于 10%, 优选低于 5%。更优选低于 1%, 最优选低于 0.5%。优选地, 将抗体固定在支撑底物上。优选地, 抗体是多克隆的。或者, 抗体是单克隆的。

本发明进一步提供一种制备抗体的方法, 该方法包含通过重复给予根据本发明的第一方面的免疫原免疫动物, 优选脊椎动物, 最优选哺乳动物, 和收集从免疫动物得到的血清的步骤。优选地, 该方法进一步包括将所述血清抗体固定到支撑底物上, 优选固体支持物, 最优选聚苯乙烯固体支持物。按照这一方法制备的抗体是多克隆的。

更另一方面, 本发明包括在试样中检测或测定 MDMA 及其亚甲基二氧基类似物的方法, 该方法包括用本发明的缀合物或其混合物和本发明的抗体或其混合物接触试样; 检测或测定结合的缀合物的数量; 并且从标准曲线推断试样中 MDMA 及其亚甲基二氧基类似物的存在或数量。

另一方面, 本发明包括检测或测定 MDMA 及其亚甲基二氧基类似物的试剂盒, 该试剂盒包括用本发明的缀合物或其混合物和本发明的抗体或其混合物。该试剂盒可以任意地包括应用所述缀合物和所述抗体在试样中检测或测定 MDMA 及其亚甲基二氧基类似物的指导。

优选地, 试样是溶液, 如生物流体。更优选地, 试样是血清或尿。最优选地, 试样是来自人类患者的溶液。

本发明的方法和试剂盒中, 首选各自不同的交联剂(免疫原的和缀合物的)。

另一方面，本发明包括使用本发明的缀合物或其混合物和本发明的抗体或其混合物在试验试样如生物流体中检测或测定 MDMA 及其亚甲基二氧基类似物。

半抗原的制备

半抗原衍生物 N-(3'-羧基丙基)MDMA(化合物 7)，N-(4'-氨基丁基)MDMA(化合物 9)和 N-(3-乙酰基硫代丙基)MDMA(化合物 10)按照图-1 的概要制备。首先从 3,4-(亚甲基二氧基)苯乙酸(化合物 4)用两步制备 3,4-亚甲基二氧基脱氧麻黄碱(化合物 1)：将化合物 4 与乙酸酐/吡啶反应，接下去在乙醇中回流用浓盐酸水解反应中间体得到 3,4-(亚甲基二氧基)苯基丙酮(化合物 5)。在三乙基胺和氰基硼氢钠的存在下，将化合物 5 与盐酸甲胺在甲醇中反应得到较高收率的 MDMA(化合物 1)。半抗原 7、9 和 10 从化合物 1 依下各项获得：

半抗原 7

在催化剂碘化钾的存在下，将化合物 1 与乙基-4-溴丁酸酯(bromobutyrate)在乙腈中回流反应得到化合物 6 的酯。通过在四氢呋喃(THF)/水中用氢氧化钾皂化化合物 6 后得到半抗原 7，N-(3'-羧基丙基)MDMA。

半抗原 9

将化合物 1 与(N-(4-溴丁基)邻苯二甲酰亚胺在乙醇中回流反应，接下去通过在甲醇中用水合肼回流水解邻苯二甲酰亚胺基得到半抗原 N-(4'-氨基丁基)MDMA(化合物 9)。

半抗原 10

通过 MDMA(化合物 1)与碘代丙基硫代乙酸乙酯(iodopropylthioacetate)在乙醇中回流反应制备得到半抗原 10 [N-(3'-乙酰基硫代丙基)MDMA]。

免疫原和缀合物的制备

虽然 MDMA 半抗原提供确定的结构上的表位(完整的亚甲基二氧基环)，但是它们不能自身致免疫，且因此需要结合到载体物质上，当注射入宿主动物体内时就会引起免疫应答。合适的载体物质包括蛋白质，如白蛋白、

血清蛋白，例如球蛋白、接目镜蛋白和脂蛋白。说明性的蛋白质载体包括牛血清白蛋白、卵清蛋白、牛 γ -球蛋白、甲状腺素结合球蛋白、匙孔血蓝蛋白(KLH)等等。或者，可以应用具有足够数目有用的氨基如赖氨酸的合成的聚(氨基酸)、其它合成或天然的带有反应官能基的聚合物材料。特别是能够结合到半抗原产生免疫原的碳水化合物、酵母或多糖。

每个半抗原也能够共价连接标记试剂，如酶(例如，辣根过氧化物酶)，具有荧光性质的物质或放射性标记以产生缀合物(或检测试剂)用于免疫检测。荧光物质可以是，例如一价的荧光素残基或其衍生物。

为了确认载体物质上结合有适当的半抗原，在免疫前，使用矩阵辅助紫外激光解析/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)对每个免疫原进行评估。对于优选的载体物质即牛血清白蛋白而言，优选每摩尔载体最少6摩尔半抗原。

用半抗原制备缀合物和免疫原时，如果其中存在巯基，例如半抗原10，马来酰亚胺、卤素、吡啶基二硫代(pyridyldithio)或乙烯基砒必须首先各自引入标记试剂或载体物质，使用异双官能交联剂(heterobifunctional linkers)如(但不限制于)N-(γ -马来酰亚胺丁酰氧基)琥珀酰亚胺酯(GMBS)；琥珀酰亚胺基(succinimidyl)4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)；(间-马来酰亚胺苯甲酰基(maleimidobenzoyl))-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(propionate)(SPDP)；乙烯基砒(vinylsulphone)(美国Pierce化学公司)。这样修饰的标记试剂或载体物质随后能够通过半抗原，例如半抗原10中存在的巯基缀合(conjugate)。对于没有巯基的半抗原，例如半抗原7和9，使用没有事先修饰的标记试剂或载体物质进行缀合，适当的使用缀合的标准方法，如1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(carbodiimide)(EDC)或混合的酸酐。特别地，通过EDC使半抗原7与例如HRP缀合，通过偏高碘酸钠与半抗原9缀合，随后用氰基硼氢钠还原Schiff碱。

抗血清的制备

为了产生多克隆抗血清，将免疫原与Freund佐剂混合，并且将混合物

注射入宿主动物体内，如兔、羊、鼠、天竺鼠或马。进一步注射(加强)并取血清试样评价抗体滴度。但达到最佳滴度时，随后将宿主动物放血得到适当体积的特异性的抗血清。要求的抗体纯化水平视计划的应用而定。对于许多目的，根本不需要纯化，但是，在其它情况下，例如抗体固定在固体载体上，纯化步骤能够除去不想要的物质和除去非特异性的结合。

本发明特异性抗体作为试剂在免疫试验中用于测定或检测生物流体中的 MDMA 及其亚甲基二氧基类似物的试剂是有用的。

MALDI-TOF 分析免疫原的一般方法

使用 Voyager STR 生物分光度测量方法研究站激光解析质谱与延迟萃取(delayed extraction)结合进行 MALDI-TOF 质谱。将每个要分析的等分试样在 0.1% 的三氟乙酸(TFA)水溶液中稀释制成 1mg/ml 的试样溶液。使用芥子酸基质(matrix)和牛血清白蛋白(Fluka)作为外标分析等分试样(1 μ l)。附图 3 显示了 BSA 载体物质的分析结果。能够看到表示出的主信号显示了该试样平均质子质量 m/z 66,115。在 m/z 33,038 和 132,558 观察到的信号与观察到的主要组分的双电体(double charged form)和二聚体形式一致。进一步观察到的信号包括在 m/z 13,505 的。

除非另有说明，下面实施例中的百分比视为(体积/体积)百分比。

实施例

实施例 1 (3,4-亚甲基二氧基)苯基丙酮 5 的制备

将 3,4-亚甲基二氧基)苯乙酸(化合物 4) (15g, 0.0832mol) 溶于乙酸酐(73.5ml)和吡啶(33.75ml)中，并将混合物回流 16 小时。冷却后，在真空中(温度尽可能低)除去溶剂，残留物用无水乙醇(58.5ml)吸收，加入浓盐酸(5.63ml)，将混合物回流 2 小时。

加入水(150ml)并用二氯甲烷(3×150 ml)萃取。用硫酸钠干燥结合的有机萃取物，过滤并除去溶剂。残留物用柱色谱(硅胶，10%-20%乙酸乙酯的己烷溶液)纯化后得到 11.25g 橙色油状(3,4-亚甲基二氧基)苯基丙酮(化合物 5) (收率 77%)。

FT-IR(薄膜，纯的): 1711.67 cm^{-1} (图 5)

实施例 2 制备 3,4-亚甲基二氧基脱氧麻黄碱 (MDMA) 1

将化合物 5 (4g, 0.022mol) 溶于甲醇 (100ml) 中, 并向搅拌的该溶液中加入盐酸甲胺 (15.16g, 0.22mol) 和三乙胺 (6.76ml, 0.049mol)。将含有氰基硼氢钠 (1.41g, 0.022mol) 的甲醇 (10ml) 全部加入, 并将反应混合物在室温搅拌过夜。

在真空中除去溶剂, 加入水 (50ml) 后加入 1N HCl (50ml), 将混合物用二乙醚 (100ml) 洗涤。水相用 2N NaOH 碱化至 pH12-13, 并用乙酸乙酯 (3 × 100ml) 萃取。用硫酸钠干燥结合的有机萃取物, 过滤, 除去溶剂, 得到较高收率的棕色油状粗品 MDMA (化合物 1) 的游离碱 (free base)。

得到的粗产物不经过进一步纯化可直接应用。

FT-IR (薄膜, 纯的 (neat)): 3172, 2779.3, 2715.4, 1246.7 和 1037.9 cm^{-1} (图 6)

实施例 3 制备 [乙基 N-(3'-羧基丙基)]-3,4-亚甲基二氧基脱氧麻黄碱 6

将粗品化合物 1 (2.4g) 转入无水乙腈中。加入乙基 4-溴代丁酸酯 (2.426g, 0.12mol) 后加入碘化钾 (200mg), 并且将得到的混合物回流 4-5 小时。冷却后, 将溶液过滤, 并在真空中除去溶剂。

通过硅胶 (5% 甲醇的氯仿溶液) 色谱进行粗产物的纯化, 得到 1.356g 淡橙色油状的酯 6。

FT-IR (薄膜, 纯的): 2645.15, 1728.45, 1490.6, 1253.0 和 1036.7 cm^{-1} (图 7)

实施例 4 制备 N-(3'-羧基丙基)-3,4-亚甲基二氧基脱氧麻黄碱-半抗原 7

将酯 6 (1.356g) 转入四氢呋喃 (10ml) 和水 (10ml) 中, 加入氢氧化钾 (0.371g) 并将混合物在室温下搅拌直到 TLC (5% 甲醇 (MeOH) / 氯仿) 指示反应完成。

通过加入 1N HCl 中和混合物并在真空中还原干燥。残留物用乙醇 (20ml) 处理, 并将不溶的有机物质滤除。在真空中除去溶剂, 将残留物在乙腈中

重结晶得到 0.529g 白色泡沫状的半抗原 7。

FT-IR(薄膜, 纯的): 3405.63, 1574.53(br), 1253.22 和 1039.2 cm^{-1} (图 8)

m. p(乙腈): 37-40 $^{\circ}\text{C}$

实施例 5 制备 N-(4'-丁基苯二酰亚氨基)-3,4-亚甲基二氧基脱氧麻黄碱 8

将粗品 MDMA 1 (2.35g) 转入无水乙醇(20ml)中, 加入 N-(4-(溴代丁基)邻苯二甲酰亚胺(3.14g, 0.0128ml)并将得到的混合物回流 4-5 小时。在室温下冷却后, 将溶液在真空中除去溶剂, 将残留物用 10%的甲醇氯仿溶液进行硅胶色谱分析, 得到 2.013g 浅棕色油状的化合物 8。

FT-IR(薄膜, 纯的): 2633.0, 1709.2, 1398, 1252 和 1039.1 cm^{-1} (图 9)

实施例 6 制备 N-(4'-氨基丁基)-3,4-亚甲基二氧基脱氧麻黄碱二盐酸盐——半抗原 9

将实施例 5 制备的化合物 8 (2.013g, 0.005mol) 转入无水甲醇(50ml)中并加入水合肼(0.246g)。将混合物回流 2 小时, 之后再加入 0.138g 水合肼, 并继续回流 2 小时。随后在室温下冷却反应混合物, 并在真空中除去溶剂留下棕色油状物。

将油状物转入最少量的水中, 并且用大约 10ml 的 1N HCl (pH4-5) 处理。滤除沉淀, 将滤液用 6N NaOH 碱化至 pH12-13, 并用二氯甲烷(4 × 50ml)萃取。将结合的有机萃取物用硫酸钠干燥, 过滤并除去溶剂, 得到灰棕色油状的游离碱。

将油状物用 2N 氯化氢二乙醚溶液(20ml)处理并搅拌 1-2 小时。收集沉淀, 用冷的二乙醚洗涤沉淀并干燥得到 0.877g 灰白色固体的 N-(4'-氨基丁基)MDMA 盐酸盐(半抗原 9)。

FT-IR(薄膜, 纯的): 3377.66, 2792.44, 1489.3 和 1038.97 cm^{-1} (图 10)

m. p: 232-234 $^{\circ}\text{C}$

实施例 7 制备 N-(3'-乙酰基硫代丙基)-3,4-亚甲基二氧基脱氧麻黄

碱——半抗原 10

将粗品 MDMA 1 (2.98g, 0.0154mol) 转入无水乙醇 (50ml) 中, 加入碘丙基硫代乙酸酯 (5.65g, 0.023ml) 并将得到的混合物回流 16 小时。在室温下冷却后, 将溶液在真空中除去乙醇。用色谱 (硅胶, 10% 的甲醇氯仿溶液) 纯化得到深色粗品混合物, 得到 2.2g 明黄色油状的 N-(乙酰基硫代丙基)MDMA (半抗原 10)。

FT-IR (薄膜, 纯的): 2931.1, 2675.7, 1689.2, 1038.7 和 735.8 cm^{-1} (图 11)

实施例 8 半抗原 7 与 BSA 的缀合: 免疫原 7

向半抗原 7 (100mg, 0.36mmol) 在 1ml 的无水 DMF 中形成的溶液中加入 N-羟基琥珀酰亚胺 (49.7mg, 0.43mmol) 和 N,N-二环己基碳二酰亚胺 (N,N-dicyclohexylcarbodiimide) (88.9mg, 0.43mmol), 并将混合物在室温下搅拌过夜。将形成的白色尿素沉淀物滤除, 并将滤液滴加到 BSA (200mg) 在 10ml 0.05M 磷酸盐缓冲液 (pH8.5) 中。然后将混合物在室温下搅拌过夜。将溶液用蒸馏水透析 20 小时 (更换 3 次) 并冷冻干燥。

通过 MALDI-TOF (参见附图 4), 在免疫原 7 中出现的主要信号显示了平均质子质量 m/z 68, 118。在 m/z 34, 006 和 136, 475 观察到的信号分别与主要观察组分的双电体和二聚体形式一致。这些数据暗示了每摩尔 BSA 有平均 7.2 摩尔的半抗原缀合 (conjugate)。

实施例 9 半抗原 7 与 HRP 的缀合

将 10mg EDC 盐酸盐溶于 800 μl 水中, 并立即将其加入到 2mg 半抗原 7 在 200 μl DMF 中形成的溶液中。混合后, 将该溶液加入到 HRP (20mg) 在 1ml 水中形成的溶液中。立即加入 N-巯基-琥珀酰亚胺 (5mg) 并将反应混合物在室温下搅拌过夜培养。通过用磷酸盐缓冲盐水 (pH7.2, PBS) 预平衡的串联的 2 PD-10 柱 (Pharmacia Biotech) 脱盐除去过量的衍生物。然后将半抗原-HRP 缀合物用 10L PBS 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 透析过夜。

实施例 10 半抗原 9 与 HRP 的缀合

将 1ml 21mg/ml 的高碘酸钠溶液缓慢加入到 HRP (20mg) 在 1ml 水中形成

的溶液中。将所得到的溶液在室温下在暗处搅拌 20 分钟，用 1mM 醋酸盐缓冲液 (pH4.5) 在 4℃ 在暗处透析过夜。半抗原 9 (2mg) 溶于 200 μ l DMF 的溶液缓慢加入到活性酶中，并将反应混合物在暗处室温下搅拌 2 小时培养。通过用磷酸盐缓冲盐水 (pH7.2, PBS) 预平衡的串联的 2 PD-10 柱 (Pharmacia Biotech) 脱盐除去过量的衍生物。然后将半抗原-HRP 缀合物用 10L PBS 在 4℃ 在暗处透析过夜。

实施例 11 HRP-溴代乙酰基甘氨酸的制备

将 N-琥珀酰亚氨基溴代乙酰基甘氨酸 (0.375mg, 0.13mmol) 的 DMF (5ml) 溶液滴加到在避光冷却到 0℃ 条件下的 HRP (1g) 在 0.1M 硼酸盐缓冲液 (pH8.5, 45ml) 中。在加入过程中，pH 维持在 8。完全加入之后，溶液的 pH 稳定在 8 并且将溶液在暗处在 0℃ 搅拌 1 小时。将溶液中和至 pH7 并且在 4℃ 用蒸馏水和 PBS (pH7.2) 各一次透析过夜。

实施例 12 半抗原 10 与溴代乙酰基甘氨酸修饰的 HRP 的缀合

将 10mg 半抗原 10 溶于 0.5ml 0.12M 碳酸钾 (80% 甲醇/20% 水) 溶液中。将得到的溶液在暗处，在室温下放置 10 分钟。1ml 50mM 的磷酸缓冲液 (pH7) 加入到溶液中来停止反应，并通过加入 0.1M HCl 将 pH 调节到 7.0-7.5。将 300 μ l 该溶液滴加到溴代乙酰基甘氨酸修饰的 HRP (20mg 在 1ml 水中) 溶液中，并将混合物在暗处在 4℃ 搅拌过夜。将得到的半抗原-HRP 缀合物用两个 PD-10 柱 (Pharmacia Biotech) 纯化，用 PBS (pH7.2) 洗脱，并且用水在 4℃ 透析过夜。

实施例 13 对抗实施例 8 的免疫原 - 免疫原 7 产生的抗体的制备

将实施例 8 中制备的免疫原的水溶液用 Freund' s 完全佐剂 (FCA) 配制形成含有 2mg/ml 免疫原在 50% (v/v) FCA 中的乳剂。在每只动物的肋腹处的 4 个点各点皮下注射 0.25ml，将两只羊用该乳剂免疫。接下来免疫 (加强) 含有 1mg/ml 免疫原在 50% (v/v) Freund' s Incomplete 佐剂 (FIA) 中乳化的并且以相同的方式在一年中每隔一个月给药一次，在每次加强后 7-14 天产生的血样，每个血样经加工处理产生抗血清，并且通过辛酸和硫酸铵进一步纯化析出得到免疫球蛋白 G (IgG) 部分。IgG 部分通过如下说明的竞争

的微量滴定板分析法评价。

实施例 14 MDMA 与 ELISAs 竞争结果

用相对免疫原 7 (实施例 8) 产生的抗血清的 IgG 片段包覆增强结合的 96 孔聚苯乙烯微量滴定板的各孔, 在 10mM Tris, pH8.5 (125 μ l/孔) 中稀释。使用标准的 ELISA chequerboard 技术测定适当抗体包覆的稀释液。将板在 37 $^{\circ}$ C 培养 2 小时, 用含有 Tween 20 (TBST) 的 Tris 缓冲盐水洗涤 4 次并轻击干燥 (tap dry)。在 TBST 中制备 0、1、10、50、100、250、500 和 1000mg/ml 的 MDMA 标准溶液, 并将 25 μ l 各个溶液加到适当的孔中 (图 2)。将缀合物 (检测试剂)-半抗原 7-HRP (实施例 9) 和半抗原 10-HRP (实施例 12) 在 pH7.2, 含有 EDTA、D-甘露糖醇、蔗糖、硫汞撒和 BSA 的 Tris 缓冲液中稀释, 通过标准的 ELISACHEQUERBOARD 技术测定稀释液, 并且将 100 μ l 各个溶液加到适当的孔中 (图 2)。将板在 37 $^{\circ}$ C 培养 2 小时。过量的未结合的缀合物通过用 TBST 洗涤 6 次共 10 分钟除去。

将 125 μ l 四甲基联苯胺 (TMB) 底物溶液加入到板上的每个孔中, 然后在室温下在暗处培养 15-20 分钟。通过在每个孔中加入 125 μ l 0.2M 的 H₂SO₄ 终止反应。然后使用微量滴定板读数器在 450nm 处测定吸光度。每次测定产生的数据在下面的表 1 中给出。

表 1: 使用免疫原 7 (实施例 8) 和缀合物 7 (半抗原 7-HRP) (实施例 9) 以及缀合物 10 (半抗原 10-HRP) (实施例 12) 产生的抗血清作为检测试剂, 应用竞争性微量滴定板测定 MDMA 产生的数据

标准浓度 ng/ml	缀合物 7		缀合物 10	
	A ₄₅₀	%B/B ₀	A ₄₅₀	%B/B ₀
0	2.470	100	2.37	100
1	2.060	83.4	2.041	86.1
10	1.432	58	1.405	59.3
50	0.857	34.7	0.815	34.4
100	0.642	26	0.671	28.3
250	0.393	15.9	0.465	19.6
500	0.269	10.9	0.341	14.4
1000	0.185	7.5	0.213	8.97

IC ₅₀	17	23.6
------------------	----	------

A_{450} =在 450nm 的吸光度

B=在 450nm xng/ml 标准浓度的吸光度

B_0 =在 450nm 0ng/ml 标准浓度的吸光度

IC_{50} =产生 50% B/ B_0 的标准浓度

实施例 15 MDMA 竞争 ELISAs 的交叉反应性

为了测定 MDMA 竞争性 ELISA 的特异性, 在 TBST 中制备 0、500、1000、5000、10000、25000、50000 和 100000ng/ml 的潜在的交叉反应物 MDEA、MDA、d-苯异丙胺、(+)-脱氧麻黄碱、(+)-麻黄碱、(-)-麻黄碱、(+)-假麻黄碱、(-)-假麻黄碱和 1-苯异丙胺的溶液。应用每一系列在 MDMA 竞争性 ELISA 中的标准液产生标准曲线, 并用这些标准曲线测定免疫原与这些药物的交叉反应性。该研究结果在表 2 中给出, 交叉反应性根据下式计算:

$$\%CR = IC_{50_{MDMA}} / IC_{50_{CR}} \times 100$$

其中%CR 是交叉反应性百分比, $IC_{50_{MDMA}}$ 是 MDMA 引起 50%的信号置换时的浓度以及 $IC_{50_{CR}}$ 是潜在交叉反应物的浓度, 其中%CR 用于评价引起 50%的信号置换。

从结果明显看出, MDMA 检测显示与 MDEA 的高水平交叉反应性, 与 MDA 的较低水平的交叉反应性以及 d-苯异丙胺和 (+)-脱氧麻黄碱的很低水平的交叉反应性。因此, MDMA 竞争性 ELISA 对 MDMA 及其它亚甲基二氧基类似物具有高度特异性。

表 2: MDMA 竞争性 ELISA 的交叉反应性

试验	反应物	免疫原 7 的抗血清 半抗原 7-HRP	
		IC_{50} (ng/ml)	%CR
1	MDMA	17	100
	MDA	300	5.7
	d-苯异丙胺	52199	0.03
	(+)-脱氧麻黄碱	11138	0.15
	(+)-麻黄碱	>100000	<0.017
	(-)-麻黄碱	>100000	<0.017
	(+)-假麻黄碱	>100000	<0.017
	(-)-假麻黄碱	>100000	<0.017
2	MDMA	30	100
	MDEA	15	200
	1-苯异丙胺	>30000	<0.1

制备半抗原7、9和10的化学反应

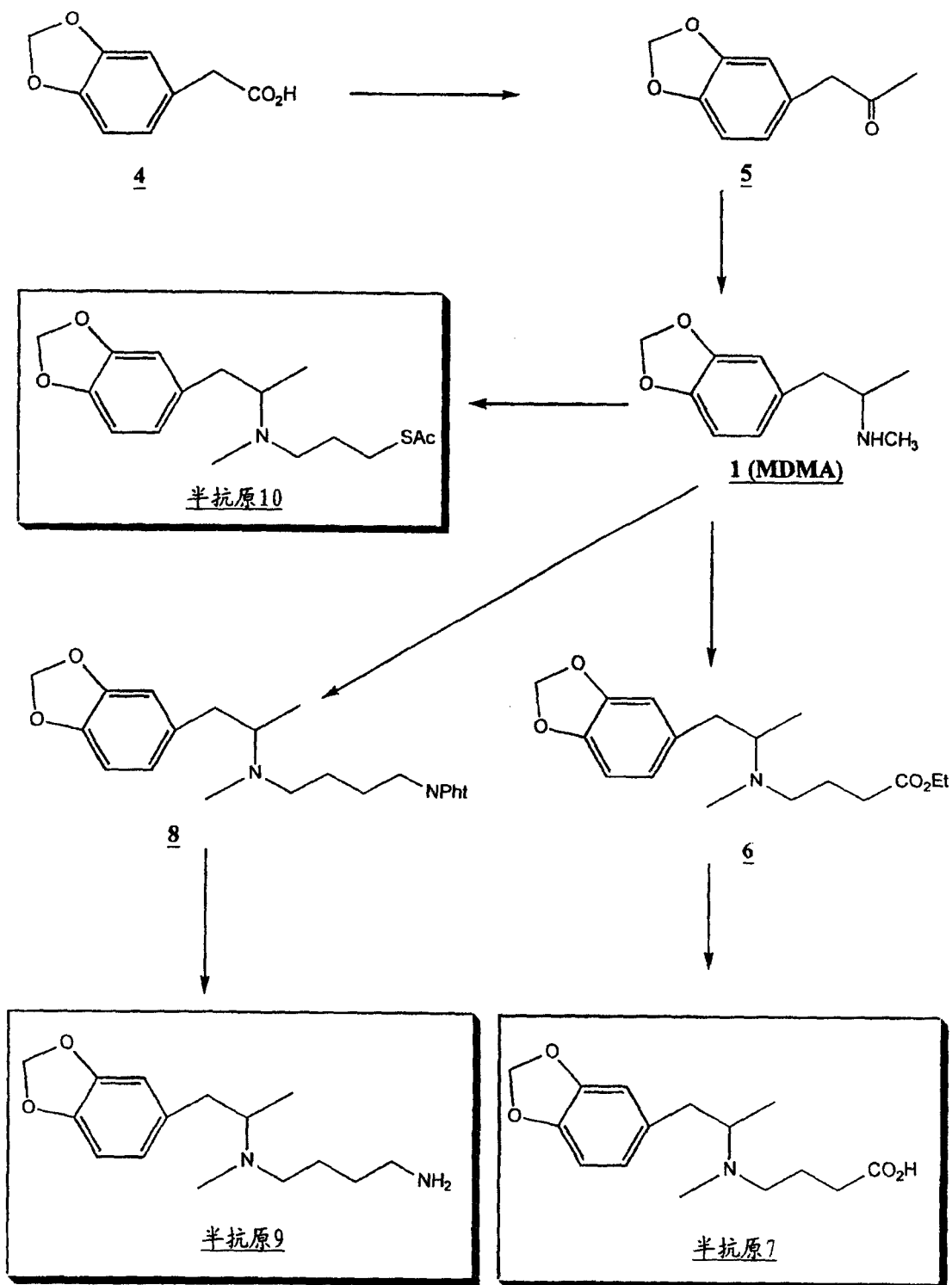


图1

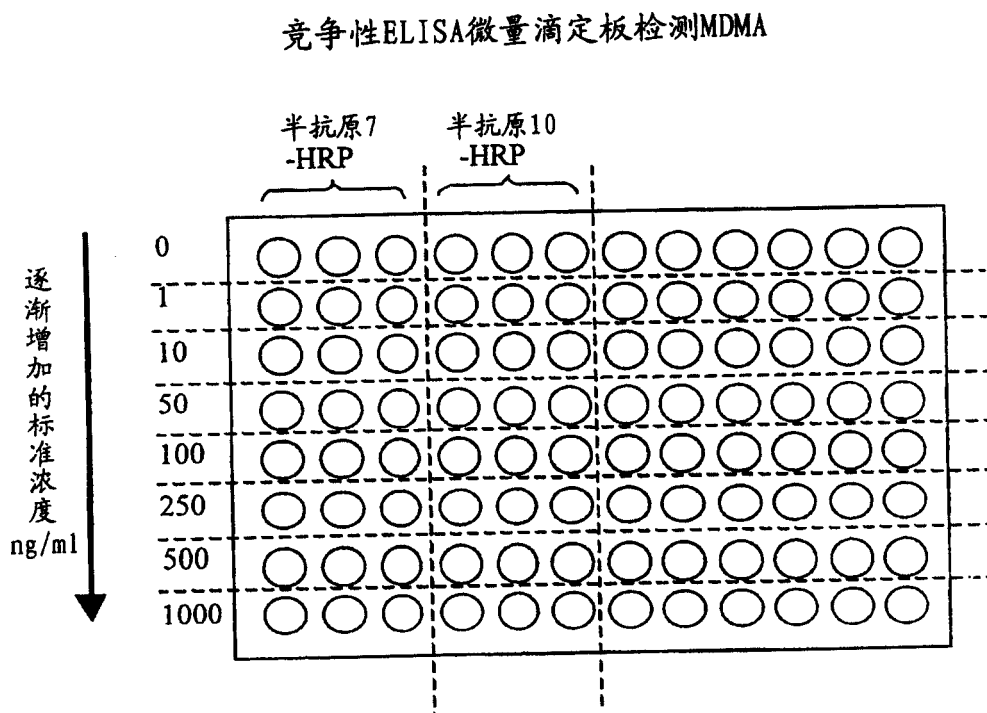
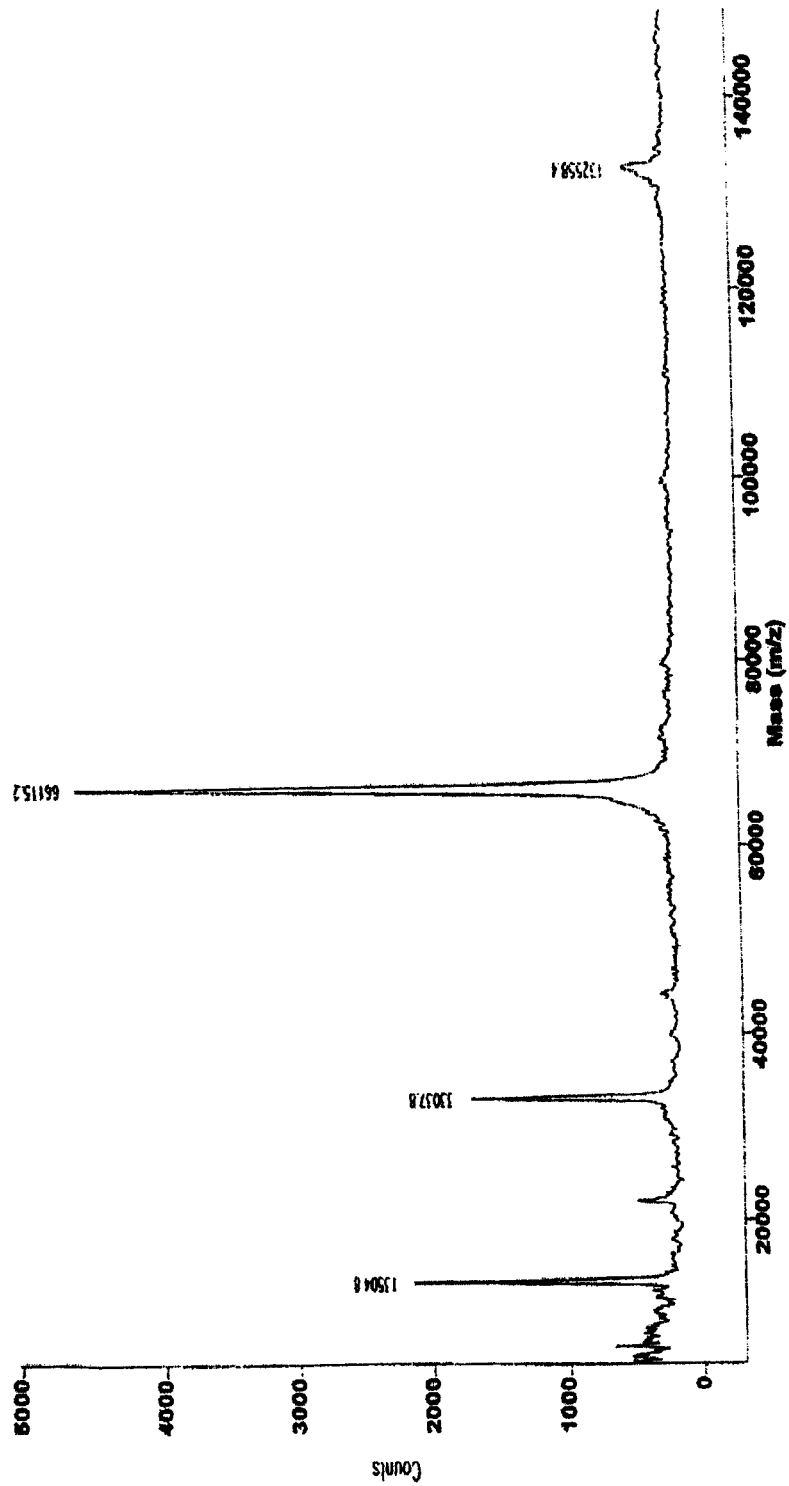
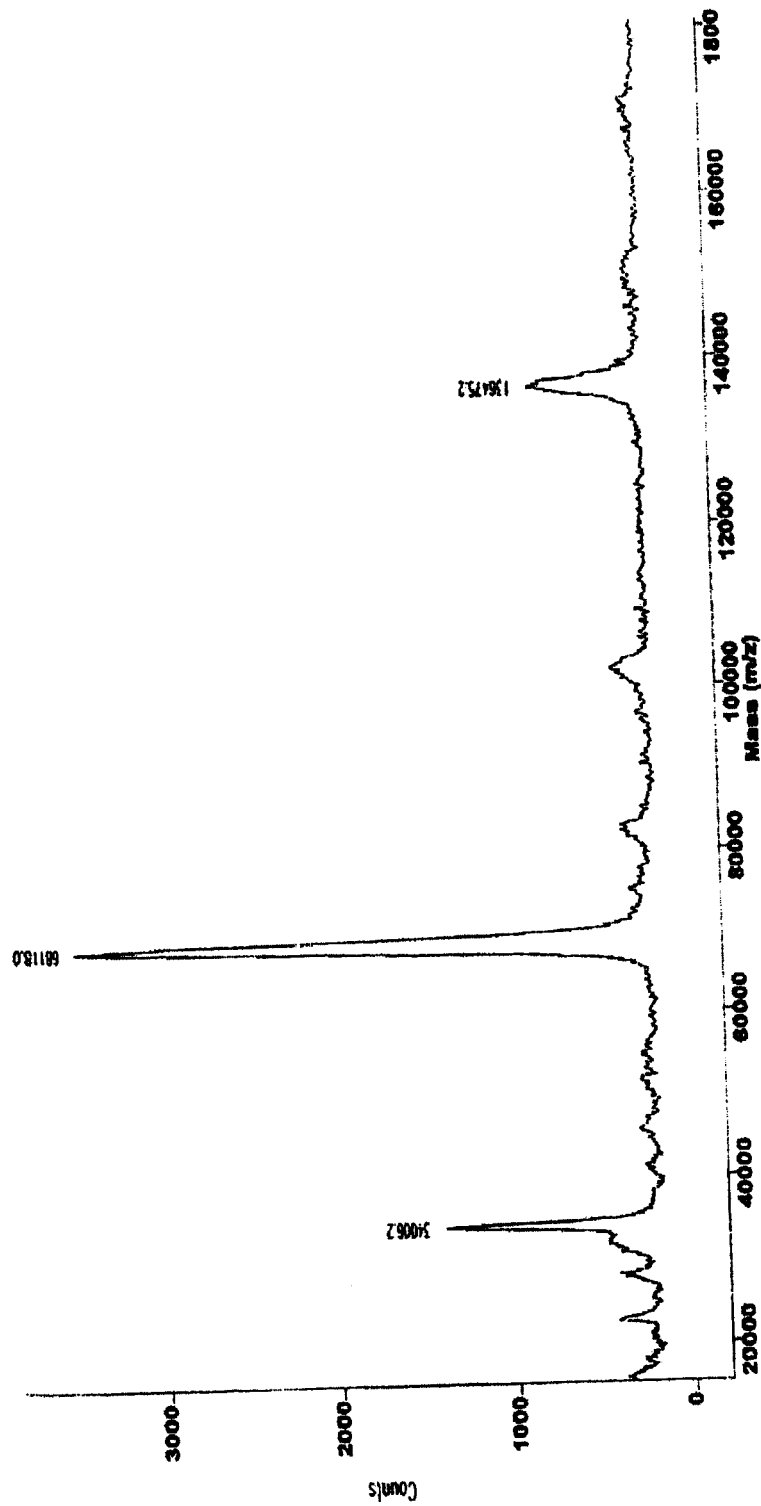


图 2



BSA载体物质

图 3



免疫原7

图 4

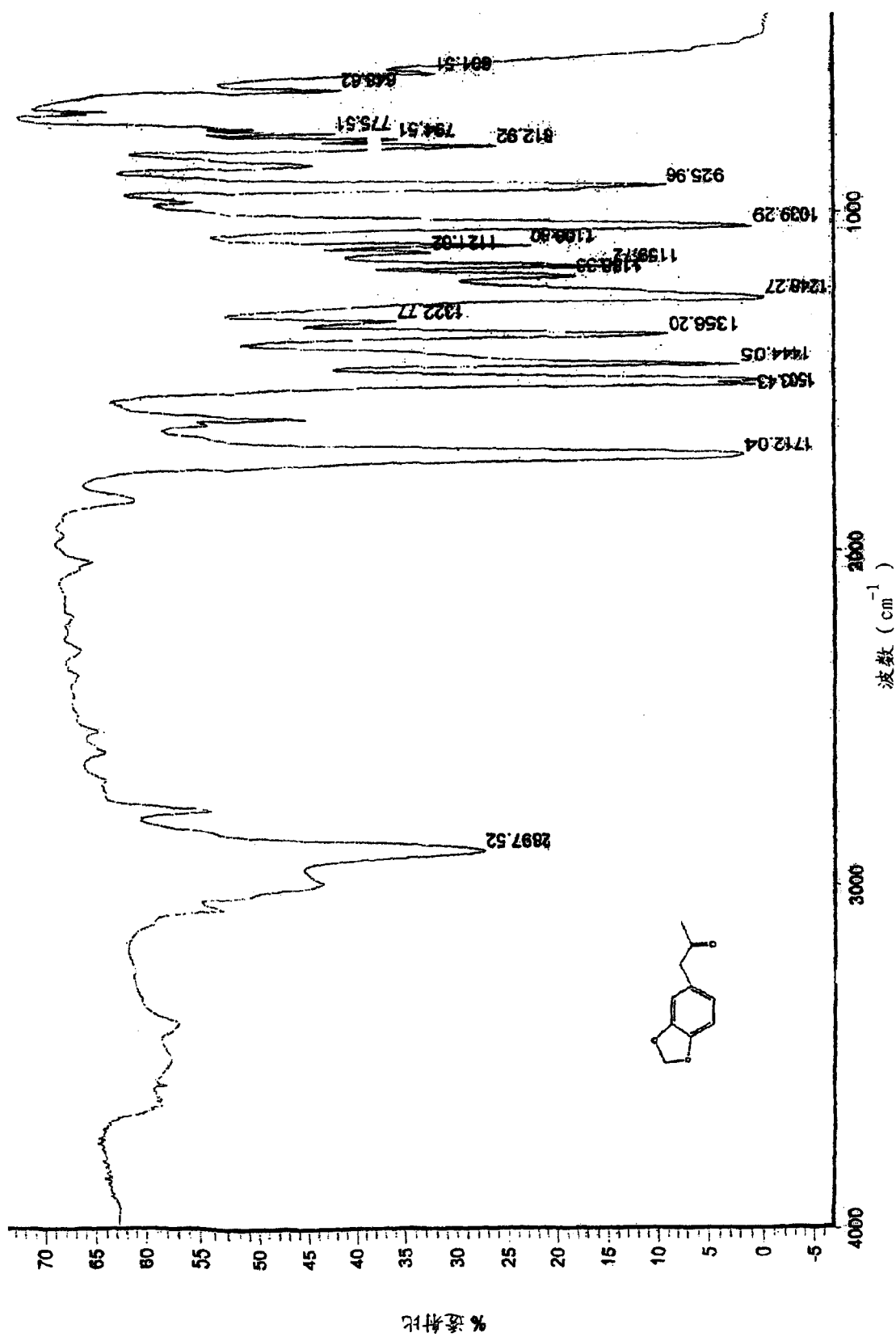


图 5

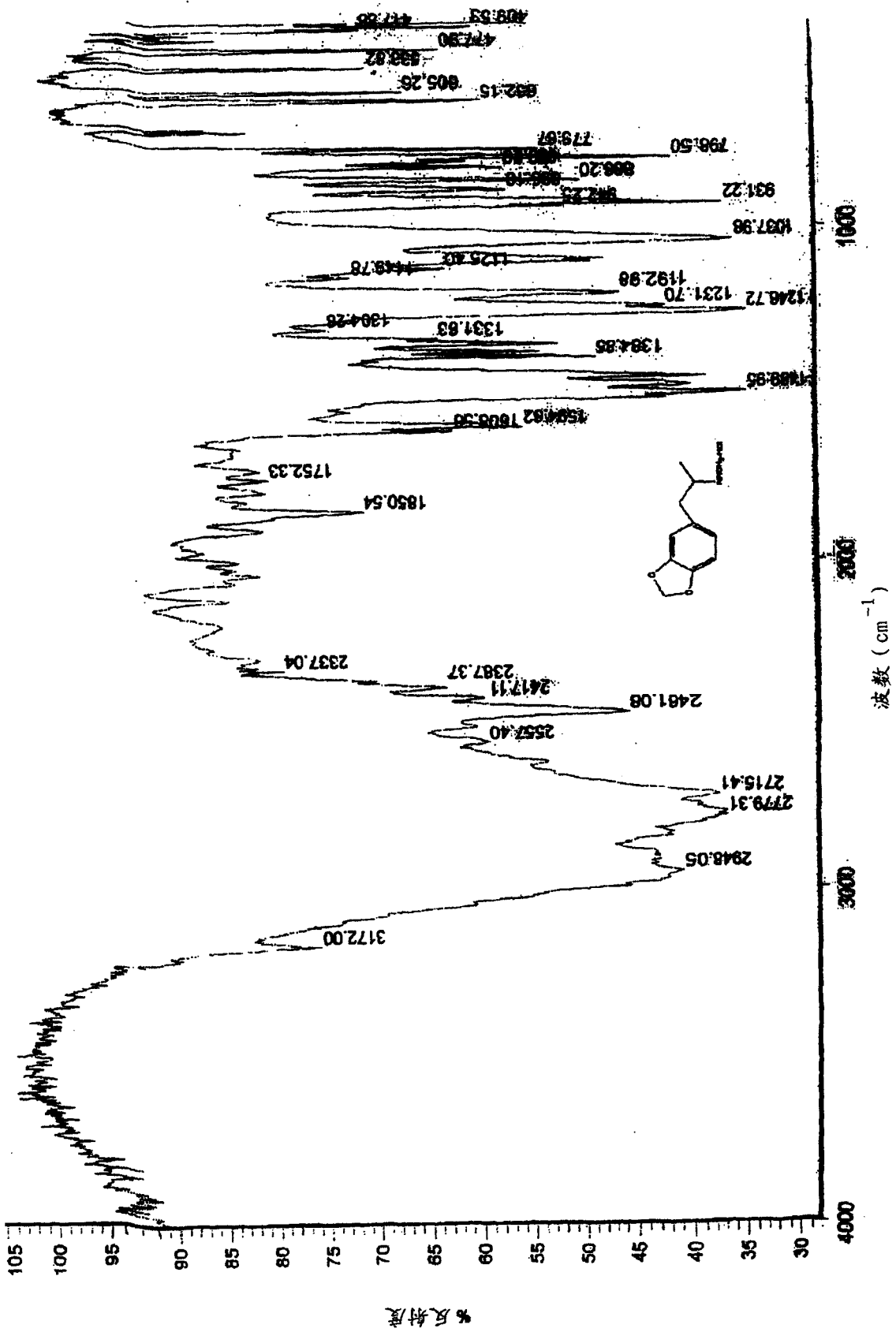


图 6

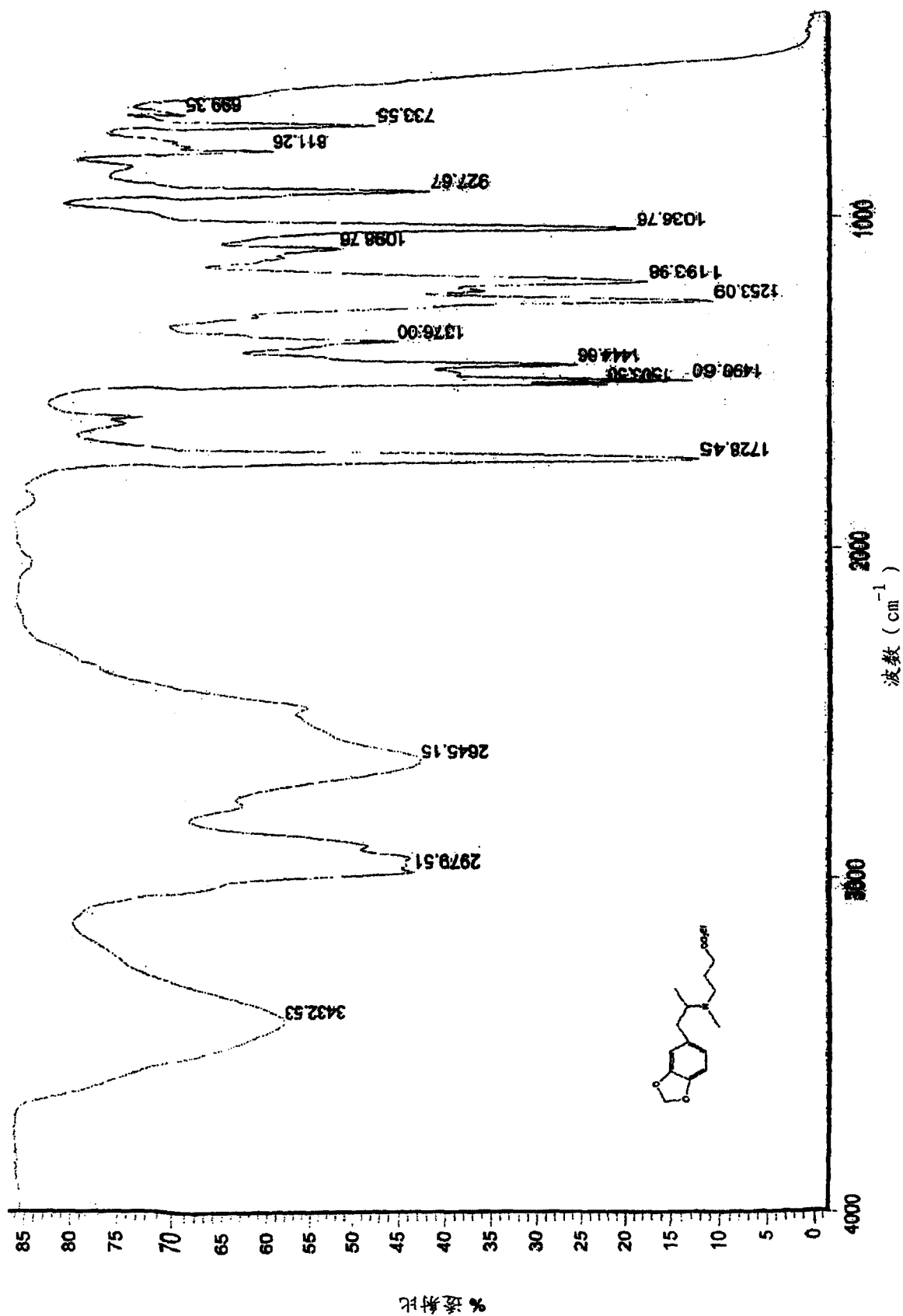


图 7

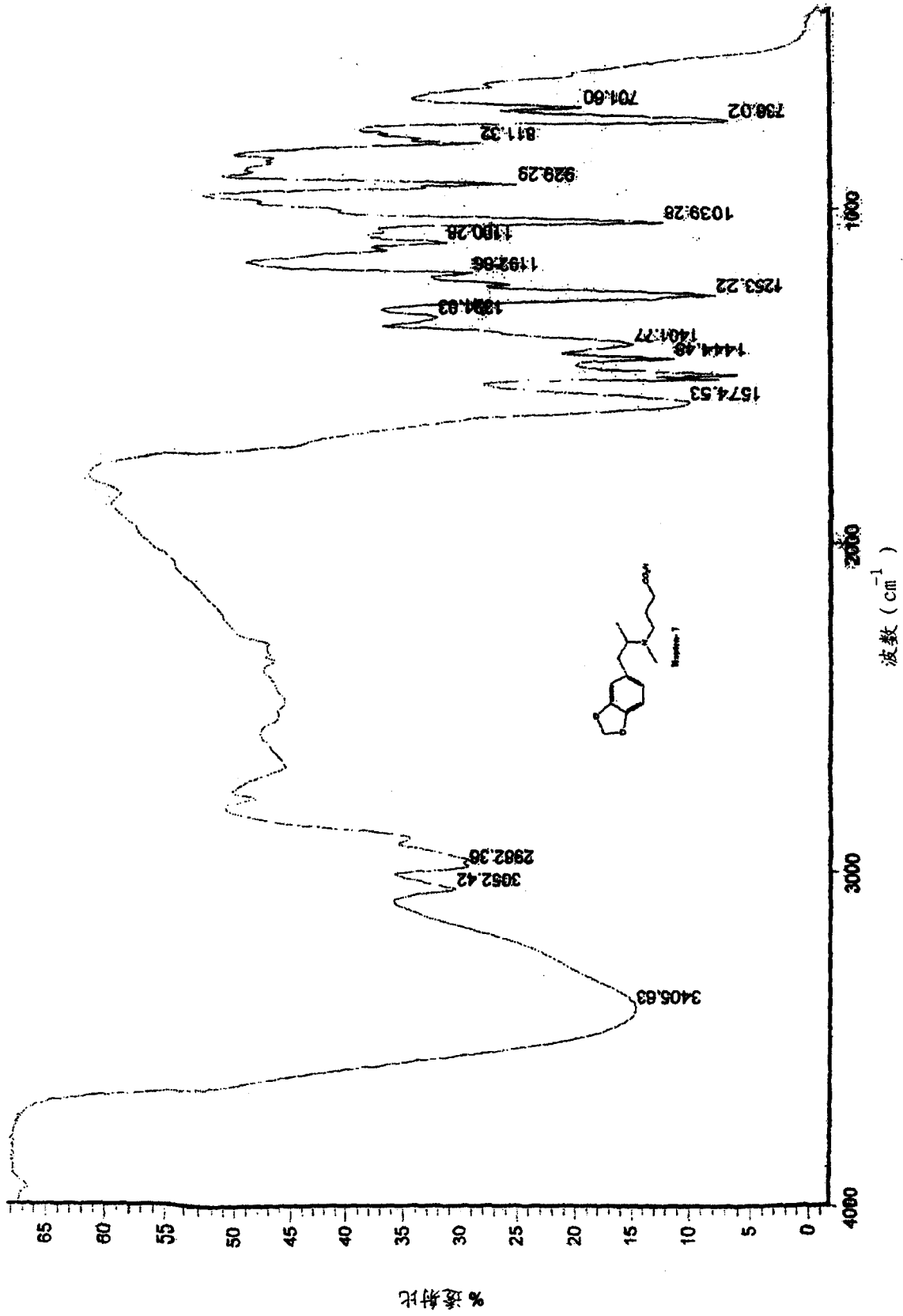


图 8

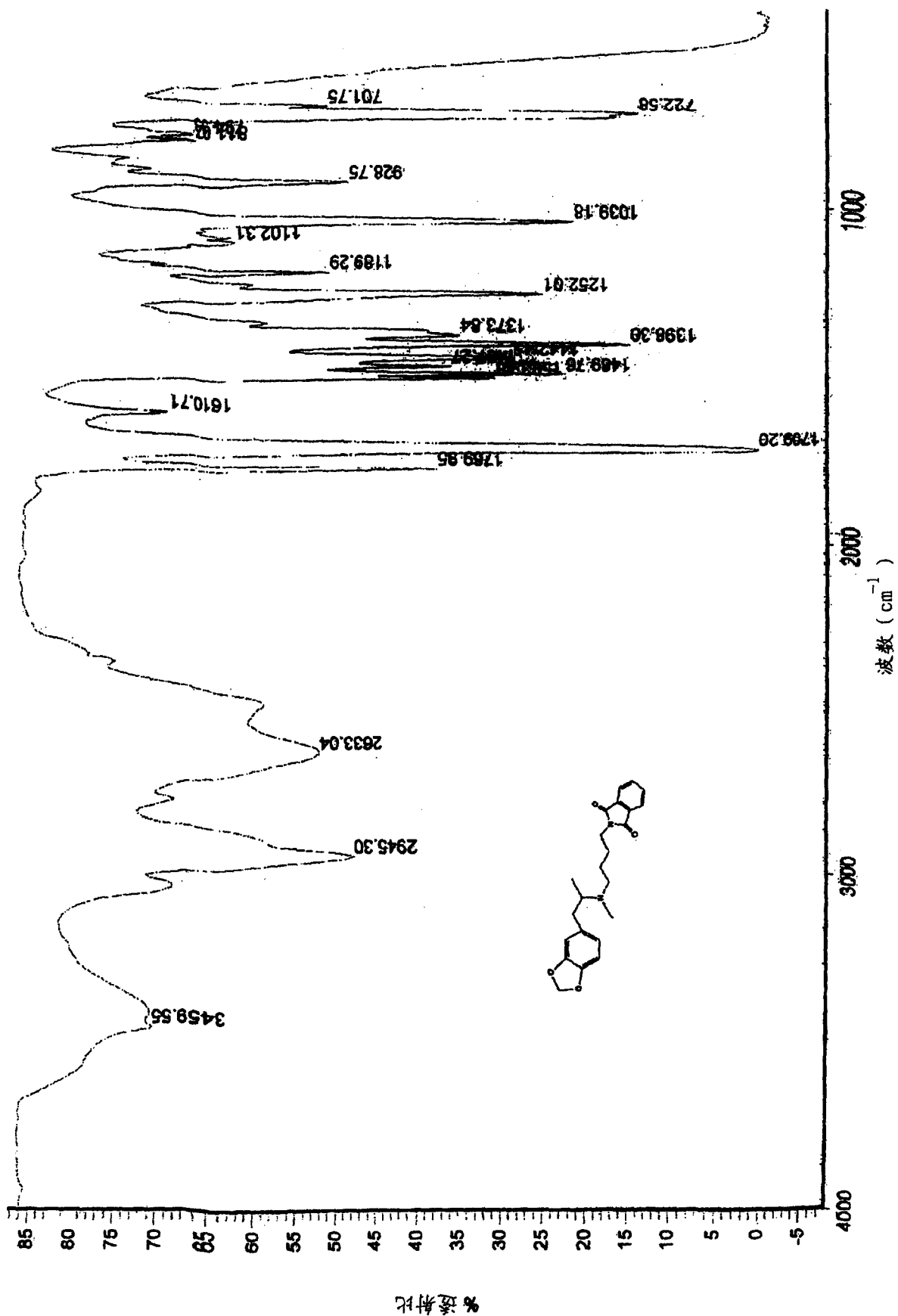


图 9

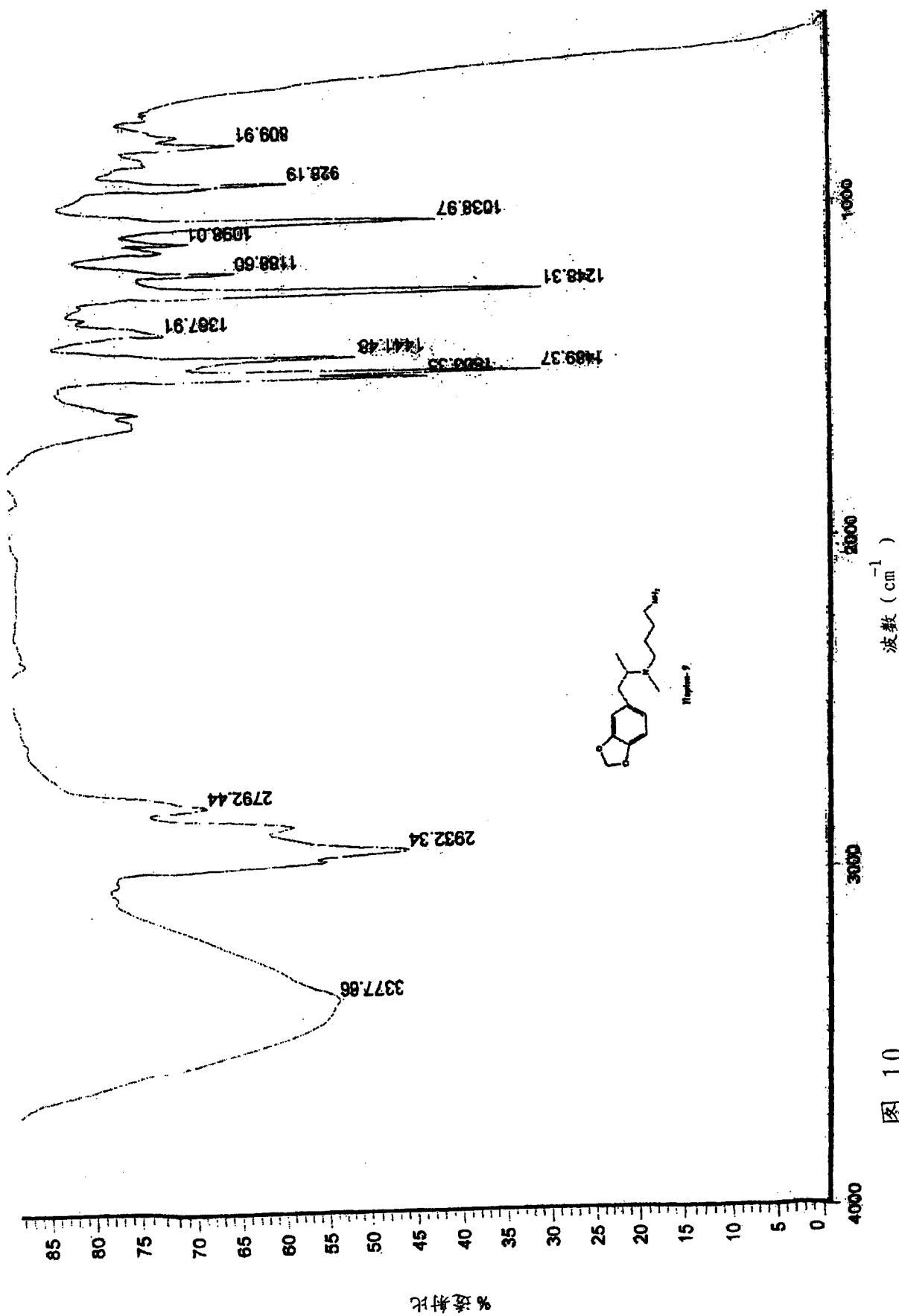
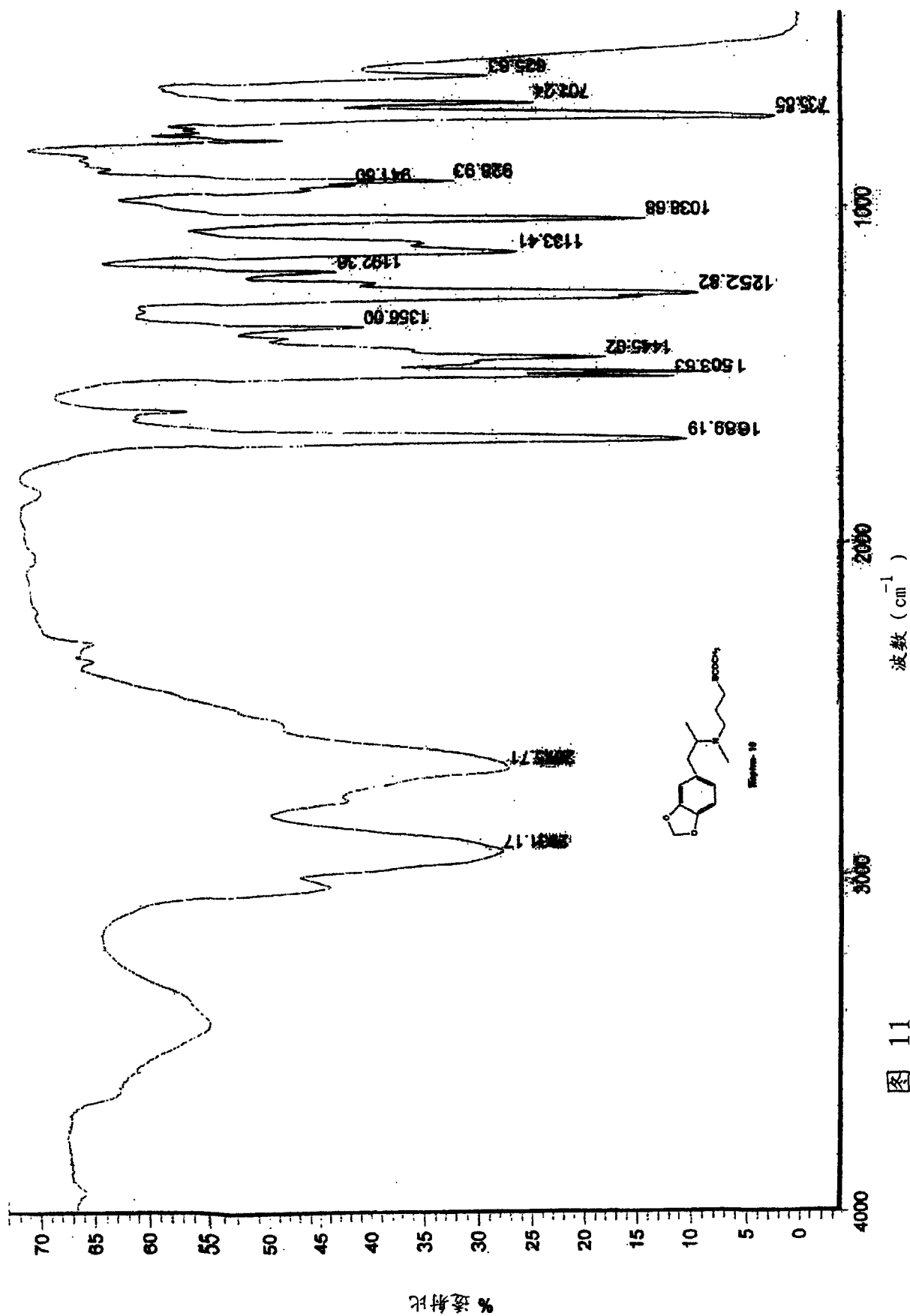


图 10



专利名称(译)	检测或测定3,4 - 亚甲基二氧基脱氧麻黄碱(MDMA)的方法和试剂盒		
公开(公告)号	CN1281626C	公开(公告)日	2006-10-25
申请号	CN02139960.3	申请日	2002-12-20
[标]发明人	罗伯特·麦康奈尔 伊尔·本齐克 斯蒂芬·菲茨杰拉德 约翰·拉蒙特		
发明人	罗伯特·麦康奈尔 伊尔·本齐克 斯蒂芬·菲茨杰拉德 约翰·拉蒙特		
IPC分类号	C07K17/02 C07K14/765 C07K16/44 C07D317/48 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/532 G01N33/58 G01N33/68 A61K47/00 A61P43/00 G01N33/94		
CPC分类号	C07K16/44 G01N33/946 Y10S435/81 Y10S435/975 Y10S436/815 Y10S530/807 Y10T436/13		
优先权	2001205058 2001-12-20 EP		
其他公开文献	CN1429844A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明描述一种在MDMA的N位置上用交联剂衍生的半抗原。本发明提供一种含有前述结合剂赋予抗原性载体物质上的半抗原，和含有前述的与可检测试剂共价结合的半抗原的缀合物。另外，本发明还涉及对抗前述免疫原产生抗体。最后，本发明涉及检测或测定生物流体中MDMA和N-烷基化的亚甲基二氧基苯异丙胺的方法和试剂盒。本发明的抗体不与苯异丙胺和脱氧麻黄碱发生明显的交叉反应。

