



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108047071 A

(43)申请公布日 2018.05.18

(21)申请号 201711287795.9

C07K 16/44(2006.01)

(22)申请日 2017.12.07

G01N 33/531(2006.01)

(71)申请人 杭州同舟生物技术有限公司

地址 310018 浙江省杭州市杭州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 徐建 王镇

(74)专利代理机构 北京超凡志成知识产权代理事务所(普通合伙) 11371

代理人 史晶晶

(51)Int.Cl.

C07C 229/14(2006.01)

C07C 227/18(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/47(2006.01)

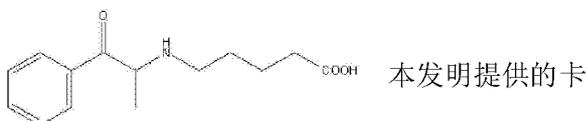
权利要求书3页 说明书13页 附图9页

(54)发明名称

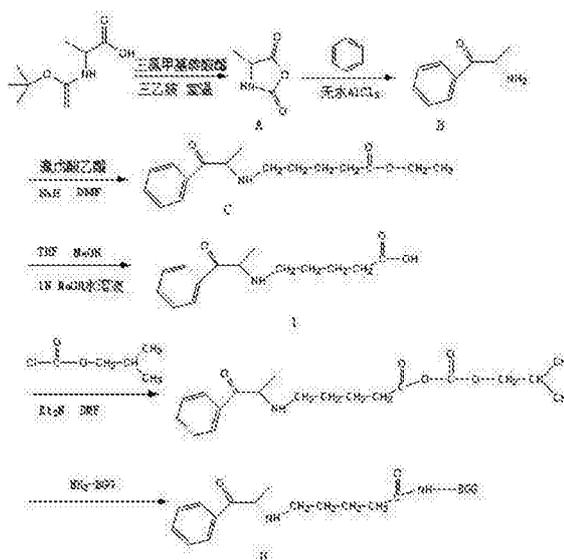
一种卡西酮人工半抗原、人工抗原及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明涉及卡西酮类人工抗原结构领域,具体而言,涉及一种卡西酮人工半抗原、人工抗原及其制备方法和应用。一种卡西酮人工半抗原,其特征在于,其分子结构式如下所示:

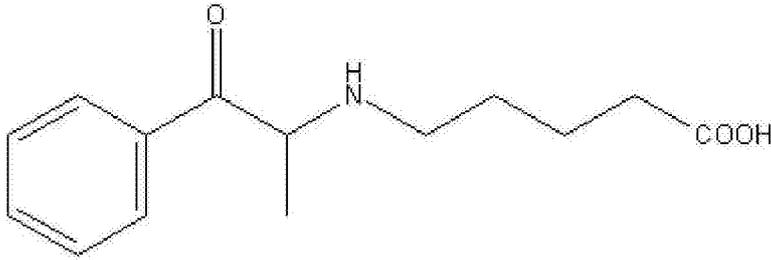


西酮人工半抗原,在卡西酮的N位上引入连接臂,在该修饰位点上引入连接臂能最大程度地保留卡西酮的特征结构,且具有可以与载体蛋白发生偶联的活性基团,可作为抗原决定簇。与采用环状连接臂相比,本发明所采用的连接臂为链状,可以尽可能的降低免疫时T细胞对连接臂识别度,这样免疫得到的抗体对卡西酮的特异性和亲合力更强。



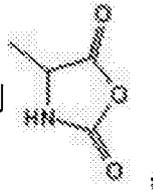
CN 108047071 A

1. 一种卡西酮人工半抗原,其特征在於,其分子结构式如下所示:



2. 权利要求1所述的卡西酮人工半抗原的制备方法,其特征在於,包括以下步骤:

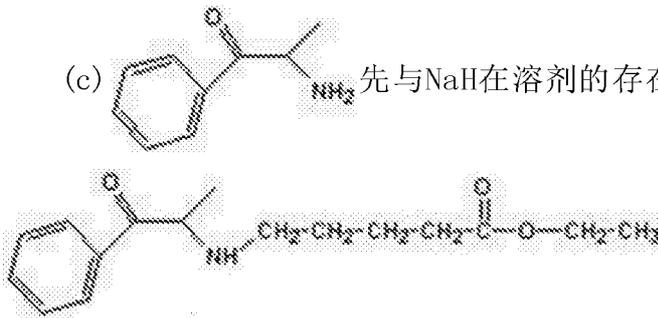
(a) Boc-L-丙氨酸与三氯甲基碳酸酯反应,得到



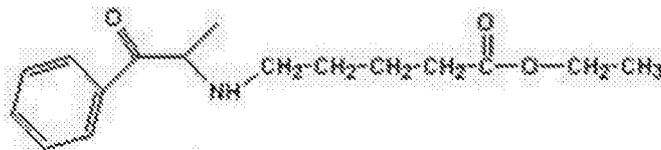
(b) 与苯反应,得到



(c) 先与NaH在溶剂的存在下反应,然后加入溴戊酸乙酯反应,得到



(d) 在碱性条件下进行水解,得到所述



卡西酮人工半抗原。

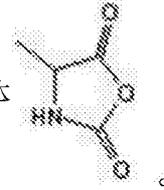
3. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在於,在步骤(a)中,Boc-L-丙氨酸与三氯甲基碳酸酯的摩尔比为1:0.4~0.5,该反应是在溶剂中以及催化剂的条件下进行;

进一步地,所述溶剂为乙酸乙酯,所述催化剂为三乙胺,反应的温度为18-25℃,反应完

成后,经过滤、浓缩和重结晶,得到



进一步地,采用二氯甲烷-正己烷混合溶剂重结晶,得白色晶体



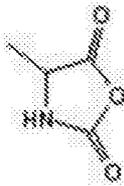
4. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,在步骤(b)中,反应是在催化剂的条件下进行,该催化剂为无水三氯化铝,所述无水三氯化铝的摩尔添加量为

所述 2-甲基-2-氧-1,3-二氧唑-5-甲酰胺的 4.5~5



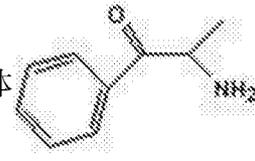
倍;

进一步地,先用苯溶解后,再分次加入催化剂进行反应;



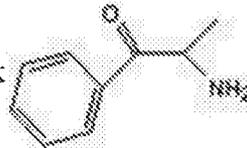
进一步地,反应结束后,反应混合物倒入冰水中搅拌,加入甲苯分层,水层用碱溶液中和,再

用乙醚萃取,分出有机相,有机相经洗涤、干燥和过滤,干燥得到黄色固体



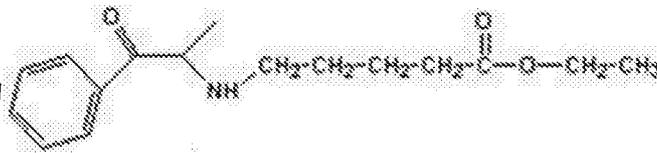
5. 根据权利要求2所述的制备方法,在步骤(c)中,与NaH按摩尔比1:

4.5~5混合,加入溶剂,反应后,按黄色固体与溴戊酸乙酯摩尔比为1:1.1



~1.5加入溴戊酸乙酯,于 $65 \pm 2^\circ\text{C}$ 下搅拌反应2~5小时,经转干、萃取,得到的有机相再经干

燥、过滤、转干,得棕黄色油状产物

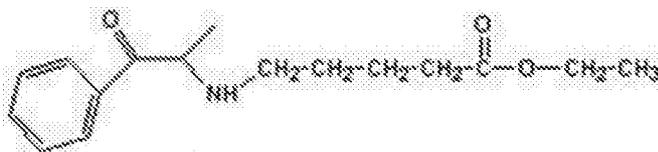


;

进一步地,所述溶剂为DMF;

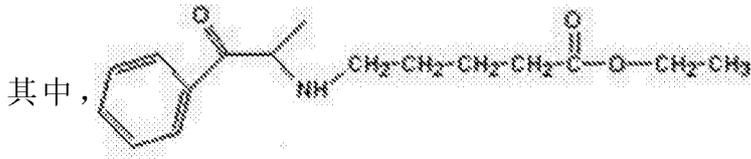
进一步地,采用乙酸乙酯和水进行萃取。

6. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,步骤(d)具体步骤为:



水溶液进行水解;

用THF和无水甲醇溶解,加入1mol/L的NaOH



THF、无水甲醇与1mol/L的

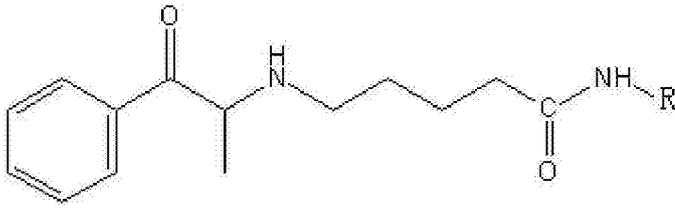
NaOH水溶液的比例为：100±5mg：2.07±0.05ml：2.65±0.05ml：9.9±0.1ml。

进一步地，所述水解反应的温度为18-25℃，反应的时间为3-5小时；

进一步地，反应结束后，调节pH=4~5，萃取得到的有机相经干燥、过滤、转干和纯化后得到所述卡西酮人工半抗原；

进一步地，该步骤所用的萃取剂为二氯甲烷，萃取2-4次。

7. 一种卡西酮人工抗原，其特征在于，其分子结构式如下所示：



其中，R为牛丙种球蛋白或牛血清白蛋白。

8. 权利要求1所述的卡西酮人工抗原的制备方法，其特征在于，权利要求1中所述的卡西酮人工半抗原通过混合酸酐法或N-羟基琥珀酰亚胺活性酯法与牛丙种球蛋白或牛血清白蛋白结合得到；

进一步地，所述混合酸酐法的步骤如下：

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

(b) 将所述上清液滴加到蛋白溶液中，将所得混合液置于3~5℃下静置过夜，经透析、离心取上清，即可；

进一步地，步骤(b)中，所述蛋白溶液的浓度为3-8mg/ml，所述上清液与所述蛋白溶液的体积比为1:5~6。

9. 一种抗卡西酮体，其特征在于，由权利要求7所述卡西酮人工抗原经动物免疫得到的，且与所述卡西酮人工抗原发生特异性免疫反应的球蛋白。

10. 权利要求9所述的抗卡西酮抗体在检测卡西酮中的应用。

## 一种卡西酮人工半抗原、人工抗原及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及卡西酮类人工抗原结构领域,具体而言,涉及一种卡西酮人工半抗原、人工抗原及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 卡西酮(Cathinone),又名benzoylethamphetamine(在以色列市场上又叫hagigat),是一种在阿拉伯茶中发现的一元胺生物碱,化学上与之相似的有:麻黄碱,阿拉伯茶碱和其他安他非命。卡西酮能引起多巴胺释放,可能是使阿拉伯茶产生刺激性影响的原因。

[0003] 约1993年,U.S.Drug Enforcement Administration将卡西酮加入药物控制条例的第一类药物。

[0004] 目前,对卡西酮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,检测费高,并且需要专业技术人员进行操作,不能达到现代检测对快速、准确的要求。

[0005] 免疫分析法可以弥补以上所有缺点,免疫分析法是一种利用抗原抗体特异性结合反应检测各种物质(药物、激素、蛋白质、微生物等)的分析方法,建立小分子化合物的免疫分析方法的关键是能够制造出对小分子化合物具有高亲和力和高特异性的抗体。但是,由于包括卡西酮在内的大多数小分子化合物(分子量小于1000),不具有免疫原性,即缺乏T细胞表位而无法直接诱导动物机体产生特异性抗体,故小分子物质被称为半抗原。通过适当的化学修饰,在半抗原分子结构的某个位置上带上端部为活性基团的连接臂,再与大分子载体结合,生成半抗原-载体偶联物(即人工抗原),人工抗原可以借助T细胞表位来间接诱导B细胞的增殖和分化,继而产生特异性抗体。

[0006] 现有技术中还未有卡西酮人工半抗原、人工抗原的相关报道。

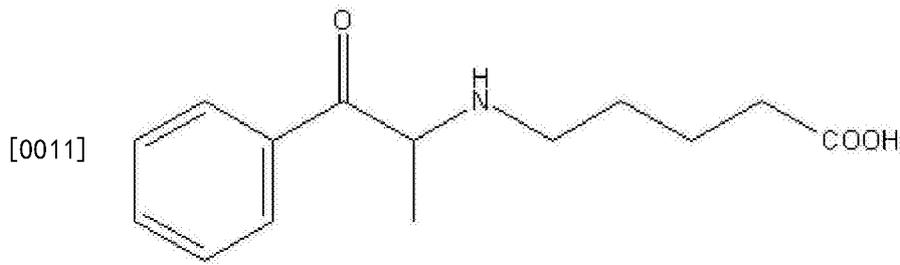
[0007] 有鉴于此,特提出本发明。

### 发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种卡西酮人工半抗原,该卡西酮人工半抗原最大程度地保留了卡西酮的特征结构,且具有可以与载体蛋白发生偶联的活性基团,可作为抗原决定簇;进一步制备获得的卡西酮人工抗原可免疫获得亲和力高、灵敏度高、特异性强的抗卡西酮抗体。

[0009] 为了实现本发明的上述目的,特采用以下技术方案:

[0010] 一种卡西酮人工半抗原,其特征在于,其分子结构式如下所示:

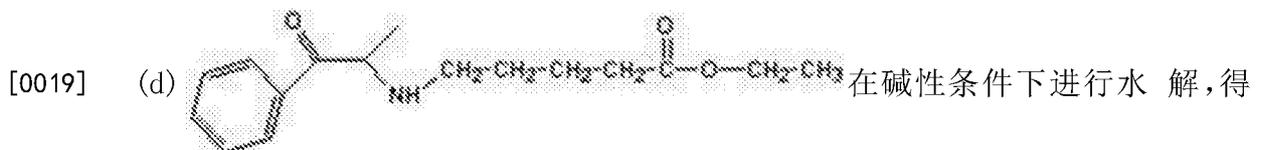
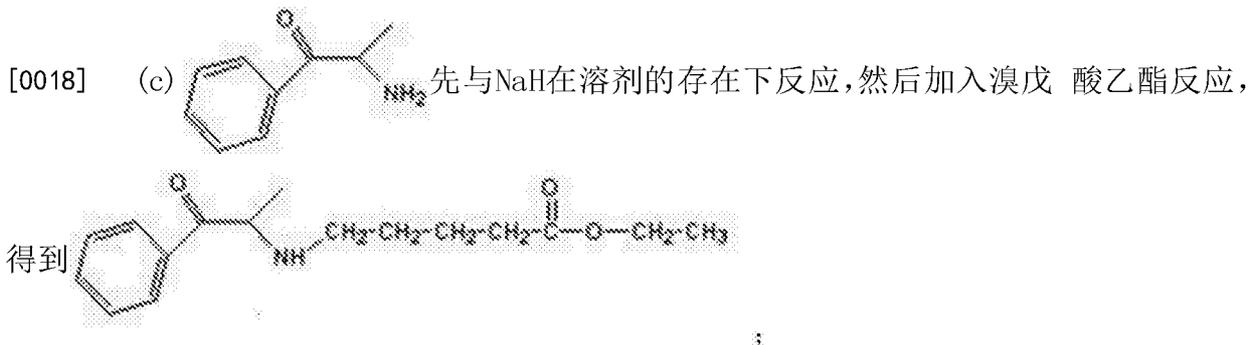
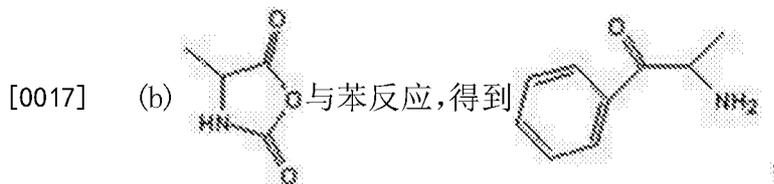
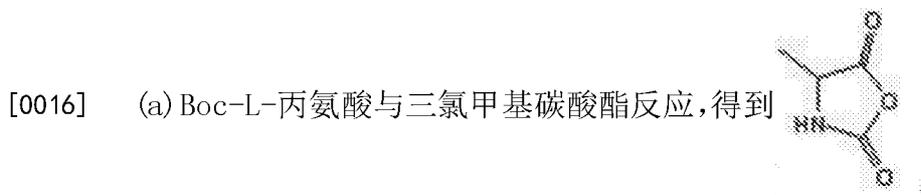


[0012] 本发明提供的卡西酮人工半抗原,在卡西酮的N位上引入连接臂,在该修饰位点上引入连接臂能最大程度地保留卡西酮的特征结构,且具有可以与载体蛋白发生偶联的活性基团,可作为抗原决定簇。

[0013] 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卡西酮的特异性和亲合力更强。

[0014] 而对于现有的4-甲基甲卡西酮类人工抗原的结构来说,其用于检测的是4-甲基甲卡西酮类化合物。一般来讲,卡西酮类化合物包括卡西酮、甲卡西酮和4-甲基甲卡西酮。因此,本发明提供的卡西酮人工抗原的检测范围更广。

[0015] 进一步地,本发明还提供了所述的卡西酮人工半抗原的制备方法,包括以下步骤:

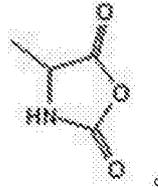


到所述卡西酮人工半抗原。

[0020] 进一步地,在步骤(a)中,Boc-L-丙氨酸与三氯甲基碳酸酯的摩尔比为1:0.4~0.5,该反应是在溶剂中以及催化剂的条件下进行。

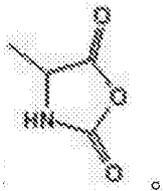
[0021] 进一步地,在步骤(a)中,所述溶剂为乙酸乙酯,所述催化剂为三乙胺,反应的温

度为18-25℃,反应完成后,经过滤、浓缩和重结晶,得到



[0022] 进一步地,在步骤(a)中,所述催化剂添加的方式为滴加,搅拌反应 2.5-3.5小时。

[0023] 进一步地,在步骤(a)中,采用二氯甲烷-正己烷混合溶剂重结晶,得 白色晶体



[0024] 在该反应条件下,白色晶体



的得率较高,后处理程序较为简单,较易提

纯。  
[0025] 另外,反应产物用二氯甲烷-正己烷混合溶剂重结晶,可以除去反应产生的副产物,以达到大致提纯的目的。

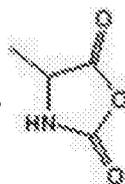
[0026] 进一步地,在步骤(b)中,反应是在催化剂的条件下进行,该催化剂为无水三氯化

铝,所述无水三氯化铝的摩尔添加量为

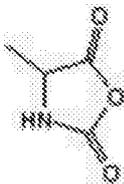


的4.5~5倍。

[0027] 进一步地,在步骤(b)中,



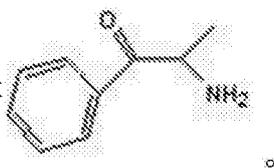
先用苯溶解后,再分次加入催化剂进行反应。



用苯溶解后,得到悬浮液;一般分三次加入催化剂,每次间隔时间为25-35分钟,在室温下搅拌过夜,完成反应。

[0028] 进一步地,在步骤(b)中,反应结束后,反应混合物倒入冰水中搅拌,加入甲苯分层,水层用碱溶液中和,再用乙醚萃取,分出有机相,有机相经洗涤、干燥和过滤,干燥得到

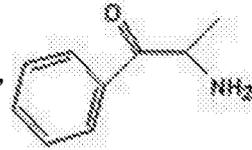
黄色固体



[0029] 在该反应条件下,黄色固体的得率较高,后处理程序较为简单,较易提纯。

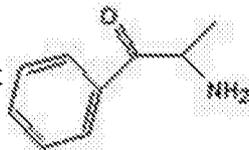
[0030] 优选地,反应产物的洗涤依次用0.1M盐酸水溶液、双蒸水、饱和碳酸氢钠溶液和饱和氯化钠溶液进行。采用如上酸洗、水洗、碱洗、再盐洗的程序可以除去反应体系中偏碱,偏酸的副产物或者杂质,以达到大致提纯的目的。

[0031] 进一步地,在步骤(c)中,



与NaH按摩尔比1:4.5~5混合,加入溶

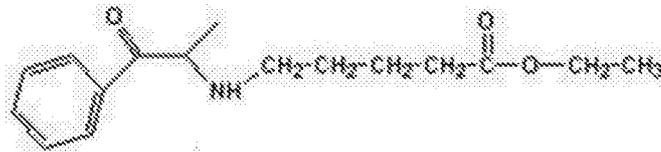
剂,反应后,按黄色固体



与溴戊酸乙酯摩尔比为1:1.1~1.5加入溴戊酸

乙酯,于 $65 \pm 2^\circ\text{C}$ 下搅拌反应2-5小时,经转干、萃取,得到的有机相再经干燥、过滤、转干,

得棕黄色油状产物

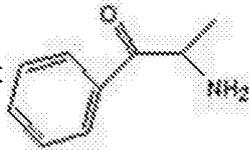


[0032] 进一步地,加入溶剂后反应是在室温搅拌反应25-35分钟。

[0033] 进一步地,在步骤(c)中,所述溶剂为DMF。

[0034] 进一步地,在步骤(c)中,采用乙酸乙酯和水进行萃取。

[0035] 优选地,黄色固体



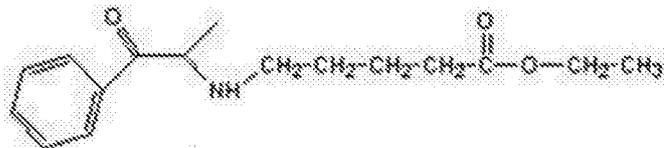
与NaH摩尔比1:4.5~5,最优选为1:5。黄色固

体

与溴戊酸乙酯摩尔比为1:1.1~1.5,最优选为1:1.5。

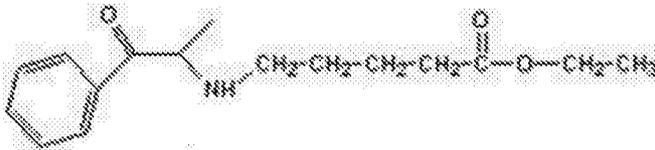
与溴戊酸乙酯摩尔比为1:1.1~1.5,最优选为1:1.5。

[0036] 进一步地,步骤(d)具体步骤为:



用THF和无水甲醇溶解,加入1mol/L的NaOH水溶液进行水解;

[0037] 其中,



THF、无水甲醇与1mol/L

的NaOH水溶液的比例为:100±5mg:2.07±0.05ml:2.65±0.05ml:9.9±0.1ml。

[0038] 进一步地,所述水解反应的温度为18-25℃,反应的时间为3-5小时。

[0039] 进一步地,反应结束后,调节pH=4~5,萃取得到的有机相经干燥、过滤、转干和纯化后得到所述卡西酮人工半抗原。

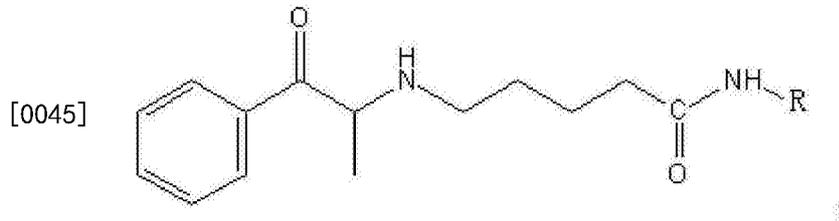
[0040] 进一步地,该步骤所用的萃取剂为二氯甲烷,萃取2-4次。

[0041] 进一步地,纯化采用薄层层析法进行。

[0042] 通过上述方法,在卡西酮的N位上引入连接臂,在该修饰位点上引入连接臂能最大程度地保留卡西酮的特征结构。

[0043] 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卡西酮的特异性和亲合力更强。

[0044] 本发明还提供了一种卡西酮人工抗原,其分子结构式如下所示:



[0046] 其中,R为牛丙种球蛋白或牛血清白蛋白。

[0047] 进一步地,本发明还提供了所述的卡西酮人工抗原的制备方法,将上述的卡西酮人工半抗原通过混合酸酐法或N-羟基琥珀酰亚胺活性酯法与目标蛋白结合得到。

[0048] 目标蛋白为牛丙种球蛋白或牛血清白蛋白。

[0049] 进一步地,所述混合酸酐法的步骤如下:

[0050] (a) 将所述卡西酮人工半抗原、三乙胺、氯甲酸异丁酯按摩尔比 1:1~1.2:1~1.3 混合,20~30℃下搅拌反应18~19小时,反应结束后离心取上清液;

[0051] (b) 将所述上清液滴加到蛋白溶液中,将所得混合液置于3~5℃下静置过夜,经透析、离心取上清,即可。

[0052] 进一步地,步骤(b)中,所述蛋白溶液的浓度为3-8mg/ml,所述上清液与所述蛋白溶液的体积比为1:5~6。

[0053] 如未作特殊说明,本发明中蛋白溶液是将目标蛋白牛丙种球蛋白或牛血清白蛋白溶于钠离子浓度为0.1~0.2mol/L的PBS缓冲液(pH 7.2~7.4)中制成的。

[0054] 优选地,R为牛丙种球蛋白。

[0055] 本发明选用牛丙种球蛋白(BGG)作为大分子载体,与牛血清蛋白(BSA)相比具有以下优点:

[0056] ①牛丙种球蛋白能够结合更多的卡西酮人工半抗原,免疫原性较好;

[0057] ②从实验看,牛丙种球蛋白与卡西酮人工半抗原的结合更稳定,牛血清蛋白与卡西酮人工半抗原结合后,卡西酮人工半抗原容易在后续处理中脱离,从而使最终的人工抗原在长期保存中容易产生沉淀,稳定性差;

[0058] ③用牛丙种球蛋白与卡西酮人工半抗原结合后形成的卡西酮人工抗原,经动物免疫得到的抗卡西酮体的特异性更好。

[0059] 本发明还提供了一种抗卡西酮体,由上述卡西酮人工抗原经动物免疫得到的,且与所述卡西酮人工抗原发生特异性免疫反应的球蛋白。

[0060] 本发明还提供了上述的抗卡西酮抗体在检测卡西酮中的应用。

[0061] 试验发现,将卡西酮人工抗原免疫新西兰白兔,获得的免疫血清的效价为1:80000,表明本发明的卡西酮人工抗原可免疫获得亲和力高、灵敏度高、特异性强的抗卡西酮抗体,该抗卡西酮抗体可用于卡西酮的免疫检测和分析。

[0062] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0063] (1) 本发明提供了一种卡西酮人工半抗原,该卡西酮人工半抗原最大程度地保留了卡西酮的特征结构,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。

[0064] (2) 本发明提供的卡西酮人工半抗原的制备方法,得到的卡西酮人工半抗原的纯度达到99.9%及以上,纯度高。

[0065] (3) 本发明提供的卡西酮人工抗原的制备方法,采用混合酸酐法,经过活化反应,得到的卡西酮人工抗原亲和力高,特异性强。

[0066] (4) 本发明提供的卡西酮人工抗原可免疫获得亲和力高、灵敏度高、特异性强的抗卡西酮抗体,相比于其他卡西酮人工抗原,免疫血清效价提升15倍以上。

## 附图说明

[0067] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,以下将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍。

[0068] 图1为本发明实施例提供的卡西酮人工抗原的制备流程图;

[0069] 图2为本发明实施例提供的卡西酮人工半抗原的液相色谱图;

[0070] 图3为本发明实施例提供的卡西酮人工半抗原的质谱图;

[0071] 图4为牛丙种球蛋白、卡西酮人工半抗原、卡西酮人工抗原的紫外扫描图;

[0072] 图5为对比例1卡西酮人工抗原的制备流程图;

[0073] 图6为对比例2卡西酮人工抗原的制备流程图;

[0074] 图7为对比例3卡西酮人工抗原的制备流程图;

[0075] 图8为对比例4卡西酮人工抗原的制备流程图;

[0076] 图9为对比例5卡西酮人工抗原的制备流程图;

[0077] 图10为对比例6卡西酮人工抗原的制备流程图;

[0078] 图11为对比例7卡西酮人工抗原的制备流程图。

## 具体实施方式

[0079] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人员将会理解,下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0080] 实施例1

[0081] 本实施例提供一种卡西酮人工抗原的制备方法(制备流程见图1),具体包括以下步骤:

[0082] (1) 人工半抗原的制备:

[0083] ①将1.0g (5.285mmol) Boc-L-丙氨酸与627mg (2.114mmol) 三氯甲基碳酸酯加入100ml圆底烧瓶中,接着加入100ml干燥的乙酸乙酯做溶剂,在室温下滴加0.81ml三乙胺,室温下搅拌反应3小时;反应结束后,用无水硫酸钠干燥、过滤、浓缩,残余物用二氯甲烷-正己烷混合溶剂重结晶,去掉母液,得420mg白色晶体A;

[0084] 对该白色晶体A进行TLC检测,层析液为石油醚:乙酸乙酯=1:1,产物 $R_f=0.7\sim$

0.8;

[0085] ②将420mg (3.652mmol) 白色晶体A溶于16ml苯中,向此混悬液中分三次逐渐加入2.44g (18.26mmol) 无水三氯化铝,每次间隔时间为30分钟,在室温下搅拌反应过夜,刚开始出现不溶物,溶液呈无色状,随着反应进行,溶液逐渐变黄,最后成黑褐色状;停止反应,向反应混合物中加入20ml甲苯和40ml纯化水,用分液漏斗分出水相和有机相,收集水相,水相用1mol/L NaOH水溶液调pH=7,再用乙醚萃取,乙醚相依次用0.1mol/L盐酸水溶液、双蒸水、饱和碳酸氢钠溶液、饱和氯化钠溶液洗涤,用无水硫酸钠干燥、过滤、转干,得到140mg黄色固体产物B;

[0086] 对该黄色固体产物B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,产物 $R_f=0.8\sim 0.9$ ;

[0087] ③140mg (0.94mmol) 黄色固体B溶于7ml DMF中,加入112mg (4.70mmol) NaH,室温搅拌反应30分钟,加入221 $\mu$ L (1.41mmol) 溴戊酸乙酯,于65 $^{\circ}$ C下搅拌反应3小时,油泵转干,用10ml乙酸乙酯提取、过滤、转干,得298mg棕黄色油状物C;

[0088] ④得到的298mg (1.197mmol) 棕黄色油状物C用6.2ml THF和7.9ml 无水MeOH溶解,加入29.5ml 1mol/L的NaOH水溶液,室温下快速搅拌反应4小时;反应结束后,用1M的盐酸调pH=5,用二氯甲烷萃取,合并二氯甲烷相,用无水硫酸镁干燥、过滤、转干,薄层层析法纯化得到180mg 卡西酮人工半抗原。

[0089] 薄层色谱采用的层析液为95%乙醇:1,4-二氧六环:二氯甲烷:氨水=8:1:10:1,产物 $R_f=0.4\sim 0.5$ 。

[0090] 卡西酮人工半抗原的液相色谱图见图2(紫外检测器,波长210nm),图2中,AU表示吸光度单位;卡西酮半抗原的质谱图见图3,其中,Relative Abundance表示相对丰度,m/z表示荷质比。

[0091] 从图2可以看出经过纯化得到的卡西酮人工半抗原的纯度达到99.9%以上,从图3可以看出本实施例得到的卡西酮人工半抗原的分子离子峰的质荷比(m/z)为248.16,与其理论分子量249.16吻合,它的其他三个主要碎片离子峰的质荷比(m/z)分别为77.11、148.19、203.19,与其三个主要碎片的理论分子量78、149、204吻合,综合以上数据可以确定步骤④得到的最终化合物就是本发明所设计的卡西酮人工半抗原I。

[0092] (2) 卡西酮人工抗原的制备:

[0093] ⑤将180mg (0.722mmol) 卡西酮人工半抗原置于50ml圆底烧瓶中,加入9ml N,N-二甲基甲酰胺(DMF),再加入73.2mg (0.722mmol) 三乙胺和98.6mg (0.722mmol) 氯甲酸异丁酯,20 $^{\circ}$ C搅拌反应18小时,反应结束后离心,取上清液,备用。

[0094] ⑥称取14.5g (0.0405mol) 十二水磷酸氢二钠,43.875g (0.75mol) 氯化钠,1.495g (0.00958mol) 二水磷酸二氢钠用双蒸水溶解定容至5.0L,得到钠离子浓度为0.17mol/L的PBS缓冲液,pH为7.4。

[0095] ⑦称取0.250g牛丙种球蛋白溶于50ml步骤⑥的PBS缓冲液中,得到浓度为5mg/ml的牛丙种球蛋白溶液。

[0096] ⑧在快速搅拌下,将步骤⑤的上清液缓慢滴加到牛丙种球蛋白溶液中,上清液与牛丙种球蛋白溶液的体积比为1:5,得到的混合液在4 $^{\circ}$ C条件下静置保存过夜,得到人工抗原混合液。

[0097] ⑨将人工抗原混合液移入透析袋中,用步骤⑥的PBS缓冲液透析9次,透析结束后离心取上清液即得到卡西酮人工抗原:卡西酮-牛丙种球蛋白偶联物(如式II)。卡西酮人工抗原制备前后的紫外扫描图见图4,其中,Abs 表示紫外-可见吸收光谱,WL(nm)表示波长(nm)。

[0098] 图4中,曲线a为卡西酮人工半抗原的紫外扫描图,曲线b为卡西酮人工抗原的紫外扫描图,曲线c为牛丙种球蛋白的紫外扫描图。卡西酮人工半抗原的最大吸收波长为290nm,卡西酮人工抗原的最大吸收波长为278nm,与卡西酮半抗原、牛丙种球蛋白相比,卡西酮人工抗原的最大吸收波长出现明显变化。

[0099] 实施例2

[0100] 本实施例提供一种卡西酮人工抗原的制备方法(制备流程见图1),具体包括以下步骤:

[0101] (1)人工半抗原的制备:

[0102] ①将1.0g(5.285mmol) Boc-L-丙氨酸与784mg(2.642mmol)三氯甲基碳酸酯加入100ml圆底烧瓶中,接着加入100ml干燥的乙酸乙酯做溶剂,在室温下滴加0.81ml三乙胺,室温下搅拌反应3小时;反应结束后,用无水硫酸钠干燥、过滤、浓缩,残余物用二氯甲烷-正己烷混合溶剂重结晶,去掉母液,得398mg白色晶体A;

[0103] 对该白色晶体A进行TLC检测,层析液为石油醚:乙酸乙酯=1:1,产物 $R_f=0.7\sim 0.8$ ;

[0104] ②将398mg(3.461mmol)白色晶体A溶于16ml苯中,向此混悬液中分三次逐渐加入2.079g(15.574mmol)无水三氯化铝,每次间隔时间为30分钟,在室温下搅拌反应过夜,刚开始出现不溶物,溶液呈无色状,随着反应进行,溶液逐渐变黄,最后成黑褐色状;停止反应,向反应混合物中加入20ml甲苯和40ml纯化水,用分液漏斗分出水相和有机相,收集水相,水相用1mol/L NaOH水溶液调pH=7,再用乙醚萃取,乙醚相依次用0.1mol/L盐酸水溶液、双蒸水、饱和碳酸氢钠溶液、饱和氯化钠溶液洗涤,用无水硫酸钠干燥、过滤、转干,得到119mg黄色固体产物B;

[0105] 对该黄色固体产物进行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,产物 $R_f=0.8\sim 0.9$ ;

[0106] ③119mg(0.799mmol)黄色固体B溶于5.95ml DMF中,86.29mg NaH(3.596mmol),室温搅拌反应30分钟,加入139.6 $\mu$ L(0.879mmol)溴戊酸乙酯,于65 $^{\circ}$ C下搅拌反应3小时,油泵转干,用10ml乙酸乙酯提取、过滤、转干,得234mg棕黄色油状产物C;

[0107] ④得到的234mg棕黄色油状产物C用4.87ml THF和6.2ml无水 MeOH溶解,加入23.2ml 1mol/L的NaOH水溶液,室温下快速搅拌反应4小时;反应结束后,用1mol/L的盐酸调pH=5,用二氯甲烷萃取,合并有机相,用无水硫酸镁干燥、过滤、转干,薄层层析法纯化得到102mg卡西酮人工半抗原I。薄层色谱采用的层析液为95%乙醇:1,4-二氧六环:二氯甲烷:氨水=8:1:10:1,产物 $R_f=0.4\sim 0.5$ 。

[0108] 检测,纯化得到的卡西酮人工半抗原的纯度达到99.9%。

[0109] (2)卡西酮人工抗原的制备:

[0110] ⑤将102mg(0.409mmol)卡西酮人工半抗原置于50ml圆底烧瓶中,加入5.1ml N,N-二甲基甲酰胺(DMF),再加入41.48mg(0.491mmol)三乙胺和55.87mg(0.409mmol)氯甲酸

异丁酯, 20℃搅拌反应18小时, 反应结束后离心, 取上清液, 备用。

[0111] ⑥称取14.5g (0.0405mol) 十二水磷酸氢二钠, 43.875g (0.75mol) 氯化钠, 1.495g (0.00958mol) 二水磷酸二氢钠用双蒸水溶解定容至5.0L, 得到钠离子浓度为0.17mol/L的PBS缓冲液, pH为7.4。

[0112] ⑦称取0.25g牛丙种球蛋白溶于50ml步骤⑥的PBS缓冲液中, 得到浓度为5mg/ml的牛丙种球蛋白溶液。

[0113] ⑧在快速搅拌下, 将步骤⑤的上清液缓慢滴加到牛丙种球蛋白溶液中, 上清液与牛丙种球蛋白溶液的体积比为1:6, 得到的混合液在4℃条件下静置保存过夜, 得到人工抗原混合液。

[0114] ⑨将人工抗原混合液移入透析袋中, 用步骤⑥的PBS缓冲液透析9次, 透析结束后离心取上清液即得到卡西酮人工抗原: 卡西酮-牛丙种球蛋白偶联物(如式II)。

[0115] 卡西酮人工抗原制备前后的紫外扫描结果同实施例1。

[0116] 对比例1

[0117] 一种卡西酮人工抗原的制备方法(制备流程见图5), 包括以下步骤:

[0118] 卡西酮人工半抗原的制备:

[0119] ①将1.0g (5.285mmol) Boc-L-丙氨酸与627mg (2.114mmol) 三氯甲基碳酸酯加入100ml圆底烧瓶中, 接着加入100ml干燥的乙酸乙酯作溶剂, 在室温下滴加0.81ml三乙胺, 室温下搅拌反应3小时; 反应结束后, 用无水硫酸钠干燥、过滤、浓缩, 残余物用二氯甲烷-正己烷混合溶剂重结晶, 去掉母液, 得450mg白色晶体A;

[0120] 对该白色晶体A进行TLC检测, 层析液为石油醚: 乙酸乙酯=1:1, 产物 $R_f=0.7\sim 0.8$ ;

[0121] ②将450mg (3.913mmol) 白色晶体A溶于16ml苯中, 向此混悬液中分三次逐渐加入2.61g (19.56mmol) 无水三氯化铝, 每次间隔时间为30分钟, 在室温下搅拌反应过夜, 刚开始出现不溶物, 溶液呈无色状, 随着反应进行, 溶液逐渐变黄, 最后成黑褐色状; 停止反应, 向反应混合物中加入20ml甲苯和40ml纯化水, 用分液漏斗分水相和有机相, 收集水相, 水相用1mol/L NaOH水溶液调pH=7, 再用乙醚萃取, 乙醚相依次用0.1mol/L盐酸水溶液、双蒸水、饱和碳酸氢钠溶液、饱和氯化钠溶液洗涤, 用无水硫酸钠干燥、过滤、转干, 得到164mg黄色固体产物B;

[0122] 对该黄色固体产物B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, 产物 $R_f=0.8\sim 0.9$ ;

[0123] ③将164mg (1.101mmol) 黄色固体产物B与165mg (1.652mmol) 丁二酸酐溶于8.2ml无水吡啶中, 100℃回流搅拌反应20小时; 反应结束后减压蒸馏, 薄层层析法纯化得到86mg卡西酮半抗原(如式III);

[0124] 对式III卡西酮半抗原进行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, 产物 $R_f=0.4\sim 0.5$ 。

[0125] (2) 制备卡西酮人工抗原:

[0126] ④将86mg (0.363mmol) 卡西酮半抗原III于50ml圆底烧瓶中, 加入4.3ml N,N-二甲基甲酰胺(DMF), 再加入60mg (0.523mmol) N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和107mg (0.524mmol) 环己基碳酰二亚胺(DCC), 室温搅拌反应过夜, 反应结束后离心取上清液, 备用。

[0127] ⑤称取14.5g (0.0405mol) 十二水磷酸氢二钠, 43.875g (0.75mol) 氯化钠, 1.495g (0.00958mol) 二水磷酸二氢钠用双蒸水溶解定容至5.0L, 得到钠离子浓度为0.17mol/L的PBS缓冲液, pH为7.4。

[0128] ⑥称取0.25g牛血清蛋白溶于50ml步骤⑤的PBS缓冲液中, 得到浓度为5mg/ml的牛血清蛋白溶液。

[0129] ⑦在快速搅拌下, 将步骤④的上清液缓慢滴加到牛血清蛋白溶液中, 上清液与牛血清蛋白溶液的体积比为1:5, 得到的混合液在4℃条件下静置保存过夜, 得到人工抗原混合液。

[0130] ⑧将人工抗原混合液移入透析袋中, 用步骤⑤的PBS缓冲液透析9次, 透析结束后离心取上清液即得到人工抗原: 卡西酮-牛血清蛋白偶联物 (如式IV)。其中, 图5中, BSA表示牛血清蛋白。

[0131] 对比例2

[0132] 一种卡西酮人工抗原的制备方法 (制备流程见图6), 包括以下步骤:

[0133] (1) 卡西酮人工半抗原的制备: 与对比例1相同。

[0134] (2) 卡西酮人工抗原的制备:

[0135] 采用牛丙种球蛋白作载体, 与卡西酮人工半抗原III进行偶联, 偶联步骤与对比例1相同, 得到卡西酮人工抗原V。

[0136] 对比例3

[0137] 一种卡西酮人工抗原的制备方法 (制备流程见图7), 包括以下步骤:

[0138] (1) 卡西酮人工半抗原的制备: ①与对比例1相同。

[0139] (2) 卡西酮人工抗原的制备:

[0140] ②称取86mg (0.345mmol) 卡西酮人工半抗原III置于50ml圆底烧瓶中, 加入4.3ml N,N-二甲基甲酰胺 (DMF), 再加入34.8mg (0.345mmol) 三乙胺和46.8mg (0.345mmol) 氯甲酸异丁酯, 室温搅拌反应18小时, 反应结束后离心, 取上清液, 备用。

[0141] ③-⑥与对比例1相同; 得到卡西酮人工抗原VI。

[0142] 对比例4

[0143] 一种卡西酮人工抗原的制备方法 (制备流程见图8), 包括以下步骤:

[0144] (1) 卡西酮人工半抗原的制备: ①与对比例1相同。

[0145] (2) 卡西酮人工抗原的制备: ②与对比例3相同。

[0146] ③-⑥与对比例2相同; 得到卡西酮人工抗原VII。

[0147] 对比例5

[0148] 一种卡西酮人工抗原的制备方法 (制备流程见图9), 包括以下步骤:

[0149] (1) 卡西酮人工半抗原的制备: ①-③与实施例1相同。

[0150] (2) 卡西酮人工抗原的制备:

[0151] ④称取55mg (0.221mmol) 卡西酮人工半抗原I置于50ml圆底烧瓶中, 加入2.75ml N,N-二甲基甲酰胺 (DMF), 再加入25.7mg (0.221mmol) N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和45.23mg (0.221mmol) 环己基碳酰二亚胺 (DCC), 室温搅拌反应18小时, 反应结束后离心, 取上清液, 备用。

[0152] ⑤称取14.5g十二水磷酸氢二钠, 43.875g氯化钠, 1.495g二水磷酸二氢钠用双蒸

水溶解定容至5.0L,得到PBS缓冲液,pH为7.4。

[0153] ⑥称取70mg牛血清蛋白溶于14ml PBS缓冲液中,得到牛血清蛋白溶液。

[0154] ⑦在快速搅拌下,将上清液缓慢滴加到牛血清蛋白溶液中,上清液与牛血清蛋白溶液的体积比为1:5,得到的混合液在4℃条件下静置保存过夜,既得到人工抗原混合液。

[0155] ⑧将人工抗原混合液移入透析袋中,用上述PBS缓冲液透析9次,透析结束后离心,取上清液,即得卡西酮人工抗原VIII。

[0156] 对比例6

[0157] 一种卡西酮人工抗原的制备方法(制备流程见图10),包括以下步骤:

[0158] (1) 卡西酮人工半抗原的制备:①-③与实施例1相同。

[0159] (2) 卡西酮人工抗原的制备:

[0160] 采用牛丙种球蛋白作载体,与卡西酮人工半抗原I进行偶联,偶联步骤与对比例5相同,得到卡西酮人工抗原IX。

[0161] 对比例7

[0162] 一种卡西酮人工抗原的制备方法(制备流程见图11),包括以下步骤:

[0163] (1) 卡西酮人工半抗原的制备:①-③与实施例1相同。

[0164] (2) 卡西酮人工抗原的制备:④-⑤与实施例1相同。

[0165] ⑥称取0.30g牛血清蛋白溶于60ml PBS缓冲液中,得到牛血清蛋白溶液,备用。

[0166] ⑦-⑧与对比例5相同,得卡西酮人工抗原X。

[0167] 实验例

[0168] 卡西酮人工抗原的性能测定

[0169] (1) 卡西酮人工抗原的鉴定:

[0170] 摩尔吸收系数 $\epsilon$ :用步骤⑤的PBS缓冲液配制浓度为0 $\mu$ g/ml、5 $\mu$ g/ml、10 $\mu$ g/ml、20 $\mu$ g/ml、30 $\mu$ g/ml、40 $\mu$ g/ml的卡西酮人工半抗原溶液,通过紫外扫描图可知卡西酮半抗原的最大吸收波长为290nm,在290nm处测吸光值,每个浓度做平行样。摩尔吸光系数(即摩尔吸收系数)的计算公式为: $\epsilon = \text{吸光值} / \text{摩尔浓度}$ 。

[0171] 偶联物蛋白浓度的测定:用步骤⑤的PBS缓冲液配制浓度为0 $\mu$ g/ml、10 $\mu$ g/ml、20 $\mu$ g/ml、30 $\mu$ g/ml、40 $\mu$ g/ml、60 $\mu$ g/ml、80 $\mu$ g/ml、100 $\mu$ g/ml、120 $\mu$ g/ml的牛丙种球蛋白溶液各1ml,加入3ml考马斯亮蓝染色液,立即混匀,30℃水浴温热5分钟,每个浓度做平行样,在655nm处测吸光值,绘制蛋白浓度与吸光值的关系曲线。将人工抗原溶液(用PBS缓冲液配制)按一定比例稀释,在655nm处测得人工抗原的吸光值,从曲线上读取人工抗原溶液的相应蛋白浓度值。

[0172] 偶联比测定:配制100 $\mu$ g/ml的牛丙种球蛋白PBS溶液,将偶联物(即卡西酮人工抗原)用PBS稀释到100 $\mu$ g/ml,在278nm处测得吸光值A1,以PBS为空白测得吸光值A2,则偶联比率 $\gamma$ 为: $\gamma = [(A1 - A2) / \epsilon] / (100 \times 10^{-3} / 150000)$ 。

[0173] 其中 $\epsilon$ 为摩尔吸光系数(L/mol),150000为牛丙种球蛋白的分子量,100 $\times 10^{-3}$ 为牛丙种球蛋白浓度(g/L)。

[0174] 采用牛血清蛋白作载体时,偶联比的计算式为: $\gamma = [(A1 - A2) / \epsilon] / (100 \times 10^{-3} / 65000)$ ;其中,65000为牛血清蛋白的分子量。

[0175] 得到的结果如表1所示。

[0176] 表1各卡西酮人工抗原的偶联比和摩尔吸收系数

[0177]

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	18	3.352mg/ml	5226.46
实施例 2	II	18	3.352mg/ml	5226.46
对比例 1	IV	14	2.530mg/ml	5308.45
对比例 2	V	25	3.462mg/ml	5308.45
对比例 3	VI	16	2.886mg/ml	5308.45
对比例 4	VII	24	3.214mg/ml	5308.45
对比例 5	VIII	17	2.813mg/ml	5226.46
对比例 6	IX	20	3.125mg/ml	5226.46

[0178]

对比例 7	X	3	0.178mg/ml	5226.46
-------	---	---	------------	---------

[0179] 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。

[0180] (2) 动物免疫

[0181] 将制备的各卡西酮人工抗原免疫新西兰白兔,得到的免疫血清经 ELISA方法检测其效价,检测结果见表2。

[0182] 表2各免疫血清的效价检测结果

[0183]

编号	卡西酮人工抗原	免疫血清效价
实施例1	II	1:80000
实施例2	II	1:80000
对比例1	IV	1:2500
对比例2	V	1:2600
对比例3	VI	1:3500
对比例4	VII	1:3200
对比例5	VIII	1:6000
对比例6	IX	1:5000
对比例7	X	/

[0184] 由表2可见,与实施例1和实施例2相比,利用各对比例卡西酮人工抗原进行动物免疫获得的免疫血清,其效价均偏低,不能用于免疫分析中。其中对比例7得到的卡西酮人工抗原X较为浑浊,冷冻保存后出现大量沉淀,稳定性很差,故不能作为免疫抗原。而本发

明提供的卡西酮人工抗原 II 进行动物免疫获得的免疫血清,其效价达1:80000,完全可用于免疫分析中,为卡西酮的检测提供更加方便快捷准确的途径。

[0185] 综上所述,本发明提供的卡西酮人工半抗原,最大程度地保留了卡西酮的特征结构,且具有可以与载体蛋白发生偶联的活性基团,可作为抗原决定簇;进一步制备获得的卡西酮人工抗原可免疫获得亲和力高、灵敏度高、特异性强的抗卡西酮抗体。

[0186] 本发明中,DMF表示N,N-二甲基甲酰胺,DCC表示二环己基碳二亚胺,THF表示四氢呋喃,BSA表示牛血清蛋白,BGG表示牛丙种球蛋白。

[0187] 尽管已用具体实施例来说明和描述了本发明,然而应意识到,在不背离本发明的精神和范围的情况下可以作出许多其它的更改和修改。因此,这意味着在所附权利要求中包括属于本发明范围内的所有这些变化和修改。

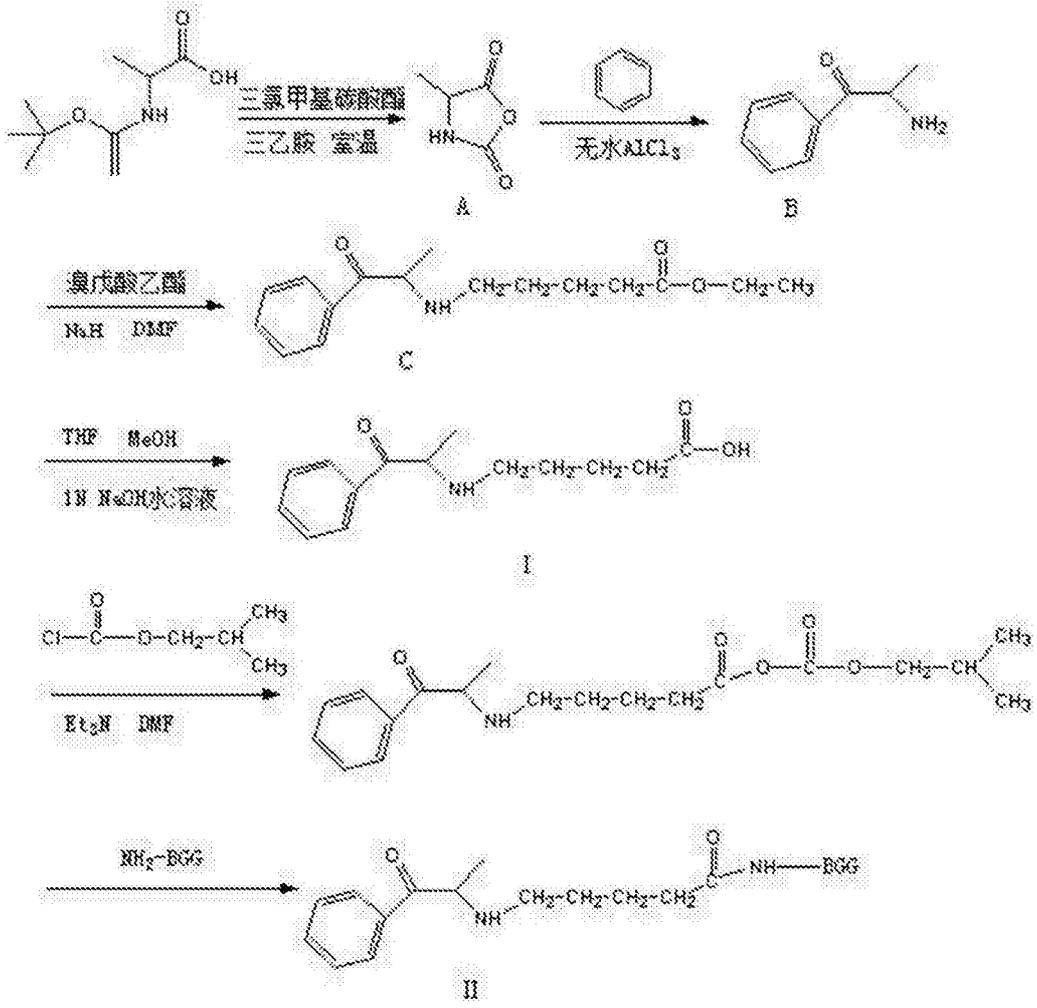


图1

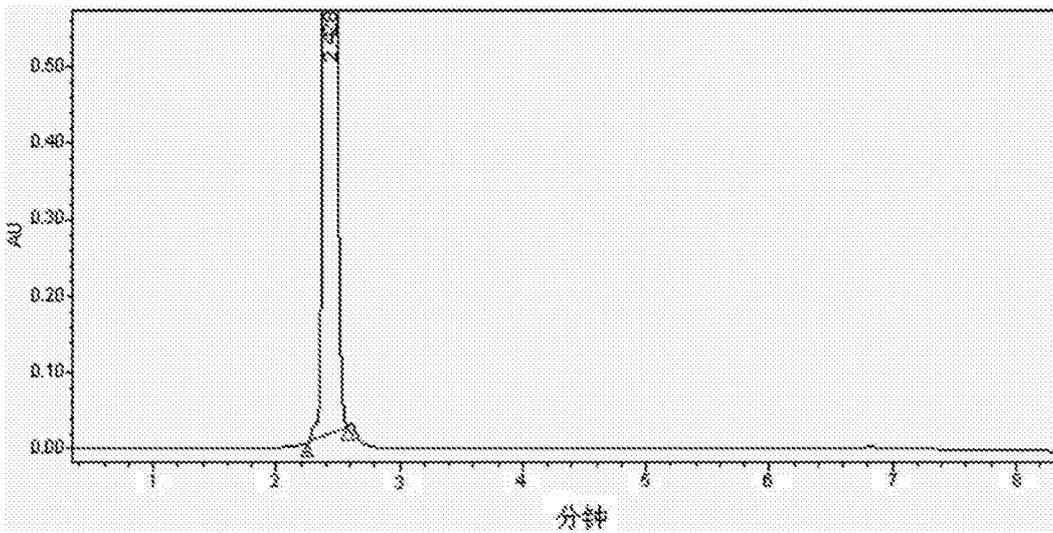


图2

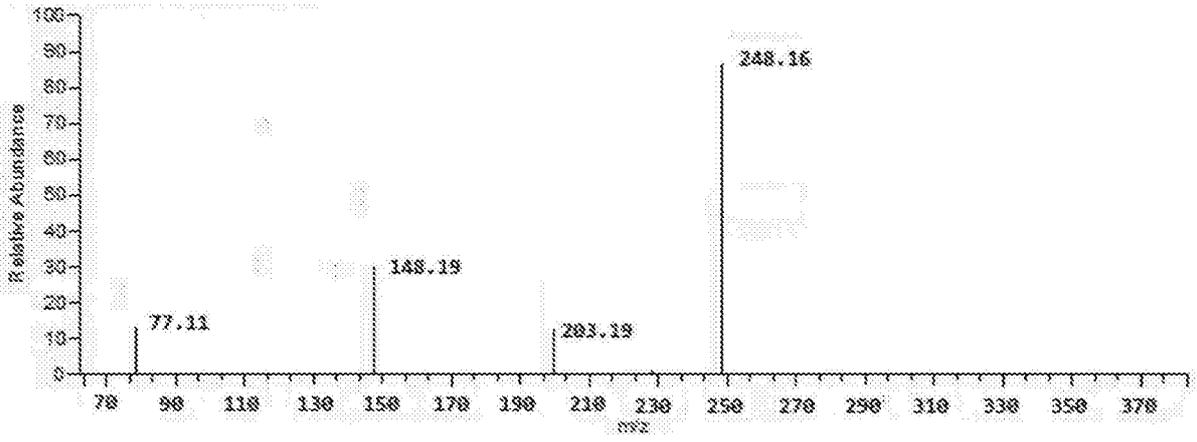


图3

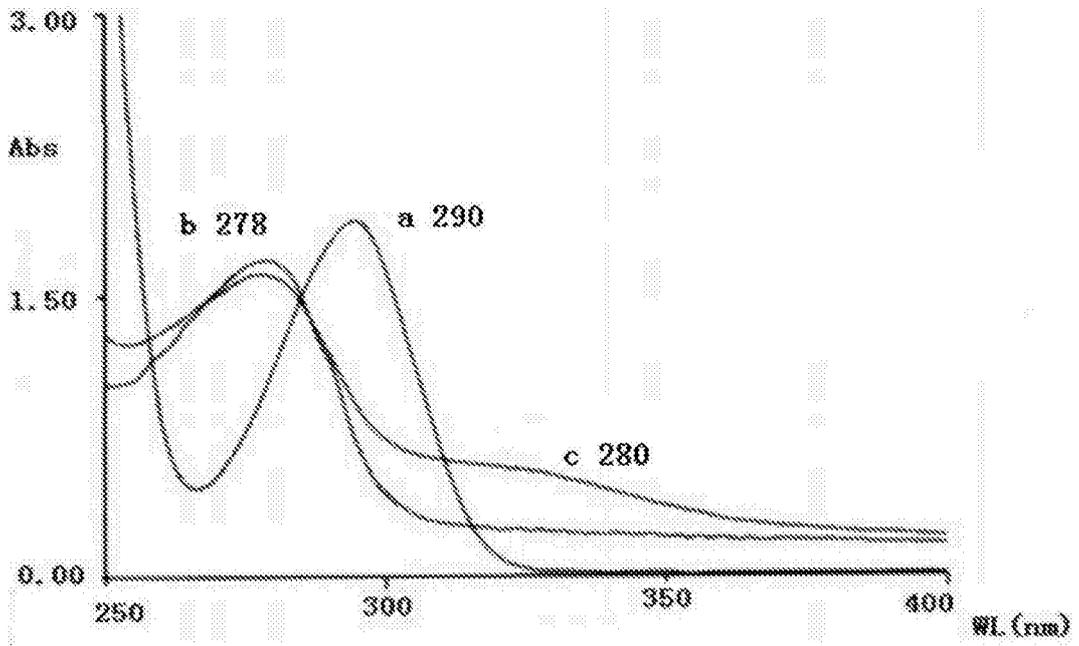


图4

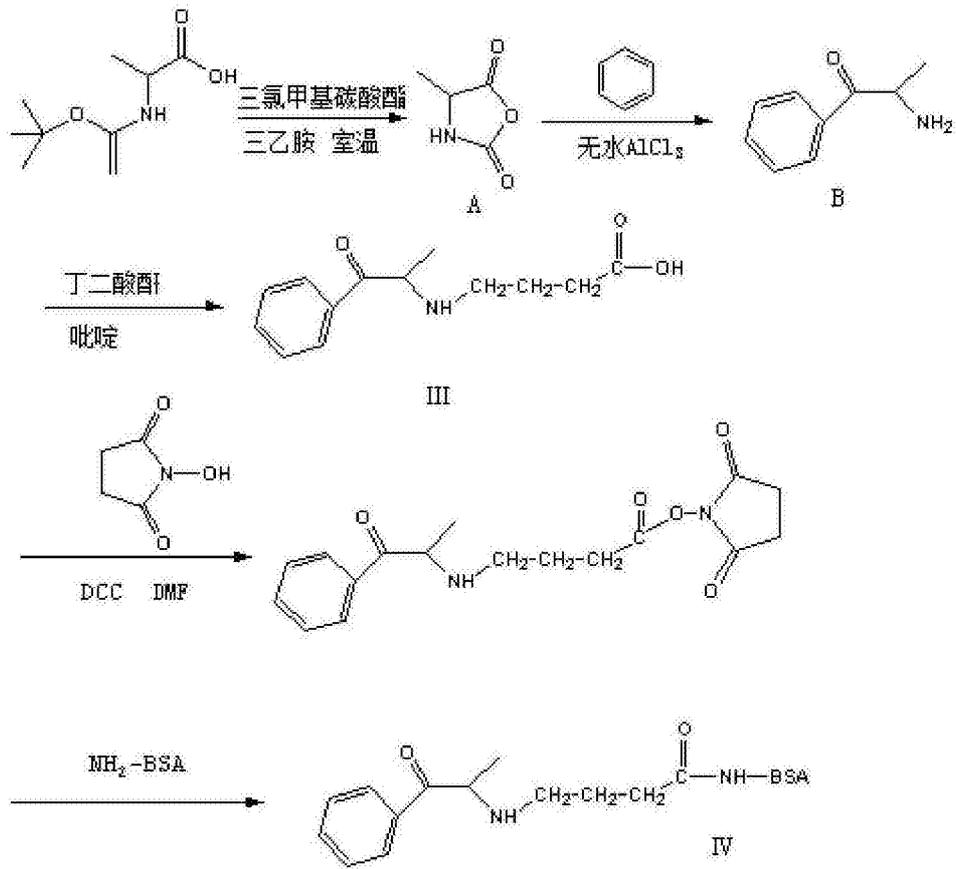


图5

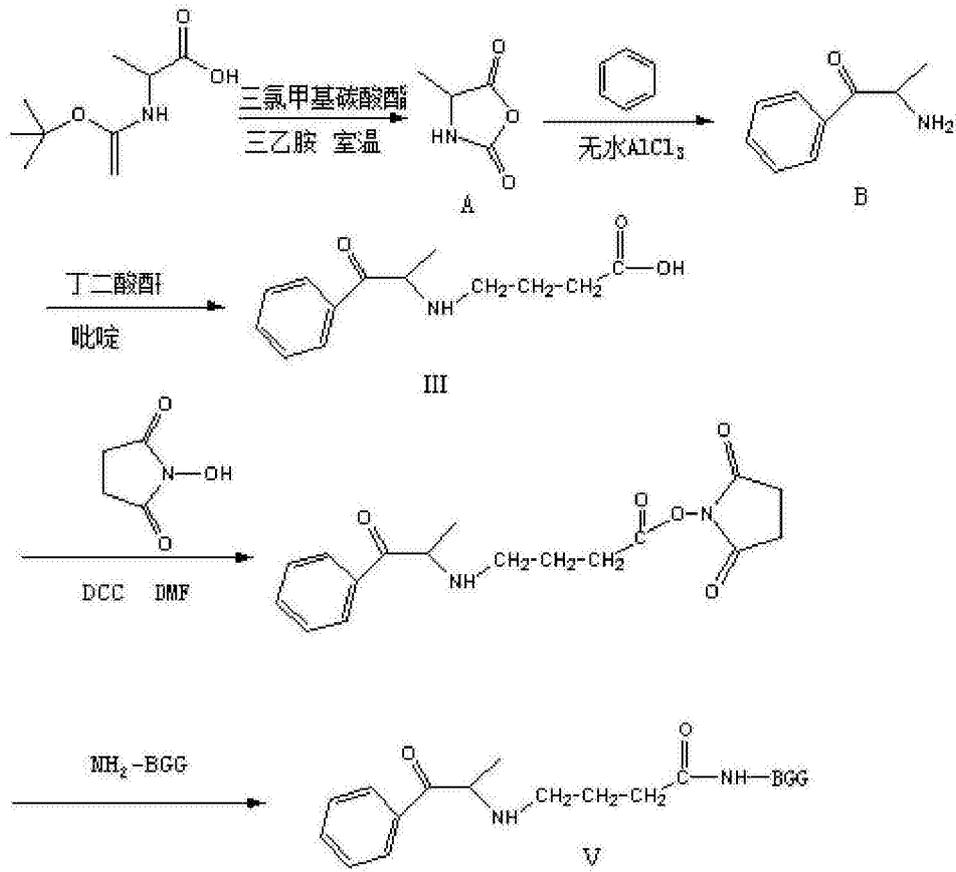


图6

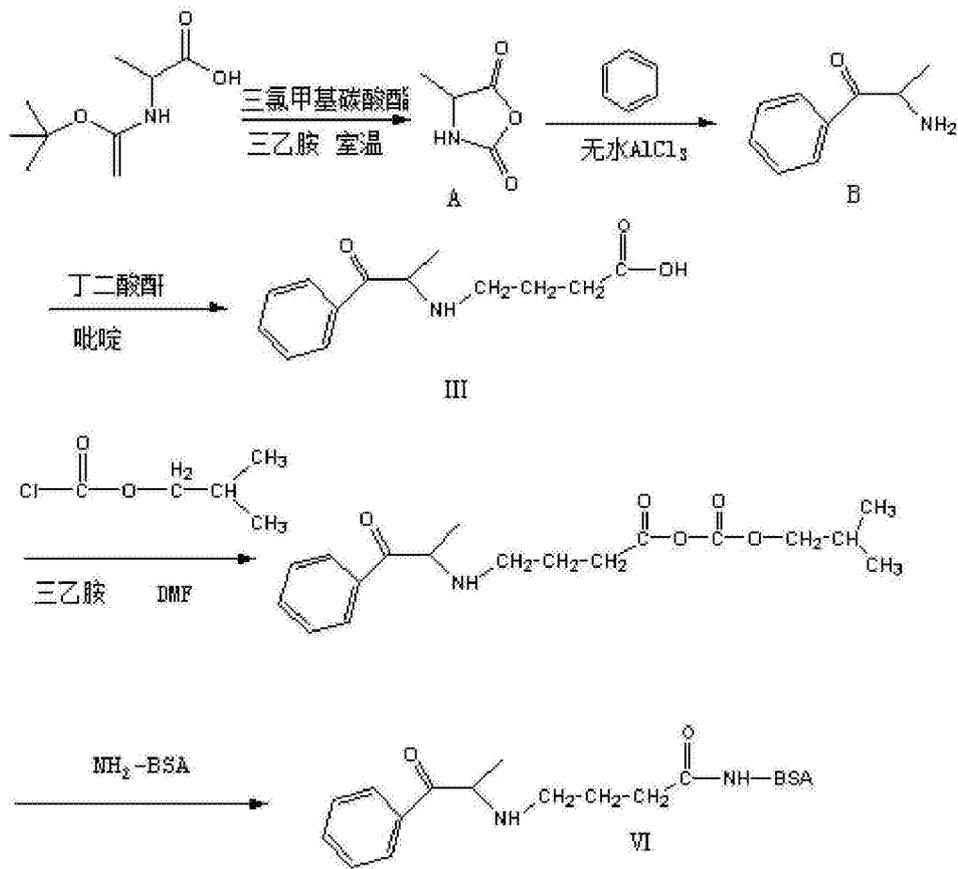


图7

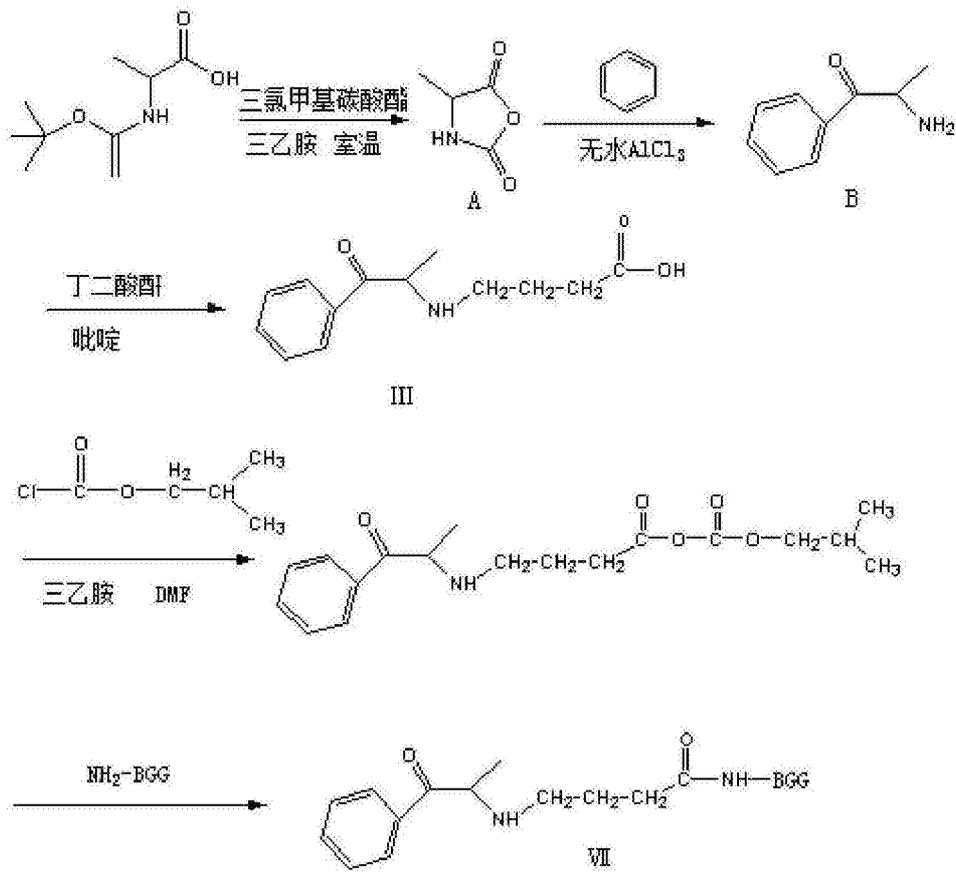


图8

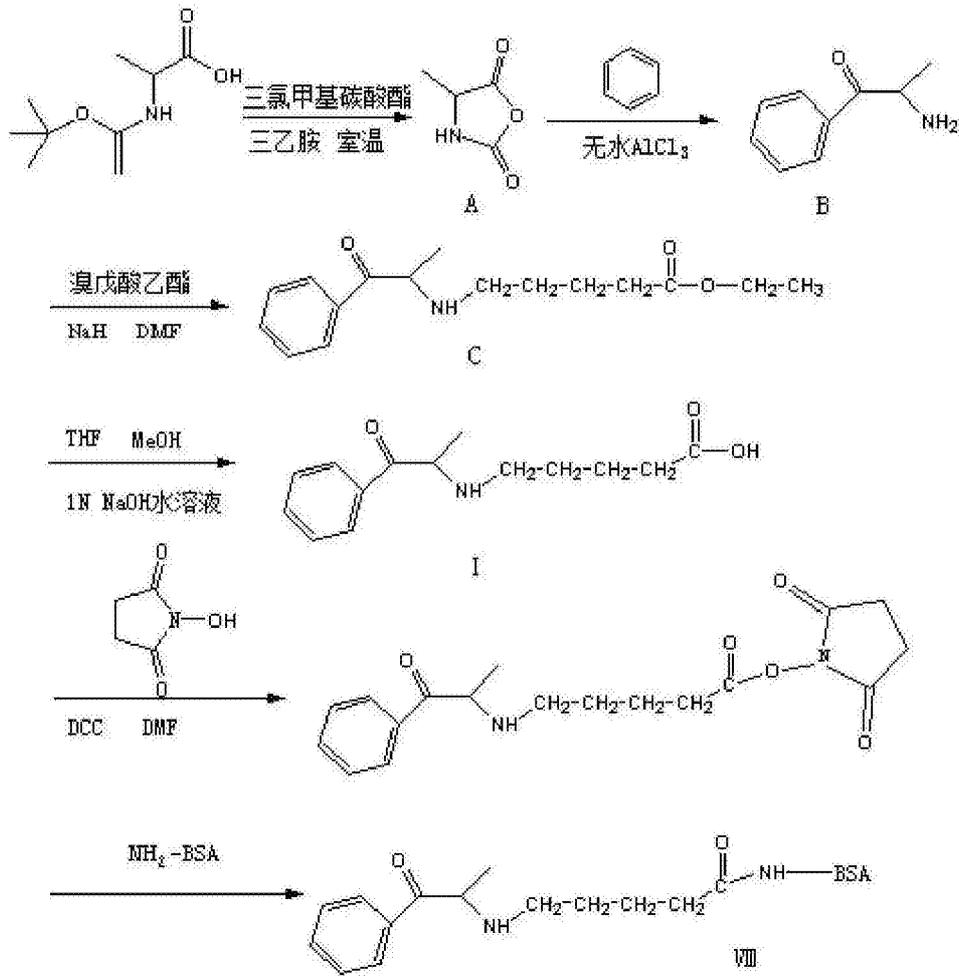


图9

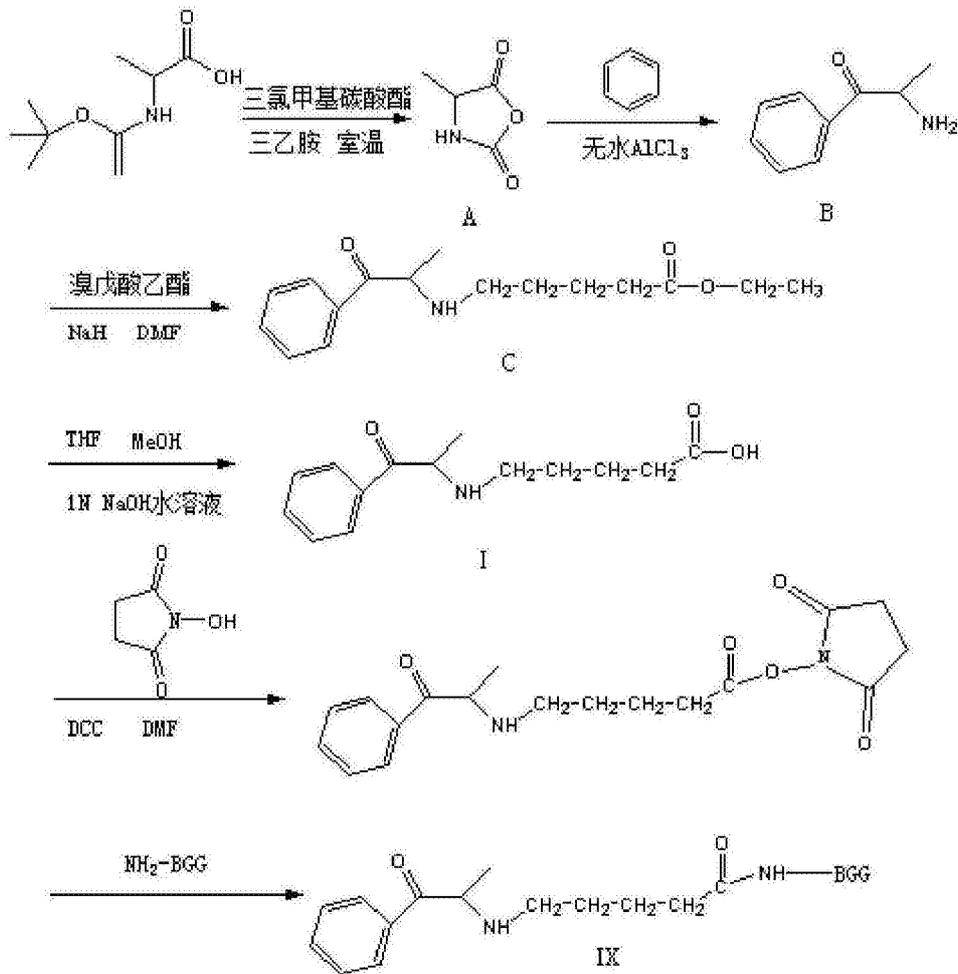


图10

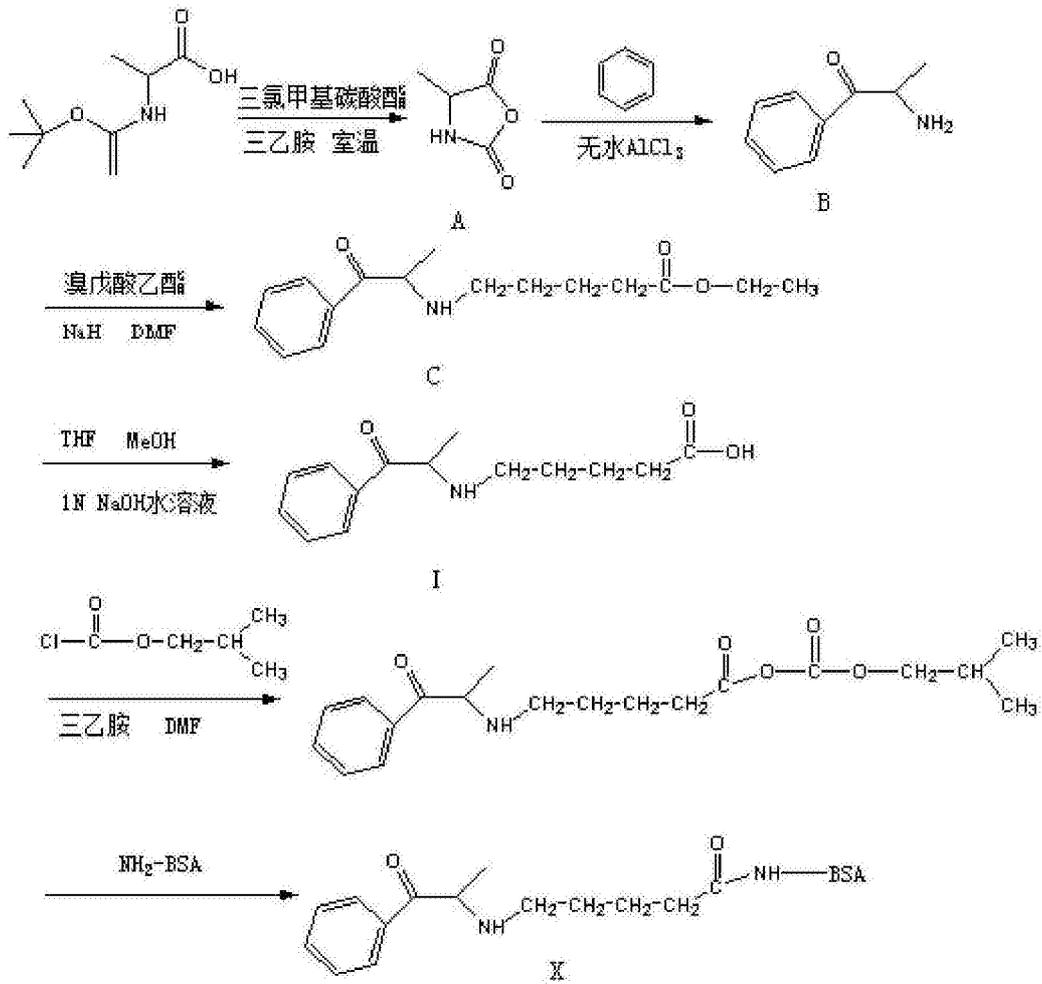


图11

专利名称(译)	一种卡西酮人工半抗原、人工抗原及其制备方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN108047071A</a>	公开(公告)日	2018-05-18
申请号	CN2017111287795.9	申请日	2017-12-07
[标]发明人	邵越水 徐建 王镇		
发明人	邵越水 徐建 王镇		
IPC分类号	C07C229/14 C07C227/18 C07K14/765 C07K14/47 C07K16/44 G01N33/531		
CPC分类号	C07C229/14 C07K14/4717 C07K14/765 C07K16/44 C07K19/00 G01N33/531		
代理人(译)	史晶晶		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及卡西酮类人工抗原结构领域，具体而言，涉及一种卡西酮人工半抗原、人工抗原及其制备方法和应用。一种卡西酮人工半抗原，其特征在于，其分子结构式如下所示：本发明提供的卡西酮人工半抗原，在卡西酮的N位上引入连接臂，在该修饰位点上引入连接臂能最大程度地保留卡西酮的特征结构，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。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卡西酮的特异性和亲合力更强。

