



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110950808 A

(43)申请公布日 2020.04.03

(21)申请号 201911043573.1

C07K 16/44(2006.01)

(22)申请日 2019.10.30

G01N 33/53(2006.01)

(71)申请人 杭州博拓生物科技股份有限公司

地址 310000 浙江省杭州市余杭区中泰街道富泰路17号

(72)发明人 王百龙 王晨

(74)专利代理机构 杭州天昊专利代理事务所

(特殊普通合伙) 33283

代理人 向庆宁

(51)Int.Cl.

C07D 243/38(2006.01)

C07K 14/435(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

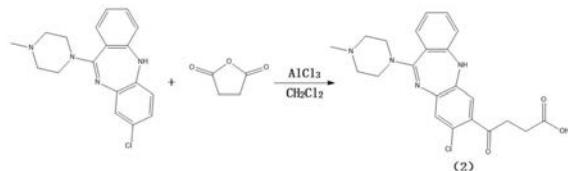
权利要求书2页 说明书9页 附图2页

(54)发明名称

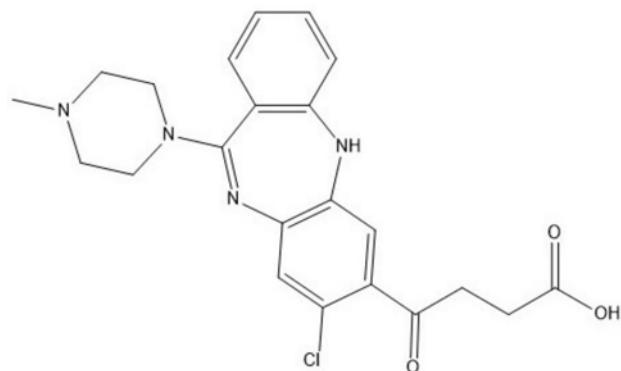
一种氯氮平人工抗原及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种氯氮平人工抗原及其制备方法,在氯氮平上引入丁二酸酐连接臂,得到氯氮平半抗原,本发明引入的连接臂没有其他特征结构,可以有效降低因为连接臂而带来的非特异性结合,而且引入连接臂的位点远离氯氮平的特征结构,制备得到的人工抗原具有更好的特异性;该半抗原与N-羟基琥珀酰亚胺及N,N-环己基碳二酰亚胺反应得到活性酯,其活性酯与载体蛋白发生偶联反应得到氯氮平人工抗原;本发明氯氮平人工抗原的制备工艺简单、生产成本低、所制备的氯氮平人工抗原可进行动物免疫,得到相应的抗体;所制备的氯氮平人工抗原及抗体可以被用来利用免疫检测方法检测样本中是否含有氯氮平以及其衍生类药物。

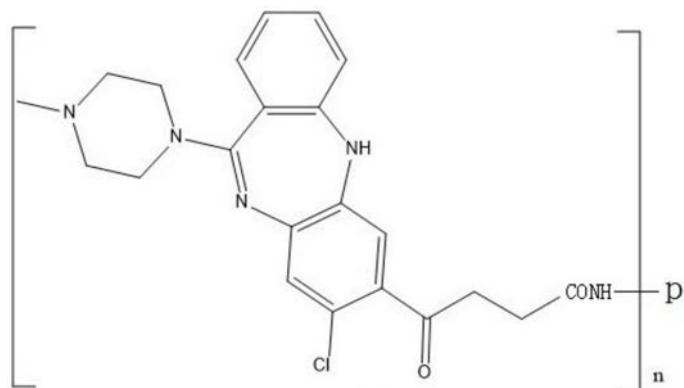


1. 一种氯氮平半抗原, 其特征在于, 其具有如式(I)所示的结构:



(I)。

2. 一种氯氮平人工抗原, 其特征在于, 其具有如式(II)所示的结构: 其中, p为载体蛋白, n表示一个载体蛋白上偶联的半抗原的个数;



(II)

3. 根据权利要求2所述的一种氯氮平人工抗原, 其特征在于, 所述载体蛋白选自牛血清白蛋白、牛γ球蛋白、牛甲状腺球蛋白、钥孔血蓝蛋白和鸡卵清白蛋白中的任意一种。

4. 一种制备氯氮平半抗原的方法, 其特征在于, 该方法用于制备权利要求1所述的半抗原, 包括如下步骤:

将氯氮平加入到反应容器中, 然后再加入二氯甲烷使氯氮平溶解完全, 控制温度在0℃, 加入丁二酸酐, 然后每1小时加入三氯化铝, 共加入三次; 恢复室温, 搅拌反应1-20小时; 反应结束后, 加入水、浓盐酸, 搅拌反应0.5-2小时, 然后用二氯甲烷萃取, 收集有机相, 减压蒸干溶剂得到产物; 然后用薄层色谱法纯化, 得到氯氮平半抗原, 其中, 整个反应中, 氯氮平: 丁二酸酐: 加入三氯化铝的总量=1:1:1~1:5:5, 此比例为物质的量之比, 三氯化铝分三次加入, 每次加入三氯化铝的质量相同。

5. 一种制备氯氮平人工抗原的方法, 其特征在于, 该方法用于制备权利要求2-3任一项所述的氯氮平人工抗原, 包括如下步骤:

(1) 氯氮平半抗原的制备:

将氯氮平加入到反应容器中, 然后再加入二氯甲烷使氯氮平溶解完全, 控制温度在0℃, 加入丁二酸酐, 然后每1小时加入三氯化铝, 共三次; 恢复室温, 搅拌反应1-20小时; 反应结束后, 加入水、浓盐酸, 搅拌反应0.5-2小时, 然后用二氯甲烷萃取, 收集有机相, 减压蒸干

溶剂得到产物；然后用薄层色谱法纯化，得到氯氮平半抗原，其中，整个反应中，氯氮平：丁二酸酐：加入三氯化铝的总量=1:1:1~1:5:5，此比例为物质的量之比，三氯化铝分三次加入，每次加入三氯化铝的质量相同；

(2) 氯氮平人工抗原的制备：

a. 称取氯氮平半抗原于另一反应容器中，加入N,N-二甲基甲酰胺使氯氮平半抗原溶解完全，再加入N-羟基琥珀酰亚胺和N,N-二环己基碳二亚胺，室温搅拌反应过夜，反应结束后离心，取上清液记为A液；其中，氯氮平半抗原：N-羟基琥珀酰亚胺：N,N-二环己基碳二亚胺=1:1:1~1:5:5，此比例为物质的量之比；

b. 制备pH为7.2~7.4的PBS缓冲液；

c. 称取牛血清白蛋白溶于步骤b中的PBS缓冲液中，得到的溶液记为B液；B液中，载体蛋白浓度为2~20mg/ml；

d. 在快速搅拌下，将A液缓慢滴加到B液，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，A液：B液=(1~5000):1000，此比例为体积比；

e. 将人工抗原混合液移入透析袋中，用步骤b中所述的PBS缓冲液透析，透析结束后，离心取上清液即得到氯氮平人工抗原。

6. 一种抗体，其特征在于，该抗体是采用权利要求2~3中任一项所述的氯氮平人工抗原免疫动物而获得。

7. 根据权利要求6所述的一种抗体，其特征在于，所述抗体为单克隆抗体或者多克隆抗体。

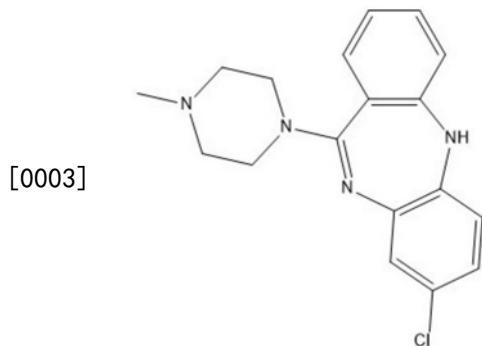
一种氯氮平人工抗原及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明具体涉及一种氯氮平人工抗原及其制备方法。

背景技术

[0002] 氯氮平为淡黄色结晶性粉末；无臭，无味，其结构式为：



[0004] 本品系二苯二氮杂卓类，对脑内5-羟色胺(5-HT2A)受体和多巴胺(DA1)受体的阻滞作用较强，对多巴胺(DA4)受体的也有阻滞作用，对多巴胺(DA2)受体的阻滞作用较弱，此外还有抗胆碱(M1)，抗组胺(H1)及抗a-肾上腺素受体作用，锥体外系反应及迟发性运动障碍较轻，一般不引起血中泌乳素增高。能直接抑制脑干网状结构上行激活系统，具有强大镇静催眠作用，用于治疗多种类型的神经分裂症。

[0005] 治疗药物监测(therapeutic drug monitoring, 简称TDM)是指在临床进行药物治疗过程中，观察药物疗效的同时，定时采集患者的血液(有时采集尿液、唾液等液体)，测定其中的药物浓度，探讨药物的体内过程，以便根据患者的具体情况，以药动学和药效学基础理论为指导，借助先进的分析技术与电子计算机手段，并利用药代动力学原理和公式，使给药方案个体化。从而达到满意的疗效及避免发生毒副反应，同时也可为药物过量中毒的诊断和处理提供有价值的实验室依据，将临床用药从传统的经验模式提高到比较科学的水平。此类监测允许例如识别不依从他们的服药方案的患者、未达到治疗剂量的患者、在治疗剂量下非响应的患者、具有亚最佳耐药性的患者、具有药代动力学药物-药物相互作用的患者、或具有导致血浆浓度不良的异常代谢的患者。患者吸收、分布、代谢、及排泄安定药物的能力存在相当大的个体差异。此类差异可能由并发症、年龄、伴随药物或遗传特性引起。不同的药物配方也能够影响安定药物的代谢。TDM允许进行剂量优化用于个体患者，改善治疗和功能结果。

[0006] 用于测定药物(例如氯氮平)的血清或血浆浓度水平的方法涉及使用带有UV或质谱检测的高效液相色谱(HPLC)，气相色谱-质谱联用分析仪(GC-MS)进行检测，以及免疫测定等，其中，高效液相色谱(HPLC)，气相色谱-质谱联用分析(GC-MS)等需要大型分析仪器，这些分析方法存在仪器昂贵，需要专业技术人员操作，需要在专业实验室中进行等缺点。

[0007] 由于氯氮平是一个小分子，只具备免疫反应性，不具备免疫原性，必须将它连结到蛋白质大分子上，借助大分子的T细胞表位刺激机体才能产生抗体特异性免疫应答。因此研制和开发出一种新的、有效的氯氮平人工抗原的合成方法是非常必要的。

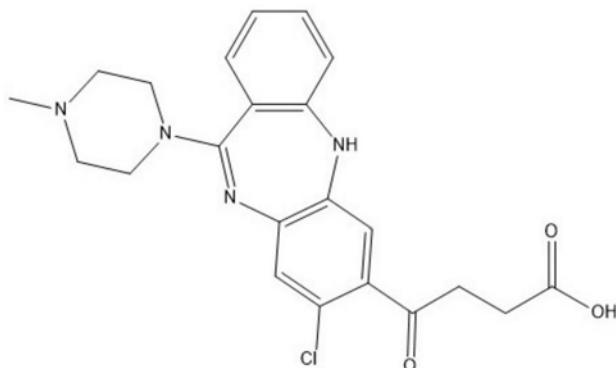
发明内容

[0008] 针对上述情况,为克服现有技术的缺陷,本发明提供一种氯氮平人工抗原及其制备方法。

[0009] 为了实现上述目的,本发明提供以下技术方案:

[0010] 一种氯氮平半抗原,其特征在于,其具有如式(I)所示的结构:

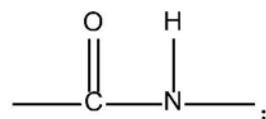
[0011]



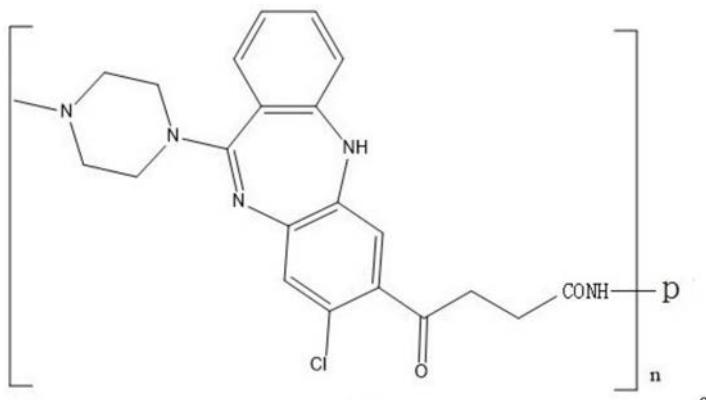
(I)

。

[0012] 一种氯氮平人工抗原,其具有如式(II)所示的结构:其中,p为载体蛋白,n表示一个载体蛋白上偶联的半抗原的个数;n的取值范围为15-70;其中,-CONH-表示酰胺基,即



[0013]



(II)

[0014] 进一步地,所述载体蛋白选自牛血清白蛋白、牛 γ 球蛋白、牛甲状腺球蛋白、钥孔血蓝蛋白和鸡卵清白蛋白中的任意一种。

[0015] 一种制备氯氮平半抗原的方法,该方法用于制备以上所述的半抗原,包括如下步骤:

[0016] 将氯氮平加入到反应容器中,然后再加入二氯甲烷使氯氮平溶解完全,控制温度在0℃,加入丁二酸酐,然后每1小时加入三氯化铝,共加入三次;恢复室温,搅拌反应1-20小时;反应结束后,加入水、浓盐酸,搅拌反应0.5-2小时,然后用二氯甲烷萃取,收集有机相,减压蒸干溶剂得到产物;然后用薄层色谱法纯化,得到氯氮平半抗原,其中,整个反应中,氯氮平:丁二酸酐:加入三氯化铝的总量=1:1:1~1:5:5,此比例为物质的量之比,三氯化铝

分三次加入,每次加入三氯化铝的质量相同。控制温度在0℃以及分批次加入三氯化铝的能够减少副产物的产生。

[0017] 一种制备氯氮平人工抗原的方法,该方法用于制备以上所述的氯氮平人工抗原,包括如下步骤:

[0018] (1) 氯氮平半抗原的制备:

[0019] 将氯氮平加入到反应容器中,然后再加入二氯甲烷使氯氮平溶解完全,控制温度在0℃,加入丁二酸酐,然后每1小时加入三氯化铝,共加入三次;恢复室温,搅拌反应1-20小时;反应结束后,加入水、浓盐酸,搅拌反应0.5-2小时,然后用二氯甲烷萃取,收集有机相,减压蒸干溶剂得到产物;然后用薄层色谱法纯化,得到氯氮平半抗原,其中,整个反应中,氯氮平:丁二酸酐:加入三氯化铝的总量=1:1:1~1:5:5,此比例为物质的量之比,三氯化铝分三次加入,每次加入三氯化铝的质量相同。

[0020] (2) 氯氮平人工抗原的制备:

[0021] a. 称取氯氮平半抗原于另一反应容器中,加入N,N-二甲基甲酰胺使氯氮平半抗原溶解完全,再加入N-羟基琥珀酰亚胺和N,N-二环己基碳二亚胺,室温搅拌反应过夜,反应结束后离心,取上清液记为A液;其中,氯氮平半抗原:N-羟基琥珀酰亚胺:N,N-二环己基碳二亚胺=1:1:1~1:5:5,此比例为物质的量之比;

[0022] b. 制备pH为7.2~7.4的PBS缓冲液;

[0023] c. 称取牛血清白蛋白溶于步骤b中的PBS缓冲液中,得到的溶液记为B液;B液中,载体蛋白浓度为2-20mg/ml;

[0024] d. 在快速搅拌下,将A液缓慢滴加到B液,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,A液:B液=(1~5000):1000,此比例为体积比;

[0025] e. 将人工抗原混合液移入透析袋中,用步骤b中所述的PBS缓冲液透析,透析结束后,离心取上清液即得到氯氮平人工抗原。

[0026] 一种抗体,该抗体是采用以上所述的氯氮平人工抗原免疫动物而获得。

[0027] 进一步地,所述抗体为单克隆抗体或者多克隆抗体。

[0028] 本发明的有益效果是:

[0029] (1) 本发明以氯氮平为原料合成人工抗原,在氯氮平上引入丁二酸酐连接臂,得到氯氮平半抗原;本发明只需要一步就能得到半抗原,具有较高的产率,大大节约了时间成本和人工成本,另外本发明引入的连接臂没有其他特征结构,可以有效降低因为连接臂而带来的非特异性结合,而且引入连接臂的位点远离氯氮平的特征结构,制备得到的人工抗原具有更高的特异性;该半抗原与N-羟基琥珀酰亚胺及N,N-环己基碳二酰亚胺反应得到活性酯,其活性酯与载体蛋白发生偶联反应得到氯氮平人工抗原;本发明中氯氮平人工抗原的制备工艺简单、原材料容易得到,生产成本低,所制备的氯氮平人工抗原可进行动物免疫,得到相应的抗体。

[0030] (2) 本发明制备的氯氮平人工抗原及抗体可以被用来利用免疫检测方法检测样本中是否含有氯氮平以及其衍生类药物,这里的样本是指哺乳动物或者人的体液样本,例如唾液、尿液、汗液,或者哺乳动物或者人的组织样本,例如肝脏、脾等组织。氯氮平人工抗原及抗体还可以广泛应用于药物依赖的检测以及治疗药物监测(TDM)及优化;免疫检测方便,准确,价格低廉,操作简单,可以很好地代替液相色谱HPLC和气相色谱-质谱联用分析仪GC/

MS等方法,具有很好的应用价值。

附图说明

- [0031] 图1是氯氮平半抗原的合成路线图。
- [0032] 图2是氯氮平人工抗原的合成路线图。
- [0033] 图3是氯氮平半抗原、氯氮平人工抗原、牛血清白蛋白的紫外扫描图谱。
- [0034] 图4是横向流动测试试纸的结构示意图。

具体实施方式

[0035] 以下结合附图对本发明的技术方案做进一步详细说明,应当指出的是,具体实施方式只是对本发明的详细说明,不应视为对本发明的限定。

[0036] 以下实施例中所使用的物质(包括反应原料、其他试剂等)及仪器等均能够通过商业途径获得。

[0037] 实施例1

[0038] (1) 氯氮平半抗原的制备

[0039] 称取200mg (0.61mmol) 氯氮平,加入到50ml单口圆底烧瓶中,然后再加入10ml二氯甲烷,使氯氮平溶解完全,控制温度在0℃,加入100mg (1mmol) 丁二酸酐,然后每1小时加入75mg (0.56mmol) 三氯化铝,共三次。恢复室温,搅拌反应18小时;反应结束后,加入5ml水,1ml浓盐酸,搅拌反应半小时,然后用10ml二氯甲烷萃取3次。收集有机相,减压蒸干溶剂得到178mg白色固体产物;然后用薄层色谱法纯化,TLC:层析液为乙酸乙酯,产物比移值Rf=0.4~0.5;得到氯氮平半抗原102mg,具体合成路线如图1所示;

[0040] (2) 氯氮平人工抗原的制备

[0041] a. 称取50mg (0.12mmol) 半抗原于50ml圆底烧瓶中,加入3ml N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 使氯氮平半抗原溶解完全,再加入34mg (0.3mmol) N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和64mg (0.3mmol) N,N-二环己基碳二亚胺 (DCC),室温搅拌反应过夜,反应结束后离心,取上清液记为A液。

[0042] b. 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7.2~7.4。

[0043] c. 称取0.25g牛血清白蛋白溶于50ml步骤b中所述的PBS缓冲液中,得到的溶液记为B液。

[0044] d. 在快速搅拌下,将A液缓慢滴加到B液,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。

[0045] e. 将人工抗原混合液移入透析袋中,用步骤b中所述的PBS缓冲液透析9次,透析结束后,离心取上清液即得到氯氮平人工抗原,具体合成路线如图2所示。

[0046] 将牛γ球蛋白 (BGG)、牛甲状腺球蛋白 (BTG)、钥孔血蓝蛋白 (KLH) 和鸡卵清白蛋白 (OVA) 中的任一种替换牛血清白蛋白 (BSA) 进行以上所述的步骤,同样地,可以制备得到不同的氯氮平人工抗原。

[0047] (3) 氯氮平人工抗原的鉴定:

[0048] (a) 紫外扫描图谱

[0049] 氯氮平半抗原,氯氮平人工抗原及牛血清白蛋白的紫外扫描图,如图3所示;由图3可知,本发明成功制备了氯氮平人工抗原。

[0050] (b) 偶联比测定:估算偶联物中被偶联的两种分子的比率(偶联比率)的方法虽然很多,但都是依据检测偶联物中被偶联的两种分子含量(或相对含量)的原理建立起来的。分光光度法是利用物质对光的吸收与其浓度呈比例关系的原理分别测定被偶联的两种分子浓度。在大分子与小分子偶联物中,两种分子均有各自不同的紫外扫描光谱,并表现出光谱图迭加的性质。

[0051] 摩尔吸光系数 ϵ :用pH为7.2~7.4的PBS缓冲液来配制氯氮平半抗原溶液,得到氯氮平半抗原浓度分别为0,5,10,20,30,40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的PBS溶液,通过紫外扫描图3可知氯氮平半抗原的最大吸收波长为288nm,在288nm处测吸光度值,每个浓度做平行样。摩尔吸光系数 $\epsilon = A / (bc)$,其中,A为吸光度,b为吸收池厚度,单位为cm,此处b=1cm;c为吸光物质的摩尔浓度,单位为mol/L;本发明计算得 $\epsilon = 3414.3 \text{L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ 。

[0052] 偶联物蛋白浓度的测定:用pH为7.2~7.4的PBS缓冲液分别配制牛血清白蛋白浓度为0,1,2,4,8,10,20 mg/ml 的牛血清白蛋白PBS溶液1ml,加入3ml考马斯亮蓝染色液,立即混匀,30℃水浴温热5分钟,每个浓度做平行样,在655nm处测吸光度值,绘制牛血清白蛋白浓度与吸光度值的关系曲线。将氯氮平人工抗原溶液按一定比例稀释,在655nm处测得氯氮平人工抗原的吸光度值,从曲线上得到氯氮平人工抗原溶液中的相应蛋白浓度值。本发明计算得氯氮平人工抗原溶液中蛋白浓度为 $c = 2.215 \text{mg}/\text{ml}$ 。

[0053] 偶联比测定:将偶联物即氯氮平人工抗原溶液,用pH为7.2~7.4的PBS缓冲液稀释到浓度为100 $\mu\text{g}/\text{ml}$,在288nm处测得吸光度值 A_1 ;将牛血清白蛋白用pH为7.2~7.4的PBS缓冲液稀释到浓度为100 $\mu\text{g}/\text{ml}$,在278nm处测得吸光度值 A_2 ,则偶联比率 γ 为: $\gamma = [(A_1 - A_2) / \epsilon] / (c * 100 \times 10^{-3} / 65000)$,其中 ϵ 为氯氮平半抗原摩尔吸光系数 $\text{L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$,65000为牛血清白蛋白的分子量, $c * 100 \times 10^{-3}$ 为氯氮平人工抗原溶液中蛋白浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$),本发明计算得 $\gamma \approx 28$ 。

[0054] 实施例2

[0055] (1) 氯氮平半抗原的制备

[0056] 称取1mmol氯氮平,加入到100ml单口圆底烧瓶中,然后再加入17ml二氯甲烷,使氯氮平溶解完全,控制温度在0℃,加入1mmol丁二酸酐,然后每1小时加入0.35mmol三氯化铝,共三次。恢复至室温,搅拌反应15小时;反应结束后,加入少量水和浓盐酸终止反应,本实施例中,加入5ml水和1ml浓盐酸;搅拌反应半小时,然后用15ml二氯甲烷萃取3次。收集有机相,减压蒸干溶剂得到固体产物;然后用薄层色谱法纯化,TLC:层析液为乙酸乙酯,产物比移值 $R_f = 0.4 \sim 0.5$;得到氯氮平半抗原(2),具体合成路线如图1所示;

[0057] (2) 氯氮平人工抗原的制备

[0058] a. 称取1mmol半抗原于150ml圆底烧瓶中,加入30ml N,N-二甲基甲酰胺(DMF)使氯氮平半抗原溶解完全,再加入1mmol N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和1mmol N,N-二环己基碳二亚胺(DCC),室温搅拌反应过夜,反应结束后离心,取上清液记为A液。

[0059] b. 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7.2~7.4。

[0060] c. 称取2.5g牛血清白蛋白溶于250ml步骤b中所述的PBS缓冲液中,得到的溶液记

为B液。

[0061] d. 在快速搅拌下,将A液缓慢滴加到B液,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。

[0062] e. 将人工抗原混合液移入透析袋中,用步骤b中所述的PBS缓冲液透析6次,透析结束后,离心取上清液即得到氯氮平人工抗原(4),具体合成路线如图2所示。经紫外扫描图谱鉴定,本实施例成功制备了氯氮平人工抗原。

[0063] 实施例3

[0064] (1) 氯氮平半抗原的制备

[0065] 称取1mmol氯氮平,加入150ml单口圆底烧瓶中,然后再加入17ml二氯甲烷,使氯氮平溶解完全,控制温度在0℃,加入5mmol丁二酸酐,然后每1小时加入1.6mmol三氯化铝,共三次。恢复至室温,搅拌反应20小时;反应结束后,加入少量水和浓盐酸终止反应,本实施例中,加入10ml水和2ml浓盐酸;搅拌反应1小时,然后用30ml二氯甲烷萃取3次。收集有机相,减压蒸干溶剂得到固体产物;然后用薄层色谱法纯化,TLC:层析液为乙酸乙酯,产物比移值R_f=0.4~0.5;得到氯氮平半抗原(2),具体合成路线如图1所示;

[0066] (2) 氯氮平人工抗原的制备

[0067] a. 称取1mmol氯氮平半抗原于150ml圆底烧瓶中,加入50ml N,N-二甲基甲酰胺(DMF)使氯氮平半抗原溶解完全,再加入5mmol N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和5mmol N,N-二环己基碳二亚胺(DCC),室温搅拌反应过夜,反应结束后离心,取上清液记为A液。

[0068] b. 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7.2~7.4。

[0069] c. 称取5g牛血清白蛋白溶于250ml步骤b得到的PBS缓冲液中,得到的溶液记为B液。

[0070] d. 在快速搅拌下,将A液缓慢滴加到B液,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。

[0071] e. 将人工抗原混合液移入透析袋中,用步骤b中所述的PBS缓冲液透析9次,透析结束后,离心取上清液即得到氯氮平人工抗原(4),具体合成路线如图2所示。经紫外扫描图谱鉴定,本实施例成功制备了氯氮平人工抗原。

[0072] 抗体的制备

[0073] 可以用以上所制备的氯氮平人工抗原来免疫动物,例如鼠,兔,或其他哺乳动物来生产多克隆抗体,也可以用杂交瘤细胞来产生单克隆抗体,这些方法是本领域现有公知的技术,在此不再赘述,可以参见一些教科书或免疫手册来获得本发明的抗体或抗体片段(制备和使用抗体-实用手册(Making AND Using Antibodies-A practical handbook).CRC Press,2007)。由上述氯氮平人工抗原制备得到的抗体可以特异识别人工抗原或者半抗原或者小分子物质,而不能识别其它无关的抗原或者小分子物质。这里所谓“特异性”是指该抗体仅能识别或结合某一特定类型的抗原,而不识别或结合其他类型的抗原。

[0074] 氯氮平人工抗原及抗体的应用

[0075] 本发明合成的氯氮平半抗原或者氯氮平人工抗原以及利用他们产生的抗体(此处抗体指的是:单克隆抗体或者多克隆抗体)可以被用来利用免疫检测方法检测样本中是否含有氯氮平以及其衍生类药物,这里的样本一般是指哺乳动物或者人的体液样本,例如唾

液、尿液、汗液，或者哺乳动物或者人的组织样本，例如肝脏、脾等组织。所述的“免疫检测方法”一般是利用抗体与抗原结合的原理进行的免疫分析或者检测方法，这种免疫检测方法包括酶联免疫(ELISA)方法，也包括横向流动(lateral flow)测试试纸(包括荧光法和胶体金法)的方法，也可以包括竞争方法。

[0076] 横向流动测试试纸它可以用吸水或者非吸水性材料制成，一个测试条可以使用多种材料，用于液体的传递。测试条的一种材料可以叠加在另一种测试条材料上，例如，滤纸叠加在硝化纤维上。或者，测试条中至少含有一种材料的一个区域位于另一种至少含有一种不同材料的区域之后。在这种情况下，各区域之间液体是流通的，它们之间可以相互叠加或者不叠加。测试条上的材料可以固定在例如塑料衬片的支持物上或者硬质表面，以加强测试条可持力。测试条各区域可按如下排列：加样区，至少一个试剂区，至少一个检测结果区，至少一个控制区，至少一个掺假检测区和液体吸收区。如果检测区包括一个控制区，优选控制区位于检测结果区的被分析物检测区之后。所有这些区或其组合可以在含有一种材料的单一试纸条上。另外，这些区由不同的材料制成，并按液体传递的方向连接在一起。例如，不同区域可以直接或者间接进行液体传递。在本实施例中，不同的区可以沿液体传递的方向，一个区域的末端和另一个区域始端相连，或沿液体传递方向相互叠加，或者通过其他材料相连接，例如连接介质材料(优选吸水性材料例如滤纸，玻璃纤维，无纺布或硝酸纤维素)。连接材料能够使包含各区域的末端与始端相接的材料、包含各区域的末端与始端相接但液体不流通的材料、或包含各区域相互重叠(例如但不限于从头到尾重叠)但液体不流通的材料，形成液体流通。横向流动测试试纸的一般结构如图4所示。

[0077] 除此之外，也可以将本发明的氯氮平人工抗原制备的抗体用于免疫治疗因为氯氮平引起的各种疾病，例如，用于治疗氯氮平成瘾的一种免疫试剂。这样抗体就作为一种药物试剂来使用。

[0078] 用实施例1所制备的氯氮平人工抗原及抗体作为主要原料制成胶体金侧向层析检测试纸条，胶体金侧向层析检测试纸条的制备采用本领域现有公知的技术制备即可；用此试纸条对氯氮平标准品进行检测，检测样品的使用量为50 μ l；具体检测数据如表1所示，其中，m表示单个样品重复检测的次数；结果阴性、阳性两列的数字分别表示：检测结果为阴性的次数、检测结果为阳性的次数，由此进一步地，可以得到检测结果的准确率；例如氯氮平的浓度为0ng/mL表示阴性，30次检测结果全部为阴性，即阴性的检测次数为30，则准确率为100%。

[0079] 表1检测结果

检测样品氯氮平 的浓度(ng/mL)	m	结果	
		阴性	阳性
[0080]	0	30	30
	50	30	0
	100	30	20
	125	30	28
	150	30	30
	300	30	30

[0081] 表1中检测结果表明本发明所制备的氯氮平人工抗原、抗体具有较高的特异性,试纸条在对氯氮平的检测中具有很高的灵敏度,本实施例中,灵敏度为100ng/ml,完全符合市场检测的需求。

[0082] 临幊上可以根据检测结果方便地判断病人体液中的药物浓度,从而调整用药剂量和周期,更精准的用药,可以预防头痛,焦虑失眠,嗜睡,小便失禁,等不良反应;也可以进行药物依赖性的研究。

[0083] 交叉反应实验:用实施例1制备的氯氮平人工抗原及抗体作为主要原料制成胶体金侧向层析检测试纸条,对表2中物质的标准品进行检测,样品使用量为50μl。

[0084] 表2交叉反应结果

样品	浓度 ng/ml	0	50	100	150	1000
氯氮平	-	+	+	+	+	+
曲唑酮	-	-	-	-	-	-
奥氮平	-	-	-	-	-	-
芬太尼	-	-	-	-	-	-
巴比妥	-	-	-	-	-	-
奥沙西泮	-	-	-	-	-	-
美沙酮	-	-	-	-	-	-
齐拉西酮	-	-	-	-	-	-
吗啡	-	-	-	-	-	-
可待因	-	-	-	-	-	-
曲马多	-	-	-	-	-	-
安定	-	-	-	-	-	-
氯胺酮	-	-	-	-	-	-
海洛因	-	-	-	-	-	-
布洛芬	-	-	-	-	-	-
咖啡因	-	-	-	-	-	-
伪麻黄碱	-	-	-	-	-	-
丁丙诺菲	-	-	-	-	-	-
利培酮						

[0085] [0086] 注：“+”表示有交叉反应，“-”表示没有反应。

[0087] 结果显示本发明制备得到的氯氮平人工抗原，抗体具有高度特异性，与其他药物没有交叉反应。

[0088] 显然，所描述的实施例仅仅是本发明的一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都应当属于本发明保护的范围。

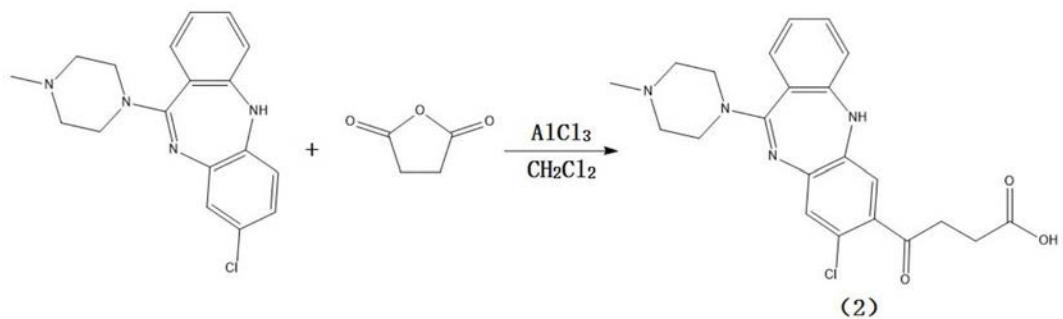


图1

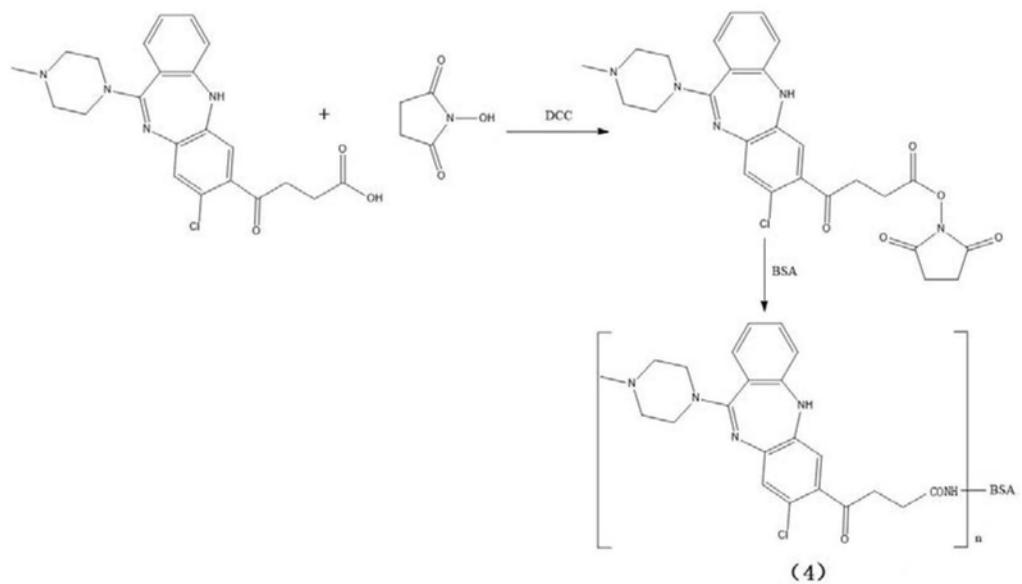


图2

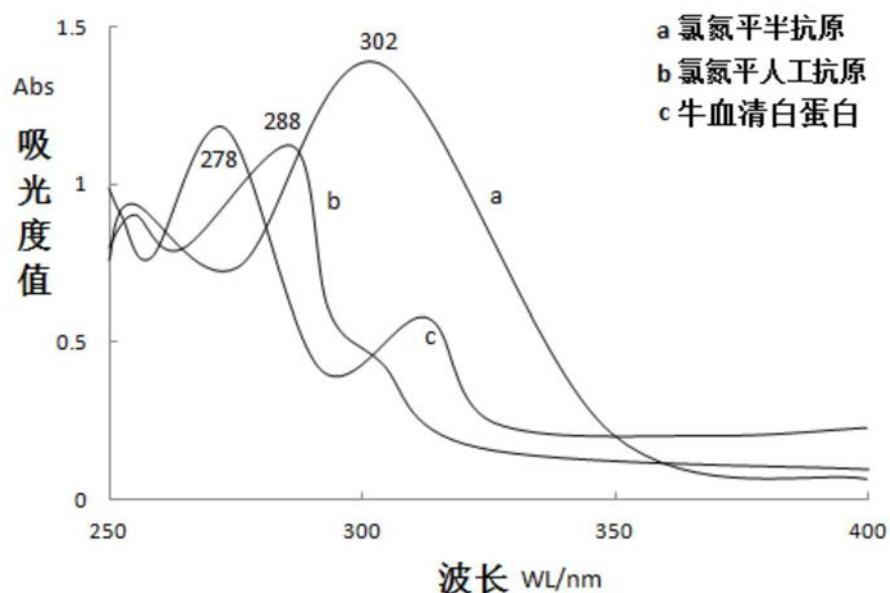


图3

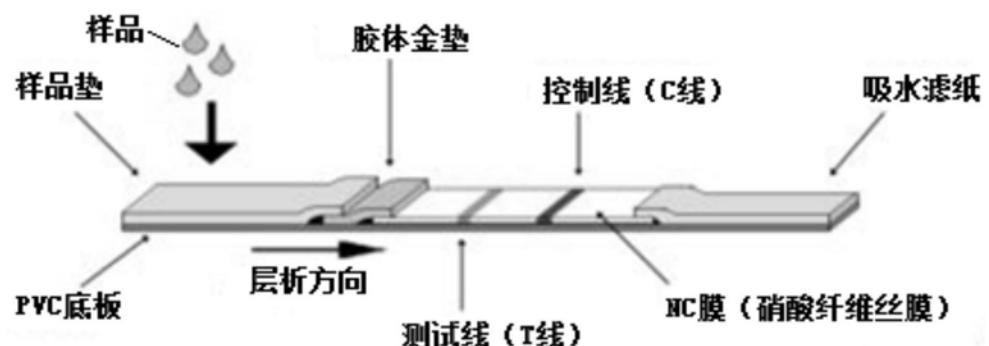


图4

专利名称(译)	一种氯氮平人工抗原及其制备方法		
公开(公告)号	CN110950808A	公开(公告)日	2020-04-03
申请号	CN201911043573.1	申请日	2019-10-30
[标]申请(专利权)人(译)	杭州博拓生物科技股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	杭州博拓生物科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	杭州博拓生物科技股份有限公司		
[标]发明人	王百龙 王晨		
发明人	王百龙 王晨		
IPC分类号	C07D243/38 C07K14/435 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 G01N33/53		
CPC分类号	C07D243/38 C07K14/435 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 G01N33/53		
代理人(译)	向庆宁		
外部链接	Espacenet	Sipo	

摘要(译)

本发明公开了一种氯氮平人工抗原及其制备方法，在氯氮平上引入丁二酸酐连接臂，得到氯氮平半抗原，本发明引入的连接臂没有其他特征结构，可以有效降低因为连接臂而带来的非特异性结合，而且引入连接臂的位点远离氯氮平的特征结构，制备得到的人工抗原具有更好的特异性；该半抗原与N-羟基琥珀酰亚胺及N,N-环己基碳二酰亚胺反应得到活性酯，其活性酯与载体蛋白发生偶联反应得到氯氮平人工抗原；本发明氯氮平人工抗原的制备工艺简单、生产成本低、所制备的氯氮平人工抗原可进行动物免疫，得到相应的抗体；所制备的氯氮平人工抗原及抗体可以被用来利用免疫检测方法检测样本中是否含有氯氮平以及其衍生类药物。

