



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103601662 A

(43) 申请公布日 2014. 02. 26

(21) 申请号 201310593798. 0

C07K 14/75 (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 11. 21

C07K 14/47 (2006. 01)

(71) 申请人 深圳市药品检验所

C07K 14/465 (2006. 01)

地址 518057 广东省深圳市南山区高新中二
道 28 号

C07K 1/107 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

(72) 发明人 王铁杰 殷果 韩东岐 鲁艺

王珏 秦斌 谭渺 闫研 关潇滢

黎雪清 王防修 蒋永青

(74) 专利代理机构 广州三环专利代理有限公司

44202

代理人 郝传鑫 熊永强

(51) Int. Cl.

C07D 209/14 (2006. 01)

C07K 14/765 (2006. 01)

C07K 14/77 (2006. 01)

C07K 14/795 (2006. 01)

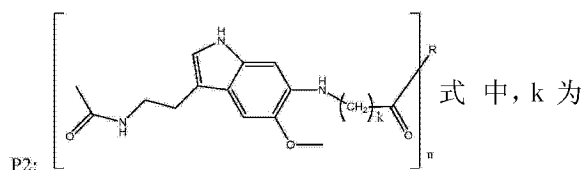
权利要求书3页 说明书11页 附图1页

(54) 发明名称

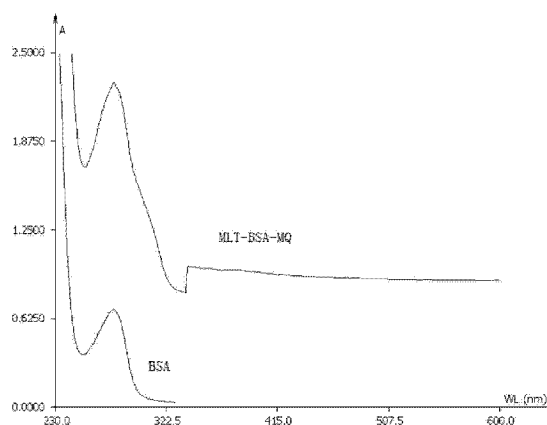
一种褪黑素半抗原、褪黑素完全抗原及其制备方法
和应用

(57) 摘要

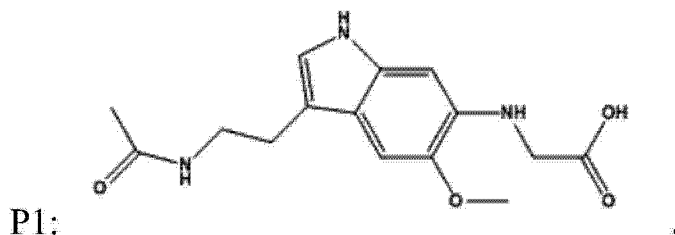
本发明提供了一种褪黑素半抗原, 以及由该半抗原制备的褪黑素完全抗原, 该褪黑素完全抗原的结构式如 P2 所示:



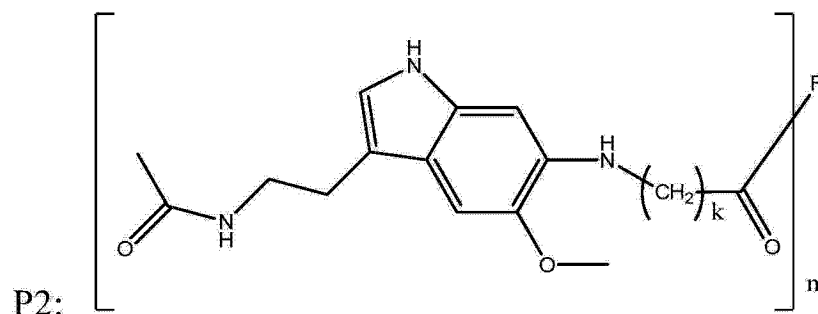
1 ~ 5 的自然数, R 为载体蛋白, n 为 10 ~ 20 的自然数; 该褪黑素完全抗原中, 其褪黑素分子的抗原决定簇能充分暴露, 且具有较完整的空间构象, 因此, 本发明提供的褪黑素完全抗原具有较好的免疫原性。本发明还提供了一种褪黑素半抗原及褪黑素完全抗原的制备方法和应用。



1. 一种褪黑素半抗原,其特征在于,结构式如 P1 所示:



2. 一种褪黑素完全抗原,其特征在于,结构式如 P2 所示:

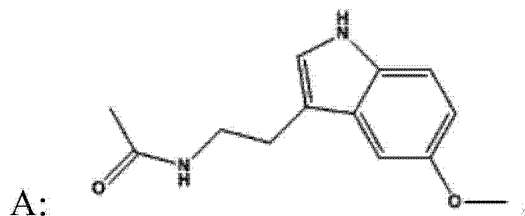


式中, k 为 1 ~ 5 的自然数, R 为载体蛋白, n 为 10 ~ 20 的自然数。

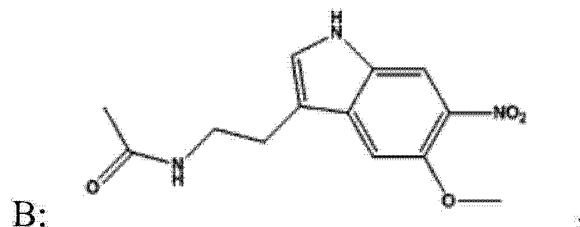
3. 如权利要求 2 所述的一种褪黑素完全抗原,其特征在于,所述载体蛋白为球蛋白、牛血清白蛋白、鸡卵清蛋白、钥孔血蓝蛋白、兔血清白蛋白、人血清白蛋白、甲状腺球蛋白、纤维蛋白原、兔丙种球蛋白或鸡的丙种球蛋白。

4. 一种褪黑素半抗原的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

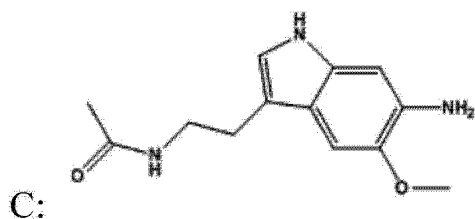
S10、提供褪黑素,其结构式如 A 所示:



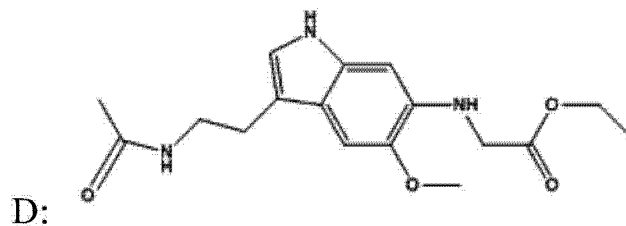
将所述褪黑素和硝酸盐按 1:1.05 ~ 1:1.1 的摩尔比溶于 85% ~ 98% 浓硫酸中,得到反应液,所述反应液在 0 ~ 5℃ 下进行硝化反应 2 ~ 3 小时后,经调节 pH 值至碱性,随后进行分离纯化,得到化合物 B,其结构式如 B 所示:



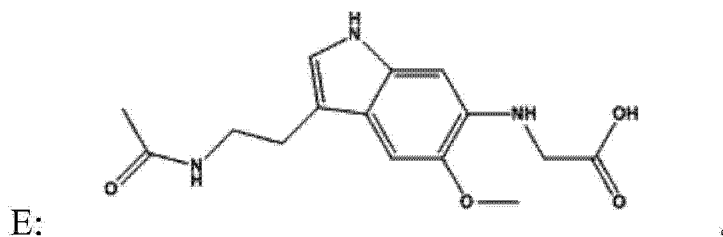
S20、酸性条件下,将所述化合物 B 和还原性金属按 1:10 ~ 1:20 的摩尔比溶于第一有机溶剂中得到反应液,所述反应液在 70 ~ 80℃ 下进行还原反应 2 ~ 4 小时后,经调节 pH 值至碱性,随后进行抽滤得到滤液,所得滤液经萃取、过柱,得到化合物 C,其结构式如 C 所示:



S30、在缚酸剂存在的条件下,将所述化合物 C 和溴乙酸乙酯按 1:1.05 ~ 1:1.1 的摩尔比溶于第二有机溶剂中,得到反应液,所述反应液在 70℃ ~ 80℃ 下反应 4 ~ 6 小时后,分离纯化,得到化合物 D,其结构式如 D 所示:



S40、将所述化合物 D 和碱按 1:2 ~ 1:3 的摩尔比溶于第三有机溶剂中,得到反应液,所述反应液在常温下反应 8 ~ 12 小时后,调节 pH 至酸性,出现白色沉淀后进行离心,得到褪黑素半抗原,其结构式如 E 所示,其中,所述碱为一水合氢氧化锂、氢氧化钾或氢氧化钾:



5. 如权利要求 4 所述的褪黑素半抗原的制备方法,其特征在于,所述步骤 S10 中,所述硝酸盐为硝酸钠或硝酸钾。

6. 如权利要求 4 所述的褪黑素半抗原的制备方法,其特征在于,所述步骤 S20 中,所述还原性金属为锌或铁;所述反应液的 pH 为 1 ~ 3;所述第一有机溶剂为乙醇或甲醇。

7. 如权利要求 4 所述的褪黑素半抗原的制备方法,其特征在于,所述步骤 S30 中,所述缚酸剂为碳酸钠或碳酸钾;所述缚酸剂的用量为所述化合物 C 摩尔浓度的 2.5 ~ 3.5 倍;所述第二有机溶剂为 N,N-二甲基甲酰胺或二甲基亚砷;所述步骤 S40 中,所述第三有机溶剂为甲醇与水的混合液或乙醇与水的混合液。

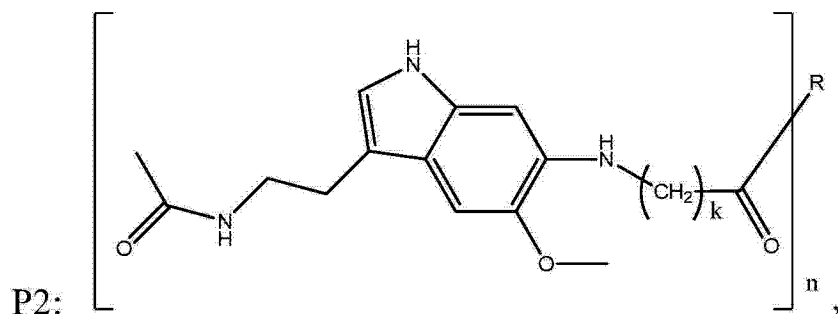
8. 一种褪黑素完全抗原的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1)、将如权利要求 4 所制备的褪黑素半抗原溶解在 N,N-二甲基甲酰胺溶液中,然后加入 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐和 N-羟基丁二酰亚胺,得到第一反应液,在 15 ~ 20℃ 下搅拌反应 2 ~ 3 小时后,得到第二反应液,其中,在所述第一反应液中,所述 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐和 N-羟基丁二酰亚胺的摩尔浓度分别为所述褪黑素半抗原摩尔浓度的 1.0 ~ 1.1、1.0 ~ 1.2 倍;

(2)、将载体蛋白加入磷酸盐缓冲液得到载体蛋白溶液,其中,所述步骤(1)制备的第一反应液中褪黑素半抗原的摩尔浓度为所得载体蛋白溶液中载体蛋白摩尔浓度的 10 ~ 20 倍;

(3)、将步骤(1)所得的第二反应液逐滴加入到步骤(2)配置的所述载体蛋白的磷酸盐

缓冲液中,在 15 ~ 20℃下搅拌反应 6 ~ 8 小时后,得到含褪黑素完全抗原的混合溶液,将所述含褪黑素完全抗原的混合溶液进行透析后离心,得到含褪黑素完全抗原的上清溶液,所述褪黑素完全抗原的结构式如 P2 所示:



式中, k 为 1 ~ 5 的自然数, R 为载体蛋白, n 为 10 ~ 20 的自然数。

9. 如权利要求 8 所述的一种褪黑素完全抗原的制备方法,其特征在于,所述步骤(2)中,所述载体蛋白为球蛋白、牛血清白蛋白、鸡卵清蛋白、钥孔血蓝蛋白、兔血清白蛋白、人血清白蛋白、甲状腺球蛋白、纤维蛋白原、兔丙种球蛋白或鸡的丙种球蛋白。

10. 如权利要求 2 所述的褪黑素完全抗原在制备检测褪黑素的药物或试剂盒中的应用。

一种褪黑素半抗原、褪黑素完全抗原及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药材料领域,具体涉及一种褪黑素半抗原、褪黑素完全抗原及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 免疫分析是以抗原与抗体之间特异性识别和可逆性结合反应为基础的痕量分析方法,其不仅适用于大分子化合物(如蛋白质、核酸、细菌)的检测,也适用于小分子化合物(如激素、药物)的测定。建立小分子化合物的免疫分析方法的关键是能够制备出对小分子化合物具有高亲和力和高选择性的抗体。由于大多数小分子化合物的分子量小于 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等产生特异性抗体。然而,小分子化合物可以通过适当的化学修饰方法,与大分子载体结合,生成小分子化合物-大分子载体的偶联物,此偶联物即为完全抗原,它可以借助 T 细胞表位来间接诱导 B 细胞的增殖及分化,产生特异性抗体。

[0003] 褪黑素(Melatonin, MLT)是一种小分子物质,化学名为 N-乙酰-5-甲氧基色胺,分子量仅为 232.28D,不具有免疫原性,用于免疫,必须先与蛋白质大分子载体结合,形成褪黑素-蛋白质载体偶联的完全抗原后才具免疫原性。然而,制备褪黑素-蛋白质载体偶联的完全抗原不能影响褪黑素的空间构象,而且需要保持褪黑素抗原决定簇(如 5-甲氧基、N-烷基侧链)的有效性,才能获得效价高、特异性强的褪黑素抗体。因此,如何制备具有良好免疫原性的完全抗原是建立测定褪黑素的免疫分析方法的难点。

发明内容

[0004] 为解决上述问题,本发明第一方面,本发明提供了一种褪黑素半抗原;

[0005] 第二方面提供了一种褪黑素完全抗原,该褪黑素完全抗原能充分暴露褪黑素的抗原决定簇,并保持褪黑素的空间构象,以该褪黑素完全抗原为免疫原制备的单克隆抗体和多克隆抗体对褪黑素具有较高的特异性和灵敏性;

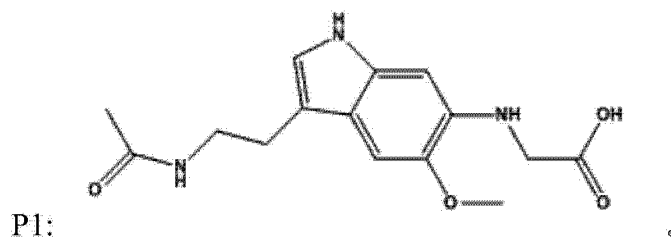
[0006] 本发明第三方面还提供了一种褪黑素半抗原的制备方法,该制备方法将褪黑素进行硝化、还原、衍生化并水解后,制得了含连接臂的褪黑素半抗原,

[0007] 本发明第四方面还提供了一种褪黑素完全抗原的制备方法,该方法将该褪黑素半抗原再与载体蛋白进行偶联,即得到褪黑素完全抗原;

[0008] 本发明第五方面还提供了一种褪黑素完全抗原的应用。

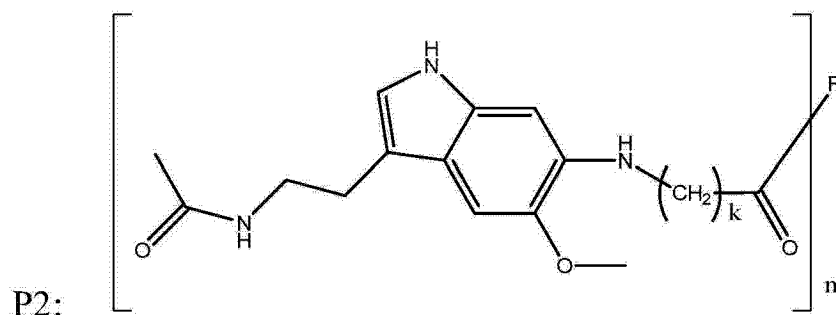
[0009] 第一方面,本发明提供了一种褪黑素半抗原,结构式如 P1 所示:

[0010]



[0011] 第二方面,本发明提供了一种褪黑素完全抗原,结构式如 P2 所示:

[0012]



[0013] 式中, k 为 1 ~ 5 的自然数, R 为载体蛋白, n 为 10 ~ 20 的自然数。

[0014] 优选地,所述载体蛋白为球蛋白、牛血清白蛋白、鸡卵清蛋白、钥孔血蓝蛋白、兔血清白蛋白、人血清白蛋白、甲状腺球蛋白、纤维蛋白原、兔丙种球蛋白或鸡的丙种球蛋白。

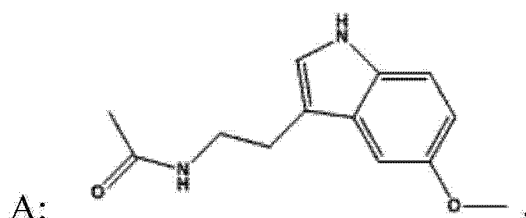
[0015] 本发明提供的褪黑素完全抗原分子包括褪黑素分子和载体蛋白,所述褪黑素分子和载体蛋白通过连接臂进行连接,所述连接臂优选为含羧基的直链烷基,其含有的活性基团羧基能保证褪黑素分子和载体蛋白上的自由氨基进行反应并偶联,此外,该连接臂的修饰位点位于苯环上,离褪黑素分子的抗原决定簇 N -烷基侧链比较远,当褪黑素与载体蛋白偶联后有利于褪黑素 N -烷基侧链的暴露,其次,该连接臂的碳链含碳原子比较适中,且具有和褪黑素 N -烷基侧链类似的原子构成和结构,不易诱导机体产生臂抗体。以该褪黑素完全抗原为免疫原制备的单克隆抗体和多克隆抗体对褪黑素具有较高的特异性和灵敏性。

[0016] 所述褪黑素分子和载体蛋白的偶联比 n 的取值范围为 10 ~ 20,即每个载体蛋白分子上连接的褪黑素分子的平均数目为 10 ~ 20,在该偶联比下得到的完全抗原既不影响褪黑素分子的空间结构,使其具有良好的免疫原性,从而有利于将本发明制备的完全抗原应用于各种免疫层析检测试剂盒中。

[0017] 第二方面,本发明还提供了一种褪黑素半抗原的制备方法,包括如下步骤:

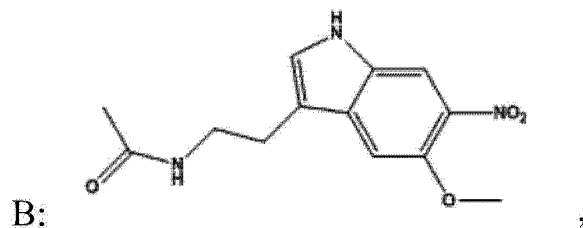
[0018] S10、提供褪黑素,其结构式如 A 所示:

[0019]



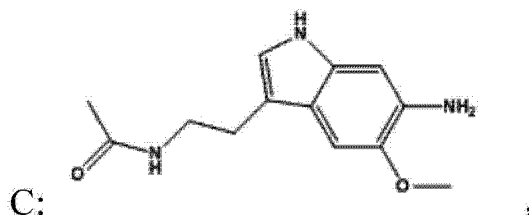
[0020] 将所述褪黑素和硝酸盐按 1:1.05 ~ 1:1.1 的摩尔比溶于 85% ~ 98% 浓硫酸中,得到反应液,所述反应液在 0 ~ 5°C 下进行硝化反应 2 ~ 3 小时后,经调节 pH 值至碱性,随后进行分离纯化,得到化合物 B,其结构式如 B 所示:

[0021]



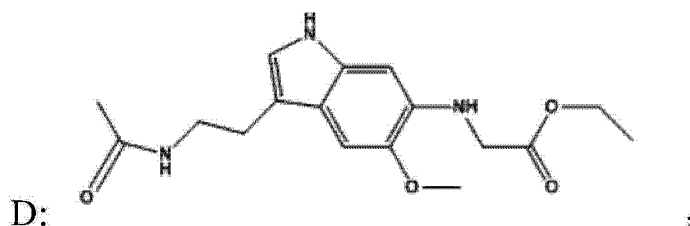
[0022] S20、酸性条件下,将所述化合物 B 和还原性金属按 1:10 ~ 1:20 的摩尔比溶于第一有机溶剂中得到反应液,所述反应液在 70 ~ 80℃ 下进行还原反应 2 ~ 4 小时后,经调节 pH 值至碱性,随后进行抽滤得到滤液,所得滤液经萃取、过柱,得到化合物 C,其结构式如 C 所示:

[0023]



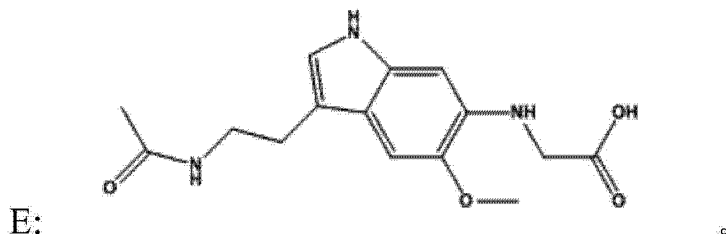
[0024] S30、在缚酸剂存在的条件下,将所述化合物 C 和溴乙酸乙酯按 1:1.05 ~ 1:1.1 的摩尔比溶于第二有机溶剂中,得到反应液,所述反应液在 70℃ ~ 80℃ 下反应 4 ~ 6 小时后,分离纯化,得到化合物 D,其结构式如 D 所示:

[0025]



[0026] S40、将所述化合物 D 和碱按 1:2 ~ 1:3 的摩尔比溶于第三有机溶剂中,得到反应液,所述反应液在常温下反应 8 ~ 12 小时后,调节 pH 至酸性至出现白色沉淀后进行离心,得到褪黑素半抗原,其结构式如 E 所示,其中,所述碱为一水合氢氧化锂、氢氧化钾或氢氧化钾:

[0027]



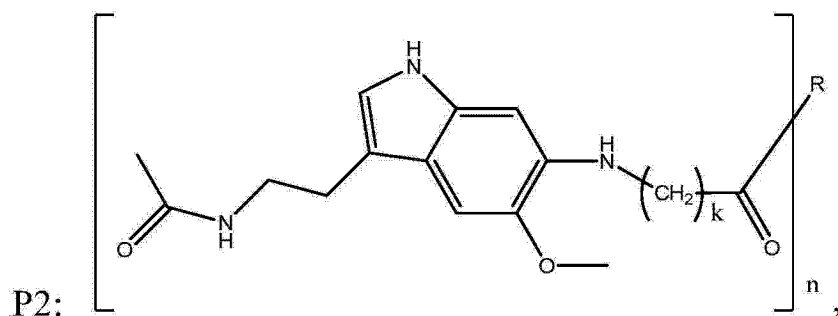
[0028] 优选地,所述步骤 S10 中,所述硝酸盐为硝酸钠或硝酸钾。

[0029] 优选地,所述步骤 S10 中,所述调节 pH 值至碱性为在冰浴条件下进行。

[0030] 优选地,所述步骤 S10 中,所述分离纯化的方式为萃取、过柱。

[0031] 优选地,所述步骤 S20 中,所述酸性条件的 pH 值为 1 ~ 3。

- [0032] 优选地,所述步骤 S20 中,所述还原性金属为锌或铁。
- [0033] 优选地,所述步骤 S20 中,所述反应液的 pH 为 1 ~ 3。
- [0034] 优选地,所述步骤 S20 中,所述第一有机溶剂为乙醇或甲醇。
- [0035] 优选地,所述步骤 S20 中,所述萃取过程中,采用的萃取剂为乙酸乙酯。
- [0036] 优选地,所述步骤 S30 中,所述缚酸剂为碳酸钠或碳酸钾。
- [0037] 优选地,所述步骤 S30 中,所述缚酸剂的用量为所述化合物 C 摩尔浓度的 2.5 ~ 3.5 倍。
- [0038] 优选地,所述步骤 S30 中,所述第二有机溶剂为 N,N-二甲基甲酰胺或二甲基亚砷。
- [0039] 优选地,所述步骤 S30 中,所述分离纯化的方式为萃取、过柱。
- [0040] 优选地,所述步骤 S40 中,所述第三有机溶剂为甲醇与水的混合液或乙醇与水的混合液。
- [0041] 进一步优选地,所述步骤 S40 中,所述甲醇与水的混合液中,甲醇和水的体积比为 1:1 ~ 1:2。
- [0042] 进一步优选地,所述步骤 S40 中,所述乙醇与水的混合液中,乙醇和水的体积比为 1:1 ~ 1:2。
- [0043] 更进一步优选地,所述步骤 S40 中,所述第三有机溶剂为体积比为 1:1 的甲醇与水的混合液。
- [0044] 第四方面,本发明提供了一种褪黑素完全抗原的制备方法,包括以下步骤:
- [0045] (1) 将如第三方面所制备的褪黑素半抗原溶解在 N,N-二甲基甲酰胺溶液中,然后加入 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐和 N-羟基丁二酰亚胺,得到第一反应液,在 15 ~ 20℃ 下搅拌反应 2 ~ 3 小时后,得到第二反应液,其中,在所述第一反应液中,所述 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐和 N-羟基丁二酰亚胺的摩尔浓度分别为所述褪黑素半抗原摩尔浓度的 1.0 ~ 1.1、1.0 ~ 1.2 倍;
- [0046] (2)、将载体蛋白加入磷酸盐缓冲液得到载体蛋白溶液,其中,所述步骤(1)制备的第一反应液中褪黑素半抗原的摩尔浓度为所得载体蛋白溶液中载体蛋白摩尔浓度的 10 ~ 20 倍;
- [0047] (3)、将步骤(1)所得的第二反应液逐滴加入到步骤(2)配置的所述载体蛋白的磷酸盐缓冲液中,在 15 ~ 20℃ 下搅拌反应 6 ~ 8 小时后,得到含褪黑素完全抗原的混合溶液,将所述含褪黑素完全抗原的混合溶液进行透析后离心,得到含褪黑素完全抗原的上清溶液,所述褪黑素完全抗原的结构式如 P2 所示:
- [0048]

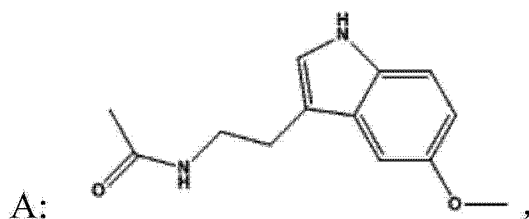


- [0049] 式中, k 为 1 ~ 5 的自然数, R 为载体蛋白, n 为 10 ~ 20 的自然数。

[0050] 优选地,所述第三方面制备的褪黑素半抗原步骤包括:

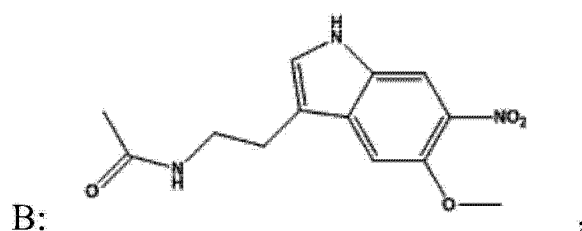
[0051] S10、提供褪黑素,其结构式如 A 所示:

[0052]



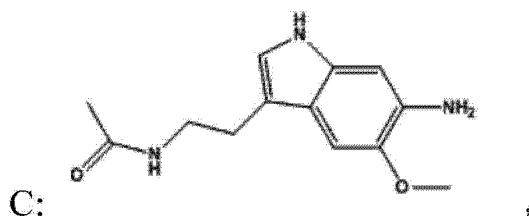
[0053] 将所述褪黑素和硝酸盐按 1:1.05 ~ 1:1.1 的摩尔比溶于 85% ~ 98% 浓硫酸中,得到反应液,所述反应液在 0 ~ 5℃ 下进行硝化反应 2 ~ 3 小时后,在冰浴条件下经调节 pH 值至碱性,随后经萃取、过柱,得到化合物 B,其结构式如 B 所示:

[0054]



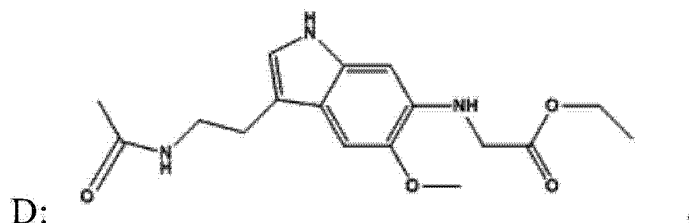
[0055] S20、酸性条件下,将所述化合物 B 和还原性金属按 1:10 ~ 1:20 的摩尔比溶于第一有机溶剂中得到反应液,所述反应液在 70 ~ 80℃ 下进行还原反应 2 ~ 4 小时后,经调节 pH 值至碱性,随后进行抽滤得到滤液,所得滤液经萃取、过柱,得到化合物 C,其结构式如 C 所示:

[0056]



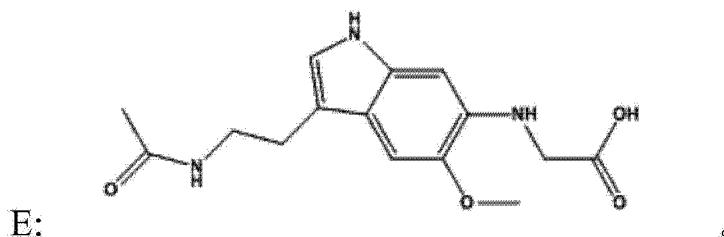
[0057] S30、在缚酸剂存在的条件下,将所述化合物 C 和溴乙酸乙酯按 1:1.05 ~ 1:1.1 的摩尔比溶于第二有机溶剂中,得到反应液,所述反应液在 70℃ ~ 80℃ 下反应 4 ~ 6 小时后,加水稀释,随后经萃取、过柱,得到化合物 D,其结构式如 D 所示:

[0058]



[0059] S40、将所述化合物 D 和碱按 1:2 ~ 1:3 的摩尔比溶于第三有机溶剂中,得到反应液,所述反应液在常温下反应 8 ~ 12 小时后,调节 pH 至酸性至出现白色沉淀后进行离心,得到褪黑素半抗原,其结构式如 E 所示,其中,所述碱为一水合氢氧化锂、氢氧化钾或氢

氧化钾：



- [0060] 优选地,所述步骤 S10 中,所述硝酸盐为硝酸钠或硝酸钾。
- [0061] 优选地,所述步骤 S20 中,所述酸性条件的 pH 值为 1 ~ 3。
- [0062] 优选地,所述步骤 S20 中,所述还原性金属为锌或铁。
- [0063] 优选地,所述步骤 S20 中,所述反应液的 pH 为 1 ~ 3。
- [0064] 优选地,所述步骤 S20 中,所述第一有机溶剂为乙醇或甲醇。
- [0065] 优选地,所述步骤 S20 中,所述萃取过程中,采用的萃取剂为乙酸乙酯。
- [0066] 优选地,所述步骤 S30 中,所述缚酸剂为碳酸钠或碳酸钾。
- [0067] 优选地,所述步骤 S30 中,所述缚酸剂的用量为所述化合物 C 摩尔浓度的 2.5 ~ 3.5 倍。
- [0068] 优选地,所述步骤 S30 中,所述第二有机溶剂为 N, N- 二甲基甲酰胺或二甲基亚砷。
- [0069] 优选地,所述步骤 S40 中,所述第三有机溶剂为甲醇与水的混合液或乙醇与水的混合液。
- [0070] 进一步优选地,所述步骤 S40 中,所述甲醇与水的混合液中,甲醇和水的体积比为 1:1 ~ 1:2。
- [0071] 进一步优选地,所述步骤 S40 中,所述乙醇与水的混合液中,乙醇和水的体积比为 1:1 ~ 1:2。
- [0072] 更进一步优选地,所述步骤 S40 中,所述第三有机溶剂为体积比为 1:1 的甲醇与水的混合液。
- [0073] 优选地,所述步骤(1)中,在所述第一反应液中,所述褪黑素半抗原的浓度为 0.0226 ~ 0.0452mol/L。
- [0074] 优选地,所述步骤(2)中,所述磷酸盐的摩尔浓度为 0.01mol/L。
- [0075] 优选地,所述步骤(2)中,所述载体蛋白为球蛋白、牛血清白蛋白、鸡卵清蛋白、钥孔血蓝蛋白、兔血清白蛋白、人血清白蛋白、甲状腺球蛋白、纤维蛋白原、兔丙种球蛋白或鸡的丙种球蛋白。
- [0076] 本发明提供的褪黑素完全抗原的制备方法,该制备方法先将褪黑素进行硝化、还原、衍生化、然后进行水解后,在褪黑素分子的苯环上引入了末端带有活性基团羧基的连接臂,制得了含连接臂的褪黑素半抗原,再将该褪黑素半抗原再与载体蛋白进行偶联,即得到褪黑素完全抗原。
- [0077] 第四方面,本发明提供了一种如第二方面所述的褪黑素完全抗原或第三方面所述的褪黑素完全抗原的制备方法在制备检测褪黑素的药物或试剂盒中的应用。
- [0078] 优选地,所述试剂盒为胶体金免疫层析试剂盒。
- [0079] 本发明提供的褪黑素半抗原、褪黑素完全抗原及其制备方法和应用具有如下有益效果：
- [0080] 1) 本发明提供的褪黑素完全抗原包括褪黑素分子和载体蛋白,所述褪黑素分子和

载体蛋白通过连接臂进行连接,在所述褪黑素完全抗原中,其褪黑素分子的抗原决定簇能充分暴露,且具有较完整的空间构象,因此,本发明提供的褪黑素完全抗原具有较好的免疫原性;

[0081] 2) 本发明提供的褪黑素完全抗原免疫小鼠制备的褪黑素单克隆抗体的效价较高,纯化后的单克隆抗体对褪黑素表现出较高的特异性和灵敏性;

[0082] 3) 本发明提供的褪黑素半抗原及褪黑素完全抗原的制备方法简单易行,可以进行大规模生产,且生产成本低。

附图说明

[0083] 图 1 为本发明实施例 4 提供的样品的紫外扫描图。

具体实施方式

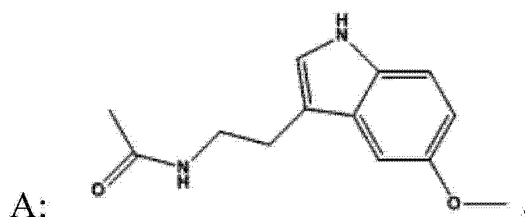
[0084] 以下所述是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也视为本发明的保护范围。

[0085] 实施例 1

[0086] 一种褪黑素半抗原的制备方法,包括以下步骤:

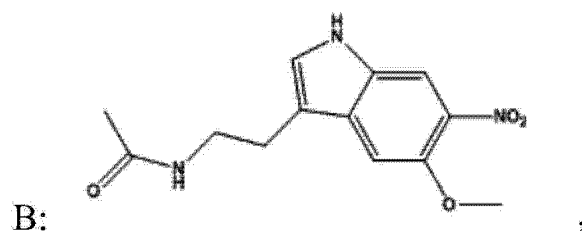
[0087] (a)、提供褪黑素,其结构式如 A 所示:

[0088]



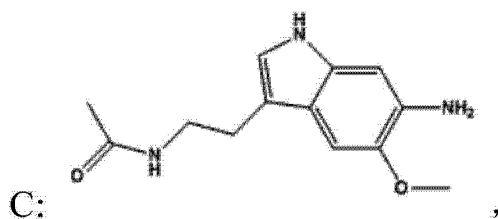
[0089] 将所述褪黑素和硝酸钠按 1:1.05 的摩尔比溶于 98% 的浓硫酸中,得到反应液,所述反应液在 0℃ 下进行硝化反应 2 小时后,冰浴条件下经调节 pH 值至碱性,随后经萃取、过柱,得到化合物 B,其结构式如 B 所示:

[0090]



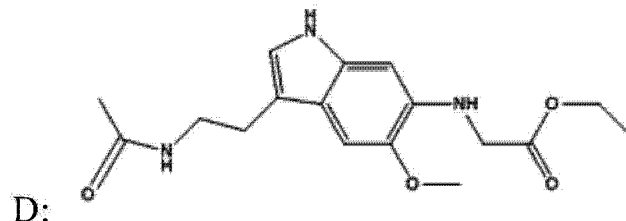
[0091] (b)、采用盐酸将乙醇调 pH 值至 1,然后将所述化合物 B 和锌粉按 1:10 的摩尔比溶于该 pH 值为 1 的乙醇中,得到反应液,所述反应液在 70℃ 下进行还原反应 4 小时,反应过程监测控制使反应液的 pH 值保持稳定,反应完毕后调节反应液 pH 值至碱性,随后进行抽滤得到滤液,所得滤液经乙酸乙酯萃取、过柱,得到化合物 C,其结构式 C 所示;

[0092]



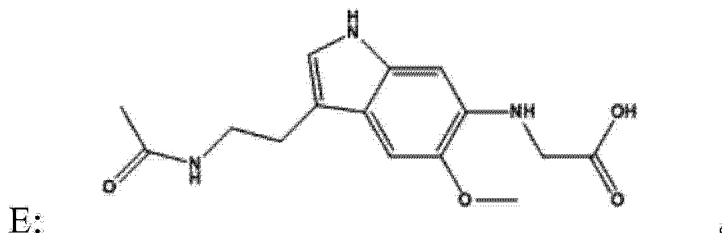
[0093] (c)、将所述化合物 C 和溴乙酸乙酯按 1:1.05 的摩尔比溶于 N,N-二甲基甲酰胺中,随后加入用量为化合物 C 摩尔量 2.5 倍的碳酸钾,得到反应液,所述反应液在 70℃ 下进行反应 4 小时后,加水稀释,随后经萃取、过柱,得到化合物 D,其结构式如 D 所示:

[0094]



[0095] (d)、将所述化合物 D 和一水合氢氧化锂按 1:2 的摩尔比溶于甲醇和水的混合液(体积比为 1:1)中,得到反应液,所述反应液在常温下进行反应 12 小时后,加适量盐酸调节 pH 为酸性(pH 约为 4),至出现白色沉淀后进行离心,离心所得沉淀即褪黑素半抗原,得到褪黑素半抗原,其结构式如 E 所示:

[0096]



[0097] 实施例 2

[0098] 一种褪黑素半抗原的制备方法,包括以下步骤:

[0099] (a)、提供褪黑素,其结构式如 A 所示;

[0100] 将所述褪黑素和硝酸钾按 1:1.1 的摩尔比溶于 85% 的浓硫酸中,得到反应液,所述反应液在 5℃ 下进行硝化反应 3 小时后,冰浴条件下经调节 pH 值至碱性,随后经萃取、过柱,得到化合物 B,其结构式如实施例 1 步骤(b) 化合物 B 所示提供褪黑素,其结构式如实施例 1 步骤(a) 化合物 A 所示;

[0101] (b)、采用盐酸将甲醇调 pH 值至 2,然后将所述化合物 B 和铁粉按 1:20 的摩尔比溶于该 pH 值为 2 的甲醇中,得到反应液,所述反应液在 80℃ 下进行还原反应 2 小时,反应过程监测控制使反应液的 pH 值保持稳定,反应完毕后调节反应液 pH 值至碱性,随后进行抽滤得到滤液,所得滤液经乙酸乙酯萃取、过柱,得到化合物 C,其结构式如实施例 1 步骤(b) 化合物 C 所示;

[0102] (c)、将所述化合物 C 和溴乙酸乙酯按 1:1.1 的摩尔比溶于二甲基亚砜中,随后加入用量为化合物 C 摩尔量 3 倍的碳酸钠,得到反应液,所述反应液在 75℃ 下进行反应 5 小时后,加水稀释,随后经萃取、过柱,得到化合物 D,其结构式如实施例 1 步骤(c) 化合物 D 所

示；

[0103] (d)、将所述化合物 D 和一水合氢氧化锂按 1:2.5 的摩尔比溶于甲醇和水的混合液(体积比为 1:1.5)中,得到反应液,所述反应液在常温下进行反应 10 小时后,加适量盐酸调节 pH 为酸性(pH 约为 5),至出现白色沉淀后进行离心,离心所得沉淀即褪黑素半抗原 E,其结构式如实施例 1 步骤(d)化合物 E 所示。

[0104] 实施例 3

[0105] 一种褪黑素半抗原的制备方法,包括以下步骤:

[0106] (a)、提供褪黑素,其结构式如实施例 1 步骤(a)化合物 A 所示;

[0107] 将所述褪黑素和硝酸钠按 1:1.1 的摩尔比溶于 90% 的浓硫酸中,得到反应液,所述反应液在 3℃ 下进行硝化反应 2.5 小时后,冰浴条件下经调节 pH 值至碱性,随后经萃取、过柱,得到化合物 B,其结构式如实施例 1 步骤(a)化合物 B 所示;

[0108] (b)、采用盐酸将乙醇调 pH 值至 3,然后将所述化合物 B 和锌粉按 1:15 的摩尔比溶于该 pH 值为 1 的乙醇中,得到反应液,所述反应液在 75℃ 下进行还原反应 3 小时,反应过程监测控制使反应液的 pH 值保持稳定,反应完毕后调节反应液 pH 值至碱性,随后进行抽滤得到滤液,所得滤液经乙酸乙酯萃取、过柱,得到化合物 C,其结构式如实施例 1 步骤(b)化合物 C 所示;

[0109] (c)、将所述化合物 C 和溴乙酸乙酯按 1:1.1 的摩尔比溶于 N,N-二甲基甲酰胺中,随后加入用量为化合物 C 摩尔量 3.5 倍的碳酸钾,得到反应液,所述反应液在 80℃ 下进行反应 6 小时后,加水稀释,随后经萃取、过柱,得到化合物 D,其结构式如实施例 1 步骤(c)化合物 D 所示;

[0110] (d)、将所述化合物 D 和一水合氢氧化锂按 1:3 的摩尔比溶于甲醇和水(体积比为 1:2)中,得到反应液,所述反应液在常温下进行反应 8 小时后,加适量盐酸调节 pH 为酸性(pH 约为 4),至出现白色沉淀后进行离心,离心所得沉淀即褪黑素半抗原 E,其结构式如实施例 1 步骤(d)化合物 E 所示。

[0111] 实施例 4

[0112] 一种褪黑素完全抗原的制备方法,包括以下步骤:

[0113] (a)、将实施例 1 所制备的褪黑素半抗原溶解在 DMF 中,然后加入 EDC·HCl 和 NHS,得到第一反应液,在 15℃ 下搅拌活化反应 2 小时后,得到第二反应液,其中,在所述第一反应液中,所述褪黑素半抗原的浓度为 0.0339mol/L,所述 EDC·HCl 和 NHS 的摩尔浓度均为所述褪黑素半抗原摩尔浓度的 1.0 倍;

[0114] (b)、将 BSA 蛋白溶解在 0.01mol/L 的 PBS 溶液中,配置 BSA 蛋白的 PBS 缓冲液,其中,所述 BSA 蛋白的摩尔浓度为 0.1505mol/L,即步骤(a)褪黑素半抗原的摩尔浓度为所述 BSA 蛋白的摩尔浓度的 17 倍;

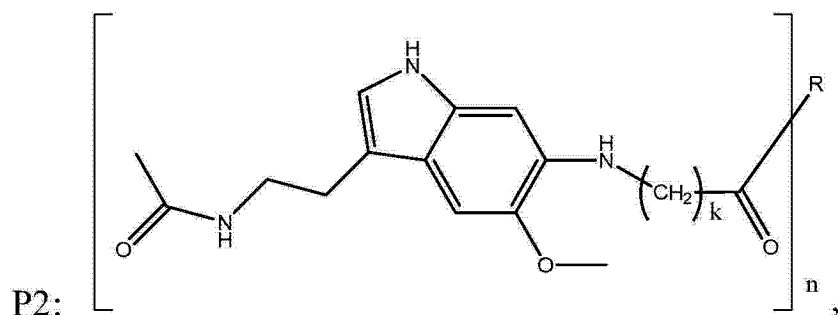
[0115] (c)、将步骤(a)所得的第二反应液逐滴加入到步骤(b)配置的所述 BSA 蛋白的 PBS 缓冲液中,在 15℃ 下搅拌反应 6 小时后,得到含褪黑素完全抗原的混合溶液,将所述含褪黑素完全抗原的混合溶液进行透析 3 小时后离心,得到含褪黑素完全抗原的上清溶液。

[0116] 采用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)对本发明制备的褪黑素完全抗原进行偶联比的测定(采用的飞行时间质谱的型号为 MALDI-TOF/TOF4700, Applied Biosystems, USA),经检测得偶联物分子量约为 71625.83Da,计算得 1 分子 BSA 约

与 17 分子褪黑素半抗原偶联,即褪黑素半抗原与 BSA 的偶联比为 17 :1。

[0117] 本实施例制备的所述褪黑素完全抗原 (MLT-BSA 偶联物, MLT 代表褪黑素) 的结构式如 P2 所示:

[0118]



[0119] 式中, k 为 1 的自然数, R 为 BSA 蛋白, n 为 17 的自然数。

[0120] 为充分说明本发明的有益效果,本实施例还采用 MAPADA UV-1800 对相同蛋白浓度的 BSA 和本实施例制备的 MLT-BSA 偶联物的紫外吸收特征进行测定。结果如图 1 所示,图 1 为 BSA 和 MLT-BSA 完全抗原的紫外扫描图,图中有两条曲线,曲线 BSA 为 BSA 的紫外扫描曲线,曲线 MLT-BSA-MQ 为褪黑素偶联抗原的紫外扫描曲线。由图 1 可知,在蛋白浓度相同或接近的条件下,没有偶联 MLT 的 BSA,和偶联了 MLT 的 BSA 在 230nm-300nm 范围内吸收峰相差很大,且在 300nm-600nm 范围内 BSA 几乎没有特征吸收峰,而偶联了 MLT 的 BSA 有明显的吸收峰,说明半抗原 MLT 成功偶联到 BSA 上。

[0121] 实施例 5

[0122] 一种褪黑素完全抗原的制备方法,包括以下步骤:

[0123] (a)、将步骤(1)所得的褪黑素半抗原溶解在 DMF 中,然后加入 EDC·HCl 和 NHS,得到第一反应液,在 18℃下搅拌活化反应 2.5 小时后,得到第二反应液,其中,在所述第一反应液中,所述褪黑素半抗原的浓度为 0.0452mol/L,所述 EDC·HCl 和 NHS 的摩尔浓度分别为所述褪黑素半抗原摩尔浓度的 1.1、1.2 倍;

[0124] (b)、将 OVA 蛋白溶解在 0.01mol/L 的 PBS 溶液中,配置 OVA 蛋白的 PBS 缓冲液,其中,所述 OVA 蛋白的摩尔浓度为 0.1550mmol/L,即步骤(a)褪黑素半抗原的摩尔浓度为所述 OVA 蛋白的摩尔浓度的 20 倍;

[0125] (c)、将步骤(a)所得的第二反应液逐滴加入到步骤(b)配置的所述 OVA 蛋白的 PBS 缓冲液中,在 18℃下搅拌反应 7 小时后,得到含褪黑素完全抗原的混合溶液,将所述含褪黑素完全抗原的混合溶液进行透析 6 小时后离心,得到含褪黑素完全抗原的上清溶液;

[0126] 采用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 对本发明制备的褪黑素完全抗原进行偶联比的测定(采用的飞行时间质谱的型号为 MALDI-TOF/TOF4700, Applied Biosystems, USA),经检测得偶联物分子量约为 48192.25Da,计算得 1 分子 OVA 约与 17 分子褪黑素半抗原偶联,即褪黑素半抗原与 OVA 的偶联比为 20 :1。

[0127] 本实施例制备的所述褪黑素完全抗原 (MLT-BSA 偶联物) 的结构式如实施例 4 中 P2 所示,式中, k 为 3 的自然数, R 为 OVA 蛋白, n 为 20 的自然数。

[0128] 实施例 6

[0129] 一种褪黑素完全抗原的制备方法,包括以下步骤:

[0130] (a)、将步骤(1)所得的褪黑素半抗原溶解在 DMF 中,然后加入 EDC·HCl 和 NHS,得到第一反应液,在 20℃ 下搅拌活化反应 3 小时后,得到第二反应液,其中,在所述第一反应液中,所述褪黑素半抗原的浓度为 0.0266mol/L,所述 EDC·HCl 和 NHS 的摩尔浓度分别为所述褪黑素半抗原摩尔浓度的 1.1、1.2 倍;

[0131] (b)、将 BSA 蛋白溶解在 0.01mol/L 的 PBS 溶液中,配置 BSA 蛋白的 PBS 缓冲液,其中,所述 BSA 蛋白的摩尔浓度为 0.1505mmol/L,即步骤(a)褪黑素半抗原的摩尔浓度为所述 BSA 蛋白的摩尔浓度的 10 倍;

[0132] (c)、将步骤(a)所得的第二反应液逐滴加入到步骤(b)配置的所述 BSA 蛋白的 PBS 缓冲液中,在 20℃ 下搅拌反应 8 小时后,得到含褪黑素完全抗原的混合溶液,将所述含褪黑素完全抗原的混合溶液进行透析 8 小时后离心,得到含褪黑素完全抗原的上清溶液;

[0133] 采用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)对本发明制备的褪黑素完全抗原进行偶联比的测定,(采用的飞行时间质谱的型号为 MALDI-TOF/TOF4700, Applied Biosystems, USA),经检测得偶联物分子量约为 69487.51Da,计算得 1 分子 BSA 约与 10 分子褪黑素半抗原偶联,即褪黑素半抗原与 BSA 的偶联比为 10:1。

[0134] 本实施例制备的所述褪黑素完全抗原(MLT-BSA 偶联物)的结构式如实施例 4 中 P2 所示,式中,k 为 3 的自然数,R 为 BSA 蛋白,n 为 10 的自然数。

[0135] 实施例 7

[0136] 一种褪黑素单克隆抗体的制备方法,包括以下步骤:

[0137] (1) 动物免疫

[0138] 以本发明实施例一提供的偶联物 MLT-BSA 为免疫抗原免疫 Balb/c 小鼠,100 μg/kg 体重。首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂,颈背部皮下多点注射,间隔 2 周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳化,继续三免、方法剂量同二免,三免一周后尾部采血检测血清效价及抑制,待检测符合要求时腹腔冲击免疫一次,3 天后取脾细胞。

[0139] (2) 细胞融合和克隆化

[0140] 取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞,按 5:1 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合,采用间接竞争 ELISA 测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0141] (3) 细胞冻存和复苏

[0142] 取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成 5×10^6 个/ml 的细胞悬液,分装于冻存管,在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管,立即放入 37℃ 水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0143] (4) 单克隆抗体的制备与纯化

[0144] 采用体内诱生法,将 8 周龄的 Balb/c 小鼠腹腔注入弗氏不完全佐剂 0.5ml/只,7 天后腹腔注射杂交瘤细胞 5×10^6 个/只,7 天后采集腹水。用亲和层析柱进行腹水纯化,紫外分光光度计测定蛋白浓度,-20℃ 保存备用。采用 ELISA 法测定纯化抗体的效价为 1:10000,结果表明,纯化的抗体对褪黑素表现出较高的特异性和灵敏性。

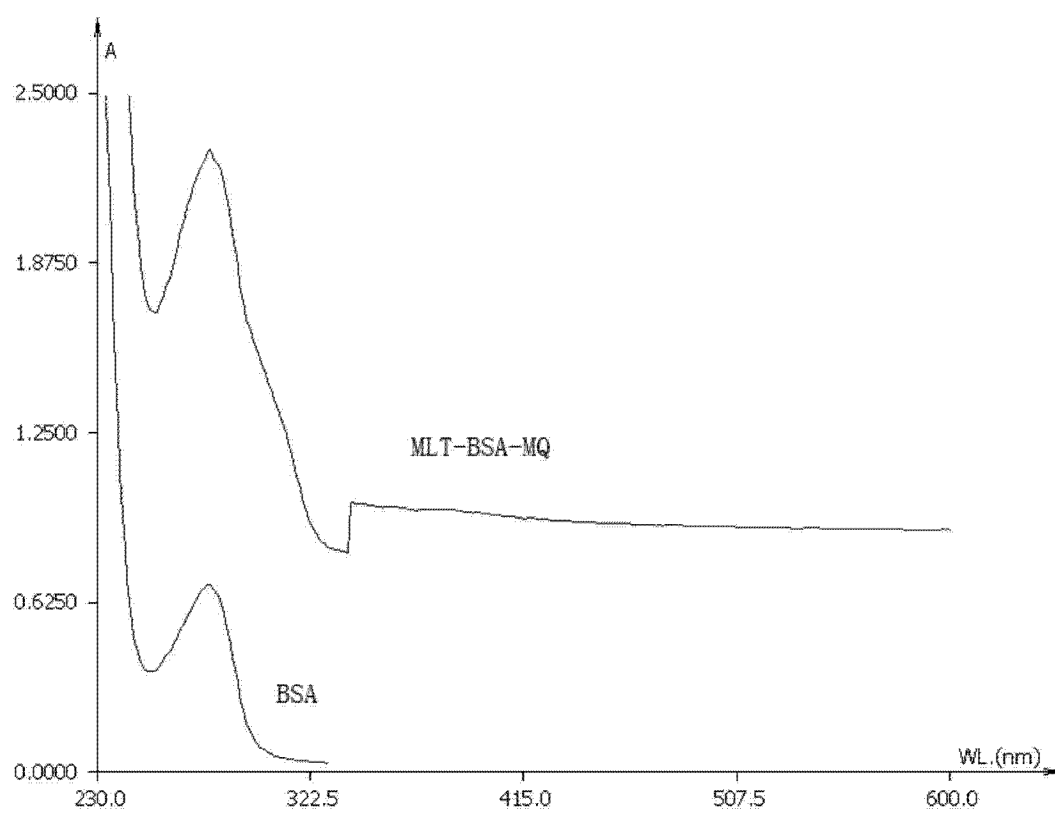


图 1

专利名称(译)	一种褪黑素半抗原、褪黑素完全抗原及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN103601662A	公开(公告)日	2014-02-26
申请号	CN201310593798.0	申请日	2013-11-21
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市药品检验所		
申请(专利权)人(译)	深圳市药品检验所		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市药品检验所		
[标]发明人	王铁杰 殷果 韩东岐 鲁艺 王珏 秦斌 谭渺 闫研 关潇滢 黎雪清 王防修 蒋永青		
发明人	王铁杰 殷果 韩东岐 鲁艺 王珏 秦斌 谭渺 闫研 关潇滢 黎雪清 王防修 蒋永青		
IPC分类号	C07D209/14 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K14/75 C07K14/47 C07K14/465 C07K11/107 G01N33/53		
CPC分类号	C07D209/14 C07K11/1077 C07K14/465 C07K14/47 C07K14/75 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K19/00 G01N33/94		
代理人(译)	熊永强		
其他公开文献	CN103601662B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种褪黑素半抗原，以及由该半抗原制备的褪黑素完全抗原，该褪黑素完全抗原的结构式如P2所示：式中，k为1~5的自然数，R为载体蛋白，n为10~20的自然数；该褪黑素完全抗原中，其褪黑素分子的抗原决定簇能充分暴露，且具有较完整的空间构象，因此，本发明提供的褪黑素完全抗原具有较好的免疫原性。本发明还提供了一种褪黑素半抗原及褪黑素完全抗原的制备方法和应用。

