



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102161662 B

(45) 授权公告日 2012. 12. 12

(21) 申请号 201110004843. 5

C07K 14/765 (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 01. 11

C07K 14/795 (2006. 01)

(66) 本国优先权数据

G01N 21/33 (2006. 01)

201010248466. 5 2010. 08. 09 CN

G01N 33/53 (2006. 01)

(83) 生物保藏信息

G01N 33/577 (2006. 01)

CCTCC NO :C2010123 2010. 11. 30

G01N 33/532 (2006. 01)

(73) 专利权人 江苏省南通药品检验所

(56) 对比文件

地址 226000 江苏省南通市崇川区青年西路  
196 号

CN 101021479 A, 2007. 08. 22, 说明书第 1-7  
页.

(72) 发明人 吴迪宏

CN 101555512 A, 2009. 10. 14, 说明书第 1-5  
页.

(74) 专利代理机构 南京天华专利代理有限责任  
公司 32218

审查员 张英姝

代理人 徐冬涛

(51) Int. Cl.

C07D 487/04 (2006. 01)

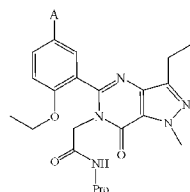
权利要求书 3 页 说明书 15 页 附图 8 页

(54) 发明名称

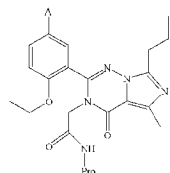
西地那非及其衍生物的人工合成抗原及其制备方法  
和应用

(57) 摘要

本发明属于药物化学领域, 公开了西地那非及其衍生物的人工合成抗原及其制备方法和应用。西地那非及其衍生物的人工合成抗原结构如式 (I) 或式 (I') 所示的化合物:



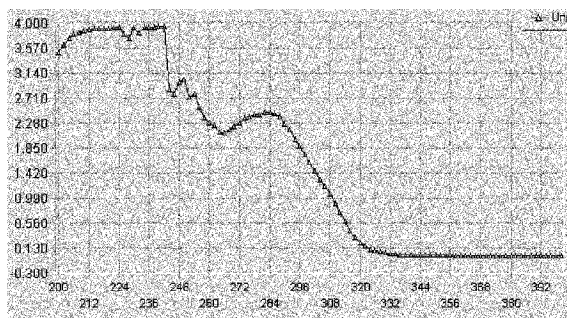
(I)



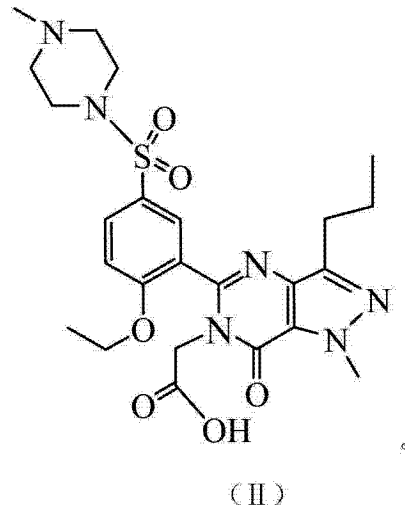
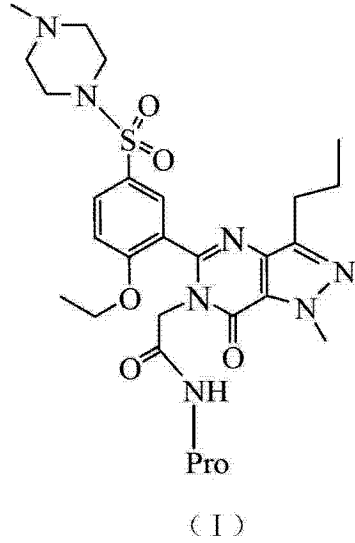
(I')

本发明首次

合成了那非类化合物特别是西地那非的人工合成抗原 (式 (I) 或式 (I') ), 所合成的人工合成抗原具有良好的免疫原性和反应性, 能够用于制备相应的单克隆抗体, 从而可以进一步做成检测那非类化合物特别是检测西地那非的胶体金试纸, 此胶体金试纸可以随时检测样品中是否含有西地那非或其结构类似物。



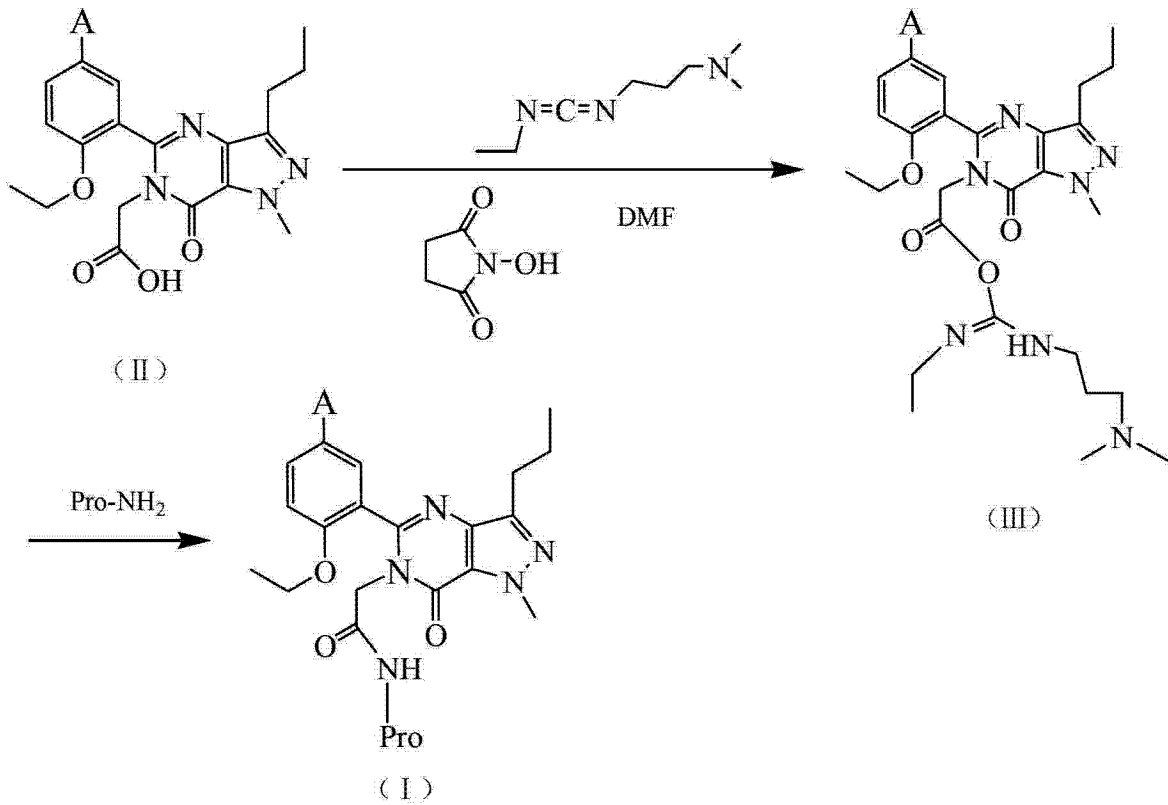
1. 结构如式(I)或式(II)所示的化合物:



其中,Pro 为载体蛋白。

2. 根据权利要求 1 所述的结构如式(I)或式(II)所示的化合物,其特征在于所述的 Pro 为牛血清白蛋白或人血蓝蛋白。

3. 权利要求 1 所述的式(I)化合物的制备方法,其特征在于合成路线如下:



其中 A 为 Pro 为载体蛋白。

4. 根据权利要求 3 所述的式 (I) 化合物的制备方法, 其特征在于所述的 Pro 为牛血清白蛋白或人血蓝蛋白。

5. 根据权利要求 3 所述的式 (I) 化合物的制备方法, 其特征在于包括如下步骤:

(1) 将式 (II) 化合物、N-羟基琥珀酰亚胺、二甲基甲酰胺、水溶性碳化二亚胺 EDC 平衡至室温; 在室温避光的条件下进行搅拌反应 22-26 个小时, 得式 (III), 此反应液记为二号反应液, 其中式 (II) 化合物与水溶性碳化二亚胺 EDC 及 N-羟基琥珀酰亚胺的摩尔比为 1:8-12:13-16;

(2) 按每 100mg 载体蛋白溶解在 15-20ml 硼酸缓冲液将载体蛋白溶于硼酸缓冲液中, 记为三号反应液;

(3) 将二号反应液加入三号反应液中, 搅拌反应, 其中载体蛋白与式 (III) 化合物摩尔比为 1:15-25, 反应得到含式 (I) 的溶液, 记为四号反应液。

6. 根据权利要求 5 所述的式 (I) 化合物的制备方法, 其特征在于所述的步骤 (1) 中式 (II) 化合物与水溶性碳化二亚胺及 N-羟基琥珀酰亚胺的摩尔比为 1:10:15; 所述的步骤 (2) 和 (3) 中载体蛋白为牛血清白蛋白或人血蓝蛋白, 载体蛋白与式 (III) 化合物摩尔比为 1:20。

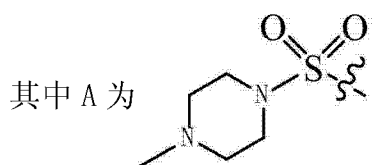
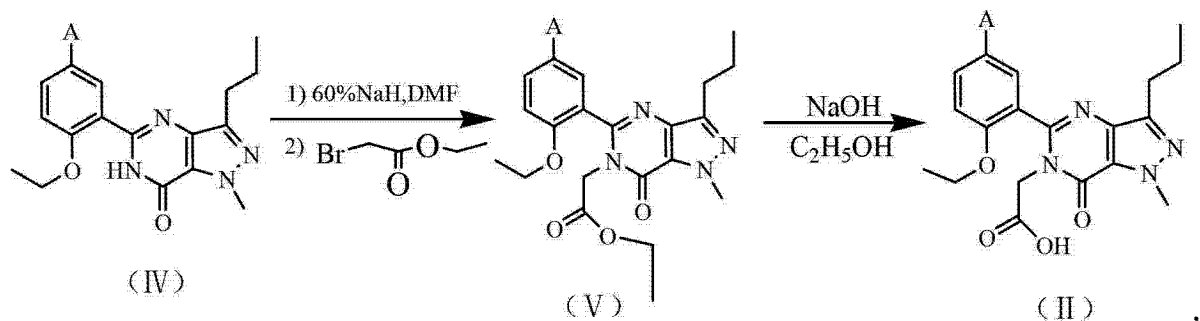
7. 根据权利要求 5 所述的式 (I) 化合物的制备方法, 其特征在于将所述的含式 (I) 的四号反应液在 3-5°C 的条件下经 20000-30000D 透析袋透析, 然后经冷冻干燥得白色絮状产品, 即为式 (I) 化合物。

8. 根据权利要求 7 所述的式 (I) 化合物的制备方法, 其特征在于将所述的含式 (I) 化合物的四号反应液置于 20000-30000 分子截留透析袋中, 透析袋中还装有 0.01-0.02M 磷酸盐缓冲液, pH 值为 7.0-7.5, 将透析袋在 3-5°C 的条件下进行透析 46-50 小时, 每隔 3-5 小时换一次磷酸盐缓冲液, 经所述透析步骤最终所得的产品, 经冷冻干燥为白色絮状产品, 即为式 (I) 化合物。

9. 根据权利要求 5 所述的式 (I) 化合物的制备方法, 其特征在于步骤 (3) 所述的搅拌反应是先在室温避光的条件下搅拌 1-3 小时, 之后再在 3-5°C 条件下避光搅拌 46-50 小时。

10. 根据权利要求 9 所述的式 (I) 化合物的制备方法, 其特征在于步骤 (3) 所述的搅拌反应是先在室温避光的条件下搅拌 2 小时, 之后在 3-5°C 条件下避光搅拌 48 小时。

11. 权利要求 1 所述的式 (II) 化合物的制备方法, 其特征在于合成路线如下:



12. 根据权利要求 11 所述的式 (II) 化合物的制备方法,其特征包括如下步骤:

(1) 烷基化:二甲基甲酰胺及式 (IV) 所示的那非类原料,通  $N_2$  保护,在室温下进行搅拌,加入 60% 的氢化钠溶液,搅拌 50-70 分钟,直至溶液无气泡产生,加入溴乙酸乙酯在室温下搅拌 11-13 小时,将反应液倾入水中分散,以氯仿进行提取,合并提取液,以无水  $Na_2SO_4$  进行干燥,之后过滤,再经过减压浓缩后得到固体,加入无水乙醚打浆洗涤所述固体,之后进行过滤,最后真空干燥得到新的固体,此固体即为式 (V) 所示的那非类化合物的烷基化物;其中每毫升二甲基甲酰胺中加入  $0.1 \sim 0.3$  mmol 式 (IV) 所示的那非类原料,式 (IV) 所示的那非类原料与氢化钠的物质的量之比为  $1:1 \sim 2$ ,式 (IV) 所示的那非类原料与溴乙酸乙酯的物质的量之比为  $1:1.5 \sim 3$ ;

(2) 水解:将式 (V) 所示的那非类化合物的烷基化物、无水乙醇及 NaOH 溶液,加热回流反应 2 小时,冷却后,浓缩得糊状物,再加入水,以盐酸调节至 pH 值为 7-9,得所述的式 (II) 化合物。

13. 根据权利要求 12 所述的式 (II) 化合物的制备方法,其特征还在于该方法还包括对步骤 (2) 所得式 (II) 化合物进行提取纯化的步骤:将步骤 (2) 中所述的 pH 值为 7-9 的反应液以氯仿进行提取,提取液用饱和食盐水洗,以无水  $Na_2SO_4$  干燥,过滤,减压浓缩得白色固体,用甲醇重结晶,得白色粉状固体,即为纯化的式 (II) 化合物。

14. 根据权利要求 12 所述的式 (II) 化合物的制备方法,其特征包括如下步骤:(1) 烷基化:20ml 二甲基甲酰胺及 1.708g、 $3.6 \times 10^{-3}$  mol 式 (IV) 所示的那非类原料,通  $N_2$  保护,在室温下进行搅拌,加入 0.173g、 $4.32 \times 10^{-3}$  mol、浓度为 60% 的氢化钠溶液,搅拌 50-70 分钟,直至溶液无气泡产生,加入 1.202g、 $7.2 \times 10^{-3}$  mol 溴乙酸乙酯在室温下搅拌 11-13 小时,将反应液倾入水中分散,以 20ml  $\times$  3 的氯仿进行提取,合并提取液,以无水  $Na_2SO_4$  进行干燥,之后过滤,再经过减压浓缩后得到固体,加入 6ml 无水乙醚打浆洗涤所述固体,之后进行过滤,最后真空干燥得到新的固体,此固体即为式 (V) 所示的那非类化合物的烷基化物;(2) 水解:将 1.682g、 $3.0 \times 10^{-3}$  mol 式 (V) 所示的那非类化合物的烷基化物、15ml 无水乙醇及 10ml、1mol/L 的 NaOH 溶液,加热回流反应 2 小时,冷却后,浓缩得糊状物,再加入水,以盐酸调节至 pH 值为 7-9 的液体,以 15ml  $\times$  3 的氯仿进行提取,合并提取液,再用饱和食盐水洗一次,以无水  $Na_2SO_4$  干燥,过滤,减压浓缩得白色固体,用甲醇重结晶,得所述的式 (II) 化合物。

15. 权利要求 1 所述的式 (I) 所示的化合物在制备西地那非检测试剂中的应用。

16. 根据权利要求 15 所述的应用,其特征还在于所述的西地那非检测试剂为检测西地那非的胶体金层析试纸条。

17. 权利要求 1 所述的式 (II) 所示的化合物在制备西地那非人工合成抗原中的应用。

## 西地那非及其衍生物的人工合成抗原及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于药物化学领域,涉及西地那非及其衍生物的人工合成抗原及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 西地那非(Sildenafil),又译昔多芬,是一种研发治疗心血管疾病药物时意外发明出的治疗男性勃起功能障碍药物,一般以其商业用名 Viagra(中国大陆注册名万艾可,台湾和香港注册名威而钢)广为人知。不过相对于商品名西地那非在中国的俗名“伟哥”使用的更广泛,影响也更大。目前,在国内好多中成药或保健品中非法添加西地那非以达到临床的疗效,作为患者,在长期不知情的情况下服用含有西地那非的中成药或保健品会引起严重的副作用,检测中成药或保健品中是否含有伟哥成分时,采用的是传统的检验方法,须将提取的样品带回实验室进行分析,或是使用大型的试验车,这样都很不方便,而且反应时间长,实验耗资较大。

### 发明内容

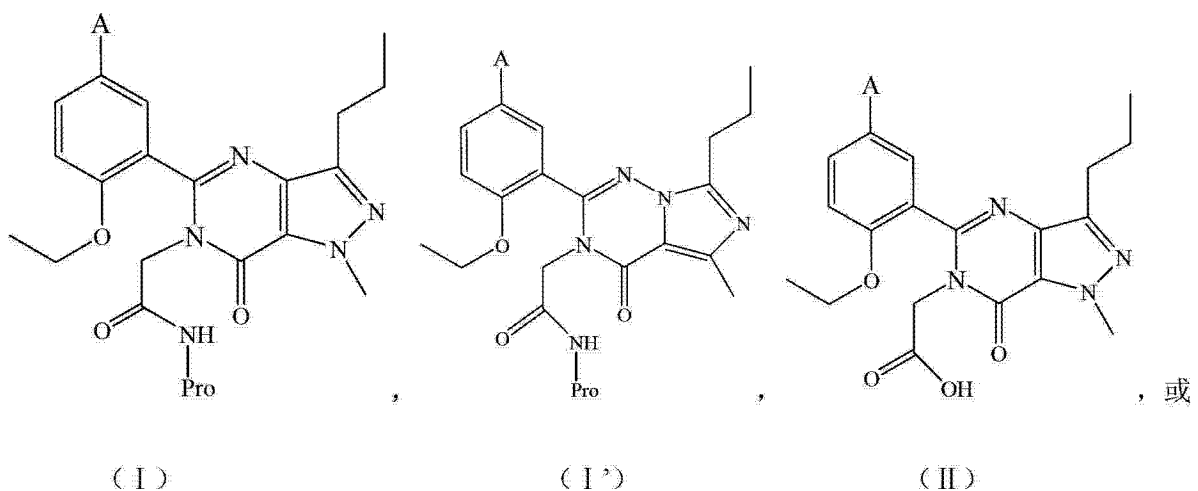
[0003] 本发明的目的是针对现有技术的上述不足,提供一种西地那非及其衍生物及其制备方法和应用。

[0004] 本发明的另一目的是提供西地那非及其衍生物的人工合成抗原及其制备方法和应用。

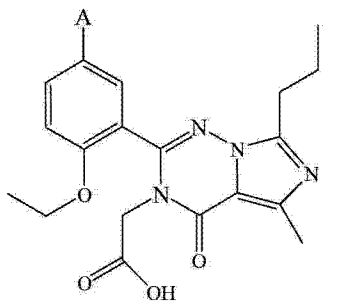
[0005] 本发明的目的可通过如下技术方案实现:

[0006] 结构如式(I)、式(I')、式(II)或式(II')所示的化合物:

[0007]

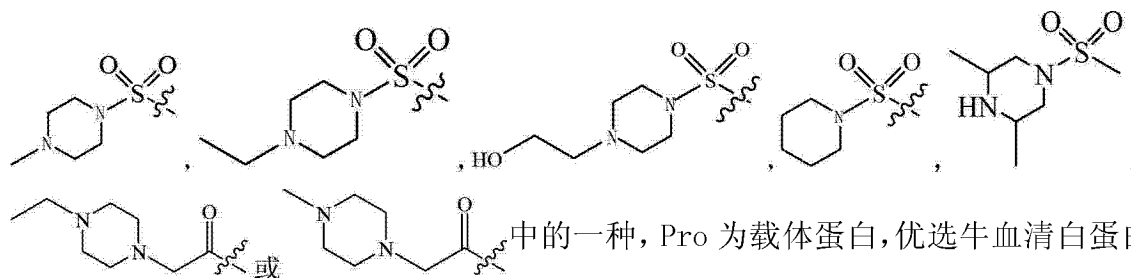


[0008]



(II')

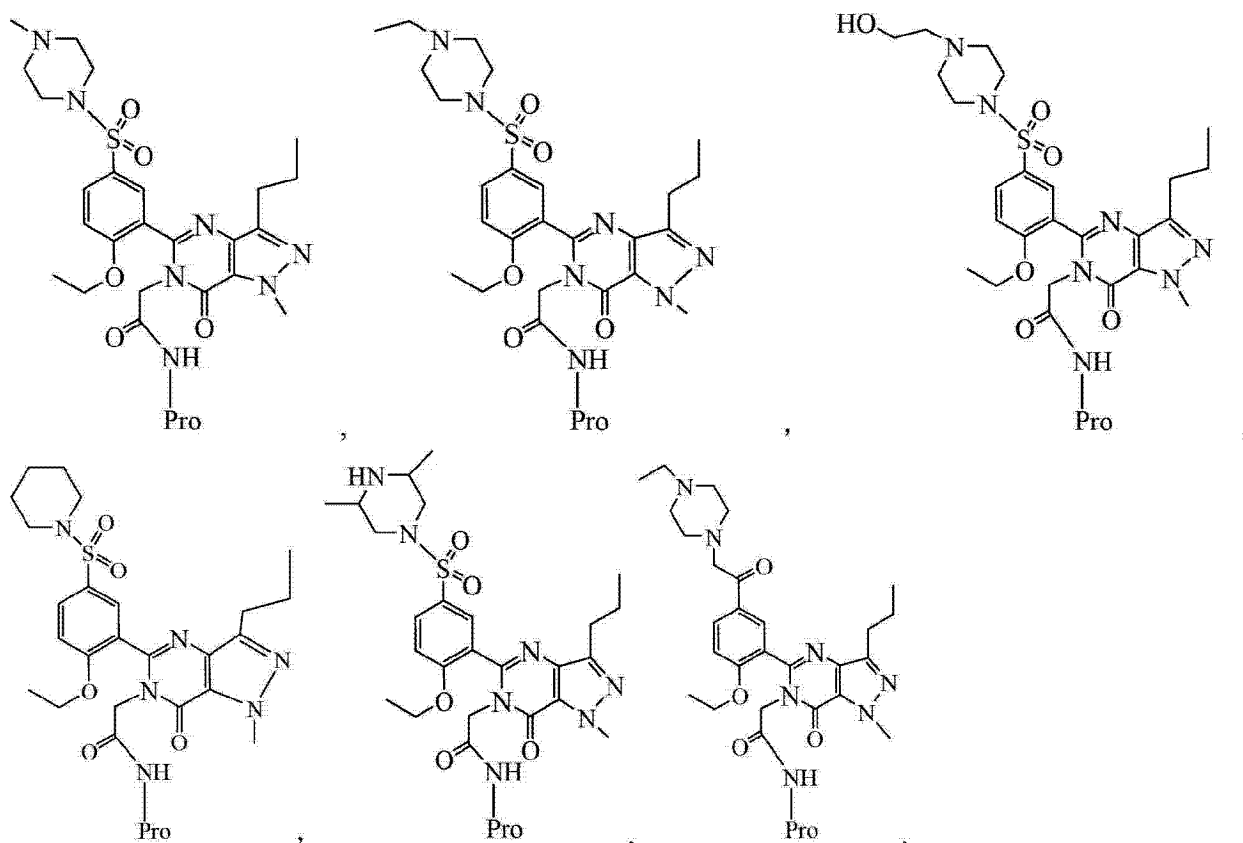
[0009] 其中 A 选自

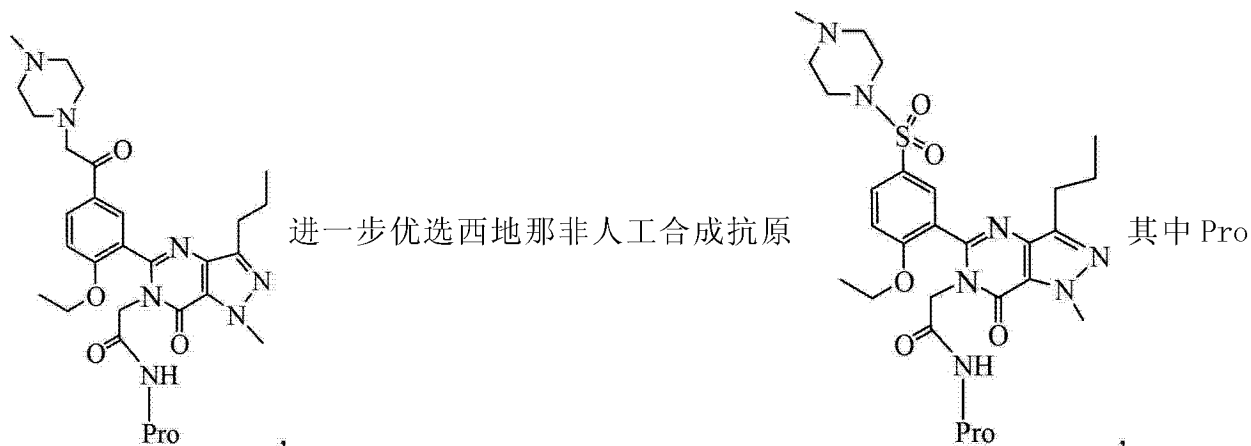


中的一种, Pro 为载体蛋白, 优选牛血清白蛋白或人血蓝蛋白。式(I)或式(I')所示的化合物即为西地那非或其衍生物的人工合成抗原。

[0010] 所述的式(I)化合物优选:

[0011]

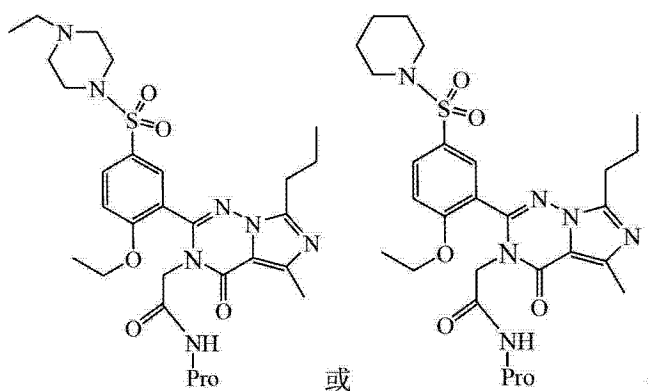




为牛血清白蛋白或人血蓝蛋白；

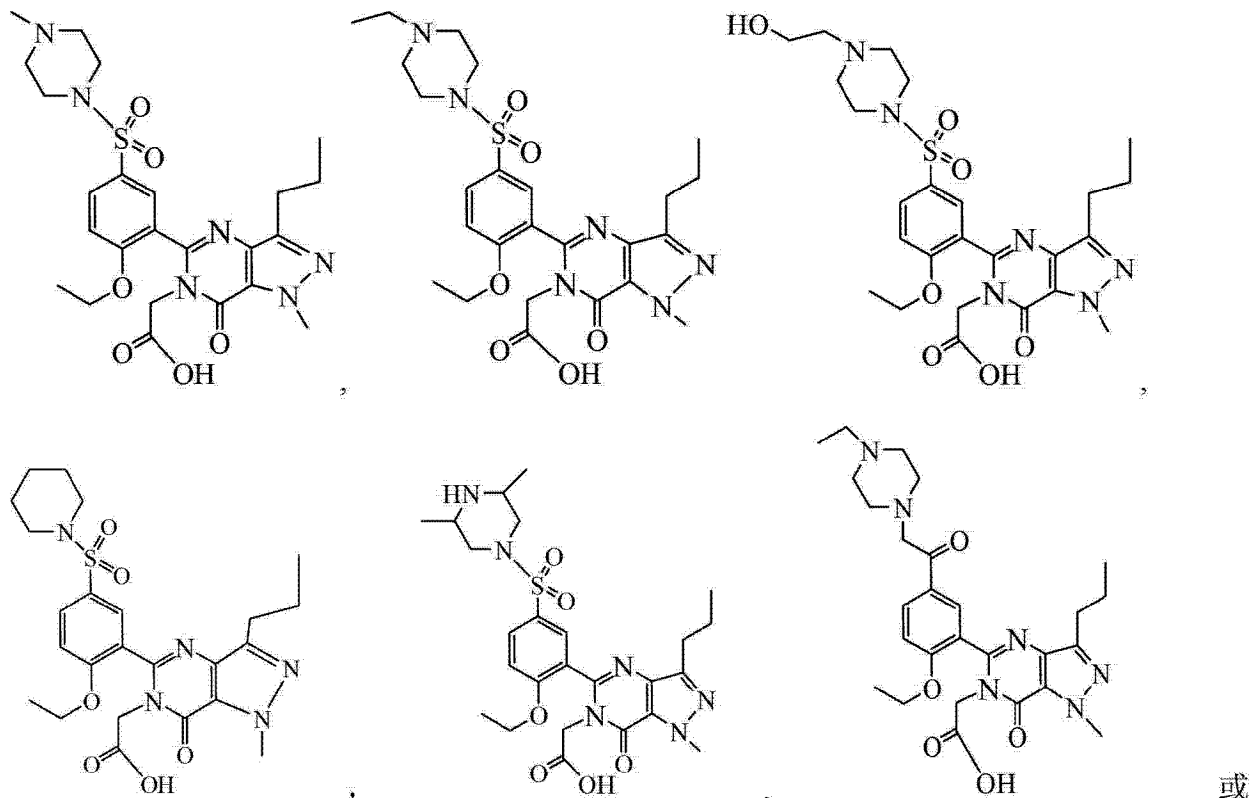
[0012] 所述的式(I')化合物优选：

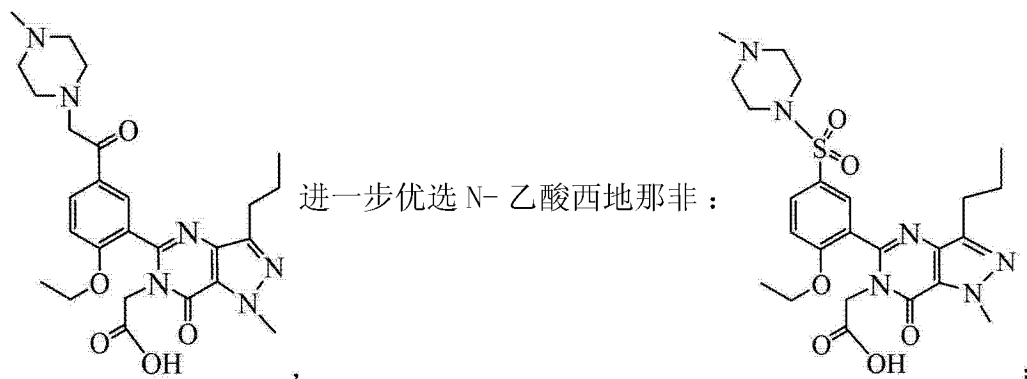
[0013]



[0014] 所述的式(II)化合物优选：

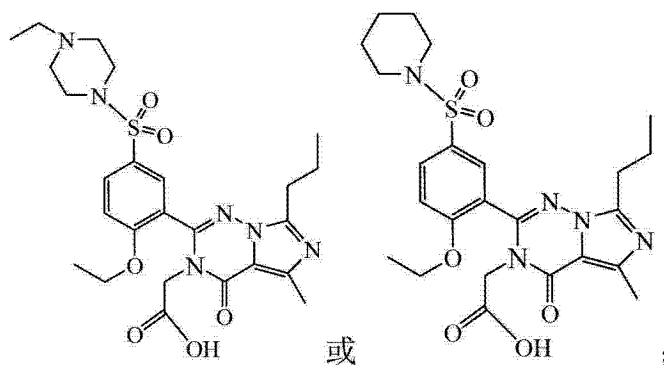
[0015]





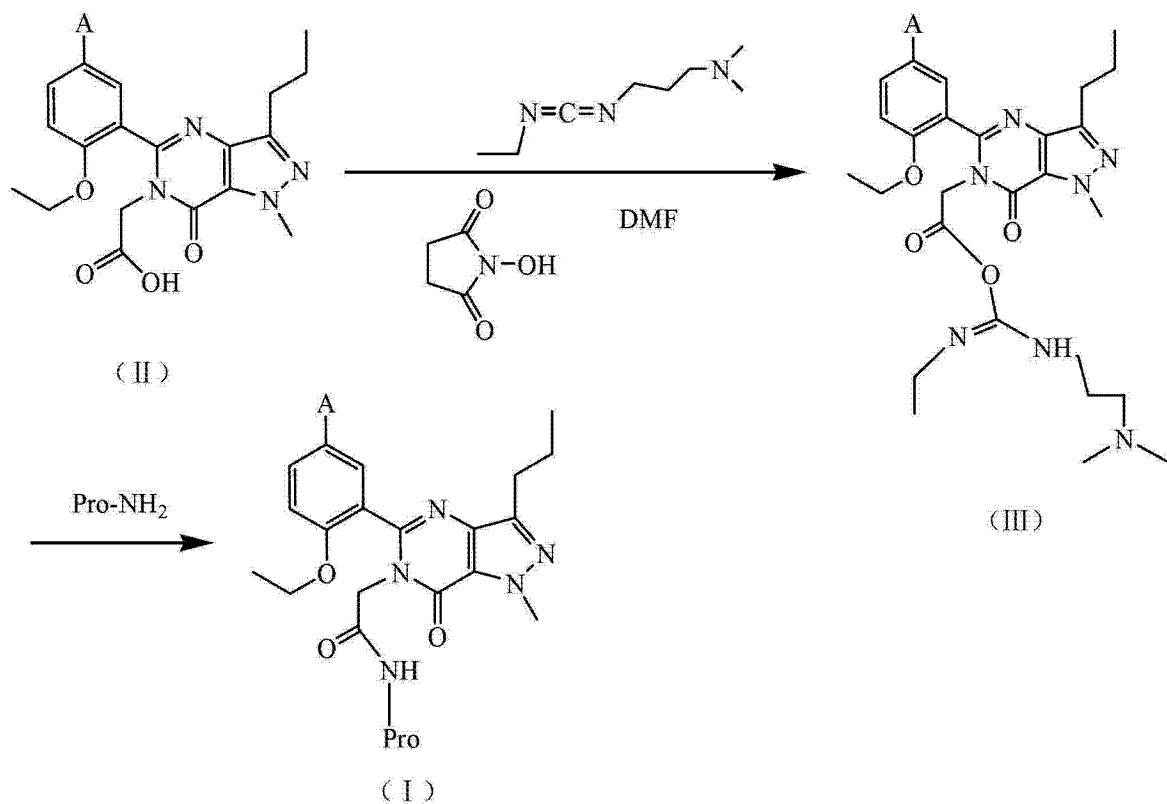
[0016] 所述的式(II')化合物优选：

[0017]

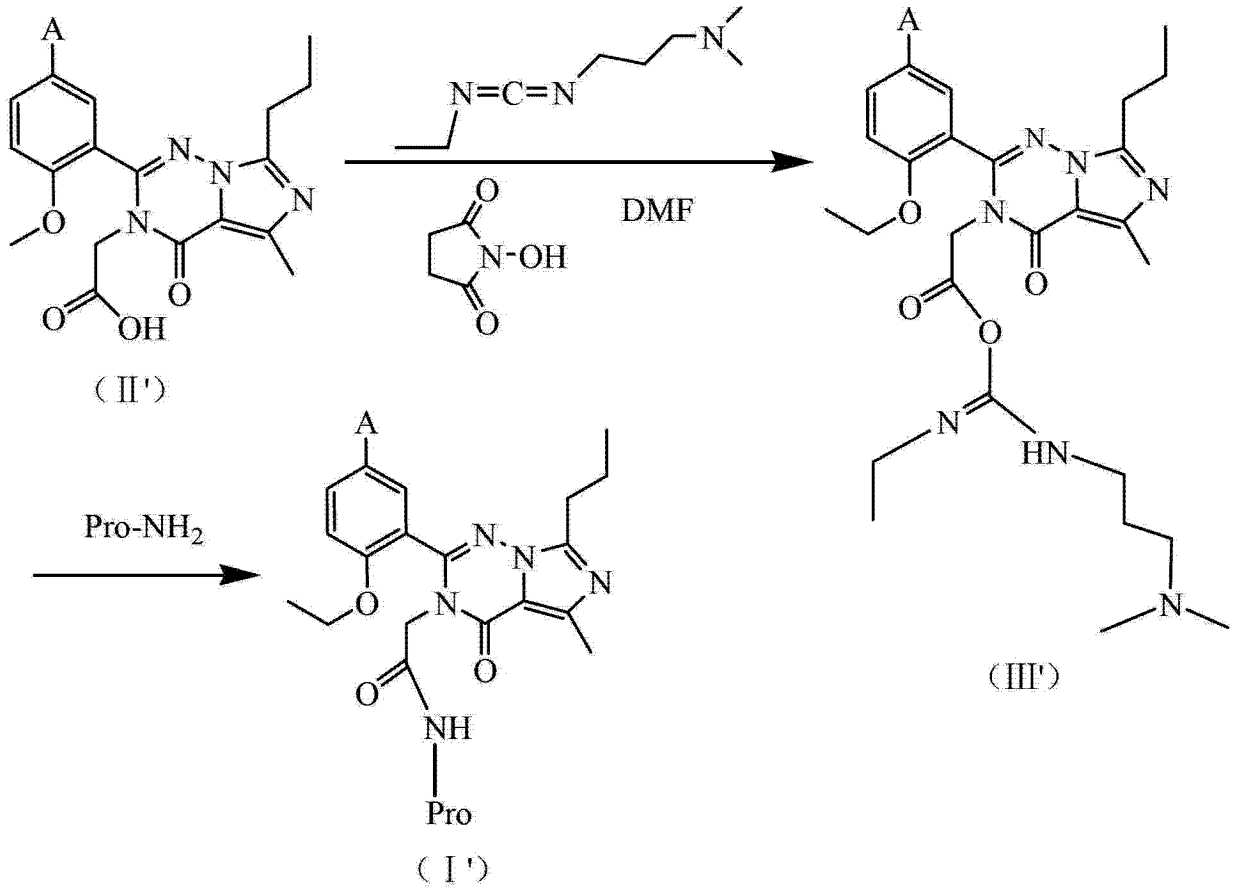


[0018] 式(I)或式(I')化合物的制备方法,通过如下合成路线实现：

[0019]

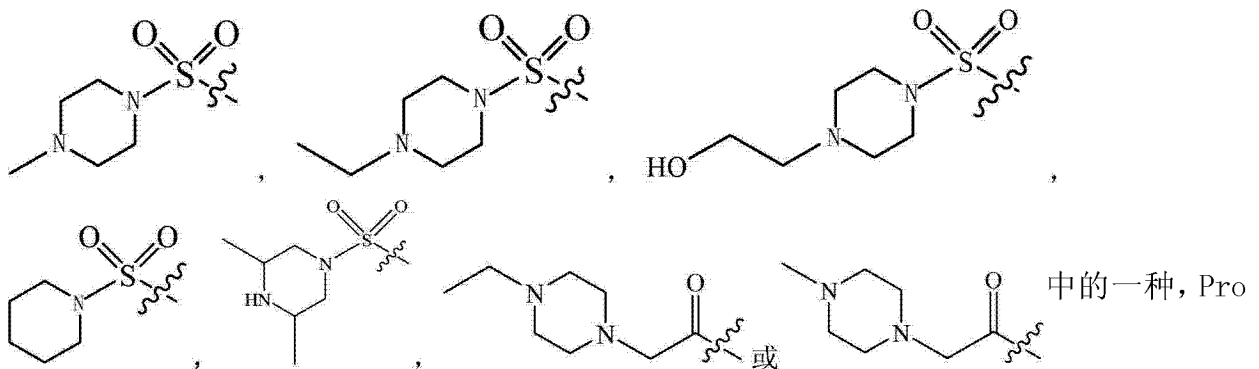


或



;

[0020] 其中 A 选自



为载体蛋白, 优选牛血清白蛋白或人血蓝蛋白;

[0021] 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳化二亚胺(EDC), 为水溶性碳化二亚胺。

[0022] 该制备方法包括如下步骤:

[0023] (1) 将式(II)化合物或式(II')化合物、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、二甲基甲酰胺(DMF)、水溶性碳化二亚胺(EDC)平衡至室温; 在室温避光的条件下进行搅拌反应 22-26 个

小时,得式(III)或式(III')化合物,此反应液记为二号反应液,其中式(II)化合物或式(II')化合物与水溶性碳化二亚胺(EDC)及N-羟基琥珀酰亚胺的摩尔比为1:8-12:13-16,最佳比值为:1:10:15;

[0024] (2)按每100mg载体蛋白溶解在15-20ml硼酸缓冲液,将载体蛋白溶于硼酸缓冲液中,记为三号反应液,所述的载体蛋白优选牛血清白蛋白或人血蓝蛋白,进一步优选牛血清白蛋白;

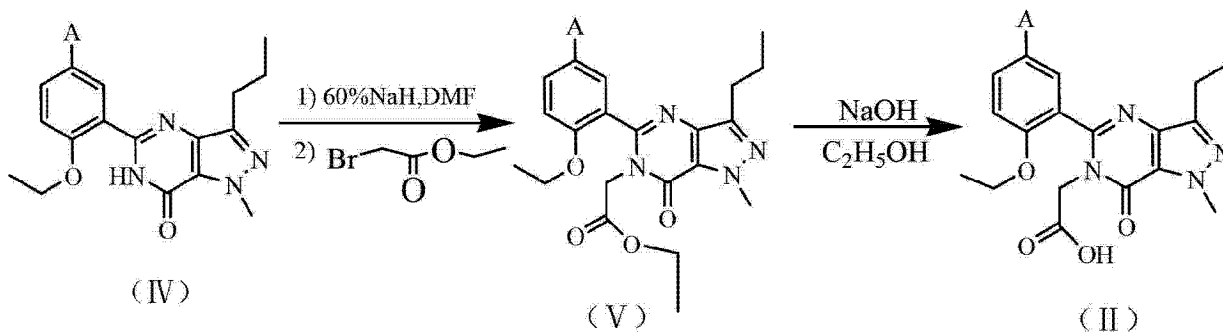
[0025] (3)将二号反应液加入三号反应液中,搅拌反应,其中载体蛋白与式(III)或式(III')化合物的摩尔比为:1:15-25,优选1:20,反应得到含式(I)或式(I')化合物的溶液,记为四号反应液。

[0026] 所述的含式(I)或式(I')化合物的四号反应液在3-5℃的条件下经20000-30000D透析袋透析,然后经冷冻干燥得白色絮状产品,即为式(I)或式(I')所示的西地那非或其衍生物的人工合成抗原;优选将所述的含式(I)或式(I')化合物的四号反应液置于20000-30000分子截留透析袋中,透析袋中还装有0.01-0.02M磷酸盐缓冲液,pH值为7.0-7.5,将透析袋在3-5℃的条件下进行透析46-50小时,每隔3-5小时换一次磷酸盐缓冲液,经所述透析步骤最终所得的产品,经冷冻干燥为白色絮状产品,即为式(I)或式(I')所示的西地那非或其衍生物的人工合成抗原。

[0027] 步骤(3)所述的搅拌反应是先在室温避光的条件下搅拌1-3小时,之后再在3-5℃条件下避光搅拌46-50小时,优选先在室温避光的条件下搅拌2小时,之后在3-5℃条件下避光搅拌48小时。

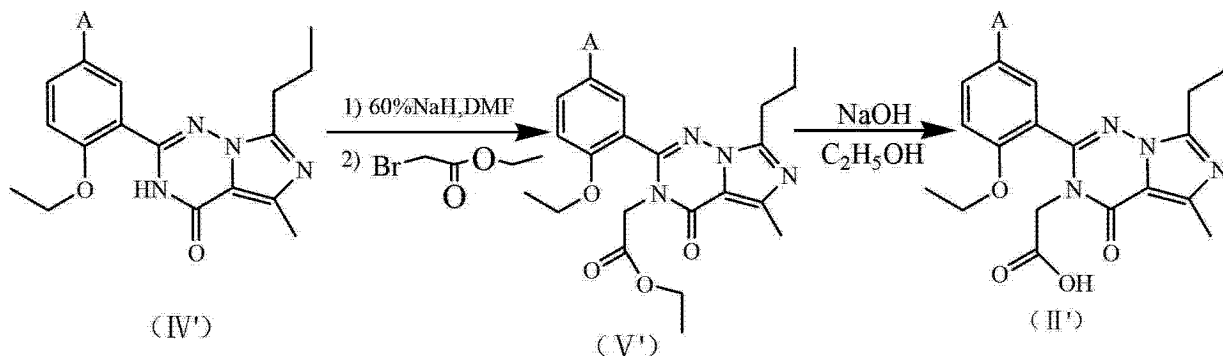
[0028] 所述的式(II)或式(II')化合物的制备方法,通过如下合成路线实现:

[0029]

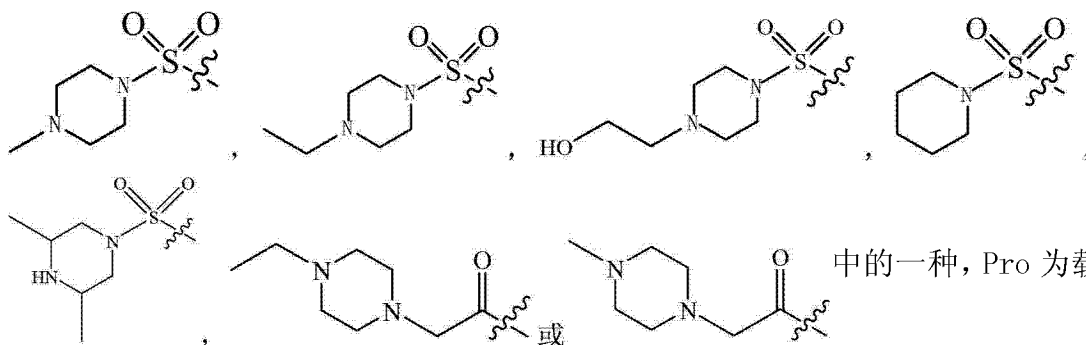


[0030] 或者

[0031]



[0032] 其中 A 选自



中的一种, Pro 为载体蛋白, 优

选牛血清白蛋白或人血蓝蛋白。

[0033] 该制备方法包括如下步骤:

[0034] (1) 烷基化: 向二甲基甲酰胺(DMF) 中加入式(IV) 或式(IV') 所示的那非类原料, 通  $N_2$  保护, 在室温下进行搅拌, 待二甲基甲酰胺(DMF) 完全溶解后, 加入浓度为 60% 的氢氧化钠溶液(NaH), 搅拌 50-70 分钟, 直至溶液无气泡产生, 加入溴乙酸乙酯在室温下搅拌 11-13 小时, 将反应液倾入水中分散, 以氯仿进行提取, 合并提取液, 以无水  $Na_2SO_4$  进行干燥, 之后过滤, 再经过减压浓缩后得到固体, 加入无水乙醚打浆洗涤所述固体, 之后进行过滤, 最后真空干燥得到新的固体, 此固体即为式(V) 或式(V') 所示的那非类化合物的烷基化物; 其中每毫升二甲基甲酰胺中加入  $0.1 \sim 0.3 \text{ mmol}$  式(IV) 或式(IV') 所示的那非类原料, 式(IV) 或式(IV') 所示的那非类原料与氢氧化钠的物质的量之比为  $1:1 \sim 2$ , 式(IV) 或式(IV') 所示的那非类原料与溴乙酸乙酯的物质的量之比为  $1:1.5 \sim 3$ ;

[0035] (2) 水解: 将式(V) 或式(V') 所示的那非类化合物的烷基化物、无水乙醇及  $1 \text{ mol/L}$  NaOH 溶液, 加热回流反应 2 小时, 冷却后, 浓缩得糊状物, 再加入水, 以盐酸调节至 pH 值为 7-9, 得所述的式(II) 或式(II') 化合物, 其中式(V) 或式(V') 所示的那非类化合物的烷基化物与无水乙醇的量之比为  $1 \text{ mol} : 450 \sim 550 \text{ ml}$ ; 式(V) 或式(V') 所示的那非类化合物的烷基化物与 NaOH 的物质的量之比为  $2.5 \sim 4:1$ 。

[0036] 该方法还包括对步骤(2) 所得式(II) 或式(II') 化合物进行提取纯化的步骤: 将步骤(2) 中所述的 pH 值为 7-9 的反应液以氯仿进行提取, 提取液用饱和食盐水洗, 以无水  $Na_2SO_4$  干燥, 过滤, 减压浓缩得白色固体, 用甲醇重结晶, 得白色粉状固体, 即为式(II) 或式(II') 化合物。

[0037] 该制备方法优选包括如下步骤:

[0038] (1) 烷基化:  $20 \text{ ml}$  二甲基甲酰胺(DMF) 及  $1.708 \text{ g}$ 、 $3.6 \times 10^{-3} \text{ mol}$  式(IV) 或式(IV') 所示的那非类原料, 通  $N_2$  保护, 在室温下进行搅拌, 待二甲基甲酰胺(DMF) 完全溶解后, 加入  $0.173 \text{ g}$ 、 $4.32 \times 10^{-3} \text{ mol}$ 、浓度为 60% 的氢氧化钠溶液(NaH), 搅拌 50-70 分钟, 直至溶液无气泡产生, 加入  $1.202 \text{ g}$ 、 $7.2 \times 10^{-3} \text{ mol}$  溴乙酸乙酯在室温下搅拌 11-13 小时, 将反应液倾入水中分散, 以  $20 \text{ ml} \times 3$  的氯仿进行提取, 合并提取液, 以无水  $Na_2SO_4$  进行干燥, 之后过滤, 再经过减压浓缩后得到固体, 加入  $6 \text{ ml}$  无水乙醚打浆洗涤所述固体, 之后进行过滤, 最后真空干燥得到新的固体, 此固体即为式(V) 或式(V') 所示的那非类化合物的烷基化物;

[0039] (2) 水解: 将  $1.682 \text{ g}$ 、 $3.0 \times 10^{-3} \text{ mol}$  式(V) 或式(V') 所示的那非类化合物的烷基化物、 $15 \text{ ml}$  无水乙醇及  $10 \text{ ml}$ 、 $1 \text{ mol/L}$  的 NaOH 溶液, 加热回流反应 2 小时, 冷却后, 浓缩得糊状物, 再加入水, 以盐酸调节至 pH 值为 7-9 的液体, 以  $15 \text{ ml} \times 3$  的氯仿进行提取, 合并提取液, 再用饱和食盐水洗一次, 以无水  $Na_2SO_4$  干燥, 过滤, 减压浓缩得白色固体, 用甲醇重结

晶,得所述的式(II)或式(II')化合物。

[0040] 所述的式(IV)所示的那非类原料为西地那非、豪莫西地那非、羟基豪莫西地那非、那莫西地那非、硫代艾地那非、红地那非、那红地那非,优选西地那非;所述的式(IV')所示的那非类原料为伐地那非或伪伐地那非。

[0041] 本发明式(I)或式(I')所示的化合物在制备西地那非检测用胶体金试纸条中的应用。

[0042] 本发明式(II)或式(II')所示的化合物在制备西地那非人工合成抗原中的应用。

[0043] 式(II)或式(II')所示的化合物是一种水溶性碳化二亚胺,通常以盐酸盐的形式存在。反应最适 pH 为 :4.0-6.0。

[0044] 有益效果:

[0045] 包括西地那非在类的那非类药物为小分子物质(分子质量小于 1000),本身不具有诱导产生抗体的能力,必须设法先将这些药物与载体蛋白质偶联制备出相应的人工完全抗原,这是药物酶免疫分析的关键所在,涉及合适中间体的合成、活性官能团引入位点的选择、半抗原产物的分离纯化、偶联臂的长短、半抗原与载体分子的偶联比等。本发明通过大量实验研究,在尽可能保留那非类药物本身特征结构的前提下,在嘧啶环的 1 位 N 原子引入活性更高的基团  $-\text{CH}_2\text{COOH}$ ,形成 N-乙酸-那非类药物(式(II)化合物或式(II')化合物)。此类化合物更有利于通过连接臂与载体蛋白相连形成稳定的人工合成抗原。在连接臂的选择方面,本发明选择水溶性碳化二亚胺 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳化二亚胺(EDC)作为连接臂,EDC 通常以盐酸盐的形式存在。反应最适 pH 为 :4.0-6.0。EDC 是一种羧基活化试剂,与 N-乙酸-那非类药物(式(II)化合物或式(II')化合物)反应生成更易取代的式(III)或式(III')所示的中间产物。由于 EDC 具有恰当的长度,既确保了载体蛋白的空间位阻不会影响免疫系统对半抗原的识别,又使式(III)或式(III')所示的中间产物可以相对羧基更易被伯胺化合物亲核取代,合成的人工合成抗原中式(III)或式(III')化合物与载体蛋白的偶联比例在 10-20 之间,对下一步免疫动物或通过其他途径获得抗体具有较高的特异性和高效性。同时水溶性碳化二亚胺(EDC)联合 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)使用,会提高反应产率和更加稳定的式(III)或式(III')所示的中间产物。

[0046] 本发明首次合成了那非类化合物特别是西地那非的半抗原化合物(式(II)或式(II'))以及那非类化合物特别是西地那非的人工合成抗原(式(I)或式(I')),所合成的人工合成抗原具有良好的免疫原性和反应性,能够用于制备相应的单克隆抗体,从而可以进一步做成检测那非类化合物特别是检测西地那非的胶体金试纸,此胶体金试纸可以随时检测样品中是否含有西地那非或其结构类似物(母核相同),不需要专业人士操作,检测方便,现场即可快速检测,克服了目前西地那非现场检测不方便,而且反应时间长,实验耗资较大的缺陷。

[0047] 式(II)或式(II')所示的化合物合成人工合成抗原的机理为:水溶性碳化二亚胺(EDC)与含有羧基的式(II)化合物或式(II')化合物反应,生成活泼的式(III)或式(III')所示的中间体化合物,然后载体蛋白在某一 pH 时,一般是大于其等电点,使蛋白中的氨基暴露出来,从而成为提供伯胺的底物,然后亲核进攻活性中间产物式(III)或式(III')化合物,从而达到小分子化合物偶联到载体蛋白的目的。

[0048] 生物材料保藏信息

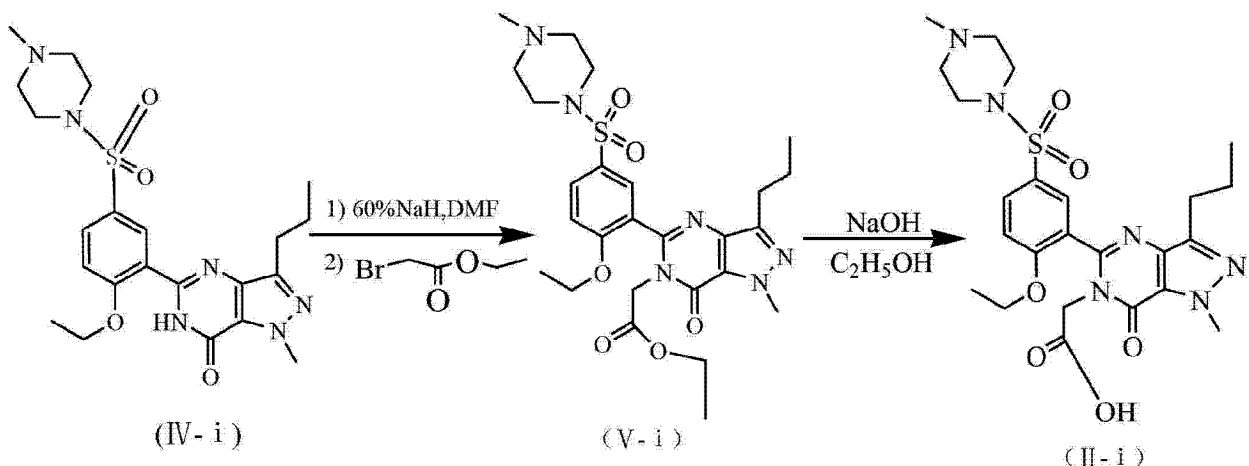
[0049] 本发明涉及的杂交瘤细胞株 2H5B12C3, 于 2010 年 11 月 30 日, 保藏于中国典型培养物保藏中心, 简称 CCTCC, 地址为武汉市武汉大学, 保藏编号为 CCTCC NO :C2010123。

### 附图说明

- [0050] 图 1、10ug/ml N- 乙酸西地那非全波长扫描图谱；  
 [0051] 图 2、30ug/ml N- 乙酸西地那非全波长扫描图谱；  
 [0052] 图 3、100ug/ml N- 乙酸西地那非全波长扫描图谱；  
 [0053] 图 4、1mg/ml N- 乙酸西地那非全波长扫描图谱；  
 [0054] 图 5、100ug/ml N- 乙酸西地那非紫外全波长吸收图谱；  
 [0055] 图 6、N- 乙酸西地那非 -BSA 全波长扫描图谱；  
 [0056] 图 7、N- 乙酸西地那非核磁共振图谱；  
 [0057] 图 8、N- 乙酸西地那非质谱；  
 [0058] 图 9、N- 乙酸西地那非 HPLC 图谱；  
 [0059] 图 10、胶体金层析试纸条的剖面结构示意图。  
 [0060] 图 11、西地那非 3.0mm 检测卡检西地那非五个浓度梯度的结果。  
 [0061] 图 12、西地那非 3.0mm 检测卡检伐地那非五个浓度梯度的结果。  
 [0062] 图 13、西地那非 3.0mm 检测卡检红地那非五个浓度梯度的结果。  
 [0063] 图 14、西地那非 3.0mm 检测卡检他达拉非五个浓度梯度的结果。

### 具体实施方式

- [0064] 实施例 1  
 [0065] A 合成式 N- 乙酸西地那非  
 [0066] 合成路线：  
 [0067]



[0068] (1) 烷基化：往反应瓶中加入 20ml 干燥的二甲基甲酰胺(DMF)及 1.708g、 $3.6 \times 10^{-3} \text{mol}$  的西地那非 (IV-i), 并通  $\text{N}_2$  保护, 在室温下进行搅拌, 待二甲基甲酰胺(DMF)完全溶解后, 快速称取 0.173g、 $4.32 \times 10^{-3} \text{mol}$ 、浓度为 60% 的氢氧化钠(NaH), 并将其加入所述反应瓶中, 搅拌 60 分钟, 直至溶液无气泡产生, 然后用 1ml 注射器吸取 1.202g、 $7.2 \times 10^{-3} \text{mol}$  的溴乙酸乙酯慢慢注入所述反应瓶中, 注入完毕后, 在室温下搅拌 12 小时, 之后将反应液

倾入 60ml 水中分散,以 20ml×3 的氯仿进行提取,合并提取液,以无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  进行干燥,之后过滤,再经过减压浓缩后得到固体,加入 6ml 无水乙醚打浆洗涤所述固体,之后进行过滤,最后真空干燥得到 1.722g 新的固体,收率 85.31%,此固体为西地那非的烷基化物(式(V-i));

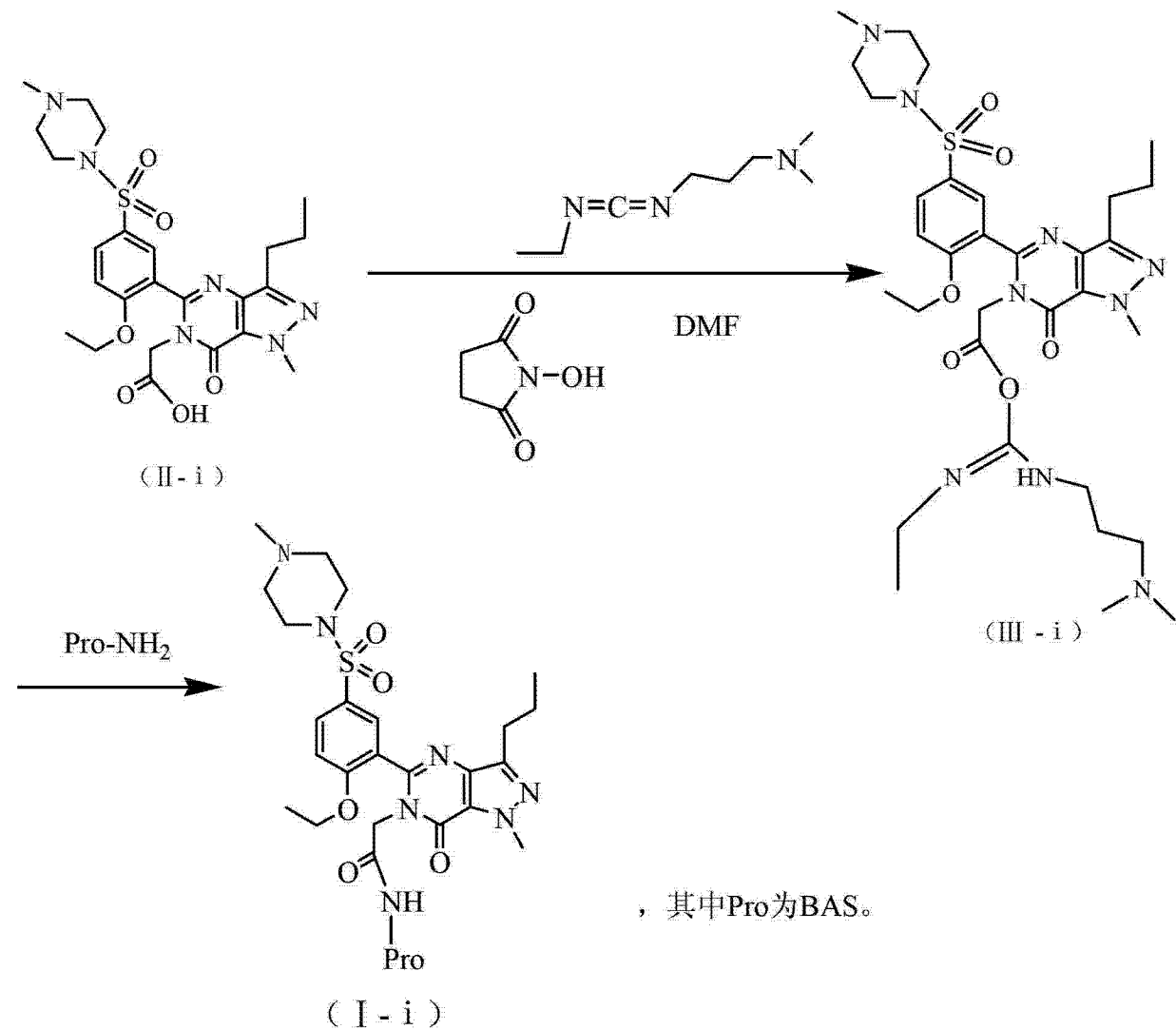
[0069] (2) 水解:将 15ml 无水乙醇和上述步骤所得的 1.682g、 $3.0 \times 10^{-3} \text{mol}$  的西地那非烷基化物(式(V-i))加入新的反应瓶中,进行搅拌分散,再加入 10ml、1mol/L 的 NaOH 溶液,加热回流反应 2 小时,停止加热稍冷却后,将反应液转入单口瓶中,减压浓缩得糊状物,再加入 20ml 水,以 3N 盐酸调节至 pH 值为 8 的液体,以 15ml×3 的氯仿进行提取,合并提取液,再用饱和食盐水洗一次,以无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥,过滤,减压浓缩得白色固体,用甲醇重结晶,得 1.222g 白色粉状固体,收率 76.47%,此固体为 N-乙酸西地那非(式(II-i));

[0070] 半抗原化合物 N-乙酸西地那非分子量为 532.6,熔点为  $136^\circ\text{C}$ ,核磁共振验证其结构为式(II-i),详见图 7;MS:533.22 ( $\text{M}+\text{H}^+$ )详见图 8;HPLC 检测纯度为 99.78%,详见图 9。

[0071] B、生成人工合成抗原:

[0072] 合成路线:

[0073]



[0074] (1) 将上述步骤中所得的 N-乙酸西地那非(式(II-i))、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、

二甲基甲酰胺(DMF)、水溶性碳化二亚胺平衡至室温；

[0075] (2) 取 N- 乙酸西地那非(式(II -i))、水溶性碳化二亚胺(EDC) 和 N- 羟基琥珀酰亚胺, 三者的摩尔比为 :N- 乙酸西地那非 :水溶性碳化二亚胺(EDC):N- 羟基琥珀酰亚胺=1 : 10 :15, 将其置入预先洗干净的圆底烧瓶, 加入上述步骤中所得的适量的二甲基甲酰胺溶解, 一般根据上述混合液体的多少加入二甲基甲酰胺, 二甲基甲酰胺的加入量对反应影响不大, 一般加入 2-4ml 二甲基甲酰胺, 能溶解样品即可, 太多对下一步反应中的蛋白载体有影响, 为保证反应完全, 在室温避光的条件下搅拌 24h, 最后生成的溶液为含式(III -i) 化合物的反应液, 记为二号反应液。其中烧瓶中不能有水残留, 用前需烘干并预冷至室温, 以免影响反应物、产物的稳定性, 影响反应效率；

[0076] (3) 当式(II -i) 化合物、N- 羟基琥珀酰亚胺和水溶性碳化二亚胺(EDC) 在二甲基甲酰胺中反应完全后, 现配载体蛋白溶液牛血清白蛋白溶液(BSA 溶液), 将牛血清白蛋白与硼酸缓冲液按 1:0.15 (100mg 溶解在 15ml 硼酸缓冲液) 的量溶解于另一干净容器中的硼酸缓冲液, 然后转入另一干净圆底烧瓶中, 此溶液记为三号反应液, 其中硼酸缓冲液和载体蛋白反应液必须现配现用, 硼酸缓冲液为 pH9.0 的硼酸缓冲液；

[0077] (4) 将二号反应液按每 10 秒 1 滴的速度滴入三号反应液中, 直至将二号的反应液加完后, 其中载体蛋白 BSA 与(III -i) 化合物比例为 :1:20, 先在室温避光的条件下搅拌 2 小时, 之后在 3-5℃ 条件下避光搅拌 48 小时, 反应生成 N- 乙酸西地那非 -BSA (式(I -i)) 即为西地那非的人工合成抗原。反应体系中载体蛋白与(III -i) 化合物的比例根据不同的半抗原而定, 一般半抗原化合物与载体蛋白的偶联比例在 10-20 之间, 所反应得到的抗原, 对下一步免疫动物或通过其他途径获得抗体具有较高的特异性和高效性, 所以载体蛋白与半抗原化合物的摩尔反应比例在 20 左右较佳；

[0078] (5) 等所有反应结束后, 将步骤(4) 所得的反应液置于 20000 分子截留透析袋中, 透析袋中还装有 0.01M 磷酸盐缓冲液, pH 值为 7.0-7.5, 将透析袋在 3-5℃ 的条件下透析 48h, 每隔 3 小时换一次磷酸盐缓冲液；

[0079] (6) 透析上述步骤中所得的样品, 经冷冻干燥为白色絮状产品, 即为经纯化的西地那非的人工合成抗原 N- 乙酸西地那非 -BSA。

[0080] 实施例 2

[0081] 人工合成抗原的检测方法如下：

[0082] 分别取：

[0083] 10ug/ml, 50ug/ml, 100ug/ml, 250ug/ml, 500ug/ml, 750ug/ml, 1mg/ml 梯度浓度的半抗原 N- 乙酸西地那非, BSA, 全抗原 N- 乙酸西地那非 -BSA, 分别对其进行全波长扫描, 以确定最佳全波长扫描浓度。

[0084] 从图 1 至图 4 中可看出, 100ug/ml 浓度为 N- 乙酸西地那非较好的全波长扫描浓度。当浓度太小时, 由于吸收值过低, 不能体现样品的最大吸收波长；浓度达到 1mg/ml 时, 由于样品浓度太高, 会掩盖 N- 乙酸西地那非的最佳吸收波长。

[0085] 从图 5、6 可知, N- 乙酸西地那非, N- 乙酸西地那非 -BSA 均在 280nm 处有吸收峰。100ug/ml N- 乙酸西地那非在 280nm 处吸收值大于 0.7。吸收值太大, 引起的偏差太大, 故稀释十倍, 浓度为 10mg/ml, 测得紫外吸收值为 0.280, 符合测 N- 乙酸西地那非摩尔吸光值的要求。

[0086]  $E=A/c1=0.28/(10\mu\text{g} \times 10^{-3}/\text{ml}/532.6)=14912$  (532.6 为 N- 乙酸西地那非的摩尔质量) ;

[0087] 对 BSA 和 N- 乙酸西地那非 -BSA (以下简称 S-BSA) 分别在 1mg/ml 的浓度下测其 280nm 处紫外吸光值, 数据如下 :

[0088] 1mg/ml BSA 在 280nm 处的吸收值 :0.595,

[0089] 1mg/ml S-BSA 在 280nm 处的吸收值 :2.717,

[0090] 则产物中 N- 乙酸西地那非的吸收值 :2.717-0.595=2.122,

[0091] 则产物中 N- 乙酸西地那非的摩尔浓度 :2.122/14912=1.423x10<sup>-4</sup>mol/L,

[0092] 则产物中 N- 乙酸西地那非的质量浓度 :1.423x10<sup>-4</sup>x 532.6=0.075g/L,

[0093] 产物中 BSA 的质量浓度 :1-0.0758=0.9242,

[0094] 产物中 BSA 的摩尔浓度 :0.9242/67000=1.379x10<sup>-5</sup>mol/L (67000 为 BSA 的摩尔质量), 则偶联比为 :1.423x10<sup>-4</sup>mol/L/1.379x10<sup>-5</sup>mol/L=10。

[0095] 实施例 3 人工合成抗原反应原性及免疫原性的检测

[0096] 1、材料与试剂

[0097] (1) 雌性 BALB/c 小鼠, 体重 18 ~ 22g

[0098] (2) HRP 标记羊抗鼠 IgG

[0099] (3) 福氏完全佐剂和福氏不完全佐剂

[0100] (4) 包被缓冲液 (0.85mol/L pH9.6 的碳酸缓冲液) :Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、1.59g、NaHCO<sub>3</sub>、2.93g、加蒸馏水至 1000ml ;

[0101] (5) 封闭液 :1% 明胶 (用包被缓冲液液配制) ;

[0102] (6) 洗涤缓冲液 (PBST) :含 0.05%Tween-20 的 0.01mol/L pH7.4 的 PBS ;

[0103] (7) 抗体稀释液 :含 0.05%Tween-20、0.1% 明胶的 0.01mol/L pH7.4 的 PBS ;

[0104] (8) 终止液 (4mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) :取蒸馏水 156.6ml 逐滴加入浓硫酸 (98%) 43.4ml ;

[0105] (9) 底物缓冲液 (p H 5.0 的磷酸 - 柠檬酸缓冲液) :0.2mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (28.4g/L) 25.7ml、0.1mol/L 柠檬酸 (19.2g/L) 24.3ml、蒸馏水 50ml ;

[0106] (10) OPD 底物使用液 (OD492) :OPD40mg、底物缓冲液 100ml、30% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20  $\mu$  l。

[0107] 2、免疫 BALB/c 小鼠

[0108] 偶联抗原 N- 乙酸西地那非 -BSA 加等量的弗氏完全佐剂乳化, 分多点小鼠皮下注射 0.2ml (1mg/ml)。3 周后, N- 乙酸西地那非 -BSA 加等量的弗氏不完全佐剂充分混匀后, 分多点小鼠皮下注射 0.2ml (1mg/ml), 10 天后, 断尾取血一滴, 测抗体效价, 选滴度高的小鼠做融合试验。一个月后可以经静脉给予无佐剂抗原 0.1ml, 3~4 天后, 杀死小鼠取脾做融合用。

[0109] 3、免疫效价测定

[0110] 第三次免疫后 7 ~ 10d 用 ELISA 法检测血清效价。方法如下 :免疫后的 BALB/c 小鼠尾部采血 0.05ml, 3000r/min 离心 5min, 收集血清, 4 $^{\circ}$ C 保存。用包被缓冲液将包被抗原 N- 乙酸西地那非 -BSA 稀释至适当的工作浓度 (0.5  $\mu$  g/ml) ;将其加入到酶标板中, 每孔 100  $\mu$  l, 4 $^{\circ}$ C 过夜 ;然后弃去孔内的液体。每孔加封板液 200  $\mu$  l, 37 $^{\circ}$ C 湿盒孵育 1h, 然后用洗涤缓冲液洗 3 次, 每次 90s (简称洗涤, 下同), 拍干。将血清样品倍比稀释后加入酶标板中, 每孔 100  $\mu$  l ;同时设空白对照和阴性对照各 2 孔。37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, 洗涤、拍干。加酶标第

二抗体 :先用稀释液将酶标第二抗体稀释到 1:5000 倍,每孔加入 100  $\mu$  l,置 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h,然后洗涤、拍干 ;加底物液 :各孔加新配制的 OPD 底物使用液 100  $\mu$  l,37 $^{\circ}$ C 孵育 10 ~ 30min 后,每孔加终止液 50  $\mu$  l 终止反应。然后在酶标仪上读取 492nm 的吸光度。以抗血清吸光度为阴性血清吸光度 2 倍时 (即 P/N  $\geq$  2) 对应的抗血清稀释度为抗血清的效价。

#### [0111] 4、检测结果

[0112] 三次免疫后经 ELISA 测定小鼠血清中抗体效价分别为 1:1.6 $\times$ 10<sup>5</sup>、1:3.2 $\times$ 10<sup>5</sup>、1:1.6 $\times$ 10<sup>5</sup>、1:3.2 $\times$ 10<sup>5</sup>。四只小鼠的血清效价均达到了 1:1.6 $\times$ 10<sup>5</sup> 以上,说明人工抗原合成成功,具有较好的反应原性和免疫原性,免疫效果明显,获得了高效价的血清,可以满足后续单克隆抗体制备的需要。

#### [0113] 实施例 4 胶体金层析试纸条的制备

[0114] 将按照实施例 1 方法制备的西地那非人工合成抗原 N-乙酸西地那非-BSA 按常规方法免疫小鼠制备分泌西地那非单克隆抗体的杂交瘤细胞株,并通过 ELISA 试验筛选阳性克隆,得到阳性克隆杂交瘤细胞 2H5B12C3(保藏编号为 CCTCCNO :C2010123,保藏日 :2010 年 11 月 30 日),将阳性克隆杂交瘤细胞免疫 Babc 小鼠制备抗体腹水,采用 ELISA 检查,腹水滴度可达 1.0 $\times$ 10<sup>6</sup>,将腹水纯化得到高纯度的单克隆抗体蛋白,测定蛋白浓度,备胶体金标记用。

[0115] 制备含抗西地那非单克隆抗体的胶体金标记物和鼠 IgG 单克隆抗体的胶体金标记物的混合溶液 :用柠檬酸三钠还原剂将氯金酸还原制成 20nm-40nm 的胶体金溶液 ;用 0.1mol/LK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 调节所述的胶体金溶液至最适 pH8.5-9.0,将纯化的本发明西地那非单克隆抗体纯水透析后,按 3  $\mu$  g/ml 量加入胶体金溶液中,室温电磁搅拌 15-30min,然后按 5  $\mu$  g/ml 的量加入鼠 IgG 单克隆抗体,室温电磁搅拌 15-30min,逐滴加入 1% 络蛋白溶液,使终浓度为 0.1%,持续搅拌 5min,4 $^{\circ}$ C 下 15000rpm 离心 10min,弃去上清,将沉淀物用重悬液重新恢复至原体积混匀,再次离心一次,用重悬溶液将沉淀物混悬至原体积 1/20,4 $^{\circ}$ C 保存备用,即获得含抗西地那非单克隆抗体的胶体金标记物和鼠 IgG 单克隆抗体的胶体金标记物的混合溶液,其中所述重悬液为含 5% 海藻的 0.02Tris-HCL 缓冲液 ;

[0116] 将 1:15 稀释的含抗西地那非单克隆抗体的胶体金标记物和鼠 IgG 单克隆抗体的胶体金标记物的混合溶液喷涂吸附于聚酯纤维毡中,27 $^{\circ}$ C 保温干燥,制备西地那非金标结合垫 3,喷涂工艺简单快速,喷涂均匀,干燥快。

[0117] 在包被膜 3 上用实施例 1 制备的西地那非人工抗原溶液 0.6mg/ml 包被直线式检测线 T 线 4,用羊抗鼠 IgG 溶液 2.0mg/ml 包被直线式对照线 C 线 5,两条线竖向平行排列。

[0118] 试纸条的组装(图 10) :将样品垫 1、金标组合垫 2、包被膜 3 和吸水垫 6 依次粘附在衬板 7 上,样品垫 1 置于衬板 7 的一端,吸水垫 6 置于衬板 7 的另一端,包被膜 3 置于衬板 7 的中间,金标结合垫 2 置于样品垫 1 和包被膜 3 之间,即得到用于免疫检测的西地那非胶体金层析检测试验纸大板,将大板按客户要求分切成 2.5mm-7.0mm 宽度规格的试纸条,密封干燥保存。

#### [0119] 实施例 5

[0120] 用实施例 4 制备的西地那非胶体金试纸条检测浓度分别为 5ppb、100  $\mu$  g/ml、500  $\mu$  g/ml 的西地那非溶液以蒸馏水(即西地那非浓度 0mg/ml),结果见图 11,由结果看出蒸馏水(含西地那非 0mg/ml) 结果阴性 ;5ppb 西地那非溶液结果为阳性 ;100  $\mu$  g/ml 西地那

非溶液结果阳性 ;500  $\mu\text{g/ml}$  西地那非溶液结果阳性 ;1mg/ml 西地那非结果阳性。

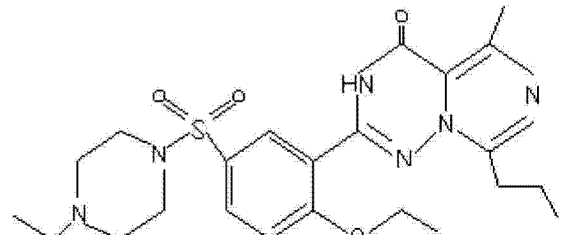
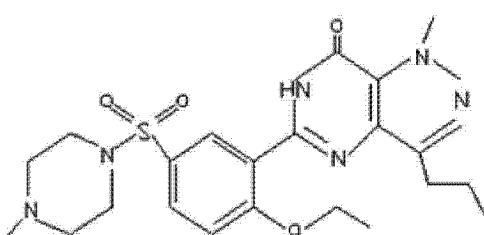
[0121] 用实施例 4 制备的西地那非胶体金试纸条检测浓度分别为 5ppb、100  $\mu\text{g/ml}$ 、500  $\mu\text{g/ml}$  的伐地那非溶液以蒸馏水(即伐地那非浓度 0mg/ml),结果见图 12,由结果看出蒸馏水(含伐地那非 0mg/ml)结果阴性 ;5ppb 伐地那非溶液结果为阳性 ;100  $\mu\text{g/ml}$  伐地那非溶液结果阳性 ;500  $\mu\text{g/ml}$  伐地那非溶液结果阳性 ;1mg/ml 伐地那非结果阳性。说明西地那非胶体金检测试纸适用于衍生物伐地那非的检测。

[0122] 用实施例 4 制备的西地那非胶体金试纸条检测浓度分别为 5ppb、100  $\mu\text{g/ml}$ 、500  $\mu\text{g/ml}$  的红地那非溶液以蒸馏水(即红地那非浓度 0mg/ml),结果见图 13,由结果看出蒸馏水(含红地那非 0mg/ml)结果阴性 ;5ppb 红地那非溶液结果为阳性 ;100  $\mu\text{g/ml}$  红地那非溶液结果阳性 ;500  $\mu\text{g/ml}$  红地那非溶液结果阳性 ;1mg/ml 红地那非结果阳性。说明西地那非胶体金检测试纸适用于与其具有相同母核的衍生物红地那非的检测。

[0123] 用实施例 4 制备的西地那非胶体金试纸条检测浓度分别为 5ppb、100  $\mu\text{g/ml}$ 、500  $\mu\text{g/ml}$  的他达拉非溶液以蒸馏水(即他达拉非浓度 0mg/ml),结果见图 14,由结果看出蒸馏水(含他达拉非 0mg/ml)结果阴性 ;5ppb 他达拉非溶液结果为阴性 ;100  $\mu\text{g/ml}$  他达拉非溶液结果阴性 ;500  $\mu\text{g/ml}$  他达拉非溶液结果阴性 ;1mg/ml 他达拉非结果阴性。说明西地那非胶体金检测试纸不适用于他达拉非的检测。

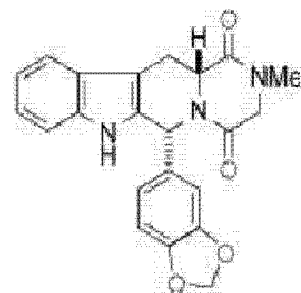
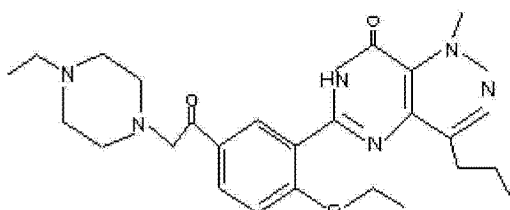
[0124] 西地那非、伐地那非、红地那非、他达拉非的结构式依次如下 :

[0125]



[0126] 西地那非,伐地那非

[0127]



[0128] 红地那非,他达拉非

[0129] 由上述结构式可看出西地那非、伐地那非、红地那非均具有相同的母核,而他达拉非与前三者不具有相同母核,可见实施例 4 制备的西地那非胶体金试纸条可用于检测西地那非以及与西地那非具有相同母核的那非类化合物,而不能用于与西地那非母核不同的化合物。

[0130] 本发明检测西地那非的胶体金层析试纸条的检测反应原理 :

[0131] 西地那非属于小分子物质,本发明采用竞争法,即样品中的西地那非或与其具有相同母核的结构类似物和固定在包被膜 3 上的包被抗原 N- 乙酸西地那非 -BSA 竞争胶体

金标记的西地那非单克隆抗体。当试纸条以样品垫 1 末端浸入样本后,样品溶液沿着试纸条通过毛细作用从下往上泳动,溶解金标垫上干燥的抗西地那非金标单克隆抗体,若待测样品中不存在待测药物,则西地那非金标单克隆抗体会直接泳动到检测线和硝酸纤维膜上的 N- 乙酸西地那非-BSA 发生免疫反应,从而胶体金颗粒发生聚集,在检测线处形成红色线条。若待测样品中存在待测药品,则西地那非金标单克隆抗体会和样品中的检测物发生免疫反应而不会向前移动,由于没有西地那非金标单克隆抗体与检测线包被原结合,从而检测线就不会有红色线条出现。对照线(5) 包被有羊抗鼠 IgG,无论样品中是否存在待测药物,金标结合垫中的另一种金标抗体鼠 IgG 金标单克隆抗体都会因毛细管作用移动到对照线(5) 与羊抗鼠 IgG 结合,发生免疫反应,胶体金颗粒发生聚集,形成红色线条。

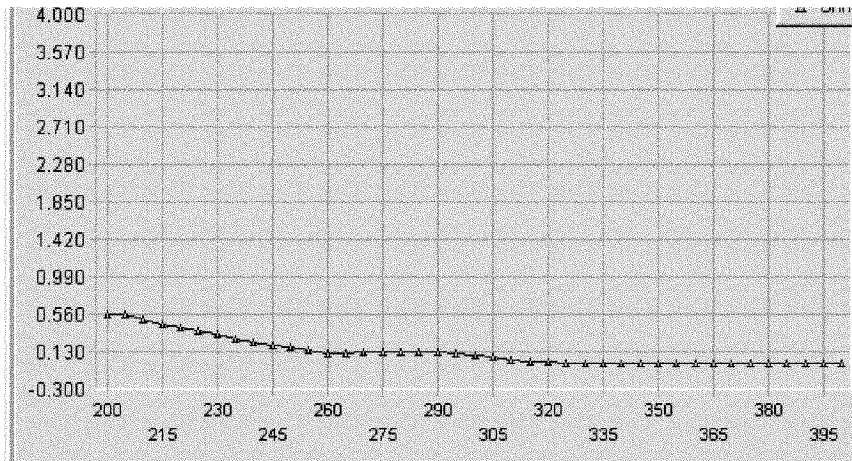


图 1

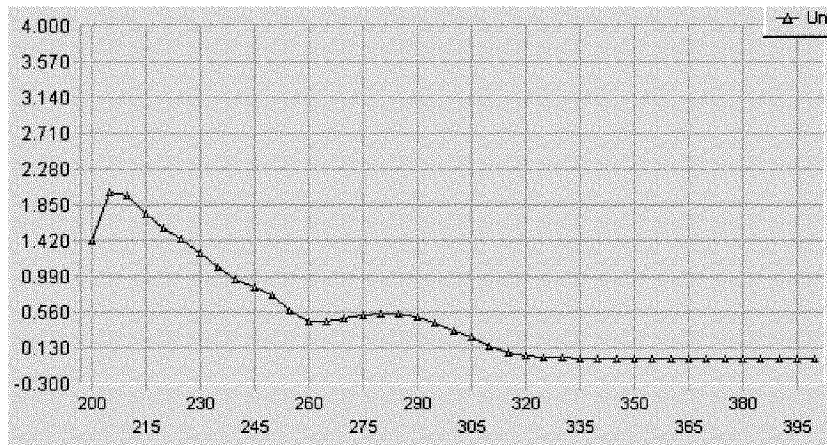


图 2

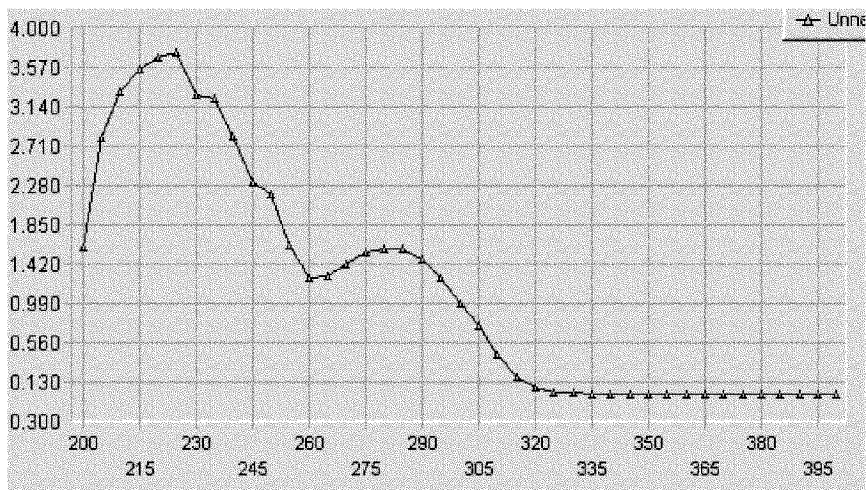


图 3

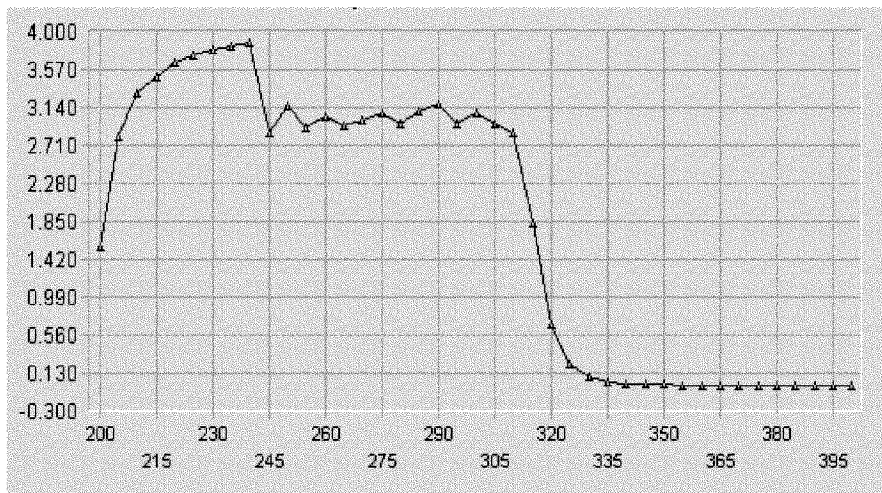


图 4

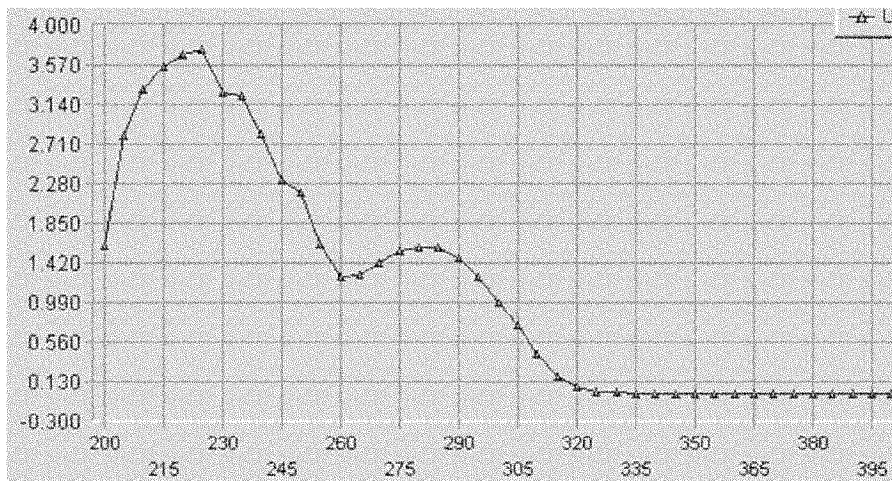


图 5

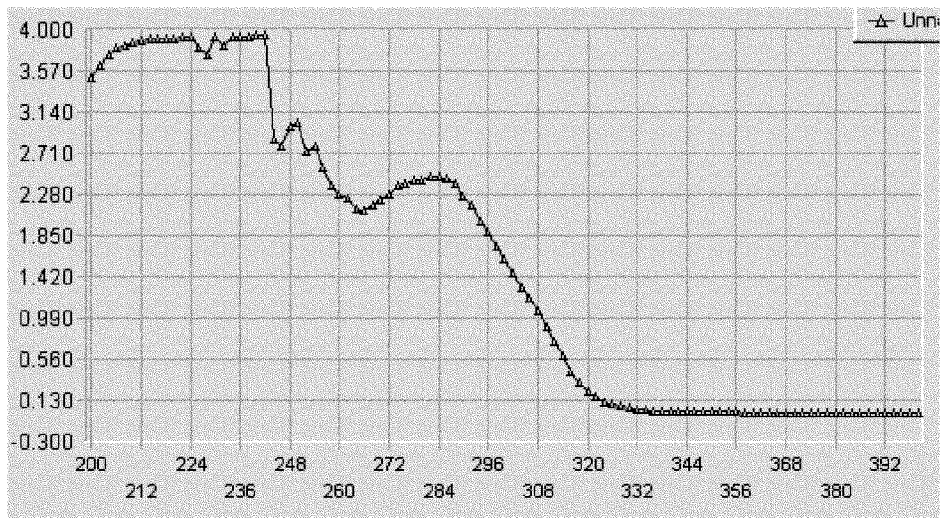


图 6

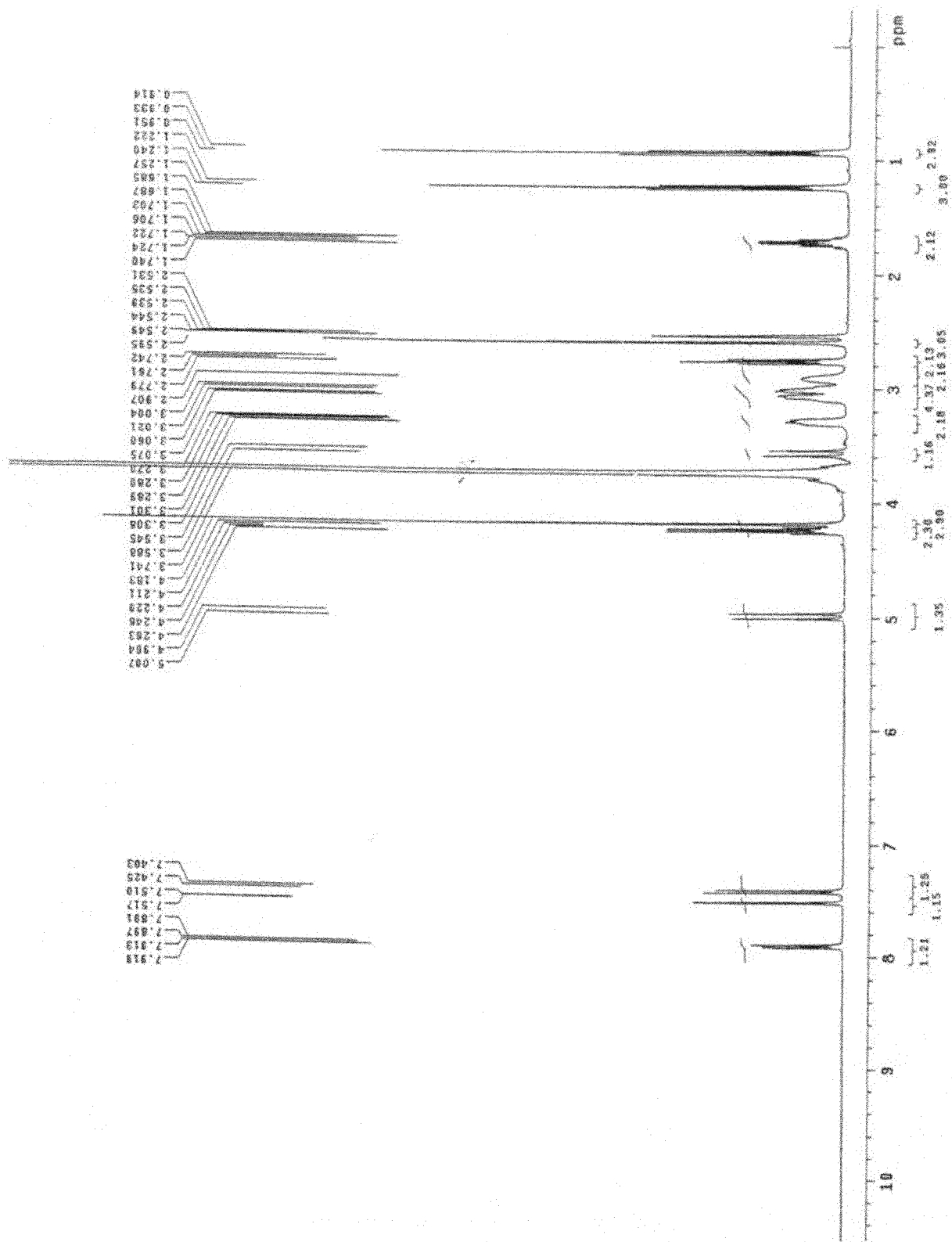


图 7

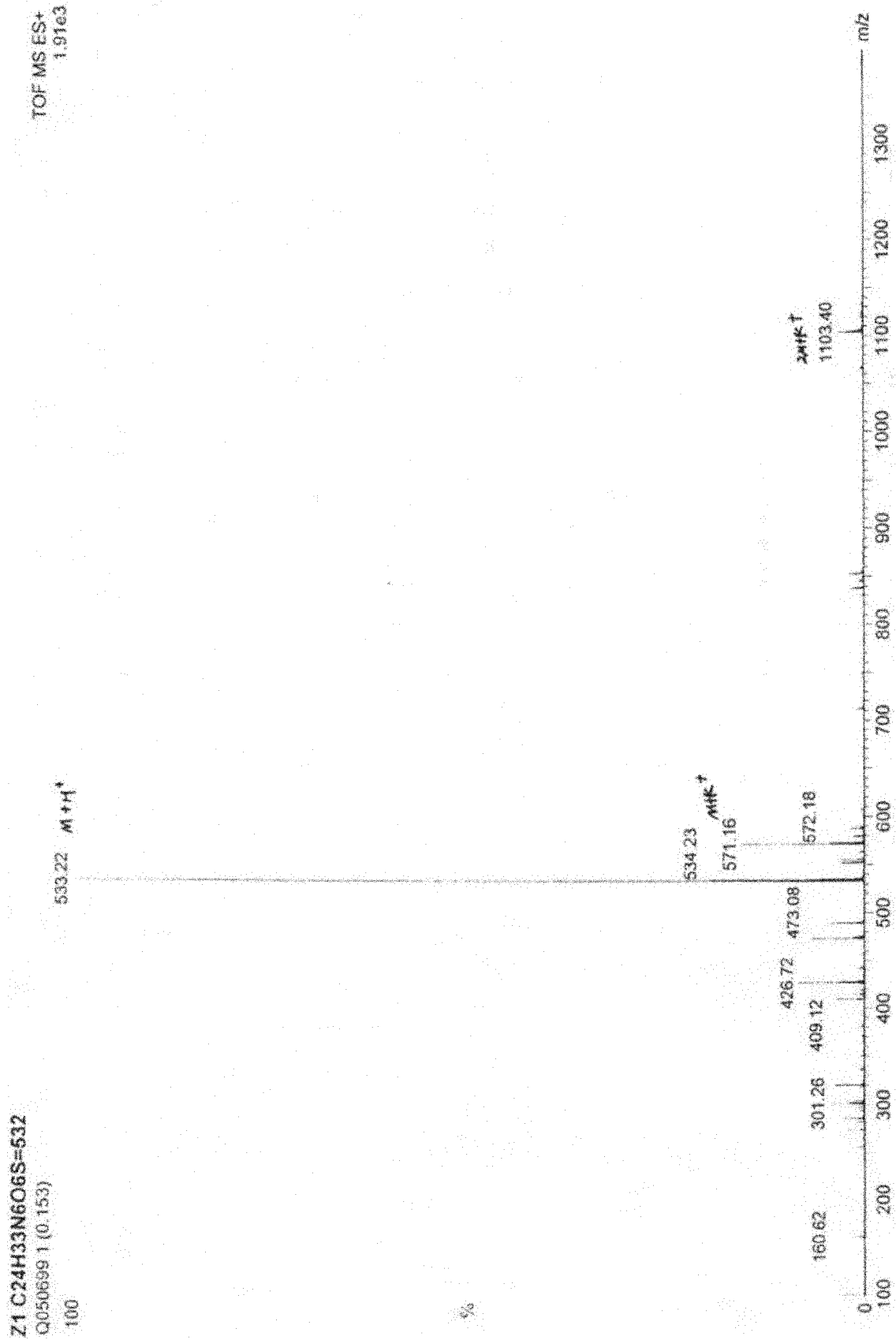
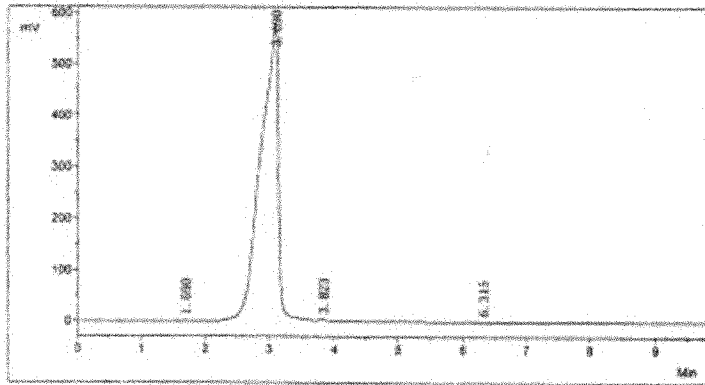


图 8

HS 色谱数据工作站分析报告

样品名称: 文件名: x  
 进样时间: 2005年07月14日 半峰宽: 5 斜率: 50  
 分析方法: 面积 归一法 色谱仪:  
 检测器:



序号	峰号	组份名	保留时间	峰高	峰面积	含量
1	1		1.690	861.0	4543.6	0.0422
2	2		3.090	582154.4	10740318.7	99.7847
3	3		3.823	2227.9	13648.8	0.1268
4	4		6.315	95.0	4983.0	0.0463
合计				583338.3	10763492.2	100.0000

图 9

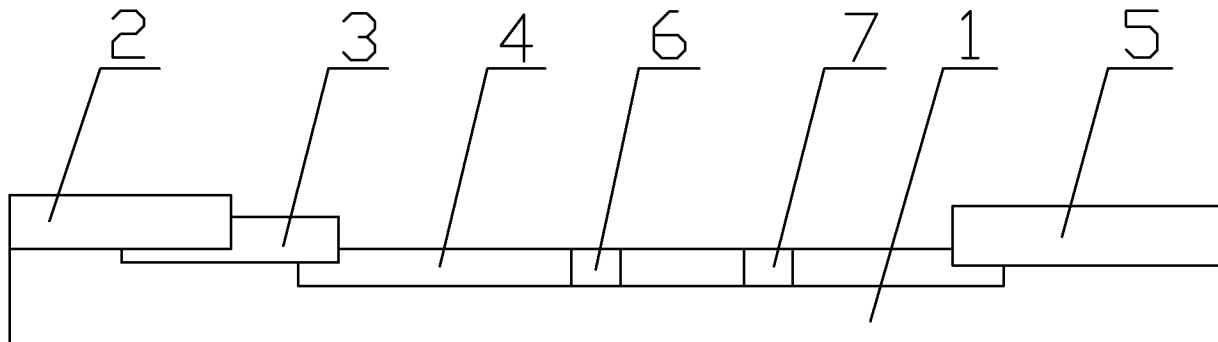


图 10

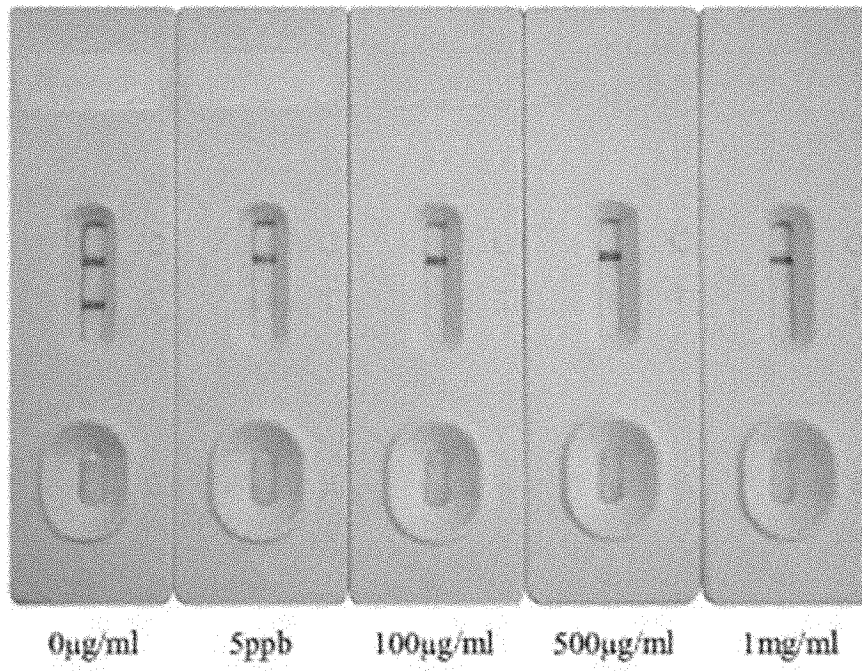


图 11

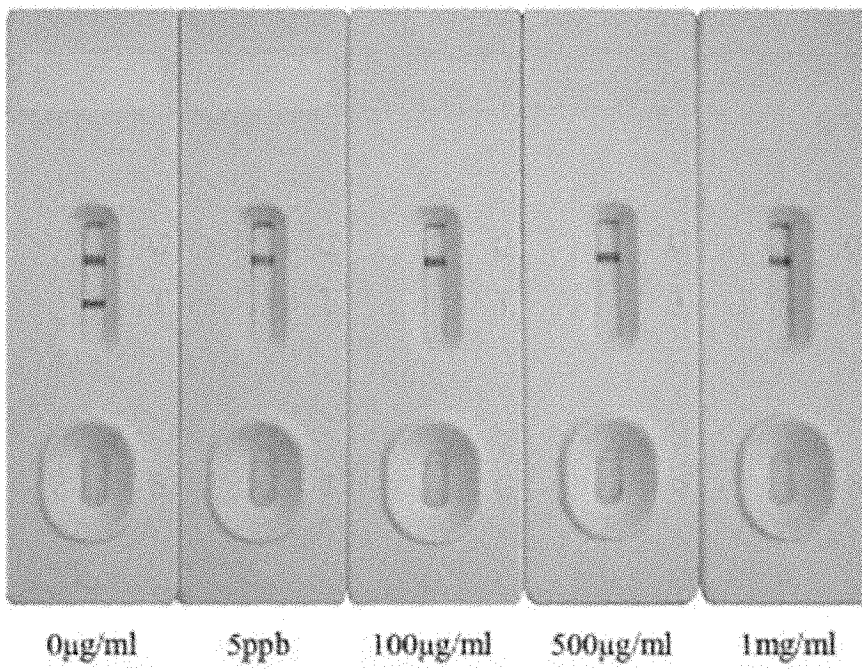


图 12

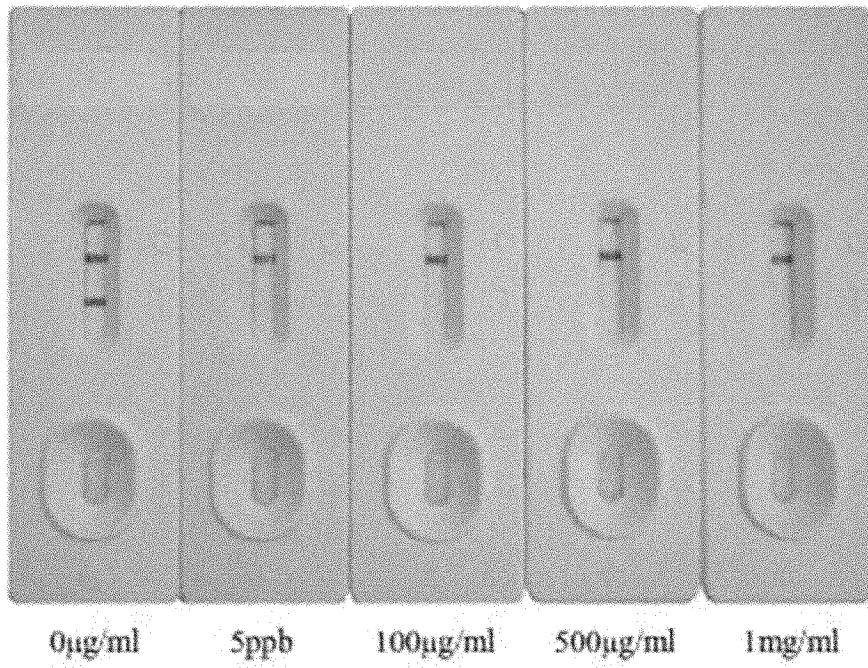


图 13

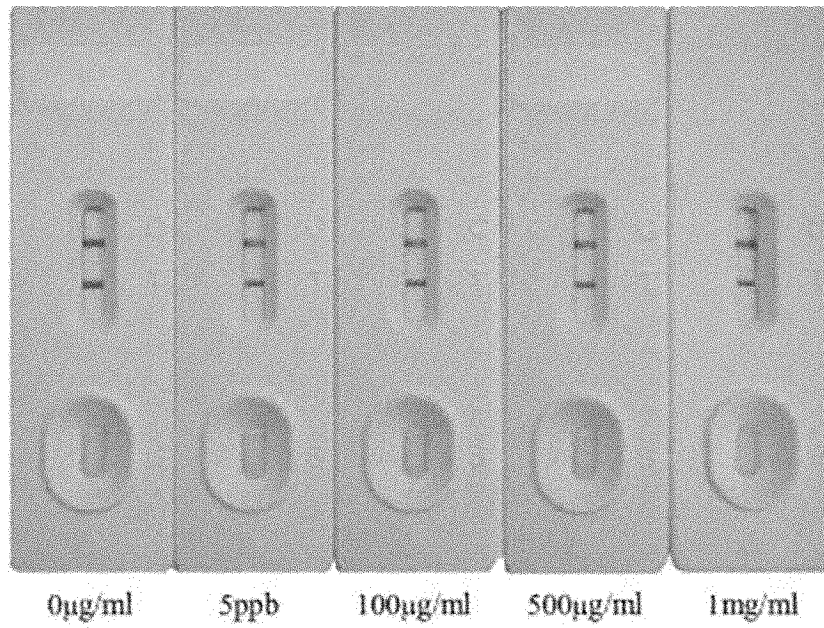


图 14

专利名称(译)	西地那非及其衍生物的人工合成抗原及其制备方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN102161662B</a>	公开(公告)日	2012-12-12
申请号	CN201110004843.5	申请日	2011-01-11
[标]发明人	吴迪宏		
发明人	吴迪宏		
IPC分类号	C07D487/04 C07K14/765 C07K14/795 G01N21/33 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/532		
优先权	201010248466.5 2010-08-09 CN		
其他公开文献	CN102161662A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明属于药物化学领域，公开了西地那非及其衍生物的人工合成抗原及其制备方法和应用。西地那非及其衍生物的人工合成抗原结构如式(I)或式(I')所示的化合物：本发明首次合成了那非类化合物特别是西地那非的人工合成抗原(式(I)或式(I'))，所合成的人工合成抗原具有良好的免疫原性和反应性，能够用于制备相应的单克隆抗体，从而可以进一步做成检测那非类化合物特别是检测西地那非的胶体金试纸，此胶体金试纸可以随时检测样品中是否含有西地那非或其结构类似物。

