

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 14/765

C07K 17/02 G01N 33/531



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200310106386.6

[43] 公开日 2004 年 11 月 10 日

[11] 公开号 CN 1544469A

[22] 申请日 2003.11.21

[21] 申请号 200310106386.6

[71] 申请人 南京大学

地址 210093 江苏省南京市汉口路 22 号

共同申请人 北京市公安局法医检验鉴定中心

[72] 发明人 张大明 宋朝锦 鞠焜先

[74] 专利代理机构 南京苏高专利事务所

代理人 柏尚春

权利要求书 1 页 说明书 5 页

[54] 发明名称 抗凝血类杀鼠药免疫原的合成方法

[57] 摘要

本发明公开了一种能快速准确地检测出中毒者尿液中抗凝血类杀鼠药成分的抗凝血类杀鼠药免疫原的合成方法，它以 4-羟基香豆素为半抗原，利用酯化反应进行化学修饰得到香豆素-琥珀酸酯，通过混合酸酐法的氯甲酸异丁酯法进行偶联，通过葡聚糖 G50 凝胶柱纯化，冻干，合成出的抗凝血类杀鼠药免疫原特异性强的抗凝血类杀鼠药免疫原的结合物，该免疫原可以用于免疫动物，进一步制备出用于检测用的抗凝血类杀鼠药的单克隆抗体。本发明广泛适用于临床，生物化学，环境分析各个领域。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种抗凝血类杀鼠药免疫原的合成方法，其特征在于它包括以下步骤：

A) 用羟基香豆素类化合物作为半抗原，利用酯化反应进行化学修饰得到香豆素-琥珀酸酯；

B) 将步骤 A) 得到的香豆素-琥珀酸酯通过混合酸酐法的氯甲酸异丁酯法进行偶联；

C) 将步骤 B) 得到的反应产物通过葡聚糖 G50 凝胶柱纯化，冻干，制备出抗凝血类杀鼠药免疫原的结合物。

2、根据权利要求 1 所述的抗凝血类杀鼠药免疫原的合成方法，其特征是：步骤 A) 中所述羟基香豆素类化合物为 4-羟基香豆素。

3、根据权利要求 2 所述的抗凝血类杀鼠药免疫原的合成方法，其特征是：将步骤 A) 中的 4-羟基香豆素 1~2 g 置于反应瓶中，加入琥珀酸酐，在 100~120 °C 吡啶介质中回流 3~5 小时，再用旋转蒸发器甩干吡啶溶液，氯仿提取，氯仿层用重蒸馏水洗 2~4 次，得到产物为酱油色油状体香豆素-琥珀酸酯。

4、根据权利要求 2 所述的抗凝血类杀鼠药免疫原的合成方法，其特征是：步骤 B) 中所用原料包括牛血清白蛋白、三丁胺、氯甲酸乙酯、二氧六环和氢氧化钠溶液。

5、根据权利要求 4 所述的抗凝血类杀鼠药免疫原的合成方法，其特征是：所述牛血清白蛋白为 BR 级，白蛋白含量 95%，分子量 67366.4；三丁胺为分子量 185.34，CP 纯，含量不少于 99%；氯甲酸乙酯为分子量 108.53，CP 纯，含量不少于 96.5%；二氧六环为 AR 级，重蒸馏；氢氧化钠溶液为 1 M。

6、根据权利要求 5 所述的抗凝血类杀鼠药免疫原的合成方法，其特征是：

(1) 首先将牛血清白蛋白溶解在重蒸馏水中，用氢氧化钠溶液调至 pH 8.5 后反应；

(2) 然后将香豆素-4-琥珀酸酯溶于重蒸馏的二氧六环溶剂中，加入氯甲酸乙酯和三丁胺，再冰浴反应；

(3) 最后把 (2) 得到的溶液缓缓倒入 (1) 的溶液中并小心搅拌，加入氢氧化钠溶液调至 pH 8.5，加重蒸馏水，将总体剂在 5 °C 冰箱中反应。

7、根据权利要求 6 所述的抗凝血类杀鼠药免疫原的合成方法，其特征是：(1) 中牛血清白蛋白为 0.512 g、重蒸馏水为 100 ml、氢氧化钠溶液为 1 M、反应时间为 30 min；(2) 中香豆素-4-琥珀酸酯为 0.3 g、重蒸馏的二氧六环溶剂为 25 ml、氯甲酸乙酯为 97 μ l、三丁胺为 178 μ l、冰浴反应时间为 30 min；(3) 中氢氧化钠溶液为 1M，总体剂为 200 ml，冰箱中反应时间为 8 小时。

抗凝血类杀鼠药免疫原的合成方法

一、技术领域

本发明属于生物医药领域，涉及一种免疫分析方法，具体地说是一种抗凝血类杀鼠药免疫原的合成方法。

二、背景技术

近年来，使用杀鼠药投毒或意外中毒的事件时有发生，严重影响了社会的安定和人民生活的稳定。快速准确地检测中毒者尿液，以确定毒物名称，为及时给医院抢救提供方向和给事件性质定性提供依据，是当前相关部门研究的方向。目前抗凝血类杀鼠药的中毒现象时有发生，因此准确、快速地检验抗凝血类杀鼠药（10 min之内给出结果）具有重要的实际意义。

常规的免疫分析方法主要利用在抗体上标记放射性同位素、酶、荧光物质等，在待测抗原与标记抗体特异性反应后，洗板分离，通过测定标记的放射性同位素或荧光物质的信号，或测定标记酶作用于底物所产生的电活性物质、发光物质等的信号进行测定。近几十年来，免疫分析技术结合了抗原、抗体分子间的特异性识别反应和电化学、光谱学、声学等技术的灵敏、方便等特性，以其对分析物的高选择性和高灵敏性，成为临床、生物化学，环境分析等各个领域重要分析手段之一。在所有这些方法中，无论标记的是何种物质，都需要得到特异性强、灵敏度高的单克隆抗体，而单克隆抗体的获得需要有特异性强的免疫原。小分子化合物本身不具备免疫原性，因此免疫原的合成至关重要。免疫原的合成通常是将小分子化合物与牛血清白蛋白 BSA 联结，联结的位置直接影响单克隆抗体的特异性。

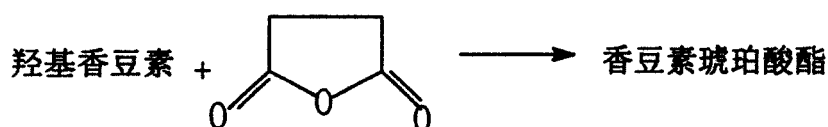
三、发明内容

本发明的目的是提供一种能快速准确地检测出中毒者尿液中抗凝血类杀鼠药成份的抗凝血类杀鼠药免疫原的合成方法，它给医院及时抢救提供依据，同时给中毒事件性质定性提供方向。

本发明的目的是通过以下技术方案来实现的：一种抗凝血类杀鼠药免疫原的合成方法，其特征在于它包括以下步骤：

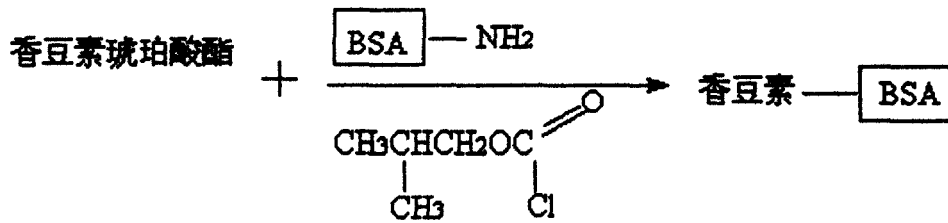
A) 羟基香豆素类化合物作为半抗原，利用酯化反应进行化学修饰得到香豆素-琥珀酸酯；

羟基香豆素在吡啶介质中与琥珀酸酐酯化反应式为：



B) 将步骤 A) 得到的香豆素-琥珀酸酯通过混合酸酐法的氯甲酸异丁酯法进行偶联:

羟基香豆素与牛血清白蛋白 (BSA) 偶联过程为:



C) 将步骤 B) 得到的反应产物通过葡聚糖 G50 凝胶柱纯化, 冻干, 制备出抗凝血类杀鼠药免疫原的结合物。

抗凝血类杀鼠药在体内的代谢物主要为羟基香豆素类化合物, 如 7-羟基香豆素、4-羟基香豆素。考虑到代表性, 选择抗凝血类杀鼠药的半抗原为 4-羟基香豆素, 在步骤 A) 中所述羟基香豆素类化合物为 4-羟基香豆素。

将步骤 A) 中的 4-羟基香豆素 1~2 g 于反应瓶中, 加入琥珀酸酐, 在 100~120 °C 吡啶介质中回流 3~5 小时, 再用旋转蒸发器甩干吡啶溶液, 氯仿提取, 氯仿层用重蒸馏水洗 2~4 次, 得到产物为酱油色油状体香豆素-琥珀酸酯。

步骤 B) 中所用原料包括牛血清白蛋白 Bovine Serum Albumin (BSA)、三丁胺 Tri-n-butylamine、氯甲酸乙酯 Ethyl Chloroformate、二氧六环和氢氧化钠溶液。其中, 所述牛血清白蛋白 (BSA) 为 BR 级, 白蛋白含量 95%, 分子量 67366.4; 三丁胺为分子量 185.34, CP 纯, 含量不少于 99%; 氯甲酸乙酯为分子量 108.53, CP 纯, 含量不少于 96.5%; 二氧六环为 AR 级, 重蒸馏; 氢氧化钠溶液为 1 M。具体操作步骤为:

(1)、首先将牛血清白蛋白溶解在重蒸馏水中, 用氢氧化钠溶液调至 pH 8.5 后反应;

(2)、然后将香豆素-4-琥珀酸酯溶于重蒸馏的二氧六环溶剂中, 加入氯甲酸乙酯和三丁胺, 再冰浴反应;

(3) 最后把 (2) 得到的溶液缓缓倒入 (1) 的溶液中并小心搅拌, 加入氢氧化钠溶液调至 pH 8.5, 加重蒸馏水, 将总体剂在 5 °C 冰箱中反应。

在以上操作步骤中, (1) 中牛血清白蛋白为 0.512 g、重蒸馏水为 100 ml、氢氧化钠溶液为 1 M、反应时间为 30 min; (2) 中香豆素-4-琥珀酸酯为 0.3 g、重蒸馏的二氧六环溶剂为 25 ml、氯甲酸乙酯为 97 μl、三丁胺为 178 μl、冰浴反应时间为 30 min;

(3) 中氢氧化钠溶液为 1M, 总体剂为 200 ml, 冰箱中反应时间为 8 小时。

对以上通过本发明制得的香豆素-4-琥珀酸酯半抗原-BSA 结合物进行免疫原鉴定：

1、紫外分析法

纯化后的香豆素-4-琥珀酸酯半抗原-BSA 结合物用紫外光谱仪进行测量，同时用紫外光谱仪分别测量香豆素-4-琥珀酸酯和 BSA，以验证结合物是否为香豆素-4-琥珀酸酯半抗原-BSA 结合物，验证结果证明的确是香豆素-4-琥珀酸酯半抗原-BSA 结合物。

2、红外分析法

冻干纯化后的香豆素-4-琥珀酸酯-BSA 结合物，溴化钾压片，进行红外分析，同时分析 BSA 及香豆素琥珀酸酯，用以判断是否为香豆素琥珀酸酯的结合物，判断结果证明的确是香豆素琥珀酸酯的结合物。

3、飞行质谱方法

采用基质辅助激光解吸飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)分析半抗原结合到 BSA 分子上的数目，半抗原结合到 BSA 分子上的数目常常影响抗体产生。过去有的作者认为接到 BSA 分子上的半抗原要尽可能多。实验结果表明过多的半抗原并不能得到预期的结果。半抗原过多或过少均可能降低诱发产生抗体的能力。

本发明的优点是：1、抗原和 BSA 联结的位置直接影响单克隆抗体的特异性，本发明选择在识别不重要的羟基位置进行联结，合成出的抗凝血类杀鼠药免疫原特异性强，可为进一步免疫动物，为制备出特异性强的单克隆抗体打下了良好的基础；2、本发明中合成方法简单、易操作，不需要特殊的仪器设备。

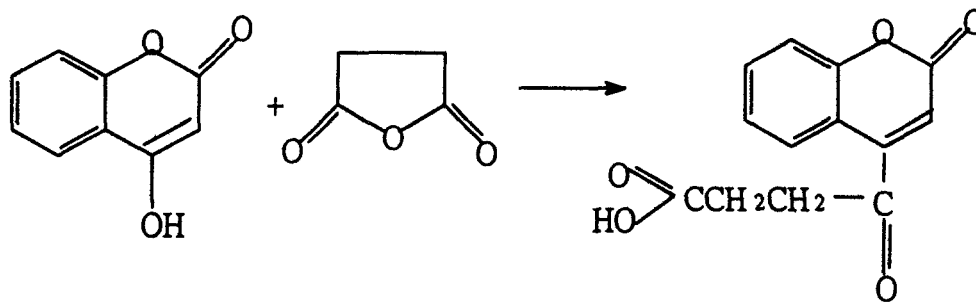
四、具体实施方式

一种本发明所述的抗凝血类杀鼠药免疫原的合成方法，抗凝血类杀鼠药在体内的代谢物主要为羟基香豆素类化合物，如 7-羟基香豆素、4-羟基香豆素。考虑到代表性，选择抗凝血类杀鼠药的半抗原为 4-羟基香豆素。它包括以下步骤：

A) 香豆素-4-琥珀酸酯(Coumarin-4-hemisuccinate)的合成

取 4-羟基香豆素 1.6 g 于三口反应瓶中，加 3.0 g 琥珀酸酐，在 110 °C 吡啶介质中回流 4 小时，用旋转蒸发器甩干吡啶溶液，氯仿提取，氯仿层用重蒸馏水洗 3 次，产物为酱油色油状体。

香豆素-4-琥珀酸酯合成路线如下：



4-羟基香豆素
(4-Hydroxycoumarin)

丁二酸酐

香豆素-7-琥珀酸酯
Coumarin-4-hemisuccinate

(4-O-carboxymethylcoumarin)

B) 香豆素-4-琥珀酸酯-BAS 结合物的偶联

原料为:

牛血清白蛋白 Bovine Serum Albumin (BSA), BR 级, 含量 95% (白蛋白), 分子量 67366.4。三丁胺 Tri-n-butylamine, 分子量 185.34, CP 纯, 含量不少于 99%。氯甲酸乙酯 Ethyl Chloroformate, 分子量 108.53, CP 纯, 含量不少于 96.5。二氧六环 AR 级, 重蒸馏。1 M 氢氧化钠溶液。

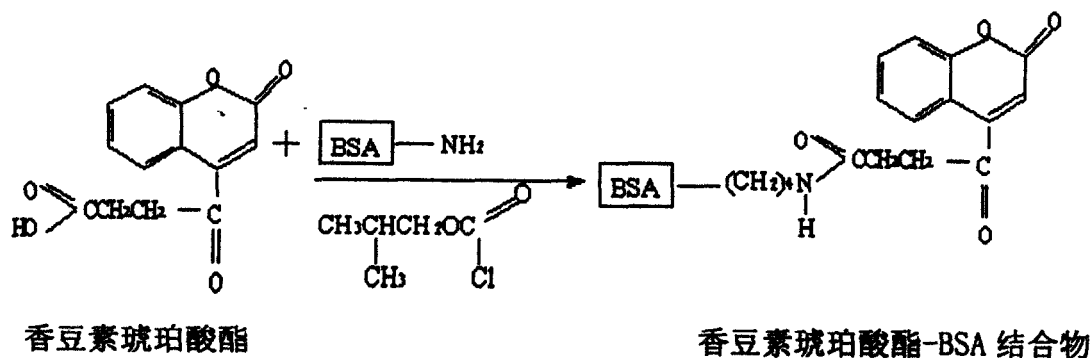
偶联过程为:

(1) BSA 0.512 g 溶解在 100 ml 重蒸馏水中, 用 1 M 氢氧化钠溶液调 pH 8.5, 反应 30 min。

(2) 香豆素-4-琥珀酸酯 0.3 g 溶于 25 ml 重蒸馏的二氧六环溶剂, 加 97 μ l 氯甲酸乙酯, 178 μ l 三丁胺, 在冰浴反应 30 min。

(3) 把 (2) 的溶液缓缓倒入 (1) 的溶液中并小心搅拌, 加入 1M 氢氧化钠溶液调 pH 8.5, 加重蒸馏水, 使总体剂为 200 ml, 在 5 $^{\circ}$ C 冰箱反应 8 小时。

香豆素-4-琥珀酸酯-BSA 偶联 (混合酸酐法) 如下:



C) 去水冻干纯化

反应后的溶液放在冻干机中冻干。冻干的结合物用 2 ml 磷酸盐缓冲溶液溶解，过葡聚糖 G50 柱，接收第二峰的液体，接收液在冻干机器中冻干为成品抗凝血鼠药结合物。

对以上采用本发明制得的香豆素-4-琥珀酸酯-BSA 结合物免疫原的鉴定：

1、飞行质谱方法

香豆素琥珀酸酯-BSA 结合物纯化后的香豆素-4-琥珀酸酯半抗原-BSA 结合物，以芥子酸为介质，进行飞行质谱测量。因为结合物的分子量与 BSA 的分子量不同，在飞行质谱中的飞行速度有所不同，根据结合物与 BSA 的质核比(m/z)，可计算出免疫原中载体蛋白与药物的结合摩尔比。

采用 JMS-LDI1700 时间飞行质谱 (TOF)，N₂激光器，波长 337 nm，脉冲 3 ns，检测器电压-4.75 kv，基质：10³ 倍数芥子酸含有 10% 的三氟乙酸水溶液。香豆素-4-琥珀酸酯的分子量为 262，实际测得 BSA 的分子量为 67366.4，BSA-香豆素-7-琥珀酸酯分子量为 70839.5。

2、紫外分析

透析纯化后的香豆素-4-琥珀酸酯半抗原-BSA 结合物（未冻干）用紫外光谱仪进行测量，同时分别进行测量香豆素-4-琥珀酸酯和 BSA 的紫外光谱，如果在 BSA 上没有结合香豆素-4-琥珀酸酯，就不存在香豆素-4-琥珀酸酯的吸收峰。以此验证结合物是否为香豆素-4-琥珀酸酯-BSA 结合物，验证结果证明的确是香豆素-4-琥珀酸酯半抗原-BSA 结合物。

3、红外分析

纯化后的香豆素-4-琥珀酸酯-BSA 结合物冻干，溴化钾压片，进行红外分析，同时分析 BSA 及香豆素-4-琥珀酸酯，用以判断是否为香豆素-4-琥珀酸酯的结合物，判断结果证明的确是香豆素琥珀酸酯的结合物。

专利名称(译)	抗凝血类杀鼠药免疫原的合成方法		
公开(公告)号	CN1544469A	公开(公告)日	2004-11-10
申请号	CN200310106386.6	申请日	2003-11-21
[标]申请(专利权)人(译)	南京大学		
申请(专利权)人(译)	南京大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京大学		
[标]发明人	张大明 宋朝锦 鞠焯先		
发明人	张大明 宋朝锦 鞠焯先		
IPC分类号	C07K14/705 C07K14/765 C07K17/02 G01N33/531		
其他公开文献	CN1233657C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种能快速准确地检测出中毒者尿液中抗凝血类杀鼠药成分的抗凝血类杀鼠药免疫原的合成方法，它以4-羟基香豆素为半抗原，利用酯化反应进行化学修饰得到香豆素-琥珀酸酯，通过混合酸酐法的氯甲酸异丁酯法进行偶联，通过葡聚糖G50凝胶柱纯化，冻干，合成出的抗凝血类杀鼠药免疫原特异性强的抗凝血类杀鼠药免疫原的结合物，该免疫原可以用于免疫动物，进一步制备出用于检测用的抗凝血类杀鼠药的单克隆抗体。本发明广泛适用于临床，生物化学，环境分析等各个领域。

