

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07D457/06

C07K 16/06 C07K 17/02

G01N 33/531 G01N 33/536

G01N 33/544 G01N 33/563

G01N 33/94



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02140035.0

[43] 公开日 2003 年 10 月 22 日

[11] 公开号 CN 1450065A

[22] 申请日 2002.12.20 [21] 申请号 02140035.0

[30] 优先权

[32] 2001.12.20 [33] EP [31] 01205057.1

[71] 申请人 兰多克斯实验室有限公司

地址 英国北爱尔兰

[72] 发明人 罗伯特·I·麦康奈尔

伊尔·O·本齐克

斯蒂芬·P·菲茨杰拉德

约翰·V·拉蒙特

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

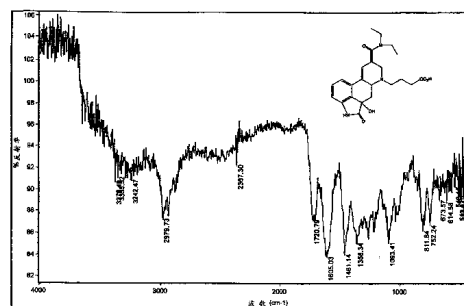
代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 3 页 说明书 15 页 附图 13 页

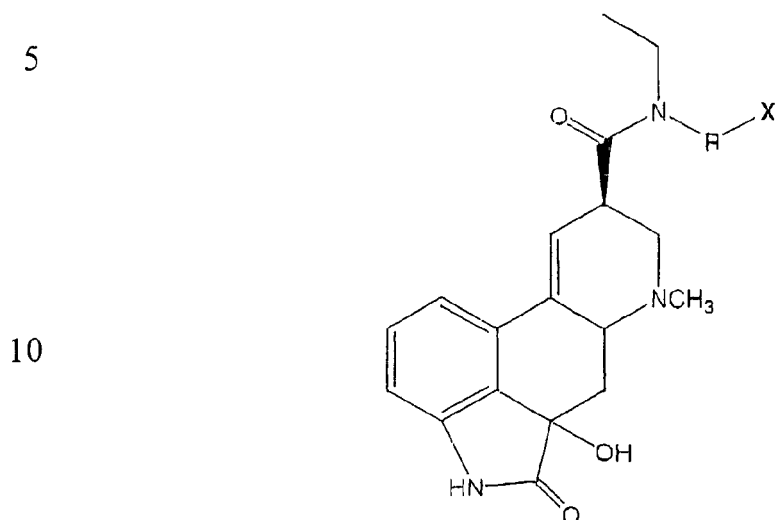
[54] 发明名称 2-氧-3-羟基-LSD 的半抗原、
免疫原、抗体和偶联物

[57] 摘要

本发明描述了一种半抗原，其在 2-氧-3-羟基-LSD 的 8β-羧酰胺的氮上用交联剂衍化而成。本发明也提供了一种免疫原，该免疫原包括上述半抗原和一个与半抗原结合的能够产生抗原性的载体材料；本发明还提供了一种含有上述半抗原的偶联物，其中的半抗原共价结合有一个可检测的标记物。另外，本发明涉及针对上述免疫原的抗体。最后，本发明涉及检测或测定生物体液中的 2-氧-3-羟基-LSD 的方法和试剂盒。本发明的抗体对 2-氧-3-羟基-LSD 具有高度的特异性，而与 LSD 和去甲-LSD 无显著交叉反应。



1. 一种具有下列结构式的半抗原：



15 其中 R 是二价连接基因，X 是末端基团。

2. 权利要求 1 的半抗原，其中 R 包括取代或未取代的、支链或直链、饱和或不饱和的亚烷基半分子；取代或未取代的、饱和或不饱和的环亚烷基半分子；或者，取代或未取代的亚芳基半分子；且 X 独立地包括羧酸或其酯、醛、硫代羧酸或其酯，优选硫代乙酰基或卤代羧酸或其酯，优选卤代乙酰基。

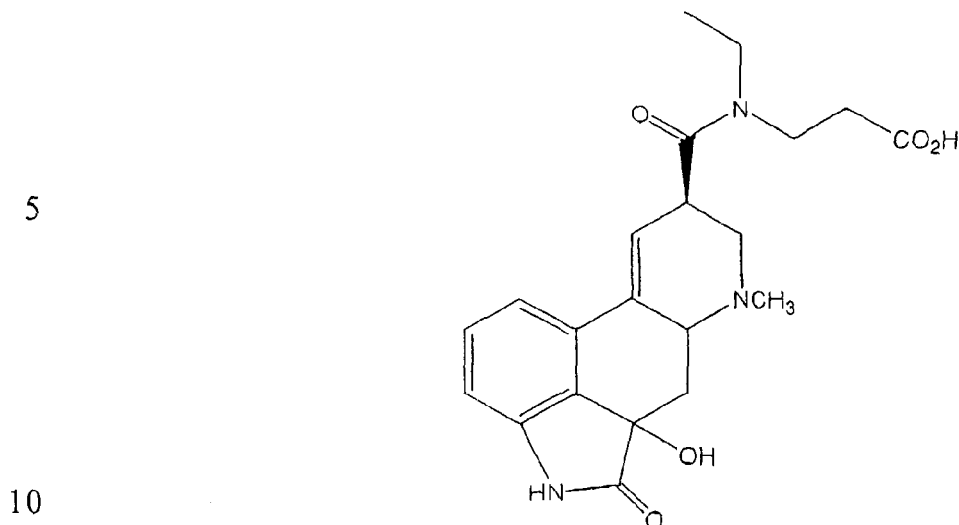
20

3. 权利要求 2 的半抗原，其中 R 是 C₁₋₆ 的取代或未取代的直链饱和亚烷基半分子，最优选 C₂₋₃ 的取代或未取代的直链饱和亚烷基半分子。

4. 权利要求 2 或 3 的半抗原，其中 X 是羧酸。

5. 权利要求 4 的半抗原，该半抗原是由 2-氧-3-羟基-LSD 衍生的下列半抗原：

25



半抗原 A

6. 权利要求 3 的半抗原，其中 R 是具有 2 个碳原子的、饱和的、未取代的直链亚烷基。

15 7. 一种免疫原，其含有与能赋予抗原性的载体材料偶联的、权利要求 1-6 任一项所述半抗原。

8. 针对权利要求 7 所述免疫原的抗体，该抗体至少能与 2-氧-3-羟基-LSD 的 3-羟基-2-吡咯烷酮结构表位相结合。

20 9. 一种偶联物，其含有权利要求 1-6 任一项的半抗原，该半抗原与可检测的标记物共价连接。

10. 权利要求 9 的偶联物，其中的标记物选自酶、发光物质、放射性物质，或它们的混合物。

25 11. 制备权利要求 8 所述抗体的方法，该方法包括下述步骤：用权利要求 7 的免疫原重复给药以免疫动物，优选脊椎动物，最优选哺乳动物，然后收集被免疫的动物的血清。

12. 检测或测定样品中的 2-氧-3-羟基-LSD 的方法，该方法包括将样品与权利要求 9 或 10 的偶联物或其混合物接触，以及与权利要求 8 的抗体或其混合物接触；检测或测定所结合的偶联物；并根据标准曲线推导出样品中 2-氧-3-羟基-LSD 的存在或 2-氧-3-羟基-LSD 的量。

30 13. 检测或测定 2-氧-3-羟基-LSD 的试剂盒，该试剂盒含有权利要求 9 或 10 的偶联物或其混合物，以及权利要求 8 的抗体或其混合物。

14. 权利要求 9 或 10 的偶联物或其混合物, 以及权利要求 8 的抗体或其混合物的用途, 用于检测或测定样品中的 2-氧-3-羟基-LSD, 如生物流体中的 2-氧-3-羟基-LSD。

15. 特异性针对 2-氧-3-羟基-LSD 的抗体, 该抗体对 LSD 和对去甲-LSD 的交叉反应小于 5%。

2-氧-3-羟基-LSD 的半抗原、
免疫原、抗体和偶联物

5

技术领域

本发明涉及半抗原，该半抗原用来制备在竞争性免疫分析中用来检测 LSD 主要代谢物 2-氧-3-羟基-LSD(2-oxo-3-hydroxy-LSD)的免疫原、抗体和偶联物。

10 本发明还涉及检测或测定 2-氧-3-羟基-LSD 的方法和试剂盒，本发明的方法和试剂盒不会与亲本 LSD 自身或去甲-LSD 发生明显交叉反应。

“检测”意思是指对物质的存在与否进行定性分析。

“测定”是指对物质的量进行定量分析。

背景技术

15 麦角酸二乙胺(LSD)(图 1.1)是一种对精神起作用的强效化合物，被分类为 I 类给药方案的药物，该化合物可以以药丸、溶液和浸渍糖块、吸水纸或维他命片的形式提供。

LSD 是一种非常强的迷幻剂，其效力是二甲 4 羟基磷酸胺(psilocybin)的 10 - 150 倍，是酶斯卡灵(mescaline)的 4500 - 9275 倍，该化合物的异构体 d-异-LSD(图 1.2)没有活性。

20 由于对 LSD 在人体中给药的限制增加，因此目前关于 LSD 在人体中的分布、代谢特点(metabolic profile)以及吸收(extraction)的了解有限。关于 LSD 在动物中的分布和代谢特点已有相当多的报道，它们发现，在动物中最常见的代谢物是去甲(nor)-LSD(图 1.3)、2-氧-3-羟基-LSD(图 1.4)、2-氧-LSD、
25 13-羟基-LSD、14-羟基-LSD、N-脱乙基-LSD、N-乙基-N-(2-羟乙基)-LSD(酰胺 N)、N-乙基-N-乙烯基-LSD(酰胺 N)和麦角酸。主要的代谢物是去甲-LSD
3 和 2-氧-3-羟基-LSD 4，其中后者是最近在人尿中进行药物检测时被检测到的，该化合物通过与参考化合物比较 LC-MS 特性已得到证实。2-氧-3-羟基-LSD 4 的平均浓度比 LSD 高 20 倍。在人尿的常规分析中，也能检测到 d-
30 异-LSD 2，该化合物被认为是 LSD 不正当制备的副产品。

由于消耗的剂量非常低(通常 40 - 120 μ g)，并且由于代谢很快而排泄至

尿中的仅有不足 1% 未发生改变, 因此, 生物样品中 LSD 的鉴定对于科学家来说是一个很大的挑战。而且, LSD 在酸、热和光照条件下的不稳定性更增加了对其进行鉴定的困难。因为 LSD 被代谢成许多种化合物, 因此大多数已知方法旨在鉴定生物样品中未改变的 LSD(或亲本 LSD)。

- 5 虽然 LSD 最通常是通过 GC-MS 在尿中检测, 但是免疫分析法, 特别是竞争性结合免疫分析法是现有最简单且最省时的筛选方法。竞争性结合免疫分析法, 顾名思义, 是测量给定量标记抗原(即“检测试剂”, 或偶联物)与未知量的未标记抗原(即“样品”)之间竞争结合抗体的情况。

10 针对 LSD 的商业免疫分析方法包括放射免疫分析法, 该方法非常灵敏, 但是必需放射性核素示踪剂(如 ^{125}I 和 ^3H), 而且在有些情况下还需要一个预先吸收步骤。利用放射免疫分析法检测尿中的药物时, 通过比较样品和含有 500pg/ml LSD 的标准品的计数而将样品鉴定为阳性或阴性。

商业上也使用非同位素均相免疫分析来检测 LSD。克隆酶供体免疫分析(Cloned Enzyme Donor Immunoassay, CEDIA, Boehringer Mannheim)和酶
15 多重免疫分析(Enzyme Multiplied Immunoassay, EMIT, Behring Diagnostics)都是基于酶活化的原理。联机免疫分析(Online Immunoassay)(Roche Diagnostic Systems)是基于溶液中微粒的动力学相互作用。这三种分析法是特别设计用于大量分析或自动分析仪的。微滴板免疫分析(Microplate Immunoassay, STC Diagnostics)可用于小量检测。这些非同位素 LSD 免疫
20 分析法与原始的 LSD 放射免疫分析结果比较一致。

所有现有市售 LSD 免疫分析法都特别适用于亲本药物, LSD, 且表现出与 LSD 代谢物的低交叉反应性。

例如, US 6207396 B1(Microgenics Corporation)公开了 LSD 亲本药物(不是 2-氧-3-羟基-LSD)的吲哚环 N-1 位置发生改变而衍生的半抗原。US
25 6207396 B1 中的抗体是 d-LSD 特异性的, 与 2-氧-3-羟基-LSD(1.82%)或异 LSD(0.04%)不会发生强的交叉反应(见表 I)。

现有技术未发现 2-氧-3-羟基-LSD 特异性抗体。EP1148339 A2 (Roche Diagnostics Corporation)公开了在 2-氧-3-羟基-LSD 的吲哚环上或在 2-氧-LSD 上的 N-1 位置衍生而成的半抗原。EP1148339 A2 中, 抗 2-氧-3-羟基-LSD 的抗体与抗亲本药 LSD 的抗体表现出高水平交叉反应(74.9 - 84.4%),
30 而抗 2-氧-3-羟基-LSD 的抗体与抗第二种代谢物去甲-LSD 的抗体表现出低

水平交叉反应(1.8-4.6%)。

EP0816364 A1 (F.Hoffmann-La-Roche AG)和 Bioconjugate Chemistry 1997, 8, pp896-905 分别描述了如何制备在 LSD 自身吲哚环的 N-1 位点衍生或由去甲-LSD 衍生而成的半抗原。在 Bioconjugate Chemistry 1997, 8, pp 896-5 905 中, 抗免疫原 4 的抗体与抗 d-LSD 的抗体表现出 100% 的交叉反应, 与抗去甲-LSD 的抗体表现出 20% 的交叉反应, 与抗 2-氧-3-羟基-LSD 的抗体表现出 50% 的交叉反应。抗免疫原 8 的抗体与抗 LSD 的抗体表现出 100% 的交叉反应, 与抗去甲-LSD 的抗体表现出 40% 的交叉反应, 与抗 2-氧-3-羟基-LSD 的抗体表现出小于 20% 的交叉反应。

10 Clin. Chem. 23/2, 169-174(1977)描述了一种在血清和尿中检测 LSD 的放射免疫分析法, 该方法利用了针对两种不同免疫原的抗血清, 这两种免疫原中, LSD 自身在吲哚氮原子上发生改变, 或经由 8 β -羧酰胺(carboxamide)的氮而发生改变。

15 本发明人不了解用交联剂在 2-氧-3-羟基-LSD 的 8 β -羧酰胺的氮上衍生得到的任何半抗原。

本发明人也不了解对 2-氧-3-羟基-LSD 具有特异性而对亲本 LSD 自身或对去甲-LSD 无显著交叉反应的抗体。

发明内容

20 本发明的一个目标是克服现有技术中的上述所有或部分缺陷, 或者提供一种替代方案。

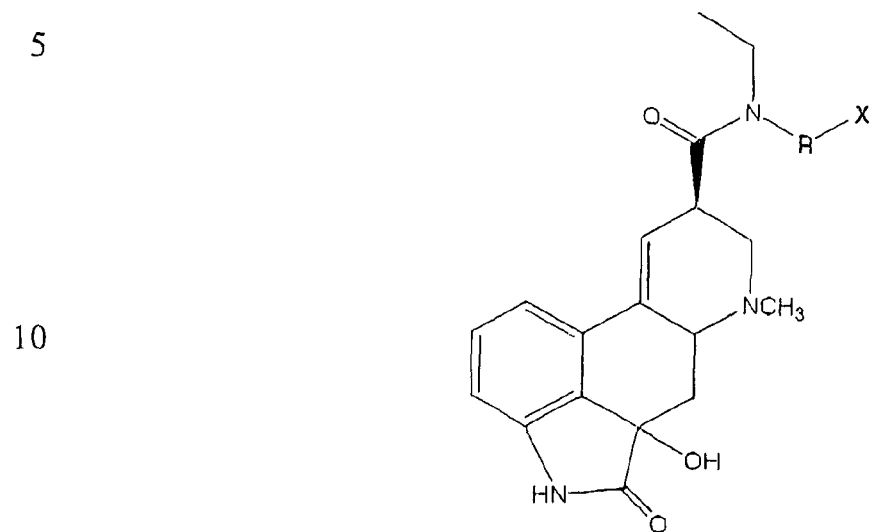
本发明一个优选实施方案的目的是提供一种检测或测定 2-氧-3-羟基-LSD 的量的方法和试剂盒。

25 本发明的目的是通过制备一种对 2-氧-3-羟基-LSD 具有高特异性而与亲本 LSD 或与去甲-LSD 发生非显著交叉反应的抗体, 从而克服现有的 LSD 代谢物免疫分析缺乏特异性的问题。“非显著”是指, 将与 2-氧-3-羟基-LSD 的反应设为 100% 时, 交叉反应性小于约 25%, 优选小于约 10%, 更优选小于约 7.5%, 甚至更优选小于约 5%。为了达到这种特异性, 本发明所描述的半抗原是在 2-氧-3-羟基-LSD 的 8 β -羧酰胺的氮上发生衍生而成。

30 本发明的一个优选实施方式的另一个目标是提供一种抗体, 该抗体至少能与 2-氧-3-羟基-LSD 的 3-羟基-2-吡咯烷酮结构表位相结合。

本发明描述了一种用交联剂在 2-氧-3-羟基-LSD(图 1.4)的 8 β -羧酰胺的氮或在 2-氧-3-羟基-LSD 的 N-6 衍化而得到的半抗原。

第一方面, 本发明提供了具有如下结构式的半抗原:



15 其中 R 是二价连接基因, X 是一个末端基团。

优选的, R 包括被取代的或未被取代的、支链的或直链的、饱和的或不饱和的亚烷基半分子(moiety), 被取代的或未被取代的、饱和的或不饱和的环亚烷基半分子, 或被取代的或未被取代的亚芳基半分子; X 独立的包括羧酸或其酯、醛、硫代羧酸或其酯, 优选硫代乙酰基或卤代羧酸或其酯, 20 优选卤代乙酰基。

因此, 在以上提到的结构式中, 交联剂包含-R-X。

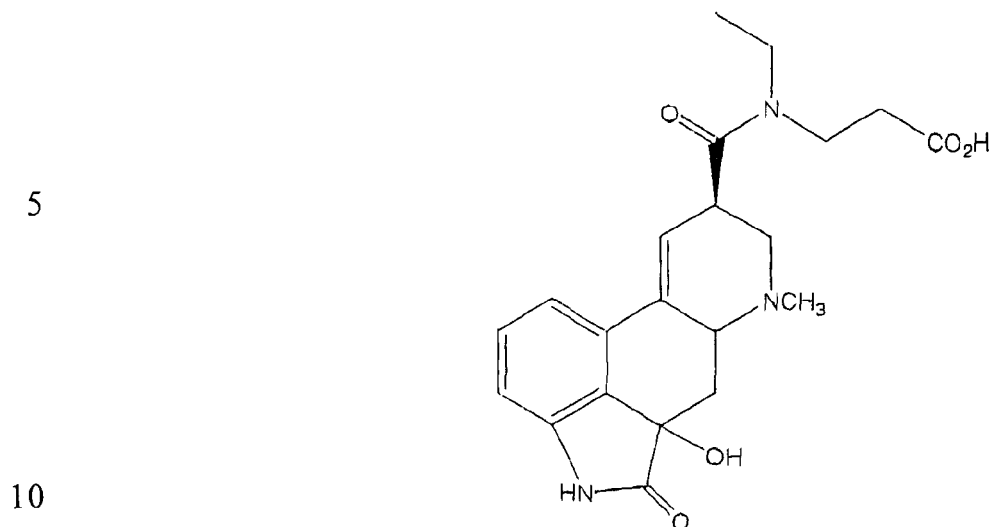
更优选的, R 是 C₁₋₆, 最优选 C₂₋₃, 被取代的或未被取代的、直链饱和亚烷基半分子。

合适的环亚烷基半分子包括环己烷。

25 合适的亚芳基半分子包括苯和二甲苯。

优选的, X 是羧酸。

最优选的, 该半抗原是衍生自 2-氧-3-羟基-LSD 的下列半抗原:



半抗原 A

在本发明的半抗原 A 中，R 是具有 2 个碳原子的饱和、未取代、直链亚烷基，本发明所述的半抗原 B 中，R 是具有 3 个碳原子的饱和、未取代、直链亚烷基。

15

末端基团 X 用于将本发明的半抗原偶联到载体材料上，从而制备出相应的免疫原。所得免疫原可给药宿主，以使宿主产生渴望的特异性抗血清，优选多克隆抗血清，该抗血清可随后用于开发灵敏的免疫分析法以检测 2-氧-3-羟基-LSD。

20 因此，本发明也提供了一种免疫原，该免疫原包括本发明的半抗原以及与该半抗原偶联的能够赋予抗原性的载体材料。优选的，该载体材料是蛋白质、蛋白质片段、合成多肽或半合成多肽。

本发明另一方面涉及抗本发明的免疫原的抗体，所述抗体至少能与 2-氧-3-羟基-LSD 的 3-羟基-2-吡咯烷酮结构表位相结合。优选的，所述抗体被 25 固定和支持物上。优选的，所述抗体是多克隆抗体，或者是单克隆抗体。

本发明另一方面包括一种含有本发明的半抗原的偶联物，其中的半抗原与可检测的标记物共价连接。优选的，标记物选自酶、发光物质、放射性物质、或它们的混合物，更优选的，标记物是酶，优选过氧化物酶，最 30 优选辣根过氧化物酶(HRP)。或者，或另外，发光物质可以是生物发光材料、化学发光材料或荧光材料。

本发明还提供了一种制备抗体的方法，该方法包括用本发明的免疫原

重复给药以免疫动物(优选脊椎动物,最优选哺乳动物),然后收集被免疫的动物的血清。优选的,该方法还包括将所述的血清抗体固定在支持物上,优选为固相支持物,最优选为聚苯乙烯固相支持物。利用该方法制备的抗体是多克隆抗体。

- 5 本发明另一方面包括一种检测或测定样品中的 2-氧-3-羟基-LSD 的方法,该方法包括将样品与本发明的偶联物或其混合物接触,以及与本发明的抗体或其混合物接触,检测或测定被结合的偶联物,根据标准曲线推导出样品中 2-氧-3-羟基-LSD 的存在或量。

- 10 本发明另一方面包括一种检测或测定 2-氧-3-羟基-LSD 的试剂盒,该试剂盒含有本发明的偶联物或其混合物,以及本发明的抗体或其混合物。该试剂盒可选择地包括关于使用所述偶联物和抗体以检测或测定样品中的 2-氧-3-羟基-LSD 的说明书。

优选的,样品是溶液,如生物流体,更优选样品是血清或尿,最优选样品是来自病人的溶液。

- 15 在本发明的方法和试剂盒中,优选(免疫原上和偶联物上)各自的交联剂各不相同。

本发明另一方面涉及,本发明的偶联物或其混合物和本发明的抗体或其混合物检测或测定样品(如生物流体)中的 2-氧-3-羟基-LSD 的用途。

- 20 本发明的焦点是 2-氧-3-羟基-LSD(图 1.4)的特异性抗体的制备。为了获得这种特异性,半抗原 A 是由 2-氧-3-羟基-LSD 在 N-羧酰胺上发生衍生而成。

半抗原的制备

- 25 本发明的半抗原 A 由麦角酸经过三个步骤制备得到(图 2)。用 1,1'-羰基二咪唑(CDI)的二甲基甲酰胺(DMF)溶液将麦角酸 5 的羧基活化,使获得的活化酯中间产物与 N-乙基 N-(2-乙氧甲酰(carbethoxy))乙胺 10(使丙烯酸乙酯与乙胺反应而制得)反应产生酯 6,用次氯酸钙氧化酯 6 的酒石酸盐的吡啶环的双键制得酯 2-氧-3-羟基麦角酸 N-乙基 N-(2-乙氧甲酰)乙酰胺 7,所述次氯酸钙是在原位向氢氧化钙中通入氯气反应制得。用氢氧化钾的四氢呋喃水溶液使酯 7 皂化从而得到半抗原 A。

- 30 本发明所述的半抗原 B 由去甲-LSD 3 经过三个步骤得到(图 3)。在氢氧化钠的 DMF 溶液存在的情况下,用乙基 4-溴代丁酸酯使去甲-LSD 3 发生 N-

烷化而产生酯 8,使用对酯 6 进行氧化所用的条件使酯 8 吡啶环的双键氧化,产生酯 2-氧-3-羟基-6-(3-乙氧甲酰)丙基-去甲-LSD 9。在四氢呋喃中用氢氧化钾水溶液使酯 9 皂化从而得到半抗原 B。

免疫原和偶联物的制备

5 虽然本发明的半抗原具有确定的结构表位,但是它们本身不具有免疫原性,因此需与载体材料偶联,所述的载体材料通过给药宿主动物能诱导产生免疫反应。合适的载体材料一般包含多氨基酸片段,且包括多肽;蛋白质,如白蛋白、血清蛋白,例如,球蛋白和眼晶状体蛋白及脂蛋白。例如,蛋白质载体材料包括牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白、牛 γ 球蛋白、结合甲状腺素的球蛋白、匙孔血蓝蛋白(KLH)等。替代地,可使用含有足够数目的可以利用的氨基的聚(氨基酸),如赖氨酸,也可以使用其它多种带有反应性功能基团的合成或天然多聚物。具体而言,可将碳水化合物、酵母或多糖偶联到本发明所述半抗原上从而制得本发明所述免疫原。

15 本发明的每种半抗原也可以与标记物,如酶(例如辣根过氧化物酶)、具有荧光特性的物质或放射性标记偶联,从而产生用于免疫分析的偶联物(或检测试剂)。该荧光物质可以是,例如:单价荧光素残基或其衍生物。

在用本发明的半抗原制备免疫原或偶联物时,如果所述半抗原中存在巯基,即其中的 X 是硫代羧酸或硫代羧酸酯,则首先利用异双功能连接物将顺丁烯二酰亚胺、卤-或乙烯基砵基团引至载体材料或标记物(酶或标记),
20 所述异双功能连接物如: N-(γ -顺丁烯二酰亚胺基丁酰基氧)琥珀酰亚胺酯(GMBS),琥珀酰亚胺基 4-(N-顺丁烯二酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC), (m-顺丁烯二酰亚胺基苯甲酰)-N-羟基琥珀酰亚胺(MBS),琥珀酰亚胺基 4-(ρ -顺丁烯二酰亚胺基苯基)丁酸酯(SMPB), N-琥珀酰亚胺基(4-碘代乙酰基)氨基苯甲酸盐(SLAB),溴乙酰氨基乙酸 N-羟基琥珀酰亚胺, N-琥珀酰亚胺基 3-(2-吡啶基二硫)丙酸盐(SPDP),或乙烯基砵(Pierce Chemical Company, USA)。经过如此修饰的载体材料或标记物因此可通过半抗原上的巯基来偶联。对于没有巯基的半抗原(如本发明的半抗原 A),不需要利用标准的偶联方法(用混合酸酐、EDC 或琥珀酰亚胺活化半抗原)来预先修饰载体材料或标记物就可进行偶联。

30 为了证实半抗原与载体材料发生了充分的偶联,在免疫接种之前,用基质辅助 UV 激光解吸/离子化飞行时间质谱分析(MATDI-TOF MS)来评估

每种免疫原。在使用优选的载体材料(如牛血清白蛋白)的情况下,优选每个载体分子最少使用 6 个半抗原分子。本发明的每种免疫原都能用于免疫,以产生本发明的抗体。

对免疫原进行 MATDI-TOF 分析的常规方法

- 5 使用 Voyager STR Biospectrometry Research Station 激光解吸质谱分析仪配合延迟的抽提来进行 MALDI-TOF 质谱分析。将需要分析的每一样品取等份试样,在 0.1% 的三氟乙酸(TFA)水溶液中稀释,以制备 1mg/ml 的样品溶液。等份试样(1 μ l)用芥子酸基质来分析,以牛血清白蛋白(Fluka)为外在标准品。图 5 显示了 BSA 载体材料的分析结果。如图所示,存在一个主要信号,它表示该样品的平均质子化质量(protonated mass)为 m/z 66400。在 m/z 10 33202 处的信号与带有双倍电荷(doubly-charged)的主要成分相符。

抗血清的制备

- 15 为了生产多克隆抗血清,将本发明的每种免疫原与弗氏(Freund's)佐剂混合,将混合物注射到宿主动物(如兔、绵羊、小鼠、豚鼠或马)中。此后还进行多次注射(加强免疫),取血清样进行抗体滴度测定。当达到最佳滴度时,将宿主动物放血以产生适量体积的特异性抗血清。抗体纯化需要达到的程度根据其用途而定。对多种用途而言,根据无需纯化,但是,在其它情况(如需要将抗体固定至固相支持物时),可采用纯化步骤除去不需要的物质并消除非特异性结合。

- 20 本发明的特异性抗体可在生物化学测定法中用作试剂以检测或测定生物流体中的 2-氧-3-羟基-LSD。

在以下实施例中,除非另有说明,百分比采用的是体积百分比(v/v)。

附图说明

- 图 1 显示 LSD 及相关化合物的结构。
- 25 图 2 示意 2-氧-3-羟基 LSD 的半抗原 A 和免疫原 A 的制备。
- 图 3 示意 2-氧-3-羟基 LSD 的半抗原 B 和免疫原 B 的制备。
- 图 4 示意 2-氧-3-羟基 LSD 的竞争性 ELISA 微滴板试验。
- 图 5 显示了 BSA 载体材料的分析结果。
- 图 6 显示 2-氧-3-羟基麦角酸 N-乙基 N-(2-羧基)乙酰胺与 BSA 的偶联物 30 (免疫原 A)的 MALDI-TOF 检测结果。

图 7 显示 2-氧-3-羟基-6-(3-羧基)丙基-去甲-LSD 与 BSA 的偶联物(免疫

原 B)的 MALDI-TOF 检测结果。

图 8 显示 N-乙基 N-(2-乙氧甲酰)乙胺连接物 10 的红外光谱(FT-IR)。

图 9 显示麦角酸 N-乙基 N-(2-乙氧甲酰)乙酰胺 6 的红外光谱(FT-IR)。

图 10 显示 2-氧-3-羟基麦角酸 N-乙基 N-(2-乙氧甲酰)乙酰胺 7 的红外光谱(FT-IR)。

图 11 显示 6-(3-乙氧甲酰)丙基-去甲-LSD 8 的红外光谱(FT-IR)。

图 12 显示 2-氧-3-羟基-6-(3-乙氧甲酰)丙基-去甲-LSD 9 的红外光谱(FT-IR)。

图 13 显示 2-氧-3-羟基-6-(3-羧基)丙基-去甲-LSD(半抗原 B) 的红外光谱(FT-IR)。

具体实施方式

实施例

实施例 1: N-乙基 N-(2-乙氧甲酰)乙胺连接物 10 的合成

在 0℃, 将丙烯酸乙酯(8.0 ml, 73.92 mmol)于 40ml 四氢呋喃(THF)中的溶液逐滴加到 110ml 2M 乙胺的四氢呋喃(THF)溶液中, 将反应混合液室温搅拌过夜。使反应溶液通过棉塞过滤, 减压浓缩, 得到名为化合物 **10** (9.01g, 84%)的澄清溶液。

$\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3319.68, 2969.10, 1732.07, 1191.87 (FT-IR: 图 8)

实施例 2: 麦角酸 N-乙基 N-(2-乙氧甲酰)乙酰胺 6 的合成

麦角酸 **5** (934 mg, 3.27 mmol)在 40ml 干的二甲基甲酰胺(DMF)中的混合物用 1'-羰基二咪唑(CDI, 795 mg, 4.91 mmol)处理, 在氮气下室温搅拌 1 小时。逐滴加入 N-乙基-N-(2-乙氧甲酰)乙胺连接物 **10** (1.90 g, 13.08 mmol)在 10ml 干的二甲基甲酰胺(DMF)中的溶液, 将反应混合溶液室温搅拌过夜。反应混合物经减压浓缩, 将得到的残余物溶于 200 ml 氯仿中。该氯仿溶液用 100 ml 水洗两次, 用无水硫酸钠干燥, 经减压浓缩得到粗制的题述化合物 **6** (2.2 g), 为油的形式。它无需进一步纯化就可用于以下实施例。

$\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3121.90, 2987.10, 2848.65, 1735.30, 1676.97, 1202.97 (FT-IR: 图 9)

实施例 3: 2-氧-3-羟基麦角酸 N-乙基 N-(2-乙氧甲酰)乙酰胺 7 的合成
将酒石酸(2.52 g, 16.79 mmol)溶于 40ml 水中, 并在冰上冷却。向该混

合物中加入 2.2g 粗制的麦角酸 N-乙基 N-(2-乙氧甲酰)乙酰胺 6 (1.29 g, 3.27 mmol; 基于来自上述实施例的 100% 产量)。将氯气(1.55 g, 21.83 mmol)溶入氢氧化钙(0.81 g, 10.93 mmol)在 240 ml 水中形成的溶液中, 以此制备次氯酸钙溶液。使浑浊液通过 0.45 μ m 滤膜除去任何不溶物质, 用冰冷却。将

5 麦角酸 N-乙基 N-(2-乙氧甲酰)乙酰胺酒石酸酯溶液加到 170 ml 新制备的次氯酸钙溶液中。将反应混合物在 0-5 $^{\circ}$ C 搅拌 30 min, 用 80 ml 饱和碳酸氢钠溶液稀释, 用 6 \times 100 ml 氯仿抽提。将氯仿抽提物合并, 用无水硫酸钠干燥, 减压浓缩。使所得残余物在硅胶上层析, 获得 2-氧-3-羟基麦角酸 N-乙基 N-(2-乙氧甲酰)乙酰胺 7 (385 mg, 28%), 这是一种无定形的黑褐色固体(在

10 硅胶上用 25% 甲醇的氯仿溶液作为洗脱剂时, R_f 为 0.53)。

$\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3180.04, 2980.66, 2937.48, 2803.85, 1731.59, 1669.11, 1448.37, 1385.34 (FT-IR: 图 10)

实施例 4: 2-氧-3-羟基麦角酸 N-乙基 N-(2-羧基)乙酰胺(半抗原 A)的合成

15 2-氧-3-羟基麦角酸 N-乙基 N-(2-乙氧甲酰)乙酰胺 7 (63.6 mg, 0.15 mmol) 在 5 ml 四氢呋喃(THF)和 5 ml 水中形成混合物。向该混合物中加入固体氢氧化钾(12.5 mg, 0.22 mmol), 室温搅拌反应 3 小时(h), 直到经 TLC 分析表明反应完全。用 1N HCl 将反应溶液中和到 pH7, 减压浓缩干燥。将得到的残余物溶于 10% 甲醇的氯仿混合物中, 过滤除去无机盐。将溶剂蒸发后得

20 到 2-氧-3-羟基麦角酸 N-乙基 N-(2-羧基)乙酰胺(半抗原 A)(45 mg, 76%), 这是一种无定形的棕色固体(在硅胶上用 20% 甲醇的氯仿溶液作为洗脱剂时, R_f 为 0.52)。

$\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3297, 2963, 1723, 1557, 1099, 1020, 802(FT-IR)

25 实施例 5: 2-氧-3-羟基麦角酸 N-乙基 N-(2-羧基)乙酰胺与 BSA 的偶联物(免疫原 A)

将 2-氧-3-羟基麦角酸 N-乙基 N-(2-羧基)乙酰胺(半抗原 A)(45 mg, 0.11 mmol)溶于 1 ml 二甲基甲酰胺(DMF)中。向其中加入二环己基碳二亚胺(DCC)(27.9 mg, 0.14 mmol)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)(15.6 mg, 0.14 mmol), 将该混合物室温搅拌过夜。所形成的二环己基脲过滤除去, 将该溶液逐滴

30 加入将 BSA (150 mg)溶于 6 mL 0.05M 碳酸氢钠溶液(pH 8.5)所得到的溶液中, 将混合物 4 $^{\circ}$ C 搅拌过夜, 避光。然后将该溶液在 4 $^{\circ}$ C 用 5L PBS (pH 7.2)

透析过夜，冷冻干燥。

MALDI-TOF 检测(图 6)表明，存在一个主要信号，其指示该样品具有 m/z 70351 的一个平均质子化质量。在 m/z 35248 处的信号与带有双倍电荷的主要成分相符。这些数据表明平均每个 BSA 分子结合了 9.8 个半抗原 A 分子。

5 实施例 6: 6-氟基-去甲-LSD 的合成

在氮气下向溴化氟(2.96 g, 27.95 mmol)在 150ml 干氯仿中的回流溶液中逐滴加入麦角酸二乙酰胺 1 (2.00 g, 6.19 mmol)在 100 ml 干氯仿中的溶液。将反应物回流加热 4 小时，冷却到室温。用 150 ml 的 1% (w/v) 酒石酸溶液抽提有机相两次，将合并的含水洗涤液用 100 ml 氯仿抽提，将合并的有机相用无水硫酸钠干燥，减压浓缩。用乙酸乙酯在硅胶上对黑色残余物进行层析，待溶剂蒸发后，得到 6-氟基-去甲-LSD (879 mg, 42%)，这是浅黄色固体。

$\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3192, 2933, 2212, 1636, 1449, 986

15 实施例 7: 去甲-LSD 3 的合成

在氮气条件下，用锌粉(1.53 g, 23.39 mmol)处理 6-氟基-去甲-LSD (879 mg, 2.63 mmol)在 8ml 乙酸和 2ml 水中的混合物，并在回流条件下加热 6 小时。使溶液冷却，通过水洗除去过量的锌，将反应溶液减压浓缩至小体积，将浓缩物用 10 ml 水稀释。在 0°C 将该溶液的 pH 用浓缩的氨水溶液调节到 pH 9。所得粘性沉淀用 50 ml 氯仿抽提 4 次，合并氯仿抽提液，用无水硫酸钠干燥，减压浓缩，得到去甲-LSD 3 (625 mg, 77%)，这是一种浅褐色的无定形固体(在硅胶上用 20% 甲醇的氯仿溶液作为洗脱剂时， R_f 为 0.47)。

$\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3260, 2974, 2934, 1620, 1447

25 实施例 8: 6-(3-乙氧甲酰)丙基-去甲-LSD 8 的合成

用乙基溴代丁酸酯(290 μL , 2.02 mmol)、碳酸钾(839 mg, 6.06 mmol)和催化量的碘化钾处理去甲-LSD3 (625 mg, 2.02 mmol)在 5ml 干二甲基甲酰胺(DMF)中的混合物，在氮气条件下 40°C 搅拌过夜。将反应溶液减压浓缩至残量，用 5% 甲醇的氯仿溶液在硅胶上层析，待溶剂挥发后得到 6-(3-乙氧甲酰)丙基-去甲-LSD 8 (368 mg, 43%) (在硅胶上用 20% 甲醇的氯仿溶液作为洗脱剂时， R_f 为 0.77)。

30

$\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3268.56, 2975.19, 2934.49, 1731.00, 1623.51 (FT-IR: 图 11)

实施例 9: 2-氧-3-羟基-6-(3-乙氧甲酰)丙基-去甲-LSD 9 的合成

将 6-(3-乙氧甲酰)丙基-去甲-LSD 8 (368 mg, 0.87 mmol) 加到酒石酸 (196 mg, 1.31 mmol) 溶于 20 ml 水中并在冰上冷却而形成的混合液中。将氯气 (1.55 g, 21.83 mmol) 溶入氢氧化钙 (0.81 g, 10.93 mmol) 在 240 ml 水中形成的溶液中, 以此制备次氯酸钙溶液。使浑浊液通过 0.45 μM 滤膜除去任何不溶物质, 用冰冷却。将 6-乙氧甲酰丙基-麦角酸二乙酰胺酒石酸酯溶液加入到 45 ml 新制备的次氯酸钙溶液中, 在 0 $^{\circ}\text{C}$ -50 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌反应 30 min。反应物用 80 ml 饱和碳酸氢钠溶液稀释, 用 6 \times 100 ml 氯仿抽提。将氯仿抽提物合并, 用无水硫酸钠干燥, 减压浓缩。使所得残余物在硅胶上层析, 得到 2-氧-3-羟基-6-(3-乙氧甲酰)丙基-去甲-LSD 9 (102 mg, 26%), 这是一种无定形的棕色固体(在硅胶上用 10% 甲醇的氯仿溶液作为洗脱剂时, R_f 为 0.44)。

$\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3242.29, 2976.74, 1727.98, 1615.25, 1447.09, 1214.64 (FT-IR: 图 12)

15 实施例 10: 2-氧-3-羟基-6-(3-羧基)丙基-去甲-LSD(半抗原 B)的合成

将 2-氧-3-羟基-6-(3-乙氧甲酰)丙基-去甲-LSD 9 (90 mg, 0.20 mmol) 溶于 3 ml 四氢呋喃(THF)及 3 ml 水中, 向该混合物中加入固体氢氧化钾(22 mg, 0.40 mmol)。室温搅拌反应 3h, 直至经 TLC 分析表明反应完成。反应液用 1N HCl 中和至 pH 7, 减压浓缩干燥。将残余物溶于 10% 甲醇的氯仿混合物中, 将无机盐过滤除去。蒸发溶剂, 得到泡沫状棕色固体 2-氧-3-羟基-6-(3-羧基)丙基-去甲-LSD(半抗原 B)(86 mg, 102%)。

$\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3242.47, 2979.73, 1720.79, 1605.03 (FT-IR: 图 13)

25 实施例 11: 2-氧-3-羟基-6-(3-羧基)丙基-去甲-LSD 与 BSA 的偶联物(免疫原 B)

将 2-氧-3-羟基-6-(3-羧基)丙基-去甲-LSD(半抗原 B) (32 mg, 0.08 mmol) 溶于 0.5ml 二甲基甲酰胺(DMF)中。向其中加入二环己基碳二亚胺(DCC) (18.5 mg, 0.09 mmol)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) (10.4 mg, 0.09 mmol), 将该混合物室温搅拌过夜, 所形成的二环己基脲通过过滤除去, 将该溶液逐滴加入到 BSA (100 mg)在 6 ml 0.05M 碳酸氢钠溶液(pH 8.5)中所形成的溶液中, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 将混合物避光搅拌过夜, 然后将该溶液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 用 5L 磷酸盐缓冲液(PBS) (pH 7.2)透析 24 小时(换液 2 次), 然后冻干。

MALDI-TOF 检测(图 7)表明, 存在一个主要信号, 其指示该样品具有 m/z 69699 的一个平均质子化质量。在 m/z 34862 处的信号与带有双倍电荷的主要成分相符。这些数据表明平均每个 BSA 分子结合了 8.1 个半抗原 B 分子。

5 实施例 12: 半抗原 A 与标记物(辣根过氧化物酶(HRP))的偶联

将 10 mg EDC 溶于 800 μ l 水中, 立即加入到所述半抗原(1 mg)在 200 μ l DMF 中所形成的溶液中。将所得溶液轻轻混合, 然后加入到 HRP(20 mg)的 1 ml 水溶液中。混合后, 加入 5 mg 硫代-NHS, 在室温黑暗条件下将整个反应混合物保温过夜。使所得偶联物通过流过两个 PD10 柱(Pharmacia Biotech)而纯化, 用 20 mM PBS, pH 7.2 洗脱, 然后在 4 $^{\circ}$ C 用 20 mM PBS, pH 7.2 透析过夜。

实施例 13: 针对实施例 5 所得免疫原 A 的抗体的制备

实施例 5 所得免疫原水溶液用弗氏完全佐剂(FCA)进行配制, 使 4 mg/ml 免疫原在 50% (v/v) FCA 中形成乳液。三只绵羊用这种乳液免疫(第一次免疫), 在每个动物的腰窝部位皮下注射 4 个点, 每个点注射 0.25 ml, 下一次免疫(第一次加强免疫)含有 2 mg/ml 免疫原, 后续各次免疫(第 2-25 次加强免疫)含有 1 mg/ml 免疫原。所有的加强免疫都在 50% (v/v) 弗氏不完全佐剂(FIA)中乳化, 并以与第一次免疫相同的方式每月给药, 持续一年。每一次加强免疫的 7-14 天后采集血样, 处理每个样品以生产抗血清, 该抗血清用辛酸和硫酸铵沉淀进一步纯化, 从而产生免疫球蛋白 G (IgG) 级分。用竞争性 ELISA 微滴板测定法检测该 IgG 级分, 如下面实施例 14 所述。

实施例 14: 针对 2-氧-3-羟基-LSD 的竞争性 ELISA 的开发

将针对本发明免疫原 A(实施例 5)的抗血清中的 IgG 级分稀释于 10mM Tris, pH8.5 溶液中, 然后用该溶液包被强结合力的 96 孔聚苯乙烯微滴板(125 μ l/孔)。用标准 ELISA 棋盘格技术(standard ELISA Chequerboard technique)检测相应的抗体包被稀释物。平板在 37 $^{\circ}$ C 保温 2 小时, 用含有 Tween 20 的 Tris 盐缓冲液(TBST)洗 4 次, 轻轻拍干, 用 TBST 制备 2-氧-3-羟基-LSD 的标准溶液, 浓度为 0, 10, 50, 100, 250, 500, 1000 和 2000 ng/ml, 每一浓度的标准溶液取 50 μ l 加入相应的孔中(图 4)。将本发明的偶联物(检测试剂)稀释在含有 EDTA、D-甘露醇、蔗糖、乙基汞硫代水杨酸钠(thimerosal)和 BSA 的 Tris 缓冲液(pH7.2)中, 相应稀释液用标准 ELISA 棋盘格技术检测,

并取 75 μ l 加入相应的孔中(图 4)。平板在 37 $^{\circ}$ C 保温 2 小时。过量的未结合的偶联物通过在 10 分钟内用 TBST 洗 6 次而除去。

将 125 μ l 四甲基联苯胺(TMB)底物溶液加到平板的每个孔中,将平板在室温避光温育 15 - 20 分钟。向每个孔中加入 125 μ l 0.2M H₂SO₄ 来终止反应。

5 用微滴板读取仪读取 450nm 处的吸收值。该试验所得数据如下表 1 所示。

实施例 15: 2-氧-3-羟基-LSD 在竞争性 ELISA 中与 LSD 及其代谢物的交叉反应

用 TBST 制备 LSD 及其代谢物的标准溶液,浓度为 0、10.0、50.0、100.0、250.0、500.0, 1000 和 2000 ng/ml。在此竞争性 ELISA 中使用每个系列的标准液作出标准曲线,用于测定该免疫分析中与 LSD 及其代谢物的交叉反应,通过下列公式计算交叉反应:

$$\% CR = IC_{50_{2-氧}} / IC_{50_{LSD}} \times 100$$

其中 % CR 是交叉反应的百分比, IC_{50_{2-氧}} 是导致 50% 信号位移 (displacement) 时 2-氧-3-羟基-LSD 的浓度, IC_{50_{LSD}} 是导致 50% 信号位移时 LSD 或 LSD 代谢物的浓度。

表 1: 用针对免疫原 A(半抗原 A-BSA)(实施例 5)和偶联物 A(半抗原 A-HRP)的抗血清作为检测试剂(实施例 12),通过 2-氧-3-羟基-LSD 的竞争性微滴板试验所得的交叉反应数据。

| 标准品 ng/ml | 2-氧-3-羟基-LSD | | 去甲-LSD | | LSD | |
|--------------|------------------|--------|------------------|--------|------------------|--------|
| | A ₄₅₀ | % B/B0 | A ₄₅₀ | % B/B0 | A ₄₅₀ | % B/B0 |
| 0 | 1.779 | | 1.790 | | 1.805 | |
| 10 | 1.396 | 78.47 | 1.772 | 99.0 | 1.792 | 99.28 |
| 50 | 1.056 | 59.36 | 1.767 | 98.7 | 1.777 | 98.45 |
| 100 | 0.891 | 50.08 | 1.763 | 98.5 | 1.775 | 98.34 |
| 250 | 0.660 | 37.10 | 1.738 | 97.1 | 1.740 | 96.40 |
| 500 | 0.514 | 28.89 | 1.686 | 94.2 | 1.653 | 91.58 |
| 1000 | 0.391 | 21.98 | 1.638 | 91.5 | 1.572 | 87.09 |
| 2000 | 0.318 | 17.88 | 1.552 | 86.7 | 1.453 | 80.50 |
| | | | | | | |
| % CR | 100 | | <5 | | <5 | |

A_{450} = 450nm 处的吸收值

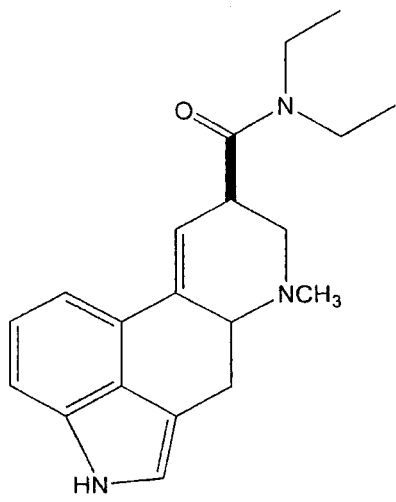
B = x ng/ml 浓度的标准溶液在 450nm 处的吸收值

B0 = 0 ng/ml 浓度的标准溶液在 450nm 处的吸收值

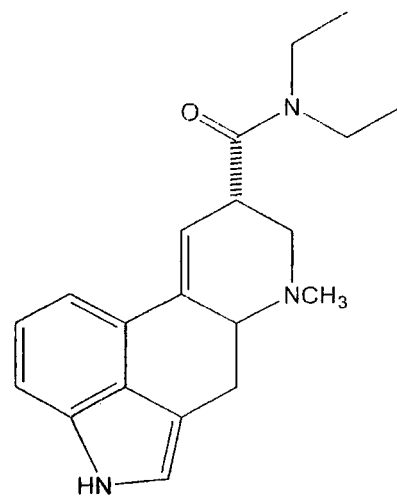
%CR=基于对 2-氧-3-羟基-LSD 的特异性的交叉反应百分比

- 5 结果证明，该试验对 2-氧-3-羟基-LSD 具有高度特异性，而与 LSD 和去甲-LSD 的交叉反应水平非常低。

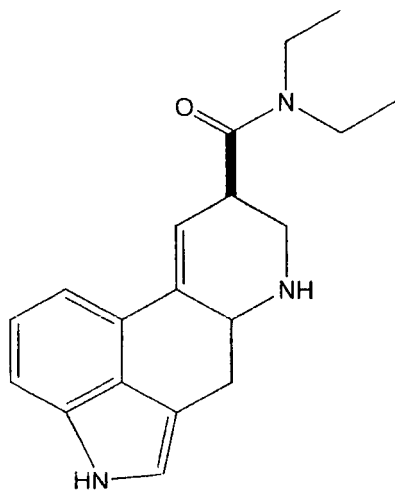
LSD及相关化合物的结构



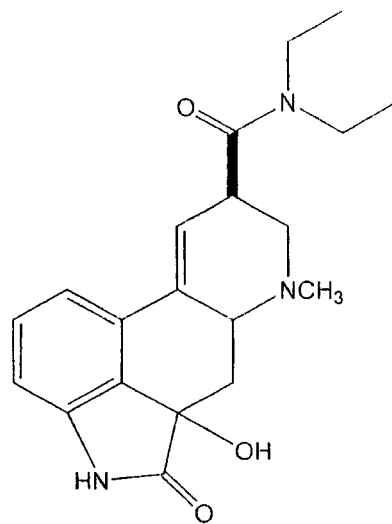
LSD 1



异-LSD 2



去甲-LSD 3



2-氧-3-羟基-LSD 4

图 1

2-氧-3-羟基LSD的半抗原A和免疫原A

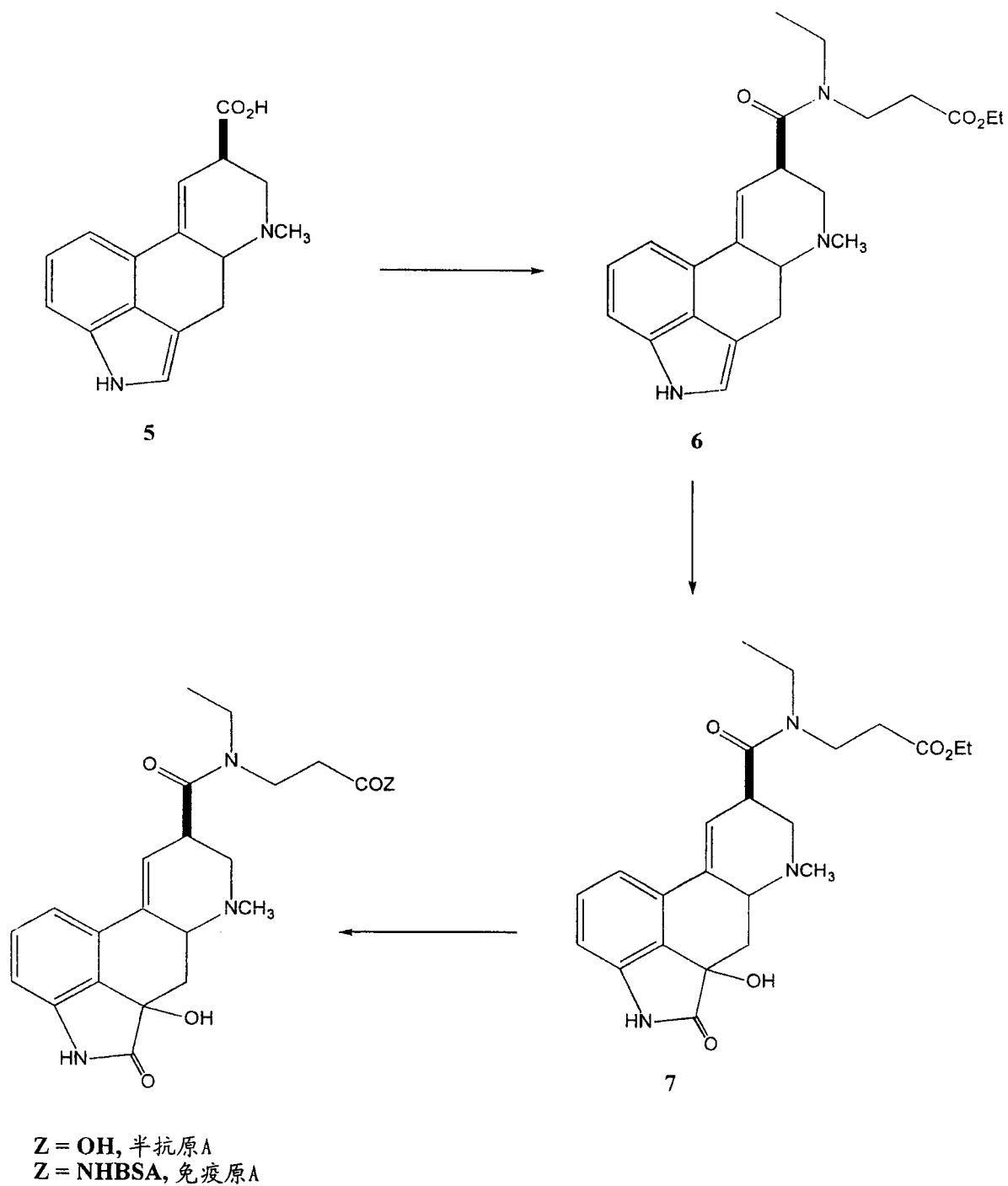


图 2

2-氧-3-羟基LSD的半抗原B和免疫原B

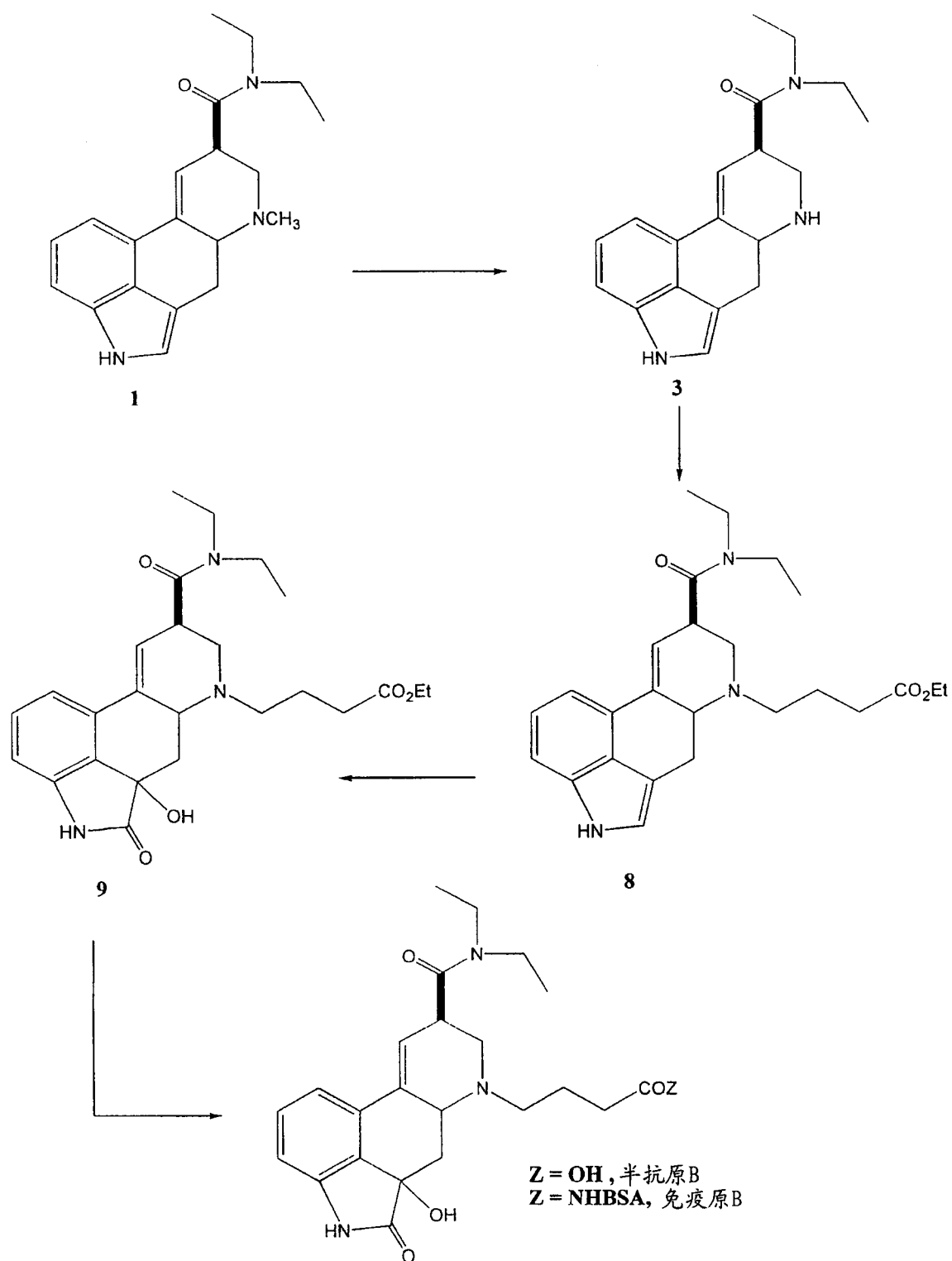


图 3

2-氧-3-羟基-LSD 的竞争性 ELISA 微滴板试验

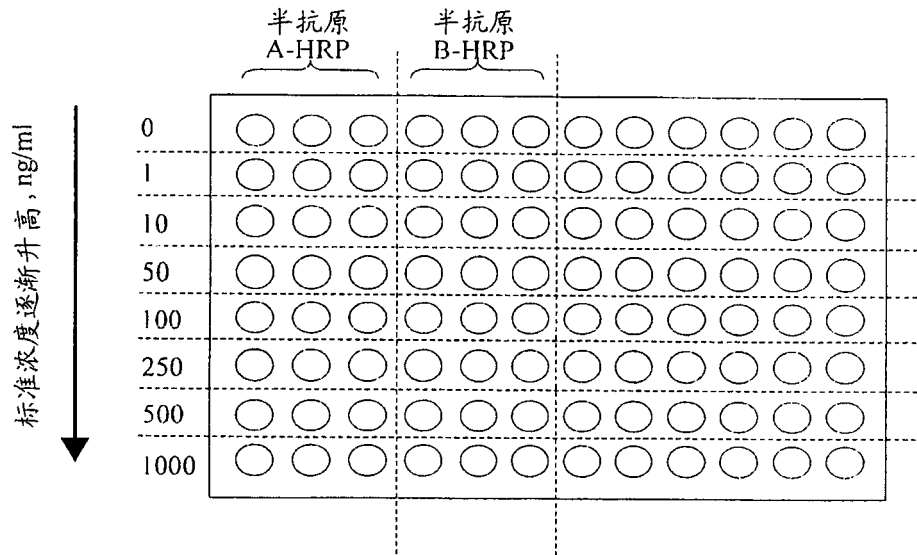


图 4

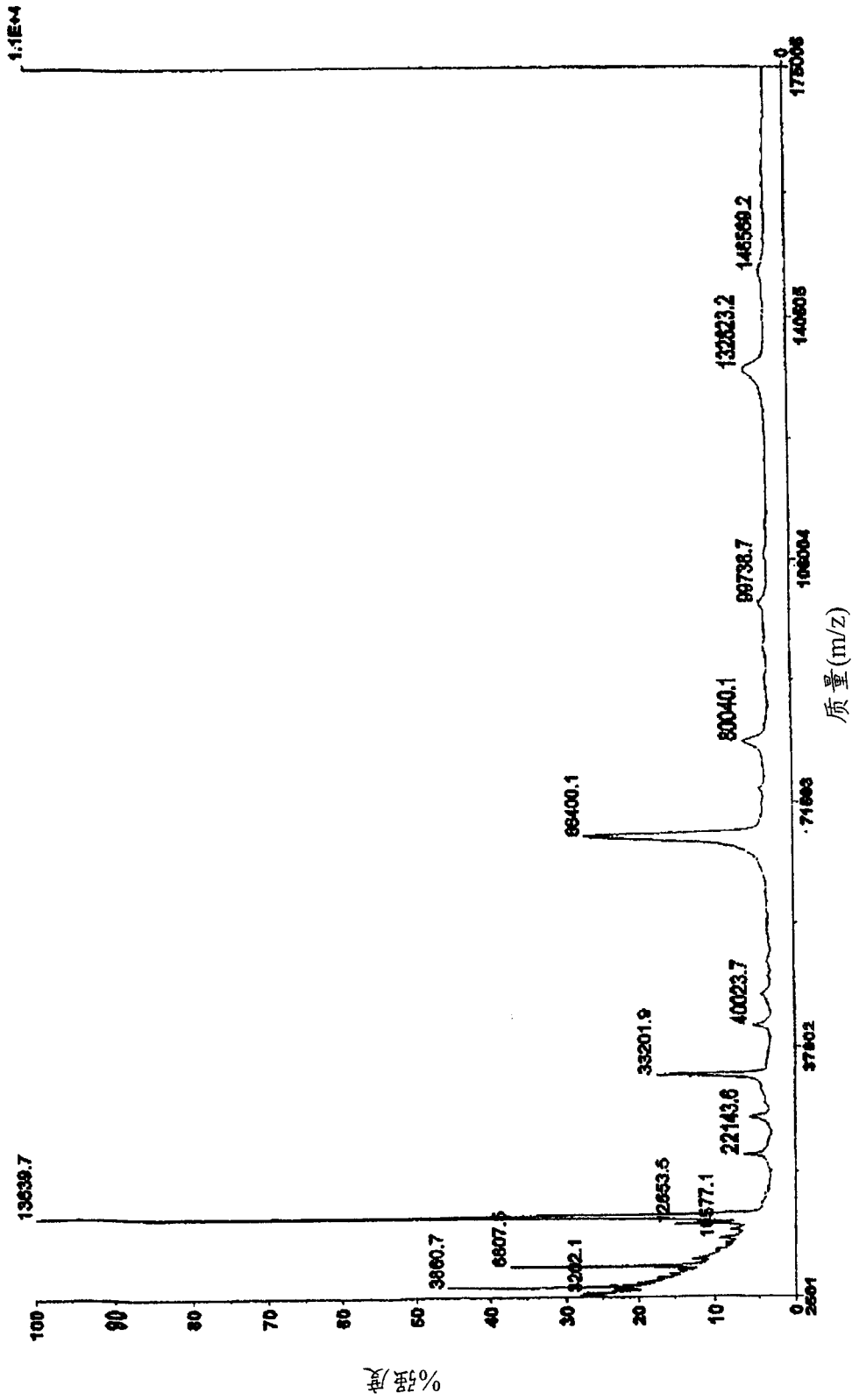


图 5

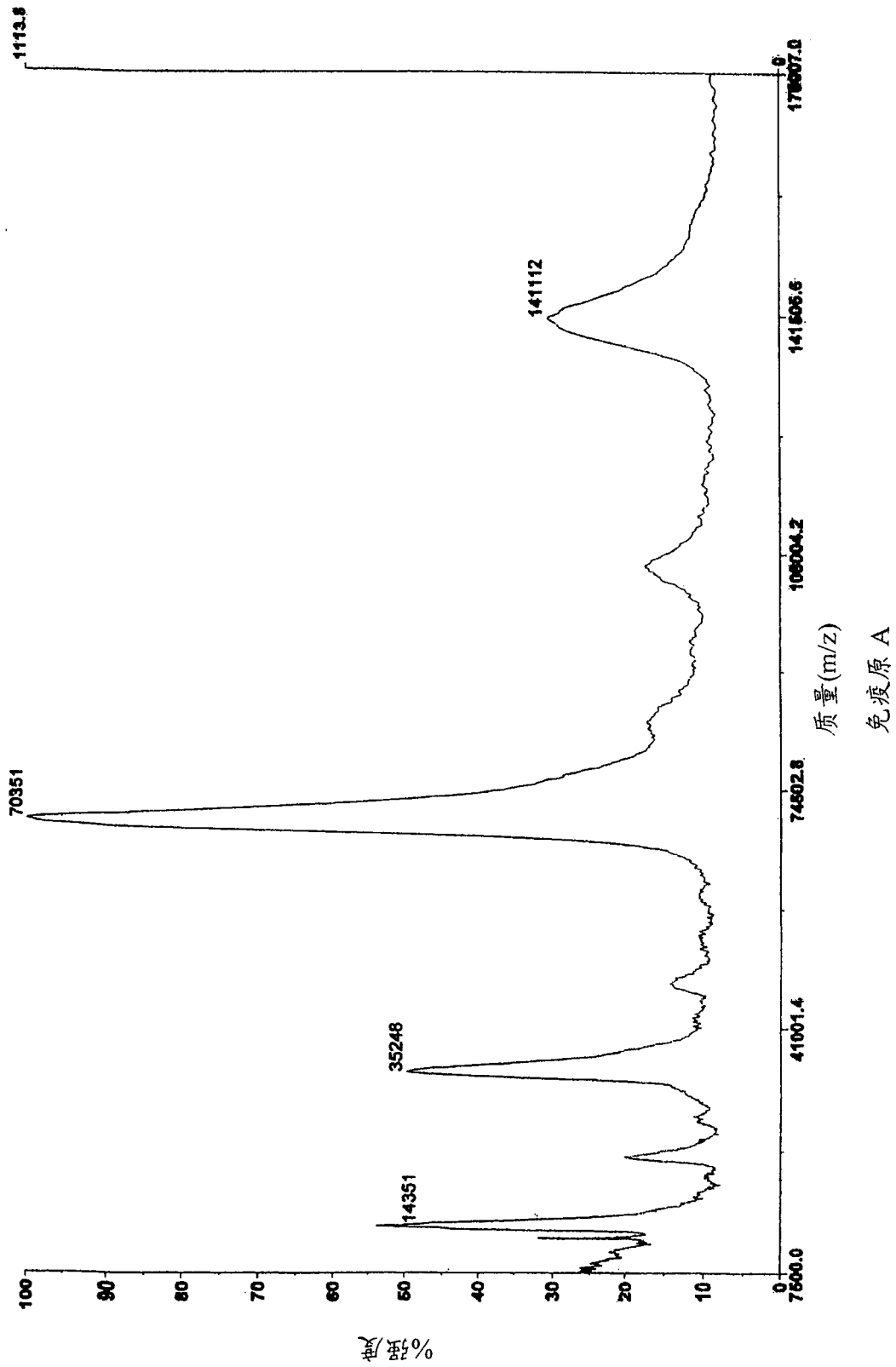
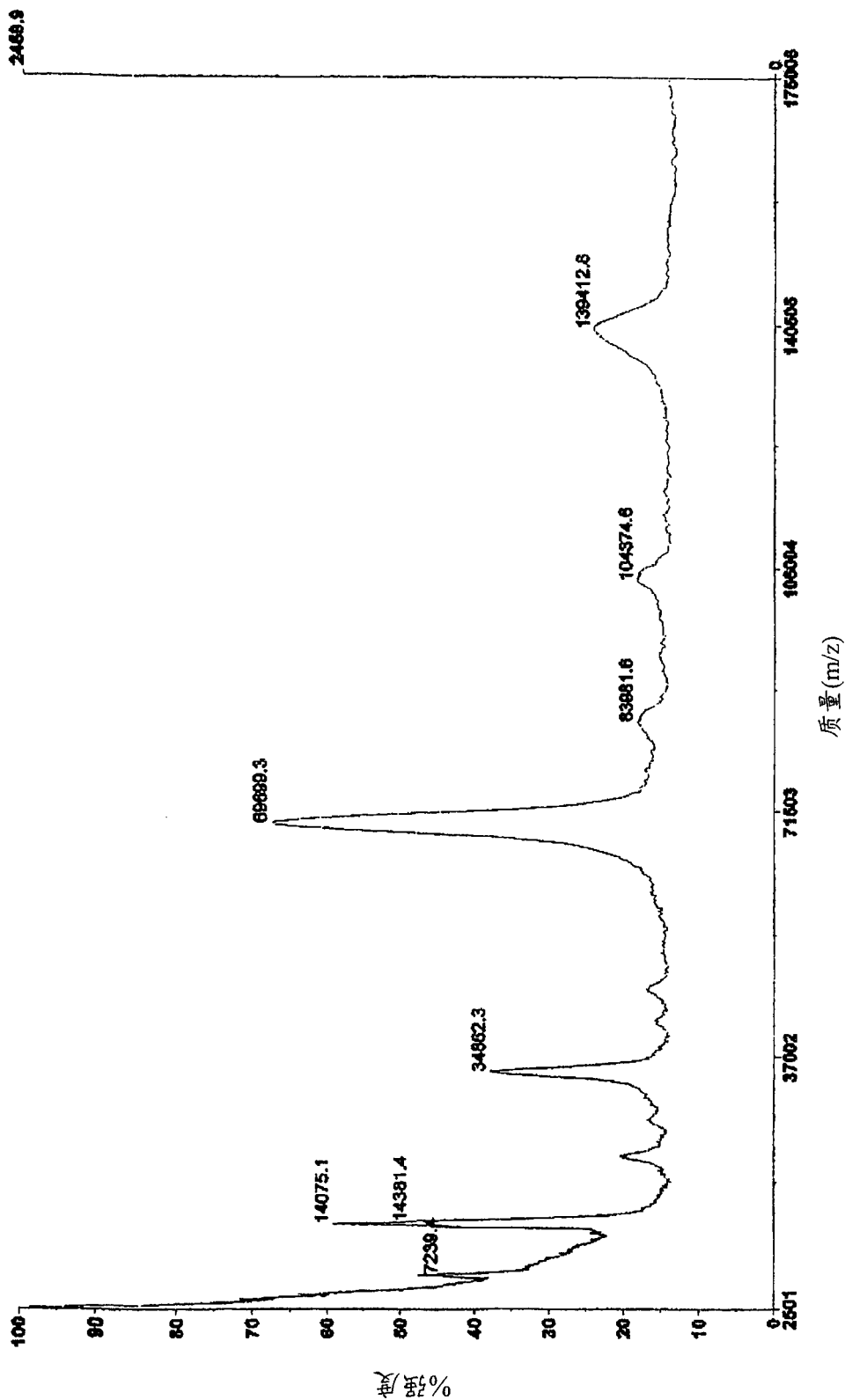


图 6



质量(m/z)
免疫原 B

图 7

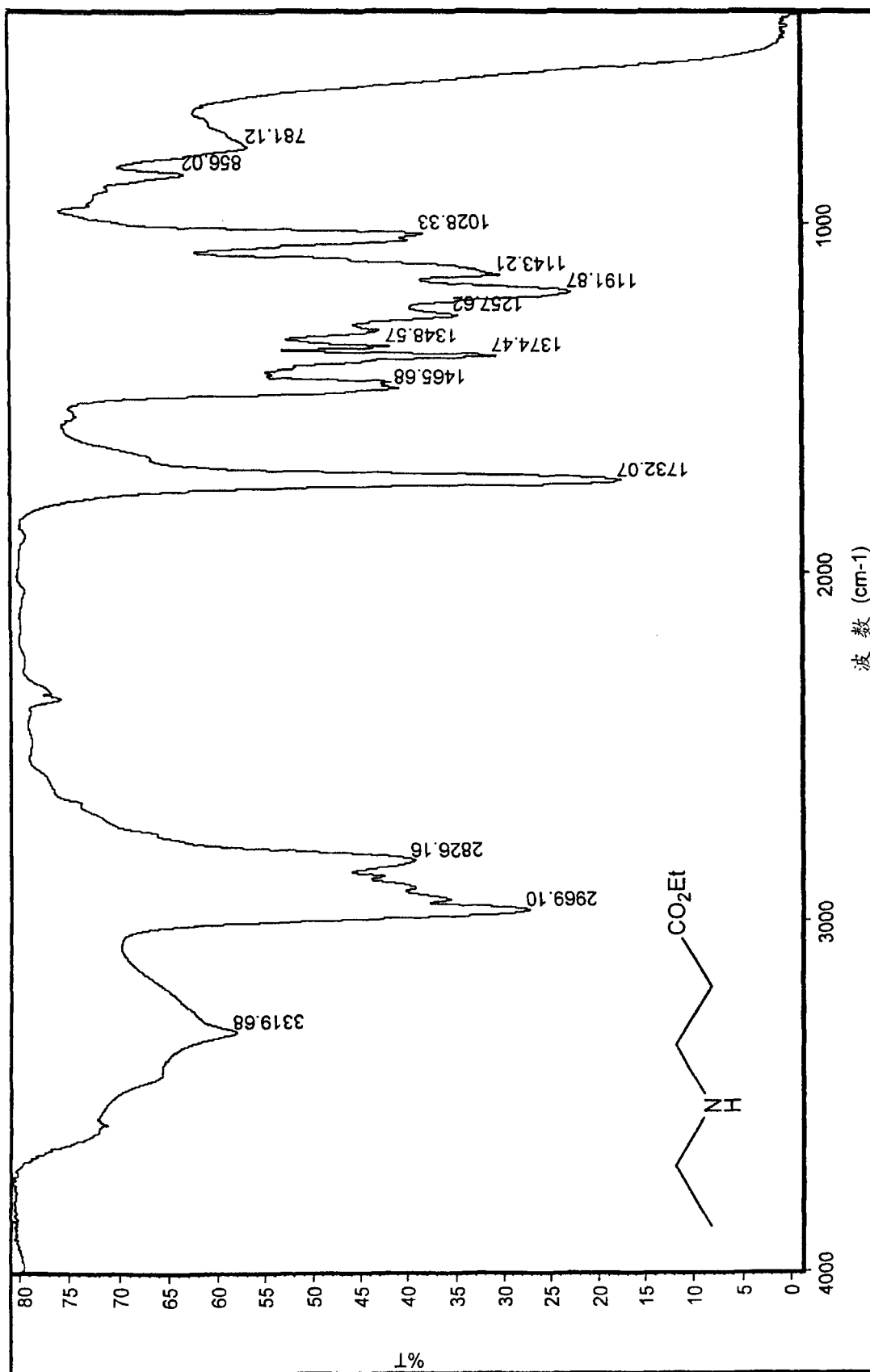


图 8

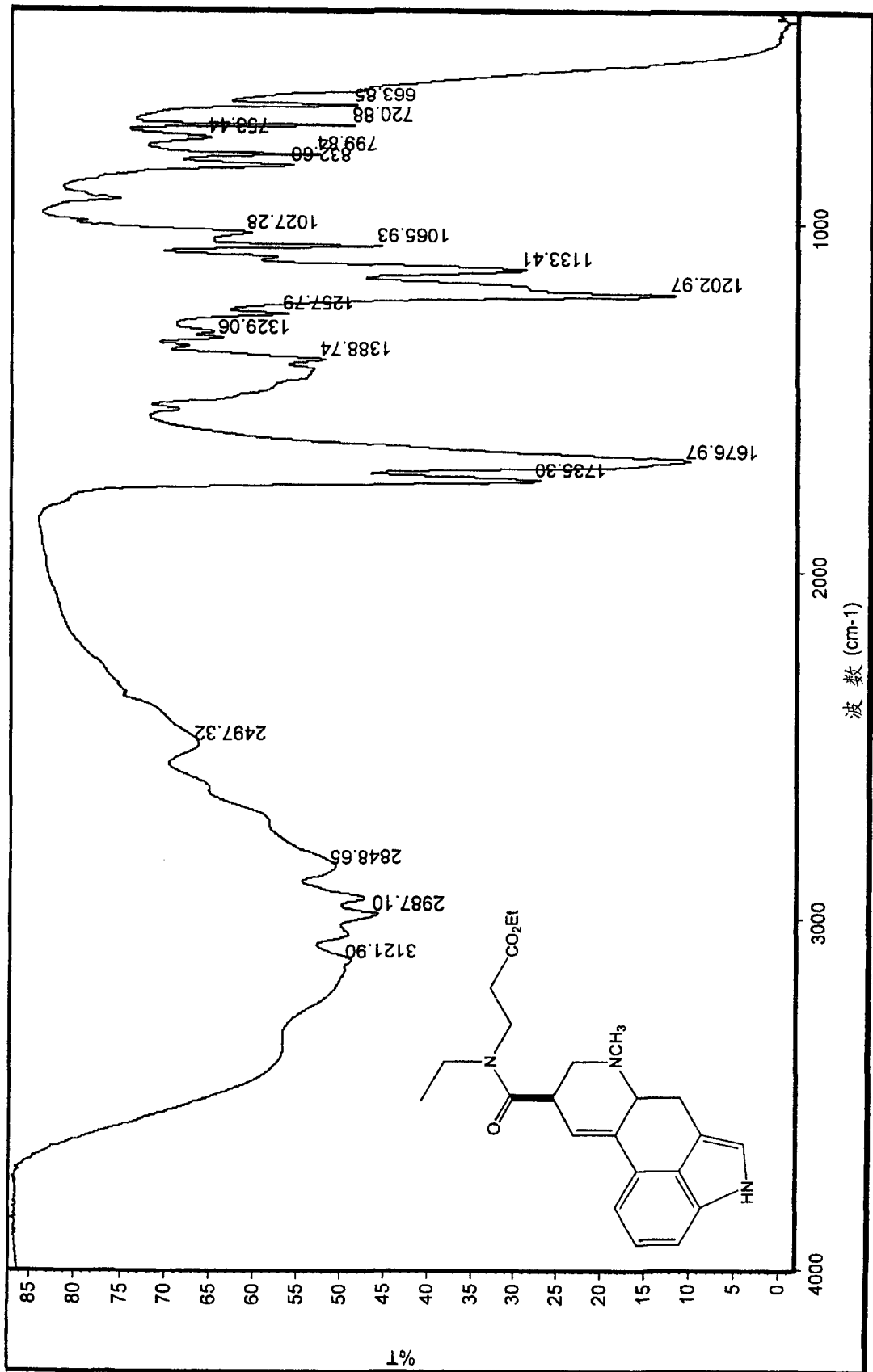


图 9

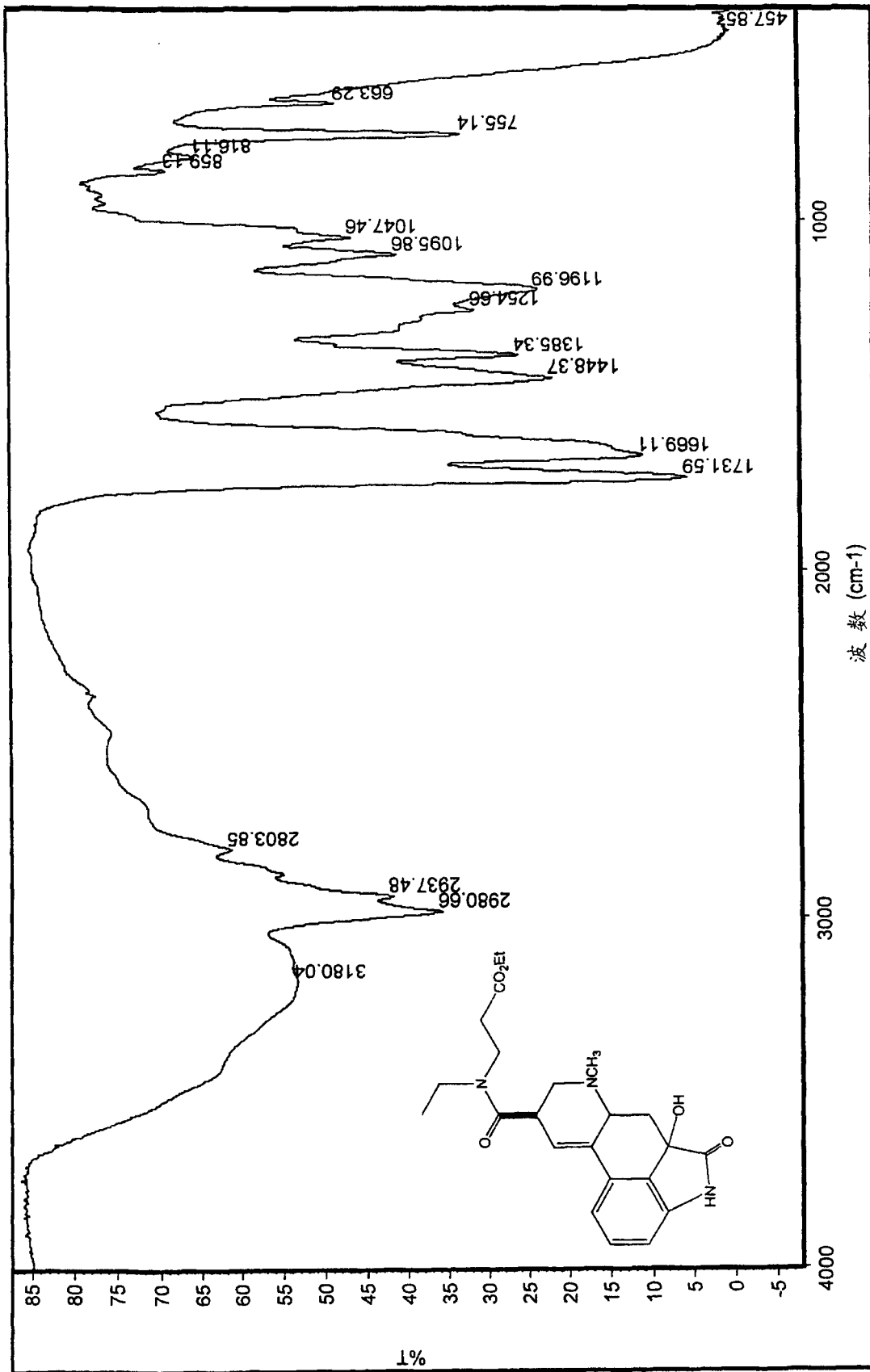


图 10

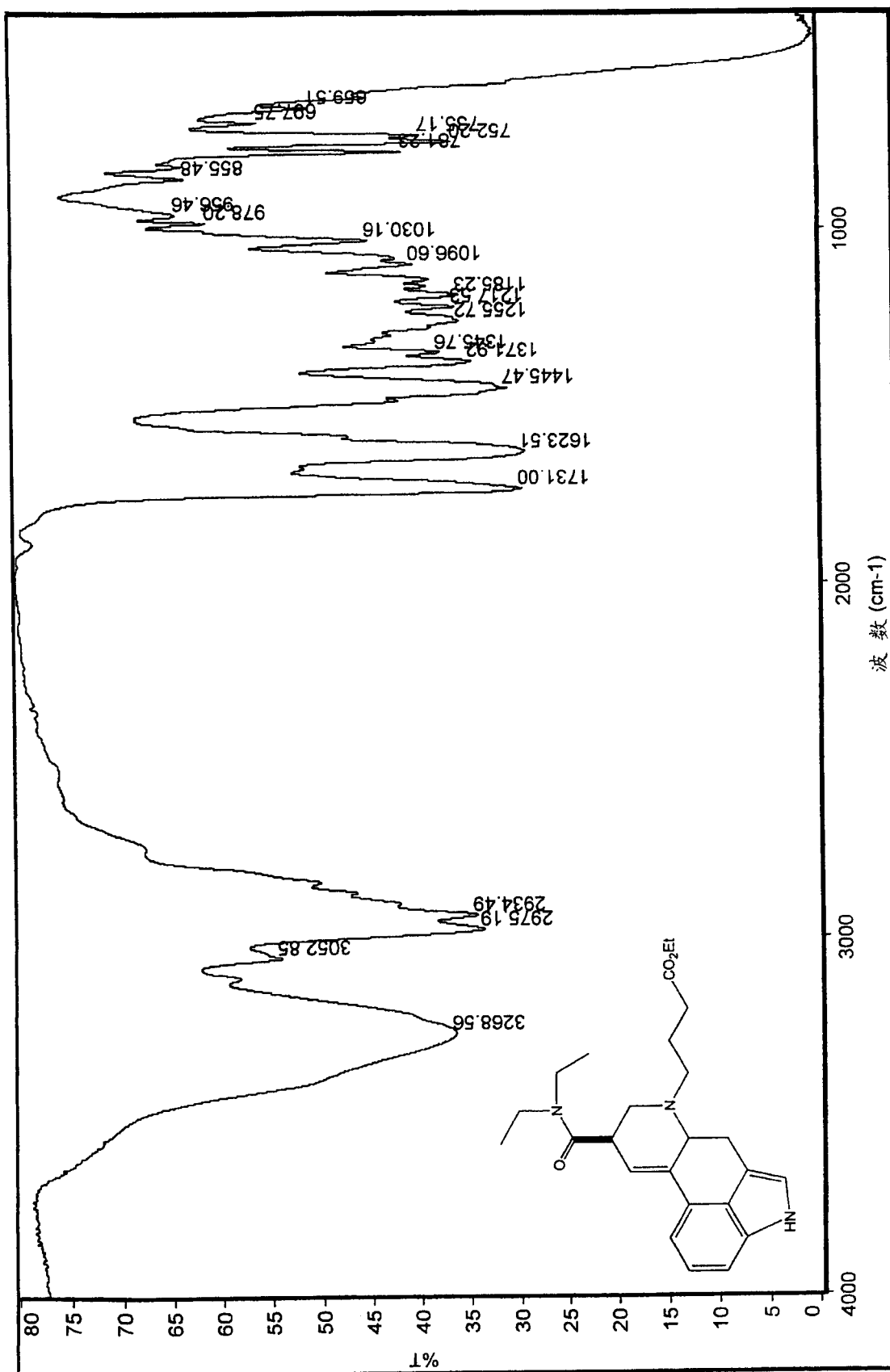


图 11

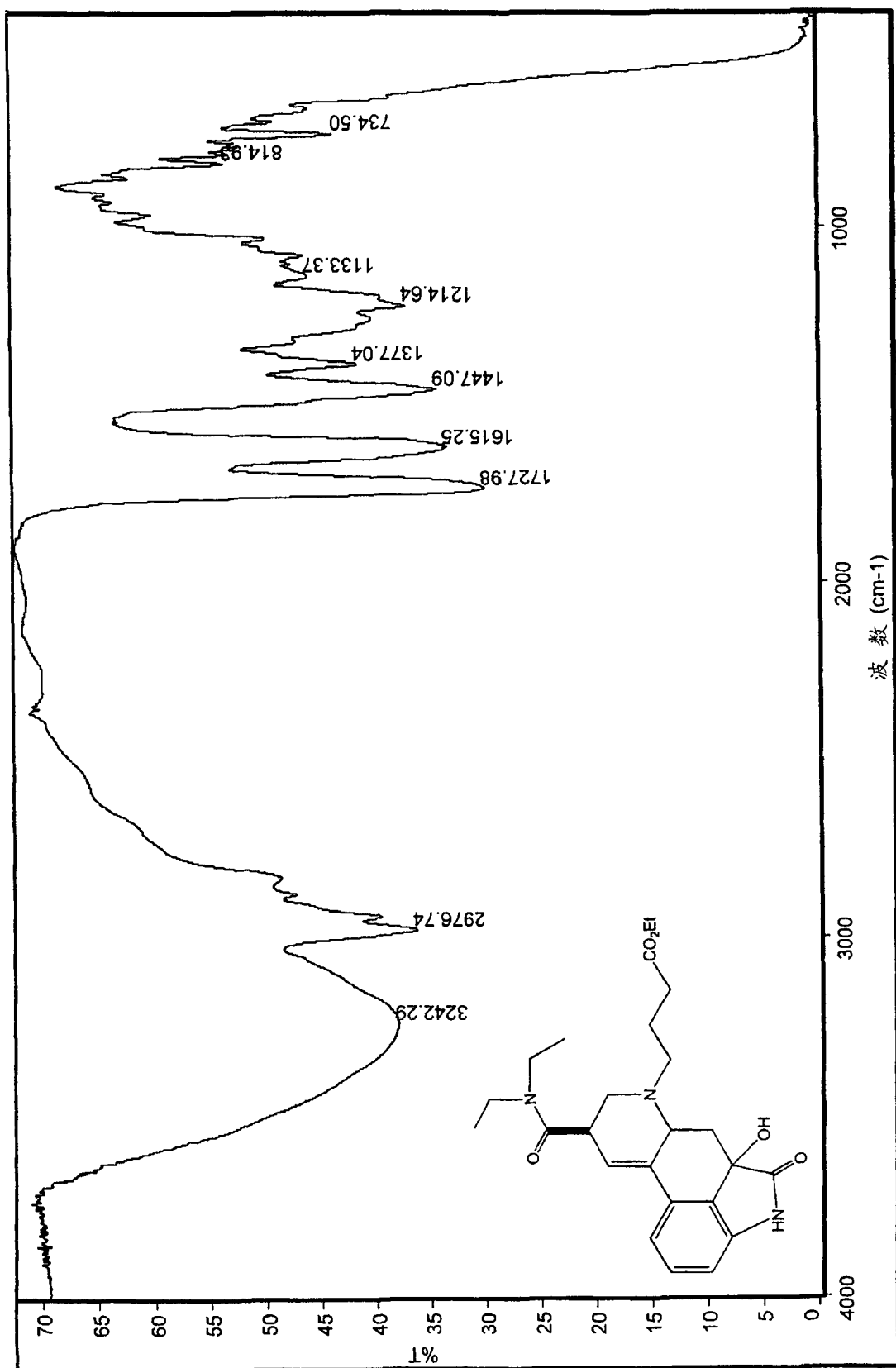


图 12

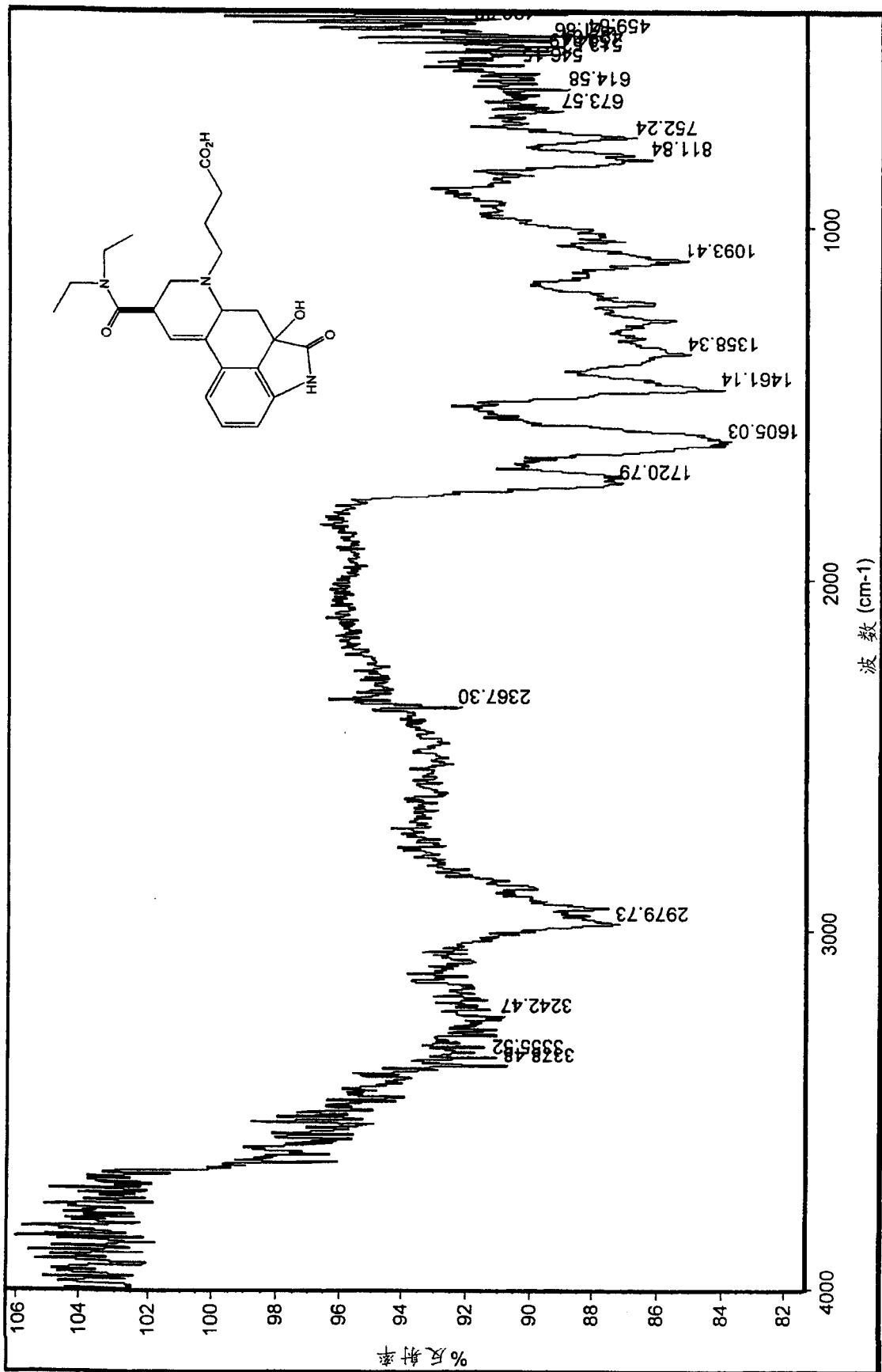


图 13

| | | | |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译) | 2 - 氧 - 3 - 羟基 - LSD的半抗原、免疫原、抗体和偶联物 | | |
| 公开(公告)号 | CN1450065A | 公开(公告)日 | 2003-10-22 |
| 申请号 | CN02140035.0 | 申请日 | 2002-12-20 |
| [标]发明人 | 罗伯特·麦康奈尔 伊尔·本齐克 斯蒂芬·菲茨杰拉德 约翰·拉蒙特 | | |
| 发明人 | 罗伯特·麦康奈尔 伊尔·本齐克 斯蒂芬·菲茨杰拉德 约翰·拉蒙特 | | |
| IPC分类号 | A61K47/48 C07D457/06 C07K16/44 G01N33/94 C07K16/06 C07K17/02 G01N33/531 G01N33/536 G01N33/544 G01N33/563 | | |
| CPC分类号 | A61K47/48284 Y10S436/814 C07D457/06 A61K47/4833 C07K16/44 G01N33/946 A61K47/643 A61K47/646 | | |
| 优先权 | 2001205057 2001-12-20 EP | | |
| 其他公开文献 | CN1300139C | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明描述了一种半抗原，其在2-氧-3-羟基-LSD的8β-羧酰胺的氮上用交联剂衍化而成。本发明也提供了一种免疫原，该免疫原包括上述半抗原和一个与半抗原结合的能够产生抗原性的载体材料；本发明还提供了一种含有上述半抗原的偶联物，其中的半抗原共价结合有一个可检测的标记物。另外，本发明涉及针对上述免疫原的抗体。最后，本发明涉及检测或测定生物体液中的2-氧-3-羟基-LSD的方法和试剂盒。本发明的抗体对2-氧-3-羟基-LSD具有高度的特异性，而与LSD和去甲-LSD无显著交叉反应。

