



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109897025 A

(43)申请公布日 2019.06.18

(21)申请号 201910152728.9

C07K 14/795(2006.01)

(22)申请日 2019.02.28

G01N 33/53(2006.01)

(71)申请人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

(72)发明人 王战辉 沈建忠 温凯 江海洋
于雪芝 余文博 李红芳 段长飞
史为民

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王文君 陈征

(51)Int.Cl.

C07D 311/56(2006.01)

C07K 14/47(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

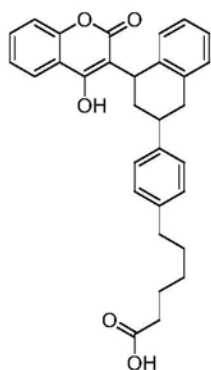
权利要求书3页 说明书11页 附图4页

(54)发明名称

抗凝血鼠药半抗原和人工抗原及其制备方法与应用

(57)摘要

本发明涉及抗凝血鼠药半抗原和人工抗原及其制备方法与应用。所述抗凝血鼠药半抗原的

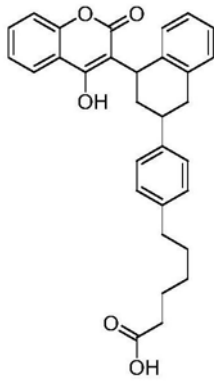


结构如式(I)所示：

式(I)

CN 109897025 A 所述抗凝血鼠药人工抗原是由式(I)所示半抗原与载体蛋白偶联得到。利用所述抗凝血鼠药人工抗原免疫动物,可得到效价高,灵敏度高的特异性抗体。本发明提供的抗凝血鼠药半抗原及其制备的抗体,为建立快速、简便、价廉、灵敏、特异的抗凝血鼠药检测方法提供了新手段。

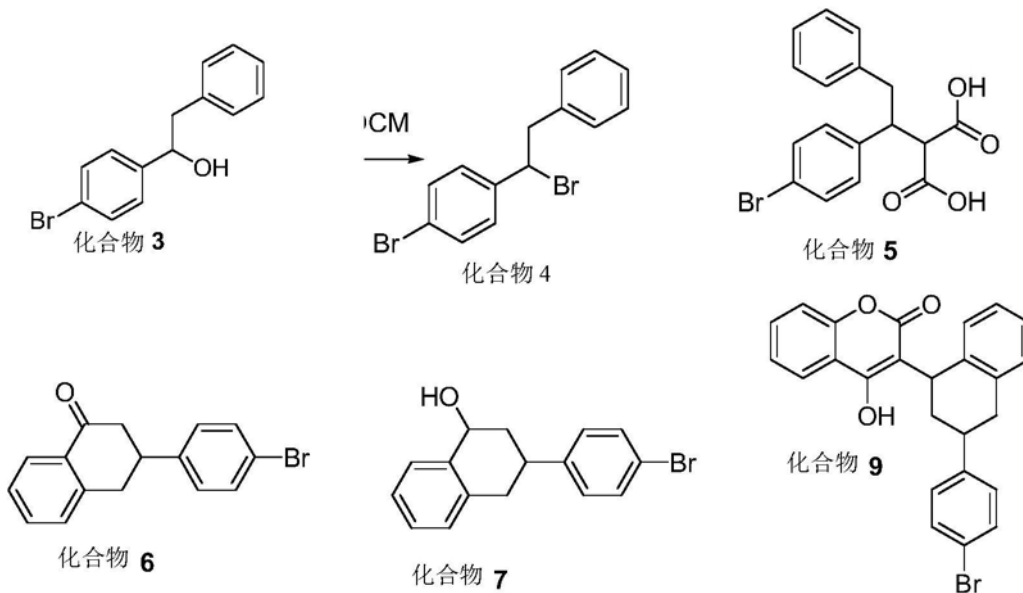
1. 抗凝血鼠药半抗原, 其特征在于, 其结构如式(I) 所示:

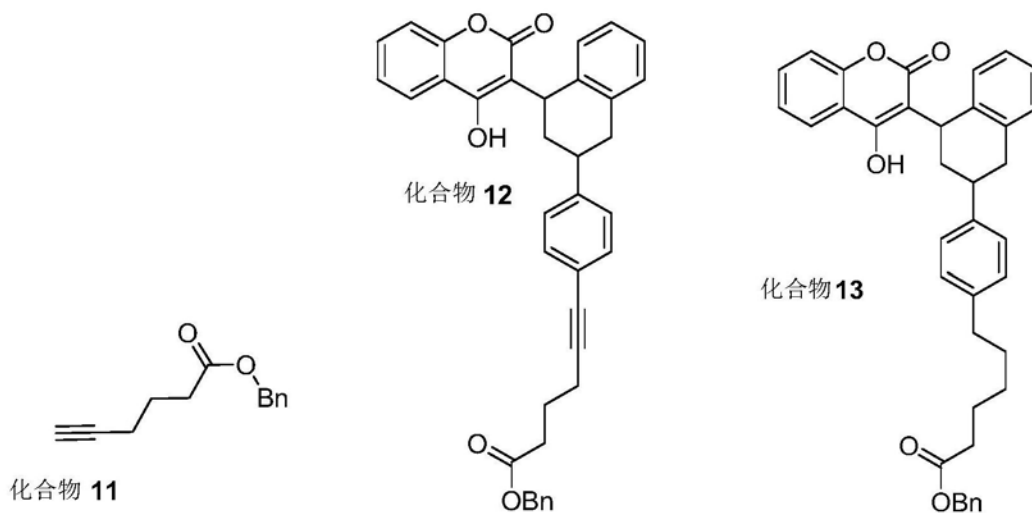


式(I)。

2. 权利要求1所述半抗原的制备方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

- 1) 苯基溴化镁与4-溴苯甲醛反应得到化合物3;
 - 2) 化合物3与三溴化磷反应得到化合物4;
 - 3) 化合物4与丙二酸二乙酯反应得到化合物5;
 - 4) 化合物5与多聚磷酸反应得到化合物6;
 - 5) 化合物6与NaBH₄反应得到化合物7;
 - 6) 化合物7与对甲苯磺酸和4-羟基香豆素反应得到化合物9;
 - 7) 5-炔基己酸与溴苯反应得到化合物11;
 - 8) 化合物11与化合物9反应得到化合物12;
 - 9) 化合物12发生氢化反应得到化合物13;
 - 10) 化合物13发生水解反应得到所述抗凝血鼠药半抗原;
- 其中, 所述化合物3、4、5、6、7、9、11、12、13的结构分别如下:





3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,包括如下步骤:

1) 在氮气气氛下,1M苄基溴化镁溶液316mL用四氢呋喃170mL稀释冷却到 -15°C ,1h内向该溶液中加入含45.1g 4-溴苯甲醛的THF溶液100mL,该体系在 -10°C 搅拌1h,用饱和氯化铵溶液淬灭;该体系用水稀释,乙酸乙酯萃取三次;合并有机相,依次用水、食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,滤液浓缩后得到化合物3;

2) 向冰盐浴的含80.0g化合物3的二氯甲烷溶液450mL中,在30min内加入三溴化磷11.4mL;该混合物在 $0-5^{\circ}\text{C}$ 搅拌2h,用冰水淬灭;所得混合物用二氯甲烷提取三次;合并有机相,依次用水、食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤;滤液浓缩后得到化合物4;

3) 在氮气气氛下,向冰水浴的含12.661g氢氧化钠的DMF500mL悬浮液中依次加入48mL丙二酸二乙酯和97.7g化合物4;反应混合物加热到 90°C 反应16h;冷却到室温,用饱和氯化铵溶液淬灭,用水稀释,乙酸乙酯提取三次;合并有机相,依次用水、食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤;滤液浓缩得到黄色油状物;将156.0g所述油状物溶解在600mL乙醇中,向其中加入300mL水和59.5g NaOH;该体系在 90°C 加热23h;冷却到室温,有浅黄色固体析出,过滤弃掉固体;减压浓缩滤液,得到残渣,该残渣用水打浆,用甲基叔丁基醚洗涤;水相用3M HCl酸化到 $\text{pH}<3$,乙酸乙酯提取两次;合并有机相,依次用水、食盐水洗涤,然后过滤,干燥,得到化合物5;

4) 向加热到 140°C 的多聚磷酸270.0g中,在1h内加入41.5g化合物5;反应体系加热到 170°C 搅拌1h;体系冷却到 $80-90^{\circ}\text{C}$,加入甲苯400mL,然后加水550mL进行淬灭;分离甲苯层,水层用乙酸乙酯萃取两次;合并有机相,依次用水、食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤浓缩至干,所得残留物在二氯甲烷和石油醚1:3体积比的混合液中重结晶,得到化合物6;

5) 化合物6溶解在100mL THF和200mL乙酸乙酯中,在 0°C 下向其中加入3.392g NaBH_4 ;反应体系升至室温搅拌16h;加入氯化铵淬灭反应;所得混合物浓缩后用水稀释,二氯甲烷萃取两次;合并有机相,依次用饱和碳酸氢钠溶液、水、食盐水洗涤,干燥浓缩,所得残留物在二氯甲烷和石油醚1:3体积比的混合液中重结晶,得到化合物7;

6) 向含5.0g化合物7的甲苯溶液100mL中加入625mg对甲苯磺酸和4.010g 4-羟基香豆素;加热回流 42°C ,产物浓缩后,向残渣中加入水,乙酸乙酯萃取两次;合并有机相,依次用饱和碳酸氢钠溶液、水、食盐水洗涤,干燥,过滤浓缩至干;所得残渣用石油醚打浆得到化合物9;

7) 向含4.5g 5-炔基己酸的DMF溶液50mL中加入11.093g碳酸钾和10.296g溴苄;该体系室温搅拌反应16h后,该体系用水稀释,乙酸乙酯萃取两次;合并有机相,依次用水、食盐水洗涤,干燥过滤,浓缩至干,所得残渣用硅胶柱层析分离,得到化合物11;

8) 在氮气气氛下,向反应瓶中分别加入3.8g化合物9,299mg PdCl₂(PPh₃)₂,82mg CuI,然后依次加入30mL二异丙基胺和3.438g化合物11;该体系加热到80℃搅拌反应23h,冷却至室温,浓缩;残渣用乙酸乙酯稀释,硅藻土过滤;有机相依次用饱和氯化铵溶液、水、食盐水洗涤,干燥,浓缩至干,所得残渣用硅胶柱层析分离得到化合物12;

9) 向含5.1g化合物12的四氢呋喃溶液25mL和甲醇25mL的溶液中加入10%钯碳催化剂700mg,在氢气氛围下,该体系35℃搅拌反应72h;硅藻土过滤,滤液浓缩至干得到化合物13;

10) 将4.5g化合物13溶解在30mL四氢呋喃和50mL甲醇中,向其中加入20mL水和500mg NaOH,30℃搅拌5h,浓缩至干,用1M盐酸酸化至pH<2;该体系用乙酸乙酯提取两次,合并有机相,依次用水、食盐水洗涤,浓缩至干,最后用反相色谱柱分离得到的产物,即为抗凝血鼠药半抗原;

优选地,步骤7) 硅胶柱层析所用流动相为石油醚和乙酸乙酯体积比10:1的混合物。

4. 抗凝血鼠药人工抗原,其特征在于,由权利要求1所述抗凝血鼠药半抗原与载体蛋白偶联后得到;

其中,所述载体蛋白选自牛血清白蛋白、卵清蛋白、钥孔血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白;优选牛血清白蛋白、钥孔血蓝蛋白。

5. 权利要求4所述人工抗原的制备方法,其特征在于,采用活泼酯法使所述抗凝血鼠药半抗原与载体蛋白偶联制得人工抗原。

6. 由权利要求4所述人工抗原制备的特异性抗体,包括多克隆抗体和单克隆抗体。

7. 权利要求1所述半抗原或权利要求4所述人工抗原的以下任一应用:

①在制备抗凝血鼠药特异性抗体中的应用;

②在检测抗凝血鼠药特异性抗体中的应用。

8. 抗凝血鼠药多克隆抗体,其特征在于,由权利要求4所述人工抗原免疫实验动物获得;

优选地,所述人工抗原由所述抗凝血鼠药半抗原与钥孔血蓝蛋白偶联得到。

9. 由权利要求6所述特异性抗体或权利要求8所述多克隆抗体制备的抗凝血鼠药检测试剂或试剂盒。

10. 权利要求6所述特异性抗体或权利要求8所述多克隆抗体的以下任一应用:

(1) 在检测抗凝血鼠药中的应用;

(2) 在制备抗凝血鼠药的免疫层析试纸条中的应用;

(3) 在制备抗凝血鼠药的胶体金检测试纸条中的应用;

优选地,所述抗凝血鼠药选自鼠得克、氯敌鼠、氯华法林、敌鼠、氟鼠灵、溴敌隆、杀鼠醚、华法林。

抗凝血鼠药半抗原和人工抗原及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物化工技术领域,具体地说,涉及抗凝血鼠药半抗原和人工抗原及其制备方法与应用。

背景技术

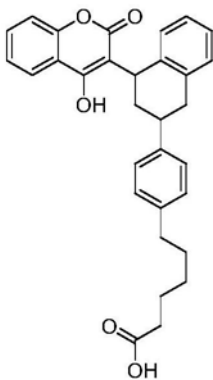
[0002] 抗凝血类鼠药(anticoagulant rodenticide,AR)是一类可以竞争性地与维生素K结合,从而导致鼠的凝血功能障碍,直至内脏出血致死的一类杀鼠剂。此类鼠药具有高效、低毒、安全的优点,是目前较理想的并且使用最为广泛的杀鼠剂。但由抗凝血剂鼠药造成的非靶标物中毒事件频繁发生,其中包括误食,恶意投毒和二次中毒等导致的群体或个体中毒事件,严重威胁了公共卫生安全。因此,在发生中毒事件后有必要对生物样本中多种抗凝血剂鼠药进行同时检测,为病因的确证和临床治疗奠定基础。

[0003] 目前,生物样品中抗凝血剂鼠药的检测方法主要有高效液相色谱法,液质联用等仪器分析方法。但仪器分析方法是确证方法,存在检测成本高,一起价格高昂,需要专门人员进行操作,样品处理复杂等缺点,无法满足大批量样本快速筛查。免疫分析技术,具有较高的灵敏度和特异性,在大量样本的现场快速检测时更受欢迎。免疫分析技术依托于核心试剂抗体,而抗体的性质又取决于半抗原的结构。因此,研发一种通用型抗凝血剂鼠药半抗原显得尤为重要。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供抗凝血鼠药半抗原和人工抗原及其制备方法与应用。

[0005] 为了实现本发明目的,第一方面,本发明提供抗凝血鼠药半抗原,其结构如式(I)所示:



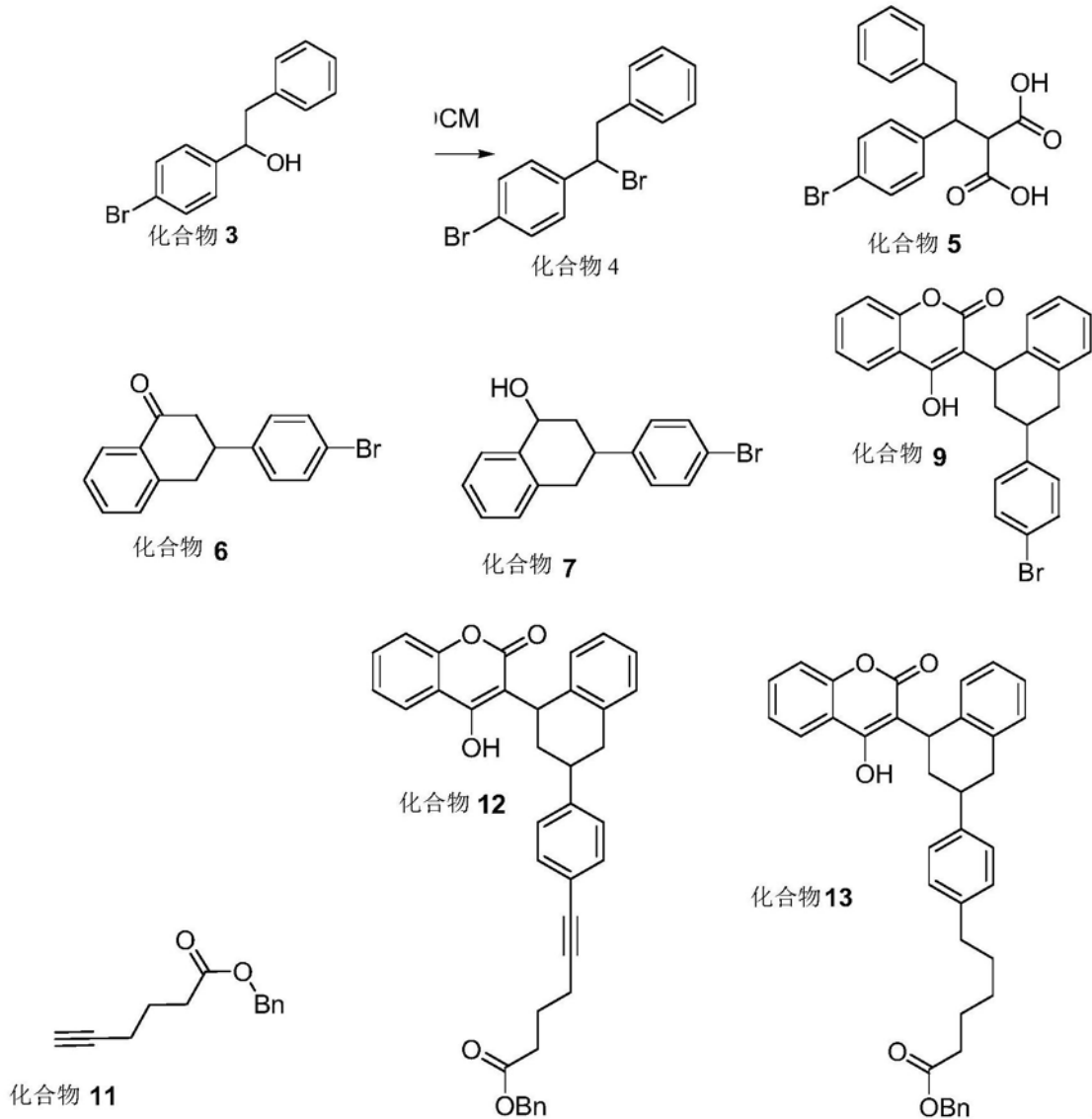
[0006]

式(I)

[0007] 第二方面,本发明提供所述半抗原的制备方法,包括如下步骤:

- [0008] 1) 苄基溴化镁与4-溴苯甲醛反应得到化合物3;
- [0009] 2) 化合物3与三溴化磷反应得到化合物4;
- [0010] 3) 化合物4与丙二酸二乙酯反应得到化合物5;
- [0011] 4) 化合物5与多聚磷酸反应得到化合物6;
- [0012] 5) 化合物6与NaBH₄反应得到化合物7;

- [0013] 6) 化合物7与对甲苯磺酸和4-羟基香豆素反应得到化合物9;
 [0014] 7) 5-炔基己酸与溴苄反应得到化合物11;
 [0015] 8) 化合物11与化合物9反应得到化合物12;
 [0016] 9) 化合物12发生氢化反应得到化合物13;
 [0017] 10) 化合物13发生水解反应得到所述抗凝血鼠药半抗原、
 [0018] 其中,所述化合物3、4、5、6、7、9、11、12、13的结构分别如下:
 [0019]



[0020] 进一步地,所述半抗原的制备方法包括如下步骤:

[0021] 1) 在氮气气氛下,1M苄基溴化镁溶液316mL用四氢呋喃170mL稀释冷却到-15℃,1h内向该溶液中加入含45.1g 4-溴苯甲醛的THF溶液100mL,该体系在-10℃搅拌1h,用饱和氯化铵溶液淬灭;该体系用水稀释,乙酸乙酯萃取三次;合并有机相,依次用水、食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,滤液浓缩后得到化合物3;

[0022] 2) 向冰盐浴的含80.0g化合物3的二氯甲烷溶液450mL中,在30min内加入三溴化磷11.4mL;该混合物在0-5℃搅拌2h,用冰水淬灭;所得混合物用二氯甲烷提取三次;合并有机相,依次用水、食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤;滤液浓缩后得到化合物4;

[0023] 3) 在氮气气氛下,向冰水浴的含12.661g氢氧化钠的DMF500mL悬浮液中依次加入48mL丙二酸二乙酯和97.7g化合物4;反应混合物加热到90℃反应16h;冷却到室温,用饱和氯化铵溶液淬灭,用水稀释,乙酸乙酯提取三次;合并有机相,依次用水、食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤;滤液浓缩得到黄色油状物;将156.0g所述油状物溶解在600mL乙醇中,向其中加入300mL水和59.5g NaOH;该体系在90℃加热23h;冷却到室温,有浅黄色固体析出,过滤弃掉固体;减压浓缩滤液,得到残渣,该残渣用水打浆,用甲基叔丁基醚洗涤;水相用3M HCl酸化到pH<3,乙酸乙酯提取两次;合并有机相,依次用水、食盐水洗涤,然后过滤,干燥,得到化合物5;

[0024] 4) 向加热到140℃的多聚磷酸270.0g中,在1h内加入41.5g化合物5;反应体系加热到170℃搅拌1h;体系冷却到80-90℃,加入甲苯400mL,然后加水550mL进行淬灭;分离甲苯层,水层用乙酸乙酯萃取两次;合并有机相,依次用水、食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤浓缩至干,所得残留物在二氯甲烷和石油醚1:3体积比的混合液中重结晶,得到化合物6;

[0025] 5) 化合物6溶解在100mL THF和200mL乙酸乙酯中,在0℃下向其中加入3.392g NaBH₄;反应体系升至室温搅拌16h;加入氯化铵淬灭反应;所得混合物浓缩后用水稀释,二氯甲烷萃取两次;合并有机相,依次用饱和碳酸氢钠溶液、水、食盐水洗涤,干燥浓缩,所得残留物在二氯甲烷和石油醚1:3体积比的混合液中重结晶,得到化合物7;

[0026] 6) 向含5.0g化合物7的甲苯溶液100mL中加入625mg对甲苯磺酸和4.010g 4-羟基香豆素;加热回流42℃,产物浓缩后,向残渣中加入水,乙酸乙酯萃取两次;合并有机相,依次用饱和碳酸氢钠溶液、水、食盐水洗涤,干燥,过滤浓缩至干;所得残渣用石油醚打浆得到化合物9;

[0027] 7) 向含4.5g 5-炔基己酸的DMF溶液50mL中加入11.093g碳酸钾和10.296g溴苄;该体系室温搅拌反应16h后,该体系用水稀释,乙酸乙酯萃取两次;合并有机相,依次用水、食盐水洗涤,干燥过滤,浓缩至干,所得残渣用硅胶柱层析分离(流动相为石油醚和乙酸乙酯体积比10:1的混合物),得到化合物11;

[0028] 8) 在氮气气氛下,向反应瓶中分别加入3.8g化合物9,299mg PdCl₂(PPh₃)₂,82mg CuI,然后依次加入30mL二异丙基胺和3.438g化合物11;该体系加热到80℃搅拌反应23h,冷却至室温,浓缩;残渣用乙酸乙酯稀释,硅藻土过滤;有机相依次用饱和氯化铵溶液、水、食盐水洗涤,干燥,浓缩至干,所得残渣用硅胶柱层析分离得到化合物12;

[0029] 9) 向含5.1g化合物12的四氢呋喃溶液25mL和甲醇25mL的溶液中加入10%钨碳催化剂700mg,在氢气氛围下,该体系35℃搅拌反应72h;硅藻土过滤,滤液浓缩至干得到化合物13;

[0030] 10) 将4.5g化合物13溶解在30mL四氢呋喃和50mL甲醇中,向其中加入20mL水和500mg NaOH,30℃搅拌5h,浓缩至干,用1M盐酸酸化至pH<2;该体系用乙酸乙酯提取两次,合并有机相,依次用水、食盐水洗涤,浓缩至干,最后用反相色谱柱分离得到的产物,即为抗凝血鼠药半抗原。

[0031] 本发明抗凝血鼠药半抗原合成路线见图1。

[0032] 第三方面,本发明提供抗凝血鼠药人工抗原,是由所述抗凝血鼠药半抗原与载体蛋白偶联后得到。所述抗凝血鼠药人工抗原可以作为免疫原也可以作为包被原。

[0033] 其中,所述载体蛋白选自牛血清白蛋白、卵清蛋白、钥孔血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人

血清白蛋白;优选牛血清白蛋白、钥孔血蓝蛋白。

[0034] 第四方面,本发明提供所述人工抗原的制备方法,采用活化酯法(Active ester method,NHS)将载体蛋白偶联于所述抗凝血鼠药半抗原的羧基碳上。

[0035] 可选地,式(I)所示化合物与载体蛋白的偶联摩尔比为12:1。

[0036] 第五方面,本发明提供由所述抗凝血鼠药人工抗原制备的特异性抗体,包括多克隆抗体和单克隆抗体,优选多克隆抗体。所述多克隆抗体可通过抗凝血鼠药人工抗原免疫实验动物(如小鼠),收集血清纯化获得。

[0037] 第六方面,本发明提供所述抗凝血鼠药半抗原或所述抗凝血鼠药人工抗原的以下任一应用:

[0038] ①在制备抗抗凝血鼠药特异性抗体中的应用;

[0039] ②在检测抗抗凝血鼠药特异性抗体中的应用。

[0040] 第七方面,本发明提供由所述特异性抗体制备的抗凝血鼠药检测试剂或试剂盒。

[0041] 第八方面,本发明提供所述特异性抗体的以下任一应用:

[0042] (1)在检测抗凝血鼠药中的应用;

[0043] (2)在制备抗凝血鼠药的免疫层析试纸条中的应用;

[0044] (3)在制备抗凝血鼠药的胶体金检测试纸条中的应用。

[0045] 优选地,所述抗凝血鼠药包括但不限于鼠得克、氯敌鼠、氯华法林、敌鼠、氟鼠灵、溴敌隆、杀鼠醚、华法林。

[0046] 本发明所述人工抗原分为免疫原和包被原,免疫原可以是AR-KLH,包被原可以是AR-BSA。

[0047] 在本发明的一个具体实施方式中,免疫Balb/c小鼠的方法为:免疫原用等体积的弗氏完全佐剂乳化后首次免疫6周龄Balb/c小鼠,再用相同剂量的免疫原与等体积的弗氏不完全佐剂乳化后对首次免疫的Balb/c小鼠进行加强免疫。

[0048] 其中,所述首次免疫的所述免疫原的剂量为0.1mg/只,乳化后每只Balb/c小鼠的免疫剂量为0.2ml/只。

[0049] 上述加强免疫次数为2次。

[0050] 上述加强免疫具体为在每次免疫后3周各进行一次加强免疫。

[0051] 所述小鼠抗血清即为鼠源多克隆抗体,在第二次加强免疫一周后,眼球静脉采血分离获得血清。

[0052] 所述分析测定方法为酶联免疫吸附测定法(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)。

[0053] 所述ELISA检测方法,包括:间接ELISA法,检测抗凝血鼠药抗体血清效价;间接竞争ELISA法,测定抗体的半数抑制浓度(IC₅₀)和特异性。

[0054] 借由上述技术方案,本发明至少具有下列优点及有益效果:

[0055] (一)本发明首次公开了一种新型的抗凝血鼠药半抗原、人工抗原及其制备方法,用所述抗凝血鼠药人工抗原免疫动物,可得到效价高,灵敏度高的特异性抗体。本发明提供的抗凝血鼠药半抗原及其制备的抗体,为建立快速、简便、价廉、灵敏、特异的抗凝血鼠药检测方法提供了新手段。

[0056] (二)本发明提供的抗凝血鼠药半抗原是利用从头合成的多步化学合成法,在保留

抗凝血剂鼠药的公共母核结构的条件下,合成一种间隔臂为6个碳原子、活泼基团为羧基的半抗原,为抗凝血剂鼠药抗体的制备及免疫分析方法的建立奠定基础。

[0057] (三)利用本发明抗凝血鼠药半抗原制备的完全抗原和抗凝血鼠药多克隆抗体,为生物样本中抗凝血剂鼠药的检测提供有效的检测手段。本发明中,筛选到性质最优抗体,其效价最高可达 2.7×10^4 ,间接竞争ELISA方法对鼠得克的灵敏度(IC_{50})为1.1ng/mL。可以同时识别鼠得克、氯敌鼠、氯华法林、敌鼠、氟鼠灵、溴敌隆、杀鼠醚和华法林等8种抗凝血鼠药,且对这8种抗凝血鼠药的 IC_{50} 均小于7ng/mL。

[0058] (四)利用本发明提供的抗凝血鼠药半抗原制备的抗凝血鼠药多克隆抗体具有灵敏度高,可识别多种抗凝血鼠药,实用价值高等独特优点,在公共卫生安全事件的生物样本检测中具有良好的应用前景。

附图说明

[0059] 图1为本发明实施例1中式(I)所示抗凝血鼠药半抗原制备的流程图。

[0060] 图2为本发明实施例1中抗凝血鼠药半抗原氢谱图。

[0061] 图3为本发明实施例1中抗凝血鼠药半抗原碳谱图。

[0062] 图4为本发明实施例3中利用抗血清AR-3#检测抗凝血鼠药的标准曲线图。

具体实施方式

[0063] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段,所用原料均为市售商品。

[0064] 以下实施例中使用的鼠得克、氯华法林、华法林、克灭鼠、杀鼠醚、溴敌隆、大隆、氟鼠灵、噻鼠隆、敌鼠、氯敌鼠和氯鼠酮等标准品均购自百灵威科技公司。

[0065] 化学试剂二甲基亚砜、苄基溴化镁、氯化铵、乙酸乙酯、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、碳酸钾、硫酸镁、乙醇等购自国药集团。

[0066] 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、Proclin 300生物防腐剂、偶联剂N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)等均购自Sigma公司。

[0067] 钥孔血蓝蛋白(Keyhole Limpet Hemocyanin, KLH),牛血清白蛋白(Albumin from bovine serum, BSA),胎牛血清均购自Sigma公司。

[0068] 羊抗鼠IgG酶标抗体购自Jackson Immunoresearch。

[0069] 96孔酶标板购自Costar公司。

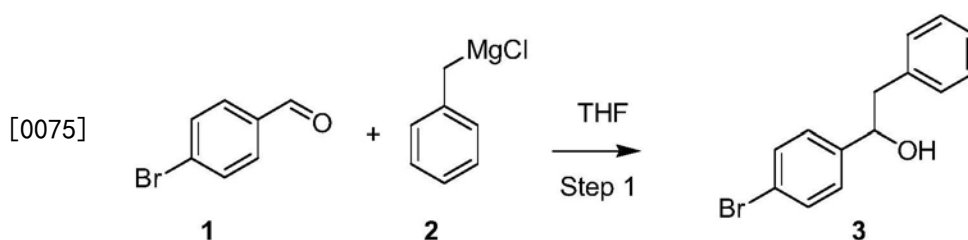
[0070] Balb/c小鼠购自北京维通利华。

[0071] 柱层析所用固定相均为200-300目的硅胶。反相色谱柱为Hamilton反相液相色谱柱(C18柱),规格:PRP-h1 79256。

[0072] 实施例1抗凝血鼠药半抗原的制备和鉴定

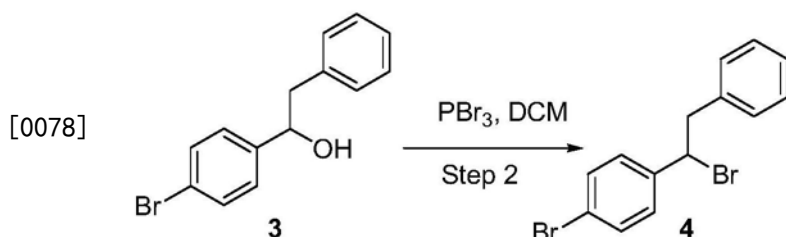
[0073] 一、抗凝血鼠药半抗原的制备

[0074] 第一步:1-(4-溴苯基)-2-苯基乙醇(中间体3)的合成



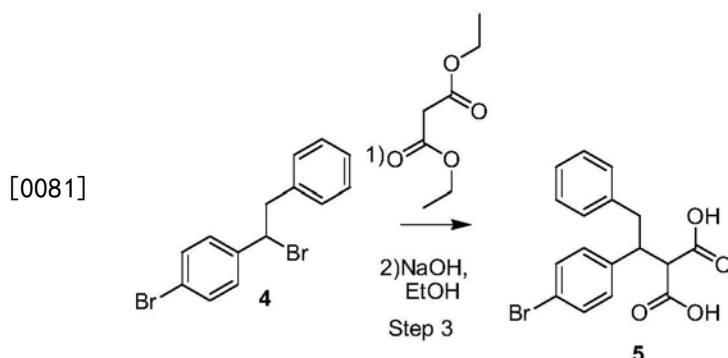
[0076] 在氮气气氛下, 苄基氯化镁 (1M, 316mL) 溶液用四氢呋喃 (THF, 170mL) 稀释冷却到 -15°C 。往该溶液中, 在1h内加入4-溴苯甲醛 (45.1g) 的THF (100mL) 溶液。该体系在 -10°C 搅拌1h, 用饱和氯化铵溶液淬灭。该体系用水稀释, 乙酸乙酯萃取三次。合并有机相依次用水洗, 食盐水洗, 无水硫酸钠干燥, 过滤。滤液浓缩后得到黄色油状物 (80.0g) 为化合物3, 该油状物用于接下来的反应中。

[0077] 第二步: 1-溴-4-(1-溴-2-苯基乙基)-苯 (中间体4) 的合成



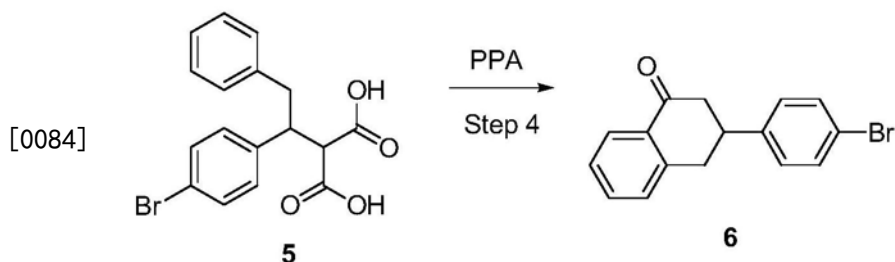
[0079] 向冰盐浴的中间体3 (80.0g) 的二氯甲烷 (DCM, 450mL) 溶液中, 在30min内加入三溴化磷 (PBr_3 , 11.4mL)。该混合物在 $0-5^{\circ}\text{C}$ 搅拌2h, 用冰水淬灭。该混合物用DCM提取三次。合并有机相后依次用水, 食盐水, 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤。滤液浓缩后得到黄色油状物为中间体4 (97.7g)。该油状物用于下面的反应中。

[0080] 第三步: 2-(1-(4-溴苯基)-2-苯乙基) 丙二酸 (中间体5) 的合成



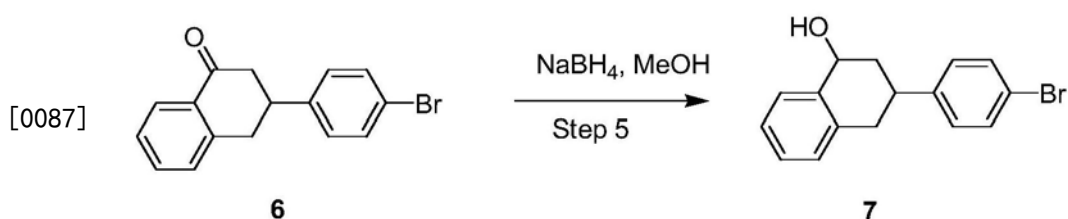
[0082] 在氮气氛围下, 向冰水浴的氢氧化钠 (60%在矿物油中, 12.661g) 的DMF (500mL) 悬浮液体中依次加入丙二酸二乙酯 (48mL) 和中间体4 (97.7g)。反应混合物加热到 90°C 反应16h。冷却到室温, 用饱和氯化铵溶液淬灭, 用水稀释, 乙酸乙酯提取三次。合并有机相, 依次用水洗, 食盐水洗, 无水硫酸钠干燥, 过滤。滤液浓缩得到黄色油状物 (156.0g)。该油状物溶解在乙醇中 (600mL), 往其中加入水 (300mL) 和NaOH (59.5g)。该体系在 90°C 加热23h。冷却到室温。浅黄色固体析出, 过滤弃掉固体。减压浓缩滤液, 得到残渣, 该残渣用水打浆, 用甲基叔丁基醚洗涤。水相用3M HCl酸化到 $\text{pH}<3$, 乙酸乙酯提取两次。合并有机相, 依次用水, 食盐水洗涤。过滤, 干燥, 获得浓缩至干的残留物。该残留物用石油醚打浆后得到浅黄色固体为产物中间体5 (41.6g; 总收率47%)。

[0083] 第四步: 3-(4-溴苯基)-3,4-二氢-2H-萘-1-酮 (中间体6) 的合成



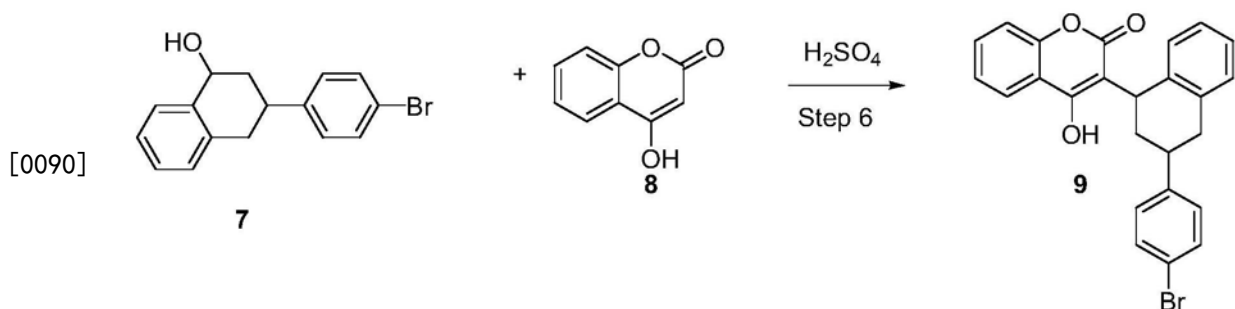
[0085] 向加热到140℃的多聚磷酸(270.0g)中,在1h内加入中间体5(41.5g)。反应体系加热到170℃搅拌1h。体系冷却到80-90℃。加入甲苯(400mL),小心加入水(550mL)来淬灭。分离甲苯层,水层用乙酸乙酯来萃取两次。合并有机相,用水和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤浓缩至干。得到的残留物在二氯甲烷:石油醚(DCM/PE=1:3,v/v)中重结晶得到产物中间体6,为黄色固体(21.9g;收率:63.6%)。

[0086] 第五步:3-(4-溴苯基)-1,2,3,4-四氢-萘-1-醇(中间体7)的合成



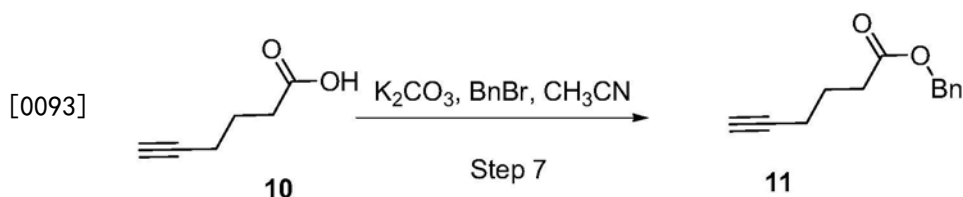
[0088] 中间体6(13.5g)溶解在THF(100mL)和乙酸乙酯(EtOAc,200mL)中,在0℃下向其中加入NaBH₄(3.392g)。反应体系升温到室温搅拌16h。氯化铵淬灭反应。浓缩,用水稀释,DCM萃取两次。合并后的有机相用饱和的碳酸氢钠洗涤,水,食盐水洗涤,干燥浓缩。得到的固体用DCM/PE(DCM/PE=1:3,v/v)重结晶得到白色固体产物中间体7(11.5g;收率:85%)。

[0089] 第六步:3-(3-(4-溴苯基)-1,2,3,4-四氢萘-1-基)-4-羟基-2H-色原-2-酮(中间体9)的合成



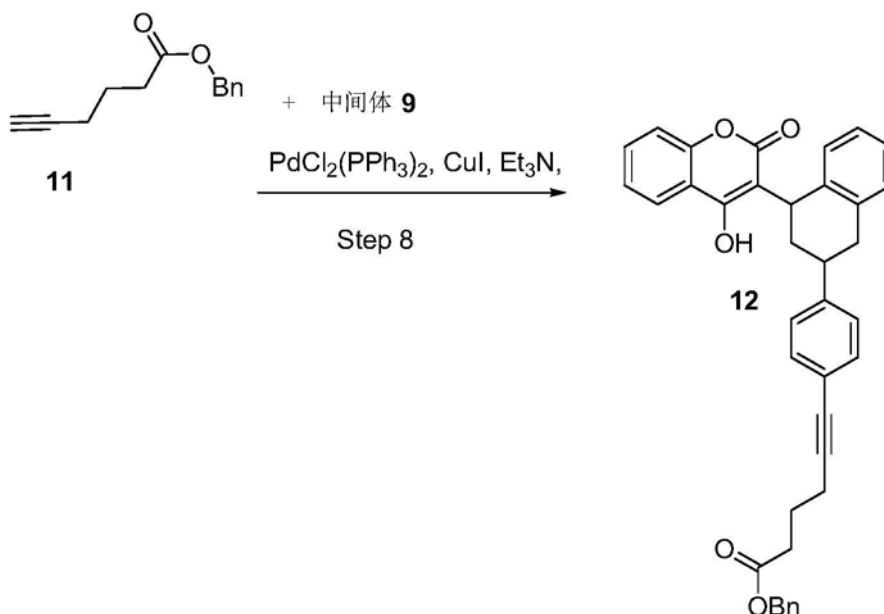
[0091] 向中间体7(5.0g)的甲苯(100mL)溶液中加入对甲苯磺酸(625mg)和4-羟基香豆素(4.010g)。加热回流42℃。浓缩后,向残渣中加入水,乙酸乙酯萃取两次。合并后的有机相依次用饱和碳酸氢钠洗,水洗,食盐水洗,干燥,过滤浓缩至干。残渣用石油醚打浆得到灰黄色固体产品中间体9(5.5g,收率:75%)。

[0092] 第七步:5-炔基己酸苄酯(中间体11)的合成



[0094] 向5-炔基己酸 (4.5g) 的DMF (50mL) 溶液中加入碳酸钾 (11.093g) 和溴苄 (10.296g)。该体系室温搅拌反应16h。该体系用水稀释, 乙酸乙酯萃取两次。合并后的有机相依次用水洗涤三次, 食盐水洗涤一次, 干燥过滤。浓缩至干。残渣过硅胶柱层析分离 (流动相PE:EtOAc=10:1, v/v) 的黄色油状液体为产品中间体11。(7.0g; 收率:86%)。

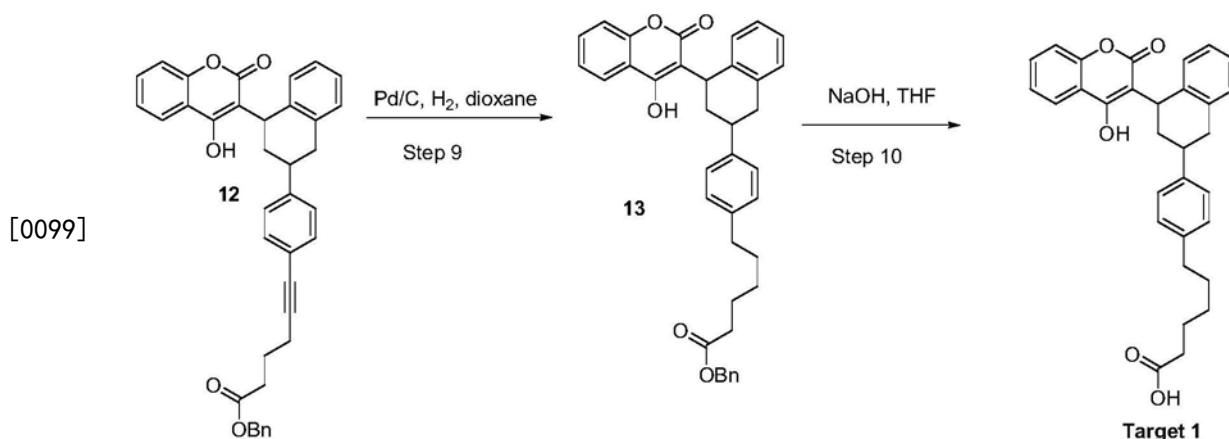
[0095] 第八步:6-(4-(4-(4-羟基-2-氧代-2H-色原-3-基)-1,2,3,4-四-氢萘-2-基苯基)5-炔基己酸苄酯(中间体12)的合成



[0096]

[0097] 在氮气气氛下, 向反应瓶中分别加入中间体9 (3.8g), $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (299mg), CuI (82mg), 然后依次注射加入二异丙基胺 (30mL) 和中间体11 (3.438g)。该体系加热到80°C 搅拌反应23h。冷却至室温, 浓缩。残渣用乙酸乙酯稀释, 硅藻土过滤。有机相依次用饱和氯化铵洗涤, 水洗, 食盐水洗, 干燥, 浓缩至干。残渣过硅胶柱层析分离得到深红色油状物中间体12 (5.1g)。

[0098] 第九步和第十步: 目标产物 (Target 1) 的合成



[0099]

[0100] 向中间体12 (5.1g) 的THF (25mL) 和甲醇 (MeOH, 25mL) 的溶液中加入10% Pd/C (700mg), 在氢气氛围下, 该体系35°C 搅拌反应72h。硅藻土过滤, 滤液浓缩至干得黄色油状物中间体13 (4.5g)。该中间体溶解在THF (30mL) 和MeOH (50mL), 向其中加入水 (20mL) 和NaOH (500mg)。30°C 搅拌5h。浓缩至几乎干燥, 用1M盐酸酸化至pH<2。该体系用乙酸乙酯提取两

次,水洗,食盐水洗,干燥,浓缩至干。反相色谱柱分离得到的浅黄色固体(1.210g;产率:28%)即为目标产物(抗凝血鼠药半抗原,Target 1)。合成路径图见图1。

[0101] 二、抗凝血鼠药半抗原的鉴定

[0102] 用核磁对纯化后的半抗原进行鉴定,¹H NMR (500MHz DMSO-d₆): δ 1.20-1.31 (m, 3H), 1.52-1.57 (m, 4H), 1.99-2.21 (m, 4.5H), 2.35-2.55 (m, 1.5H), 2.96-2.98 (m, 2H), 3.03-3.06 (m, 0.5H), 4.01-4.05 (q, J=6.0Hz, 0.5H), 4.38 (t, J=7.5Hz 0.5H), 4.73-4.77 (m, 0.5H), 6.68-6.88 (m, 1H), 7.00-7.16 (m, 7H), 7.36-7.38 (m, 2H), 7.61-7.62 (m, 1H), 7.97-8.04 (m, 1H)。抗凝血鼠药半抗原氢谱图见图2。

[0103] ¹³C NMR (125MHz, DMSO-d₆): δ 24.23, 28.14, 30.60, 31.70, 31.73, 31.75, 33.52, 34.10, 34.50, 34.53, 34.87, 35.95, 36.26, 37.85, 108.22, 109.39, 116.06, 116.14, 123.11, 123.60, 123.67, 125.08, 125.24, 125.51, 125.80, 126.38, 126.42, 126.78, 127.99, 128.22, 128.28, 128.53, 131.62, 136.44, 136.51, 138.21, 139.46, 139.84, 142.37, 143.17, 152.03, 160.55, 174.30。抗凝血鼠药半抗原碳谱图见图3。

[0104] 核磁数据表明抗凝血剂鼠药半抗原(Target 1)合成成功,可以用于抗体的制备。

[0105] 实施例2抗凝血鼠药人工抗原的制备

[0106] 称取实施例1制备的抗凝血鼠药半抗原10mg,溶解于300 μ L DMF中,得到半抗原溶液。再向制备的半抗原溶液中加入12mg EDC和8mg NHS,置于磁力搅拌器上,400rpm室温反应6h。将反应后的溶液离心(4000rpm),取上清(250 μ L)。取60mg BSA和20mg KLH,分别溶于15mL含10%(体积百分含量)DMF的PBS缓冲液和10mL含5%(体积百分含量)DMF的PBS缓冲液中,得到两种蛋白溶液。向两种蛋白溶液中滴加各50 μ L上述上清液,置于磁力搅拌器反应7h,即可获得半抗原与载体蛋白的偶联物(人工抗原)。将上述所制备的蛋白偶联物转移到截留分子量为7KDa的透析袋中,然后将透析袋置于PBS缓冲液中4 $^{\circ}$ C透析2天。取出透析后的人工抗原分装保存。其中,KLH与半抗原的偶联物命名为AR-KLH,BSA与半抗原的偶联物命名为AR-BSA。

[0107] 实施例3抗凝血鼠药多克隆抗体的制备和鉴定

[0108] 一、抗凝血鼠药多克隆抗体的制备

[0109] 将实施例2制备的AR-KLH作为免疫原免疫小鼠,将AR-BSA作为包被原作为抗血清检测的包被原。用Bradford法测定AR-KLH和AR-BSA的浓度,经测定可得AR-KLH和AR-BSA的浓度分别为3.5mg/mL和1.5mg/mL。

[0110] 首次免疫时将AR-KLH免疫原稀释至1mg/mL(用0.01mol/L PBS稀释),取稀释后的免疫原与弗氏完全佐剂等体积混合,并充分乳化,颈背部皮下多点接种6周龄Ba1b/c小鼠(4只),接种免疫原剂量为100 μ g/只,注射剂量为0.2ml/只。之后,每隔3周加强免疫一次,加强免疫时将免疫原与等体积的弗氏不完全佐剂乳化。免疫原的免疫剂量与首次免疫剂量相同,加强免疫次数为2次。

[0111] 二、小鼠多克隆抗体的检测

[0112] 在第2次加强免疫完成一周后对小鼠眼球采血,3000rpm离心共获得4种抗血清(即多克隆抗体),抗血清分别命名按照1#小鼠的抗血清为AR-1#,2#小鼠的抗血清为AR-2#的规律进行命名。用经典棋盘法测抗血清效价以及用间接竞争ELISA法测抗血清灵敏度。

[0113] 1、抗血清效价的测定

[0114] 用间接ELISA法对抗体效价进行检测。间接ELISA法步骤如下：

[0115] (1) 包被：用0.05M的碳酸盐缓冲液 (pH 9.6) 将包被原AR-BSA稀释成0.25 μ g/mL，并加入96孔透明酶标板中 (100 μ L/孔)，37 $^{\circ}$ C温箱孵育2h，用PBST缓冲液洗板3次。

[0116] (2) 封闭：加入封闭液 (2%脱脂牛奶) 150 μ L/孔，37 $^{\circ}$ C温箱孵育1h，弃封闭液，用PBST缓冲液洗涤1次，拍干。

[0117] (3) 加待测抗体：各列孔加入50 μ L 0.01M PBS (pH7.4)，再加入50 μ L稀释后的抗凝血鼠药多克隆抗体，抗体从1:1000开始，以3倍为梯度用0.01M PBS开始稀释，一共稀释8个梯度。加样量为每孔50 μ L，37 $^{\circ}$ C温箱反应30min，PBST缓冲液洗涤3次，拍干。

[0118] 同时设置未经免疫的小鼠抗血清作为阴性对照。

[0119] (4) 加酶标二抗：加入用酶标二抗稀释液按照体积比1:5000稀释的HRP标记羊抗鼠IgG抗体，100 μ L/孔，37 $^{\circ}$ C温箱反应30min，PBST缓冲液洗涤3次，拍干。

[0120] (5) 显色：将辣根过氧化物酶底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺溶液和质量分数为30%的过氧化氢按照1:1的体积比混合，加入微孔板中 (100 μ L/孔)，37 $^{\circ}$ C温箱显色15min。

[0121] (6) 终止：每孔加入50 μ L 2mol/L的浓硫酸。

[0122] (7) 读数：以OD₄₅₀波长测定各孔OD值。以阴性OD值不大于0.15，以最大OD值在1.5-1.8之间对应的抗体稀释度为抗体效价。抗血清的最佳稀释度见表1，由表中数据可知，所有抗血清的稀释度均在 0.9×10^4 以上，说明用合成的半抗原偶联载体蛋白去免疫小鼠，可以获得较好的免疫效果。其中抗血清AR-1#的效价最高，为 2.7×10^4 。

[0123] 2、多克隆抗体IC₅₀和特异性的测定

[0124] (1) 包被、封闭过程同上。

[0125] (2) 加标准品和抗体：每孔加入50 μ L鼠得克标准品溶液和50 μ L抗体稀释液 (按照表1中的抗体效价进行稀释)，37 $^{\circ}$ C孵育30min，然后用PBST溶液洗涤3次，拍干。标准品溶液的溶剂为PBS缓冲液，鼠得克，敌鼠，氯华法林和氯敌鼠的标准品浓度设定为0,0.033,0.1,0.3,0.9,2.7,8.1和24.3ng/mL，其余抗凝血剂鼠药的标准品浓度设定为0,1,3,9,27,81,243,729ng/mL，每个浓度三个平行。

[0126] 表1抗血清稀释度表

抗血清编号	包被原浓度	抗体稀释度(10^4)
AR-1#	0.25 μ g/mL	2.7
AR-2#		0.9
AR-3#		0.9
AR-4#		0.9

[0128] (3) 加酶标二抗，显色，终止及读数过程同上。

[0129] 将所测得的数据以 $-\log_{10}$ (竞争物) 值为横坐标，以OD₄₅₀值为纵坐标，利用Origin8.0的四参数方程进行拟合，建立标准曲线获得IC₅₀值。并根据IC₅₀值计算抗体的交叉反应率 (CR)，具体计算公式为：CR (%) = IC₅₀ (鼠得克) / IC₅₀ (结构类似物) \times 100%。结果显示AR-1#的灵敏度最高，对鼠得克的IC₅₀为1.1ng/mL (图4)。AR-1#可以同时识别鼠得克、氯敌鼠、氯华法林、敌鼠、氟鼠灵、溴敌隆、杀鼠醚和华法林等8种抗凝血鼠药，且对这8种抗凝血鼠药的IC₅₀均小于7ng/mL (表2)。结果表明，本发明中所设计的抗凝血剂半抗原结构作为抗原决定簇，可以很好地刺激小鼠产生具有广谱识别性的抗体。

[0130] 表2抗血清AR-1#的交叉反应率表

[0131]	抗凝血剂类鼠药	AR-1#	
		IC ₅₀ (ng/mL)	CR (%)
	鼠得克	1.1	100
	氯敌鼠	0.19	578
	氯华法林	0.5	220
	敌鼠	0.61	180
	氟鼠灵	5	22
	溴敌隆	5.35	21
[0132]	杀鼠醚	6.1	6.1
	华法林	6.15	6.15
	大隆	20	20
	克灭鼠	28	28
	噻鼠灵	44	2.5
	杀鼠酮	200	0.6

[0133] AR-1#对鼠得克的线性检测范围(IC₂₀-IC₈₀)为0.2-2.1ng/mL。IC₅₀=1.1ng/mL。

[0134] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之做一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

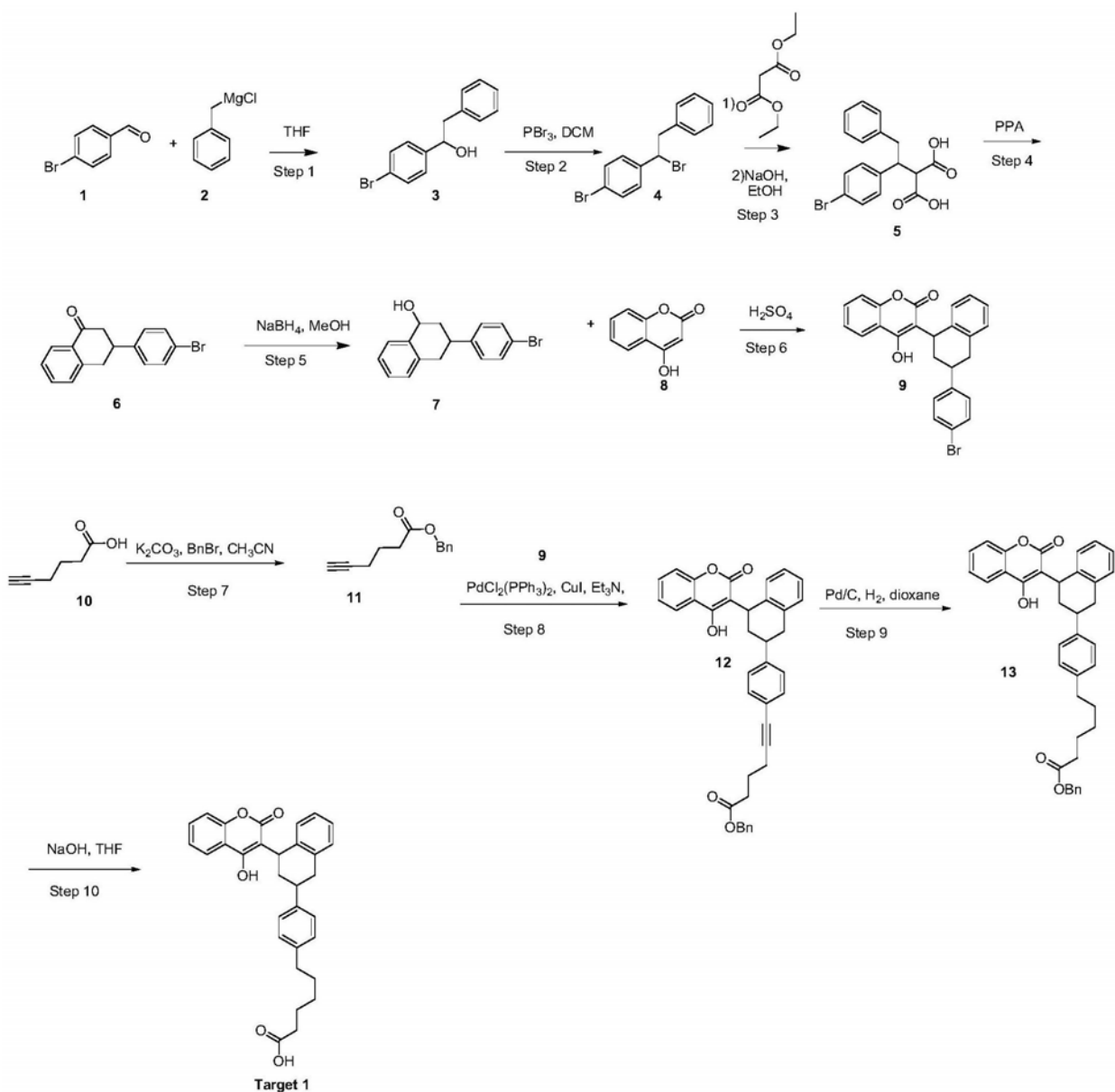


图1

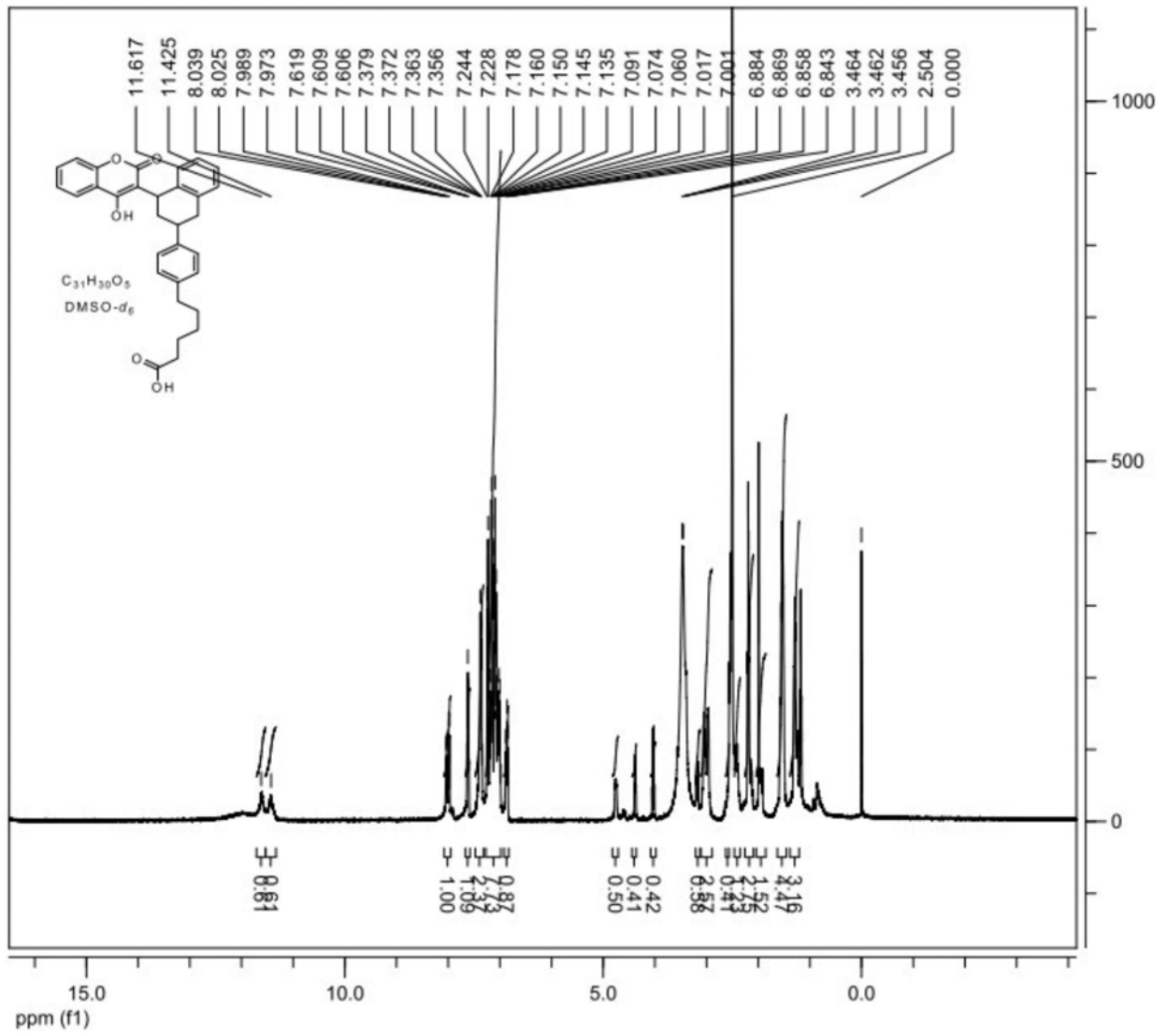


图2

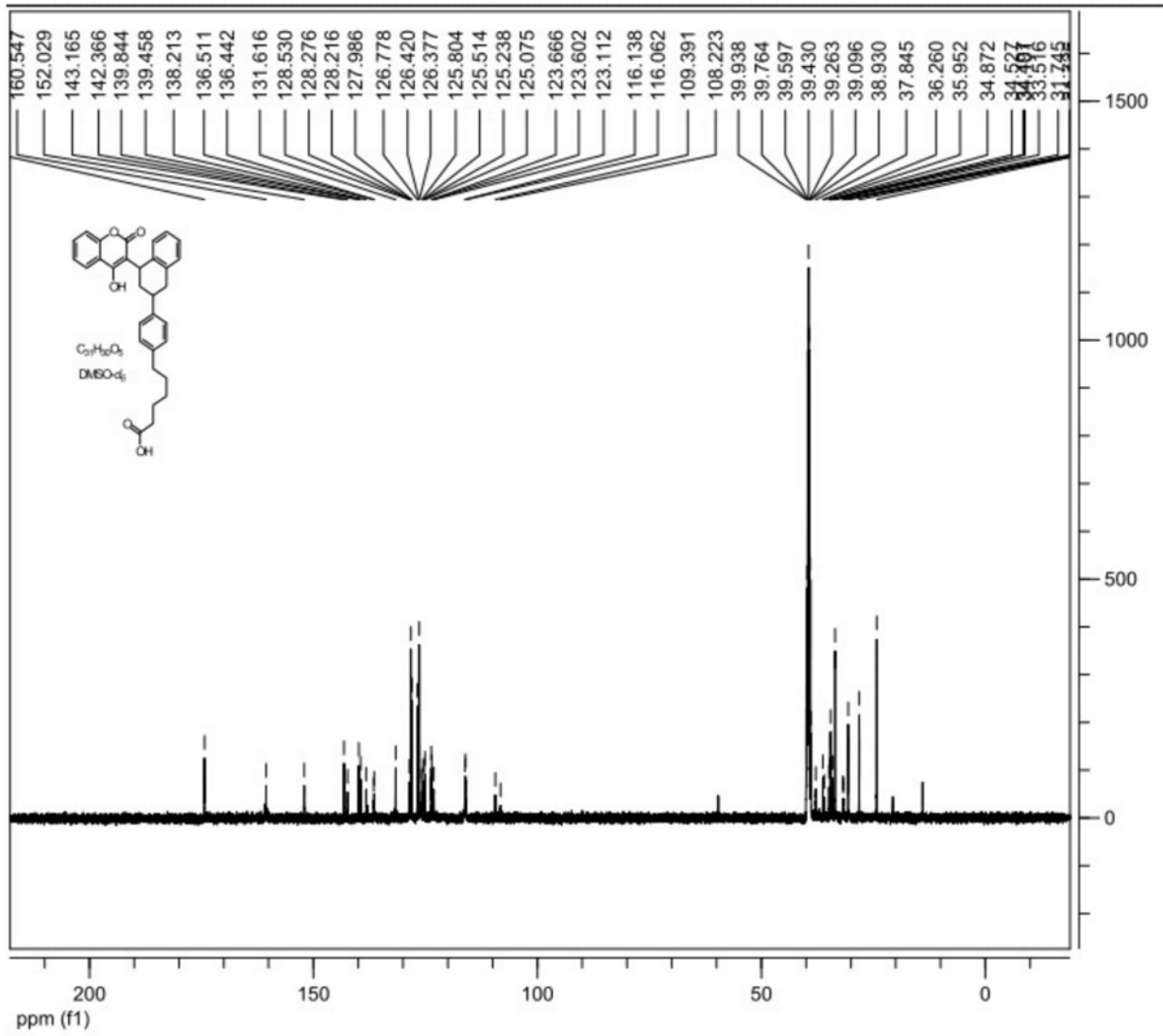


图3

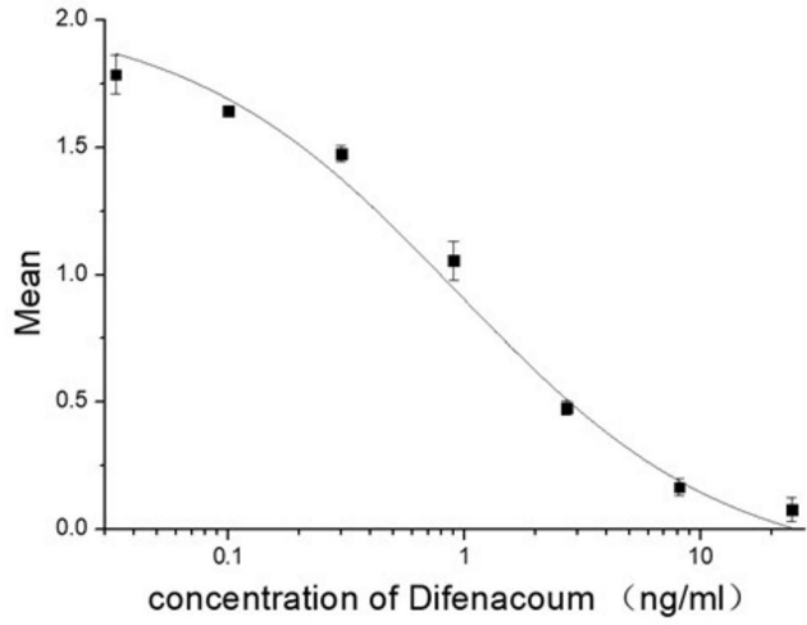
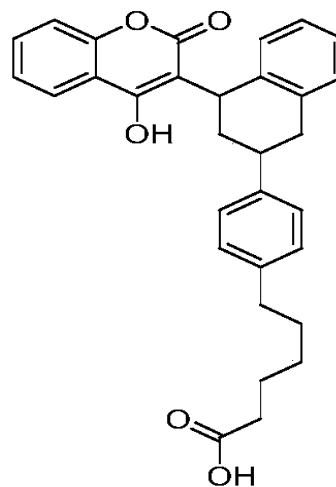


图4

专利名称(译)	抗凝血鼠药半抗原和人工抗原及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN109897025A	公开(公告)日	2019-06-18
申请号	CN201910152728.9	申请日	2019-02-28
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	王战辉 沈建忠 温凯 江海洋 于雪芝 余文博 李红芳 史为民		
发明人	王战辉 沈建忠 温凯 江海洋 于雪芝 余文博 李红芳 段长飞 史为民		
IPC分类号	C07D311/56 C07K14/47 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 G01N33/53		
代理人(译)	王文君 陈征		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及抗凝血鼠药半抗原和人工抗原及其制备方法与应用。所述抗凝血鼠药半抗原的结构如式(I)所示：所述抗凝血鼠药人工抗原是由式(I)所示半抗原与载体蛋白偶联得到。利用所述抗凝血鼠药人工抗原免疫动物，可得到效价高，灵敏度高的特异性抗体。本发明提供的抗凝血鼠药半抗原及其制备的抗体，为建立快速、简便、价廉、灵敏、特异的抗凝血鼠药检测方法提供了新手段。



式(I)。