



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104311438 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 28

(21) 申请号 201410471148. 3

(22) 申请日 2014. 09. 16

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO: C2014127 2014. 06. 19

(71) 申请人 苏州大学

地址 215123 江苏省苏州市苏州工业园区仁
爱路 199 号

(72) 发明人 乔春华 吴康 许芸芸

(74) 专利代理机构 北京万慧达知识产权代理有
限公司 11111

代理人 张金芝 杨颖

(51) Int. Cl.

C07C 229/34 (2006. 01)

C07C 227/18 (2006. 01)

C07K 14/765 (2006. 01)

C07K 16/44 (2006. 01)

G01N 33/577 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

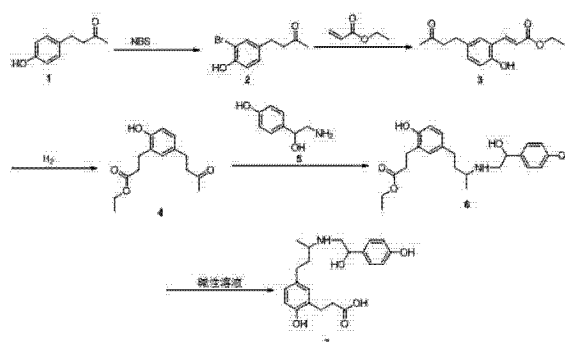
权利要求书2页 说明书14页 附图3页

(54) 发明名称

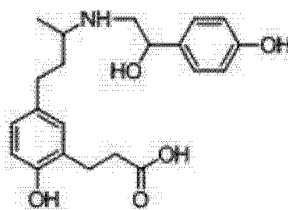
一种莱克多巴胺半抗原、人工抗原、单克隆抗体及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明提出了一种免疫检测技术,具体涉及一种莱克多巴胺半抗原、人工抗原及其制备方法,以及利用该人工抗原免疫小鼠后制备单克隆抗体,所述单克隆抗体由杂交瘤细胞株 12B2 分泌,该杂交瘤细胞保藏在中国典型培养物保藏中心,保藏号 (CCTCC NO): C2014127。利用本发明提供的莱克多巴胺单克隆抗体效价高、灵敏度高、特异性强,可应用于莱克多巴胺药物残留的检测。

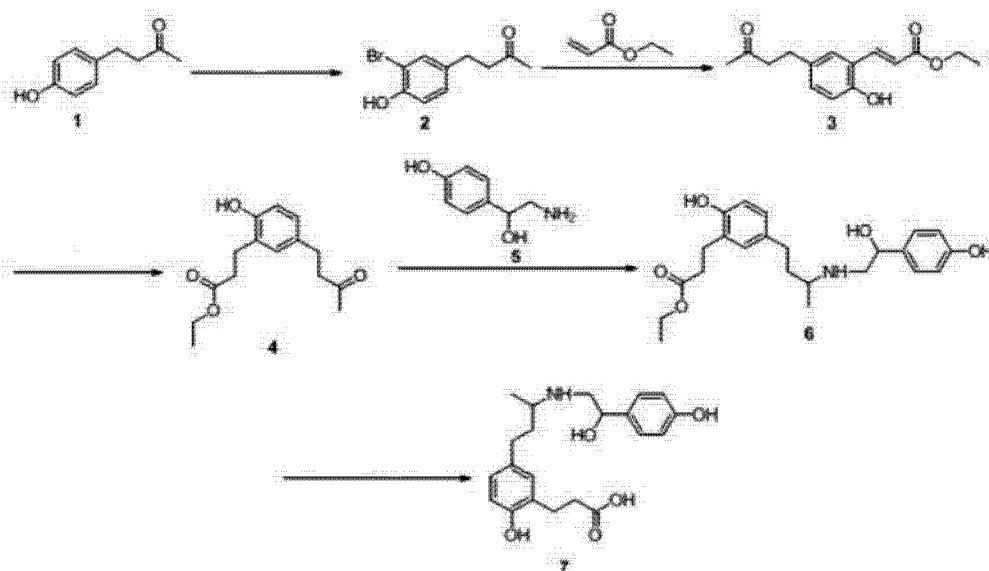


1. 一种莱克多巴胺半抗原,其结构式为下式 I :



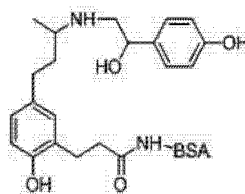
式 I

2. 根据权利要求 1 所述的一种莱克多巴胺半抗原的制备方法,包括如下步骤:化合物 1 通过溴代反应得到中间体 2;所述中间体 2 与丙烯酸乙酯反应得到中间体 3;所述中间体 3 经还原反应得到中间体 4;所述中间体 4 与化合物 5 反应得到中间体 6;所述中间体 6 经水解反应得到所述莱克多巴胺半抗原 7;



3. 根据权利要求 2 所述的一种莱克多巴胺半抗原的制备方法,其特征在于包括如下步骤:(a) 将所述化合物 1 溶于乙腈中,加入 N-溴代丁二酰亚胺,所述化合物 1 与所述 N-溴代丁二酰亚胺的加入量之比为 1:1 ~ 1.5 倍当量,室温下反应 2-4h,得到所述中间体 2;(b) 在所述中间体 2 中加入 [1, 1'-双(二苯基膦基)二茂铁] 二氯化钯,抽换氮气,加入三乙胺、N,N-二甲基甲酰胺和丙烯酸乙酯,再次抽换氮气,90-110℃ 下回流搅拌反应 15-20h,得到所述中间体 3;(c) 在所述中间体 3 中加入甲醇和催化剂 Pd/C,抽换氢气,室温下反应 3-6h,得到所述中间体 4;(d) 将所述中间体 4 溶于甲醇中,加入化合物 5、三乙胺搅拌反应 10-30min,加入三乙氧基硼氢化钠,36-60℃ 下回流搅拌反应 20-30h 后,得到所述中间体 6;(e) 将所述化合物 6 溶于甲醇中,加入 NaOH,50-70℃ 下回流搅拌反应 5-7h,得到所述莱克多巴胺半抗原 RAC-CA。

4. 根据权利要求 1 制备的一种莱克多巴胺人工抗原,其结构式如下式 II :



式 II

5. 根据权利要求 4 所述的一种莱克多巴胺人工抗原的制备方法,其特征在于:将所述莱克多巴胺半抗原与牛血清白蛋白偶联得到所述莱克多巴胺人工抗原。

6. 根据权利要求 4 所述的一种莱克多巴胺人工抗原制备的一种莱克多巴胺单克隆抗体,其特征在于:所述莱克多巴胺单克隆抗体是由杂交瘤细胞株 12B2 分泌,所述杂交瘤细胞保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号 (CCTCC NO) 是 :C2014127。

7. 根据权利要求 1 所述的莱克多巴胺半抗原,或权利要求 4 所述的莱克多巴胺人工抗原在制备所述莱克多巴胺单克隆抗体中的应用。

8. 根据权利要求 1 所述的莱克多巴胺半抗原,或权利要求 4 所述的莱克多巴胺人工抗原在莱克多巴胺定性及定量检测中的应用。

一种莱克多巴胺半抗原、人工抗原、单克隆抗体及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测技术领域,具体涉及一种莱克多巴胺半抗原、人工抗原、单克隆抗体及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 莱克多巴胺(RAC,结构式如图1)又称克伦巴安,是一种含有双苯烷胺类结构的 β -肾上腺素受体激动剂,是一种能够通过与细胞膜上的 β 受体相结合后产生相应生理效应的人工合成的天然儿茶酚胺类似物,其作用与肾上腺素和去甲肾上腺素的作用相似,临床上一般用于治疗支气管哮喘、支气管痉挛等疾病,还可用于治疗肌肉萎缩症,增长肌肉,减少脂肪蓄积,并对胎儿和新生儿生长有益。

[0003] 莱克多巴胺用于饲养动物时,能够使动物体内的营养得到再分配,改变动物的营养代谢方式,减少脂肪生成,提高瘦肉率,更能迎合消费者的需求从而能够带来可观的经济效益。但是,如果 β -受体激动剂在动物体内长期蓄积,则会通过食物链对消费者的身体健康造成威胁,严重时会引起心悸、肌肉震颤、恶心呕吐等中毒症状,尤其是对患有心脏病、糖尿病或者高血压的病人身体危害更大。

[0004] 我国农业部在1997年颁布法令严禁使用 β -受体激动剂作为动物饲料添加剂促进动物生长。中华人民共和国工业和信息化部、农业部、商务部、卫生部、国家工商行政管理总局、国家质量监督检验检疫总局联合发布公告,自2011年12月5日起在我国境内禁止生产和销售莱克多巴胺。

[0005] 目前,在美国、加拿大、巴西等24个国家仍允许将莱克多巴胺添加到动物饲料中来促进动物生长和提高瘦肉率,这成为非法使用者为牟取不正当利益的借口。莱克多巴胺仍活跃于市场的另一个重要原因,是目前的检测方法达不到要求。

[0006] 目前莱克多巴胺的检测方法主要是色谱分析方法,其次是免疫分析方法。色谱分析方法虽然比较灵敏,准确度高,但需要大型仪器支持,需要繁琐的样品前处理以及专业的人员操作,不能适应市场对分析方法快速、简便的要求。免疫分析方法虽然快速、简便、特异性强、灵敏度高,不用繁琐的样品前处理、适合现场批量样品的检测等优点,但是酶联免疫试剂盒对检测莱克多巴胺特异性不理想,试剂盒的灵敏度不高,因此制备灵敏度高,特异性强的莱克多巴胺抗体是关键,而解决其问题关键取决于免疫半抗原的分子结构和分泌抗体的细胞系。

[0007] 专利201210177057.X提供了一种莱克多巴胺半抗原、人工抗原的制备方法,虽然半抗原的合成方法简单,纯度和产率较高,但是该半抗原是以莱克多巴胺原料为基础合成的,会增加莱克多巴胺检测的成本。

[0008] 专利CN 102924601B提供了一种莱克多巴胺单克隆抗体的制备方法,其半抗原也是以莱克多巴胺结构为基础进行合成的,不仅生产成本相对高,而且其制备单克隆抗体的灵敏度低。

[0009] 为了解决上述问题,本发明的关键点从基础原料合成莱克多巴胺的类似物作为半抗原,降低检测成本,并且半抗原最大限度上保留莱克多巴胺的原有结构,而优化免疫抗原制备杂交瘤细胞分泌大量的抗体,提高抗体的特异性,灵敏度,增强抗体与抗原的识别能力。

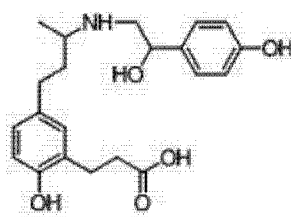
发明内容

[0010] 为了克服现有技术的上述缺陷和不足,本发明的目的在于提供一种莱克多巴胺半抗原、人工抗原、单克隆抗体及其制备方法和应用,利用该方法制备的莱克多巴胺检测单克隆抗体具有效价高、灵敏度高、特异性强、检测成本低廉的特点。

[0011] 本发明主要有以下技术方案实现:

[0012] 一种莱克多巴胺半抗原,其结构式为下式 I:

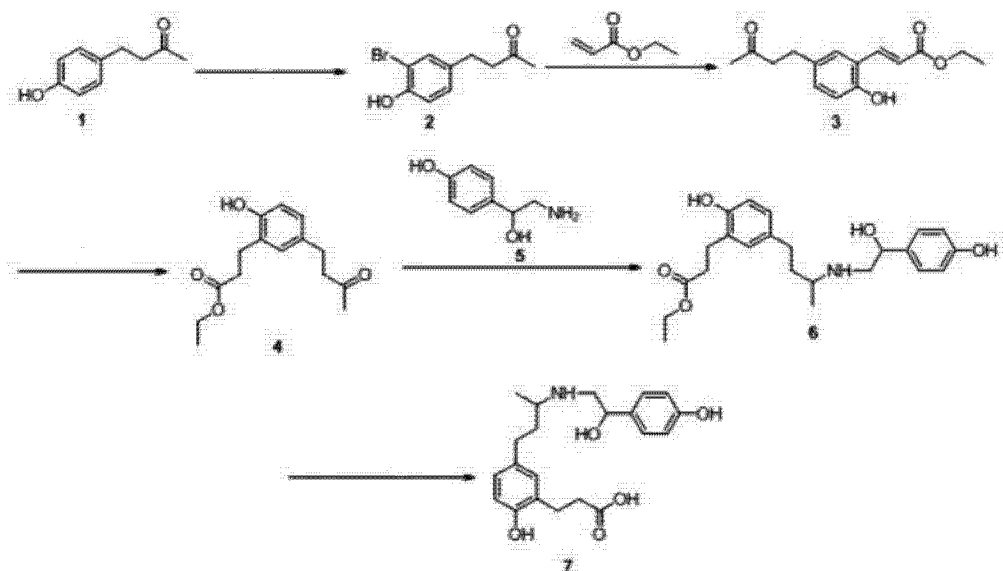
[0013]



式 I

[0014] 一种莱克多巴胺半抗原的制备方法,包括如下步骤:化合物 1 通过溴代反应得到中间体 2;所述中间体 2 与丙烯酸乙酯反应得到中间体 3;所述中间体 3 经还原反应得到中间体 4;所述中间体 4 与化合物 5 反应得到中间体 6;所述中间体 6 经水解反应得到所述莱克多巴胺半抗原 7;

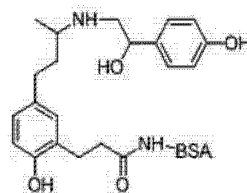
[0015]



[0016] 一种莱克多巴胺半抗原的制备方法,其特征在于包括如下步骤:(a) 将所述化合物 1 溶于乙腈中,加入 N- 溴代丁二酰亚胺,所述化合物 1 与所述 N- 溴代丁二酰亚胺的加入量之比为 1:1 ~ 1.5 倍当量,室温下反应 2-4h,得到所述中间体 2;(b) 在所述中间体 2 中加入 [1, 1'- 双(二苯基膦基)二茂铁] 二氯化钯,抽换氮气,加入三乙胺、N, N- 二甲基甲酰胺和丙烯酸乙酯,再次抽换氮气,90-110℃ 下回流搅拌反应 15-20h,得到所述中间体 3;(c) 在所述中间体 3 中加入甲醇和催化剂 Pd/C,抽换氢气,室温下反应 3-6h,得到所述中间体 4;(d) 将所述中间体 4 溶于甲醇中,加入化合物 5、三乙胺搅拌反应 10-30min,加入三乙氧基硼氢钠,36-60℃ 下回流搅拌反应 20-30h 后,得到所述中间体 6;(e) 将所述化合物 6 溶于甲醇中,加入 NaOH,50-70℃ 下回流搅拌反应 5-7h,得到所述莱克多巴胺半抗原 RAC-CA。

[0017] 一种莱克多巴胺人工抗原,其结构式如下式 II:

[0018]



式 II

[0019] 一种莱克多巴胺人工抗原的制备方法,其特征在于:将所述莱克多巴胺半抗原与牛血清白蛋白偶联得到所述莱克多巴胺人工抗原。

[0020] 一种莱克多巴胺人工抗原制备的一种莱克多巴胺单克隆抗体,其特征在于:所述莱克多巴胺单克隆抗体是由杂交瘤细胞株 12B2 分泌,所述杂交瘤细胞保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号 (CCTCC NO) 是:C2014127。

[0021] 由以上细胞株 12B2 分泌的单克隆抗体,制备方法包括以下步骤:

[0022] A. 合成莱克多巴胺半抗原 RAC-CA 作为半抗原;

[0023] B. 将半抗原 RAC-CA 与牛血清白蛋白偶联制备免疫抗原 RAC-CA-BSA;

[0024] C. 将半抗原 RAC-CA 与卵清白蛋白偶联制备包被抗原 RAC-CA-OVA;

[0025] D. 动物免疫注射:以 6-8 周龄雌性 Balb/C 鼠作为免疫动物,腹腔、皮下交替注射免疫抗原进行免疫,腹腔注射加强免疫;

[0026] E. 筛选动物免疫血清:用间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 实验检测免疫鼠血清,筛选用于细胞融合的受免鼠;

[0027] F. 制备杂交瘤细胞:取小鼠脾脏细胞与 Sp2/0 骨髓瘤细胞进行细胞融合,经过亚克隆获得可稳定分泌抗莱克多巴胺单克隆抗体细胞株 12B2;

[0028] G. 制备腹水:对小鼠腹腔注射杂交瘤细胞 12B2,采集腹水;

[0029] H. 腹水的纯化:将上述采集的腹水进行纯化,制备单克隆抗体,测定抗体效价,竞争 ELISA 方法测定抗体的 IC_{50} 。

[0030] 其中,所述步骤 B 和 C 的具体步骤为:先将 RAC-CA 溶解在 N,N-二甲基甲酰胺中,加入 N-羟基丁二酰亚胺、二环己基碳二亚胺,室温条件下过夜反应形成活化酯,过滤除去反应中产生的固体,再在冰浴条件下慢慢滴加到 BSA/OVA 的 0.01MNaHCO₃ 的溶液中形成偶联物,冰浴下在 PBS 溶液中进行透析。每 4 小时换一次透析液,重复六次。透析完毕,将反应液从透析袋中小心转移至样品瓶中,保鲜膜封好,盖上瓶盖,于 -80℃ 下预冷冻,冷冻干燥得白色固体粉末 RAC-CA-BSA 及 RAC-CA-OV,紫外可见光谱测定偶联比。

[0031] 所述步骤 D 和 E 的具体步骤为每次免疫注射剂量为 100 μ g/只,首次免疫采用腹腔注射,所述 RAC-CA-BSA 与等体积弗式完全佐剂乳化后作为第一次免疫原,所述 RAC-CA-BSA 与弗式不完全佐剂等体积乳化后皮下注射作为第二次和第四次免疫,所述 RAC-CA-BSA 与 1/3 体积的弗式不完全佐剂乳化后腹腔注射作为第三次和第五次免疫,免疫间隔期为三周。所述免疫结束后 7-10 天,用间接 ELISA 实验及间接竞争 ELISA 实验测血清抗体效价,选取所述血清效价高的小鼠进行加强免疫,加强免疫为融合前三天,所述 RAC-CA-BSA 不加佐剂腹腔注射,为 200 μ g/只。

[0032] 所述步骤 F 中,所述加强免疫结束后三天,取接受过加强免疫的小鼠脾脏细胞,以 PEG1500 作为融合剂,与 SP2/0 骨髓瘤细胞按数量比 8:1 进行细胞融合,选取阳性克隆进行亚克隆,得到能够稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0033] 所述步骤 G,按 0.5ml pristone/只腹腔注射 Balb/c 鼠,致敏 7 天后,按 $1-2 \times 10^6$ 杂交瘤细胞/只腹腔注射上述致敏鼠,7-10 天后采集腹水,1000r/min 离心 10min 去除腹水中细胞,取上清,12000r/min 离心 30min 去除腹水中细胞碎片,再取上清,该上清中含有大量莱克多巴胺单克隆抗体蛋白,测 OD₂₈₀ 与 OD₂₆₀ 值初步标定总蛋白含量,一部分用于下一步抗体纯化,其余部分分装 -80° 冻存备用。

[0034] 所述步骤 H,取所述步骤 G 制备的腹水,用冰水浴预冷,0.01M PBS 稀释(一份腹水+三份 0.01M PBS(pH 7.4))后做准备液,按 10mg 腹水总蛋白取 1ml protein G resin 量,将其填充于抗体蛋白亲和层析柱床中,用 resin 50× 体积的预冷 0.01M PBS(pH 7.4) 平衡层析柱。使腹水中单克隆抗体蛋白充分与 protein G 特异性结合,用 50× 体积的预冷 0.01M PBS(pH7.4) 充分洗涤层析柱以去除粘附层析柱中的杂蛋白。

[0035] 于 1.5ml EP 管中预先各加 1.0M Tris-Cl (pH 9.6) 100 μ l, 再将上述处理的层析柱加入冰水预冷 0.1M glycine-HCl (pH 2.7) 进行洗脱, 滤液按 0.9ml/管分部收集于上述处理的 EP 管中, 每管取少许测 OD₂₈₀ 蛋白峰, 合并蛋白峰管, 并将合并液置于透析袋中, 于冰水浴 0.01M PBS (pH 7.4) 中透析过夜。

[0036] 取该处理液少许, 进行间接 ELISA 和游离莱克多巴胺作竞争抗原的间接竞争 ELISA 分析。

[0037] 所述莱克多巴胺半抗原, 或所述莱克多巴胺人工抗原在制备所述莱克多巴胺单克隆抗体中的应用。

[0038] 所述的莱克多巴胺半抗原, 或所述的莱克多巴胺人工抗原在莱克多巴胺定性及定量检测中的应用。

[0039] 本发明的有益效果: 1. 本发明提供的莱克多巴胺半抗原是以对羟基苯丙酸、N-溴代丁二酰亚胺为基础原料合成的, 而不是以莱克多巴胺的结构为基础合成的, 这样不用购置莱克多巴胺原料, 降低合成莱克多巴胺半抗原的成本; 2. 莱克多巴胺半抗原在合成过程中通过 Heck 反应在莱克多巴胺原有结构中苯环酚羟基的邻位引入三个碳原子的羧基链, 保留原莱克多巴胺结构上所有的羟基和胺基, 即最大限度的保留其原有分子结构中的电子分布、分子极性等特点, 使最终获得的莱克多巴胺单克隆抗体具有更高的特异性; 3. 莱克多巴胺单克隆抗体是由杂交瘤细胞株 12B2 分泌的, 具有稳定分泌大量的抗体, 并且实验证明纯化后的莱克多巴胺单克隆抗体 IC₅₀ 值为 0.35ppb, 效价 800000, 提高了莱克多巴胺灵敏度和效价, 交叉反应实验也证明了莱克多巴胺单克隆抗体的特异性强; 4. 合成的莱克多巴胺半抗原和莱克多巴胺人工抗原能够在莱克多巴胺定性、定量检测中得到应用并且在制备莱克多巴胺产品中得到应用。

附图说明

[0040] 图 1 为莱克多巴胺结构式;

[0041] 图 2 为实施例 1 的莱克多巴胺半抗原的制备;

[0042] 图 3 为实施例 1 的莱克多巴胺人工抗原与包被抗原的制备与检测;

[0043] 图 4 为实施例 1 的 RAC-CA-BSA 偶联物、RAC-CA、BSA 的紫外吸收扫描光谱示意图;

[0044] 图 5 为实施例 1 的 RAC-CA-OVA 偶联物、RAC-CA、OVA 的紫外吸收扫描光谱示意图;

[0045] 图 6 为实施例 1 的莱克多巴胺单克隆抗体的 IC₅₀ 测定曲线。

具体实施方式

[0046] 下面结合附图和实施例对本发明做进一步详细的说明。

[0047] 实施例 1

[0048] 一、莱克多巴胺半抗原的制备

[0049] 具体实验步骤为:

[0050] (1) 将化合物 1 (164mg, 1.0mmol, 1.0eq) 溶于 4mL 乙腈中, 搅拌下加入 NBS (N-溴代丁二酰亚胺) (200mg, 1.1mmol, 1.1eq), 室温下搅拌反应 3h。反应完加入 25mL H₂O, EA (乙酸乙酯) (3 $\times$ 10mL) 萃取, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩, 干法柱层析, DCM (二氯甲烷) 为洗脱剂, 常压洗脱, 得到黄色油状物 209mg 即中间体 2。产率: 86%。1H

NMR(400MHz, CDCl_3) δ 7.28(d, $J = 1.5\text{Hz}$, 1H), 7.02(dd, $J = 8.3, 1.6\text{Hz}$, 1H), 6.91(d, $J = 8.3\text{Hz}$, 1H), 5.62(s, 1H), 2.79(d, $J = 6.9\text{Hz}$, 2H), 2.73(d, $J = 7.0\text{Hz}$, 2H), 2.14(s, 3H)。

[0051] (2) 将中间体 2(1.75g, 7.29mmol, 1.0eq) 加入到干燥两口瓶中, 加入 [1, 1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钯(970mg, 1.46mmol, 0.2eq), 抽换 N_2 多次, 用注射器将 TEA(三乙胺)5mL, DMF(N,N-二甲基甲酰胺)29mL 注入两口瓶, 注入丙烯酸乙酯, 再次抽换 N_2 多次, 100°C 下回流搅拌反应 17h, 反应毕, 加 200mL 水稀释, EA(100mL $\times$ 3) 萃取, 合并有机相, 水洗(3 $\times$ 150mL), 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩, 干法柱层析, 洗脱剂体系由 PE:EA 体系转化为 DCM:MeOH 体系。产物为黄色油状物, 置冰箱过夜得到淡黄色固体 887mg 即中间体 3。产率:47%。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 7.97(d, $J = 16.2\text{Hz}$, 1H), 7.04(dd, $J = 8.2, 1.8\text{Hz}$, 1H), 6.83(s, 1H), 6.76(d, $J = 8.3\text{Hz}$, 1H), 6.61(d, $J = 16.1\text{Hz}$, 1H), 4.27(q, $J = 7.1\text{Hz}$, 2H), 2.82(t, $J = 7.0\text{Hz}$, 2H), 2.74(t, $J = 7.1\text{Hz}$, 2H), 2.14(s, 3H), 1.34(t, $J = 7.1\text{Hz}$, 3H)。

[0052] (3) 将中间体 3(100mg, 0.38mmol, 1.0eq) 加入到茄形瓶中, 加入 MeOH3mL, 小心分批少量加入 Pd/C(10%) (30mg, 0.3eq) 抽换 H_2 多次, 室温下反应 4h。反应完, 反应液用硅藻土过滤, MeOH 洗涤滤饼, 减压浓缩, 得粗品 93mg 即中间体 4, 直接投下一步。产率:92%。

[0053] (4) 将中间体 4(1.1g, 4.16mmol, 1.0eq) 溶于 21mL MeOH 中, 加入化合物 5(794mg, 4.16mmol, 1.0eq), TEA(849mg, 8.32mmol, 2.0eq), 搅拌反应 10min, 加入 STAB-H(三乙酰氧基硼氢钠)(3.55g, 12.48mmol, 3.0eq), 刚加入会有大量气泡冒出, 50°C 下回流搅拌反应 24h, 补加 STAB-H(1.18g, 4.16mmol, 1.0eq), 继续搅拌反应过夜, 第二次补 STAB-H(1.18g, 4.16mmol, 1.0eq), 继续搅拌反应 12h, 向反应液中加入 50mL 水, EA(30mL $\times$ 3) 萃取, 合并有机相, 饱和氯化铵水溶液(3 $\times$ 30mL) 洗涤有机相(除 TEA), 将有机相干燥, 减压浓缩, 干法柱层析, 洗脱剂体系:D:M = 20:1-10:1, 得到黄色油状物, DCM, 乙醚浓缩得到白色粉末 496mg 即中间体 6。产率:30%。 ^1H NMR(400MHz, CD_3OD) δ 7.24(t, $J = 6.9\text{Hz}$, 2H), 6.95(s, 1H), 6.91(d, $J = 8.3\text{Hz}$, 1H), 6.79(d, $J = 8.3\text{Hz}$, 2H), 6.69(d, $J = 8.1\text{Hz}$, 1H), 4.83(s, 1H), 4.07(q, $J = 7.2\text{Hz}$, 2H), 3.24(s, 1H), 3.08(d, $J = 4.4\text{Hz}$, 2H), 2.85(t, $J = 7.5\text{Hz}$, 2H), 2.69(s, 1H), 2.58(t, $J = 7.6\text{Hz}$, 2H), 2.54(s, 1H), 2.07(s, 1H), 1.81(dd, $J = 13.8, 9.1\text{Hz}$, 1H), 1.38(t, $J = 6.1\text{Hz}$, 3H), 1.20(t, $J = 7.2\text{Hz}$, 3H)。

[0054] (5) 将中间体 6(354mg, 0.88mmol, 1.0eq) 溶于 19mL MeOH 中, 加入 1.28mL 1M NaOH(51.2mg, 1.28mmol, 1.45eq), 60°C 下回流搅拌反应 6h, 反应完全后加入 1.28mL 1M HCl, 减压浓缩除去溶剂(包括水), 干法柱层析, 洗脱剂体系:D:M = 20:1-5:1, 得到黄色油状物, 加乙醚减压浓缩多次, 真空干燥, 得到白色固体粉末 168mg 即莱克多巴胺半抗原 7。产率:51%。 ^1H NMR(400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.50(s, 1H), 7.18(d, $J = 8.0\text{Hz}$, 2H), 6.91(s, 1H), 6.85(d, $J = 7.6\text{Hz}$, 1H), 6.76(d, $J = 7.9\text{Hz}$, 2H), 6.71(d, $J = 7.8\text{Hz}$, 1H), 5.76(s, 1H), 4.82(t, $J = 10.9\text{Hz}$, 1H), 3.14(d, $J = 15.4\text{Hz}$, 2H), 3.03-2.86(m, 2H), 2.70(t, $J = 7.5\text{Hz}$, 2H), 2.55(s, 1H), 2.44(t, $J = 7.6\text{Hz}$, 2H), 2.01(s, 1H), 1.68(s, 1H), 1.25(t, $J = 7.1\text{Hz}$, 3H)。 ^{13}C NMR(101MHz, CD_3OD) δ 181.5, 161.3, 157.6, 135.8, 135.2, 133.9, 131.6, 131.2, 131.1, 119.3, 72.9, 58.0, 55.0, 38.9, 38.3, 34.6, 30.1, 19.4, 18.8。HRMS: $[\text{M}^+\text{H}^+]$: Found m/z 374.1963, Calcd m/z 374.1889。

[0055] 步骤(1)-(5)的合成路线示意图如图2所示。

[0056] 二、莱克多巴胺人工抗原与包被抗原的制备与检测

[0057] 1. 莱克多巴胺人工抗原的制备与检测

[0058] a. 莱克多巴胺人工抗原的制备具体实验步骤为：

[0059] (1) 称取 RAC-CA (7.0mg, 0.01mmol, 60eq)，溶于 0.5mL 的 DMF 中，加入 DCC (2.2mg, 0.015mmol, 33eq)，NHS (1.2mg, 0.015mmol, 33eq)，室温下搅拌反应 12h，过滤掉生成的 DCU，得到 A 液。

[0060] (2) 称取 BSA (20mg, 1.0eq) 溶于 1.2mL NaHCO_3 (0.1M, pH 8.5) 中。在冰浴下搅拌 5-10min，再向其中逐滴滴加 A 液，动作要缓慢，轻柔。滴加完毕，撤去冰浴，继续室温下反应过夜。

[0061] (3) 将反应液小心移至透析袋中，冰浴 (0-4℃) 下在 PBS (0.01M, pH 7.4) 溶液中进行透析。每 4 小时换一次透析液，重复六次。透析完毕，将反应液从透析袋中小心转移至样品瓶中，保鲜膜封好，盖上瓶盖，于 -80℃ 下预冷冻。

[0062] (4) 冷冻干燥得白色固体粉末 RAC-CA-BSA。

[0063] b. 莱克多巴胺人工抗原的检测：

[0064] (1) 采用紫外分光光度计进行全波长扫描，以 PBS 为空白对照，寻找 RAC-CA-BSA 的最大吸收波长 λ ，以及在浓度 C (以 BSA 的含量计算) 时的吸光度值 A。

[0065] (2) 在 λ 处测定 RAC-CA, BSA 不同浓度的吸光度值，绘制 RAC-CA, BSA 紫外吸收标准曲线，根据 BSA 紫外吸收标准曲线计算 BSA 在浓度 C 时的吸光度值 A1。

[0066] (3) 根据 RAC-CA 的紫外吸收标准曲线计算吸光度值为 (A-A1) 时的浓度 C1。

[0067] (4) 根据公式偶联比 $n = (C1/M_{\text{RAC-CA}}) / (C/M_{\text{BSA}})$ 计算 RAC-CA 与 BSA 的偶联比。RAC-CA、RAC-CA-BSA、BSA 紫外扫描光谱见图 4 所示。其中 RAC-CA, BSA 溶液浓度均为 100 $\mu\text{g/mL}$ ，RAC-CA-BSA 溶液浓度为 605 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0068] 结果分析：计算得到的 RAC-CA 与 BSA 的偶联比为 33:1。

[0069] 2. 包被抗原的制备与检测

[0070] a. 包被抗原的制备具体实验步骤为：

[0071] (1) 称取 RAC-CA (5.6mg, 0.015mmol, 30eq)，溶于 0.6mL 的 DMF 中，加入 DCC (3.4mg, 0.0165mmol, 33eq)，NHS (1.9mg, 0.0165mmol, 33eq)，室温下搅拌反应 12h，过滤掉生成的 DCU，得到 A 液。

[0072] (2) 称取 OVA (13.54mg, 1.0eq) 溶于 1.5mL NaHCO_3 (0.1M, pH 8.5) 中，先在冰浴下搅拌 5-10min，再向其中逐滴滴加 A 液，动作要缓慢，轻柔。滴加完毕，撤去冰浴，继续室温下反应过夜。

[0073] (3) 将反应液小心移至透析袋中，冰浴 (0-4℃) 下在 PBS (0.01M, pH 7.4) 溶液中进行透析。每 4 小时换一次透析液，重复六次。透析完毕，将反应液从透析袋中小心转移至样品瓶中，保鲜膜封好，盖上瓶盖，于 -80℃ 下预冷冻。

[0074] (4) 冷冻干燥得白色固体粉末 RAC-CA-OVA。

[0075] b. 包被抗原的检测

[0076] (1) 采用紫外分光光度计进行全波长扫描，以 PBS 为空白对照，寻找 RAC-CA-OVA 的最大吸收波长 λ ，以及在浓度 C2 (以 OVA 计算) 时的吸光度值 A2。

[0077] (2) 在 λ 处测定 RAC-CA, OVA 不同浓度的吸光度值，绘制 RAC-CA, OVA 紫外吸收标

准曲线,根据 BSA 紫外吸收标准曲线计算 BSA 在浓度 C 时的吸光度值 A3。

[0078] (3) 根据 RAC-CA 的紫外吸收标准曲线计算吸光度值为 (A2-A3) 时的浓度 C3。

[0079] (4) 根据公式偶联比 $n = (C2/MRAC-CA) / (C1/MOVA)$ 计算 RAC-CA 与 BSA 的偶联比。RAC-CA、RAC-CA-OVA、OVA 紫外扫描光谱见图 5 所示。其中 RAC-CA, OVA 溶液浓度均为 100 $\mu\text{g/mL}$, RAC-CA-OVA 溶液浓度为 432.5 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0080] 结果分析:计算得到的 RAC-CA 与 OVA 的偶联比为 18:1。

[0081] 免疫抗原与包被抗原的制备路线如图 3 所示。

[0082] 三、小鼠免疫及抗血清检测

[0083] 取 6 只 6-8 周龄的 Balb/C 健康雌性小鼠,每只小鼠按下列程序免疫:每次免疫注射剂量为 100 $\mu\text{g/只}$,首次免疫采用腹腔注射, RAC-CA-BSA 与等体积弗式完全佐剂乳化后作为第一次免疫原, RAC-CA-BSA 与弗式不完全佐剂等体积乳化后皮下注射作为第二次和第四次免疫, RAC-CA-BSA 与 1/3 体积的弗式不完全佐剂乳化后腹腔注射作为第三次和第五次免疫,免疫间隔期为三周。免疫结束后 7-10 天,尾静脉血离心取血清,用间接 ELISA 实验选取血清效价高的小鼠进行加强免疫,加强免疫为融合前三天, RAC-CA-BSA 不加佐剂腹腔注射,为 200 $\mu\text{g/只}$ 。免疫程序见下表 1。

[0084] 表 1 免疫程序

[0085]

免疫次数	剂量/只	间隔	方式	佐剂	佐剂体积百分比/%	备注
一免	100 μg (B-H)	3 周	腹腔	CFA	50	
二免	100 μg (B-H)	3 周	皮下	IFA	50	
三免	100 μg (B-H)	3 周	腹腔	IFA	25	
四免	100 μg (B-H)	3 周	皮下	IFA	50	
五免	100 μg (B-H)	3 周	腹腔	IFA	25	多抗分析

[0086] 间接 ELISA 实验检测抗血清效价方法的建立:

[0087] (1) 碳酸盐缓冲溶液的配制:0.05M $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ (pH 9.6):1.59g Na_2CO_3 , 2.93g NaHCO_3 加三蒸水至 1000mL。

[0088] (2) 抗原包被:包被抗原 RAC-CA-OVA (偶联比为 18:1) 用碳酸盐缓冲溶液稀释,包被浓度分别是 27, 9, 3, 1, 0.333, 0.111, 0.037 $\mu\text{g/mL}$ (包被于 ELISA 板的 A-G line, 100 $\mu\text{l/well}$)。包被抗原对照:OVA, 包被浓度:27 $\mu\text{g/mL}$ (包被于 ELISA 板的 H line, 100 $\mu\text{l/well}$) , 包被完置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1-1.5h, 之后置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。

[0089] (3) 配置 0.01M pH7.4 的 PBS 溶液:2.9009g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.2964g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 8.5g NaCl 加三蒸水至 1000mL。

[0090] (4) 配置 1% (1g/100mL PBS 配置) 粗 OVA 作为封闭液。

[0091] (5) 洗涤:将板从 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出,甩去孔内液体, PBS 洗涤 3 次 (300 $\mu\text{l/well}$), 拍干。

[0092] (6) 封闭:封闭液 340 $\mu\text{l/well}$ 。加完置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2.5h。

[0093] (7) PBST 的配置:在配置好的 0.01M pH7.4 的 PBS 溶液加入 0.05% 的 Tween20, 混匀。

[0094] (8) 配置一抗稀释液:0.25-0.5mg/mL 的 OVA, PBS 配置。

[0095] (9) 抗体稀释 :

[0096] 抗体浓度的选择 :用一抗稀释液将血清分别稀释成 :1:1000,3000,9000,27000,81000 五个稀释度,并以 1:1000 的正常鼠血清作阴性对照,作为孵育一抗(分别加于 ELISA 板的 1-2,3-4,5-6,7-8,9-10,11-12 列中)。

[0097] (10) 将板取出,甩去孔内液体,用 PBST 洗涤 3 次,拍干。

[0098] (11) 加入一抗孵育液,100 μ l/well。加完孵育 2h。

[0099] (12) 配置二抗孵育液。将 1% 的粗 OVA 用 PBS 稀释成 0.1% 的稀释液,加入酶标二抗(羊抗鼠 IgG 酶标二抗),稀释成 1:500。

[0100] (13) 将板取出,甩去孔内液体,用 PBST 洗涤 5 次,拍干。

[0101] (14) 加入二抗孵育液(100 μ l/well)。加完,37℃ 孵育 1.5h。

[0102] (15) 0.1M Citric acid 配置 :0.19213g Citric acid 加三蒸水溶解并定容至 10mL。

[0103] (16) 0.2M Na_2HPO_4 配置 :0.716g Na_2HPO_4 加三蒸水溶解并定容至 10mL。

[0104] (17) 0.2M H_2SO_4 配置 :浓 H_2SO_4 : H_2O = 1:8。

[0105] (18) ELISA 显色液 :4.86mL 0.1M Citric acid 液与 5.14mL 0.2M Na_2HPO_4 液混合,加 6mg OPD 充分溶解后再加 20 μ l H_2O_2 ,避光备用。

[0106] (19) 将板取出,甩去孔内液体,4 次 PBST,2 次 PBS。

[0107] (20) 显色 :避光加入上述显色剂(100 μ l/well)。3min 后加入 0.2M H_2SO_4 (50 μ l/well) 终止反应。

[0108] (21) 测上述溶液在 490nm 波长处的吸收(OD 值)。(注 OF :超出仪器检出限)

[0109] 结果判定 :以样品血清孔的 OD 值在 1.0 左右,且 P/N 值在 2.1 以上的孔所对应的抗体稀释度为该血清的效价(P 表示待检样品血清孔的 OD 值 ;N 表示阴性对照血清孔的 OD 值)。

[0110] 四、细胞融合,杂交瘤细胞筛选及克隆化培养

[0111] 1. 饲养层细胞制备

[0112] 细胞融合的前一天,取 1 只昆明鼠拉颈处死,将该鼠浸泡于 75% 酒精中 5-10min,于超净工作台中从小鼠腹部无菌剪开皮肤充分暴露小鼠腹膜,用酒精消毒后,注入 RPMI 1640 培养液淘洗小鼠腹腔,淘洗细胞注入离心管离心,弃去上清,下层沉淀极为饲养层细胞,30mL 完全培养液重悬上述饲养层细胞,100 μ l/Well 滴加于 96Well 细胞培养板孔中,置于细胞培养箱中培养,第二天初步查验正常后继续培养。

[0113] 2. 脾细胞制备

[0114] 选取间接 ELISA 检测血清效价最高的受免小鼠,摘眼球采血,抗血清用于抗体进一步分析或作阳性抗体对照,断颈处死后,将该鼠浸泡于 75% 酒精消毒后无菌取脾,去除结缔组织,制备脾细胞悬液,转移至离心管中,RPMI 1640 培养液洗涤结缔组织,合并后离心弃上清,加 RPMI 1640 培养液至 30mL,计数备用。

[0115] 3. 骨髓瘤细胞制备

[0116] A. 在融合前 10 天左右复苏 Sp2/0 细胞,用完全培养基培养 2-3 天按 1:4-5 传代,将约 100-300 个细胞接种于 1 块 96 孔细胞培养板中培养一周左右,镜检其克隆数与克隆细胞生长状况,如 70% 细胞能良好单克隆生长表明细胞培养板是合格的同时也表明配制的含

20%胎牛血清的培养基能有效支持 Sp2/0 细胞成单克隆生长,为下一步的试验奠定基础。

[0117] B. 细胞传代时,按 1:10 传 2 瓶细胞,一瓶加 1×HAT,另一瓶作平行试验,培养 3 天后镜检,按常规 1×HAT 培养基内细胞全部死亡,而平行组细胞生长旺盛,说明该细胞株对 HAT 有敏感性。

[0118] C. 融合前 2 天,将 Sp2/0 细胞进行 1:4-5 分瓶培养,第二天补加一倍培养基继续培养,融合前使细胞处于对数生长期(确保旺盛细胞率大于 98%),从中挑选 6 瓶细胞,吹打细胞转移至 50mL 离心管中,1000r/min 离心 10min,去培养基,加 10mL RPMI1640 培养基悬浮细胞,计数后备用。

[0119] 4. 细胞融合

[0120] 按数量比脾细胞:骨髓瘤细胞=8:1,轻轻混匀后,1000r/min 离心 10min,去培养基,弹松细胞沉淀块,置离心管于 37℃灭菌温水浴中。滴加 1mL 37℃温育的细胞融合剂 PEG1500,搅拌 90s,加 1mLRPMI 1640 培养基(边加边搅拌)60s,加 1mLRPMI 1640 培养基(边加边搅拌)60s,加 1.5mL RPMI1640 培养基(边加边搅拌)60s,加 1.5mLRPMI 1640 培养基(边加边搅拌)60s,加 5mLRPMI 1640 培养基(边加边搅拌)60s,800r/min 离心 7min,去培养基,弹松细胞沉淀块,轻轻加入含 HAT 的选择性培养基,轻轻摇动后加入到预先 37℃温育的 100mL 上述含 HAT 的选择性培养基制备融合细胞悬液。

[0121] 5. 细胞培养

[0122] 将上述融合细胞悬液按 100 μl/Well 滴加于预先长有饲养细胞单层的 96 孔细胞培养板中,于 CO₂ 培养箱中培养,第二天,每孔补 100 μl HAT(2.5×) 培养基,第四天, HAT(1×) 培养基换液一次,第七天, HT(1×) 培养基换液一次,第十天, HT(1×) 培养基换液,普查细胞生长状态,制定次序表,标记,依细胞数量及时做 ELISA 检测。

[0123] 6. 杂交瘤细胞的筛选

[0124] 融合后当杂交瘤细胞数目到一定程度,便可进行 ELISA 检测对能够分泌抗体的杂交瘤细胞进行筛选。一般在上次换液后 3-4 天,以便抗体积累。

[0125] 7. 杂交瘤细胞的克隆化

[0126] 对检测到的阳性孔采用有限稀释法进行亚克隆,10-15 天选择单克隆孔做 ELISA 检测,对阳性孔进行二次亚克隆,直至抗体阳性率达 100%。选择抗体强阳性、细胞生长好的克隆进行扩增培养,冻存,保种。

[0127] 五、腹水制备

[0128] 选取雌性 6-8 周龄的 Balb/C 健康雌性小鼠,每只注射 500 μl 降植烷致敏,7-10 天后收集杂交瘤细胞, RPMI 1640 培养基洗细胞两遍,取 1×10⁶ 个细胞注射于老鼠腹腔,7-10 天可见老鼠腹腔肿大,用无菌注射器于老鼠腹腔采集腹水,离心去除细胞上层脂肪和下层细胞,去部分样品做 ELISA 测定效价及 IC₅₀,其余分装冻存备用。

[0129] 六、腹水纯化及抗体效价的测定,抗体 IC₅₀ 值的测定

[0130] 取步骤 G 制备的腹水,用冰水浴预冷,0.01M PBS 倍稀释(一份腹水+三份 0.01M PBS(pH7.4)) 后作准备液,按 10mg 腹水总蛋白取 1ml protein G resin 量,将其填充于抗体蛋白亲和层析柱床中,用 resin 50× 体积的预冷 0.01M PBS(pH7.4) 平衡层析柱。使腹水中单克隆抗体蛋白充分与 protein G 特异性结合,用 50× 体积的预冷 0.01M PBS(pH7.4) 充分洗涤层析柱以去除粘附层析柱中的杂蛋白。于 1.5ml EP 管中预先各加 100 μl 1M

Tris-Cl (pH9.6), 再将上述处理的层析柱加入冰水预冷 0.1M glycine-HCl (pH 2.7) 进行洗脱, 滤液按 0.9ml/管分部收集于上述处理的 EP 管中, 每管取少许测 OD₂₈₀ 蛋白峰, 合并蛋白峰管, 并将合并液置于透析袋中, 于冰水浴 0.01M PBS (pH7.4) 中透析过夜。取该处理液少许, 进行间接 ELISA 和游离莱克多巴胺作竞争抗原的间接竞争 ELISA 分析。

[0131] 七、莱克多巴胺单克隆抗体的鉴定

[0132] 1. 间接 ELISA 测定抗体效价

[0133] 棋盘 ELISA 的技术参数: A-G line 包被抗原 (BSA-RAC) 浓度分别为: 9000、3000、1000、333、111、37、12.3ng/ml。H line 包被对照抗原 (BSA) 浓度为: 3000ng/ml。1-2、3-4、5-6、7-8、9-10 列分别加 1:100000、200000、400000、800000、1600000 万稀释的单抗。11-12 列加 1:100000 稀释的正常 balb/c 鼠血清作对照。选取: 3000ng/ml 包被抗原 (BSA-RAC) 作工作浓度包被抗原, 1:80000、160000 倍稀释的单抗作工作浓度一抗进行 ELISA 试验。测定的单抗效价为: 1:800000。表 2 中列出的数值为在 450nm 波长测定的数值。

[0134] 表 2 Rac 单抗效价的测定

[0135]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ND	ND	ND	ND	3.73	3.82	2.15	2.20	1.19	1.21	0.15	0.15
B	ND	ND	ND	ND	2.78	2.86	1.45	1.50	0.82	0.83	0.14	0.14
C	ND	ND	3.71	3.61	1.81	1.74	0.98	0.95	0.54	0.55	0.14	0.14
D	3.75	3.84	2.28	238	1.11	1.1	0.57	0.59	0.36	0.35	0.14	0.14
E	2.07	2.22	1.24	0.62	0.58	0.60	0.35	0.36	0.24	0.24	0.14	0.13
F	1.06	1.07	0.61	0.17	0.33	0.35	0.25	0.26	0.19	0.19	0.14	0.13
G	0.64	0.65	0.41	0.17	0.24	0.25	0.20	0.19	0.16	0.17	0.14	0.15
H	0.14	0.15	0.14	0.17	0.15	0.17	0.14	0.15	0.15	0.14	0.14	0.15

[0136] 注: ND: overflow。

[0137] 2、间接竞争 ELISA 测定 IC₅₀

[0138] 主要技术参数: 包被抗原 (BSA-RAC) 工作浓度 3000ng/ml。对照抗原 (BSA) 工作浓度 3000ng/ml, 一抗工作浓度 1:80000; 游离莱克多巴胺的浓度: 0.125、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0ng/ml。表 3 中列出的数值为在 450nm 波长测定的数值。

[0139] 表 3 单抗 IC₅₀ 的测定

[0140]

RAC 浓度	OD 值 (G)	G-X	(G-X)/G (抑制率)
0	1.645		

0.125	1.615	0.03	0.018237082
0.25	1.359	0.286	0.173860182
0.5	1.012	0.633	0.384802432
1	0.562	1.083	0.658358663
2	0.341	1.304	0.792705167
4	0.221	1.424	0.865653495
8	0.119	1.526	0.927659574

[0141] 抑制率为 $(G-X)/G$ 的一半时 RAC 的浓度,即为该单抗的 IC_{50} 值;以浓度的对数为横坐标,以抑制率为纵坐标,绘制曲线,如图 6 所示。由曲线可知:此单抗的 $IC_{50} = 0.35ppb$ 。

[0142] 八、抗体的特异性

[0143] 抗体的特异性是指其同特异性抗原莱克多巴胺结合的能力与同该类的类似物结合能力的比较。一般用交叉反应率作为评价标准。抗体特异性好的化合物交叉反应小。

[0144] 分别将各种 β -受体兴奋剂标准品倍比稀释成浓度梯度进行间接 ELISA 竞争试验,绘制标准曲线,用下式计算制备的单克隆抗体对各种类似物的交叉反应率(见表 4:交叉反应率实验结果)。

[0145]

$$\text{交叉反应率}(\%) = \frac{\text{引起50\%抑制的莱克多巴胺的浓度}}{\text{引起50\%抑制的莱克多巴胺类似物的浓度}}$$

[0146] 表 4 交叉反应率实验结果

[0147]

β -受体兴奋剂	交叉反应率(%)
莱克多巴胺	100
沙丁胺醇	<0.005
西马特罗	<0.005
马布特罗	<0.005
克伦特罗	<0.005
多巴胺	<0.005

[0148] 实施例 2

[0149] 莱克多巴胺半抗原的制备

[0150] 具体实验步骤为:

[0151] (1) 将化合物 1 (164mg, 1.0mmol, 1.0eq) 溶于 4mL 乙腈中, 搅拌下加入 NBS (N-溴代丁二酰亚胺) (240mg, 1.5mmol, 1.5eq), 室温下搅拌反应 4h。反应完加入 25mL H_2O , EA (乙酸乙酯) ($3 \times 10mL$) 萃取, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩, 干法柱层析, DCM (二氯甲烷) 为洗脱剂, 常压洗脱, 得到黄色油状物 345mg 即中间体 2。产率: 94.6%。 1H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ 7.28 (d, $J = 1.5Hz$, 1H), 7.02 (dd, $J = 8.3, 1.6Hz$, 1H), 6.91 (d, $J = 8.3Hz$, 1H), 5.62 (s, 1H), 2.79 (d, $J = 6.9Hz$, 2H), 2.73 (d, $J = 7.0Hz$, 2H), 2.14 (s, 3H)。

[0152] (2) 将中间体 2 (0.88g, 3.6mmol, 1.0eq) 加入到干燥两口瓶中, 加入 [1, 1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钯 (485mg, 0.73mmol, 0.2eq), 抽换 N_2 多次, 用注射器将 TEA (三乙胺) 5mL, DMF (N,N-二甲基甲酰胺) 29mL 注入两口瓶, 注入丙烯酸乙酯, 再次抽换 N_2 多次, $110^\circ C$ 下回流搅拌反应 20h, 反应毕, 加 200mL 水稀释, EA ($100mL \times 3$) 萃取, 合并有机相, 水洗 ($3 \times 150mL$), 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩, 干法柱层析, 洗脱剂体系由 PE:EA 体系转化为 DCM:MeOH 体系。产物为黄色油状物, 置冰箱过夜得到淡黄色固体 975mg 即中间体 3。产率: 52%。 1H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ 7.97 (d, $J = 16.2Hz$, 1H), 7.04 (dd, $J = 8.2, 1.8Hz$, 1H), 6.83 (s, 1H), 6.76 (d, $J = 8.3Hz$, 1H), 6.61 (d, $J = 16.1Hz$, 1H), 4.27 (q, $J = 7.1Hz$, 2H), 2.82 (t, $J = 7.0Hz$, 2H), 2.74 (t, $J = 7.1Hz$, 2H), 2.14 (s, 3H), 1.34 (t, $J = 7.1Hz$, 3H)。

[0153] (3) 将中间体 3 (80mg, 0.3mmol, 1.0eq) 加入到茄形瓶中, 加入 MeOH 3mL, 小心分批少量加入 Pd/C (10%) (60mg, 0.75eq) 抽换 H_2 多次, 室温下反应 6h。反应完, 反应液用硅藻土过滤, MeOH 洗涤滤饼, 减压浓缩, 得粗品 70mg 即中间体 4, 直接投下一步。产率: 90%。

[0154] (4) 将中间体 4 (1.5g, 5.65mmol, 1.0eq) 溶于 21mL MeOH 中, 加入化合物 5 (1.07g, 5.65mmol, 1.0eq), TEA (849mg, 8.32mmol, 2.0eq), 搅拌反应 30min, 加入 STAB-H (三乙酰氧基硼氢钠) (3.55g, 12.48mmol, 3.0eq), 刚加入会有大量气泡冒出, $60^\circ C$ 下回流搅拌反应 30h, 补加 STAB-H (1.60g, 5.66mmol, 1.0eq), 继续搅拌反应过夜, 第二次补 STAB-H (1.60g, 5.66mmol, 1.0eq), 继续搅拌反应 10h, 向反应液中加入 50mL 水, EA ($30mL \times 3$) 萃取, 合并有机相, 饱和氯化铵水溶液 ($3 \times 30mL$) 洗涤有机相 (除 TEA), 将有机相干燥, 减压浓缩, 干法柱层析, 洗脱剂体系: D:M = 20:1-10:1, 得到黄色油状物, DCM、乙醚浓缩得到白色粉末 700mg 即中间体 6。产率: 31%。 1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 7.24 (t, $J = 6.9Hz$, 2H), 6.95 (s, 1H), 6.91 (d, $J = 8.3Hz$, 1H), 6.79 (d, $J = 8.3Hz$, 2H), 6.69 (d, $J = 8.1Hz$, 1H), 4.83 (s, 1H), 4.07 (q, $J = 7.2Hz$, 2H), 3.24 (s, 1H), 3.08 (d, $J = 4.4Hz$, 2H), 2.85 (t, $J = 7.5Hz$, 2H), 2.69 (s, 1H), 2.58 (t, $J = 7.6Hz$, 2H), 2.54 (s, 1H), 2.07 (s, 1H), 1.81 (dd, $J = 13.8, 9.1Hz$, 1H), 1.38 (t, $J = 6.1Hz$, 3H), 1.20 (t, $J = 7.2Hz$, 3H)。

[0155] (5) 将中间体 6 (118mg, 0.29mmol, 1.0eq) 溶于 10mL MeOH 中, 加入 0.5mL 1M NaOH (17mg, 0.43mmol, 1.45eq), $70^\circ C$ 下回流搅拌反应 7h, 反应完全后加入 1.0mL 1M HCl, 减压浓缩除去溶剂 (包括水), 干法柱层析, 洗脱剂体系: D:M = 20:1-5:1, 得到黄色油状物, 加乙醚减压浓缩多次, 真空干燥, 得到白色固体粉末 50mg 即莱克多巴胺半抗原 7。产率: 46%。 1H NMR (400MHz, $DMSO-d_6$) δ 9.50 (s, 1H), 7.18 (d, $J = 8.0Hz$, 2H), 6.91 (s, 1H), 6.85 (d, $J = 7.6Hz$, 1H), 6.76 (d, $J = 7.9Hz$, 2H), 6.71 (d, $J = 7.8Hz$, 1H), 5.76 (s, 1H), 4.82 (t, $J = 10.9Hz$, 1H), 3.14 (d, $J = 15.4Hz$, 2H), 3.03 - 2.86 (m, 2H), 2.70 (t, $J = 7.5Hz$, 2H), 2.55 (s, 1H), 2.44 (t, $J = 7.6Hz$, 2H), 2.01 (s, 1H), 1.6

8 (s, 1H), 1.25 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 181.5, 161.3, 157.6, 135.8, 135.2, 133.9, 131.6, 131.2, 131.1, 119.3, 72.9, 58.0, 55.0, 38.9, 38.3, 34.6, 30.1, 19.4, 18.8. HRMS: $[\text{M}^+ \text{H}^+]$: Found m/z 374.1963, Calcd m/z 374.1889.

[0156] 步骤 (1)–(5) 的合成路线示意图如图 2 所示。

[0157] 莱克多巴胺人工抗原与包被抗原的制备与检测 ; 细胞融合, 杂交瘤细胞筛选及克隆化培养 ; 腹水制备 ; 腹水纯化及抗体效价的测定 ; 抗体 IC_{50} 值的测定 ; 莱克多巴胺单克隆抗体的鉴定 ; 抗体的特异性 ; 以上所述的方法步骤均同实施例 1。

[0158] 下面将结合本发明实施例中的附图, 对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述, 显然, 所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例, 而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例, 本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例, 都属于本发明保护的范围。

[0159] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已, 并不用以限制本发明, 凡在本发明的精神和原则之内, 所作的任何修改、等同替换、改进等, 均应包含在本发明的保护范围之内。

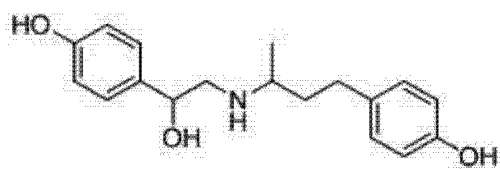


图 1

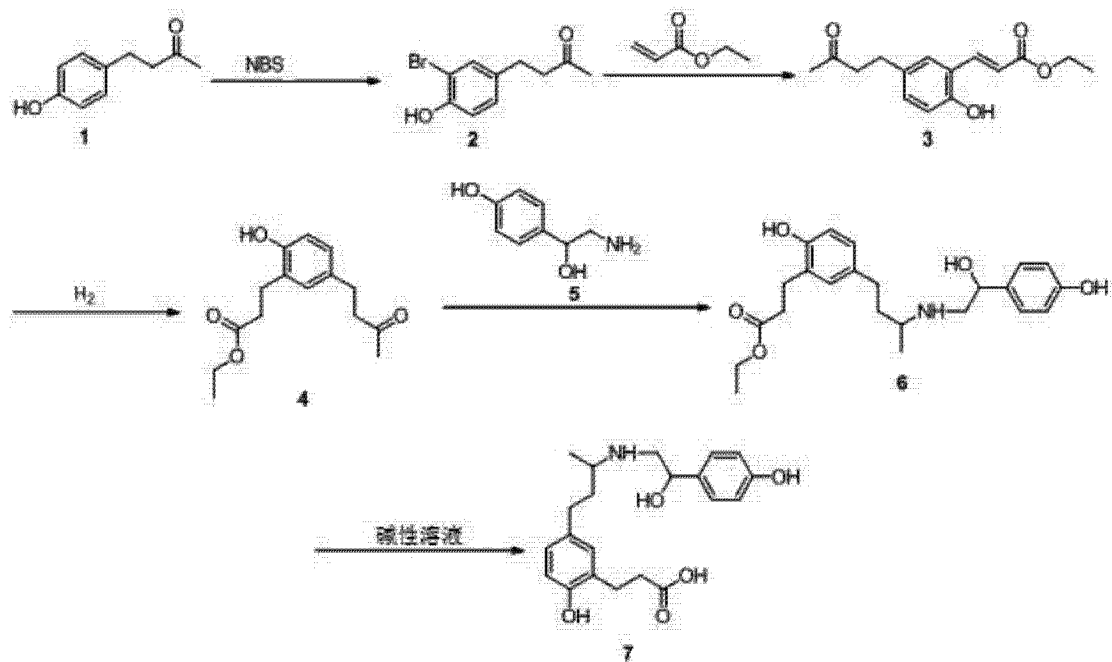


图 2

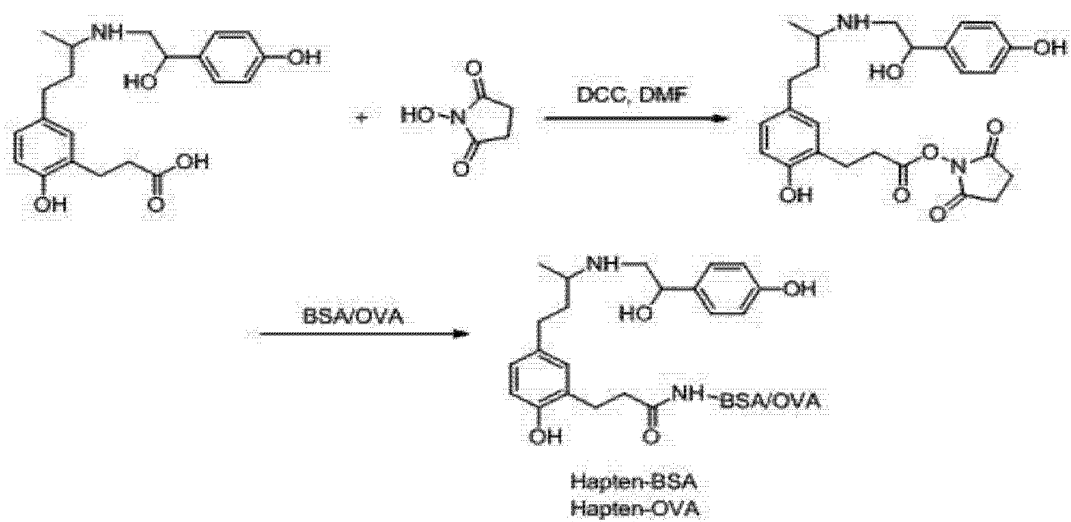


图 3

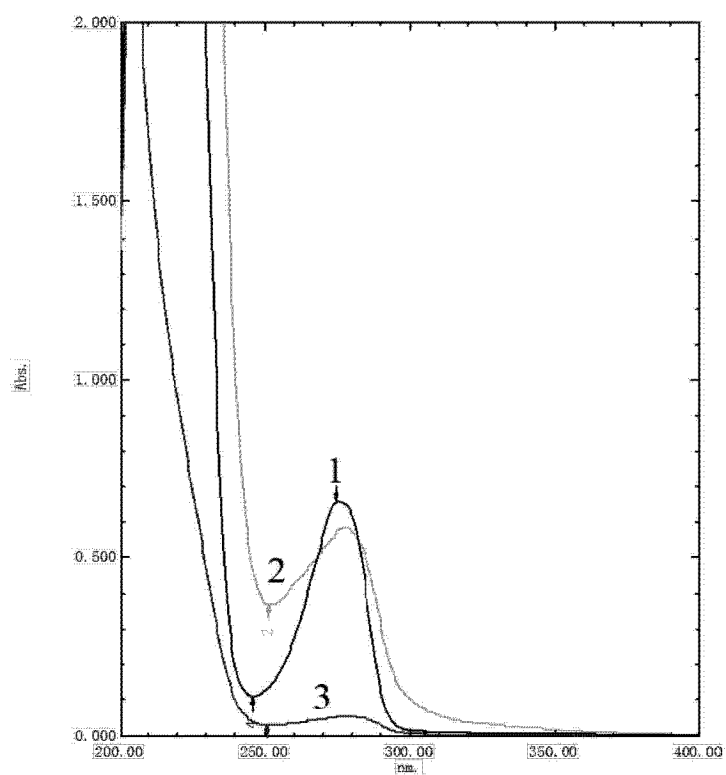


图 4

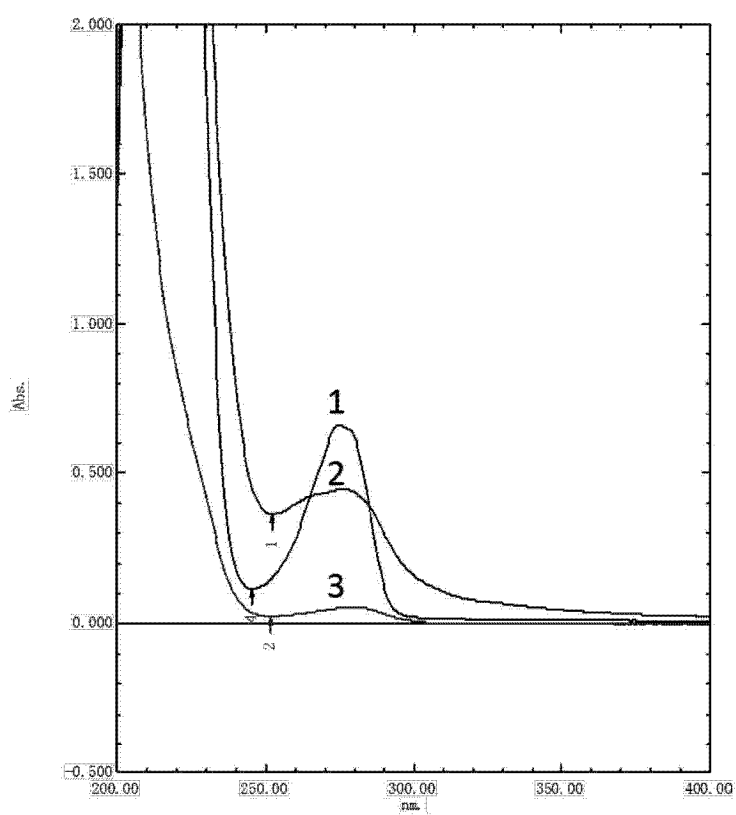


图 5

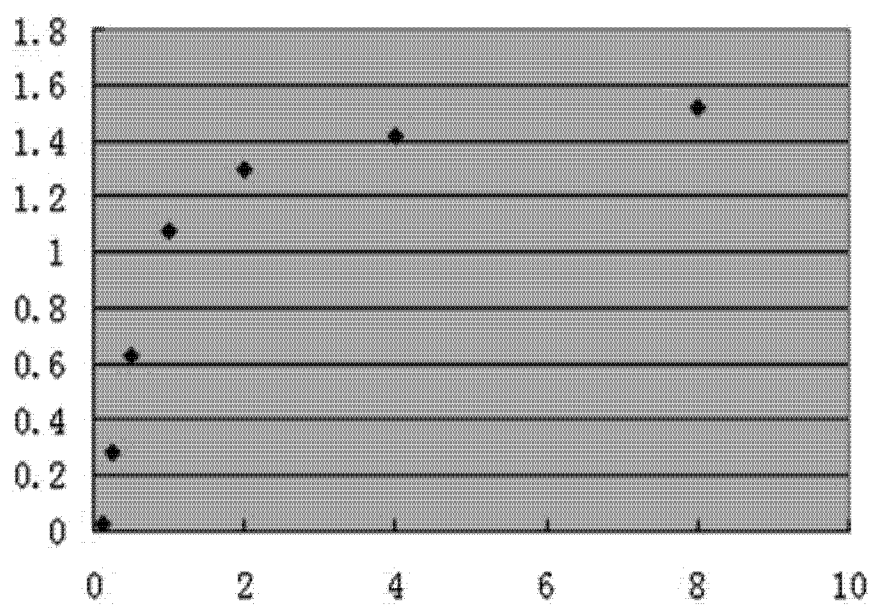


图 6

专利名称(译)	一种莱克多巴胺半抗原、人工抗原、单克隆抗体及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN104311438A	公开(公告)日	2015-01-28
申请号	CN201410471148.3	申请日	2014-09-16
[标]申请(专利权)人(译)	苏州大学		
申请(专利权)人(译)	苏州大学		
当前申请(专利权)人(译)	苏州大学		
[标]发明人	乔春华 吴康 许芸芸		
发明人	乔春华 吴康 许芸芸		
IPC分类号	C07C229/34 C07C227/18 C07K14/765 C07K16/44 G01N33/577 G01N33/531		
代理人(译)	张金芝 杨颖		
其他公开文献	CN104311438B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提出了一种免疫检测技术，具体涉及一种莱克多巴胺半抗原、人工抗原及其制备方法，以及利用该人工抗原免疫小鼠后制备单克隆抗体，所述单克隆抗体由杂交瘤细胞株12B2分泌，该杂交瘤细胞保藏在中国典型培养物保藏中心，保藏号(CCTCC NO)：C2014127。利用本发明提供的莱克多巴胺单克隆抗体效价高、灵敏度高、特异性强，可应用于莱克多巴胺药物残留的检测。

