

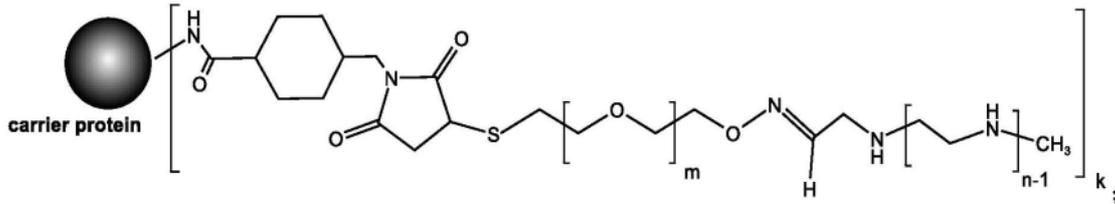
1. 一种聚乙烯亚胺抗原的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1、将聚乙烯亚胺、4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶1-氧基自由基和催化剂加入到溶剂A中溶解,进行氧化反应,反应完成后真空浓缩抽干,得到末端醛基修饰聚乙烯亚胺;

S2、将所述末端醛基修饰聚乙烯亚胺和巯基-聚乙二醇-羟胺溶于溶剂B中,加入pH调节剂,进行脎化反应,反应完成后纯化得到末端巯基修饰聚乙烯亚胺;

S3、将马来酰亚胺活化载体蛋白和所述末端巯基修饰聚乙烯亚胺溶于溶剂C中,进行迈克尔加成反应,反应完成后纯化得到载体蛋白偶联聚乙烯亚胺;

所述载体蛋白偶联聚乙烯亚胺的结构式如式(6)所示:



式(6)

式中,n为大于或等于2的任意自然数,m为大于或等于1的任意自然数,k为大于或等于1的任意自然数,carrier protein表示载体蛋白。

2. 根据权利要求1所述的聚乙烯亚胺抗原的制备方法,其特征在于,步骤S1中,所述聚乙烯亚胺、所述4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶1-氧基自由基和所述催化剂摩尔比为1:0.01-0.1:0.15-0.5。

3. 根据权利要求1所述的聚乙烯亚胺抗原的制备方法,其特征在于,步骤S1中,所述催化剂选自 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$,所述溶剂A选自乙腈,所述溶剂A中所述聚乙烯亚胺的摩尔浓度为0.05-5mol/L。

4. 根据权利要求1所述的聚乙烯亚胺抗原的制备方法,其特征在于,步骤S2中,所述末端醛基修饰聚乙烯亚胺和所述巯基-聚乙二醇-羟胺摩尔比为1:1。

5. 根据权利要求1所述的聚乙烯亚胺抗原的制备方法,其特征在于,步骤S2中,所述pH调节剂选自醋酸,所述溶剂B选自水,所述溶剂B中所述末端醛基修饰聚乙烯亚胺的摩尔浓度为1-10mol/L。

6. 根据权利要求1所述的聚乙烯亚胺抗原的制备方法,其特征在于,步骤S3中,所述马来酰亚胺活化载体蛋白和所述末端巯基修饰聚乙烯亚胺摩尔比为1:1-3。

7. 根据权利要求1所述的聚乙烯亚胺抗原的制备方法,其特征在于,步骤S3中,所述载体蛋白选自牛血清白蛋白、人血清白蛋白、卵清蛋白或钥孔血蓝蛋白中的一种,所述溶剂C选自TBS缓冲液,所述溶剂C中所述末端巯基修饰聚乙烯亚胺的摩尔浓度为5-10mol/L。

8. 根据权利要求1所述的聚乙烯亚胺抗原的制备方法,其特征在于,步骤S1中,在室温进行氧化反应3-8h;

步骤S2中,加热回流10-30min进行脎化反应,加热温度为90-100°C;

步骤S3中,室温进行迈克尔加成反应2-3h。

9. 一种聚乙烯亚胺抗原,其特征在于,由权利要求1-8任一项所述的聚乙烯亚胺抗原的制备方法制备得到。

10. 一种免疫原性组合物,其特征在于,包括如权利要求9所述的聚乙烯亚胺抗原和药学上可接受的载体、赋形剂和/或佐剂。

一种聚乙烯亚胺抗原及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及抗体制备技术领域,特别涉及一种聚乙烯亚胺抗原及其制备方法。

背景技术

[0002] 聚乙烯亚胺(Polyethylenimine, PEI) 又称聚氮杂环丙烷,是一种合成型水溶性高分子聚合物,表面具有丰富的正电荷,能够有效吸附表面带负电荷的物质。研究表明,PEI可缩合质粒DNA为带正电荷的微粒,这些微粒可以黏合到带负电荷的细胞表面残基,通过胞吞作用进入细胞,而不需受体介导就可转染细胞,而且PEI-DNA复合物能很好地抵御溶酶体的降解作用,有效提高转染效率,因此,PEI转染试剂作为生物载体材料已广泛应用在细胞和基因治疗药物领域,成为了生物载体材料领域的研究热点。而且,PEI具有较强的蛋白质结合性能,可以携带抗原蛋白被抗原提呈细胞识别并引起免疫反应,在提高抗原交叉提呈效果的同时也能够显著降低细胞毒性,有助于提高免疫治疗效果,是一种优良的治疗性肿瘤疫苗的纳米载体系统。虽然PEI具有毒性相对低、成本低、免疫原性低等特点,但是PEI在体内不易生物降解,其富集之后易引起细胞膜通透性增加、线粒体膜电位下降、溶酶体酸性环境破坏、细胞核固缩等多种亚细胞毒性,进一步还会诱导细胞自噬。因此,需要严格控制PEI的用量,准确测定溶液中PEI的含量具有重要意义。

[0003] 由于PEI带大量正电荷,极性很强,在反相色谱系统上没有保留,且PEI没有显著的紫外吸收基团,无法采用常规紫外检测器检测。现有的测定PEI浓度的方法常采用PEI与 Cu^{2+} 螯合体系,聚乙烯亚胺能够迅速与 Cu^{2+} 发生络合反应,形成一种比较稳定的螯合物体系,PEI- Cu^{2+} 螯合体系在紫外区、可见光区均产生吸收峰,该络合物可用紫外-可见分光光度计测定,结合高效液相色谱(HPLC)、气相色谱(GC)等可以将PEI- Cu^{2+} 信号从 Cu^{2+} 信号中分离出来并定量浓度;但该方法的重现性差,而且HPLC和GC等涉及大型仪器设备,操作过于繁琐、样品制备复杂、检测成本高,不适合进行大规模的推广及应用。因此,缺少高通量、简单快速的PEI含量检测方法。

[0004] 基于抗原抗体特异性识别的免疫分析方法可以定性定量检测样品中的特定物质残留,这种分析方法对仪器设备要求不高、快速简便,一般无需对样品进行复杂的预处理,而且灵敏度高、特异性强,对使用人员的专业技术要求不高,容易普及和推广,可满足快速分析检测的需要,尤其适宜大量样品的快速分析。免疫分析方法的关键在于制备出特异性强的抗体。由于PEI为小分子化合物,无有效的免疫原性,直接免疫动物后无法得到有效的抗体,因此,目前鲜有PEI抗体产品的研究报道。开发一种免疫原性强的PEI抗原的合成方法,并利用该抗原制备得到高特异性的针对PEI的抗体是亟待解决的技术问题。

发明内容

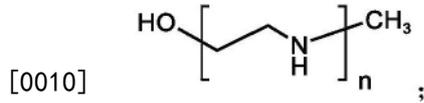
[0005] 针对现有技术存在的问题,本发明提供了一种聚乙烯亚胺抗原的制备方法,并提供了由该方法制备得到的聚乙烯亚胺抗原和含有该聚乙烯亚胺抗原的免疫原性组合物,以解决现有技术中重组抗体核酸残留以及抗体纯化过程中聚集体形成的技术问题。

[0006] 本发明具体通过以下技术方案实现：

[0007] 本发明第一方面提供了一种聚乙烯亚胺抗原的制备方法，包括以下步骤：

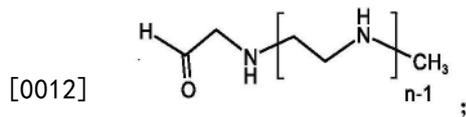
[0008] S1、将聚乙烯亚胺、4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶1-氧基自由基和催化剂加入到溶剂A中溶解，进行氧化反应，反应完成后真空浓缩抽干，得到末端醛基修饰聚乙烯亚胺；

[0009] 所述聚乙烯亚胺的结构式如式(1)所示：



式(1)

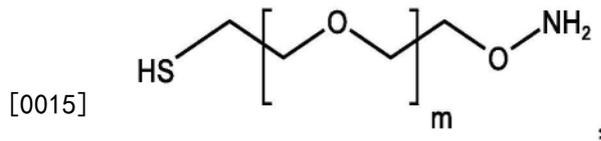
[0011] 所述末端醛基修饰聚乙烯亚胺的结构式如式(2)所示：



式(2)

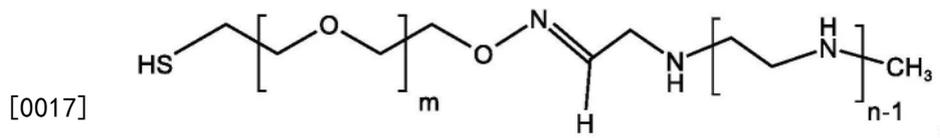
[0013] S2、将所述末端醛基修饰聚乙烯亚胺和巯基-聚乙二醇-羟胺溶于溶剂B中，加入pH调节剂，进行脎化反应，反应完成后纯化得到末端巯基修饰聚乙烯亚胺；

[0014] 所述巯基-聚乙二醇-羟胺的结构式如式(3)所示：



式(3)

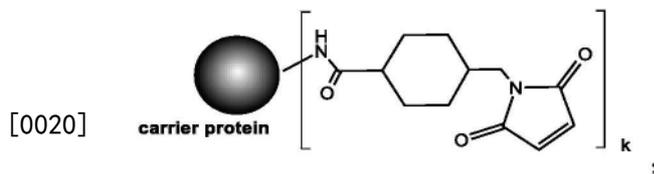
[0016] 所述末端巯基修饰聚乙烯亚胺的结构式如式(4)所示：



式(4)

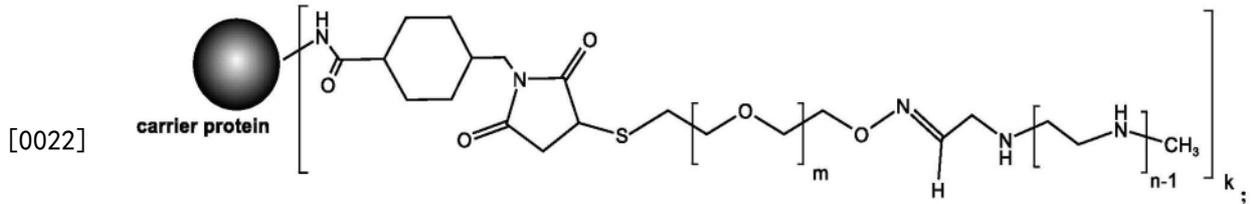
[0018] S3、将马来酰亚胺活化载体蛋白和所述末端巯基修饰聚乙烯亚胺溶于溶剂C中，进行迈克尔加成反应，反应完成后纯化得到载体蛋白偶联聚乙烯亚胺；

[0019] 所述马来酰亚胺活化载体蛋白的结构式如式(5)所示：



式(5)

[0021] 所述载体蛋白偶联聚乙烯亚胺的结构式如式(6)所示：



式(6)

[0023] 上述式中, n 为大于或等于 2 的任意自然数, m 为大于或等于 1 的任意自然数, k 为大于或等于 1 的任意自然数, carrier protein 表示载体蛋白。

[0024] 进一步地, 步骤 S1 中, 所述聚乙烯亚胺、所述 4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶 1-氧基自由基和所述催化剂摩尔比为 1:0.01-0.1:0.15-0.5。

[0025] 进一步地, 步骤 S1 中, 所述催化剂选自 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, 所述溶剂 A 选自乙腈, 所述溶剂 A 中所述聚乙烯亚胺的摩尔浓度为 0.05-5 mol/L。

[0026] 进一步地, 步骤 S1 中, 在室温进行氧化反应 3-8 h。

[0027] 进一步地, 步骤 S2 中, 所述末端醛基修饰聚乙烯亚胺和所述巯基-聚乙二醇-羟胺摩尔比为 1:1。

[0028] 进一步地, 步骤 S2 中, 所述 pH 调节剂选自醋酸, 所述溶剂 B 选自水, 所述溶剂 B 中所述末端醛基修饰聚乙烯亚胺的摩尔浓度为 1-10 mol/L。

[0029] 进一步地, 步骤 S2 中, 加热回流 10-30 min 进行脎化反应, 加热温度为 90-100°C。

[0030] 进一步地, 步骤 S3 中, 所述马来酰亚胺活化载体蛋白和所述末端巯基修饰聚乙烯亚胺摩尔比为 1:1-3。

[0031] 进一步地, 步骤 S3 中, 所述载体蛋白选自牛血清白蛋白、人血清白蛋白、卵清蛋白或钥孔血蓝蛋白中的一种, 所述溶剂 C 选自 TBS 缓冲液, 所述溶剂 C 中所述末端巯基修饰聚乙烯亚胺的摩尔浓度为 5-10 mol/L。

[0032] 进一步地, 步骤 S3 中, 室温进行迈克尔加成反应 2-3 h。

[0033] 进一步地, 步骤 S2 和步骤 S3 中, 纯化方法包括透析或超滤处理。

[0034] 本发明第二方面提供了一种聚乙烯亚胺抗原, 由如上所述的聚乙烯亚胺抗原的制备方法制备得到。

[0035] 本发明第三方面提供了一种免疫原性组合物, 包括如上所述的聚乙烯亚胺抗原和药学上可接受的载体、赋形剂和/或佐剂。

[0036] 本发明的优点及积极效果为:

[0037] 本发明首先通过将聚乙烯亚胺的末端醛基化, 然后通过双功能交联剂巯基-聚乙二醇-羟胺进行桥接, 聚乙烯亚胺的末端醛基与巯基-聚乙二醇-羟胺的氨基氧发生脎化反应, 之后巯基-聚乙二醇-羟胺的巯基与马来酰亚胺活化载体蛋白的马来酰亚胺基团发生迈克尔加成反应, 从而将聚乙烯亚胺偶联在载体蛋白上, 由此形成的抗原分子的免疫原部分一聚乙烯亚胺位于外侧, 延伸性好, 而且维持了分子结构的完整性, 有利于完全暴露完整的抗原表位, 进而提高免疫原性和所产生抗体的特异性, 以其作为免疫原免疫动物, 可有效产生针对聚乙烯亚胺的特异性抗体, 填补聚乙烯亚胺抗体的市场空白。

附图说明

[0038] 为了更清楚地说明本发明实施例中的技术方案,下面将对实施例描述中所需要使用的附图作简单的介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0039] 图1为本发明实施例的聚乙烯亚胺抗原合成路线图;

[0040] 图2为本发明实施例聚乙烯亚胺标准品的高效凝胶色谱图;

[0041] 图3为本发明实施例1末端巯基修饰聚乙烯亚胺的高效凝胶色谱图;

[0042] 图4为本发明实施例1偶联效率检测的标准曲线;

[0043] 图5为本发明实施例2末端巯基修饰聚乙烯亚胺的高效凝胶色谱图;

[0044] 图6为本发明实施例3末端巯基修饰聚乙烯亚胺的高效凝胶色谱图;

[0045] 图7为本发明实施例4正包被抗原免疫血清的效价检测结果;

[0046] 图8为本发明实施例4负包被抗原免疫血清的效价检测结果;

[0047] 图9为本发明实施例5以线性聚乙烯亚胺40K作为检测原的纯化抗体的效价检测结果;

[0048] 图10为本发明实施例5以线性聚乙烯亚胺25K作为检测原的纯化抗体的效价检测结果;

[0049] 图11为本发明实施例5以支化聚乙烯亚胺25K作为检测原的纯化抗体的效价检测结果。

具体实施方式

[0050] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例对本发明进行进一步详细说明。此处所描述的实施例仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0051] 根据本发明包含的信息,对于本领域技术人员来说可以轻而易举地对本发明的精确描述进行各种改变,而不会偏离所附权利要求的精神和范围。应该理解,本发明的范围不局限于所限定的过程、性质或组分,因为这些实施方案以及其他的描述仅仅是为了示意性说明本发明的特定方面。实际上,本领域或相关领域的技术人员明显能够对本发明实施方式作出的各种改变都涵盖在所附权利要求的范围内。

[0052] 为了更好地理解本发明而不是限制本发明的范围,在本发明中所用的表示用量、百分比的所有数字、以及其他数值,在所有情况下都应理解为以词语“大约”所修饰。因此,除非特别说明,否则在说明书和所附权利要求书中所列出的数字参数都是近似值,其可能会根据试图获得的理想性质的不同而加以改变。各个数字参数至少应被看作是根据所报告的有效数字和通过常规的四舍五入方法而获得的。另外,术语“包括”、“包含”、“含有”、“具有”等类似词语的含义是非限制性的,即可加入不影响结果的其它步骤和其它成分。

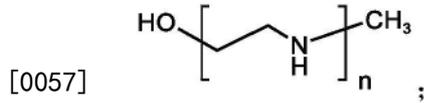
[0053] 为使本发明的上述目的、特征和优点能够更为明显易懂,下面结合附图对本发明的具体实施例做详细说明。

[0054] 本发明实施例提供了一种聚乙烯亚胺抗原的制备方法,参见图1,包括以下步骤:

[0055] S1、将聚乙烯亚胺、4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶1-氧基自由基和催化剂加入到溶剂A中溶解,进行氧化反应,反应完成后真空浓缩抽干,得到末端醛基修饰聚乙烯亚胺;需要

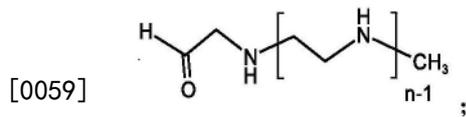
说明的是,步骤S1中反应后的产物中仅有少量未反应完的4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶1-氧基自由基和极少量的催化剂,均不影响后续实验;因此该步骤所得的反应产物可直接用于后续步骤,无需进行纯化处理;

[0056] 上述反应中,聚乙烯亚胺(PEI)的结构式如式(1)所示,n为大于或等于2的任意自然数:



式(1)

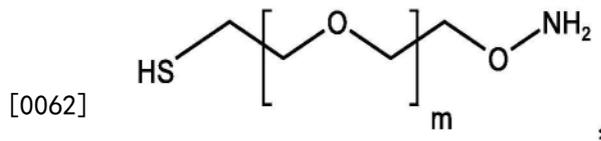
[0058] 末端醛基修饰聚乙烯亚胺(HOC-PEI)的结构式如式(2)所示:



式(2)

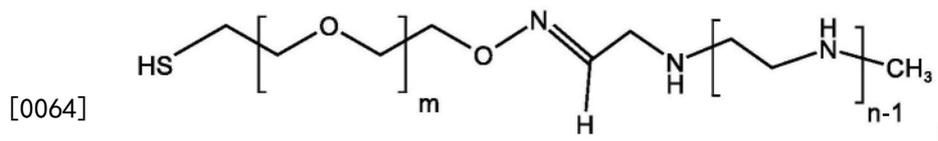
[0060] S2、将末端醛基修饰聚乙烯亚胺和巯基-聚乙二醇-羟胺溶于溶剂B中,加入pH调节剂,进行脎化反应,反应完成后纯化得到末端巯基修饰聚乙烯亚胺;

[0061] 上述反应中,巯基-聚乙二醇-羟胺(HS-PEG-OH₂)的结构式如式(3)所示,m为大于或等于1的任意自然数:



式(3)

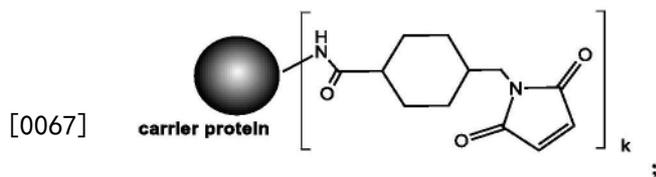
[0063] 末端巯基修饰聚乙烯亚胺(HS-PEG-PEI)的结构式如式(4)所示:



式(4)

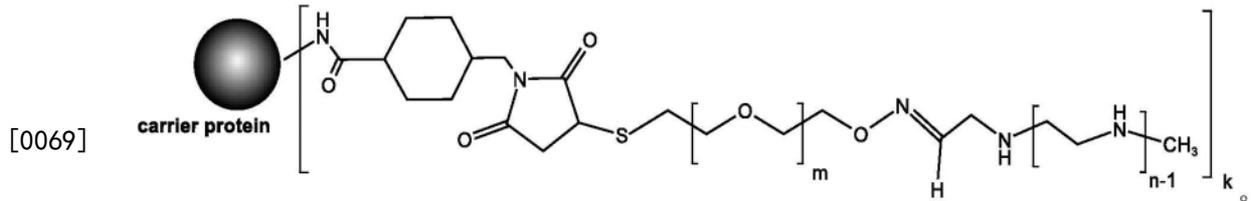
[0065] S3、将马来酰亚胺活化载体蛋白和末端巯基修饰聚乙烯亚胺溶于溶剂C中,进行迈克尔加成反应,反应完成后纯化得到载体蛋白偶联聚乙烯亚胺,即为本发明的PEI抗原;

[0066] 上述反应中,马来酰亚胺活化载体蛋白的结构式如式(5)所示,k为大于或等于1的任意自然数,carrier protein表示载体蛋白:



式(5)

[0068] 载体蛋白偶联聚乙烯亚胺(carrier protein-PEG-PEI)的结构式如式(6)所示:



式(6)

[0070] 目前有大量的研究资料表明聚乙烯亚胺(PEI)是一种优良的生物载体材料,但是关于PEI半抗原及抗原的制备方法尚未见报道。半抗原的设计和合成是完全抗原的关键步骤,决定最终得到抗体表面的抗原决定簇的特性。PEI作为一种小分子,无有效的免疫原性,为了克服该问题,本发明首先通过将线性化的PEI的末端残基氧化,形成自由醛基,之后通过巯基-聚乙二醇-羟胺(HS-PEG-OH₂)桥接,将聚乙烯亚胺偶联在载体蛋白上。HS-PEG-OH₂是一种异质双功能交联剂,其在PEG末端的一端具有游离硫醇/巯基,在另一端具有氨基氧(-ONH₂)官能团,通过氨基氧(-ONH₂)与PEI的末端醛基发生脎化反应,可将PEI接枝在PEG上,形成末端巯基修饰聚乙烯亚胺(HS-PEG-PEI),之后通过另一端的巯基与马来酰亚胺发生迈克尔加成反应,可将HS-PEG-PEI偶联在载体蛋白上,由此形成PEI抗原。本发明的PEI抗原通过HS-PEG-OH₂作为接头(linker),保证了PEI分子结构整体处于外端,延伸性好,而且维持了PEI分子结构的完整性和完全暴露了抗原表位,有利于提高免疫原性和所产生抗体的特异性;此外PEG接头水溶解、稳定性好,免疫原性差,能够在不影响抗原分子免疫性的前提下提供更好的溶解性,进一步增强抗原分子在动物体内的免疫响应。

[0071] 经动物实验验证,本发明的聚乙烯亚胺抗原免疫动物后,能够有效产生针对PEI的特异性抗体,以线性聚乙烯亚胺40K、线性聚乙烯亚胺25K、支化聚乙烯亚胺25K作为检测原,检测血清纯化后的抗体,结果显示抗体对对不同品牌、分子量以及结构的聚乙烯亚胺均有相对较好的识别效果,抗体效价可达到1:243000,有望应用于免疫检测PEI。

[0072] 在较佳的实施方式中,步骤S1中,聚乙烯亚胺、4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶1-氧基自由基和催化剂摩尔比为1:0.01-0.1:0.15-0.5。4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶1-氧基自由基用于提供氧自由基,使PEI末端羟基氧化为自由醛基,催化剂用于氧化催化作用,二者的加入量可以根据反应温度、反应效率等进行适当调整。

[0073] 可选地,步骤S1中,催化剂选自Fe(NO₃)₃,溶剂A选自有机溶剂,具体可以为乙腈,溶剂A中聚乙烯亚胺的摩尔浓度为0.05-5mol/L。

[0074] 可选地,步骤S1中,在室温进行氧化反应3-8h,具体地,反应3h、4h、5h、6h、7h或8h。

[0075] 在较佳的实施例中,步骤S2中,末端醛基修饰聚乙烯亚胺和巯基-聚乙二醇-羟胺摩尔比为1:1。可以理解的是,每一分子末端醛基修饰聚乙烯亚胺和每一分子巯基-聚乙二醇-羟胺发生脎化反应,因此优选二者的摩尔比为1:1,以保证底物之间充分反应。当然,为了提高反应效率,也可以适当使其中一种底物呈过量状态,如末端醛基修饰聚乙烯亚胺和巯基-聚乙二醇-羟胺的摩尔比为1:1.2或1.2:1。

[0076] pH调节剂用于提供弱酸性的反应条件,具体可以选择醋酸,醋酸的用量根据反应液的pH进行适量调整,以保证在弱酸性条件优选为pH 4.0-6.0下发生反应。

[0077] 聚乙烯亚胺和巯基-聚乙二醇-羟胺均为水溶性良好的反应底物,因此,优选步骤S2中,溶剂B为水,溶剂B中末端醛基修饰聚乙烯亚胺的摩尔浓度为1-10mol/L。

[0078] 可选地,步骤S2中,加热回流10-30min进行脎化反应,加热温度为90-100°C。

[0079] 本发明中马来酰亚胺活化载体蛋白可以通过载体蛋白与胺-巯基交联剂Sulfo-SMCC反应制得,Sulfo-SMCC中的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS酯)与蛋白质的伯胺反应可以形成稳定的酰胺键,进而生成稳定的马来酰亚胺活化的载体蛋白,其可与巯基在温和的偶联条件下自发反应,得到稳定的、共价连接的偶联物。

[0080] 具体地,载体蛋白选自牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白(HSA)、卵清蛋白(OVA)或钥孔血蓝蛋白(KLH)中的一种。

[0081] 在较佳的实施方式中,步骤S3中,马来酰亚胺活化载体蛋白和末端巯基修饰聚乙烯亚胺摩尔比为1:1-3。

[0082] 可选地,步骤S3中,溶剂C为TBS缓冲液(Tris-HCl缓冲盐溶液),溶剂C中末端巯基修饰聚乙烯亚胺的摩尔浓度为5-10mol/L。

[0083] 可选地,步骤S3中,室温进行迈克尔加成反应2-3h。

[0084] 步骤S2和步骤S3中,由于反应前后形成的反应产物与反应底物间具有明显的分子量大小差异,即,反应完成后,反应产物的分子量将明显大于反应底物,因此,可以通过透析或者超滤处理,具体而言,采用截留反应产物而透过反应底物的透析袋或超滤管以实现反应产物的纯化。示例性地,步骤S2中,采用的透析袋或超滤管的分子截留量为10kDa,可以通过透析换液或过滤有效去除HS-PEG-PEI中的4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶1-氧基自由基、催化剂、pH调节剂、巯基-聚乙二醇-羟胺等成分;步骤S3中,采用的透析袋或超滤管的分子截留量为50kDa,可以通过透析换液或过滤有效去除carrier protein-PEG-PEI中的PEI、HOC-PEI、HS-PEG-PEI等。为了减少杂质的引入或者提高产物浓度,优选采用超滤的方式进行反应产物的纯化。

[0085] 本发明又一实施例提供了如上所述的聚乙烯亚胺抗原的制备方法制备得到的聚乙烯亚胺抗原。

[0086] 所述聚乙烯亚胺抗原的制备方法制备得到的聚乙烯亚胺抗原与如上所述的聚乙烯亚胺抗原的制备方法相对于现有技术的优势相同,在此不再赘述。

[0087] 本发明再一实施例提供了一种免疫原性组合物,包含如上所述的聚乙烯亚胺抗原和药学上可接受的载体、赋形剂和/或佐剂。

[0088] 所述免疫原性组合物与如上所述的聚乙烯亚胺抗原相对于现有技术的优势相同,在此不再赘述。

[0089] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照制造厂商所建议的条件。

[0090] 下述实施例中,PEI(分子量40K)购自YEASEN,货号40816ES03;线性PEI(分子量25K)购自碧云天,货号C0537-100mg;支化PEI(分子量25K)购自碧云天,货号C0539-100mL;4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶1-氧基自由基(分子量172.24)购自TCI,货号H0865;HS-PEG-ONH₂(分子量5K)购自新研博美,货号:X-GF-0566-5k;L-半胱氨酸购自阿拉丁,货号C108237-100g);5,5'二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)购自阿拉丁,货号D105559-5g。其余常规试剂如Fe(NO₃)₃·9H₂O、乙腈、三(羟甲基)氨基甲烷(Tris base)、甘氨酸等购自国药集团,50kDa MWC0超滤管购自thermofisher,货号88540;10kDa MWC0超滤管购自thermofisher,货号88527。

[0091] 下述实施例中,以载体蛋白为KLH为例,马来酰亚胺活化mcKLH(分子量8000-9000kDa)购自thermofisher,货号77606。

[0092] 下述实施例中,免疫动物用的弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂购自北京博奥龙,货号分别为KX0210046Q-10和KX0210047Q-10。

[0093] 下述实施例中,血清效价检测用的384孔微孔板购自Greinerbio-one,货号781061;HRP Goat Anti-Rabbit IgG Secondary Antibody(H+L)购自Jackson ImmunoResearch,货号111-0005-046;HS-PEG-ONH₂购自新研博美,货号:X-GF-0566-5k; Sulfo-SMCC购自索莱宝,货号S7090-100mg;BSA购自Sigma,货号A1933-5G。

[0094] 下述实施例中,抗体纯化用的纯化柱购自Bio-Rad,货号Polv-Prep@Chromatography Columns:731-1550;填料PabPur SulfoLink Beads 4FF购自常州天地人和,货号SA069250;G250购自Biorox,货号EZ2811D337;Waters高效凝胶色谱仪; Ultrahydrogel 250色谱柱,购自Waters;2414型视差折光检测器,购自Waters。

[0095] 实施例1

[0096] 一种聚乙烯亚胺抗原的制备方法,包括以下步骤:

[0097] S1、将摩尔比为1:0.01:0.15的聚乙烯亚胺、4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶1-氧基自由基和催化剂Fe(NO₃)₃加入到乙腈中溶解,反应液中聚乙烯亚胺的摩尔浓度为0.05mol/L,4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶1-氧基自由基的摩尔浓度为0.5mmol/L,Fe(NO₃)₃的摩尔浓度为7.5mmol/L,在室温进行氧化反应5h,反应完成后真空浓缩抽干,得到末端醛基修饰聚乙烯亚胺;

[0098] S2、将摩尔比为1:1的末端醛基修饰聚乙烯亚胺和巯基-聚乙二醇-羟胺溶于水中,之后加入醋酸,反应液中末端醛基修饰聚乙烯亚胺的摩尔浓度为1mol/L,巯基-聚乙二醇-羟胺的摩尔浓度为1mol/L,醋酸的摩尔浓度为2mol/L,90°C加热回流10min进行脎化反应,反应完成后,使用10kDa超滤管将反应产物进行换液处理,去除产物中的4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶1-氧基自由基、催化剂、巯基-聚乙二醇-羟胺成分,得到末端巯基修饰PEI产物以及未反应完全的PEI和末端醛基修饰PEI混合物;由于PEI和末端醛基修饰PEI缺乏与步骤S3载体蛋白偶联的基团,因此,残留PEI和末端醛基修饰PEI对后续反应过程无影响,此步骤无需考虑完全除去,可在步骤S3反应完成后通过更高分子截留量的超滤管除去;

[0099] S3、将摩尔比为1:1的马来酰亚胺活化载体蛋白和末端巯基修饰聚乙烯亚胺溶于TBS缓冲液中,马来酰亚胺活化载体蛋白的摩尔浓度为5mol/L,末端巯基修饰聚乙烯亚胺的摩尔浓度为5mol/L,室温进行迈克尔加成反应2h,反应完成后,使用50kDa超滤管对反应产物混合物进行换液处理,去除未反应完全的PEI、末端醛基修饰PEI、末端巯基修饰PEI混合物,得到偶联PEI的KLH蛋白产物以及少量未反应的载体蛋白。由于未反应的载体蛋白不会影响PEI抗体的产生,因此,无需考虑除去未反应的载体蛋白。

[0100] 步骤S2反应产物测定:按照说明书操作,对步骤S2得到的产物进行高效凝胶色谱法检测,流动相为醋酸-醋酸盐缓冲液(0.2mol/L醋酸+0.1mol/L醋酸钠);检测器温度和柱温为40°C;流速1mL/min;进样量20μL;聚乙烯亚胺标准品采用市售的2种聚乙烯亚胺1:1混合而成,聚乙烯亚胺标准品1为PEI 40K(购自YEASEN,货号40816ES03),聚乙烯亚胺标准品2为线性PEI 25K(购自碧云天,货号C0537-100mg)。聚乙烯亚胺标准品高效凝胶色谱图如2所示,步骤S2反应产物的高效凝胶色谱图如3所示。

[0101] 由于巯基-聚乙二醇-羟胺(HS-PEG-OH₂)与末端醛基修饰聚乙烯亚胺(HOC-PEI)反应,形成了分子量增大的末端巯基修饰聚乙烯亚胺(HS-PEG-PEI),因此末端巯基修饰聚乙烯亚胺(HS-PEG-PEI)的出峰时间将相比于PEI和末端醛基修饰PEI靠前,而PEI和末端醛基修饰PEI由于分子量相差不大,出峰时间趋于一致。图3中峰图与理论预期相一致,说明步骤S2得到的产物主要为末端巯基修饰聚乙烯亚胺(HS-PEG-PEI)以及少量未反应完全的PEI和末端醛基修饰PEI混合物。

[0102] 步骤S3偶联效率测定,利用5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)作为巯基反应试剂,L-半胱氨酸作为标准指示剂,测定巯基含量反映偶联效率,具体包括以下步骤:

[0103] 1) 标准曲线的制备:①准确称取0.198175g DTNB用50mM Na₂HPO₄(pH=7.0)配制成50mL溶液,存放于棕色瓶中,于暗处低温保存备用。取1mL 10mM的DTNB标准液加99mL0.25M的Tris缓冲液配制成0.1mM的DTNB分析液,现用现配。②25°C条件下,用Tris缓冲液(0.25M, pH8.3)稀释L-半胱氨酸标准液(1mM),配成梯度稀释液,浓度梯度分别为:0.00mM、0.025mM、0.05mM、0.1mM、0.15mM、0.2mM。③取上述各浓度L-半胱氨酸稀释溶液1mL分别加入到5mL预先恒温于25°C水中的DTNB分析液(0.1mM),摇匀,静止10min,立即于波长412nm处测定吸光度值(A),绘制关于浓度-吸光度的标准曲线,结果见图4。

[0104] 2) 样品测定:①取上述步骤S2末端巯基修饰PEI的反应液1mL,用0.01M的PBS缓冲液稀释1000倍,配置成样品1,按照标准曲线的反应条件进行操作,测定反应后的吸光度A1,将吸光度带入标准曲线,得出样品浓度C1。②取上述步骤S3载体蛋白偶联聚乙烯亚胺反应液采用0.01M的PBS缓冲液溶解成1000倍,配置成样品溶液2,按照标准曲线的反应条件进行操作,测定反应后的吸光度A2,将吸光度带入标准曲线,得出样品浓度C2。样品1的浓度为2.4M,样品2的浓度为0.13M,可见,经过步骤S3的加成反应,反应液中巯基含量显著减少,说明末端巯基修饰PEI通过巯基偶联在载体蛋白上,合成了载体蛋白偶联PEI,经计算偶联效率为94.6%。

[0105] 实施例2

[0106] 一种聚乙烯亚胺抗原的制备方法,包括以下步骤:

[0107] S1、将摩尔比为1:0.1:0.5的聚乙烯亚胺、4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶1-氧基自由基和催化剂Fe(NO₃)₃加入到乙腈中溶解,反应液中聚乙烯亚胺的摩尔浓度为5mol/L,4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶1-氧基自由基的摩尔浓度为0.5mol/L,Fe(NO₃)₃的摩尔浓度为2.5mol/L,在室温进行氧化反应5h,反应完成后真空浓缩抽干,得到末端醛基修饰聚乙烯亚胺;

[0108] S2、将摩尔比为1:1.2末端醛基修饰聚乙烯亚胺和巯基-聚乙二醇-羟胺溶于水中,之后加入醋酸,反应液中末端醛基修饰聚乙烯亚胺的摩尔浓度为8mol/L,巯基-聚乙二醇-羟胺的摩尔浓度为9.6mol/L,醋酸的摩尔浓度为16mol/L,100°C加热回流30min进行脎化反应,反应完成后,使用10kDa超滤管将反应产物进行换液处理,去除产物中的4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶1-氧基自由基、催化剂、巯基-聚乙二醇-羟胺成分,得到末端巯基修饰PEI产物以及未反应完全的PEI和末端醛基修饰PEI混合物;

[0109] S3、将摩尔比为1:1的马来酰亚胺活化载体蛋白和末端巯基修饰聚乙烯亚胺溶于TBS缓冲液中,马来酰亚胺活化载体蛋白的摩尔浓度为10mol/L,末端巯基修饰聚乙烯亚胺的摩尔浓度为10mol/L,室温进行迈克尔加成反应3h,反应完成后,使用50kDa超滤管对反应

产物混合物进行换液处理,去除未反应完全的PEI、末端醛基修饰的PEI、末端巯基修饰的PEI混合物,得到偶联PEI的KLH蛋白产物以及少量未反应的载体蛋白。

[0110] 采用实施例1的方法测定步骤S2的反应产物,高效凝胶色谱图如5所示,从图中可以看出,本实施例步骤S2得到的产物主要为末端巯基修饰聚乙烯亚胺(HS-PEG-PEI)以及少量未反应完全的PEI和末端醛基修饰PEI混合物。

[0111] 采用实施例1的方法测定偶联效率,本实施例步骤S3的偶联效率为92.1%。

[0112] 实施例3

[0113] 一种聚乙烯亚胺抗原的制备方法,包括以下步骤:

[0114] S1、将摩尔比为1:0.05:0.3的聚乙烯亚胺、4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶1-氧基自由基和催化剂 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 加入到乙腈中溶解,反应液中聚乙烯亚胺的摩尔浓度为3mol/L,4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶1-氧基自由基的摩尔浓度为0.15mol/L, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 的摩尔浓度为0.9mol/L,在室温进行氧化反应5h,反应完成后真空浓缩抽干,得到末端醛基修饰聚乙烯亚胺;

[0115] S2、将摩尔比为1:1的末端醛基修饰聚乙烯亚胺、巯基-聚乙二醇-羟胺溶于水中,反应之后加入醋酸,反应液中末端醛基修饰聚乙烯亚胺的摩尔浓度为5mol/L,巯基-聚乙二醇-羟胺的摩尔浓度为5mol/L,醋酸的摩尔浓度为10mol/L,95°C加热回流25min进行脎化反应,反应完成后,使用10kDa超滤管将反应产物进行换液处理,去除产物中的4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶1-氧基自由基、催化剂、巯基-聚乙二醇-羟胺成分,得到末端巯基修饰PEI产物以及未反应完全的PEI和末端醛基修饰PEI混合物;

[0116] S3、将摩尔比为1:1的马来酰亚胺活化载体蛋白和末端巯基修饰聚乙烯亚胺溶于TBS缓冲液中,马来酰亚胺活化载体蛋白的摩尔浓度为7mol/L,末端巯基修饰聚乙烯亚胺的摩尔浓度为7mol/L,室温进行迈克尔加成反应2.5h,反应完成后,使用50kDa超滤管对反应产物混合物进行换液处理,去除未反应完全的PEI、末端醛基修饰的PEI、末端巯基修饰的PEI混合物,得到偶联PEI的KLH蛋白产物以及少量未反应的载体蛋白。

[0117] 采用实施例1的方法测定步骤S2的反应产物,高效凝胶色谱图如6所示,从图中可以看出,本实施例步骤S2得到的产物主要为末端巯基修饰聚乙烯亚胺(HS-PEG-PEI)以及少量未反应完全的PEI和末端醛基修饰PEI混合物。

[0118] 采用实施例1的方法测定偶联效率,本实施例步骤S3的偶联效率为93%。

[0119] 实施例4

[0120] 以实施例1制得的聚乙烯亚胺抗原进行动物免疫,包括以下步骤:1)取0.3mg载体蛋白偶联聚乙烯亚胺,使用500 μL 完全弗氏佐剂混匀后制成针剂,用于第一次免疫;2)取0.15mg载体蛋白偶联聚乙烯亚胺,使用500 μL 弗氏不完全佐剂混匀后制成针剂,用于后续的加强免疫。3)按照下述表1中的方案,免疫2只日本大耳兔,免疫结束后,收集血清,进行血清效价检测。

[0121] 表1本发明的聚乙烯亚胺抗原免疫动物周期

[0122]

免疫次数	免疫周期	免疫剂量	免疫佐剂	免疫动物状态
第一次免疫	1天	0.3mg	完全弗氏佐剂	良好
第二次免疫	12天	0.15mg	不完全弗氏佐剂	良好
第三次免疫	26天	0.15mg	不完全弗氏佐剂	良好

第四次免疫	40天	0.15mg	不完全弗氏佐剂	良好
免疫动物采血	52天			采血正常

[0123] 血清效价检测采用酶联免疫吸附法 (ELISA), 包括以下步骤: 1) 正、负包被抗原的制备: 按照说明书的方法, 将末端巯基修饰PEI使用SMCC偶联BSA后作为正包被抗原, HS-PEG-ONH₂使用SMCC偶联BSA后作为负包被抗原, 分别对免疫后的血清效价进行ELISA检测。2) 血清效价进行ELISA检测, 具体操作如下: (1) 正包被原与负包被原分别在微孔板上按照每孔包被1 μ g/mL, 100 μ L/孔, 加样完成后, 保鲜膜紧密包裹4 $^{\circ}$ C过夜或37 $^{\circ}$ C温育2h; (2) 将孔底的液体甩出, 在洁净毛巾上拍干, 洗板3次, 再置于洁净毛巾上拍干; (3) 加入200 μ L/孔脱脂牛奶封闭液, 盖上锡箔纸盖, 37 $^{\circ}$ C温箱静置2h; (4) 重复操作(2); (5) 血清1:1000 (1:1K) 起按照三倍稀释8个梯度, 将稀释后的血清分别加入孔中, 37 $^{\circ}$ C温育1h; (6) 每孔加入100 μ L的1:10000稀释的Goat Anti-Rabbit IgG Secondary Antibody, 盖上锡箔纸盖, 37 $^{\circ}$ C温育50min; (7) 重复操作(2); (8) 每孔加入100 μ L的TMB显色液, 盖上锡箔纸盖, 37 $^{\circ}$ C温育10min, 然后每孔加入100 μ L的2M硫酸终止液; (9) 测量450nm下OD值, 判断抗体效价, 正、负包被抗原免疫血清效价检测结果分别见图7-8。

[0124] 从ELISA检测结果来看, 采用聚乙烯亚胺抗原免疫动物, 在血清1:2187K稀释的样品中, 2只兔子的吸光度均大于阴性血清的吸光度数值。而以HS-PEG-ONH₂作为负包被抗原免疫动物, 在血清1:27K的稀释样品中, 其吸光度比阴性血清吸光度数值低, 说明聚乙烯亚胺抗原中用作接头的HS-PEG-ONH₂没有在动物体内引起有效的免疫反应, 免疫动物中所产生的抗体基本不识别HS-PEG-ONH₂, 对比正、负包被抗原的检查结果, 可证实免疫动物血清中产生了针对PEI的抗体。

[0125] 实施例5

[0126] 对实施例4中的正包被抗原免疫血清进行纯化, 纯化柱采用Bio-Rad的731-1550层析空柱 (低压重力柱), 填料采用天地人和的PabPur SulfoLink Beads 4FF, 可以通过与巯基的反应实现抗原的固定化, 进而对免疫血清中的抗体进行纯化。纯化过程如下: 1) 层析柱的制备: 按照说明书的方法, 取1mL填料进行清洗, 将8mg末端巯基修饰PEI与清洗后的填料进行混合, 4 $^{\circ}$ C偶联4h, 再次清洗填料后, 按照说明书操作进行封闭处理, 室温封闭2-4h, 封闭结束后使用0.01M的PBS和0.1M的甘氨酸 (pH 4.0) 交替清洗, 清洗结束即制得纯化所需的抗原亲和层析柱。2) 血清纯化: (1) 将血清与填料进行混合, 4 $^{\circ}$ C孵育2-4h; (2) 分离血清与填料, 收集填料, 采用0.01M的PBS清洗填料, 流完后用G250检测 (取100 μ L G250于96孔板中, 加入10 μ L正在滴出的清洗液), 洗至G250不变蓝为止; (3) 加入0.1M的pH 2.2甘氨酸进行洗脱, 收集洗脱液, 直至G250不变蓝为止; (4) 加入1M的Tris缓冲液 (pH 9.0) 用于调节抗体溶液的pH至中性。

[0127] 对纯化抗体进行定量, 采用NanoDrop One仪器, 按照说明书操作, 对抗体浓度进行测定, 检测得到兔1的抗体浓度为1.5mg/mL, 总量3mg; 兔2的抗体浓度2mg/mL, 总量2.8mg。

[0128] 对上述纯化抗体采用Dot blot法进行效价检测, 抗原采用聚乙烯亚胺40K (购自YEASEN, 货号40816ES03)、线性聚乙烯亚胺25K (购自碧云天, 货号C0537-100mg) 和支化聚乙烯亚胺25K (购自碧云天, 货号C0539-100mL), 具体操作如下: (1) 将前述包被原分别稀释至50ng/ μ L, 取2 μ L稀释液点在NC膜中间, 即包被量为100ng; (2) 将NC膜及膜下面的蓝色保护纸一起放入37 $^{\circ}$ C烘箱中30min; (3) 以1 \times TBST为缓冲体系, 配制质量体积比为3%的脱脂牛奶

作为封闭液和稀释液；(4) 每块膜(每个样)加入1mL封闭液,封闭处理1h；(5) 将纯化所得抗体使用封闭液稀释至1 μ g/mL,后续按3倍梯度稀释,梯度为1:1K、1:3K、1:9K、1:27K、1:81K、1:243K,即一抗浓度依次为1000ng/mL、333ng/mL、111ng/mL、37ng/mL、12ng/mL、4ng/mL；(6) 封闭完成后,将封闭液倒掉,加入相应的一抗稀释液1mL,晃动孵育2h；(7) 孵育完成后,倒掉一抗稀释液,加入TBST 2mL洗膜,洗膜重复4次；(8) 用TBST将二抗以1:8000稀释为二抗工作液,洗膜完成后加入1mL二抗工作液,孵育1h；(9) 将NC膜取出,清洗4次,加入100 μ L显影液,放入化学发光图像分析系统中。

[0129] 线性PEI 40K、线性PEI 25K、支化PEI 25K作为检测原检测血清纯化后的抗体效价结果分别见图9-11, Dot blot法检测结果显示抗体对线性PEI 40K具有最好的识别效果,同时对不同品牌、分子量以及结构的聚乙烯亚胺均有相对较好的识别效果,可以认为经过对血清的纯化,得到了针对PEI的纯化抗体,且抗体效价高,抗体效价可达到1:243000。

[0130] 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、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

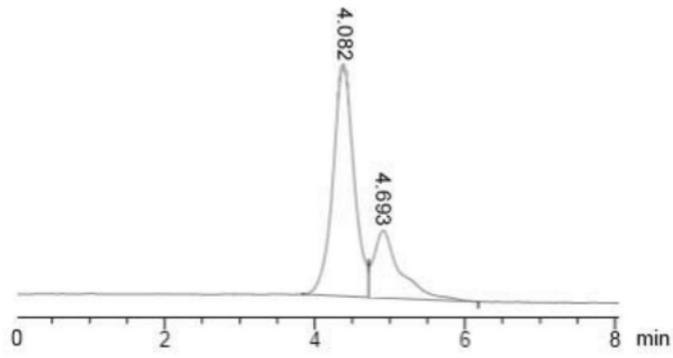


图3

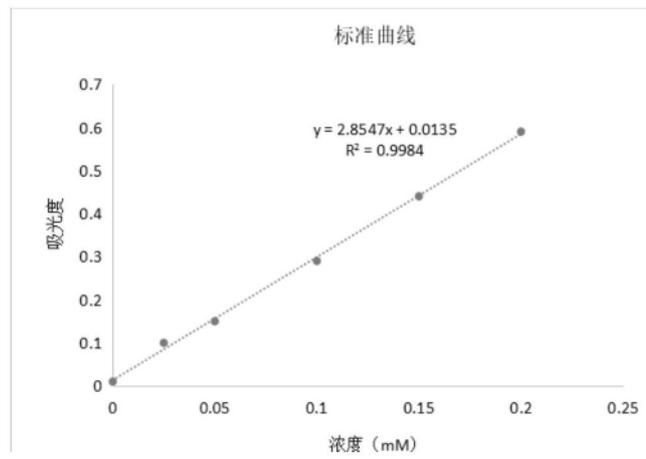


图4

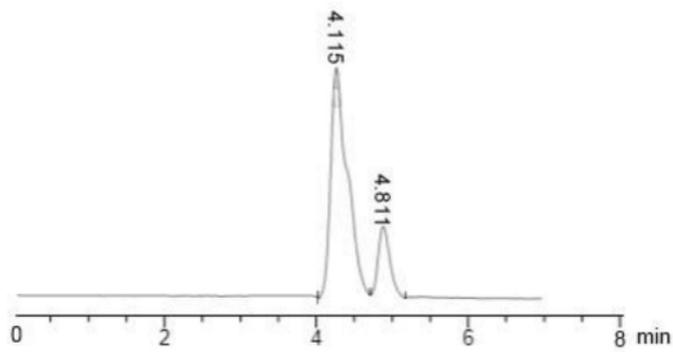


图5

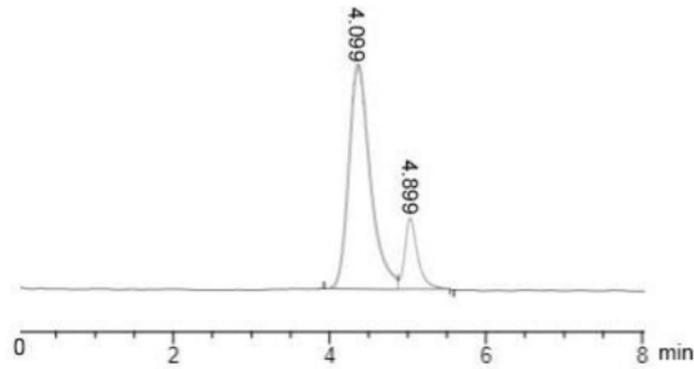


图6

4th Antiserum												
Coating concentration: 2ug/mL, 25ul/well in PBS buffer with coating antigen												
Antiserum: 25μl/well												
Secondary Antibody: HRP Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)[Jackson ImmunoResearch, 111-005-046]												
Secondary Antibody dilution ratio: 1:5000												
GASZ	Blank	Blank	Negative Control 1:1K	Negative Control 1:81K	Positive 1:1K	Positive 1:3K	Positive 1:9K	Positive 1:27K	Positive 1:81K	Positive 1:243K	Positive 1:729K	Positive 1:2187K
兔1	0.023	0.024	0.025	0.022	1.755	1.646	1.682	1.554	1.429	1.109	0.664	0.29
兔2	0.022	0.024	0.021	0.022	1.792	1.696	1.592	1.324	0.897	0.402	0.162	0.068

图7

4th Antiserum												
Coating concentration: 2ug/mL, 25ul/well in PBS buffer with coating antigen												
Antiserum: 25μl/well												
Secondary Antibody: HRP Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)[Jackson ImmunoResearch, 111-005-046]												
Secondary Antibody dilution ratio: 1:5000												
GASZ	Blank	Blank	Negative Control 1:1K	Negative Control 1:81K	Positive 1:1K	Positive 1:3K	Positive 1:9K	Positive 1:27K	Positive 1:81K	Positive 1:243K	Positive 1:729K	Positive 1:2187K
兔1	0.022	0.023	0.026	0.021	0.25	0.2	0.15	0.02	0.011	0.009	0.008	0.001
兔2	0.021	0.022	0.024	0.019	0.28	0.21	0.11	0.018	0.01	0.006	0.008	0.002

图8

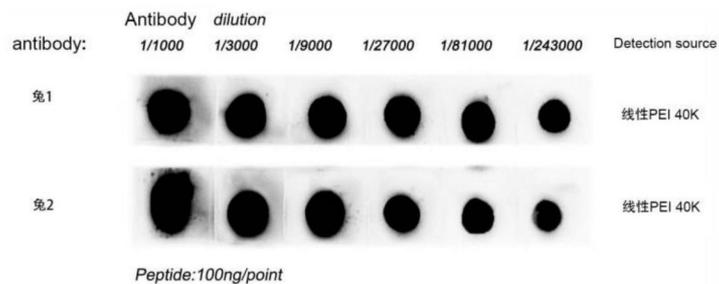


图9

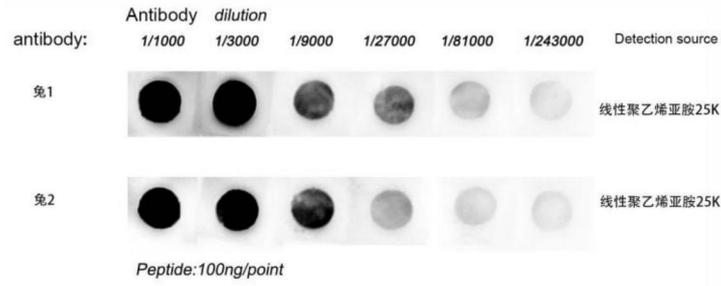


图10

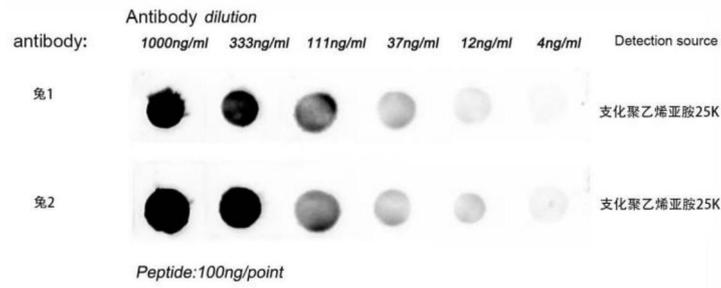


图11