



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103328448 A

(43) 申请公布日 2013. 09. 25

---

(21) 申请号 201180065600. 0 (51) Int. Cl.  
(22) 申请日 2011. 11. 21 *G07D 215/233*(2006. 01)  
(30) 优先权数据 *G01N 33/53*(2006. 01)  
P201031721 2010. 11. 23 ES  
(85) PCT申请进入国家阶段日  
2013. 07. 22  
(86) PCT申请的申请数据  
PCT/ES2011/070800 2011. 11. 21  
(87) PCT申请的公布数据  
W02012/069683 ES 2012. 05. 31  
(71) 申请人 科学研究高级委员会  
地址 西班牙马德里  
(72) 发明人 M·P·马克克拉斯  
F·J·桑谢滋巴埃萨  
D·冈萨雷斯皮纳乔  
(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专  
利商标事务所 11038  
代理人 傅宇昌

权利要求书4页 说明书20页

---

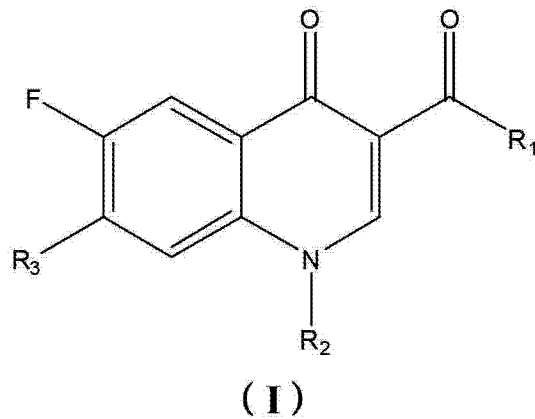
(54) 发明名称

半抗原和免疫反应试剂以及其在获得关于喹诺酮类的家族抗体和免疫测定法中的用途

(57) 摘要

本发明涉及半抗原、免疫原和次级免疫反应试剂,其用于获得针对喹诺酮类型抗生素的广谱抗体的用途,其在免疫化学分析技术中的应用,和使得能够在源自动物来源食品的生物样品中检测所述抗生素的试剂盒。

1. 式(I)的化合物：



其中，

$R_1$  选自 OH、 $O-C_1-C_{10}$  烷基、 $OR_4$ 、 $NHR_4$ ，其中  $R_4$  为免疫原性载体；

$R_2$  选自 H、 $C_3-C_{10}$  烷基、 $-(CH_2)_m-R_5R_6$ ，其中  $m$  为 3 至 6 的值，当  $R_5$  选自 O 或 NH 时；或者  $m$  为 1 至 6 的值，当  $R_5$  为 S 且  $R_6$  选自 H 或  $C_1-C_6$  烷基、芳基、烷基芳基、 $R_4$  或  $LR_4$  时，其中 L 为双官能连接化合物；

$R_3$  选自杂环、卤素或  $NR_7R_8$ ，其中  $R_7$  和  $R_8$  独立地选自 H 或  $C_1-C_6$  烷基、 $-(CH_2)_n-R_9R_{10}$ ，其中  $n$  为 1 至 6 的值， $R_9$  选自 S、O 或 NH，并且  $R_{10}$  选自 H 或  $C_1-C_6$  烷基、芳基、烷基芳基、 $R_4$  或  $LR_4$ ，或者其盐、异构体或溶剂化物。

2. 根据权利要求 1 的化合物，其中  $R_1$  为  $O-C_1-C_6$  烷基。

3. 根据权利要求 2 的化合物，其中  $R_1$  为 O- 乙基。

4. 根据权利要求 1 的化合物，其中  $R_1$  为 OH。

5. 根据权利要求 1 的化合物，其中  $R_1$  为  $NHR_4$ ，其中  $R_4$  为选自牛血清白蛋白、伴刀豆球蛋白 A、卵清蛋白、辣根过氧化物酶、匙孔虫凝血蛋白或鲑血蓝蛋白的蛋白质。

6. 根据权利要求 1 至 5 中任一项的化合物，其中  $R_2$  为  $(CH_2)_3-R_5R_6$ ，其中  $R_5$  和  $R_6$  如在权利要求 1 中那样定义。

7. 根据权利要求 6 的化合物，其中  $R_5$  为 S 且  $R_6$  选自 H 或  $LR_4$ ，其中 L 为马来酰亚胺基丙酸酰基或碘乙酰基，并且  $R_4$  为选自牛血清白蛋白、伴刀豆球蛋白 A、卵清蛋白、辣根过氧化物酶、匙孔虫凝血蛋白或鲑血蓝蛋白的蛋白质。

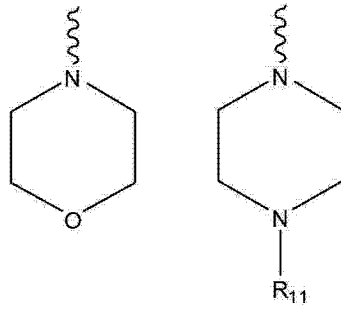
8. 根据权利要求 1 至 5 中任一项的化合物，其中  $R_2$  为  $C_3-C_6$  烷基。

9. 根据权利要求 8 的化合物，其中  $R_2$  为丙基。

10. 根据权利要求 1 至 9 中任一项的化合物，其中  $R_3$  选自卤素或杂环。

11. 根据权利要求 10 的化合物，其中  $R_3$  选自氟或氯。

12. 根据权利要求 1 至 9 中任一项的化合物，其中  $R_3$  选自下列基团：



其中  $R_{11}$  为  $C_1-C_6$  烷基。

13. 根据权利要求 12 的化合物, 其中  $R_{11}$  为甲基。

14. 根据权利要求 1 至 9 中任一项的化合物, 其中  $R_3$  为  $NR_7R_8$ , 其中  $R_7$  和  $R_8$  为相同或不同的  $C_1-C_6$  烷基基团。

15. 根据权利要求 14 的化合物, 其中  $R_7$  和  $R_8$  为乙基。

16. 根据权利要求 1 至 9 中任一项的化合物, 其中  $R_3$  为  $NR_7R_8$ , 其中  $R_7$  为氢且  $R_8$  为经取代的  $C_1-C_6$  烷基基团。

17. 根据权利要求 16 的化合物, 其中  $R_3$  为  $-NH(CH_2)_2NH_2$ 。

18. 根据权利要求 16 的化合物, 其中  $R_3$  为  $-NH(CH_2)_2NHLR_4$ , 其中 L 为 2, 4-二氯-1, 3, 5-三嗪, 并且  $R_4$  为选自牛血清白蛋白、伴刀豆球蛋白 A、卵清蛋白、辣根过氧化物酶、匙孔虫凝血蛋白或鲑血凝蛋白的蛋白质。

19. 选自下组的式 (I) 的化合物:

- 6, 7-二氟-4-氧代-1-丙基-1, 4-二氢喹啉-3-羧酸乙酯,
- 1-(3-(二苯甲基硫基)丙基)-7-氯-6-氟-4-氧代-1, 4-二氢喹啉-3-羧酸乙酯,
- 1-(3-(二苯甲基硫基)丙基)-6, 7-二氟-4-氧代-1, 4-二氢喹啉-3-羧酸乙酯,
- 6, 7-二氟-4-氧代-1, 4-二氢喹啉-3-羧酸,
- 6, 7-二氟-4-氧代-1-丙基-1, 4-二氢喹啉-3-羧酸,
- 1-(3-(二苯甲基硫基)丙基)-6, 7-二氟-4-氧代-1, 4-二氢喹啉-3-羧酸,
- 6-氟-7-(N-吗啉基)-4-氧代-1, 4-二氢喹啉-3-羧酸,
- 6-氟-7-(N-吗啉基)-4-氧代-1-丙基-1, 4-二氢喹啉-3-羧酸,
- 7-(2-氨基乙基氨基)-6-氟-4-氧代-1-丙基-1, 4-二氢喹啉-3-羧酸,
- 7-(二乙基氨基)-6-氟-4-氧代-1-丙基-1, 4-二氢喹啉-3-羧酸,
- 1-(3-(二苯甲基硫基)丙基)-6-氟-7-(N-吗啉基)-4-氧代-1, 4-二氢喹啉-3-羧酸,
- 1-(3-(二苯甲基硫基)丙基)-6-氟-4-氧代-7-(N-哌嗪基)-1, 4-二氢喹啉-3-羧酸,
- 6-氟-7-(4-甲基哌嗪-1-基)-4-氧代-1-丙基-1, 4-二氢喹啉-3-羧酸,
- 6-氟-1-(3-巯基丙基)-7-(N-吗啉基)-4-氧代-1, 4-二氢喹啉-3-羧酸,
- 6-氟-1-(3-巯基丙基)-4-氧代-7-(N-哌嗪基)-1, 4-二氢喹啉-3-羧酸,
- 1-[3-(2-乙酰胺 BSA) 巯基丙基]-6-氟-7-(N-吗啉基)-4-氧代-1, 4-二氢喹啉-3-羧酸,
- 1-[3-(2, 5-二氧代-1-(3-(甲酰胺 BSA) 丙基)-吡咯烷-3-基硫基)丙

基]-6-氟-4-氧代-7-(N-哌嗪基)-1,4-二氢喹啉-3-羧酸，  
— 1-[3-(2-乙酰胺 HCH) 硫基丙基]-6-氟-7-(N-哌嗪基)-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-羧酸，  
— 1-[3-(2-乙酰胺 BSA) 硫基丙基]-6-氟-7-(N-哌嗪基)-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-羧酸，  
— 6,7-二氟-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 BSA，  
— 6,7-二氟-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 CONA，  
— 6,7-二氟-1-丙基-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 BSA，  
— 6,7-二氟-1-丙基-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 CONA，  
— 6-氟-7-(N-吗啉基)-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 BSA，  
— 6-氟-7-(N-吗啉基)-4-氧代-1-丙基-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 BSA，  
— 7-[2-(乙酰胺 BSA) 乙基氨基]-6-氟-4-氧代-1-丙基-1,4-二氢喹啉-3-羧酸，  
— 7-(二乙基氨基)-6-氟-4-氧代-1-丙基-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 BSA，  
— 7-(二乙基氨基)-6-氟-4-氧代-1-丙基-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 CONA，  
— 6-氟-7-(4-甲基哌嗪-1-基)-4-氧代-1-丙基-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 BSA，  
— 6-氟-7-(4-甲基哌嗪-1-基)-4-氧代-1-丙基-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 CONA，  
— 7-[2-(4-氯-6-HRP-1,3,5,-三嗪-2-基氨基) 乙基氨基]-6-氟-4-氧代-1-丙基-1,4-二氢喹啉-3-羧酸；

或者其盐、异构体或溶剂化物。

20. 根据权利要求 1 至 19 中任一项的式(I)的化合物用于获得针对喹诺酮类型抗生素的抗体的用途。

21. 根据权利要求 20 的用途，其中所述抗生素选自马波沙星、恩氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星、沙氟沙星、奥索利酸、氟甲喹、氧氟沙星、达氟沙星或二氟沙星。

22. 用于获得针对喹诺酮类型抗生素的抗体的方法，其包括：

a) 使用双官能连接化合物来活化免疫原性载体，

b) 使在(a)中活化的免疫原性载体与根据权利要求 1 至 19 中任一项的式(I)的化合物相缀合，

c) 用在(b)中获得的缀合物对非人动物进行免疫接种，

d) 提取在(c)中产生的抗体。

23. 根据权利要求 22 的方法，其中所述免疫原性载体选自牛血清白蛋白、卵清蛋白、伴刀豆球蛋白 A、辣根过氧化物酶、鲎血蓝蛋白、匙孔虫戚血蓝蛋白。

24. 根据权利要求 22 或 23 中任一项的方法，其中所述免疫原性载体的活化通过将其与琥珀酰亚胺酯或碳二亚胺反应来进行。

25. 通过根据权利要求 22 至 24 中任一项的方法可获得的抗体。

26. 根据权利要求 25 的抗体用于在分离的生物样品中检测和/或定量喹诺酮类型抗生素的用途。

27. 根据权利要求 1 至 19 中任一项的式(I)的化合物作为次级免疫反应试剂以用于在分离的生物样品中检测和/或定量喹诺酮类型抗生素的用途。

28. 根据权利要求 26 或 27 的用途，其中所述生物样品源自旨在供食品消费使用的动物

来源产品。

29. 根据权利要求 28 的用途,其中所述动物来源产品为奶。

30. 用于检测和 / 或定量喹诺酮类型抗生素的试剂盒,其包含至少一种根据权利要求 25 的抗体或至少一种根据权利要求 1 至 19 中任一项的式(I)的化合物。

31. 根据权利要求 30 的检测试剂盒用于在动物来源食品中测定和 / 或定量喹诺酮类型抗生素的用途。

## 半抗原和免疫反应试剂以及其在获得关于喹诺酮类的家族 抗体和免疫测定法中的用途

[0001] 本发明涉及半抗原、免疫原和次级免疫反应试剂,其用于获得针对喹诺酮类型抗生素的广谱抗体的用途,和其在用于分析生物样品中的所述抗生素的免疫化学技术中的应用。

### 现有技术

[0002] 食品的营养品质、其可获得性和其安全性对于社会福利来说是关键要素。提高动物生产力的需要已导致在不合适的情形下使用兽医学药物。

[0003] 更具体而言,以治疗目的使用喹诺酮类型抗生素,但也以预防目的进行使用,其目的是在具有高圈养密度的农场中防止疾病。以这种方式,促进了细菌抗性机制的形成,从而在当所述细菌是人类疾病的根源时,剧烈地降低了治疗效力。

[0004] 因此,欧洲医药产品评价机构(EMEA)已经在关于食品安全的 Directive2377/90/CE 中确立了在各种不同的动物来源食品中的最大残留限量(MRL, Maximum Residue Limit)。还向检验实验室强制实行了一系列规范,其涉及取样频率和在这些产品到达消费者之前要控制的物质的数目(Directive96/23/CE)。这产生了施行高次数的分析的需要。

[0005] 目前用于检测喹诺酮类的技术主要是气相色谱-质谱联用法(GC-MS)和具有各种不同检测类型(主要是紫外线和质谱法)的高效液相色谱法(HPLC)(Hernández-Artés, J. Chromatography A. 2002, 945, 1-24)。这些技术的主要缺点是,它们要求复杂的仪器和熟练的人员,此外还需要样品的事先准备,这延长了分析时间。

[0006] 还采用微生物学类型的测定法,其尽管花费较少,但在结果获得方面的延迟连同其本身的方法学一起使得它们作为快速警报方法变得不可行。因此,现行的用于样品分析和制备的方法未充分地满足法规为保护公共卫生所需要的要求。免疫化学方法提供了重大的优点,例如筛选方法,这归因于其简单性、费用和高的处理能力。

[0007] 在文献中已经描述了各种不同的用于喹诺酮类的一般性免疫测定法。在所有情况下,免疫接种用的半抗原是通过在位置 3 处的羧酸(Holtzapfel, Food and Agric. Immunol. 1997, 9, 13-26 ; Bucknall, Food Additives and Contaminants. 2003, 20, 221-228 ; Wang, Anal. Chem. 2007, 79, 4471-4483) 或者通过在位置 7 处的哌嗪残基(Huet, J. Agric. Food Chem. 2006, 54, 2822-2827)与免疫原性蛋白质相连接的商业喹诺酮,如此封闭了喹诺酮类家族的共同的且重要的表位。

[0008] 现有技术并未致力于通过位置 1 来将喹诺酮半抗原连接至免疫原性载体的方法。以这种方式,所述半抗原保留了喹诺酮类的所有特征性表位,从而使其对于宿主动物免疫系统的暴露最大化并同时使该类型化合物的酸碱特性保持完整。

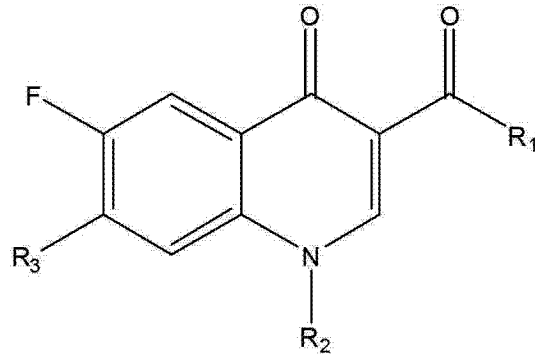
[0009] 本发明提供了所述半抗原和衍生自这些半抗原的免疫反应试剂,其在获得针对喹诺酮类的经改善的家族抗体中是有用的,并且当在用于检测喹诺酮类的免疫测定法中进行使用时,其提供更好的帮助。

[0010] 发明描述

[0011] 本发明涉及一组从化学观点来看在结构上与喹诺酮类型抗生素有关的半抗原。同样地,本发明还涉及由于将所述半抗原与免疫原性载体相连接而得到的免疫反应试剂,和这些试剂在获得具有对于喹诺酮类家族的类别选择性的抗体中的用途。再者,本发明还涉及在用于分析生物样品中的喹诺酮类的免疫化学方法中任一种所述免疫反应试剂作为次级免疫反应试剂的应用以及从任一种所述免疫反应试剂产生的任一种抗体的应用。

[0012] 在第一个方面,本发明涉及式(I)的化合物:

[0013]



(I)

[0014] 其中,

[0015] R<sub>1</sub> 选自 OH、O-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、OR<sub>4</sub>、NHR<sub>4</sub>, 其中 R<sub>4</sub> 为免疫原性载体;

[0016] R<sub>2</sub> 选自 H、C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sub>5</sub>R<sub>6</sub>, 其中 m 为 3 至 6 的值, 当 R<sub>5</sub> 选自 O 或 NH 时; 或者 m 为 1 至 6 的值, 当 R<sub>5</sub> 为 S 且 R<sub>6</sub> 选自 H、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基、芳基、烷基芳基、R<sub>4</sub> 或 LR<sub>4</sub> 时, 其中 L 为双官能连接化合物;

[0017] R<sub>3</sub> 选自杂环、卤素或 NR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>, 其中 R<sub>7</sub> 和 R<sub>8</sub> 独立地选自 H、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sub>9</sub>R<sub>10</sub>, 其中 n 为 1 至 6 的值, R<sub>9</sub> 选自 S、O 或 NH, 并且 R<sub>10</sub> 选自 H 或 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基、芳基、烷基芳基、R<sub>4</sub> 或 LR<sub>4</sub>,

[0018] 或者其盐、异构体或溶剂化物。

[0019] 优选地, R<sub>1</sub> 为 O-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基, 和更优选地, 为 O- 乙基。

[0020] 优选地, R<sub>1</sub> 为 OH。

[0021] 优选地, R<sub>1</sub> 为 NHR<sub>4</sub>, 其中 R<sub>4</sub> 为蛋白质, 和更优选地, R<sub>4</sub> 选自牛血清白蛋白(BSA)、伴刀豆球蛋白 A (CONA)、卵清蛋白、辣根过氧化物酶(HRP)、匙孔虫戚血蓝蛋白(KLH)或鲑血蓝蛋白(HCH)。

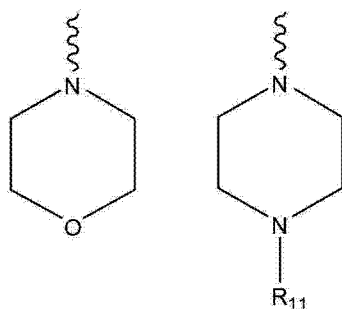
[0022] 优选地, R<sub>2</sub> 为 -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-SR<sub>6</sub>, 其中 R<sub>6</sub> 选自 H 或 LR<sub>4</sub>, L 选自马来酰亚胺基丙酸酰基和碘乙酰基, 并且 R<sub>4</sub> 选自 BSA、CONA、HRP 或 HCH。

[0023] 优选地, R<sub>2</sub> 为 C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> 烷基, 和更优选地, R<sub>2</sub> 为丙基。

[0024] 优选地, R<sub>3</sub> 选自卤素或杂环。更优选地, R<sub>3</sub> 选自氟或氯。

[0025] 优选地, R<sub>3</sub> 选自下列基团:

[0026]



[0027] 其中  $R_{11}$  为  $C_1-C_6$  烷基, 和更优选地, 为甲基。

[0028] 优选地,  $R_3$  为  $NR_7R_8$ , 其中  $R_7$  和  $R_8$  为相同或不同的  $C_1-C_6$  烷基基团。更优选地,  $R_7$  和  $R_8$  为乙基。

[0029] 优选地,  $R_3$  为  $NR_7R_8$ , 其中  $R_7$  为 H 且  $R_8$  为经取代的  $C_1-C_6$  烷基基团。更优选地,  $R_3$  为  $-NH(CH_2)_2NH_2$ 。

[0030] 优选地, 式(I) 的化合物选自下组:

[0031] — 6,7-二氟-4-氧代-1-丙基-1,4-二氢喹啉-3-羧酸乙酯,

[0032] — 1-(3-(二苯甲基硫基)丙基)-7-氟-6-氟-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-羧酸乙酯,

[0033] — 1-(3-(二苯甲基硫基)丙基)-6,7-二氟-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-羧酸乙酯,

[0034] — 6,7-二氟-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-羧酸,

[0035] — 6,7-二氟-4-氧代-1-丙基-1,4-二氢喹啉-3-羧酸,

[0036] — 1-(3-(二苯甲基硫基)丙基)-6,7-二氟-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-羧酸,

[0037] — 6-氟-7-(N-吗啉基)-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-羧酸,

[0038] — 6-氟-7-(N-吗啉基)-4-氧代-1-丙基-1,4-二氢喹啉-3-羧酸,

[0039] — 7-(2-氨基乙基氨基)-6-氟-4-氧代-1-丙基-1,4-二氢喹啉-3-羧酸,

[0040] — 7-(二乙基氨基)-6-氟-4-氧代-1-丙基-1,4-二氢喹啉-3-羧酸,

[0041] — 1-(3-(二苯甲基硫基)丙基)-6-氟-7-(N-吗啉基)-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-羧酸,

[0042] — 1-(3-(二苯甲基硫基)丙基)-6-氟-4-氧代-7-(N-哌嗪基)-1,4-二氢喹啉-3-羧酸,

[0043] — 6-氟-7-(4-甲基哌嗪-1-基)-4-氧代-1-丙基-1,4-二氢喹啉-3-羧酸,

[0044] — 6-氟-1-(3-硫基丙基)-7-(N-吗啉基)-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-羧酸,

[0045] — 6-氟-1-(3-硫基丙基)-4-氧代-7-(N-哌嗪基)-1,4-二氢喹啉-3-羧酸,

[0046] — 1-[3-(2-乙酰胺 BSA) 硫基丙基]-6-氟-7-(N-吗啉基)-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-羧酸,

[0047] — 1-[3-(2,5-二氧代-1-(3-(甲酰胺 BSA) 丙基)-吡咯烷-3-基硫基)丙基]-6-氟-4-氧代-7-(N-哌嗪基)-1,4-二氢喹啉-3-羧酸,

[0048] — 1-[3-(2-乙酰胺 HCH) 硫基丙基]-6-氟-7-(N-哌嗪基)-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-羧酸,

[0049] — 1-[3-(2-乙酰胺 BSA) 硫基丙基]-6-氟-7-(N-哌嗪基)-4-氧代-1,4-二氢

喹啉-3-羧酸，

- [0050] - 6,7-二氟-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 BSA，  
 [0051] - 6,7-二氟-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 CONA，  
 [0052] - 6,7-二氟-1-丙基-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 BSA，  
 [0053] - 6,7-二氟-1-丙基-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 CONA，  
 [0054] - 6-氟-7-(N-吗啉基)-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 BSA，  
 [0055] - 6-氟-7-(N-吗啉基)-4-氧代-1-丙基-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 BSA，  
 [0056] - 7-[2-(乙酰胺 BSA)乙基氨基]-6-氟-4-氧代-1-丙基-1,4-二氢喹啉-3-羧酸，  
 [0057] - 7-(二乙基氨基)-6-氟-4-氧代-1-丙基-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 BSA，  
 [0058] - 7-(二乙基氨基)-6-氟-4-氧代-1-丙基-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 CONA，  
 [0059] - 6-氟-7-(4-甲基哌嗪-1-基)-4-氧代-1-丙基-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 BSA，  
 [0060] - 6-氟-7-(4-甲基哌嗪-1-基)-4-氧代-1-丙基-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 CONA，  
 [0061] - 7-[2-(4-氯-6-HRP-1,3,5-三嗪-2-基氨基)乙基氨基]-6-氟-4-氧代-1-丙基-1,4-二氢喹啉-3-羧酸；

[0062] 或者其盐、异构体或溶剂化物。

[0063] 在本发明中，“烷基”是指直链或支化的烃链基团，其具有 1 至 10 个，优选地 1 至 6 个碳原子，并且其通过单键与分子残基相连接，例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、正己基等。烷基基团可以任选地被一个或多个取代基例如卤素（称为卤烷基）、羟基、烷氧基、芳基、羧基、羰基、氰基、酰基、烷氧羰基、氨基、硝基、巯基和烷硫基所取代。

[0064] 在本发明中，术语“芳基”，单独地或相组合地，是指包含环碳原子的单环或多环的芳族环系。优选的芳基为单环或双环的 5-10 元的芳族环系，例如苯基或联苯基，其任选地携带一个或多个取代基。

[0065] 在本发明中，“杂环”是指 3 至 15 元的稳定的环基团，其由碳原子和 1 至 5 个杂原子（其选自氮、氧和硫）构成，优选地，具有一个或多个杂原子的 4 至 8 元的环，更优选地，具有一个或多个杂原子的 5 或 6 元的环。为了本发明的目的，杂环可以是单环、双环或三环的环系，其可以包括稠环系，并且杂环基团中的氮、碳或硫原子可以任选地被氧化，氮原子可以任选地被季铵化，和杂环基团可以是部分地或完全地饱和的或者是芳族的。此类杂环的例子包括但不限于，氮杂**萘**、苯并咪唑、苯并噻唑、呋喃、异噻唑、吡啶、哌啶、哌嗪、硫唑嘌呤、喹啉、噻二唑、四氢呋喃、香豆素、吗啉、吡咯、吡啶、**噁**唑、异**噁**唑、三唑、咪唑等。

[0066] “卤素”是指氟、氯、溴或碘。

[0067] “免疫原性载体”是指这样的那些材料，其具有在宿主动物中独立地产生免疫应答的特性，并且可以通过共价键与本发明中所描述的半抗原相连接。合适的载体材料包括例如天然或合成的多聚化合物，例如多肽、寡核苷酸，还包括蛋白质，例如白蛋白、血清白蛋白、球蛋白、脂蛋白、血蓝蛋白。免疫原性载体的举例说明性的例子包括，牛血清白蛋白、卵清蛋白、伴刀豆球蛋白 A、匙孔虫血蓝蛋白、鲑血蓝蛋白。

[0068] 考虑到式(I)的化合物拥有能够失去或获得电荷的基团和原子,本发明还涉及以盐的形式的式(I)的化合物。

[0069] 由式(I)所表示的本发明的化合物,和更具体而言,属于前面所描述的该通式的特定化合物可以包括异构体,取决于重键的存在(例如 Z, E),包括旋光异构体或对映异构体,取决于手性中心的存在。独自的异构体、对映异构体或非对映异构体以及其混合物落在本发明的范围之内。可以通过常规技术来分开独自的对映异构体或非对映异构体以及其混合物。

[0070] 在第二个方面,本发明涉及已在前面描述的式(I)的化合物用于获得针对喹诺酮类型抗生素的广谱抗体的用途。

[0071] 喹诺酮类的一些例子为,但不限于,马波沙星、恩氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星、沙氟沙星、奥索利酸、氟甲喹、氧氟沙星、达氟沙星或二氟沙星。

[0072] 本发明的另一个方面涉及用于获得针对喹诺酮类型抗生素的抗体的方法,其包括:

[0073] a) 用双官能连接化合物来活化免疫原性载体,

[0074] b) 使在(a)中活化的免疫原性载体与式(I)的化合物相缀合,

[0075] c) 用在(b)中获得的缀合物对非人动物进行免疫接种,

[0076] d) 提取在(c)中产生的抗体。

[0077] 所述免疫原性载体可以是现有技术中已知的用于半抗原的缀合的任何合成或天然的聚合物、寡核苷酸、多肽或蛋白质,尽管其优选地选自牛血清白蛋白、卵清蛋白、伴刀豆球蛋白 A、辣根过氧化物酶、匙孔虫戚血蓝蛋白、鲎血蓝蛋白这些蛋白质。

[0078] 免疫原性载体的活化可以通过任何已知的生物化学技术来进行,尽管在本发明的方法中,优选地通过使免疫原性载体与作为双官能连接化合物的琥珀酰亚胺酯反应来进行。

[0079] “双官能连接化合物”是指具有两个官能团(通常在分子的相反的末端)的那些化合物,其能够与掺入至半抗原或免疫原性载体的其他官能团反应。如果应当与其反应的官能团是相同的,那么它们是同双官能连接化合物,和如果应当与其反应的基团是不同的,那么它们是异双官能连接化合物。

[0080] 本发明的另一个方面涉及通过已描述的方法可获得的抗体。

[0081] 本发明的另一个方面涉及所描述的抗体用于在分离的生物样品中检测和/或定量喹诺酮类型抗生素的用途。优选地,该生物样品源自旨在供食品消费使用的动物来源产品,和更优选地,为奶样品。

[0082] 本发明的另一个方面涉及所描述的式(I)的化合物在检测和/或定量在分离的生物样品中的喹诺酮类型抗生素之中作为次级免疫反应试剂的用途。优选地,该生物样品源自旨在供食品消费使用的动物来源产品,和更优选地,为奶样品。

[0083] “次级免疫反应试剂”是指在用于检测低分子量的分子的竞争性免疫测定法中所必需的那些试剂。它们可以是包被抗原,其被用于间接形式的竞争性免疫测定法中,并且在该情况下,其被附着至固体支持物并与分析物竞争在溶液中的抗体。它们可以是示踪物(酶促的、荧光的、放射性的...),其被用于直接形式的竞争性免疫测定法中,并且在该情况下,其在溶液中与分析物竞争固定化在固体支持物上的抗体。

[0084] 本发明的另一个方面涉及用于检测和 / 或定量喹诺酮类型抗生素的试剂盒, 其包含至少一种抗体或至少一种已在前面描述的式(I)的化合物。该试剂盒的组分可以附着至现有技术中已知的不同类型的支持物, 例如用于试纸条试验的硝酸纤维素或用于 ELISA 试验的聚苯乙烯平板。同样, 该试剂盒还可以包含对于实施问题样品的分析来说必需的其他类型的组分和试剂。

[0085] 本发明的另一个方面涉及前面所描述的检测试剂盒用于在动物来源食品中测定和 / 或定量喹诺酮类型抗生素的用途。动物来源食品的举例说明性的例子包括, 不同动物物种的奶及其衍生品、蛋、肉类(肌肉、肾、肝等)。

[0086] 在整个说明书和权利要求书中, 词语“包含 / 包括”及其变化形式不试图排除其他技术特征、添加剂、组分或步骤。对于本领域技术人员来说, 本发明的其他目标、优点和特征可以部分地从说明书中和部分地从本发明的实践中得出。下面的实施例和附图作为举例说明来提供, 而并不试图限制本发明。

## 实施例

[0087] 半抗原的合成

[0088] 可以按照对于有机合成领域中的任何专业人员来说已知的各种不同方法, 特别是通过下面的流程中所呈现的一般程序来制备式(I)的化合物。用于所述制备方法的起始材料是商购可得的或者可以通过在文献中所描述的方法来制备。

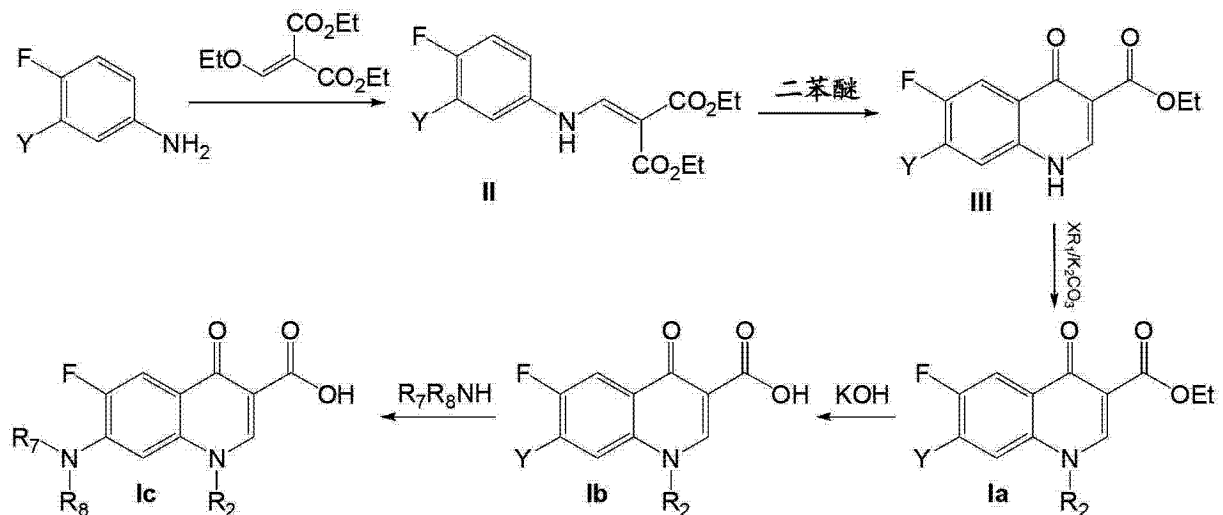
[0089] 式(I)的化合物可以从下面所描述的方法和流程开始来获得:

[0090] 根据Goulds-Jacobs方法(参见流程1), 使相应的苯胺在加成-消除反应中与乙氧基亚甲基丙二酸二乙酯反应以获得丙二酸酯 II。然后, 在高温下在二苯醚中进行反应以获得 4-氧代喹啉 III。接着, 在碱性介质中用卤化物使喹啉中的氮烷基化, 从而获得 1-(经取代的)烷基-4-氧代喹啉 Ia。使该酯在碱性介质中水解以获得相应的羧酸 Ib, 使其在芳香亲核取代中与胺反应以获得 7-氨基-4-氧代喹啉 Ic。

[0091] 在化合物 Ic 的形成中所使用的胺为哌嗪的情况下, 继续这一连串反应, 其中使用甲醛和甲酸或任何甲基化试剂例如甲基碘或硫酸二甲酯来使哌嗪中的氮甲基化。

[0092] 流程 1

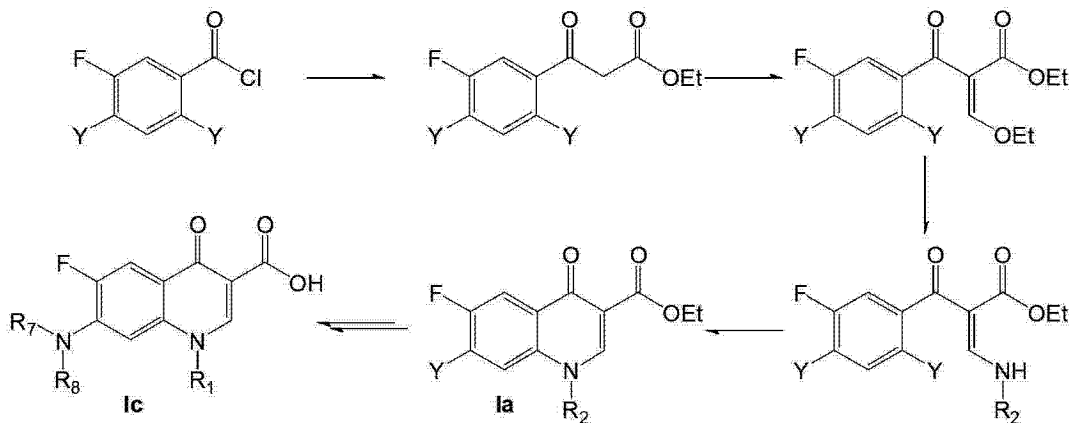
[0093]



[0094] 用于获得式 I 的化合物的一个备选策略可以是 Grohe-Heitzer 方法(参见流程 2)。在该策略中,使苯甲酸的相应氯代物酰化以获得丙二酸酯,随后将该丙二酸酯在脱水条件下与原酸酯进行缩合以得到烯醇醚。所述醚经历与相应伯胺的加成-消除反应,并且所得的产物在连续加成-消除反应中在邻位进行环化。

[0095] 流程 2

[0096]



[0097] 所使用的胺和卤代烷是商购可得的或者可以通过已知方法来获得 (March, Advanced Organic Chemistry. 1991, 编辑. John Wiley & Sons)。

[0098] 所使用的硫醇是商购可得的,并且其的保护和去保护可以通过已知方法来进行 (Green, Protective Groups in Organic Chemistry. 1999, 编辑. John Wiley & Sons)。

[0099] 免疫反应试剂的制备

[0100] 可以按照对于有机合成和免疫化学领域中的任何专业人员来说已知的各种不同方法,特别是通过下面的流程中所呈现的一般程序来制备式(I)的免疫反应试剂。用于所述制备方法的起始材料是商购可得的或者可以通过在文献中所描述的方法来制备。

[0101] a) 具有硫羟基团的半抗原

[0102] 使具有硫羟基团的半抗原共价附着至用能够通过异双官能连接化合物与所述硫羟基团反应的基团进行活化的免疫原性载体(SI)(参见流程 3)。

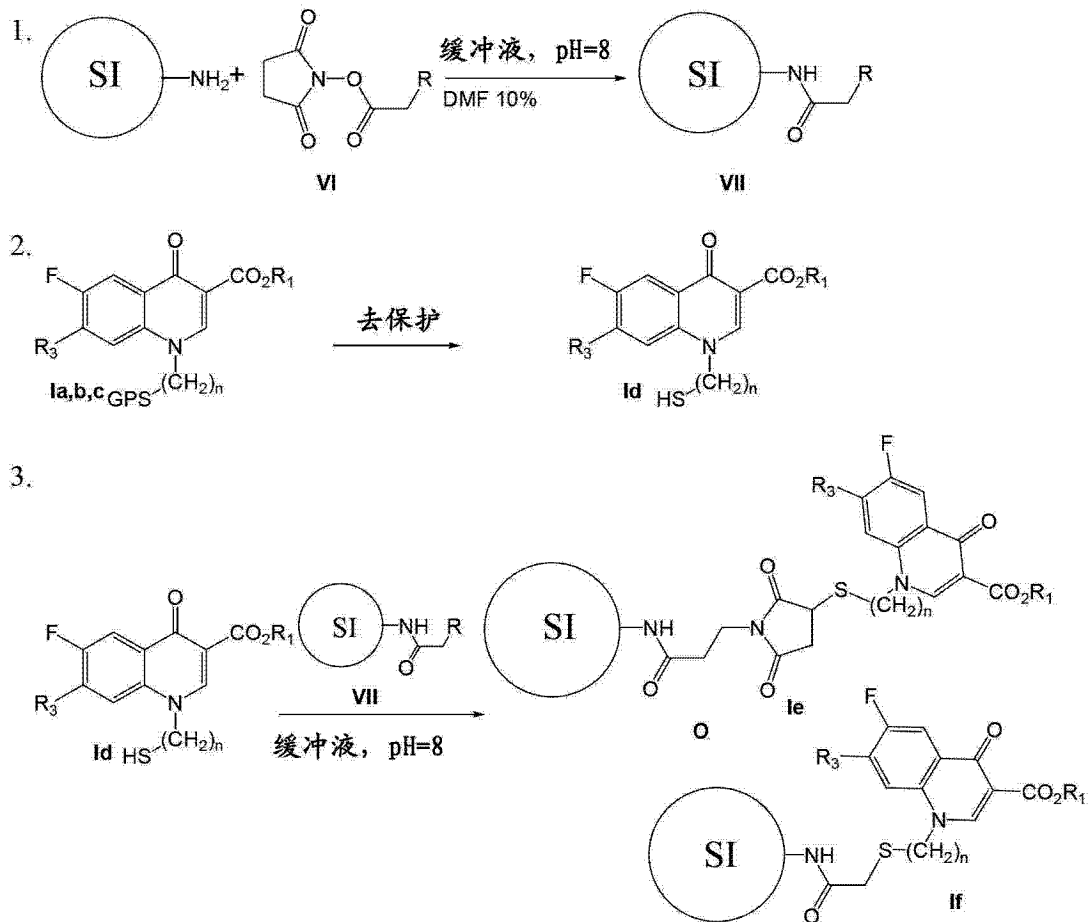
[0103] 1. 免疫原性载体的活化。使免疫原性载体与琥珀酰亚胺酯或者与在其结构中具有与硫羟基团的反应官能度的任何其他具有羧酸反应性的活性酯或活化剂反应。

[0104] 2. 硫羟基团的去保护。平行地,按照适合于相应的保护基团的方法来进行硫羟基团的去保护。

[0105] 3. 免疫缀合。使经去保护的半抗原与经活化的免疫原性载体反应。

[0106] 流程 3

[0107]

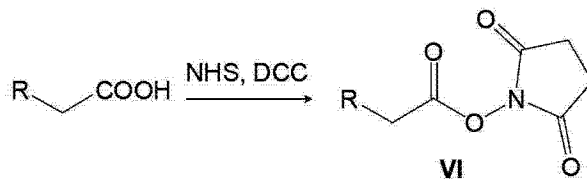


[0108] 与琥珀酰亚胺酯一样,羧酸的活化试剂是商购可得的,或者可以通过已知的方法(March, Advanced Organic Chemistry, 1991, Ed. John Wiley&Sons)或使用例如接着所描述的流程来获得。

[0109] 琥珀酰亚胺酯可以通过使用任何碳二亚胺(例如二环己基碳二亚胺)作为活化剂的相应的酸与N-羟基琥珀酰亚胺的反应来获得(参见流程4, Hampton J. Med. Chem. 1976, 19, 1279-1283)。

[0110] 流程4

[0111]

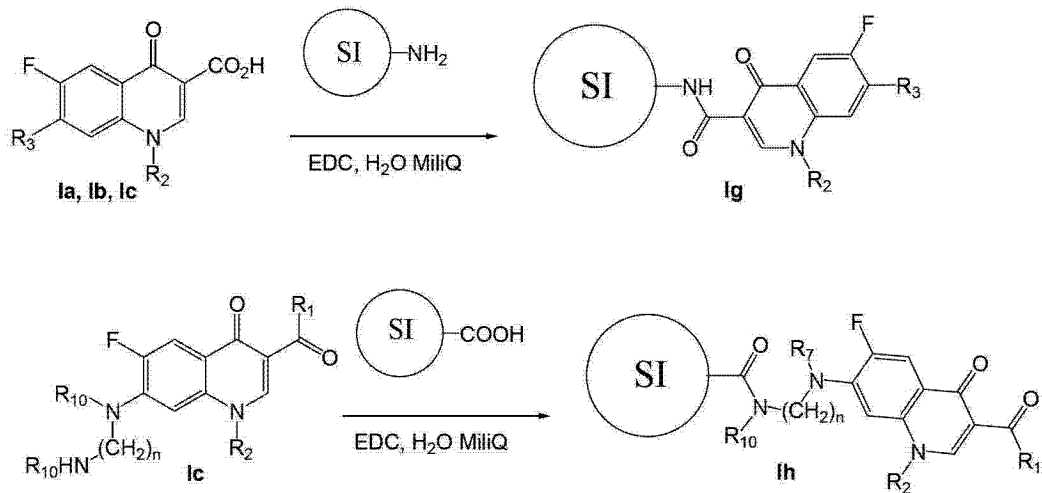


[0112] b) 具有NH或COOH基团的半抗原

[0113] 在具有胺和羧基基团的半抗原的情况下,将其与免疫原性载体相缀合,其中使用碳二亚胺反应或任何其他具有羧酸(不论是来自半抗原还是来自免疫原性载体)反应性的活化剂(参见流程5)。

[0114] 流程5

[0115]

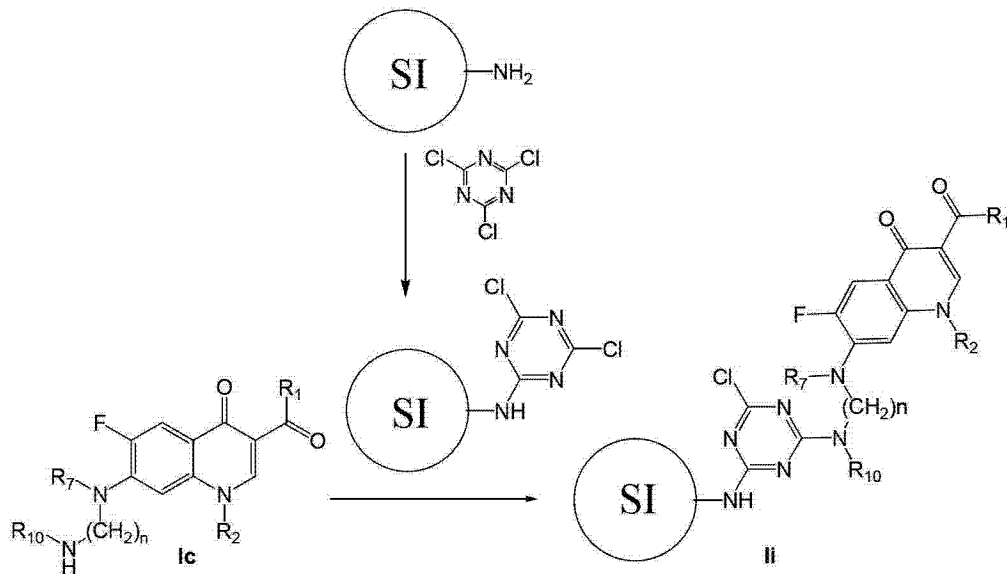


[0116] c) 具有  $\text{NH}_2$  基团的半抗原

[0117] 在具有胺基团的半抗原的情况下,也通过使用同双官能连接化合物经由其胺基团将它们缀合至事先经官能团化的免疫原性载体。所述同双官能连接化合物可以为氰尿酸氯、双-亚氨酸酯、双-N-琥珀酰亚胺酯、二异氰酸酯或二异硫氰酸酯、二酰叠氮、二醛、二酮或者任何能够在各步骤中与各种不同的胺基团进行反应的化合物(参见流程6)。

[0118] 流程6

[0119]



[0120] 接着,将通过由发明人所实施的一些试验来举例说明本发明,所述试验揭示了式(I)的化合物作为半抗原和免疫反应试剂用于获得抗氟喹诺酮(FQ)的抗体和用于开发用于检测所述抗生素的免疫测定法的特异性和有效性。

[0121] A. 化学

[0122] 一般程序和设备

[0123] 在用硅胶 60F254 (Merck, Gibbstown, NJ) 事先涂覆的铝片上实施薄层色谱法,并且当需要时,所合成的不同化合物的分开通过用硅胶 60A C. C. (37-70  $\mu\text{m}$  SDS) 的柱色谱法来进行。用 Varian 的 Mercury-400 光谱仪 (Varian Inc., Palo Alto, CA) 来获得  $^1\text{H}$  NMR 和  $^{13}\text{C}$  NMR 谱(对于  $^1\text{H}$ , 400MHz ;和对于  $^{13}\text{C}$ , 100MHz)。在该合成中所使用的化学试剂从 ACROS

ORGANICS (Geel, Belgium) 获得。中间体的制备

[0124] 中间体 II

[0125] 将相应的 3, 4- 二卤代苯胺 (10mmol) 与乙氧基亚甲基丙二酸二乙酯 (10mmol) 一起的混合物于 120°C 在搅拌下进行加热。在反应进行的 2 小时期间, 通以轻度的氮气流以除去所形成的乙醇。然后, 在减压下使混合物干燥, 从而获得所希望的产物。

[0126] 使用所述方法, 利用相应的苯胺, 制备了下列丙二酸酯:

[0127] 2-((3- 氯 -4- 氟苯基氨基) 亚甲基) 丙二酸二乙酯 (IIa, 90% 的产率)。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 1. 32 (3H, t, J=7. 14Hz), 1. 36 (3H, t, J=7. 14Hz), 4. 24 (2H, q, J=7. 14Hz), 4. 29 (2H, q, J=7. 14Hz), 6. 98 (1H, ddd, J=8. 97, 3. 84, 2. 93Hz), 7. 14 (1H, t, J=8. 60Hz), 7. 18 (1H, dd, J=6. 04, 2. 93Hz), 8. 36 (1H, d, J=13. 36Hz), 10. 97 (1H, d, J=13. 36Hz)。<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 14. 23 (1C, s) 14. 39 (1C, s) 60. 29 (1C, s) 60. 59 (1C, s) 94. 57 (1C, s) 116. 83 (1C, d, J=6. 84Hz), 117. 60 (1C, d, J=22. 23Hz), 119. 19 (1C, s) 122. 33 (1C, d, J=18. 81Hz), 136. 18 (1C, d, J=2. 99Hz), 151. 69 (1C, s) 155. 28 (1C, d, J=247. 05Hz), 165. 42 (1C, s) 168. 91 (1C, s)。

[0128] 2-((3, 4- 二氟苯基氨基) 亚甲基) 丙二酸二乙酯 (IIb, 90% 的产率)。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 1. 30 (3H, t, J=7. 14Hz), 1. 35 (3H, t, J=7. 14Hz), 4. 22 (2H, q, J=7. 14Hz), 4. 28 (2H, q, J=7. 07Hz), 6. 78-6. 87 (1H, m) 6. 96 (1H, ddd, J=11. 16, 6. 59, 2. 74Hz), 7. 15 (1H, q, J=8. 78Hz), 8. 34 (1H, d, J=13. 54Hz), 10. 96 (1H, d, J=13. 36Hz)。<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 14. 20 (1C, s) 14. 35 (1C, s) 60. 25 (1C, s) 60. 56 (1C, s) 94. 51 (1C, s) 106. 56 (1C, d, J=20. 94Hz), 113. 01 (1C, dd, J=6. 20, 3. 63Hz), 118. 33 (1C, dd, J=18. 81, 1. 28Hz), 136. 04 (1C, dd, J=7. 69, 2. 99 Hz), 147. 47 (1C, dd, J=246. 62, 12. 82Hz), 150. 82 (1C, dd, J=250. 04, 13. 68Hz), 151. 63 (1C, s) 165. 34 (1C, s) 168. 88 (1C, s)。

[0129] 中间体 III

[0130] 将相应的丙二酸酯 II (9mmol) 溶解在二苯醚 (15mL) 中, 并将所述溶液加热回流。在 2 小时后, 将混合物冷却至环境温度, 并添加己烷。将所得的固体过滤, 洗涤, 并进行干燥, 以获得所希望的产物。

[0131] 使用所述方法, 利用相应的丙二酸酯, 制备了下列 4- 氧代 -1, 4- 二氢喹啉 -3- 羧酸酯:

[0132] 7- 氯 -6- 氟 -4- 氧代 -1, 4- 二氢喹啉 -3- 羧酸乙酯 (IIIa, 92% 的产率)。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 1. 32 (3H, t, J=7. 14Hz), 4. 47 (2H, q, J=7. 26Hz), 8. 10 (1H, d, J=2. 38Hz), 8. 12 (1H, s) 9. 11 (1H, s); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 13. 60 (1C, s) 67. 53 (1C, s) 107. 03 (1C, s) 111. 70 (1C, s) 121. 68 (1C, d, J=8. 98Hz), 124. 42 (1C, s) 137. 21 (1C, d, J=21. 37Hz), 138. 00 (1C, d, J=1. 28Hz), 147. 31 (1C, d, J=1. 71Hz), 160. 23 (1C, d, J=260. 30Hz), 169. 04 (1C, s) 174. 53 (1C, d, J=4. 27Hz)。

[0133] 6, 7- 二氟 -4- 氧代 -1, 4- 二氢喹啉 -3- 羧酸乙酯 (IIIb, 85% 的产率)。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 1. 33 (3H, t, J=7. 14Hz), 4. 49 (2H, q, J=7. 07Hz), 7. 83 (1H, dd, J=8. 87, 6. 31 Hz), 8. 20 (1H, t, J=8. 33Hz), 9. 14 (1H, s); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 13. 84 (1C, s) 66. 67 (1C, s) 106. 94 (1C, s) 110. 34 (1C, d, J=22. 23Hz), 113. 75 (1C, dd, J=20. 94, 2. 99Hz), 119. 30 (1C, dd, J=8. 12, 1. 28Hz), 139. 17 (1C, d, J=11. 54Hz), 147. 42 (1C, d, J=0. 86Hz), 153. 97 (1C, dd, J=26. 26, 14. 75Hz), 159. 35 (1C, dd, J=270. 13, 15. 81Hz), 169. 01 (2C, s) 174. 35 (1C, d, J=4. 27Hz)。

z)。

[0134] 中间体 IV

[0135] 在环境温度下,在配备有磁力搅拌的圆底烧瓶中,将氯代烷基硫醇(15mmol)和二苯基甲醇(15mmol)的混合物溶解在三氟乙酸(30mL)中。根据通过薄层色谱法(二氯甲烷作为洗脱剂)所观察到的,在2小时后结束反应。使混合物在减压下干燥。将残留物溶解在乙醚中,并用水和盐水进行洗涤。将有机萃取物用无水硫酸镁进行干燥并蒸发至干,以获得所希望的化合物。

[0136] 使用所述方法,利用相应的氯代烷基硫醇,制备了下列化合物:

[0137] 二苯甲基(3-氯丙基)硫烷(IVa, 90%的产率)。<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 1.85(2H, dt, J=13.36, 6.68Hz), 2.43(2H, t, J=7.04Hz), 3.47(2H, t, J=6.40Hz), 4.81-5.28(1H, m), 7.07-7.15(2H, m), 7.17-7.24(4H, m), 7.29-7.36(4H, m); <sup>13</sup>C NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 29.19(1C, s), 31.64(1C, s), 43.42(1C, s), 54.13(1C, s), 127.18(1C, s), 128.17(1C, s), 128.51(1C, s), 141.10(1C, s)。

[0138] 中间体 V

[0139] 将碘化钠(25mmol)和 IV (13mmol)的混合物溶解在丙酮(25mL)中,并在惰性气氛中和在搅拌下带至回流。在7小时后,通过<sup>1</sup>H NMR 观察到氯原子的完全转化。使混合物在减压下干燥,并且将残留物溶解在叔丁基·甲基醚中并用水和饱和亚硫酸氢钠水溶液进行洗涤。将有机萃取物用无水硫酸镁进行干燥,过滤,并蒸发至干,以获得所希望的化合物。

[0140] 使用所述方法,利用相应的经保护的氯代烷基硫醇,制备了下列化合物:

[0141] 二苯甲基(3-碘丙基)硫烷(Va, 80%的产率)。<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 1.89(2H, dt, J=13.67, 6.84Hz), 2.38(2H, t, J=6.96Hz), 3.12(2H, t, J=6.84Hz), 5.04(1H, s), 7.13(2H, s, J=7.48, 7.48, 1.83, 1.53Hz), 7.21(4H, t, J=7.57Hz), 7.30-7.33(4H, m); <sup>13</sup>C NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 5.04(1C, s), 32.42(1C, s), 32.74(1C, s), 54.16(1C, s), 127.26(1C, s), 128.24(1C, s), 128.59(1C, s), 141.13(1C, s)。

[0142] 中间体 VI

[0143] 在 N-羟基琥珀酰亚胺(12.6mmol)和二环己基碳二亚胺(20.3mmol)的处于 0°C 的溶液上添加相应的酸(6mmol),并让其在环境温度下反应4小时。在化合物 VIa 的情况下,添加预先已让其反应了1小时的马来酸酐(10mmol)和 β-丙氨酸在 N,N-二甲基甲酰胺中的溶液。在经过4小时的反应后,使混合物在减压下蒸发,并且将粗制物溶解在二氯甲烷中并用水进行洗涤。将有机萃取物用无水硫酸镁进行干燥,过滤,并蒸发至干。将残留物进行重结晶,从而获得所希望的化合物。

[0144] 使用所述方法,利用相应的酸,制备了下列化合物:

[0145] 3-马来酰亚胺基丙酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯(VIa, 25%的产率)。<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 2.82(4H, s), 3.02(2H, t, J=7.07Hz), 3.94(2H, t, J=7.07Hz), 6.74(2H, s); <sup>13</sup>C NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 25.5(2C, s), 29.7(1C, s), 32.9(1C, s), 134.3(2C, s), 166.0(1C, s), 168.7(2C, s), 170.1(2C, s)。

[0146] 碘乙酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯(VIb, 30%的产率)。<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 2.87(2H, s), 3.96(1H, s); <sup>13</sup>C NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: -12.47(1C, s), 25.85(2C, s), 164.78(1C, s), 168.78(2C, s)。

[0147] 半抗原的制备

[0148] 半抗原 Ia

[0149] 向相应的 4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-羧酸酯 III (2mmol) 和卤代烷 (经取代的 V) (10mmol) 在无水 DMF (5mL) 中的溶液添加无水碳酸钾 (5mmol), 并且于 110°C 在惰性气氛中搅拌 10 小时。在真空中蒸发混合物, 并且将残留物溶解在二氯甲烷中并用水和饱和亚硫酸氢钠水溶液进行洗涤。将有机相用  $MgSO_4$  进行干燥, 并蒸发至干。当需要时, 通过使用二氯甲烷: 乙酸乙酯 (9:1) 作为流动相的在硅胶上的液相色谱法来纯化粗制物, 以获得所希望的产物。

[0150] 使用所述方法, 利用相应的 4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-羧酸酯, 制备了下列 1-烷基-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-羧酸酯:

[0151] 6,7-二氟-4-氧代-1-丙基-1,4-二氢喹啉-3-羧酸乙酯 (I1, 80% 的产率)。 $^1H$  NMR (TFAd)  $\delta$  ppm: 0.97 (3H, t,  $J=7.32$ Hz), 1.36 (3H, t,  $J=7.14$ Hz), 1.98 (2H, td,  $J=15.09, 7.50$ Hz), 4.52 (2H, q,  $J=7.14$ Hz), 4.61 (2H, t,  $J=7.69$ Hz), 7.91 (1H, dd,  $J=10.43, 6.22$ Hz), 8.33 (1H, t,  $J=8.42$ Hz), 9.18 (1H, s);  $^{13}C$  NMR (TFAd)  $\delta$  ppm: 10.56 (1C, s) 13.93 (1C, s) 24.00 (1C, s) 61.39 (1C, s) 66.81 (1C, s) 107.02 (1C, s) 109.01 (1C, d,  $J=24.36$ Hz), 115.07 (1C, dd,  $J=20.52, 3.42$ Hz), 120.64 (1C, d,  $J=8.12$ Hz), 139.67 (1C, d,  $J=10.69$ Hz), 150.83 (1C, s) 153.64 (1C, dd,  $J=263.29, 14.53$ Hz), 159.37 (1C, dd,  $J=269.70, 15.39$ Hz), 168.67 (1C, s) 173.38 (1C, d,  $J=3.85$ Hz)。

[0152] 1-(3-(二苯甲基硫基)丙基)-7-氯-6-氟-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-羧酸乙酯 (I2, 80% 的产率)。 $^1H$  NMR (DMSO- $D_6$ )  $\delta$  ppm: 1.27 (3H, t,  $J=7.14$ Hz), 1.91 (2H, 五重峰,  $J=7.32$ Hz), 2.37 (2H, t,  $J=7.23$ Hz), 4.22 (2H, q,  $J=7.14$ Hz), 4.36 (2H, t,  $J=6.86$ Hz), 5.31 (1H, s) 7.17 (2H, t,  $J=7.32$ Hz), 7.25 (4H, t,  $J=7.41$ Hz), 7.38 (4H, d,  $J=7.32$ Hz), 8.00 (1H, d,  $J=9.51$ Hz), 8.07 (1H, d,  $J=6.04$ Hz), 8.60 (1H, s);  $^{13}C$  NMR (DMSO- $D_6$ )  $\delta$  ppm: 13.68 (1C, s) 27.24 (1C, s) 27.58 (1C, s) 51.33 (1C, s) 51.94 (1C, s) 59.31 (1C, s) 109.05 (1C, s) 111.89 (1C, d,  $J=22.23$ Hz), 119.40 (1C, s) 124.86 (1C, d,  $J=19.66$ Hz), 126.42 (2C, s) 127.25 (4C, s) 127.82 (4C, s) 128.03 (1C, d,  $J=5.56$ Hz), 135.13 (1C, d,  $J=1.28$ Hz), 140.85 (2C, s) 149.29 (1C, s) 153.74 (1C, d,  $J=247.48$ Hz), 163.60 (1C, s) 170.71 (1C, d,  $J=2.14$ Hz)。

[0153] 1-(3-(二苯甲基硫基)丙基)-6,7-二氟-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-羧酸乙酯 (I3, 75% 的产率)。 $^1H$  NMR (TFAd)  $\delta$  ppm: 1.36 (3H, t,  $J=7.23$ Hz), 2.09 (2H, 五重峰,  $J=7.14$ Hz), 2.48 (2H, t,  $J=6.50$ Hz), 4.52 (2H, q,  $J=7.14$ Hz), 4.69 (2H, t,  $J=7.04$ Hz), 4.97 (1H, s) 7.04-7.09 (2H, m) 7.12 (4H, t,  $J=7.23$ Hz), 7.20 (4H, d,  $J=7.14$ Hz), 7.90 (1H, dd,  $J=10.15, 6.13$ Hz), 8.31 (1H, t,  $J=8.45$ Hz), 9.22 (1H, s);  $^{13}C$  NMR (TFAd)  $\delta$  ppm: 13.93 (1C, s) 28.58 (1C, s) 29.83 (1C, s) 56.63 (1C, s) 58.38 (1C, s) 66.76 (1C, s) 106.86 (1C, s) 109.00 (1C, d,  $J=23.51$ Hz), 115.07 (1C, dd,  $J=20.52, 2.99$ Hz), 120.48 (1C, d,  $J=6.84$ Hz), 128.26 (2C, s) 129.27 (4C, s) 130.10 (4C, s) 139.44 (1C, d,  $J=9.83$ Hz), 141.79 (2C, s) 151.39 (1C, s) 153.55 (1C, dd,  $J=263.29, 14.53$ Hz), 159.26 (1C, dd,  $J=269.70, 15.39$ Hz), 168.54 (1C, s) 173.39 (1C, d,  $J=4.28$ Hz)。

[0154] 半抗原 Ib

[0155] 将相应的 4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-羧酸酯 III 或 Ia (1mmol) 和氢氧化钾 (2.5mmol) 在 THF: 水 (3:1, 4mL) 的混合物中的溶液在搅拌下保持回流 4.5 小时。将反应粗

制物倒在冰-水混合物(50mL)上,用 1M HCl 进行酸化,过滤所得的沉淀物,并用冷水进行洗涤,以获得相应的羧酸。

[0156] 使用所述方法,利用相应的羧酸酯,制备了下列羧酸:

[0157] 6,7-二氟-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-羧酸(I4,80%的产率)。<sup>1</sup>H NMR(TFAd) δ ppm:7.86(1H,dd,J=8.87,6.31Hz),8.24(1H,t,J=8.33Hz),9.23(1H,s);<sup>13</sup>C NMR(TFAd) δ ppm:106.10(1C,s)110.46(1C,dd,J=22.44,1.07Hz),113.91(1C,dd,J=20.52,2.99Hz),119.29(1C,dd,J=7.91,1.50Hz),139.38(1C,d,J=11.54Hz),148.16(1C,d,J=1.71Hz),154.06(1C,dd,J=263.29,14.53Hz),159.55(1C,dd,J=270.99,15.81Hz),171.52(1C,s)174.56(1C,d,J=4.27Hz)。

[0158] 6,7-二氟-4-氧代-1-丙基-1,4-二氢喹啉-3-羧酸(I5,95%的产率)。<sup>1</sup>H NMR(TFAd) δ ppm:0.94(4H,t,J=7.41Hz),1.96(2H,td,J=15.00,7.50Hz),4.60(2H,t,J=7.69Hz),7.90(1H,dd,J=10.34,6.13Hz),8.31(1H,t,J=8.42Hz),9.24(1H,s);<sup>13</sup>C NMR(TFAd) δ ppm:10.59(1C,s)24.00(1C,s)61.52(1C,s)106.32(1C,s)109.16(1C,d,J=23.51Hz),115.27(1C,dd,J=20.52,2.99Hz),120.69(1C,d,J=7.27Hz),139.95(1C,d,J=9.83Hz),151.65(1C,s)153.74(1C,dd,J=263.93,14.32Hz),159.56(1C,dd,J=270.13,15.39Hz),171.09(1C,s)173.67(1C,d,J=3.85Hz)。

[0159] 1-(3-(二苯甲基硫基)丙基)-6,7-二氟-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-羧酸(I6,85%的产率)。<sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm:1.96(2H,dt,J=14.41,7.16Hz),2.36(2H,t,J=7.44Hz),4.49(2H,t,J=6.86Hz),5.29(1H,s)7.17(1H,t,J=7.23Hz),7.24(4H,t,J=7.41Hz),7.36(4H,d,J=7.14Hz),8.15(1H,dd,J=12.26,6.59Hz),8.23(1H,dd,J=10.34,8.87Hz),8.90(1H,s);<sup>13</sup>C NMR(101MHz,DMSO-D<sub>6</sub>) δ ppm:27.33(1C,s)27.45(1C,s)51.76(1C,s)52.25(1C,s)106.99(1C,d,J=22.65Hz),108.54(48C,s)112.79(1C,d,J=18.38Hz),122.75(1C,d,J=4.27Hz),126.39(2C,s)127.25(4C,s)127.82(4C,s)136.13(1C,d,J=10.26Hz),140.78(1C,s)147.41(1C,dd,J=249.83,14.32Hz),148.99-149.42(1C,m)152.65(1C,dd,J=253.89,14.96Hz),164.98(1C,s)175.47(1C,d,J=1.71Hz)。

[0160] 半抗原 Ic1

[0161] 在惰性气氛中,将 4-氧代-1,4-二氢喹啉 Ia 或 Ib (0.75mmol) 和相应的胺 (1.9mmol) 在无水的 DMSO (2mL) 中的溶液于 110°C 进行加热。在 5 小时后,在高度真空中除去溶剂,并且将残留物溶解在二氯甲烷中并用水和盐水进行洗涤。最后,将有机相用 MgSO<sub>4</sub> 进行干燥,并蒸发至干。

[0162] 使用所述方法,利用相应的 4-氧代-1,4-二氢喹啉,制备了下列 7-氨基-4-氧代-1,4-二氢喹啉:

[0163] 6-氟-7-(N-吗啉基)-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-羧酸(I7,60%的产率)。<sup>1</sup>H NMR(TFAd) δ ppm:3.54-3.63(4H,m)4.03-4.11(4H,m)7.36(1H,d,J=6.95Hz),8.04(1H,d,J=12.81Hz),9.08(1H,s);<sup>13</sup>C NMR(TFAd) δ ppm:50.96(2C,d,J=6.41Hz),67.74(2C,s)104.42(1C,s)107.21(1C,d,J=4.27Hz),112.24(1C,d,J=26.07Hz),115.74(1C,d,J=10.26Hz),139.34-141.64(1C,m)146.83(1C,s)150.38(1C,d,J=10.69Hz),157.04(1C,d,J=259.02Hz),172.37(1C,s)172.66(1C,d,J=4.70Hz)。

[0164] 6-氟-7-(N-吗啉基)-4-氧代-1-丙基-1,4-二氢喹啉-3-羧酸(I8,70%的产

率)。<sup>1</sup>H NMR(TFAd)  $\delta$  ppm:0.94(3H, t, J=7.41Hz), 1.97(2H, td, J=14.68, 7.23Hz), 3.54-3.59(4H, m) 4.01-4.07(4H, m) 4.56(2H, t, J=7.32Hz), 7.19(1H, d, J=6.77Hz), 8.07(1H, d, J=12.81Hz), 9.04(1H, s); <sup>13</sup>C NMR(TFAd)  $\delta$  ppm:10.74(1C, s) 23.47(1C, s) 51.03(2C, d, J=6.41Hz), 60.72(2C, s) 67.90(1C, s) 104.56(1C, s) 105.60(1C, d, J=3.85Hz), 113.43(1C, d, J=25.64Hz), 116.94(1C, d, J=9.83Hz), 141.08(1C, s) 150.32(1C, s) 150.60(1C, d, J=10.26Hz), 156.84(1C, d, J=259.02Hz), 171.77(1C, d, J=4.27Hz), 171.97(1C, s)。

[0165] 7-(2-氨基乙基氨基)-6-氟-4-氧代-1-丙基-1,4-二氢喹啉-3-羧酸(I9, 60%的产率)。<sup>1</sup>H NMR(TFAd)  $\delta$  ppm:0.89(3H, t, J=7.32Hz), 1.91(2H, dt, J=7.14Hz), 3.54(2H, s) 3.82(2H, s) 4.48(2H, t, J=6.86Hz), 6.87(1H, d, J=6.22Hz), 7.96(1H, d, J=10.61Hz), 8.93(1H, s); <sup>13</sup>C NMR(TFAd)  $\delta$  ppm:10.64(1C, s) 23.18(1C, s) 40.87(1C, s) 41.37(1C, s) 60.49(1C, s) 97.13(1C, d, J=3.85Hz), 103.93(1C, s) 111.04(1C, d, J=23.08Hz), 114.40(1C, d, J=9.40Hz), 142.16(1C, s) 147.83(1C, d, J=14.11Hz), 149.72(1C, s) 153.83(1C, d, J=256.03Hz), 171.12(1C, d, J=4.27Hz), 172.20(1C, s)。

[0166] 7-(二乙基氨基)-6-氟-4-氧代-1-丙基-1,4-二氢喹啉-3-羧酸(I10, 90%的产率, 在加压容器中)。<sup>1</sup>H NMR(TFAd)  $\delta$  ppm:0.91(3H, t, J=7.41Hz), 1.16(6H, t, J=7.23Hz), 1.93(2H, td, J=14.59, 7.23Hz), 3.88(4H, q, J=7.14Hz), 4.68(2H, t, J=7.23Hz), 8.48(1H, d, J=10.43Hz), 8.53(1H, d, J=4.57Hz), 9.31(1H, s); <sup>13</sup>C NMR(TFAd)  $\delta$  ppm:10.77(11C, s) 11.16(2C, s) 24.25(1C, s) 56.80(2C, s) 61.38(1C, s) 108.12(1C, s) 113.86(1C, d, J=66.25Hz), 118.07(1C, d, J=6.84Hz), 139.07(1C, s) 151.91(1C, d, J=48.73Hz), 153.17-153.70(1C, m) 156.33(1C, d, J=259.87Hz), 170.66(1C, s) 174.56(1C, s)。

[0167] 1-(3-(二苯甲基硫基)丙基)-6-氟-7-(N-吗啉基)-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-羧酸(I11, 70%的产率)。<sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm:2.02(2H, dt, J=13.77, 6.93Hz), 2.34(2H, t, J=6.95Hz), 3.25(4H, s) 3.73(4H, s) 4.56(2H, t, J=6.31Hz), 5.32(1H, s) 7.10(1H, d, J=6.95Hz), 7.18(2H, t, J=7.14Hz), 7.25(4H, t, J=7.50Hz), 7.37(4H, d, J=7.32Hz), 7.90(1H, d, J=13.36Hz), 20.00(1H, s); <sup>13</sup>C NMR(101MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm:27.20(1C, s) 27.47(1C, s) 49.13(2C, d, J=4.70Hz), 51.72(1C, s) 51.88(1C, s) 65.19(2C, s) 105.16(1C, s) 106.30(1C, s) 110.60(1C, d, J=22.65Hz), 118.78(1C, d, J=7.69Hz), 126.42(2C, s) 127.23(4C, s) 127.83(4C, s) 136.58(1C, s) 140.77(1C, s) 144.70(1C, d, J=9.83Hz), 148.33(1C, s) 152.23(1C, d, J=249.62Hz), 165.41(1C, s) 175.55(1C, d, J=2.56Hz)。

[0168] 1-(3-(二苯甲基硫基)丙基)-6-氟-4-氧代-7-(N-哌嗪基)-1,4-二氢喹啉-3-羧酸(I12, 95%的产率)。<sup>1</sup>H NMR(TFAd)  $\delta$  ppm:2.17(2H, m) 2.49(2H, t, J=6.96Hz), 3.35(4H, s) 3.72(4H, s) 4.75(2H, t, J=6.68Hz), 5.08(1H, s) 7.11(2H, t, J=7.14Hz), 7.18(4H, t, J=7.32Hz), 7.28(4H, d, J=7.32Hz), 7.51(1H, d, J=6.22Hz), 8.13(1H, d, J=12.44Hz), 9.13(1H, s); <sup>13</sup>C NMR(TFAd)  $\delta$  ppm:29.31(1C, s) 29.58(1C, s) 45.68(2C, s) 47.87(2C, d, J=6.41Hz), 56.90(1C, s) 57.22(1C, s) 104.92(1C, s) 106.66(1C, s) 113.60(1C, d, J=25.65Hz), 117.92(1C, d, J=8.98Hz), 128.22(2C, s) 129.34(4C, s) 130.19(4C, s) 140.67(1C, s) 141.80(2C, s) 149.66(1C, d, J=10.69Hz), 150.88(1C, s) 156.48(1C, d, J=259.02Hz), 171.58(1C, s) 172.04(1C, d, J=3.85Hz)。

[0169] 半抗原 Ic2

[0170] 将相应的哌嗪基氟喹诺酮 Ic1 (0.5mmol) 和甲醛(2mmol) 在甲酸(1mL) 中的溶液于 110℃ 搅拌 2.5 小时, 并将混合物蒸发至干。

[0171] 使用所述方法, 利用相应的哌嗪基氟喹诺酮, 制备了下列甲基哌嗪基氟喹诺酮:

[0172] 6-氟-7-(4-甲基哌嗪-1-基)-4-氧代-1-丙基-1,4-二氢喹啉-3-羧酸(I13, 定量产率)。<sup>1</sup>H NMR(TFAd)  $\delta$  ppm: 0.89(3H, t, J=7.32Hz), 1.92(1H, td, J=14.45, 7.14Hz), 2.97(3H, s) 3.31(2H, t, J=11.16Hz), 3.48(2H, t, J=12.90Hz), 3.69(2H, d, J=12.26Hz), 3.99(2H, d, J=13.91Hz), 4.55(2H, t, J=7.32Hz), 7.24(1H, d, J=6.40Hz), 8.09(1H, d, J=12.26Hz), 9.05(1H, s); <sup>13</sup>C NMR(TFAd)  $\delta$  ppm: 10.71(1C, s) 23.57(1C, s) 45.28(2C, s) 47.94-48.53(2C, m, J=5.98Hz), 55.83(1C, s) 60.84(1C, s) 105.07(1C, s) 107.06(1C, d, J=2.99Hz), 113.66(1C, d, J=25.65Hz), 118.04(1C, d, J=10.26Hz), 140.81(1C, s) 149.51(1C, d, J=10.68Hz), 150.61(1C, s) 156.86(1C, d, J=258.16Hz), 171.77(1C, s) 172.28(1C, d, J=3.85Hz)。

### [0173] B. 免疫化学

[0174] 一般程序和设备

[0175] 相应的半抗原的巯基基团的去保护通过 HPLC-UV 来进行监测, 其中使用配备有 L-7455 二极管阵列检测器、L-7200 自动取样器和 D7000 界面的 Merck Hitachi I-7100 泵 (Merck, Darmstadt, Germany)。用 HSM 软件 (Merck, Darmstadt, Germany) 来处理色谱图。使用 Lichrospher100RP-18125x4 柱 (5mm; Merck, Darmstadt, Germany), 并且以 1.0mL/ 分钟的流量使用乙腈 (ACN): 柠檬酸盐缓冲液 (50mM, pH=3) 作为流动相以梯度方式来进行分析。在两个波长处监测反应: 330nm 和 280nm。用于分析蛋白质缀合物的 MALDI-TOF-MS (基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法) 是配备有由 Perspective Biosystems Inc. (Framingham, MA) 开发的 Voyager-DE-RP (4.03 版) 和由 Galactic Industries Corporation (Salem, NH) 开发的 Grams/386 (用于 Microsoft Windows, 3.04 版, 水平 III) 这些软件的 Perspective BioSpectrometry 工作站。

[0176] 半抗原密度的分析

[0177] 借助于 MALDI-TOF-MS, 通过将天然蛋白质的分子量与缀合物的分子量进行比较来计算蛋白质缀合物的半抗原密度。MALDI 实验通过混合 2  $\mu$ L 的新制备的基质 (反-3,5-二甲氧基-4-羟基肉桂酸, 10mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>, 在 ACN/H<sub>2</sub>O 70:30, 0.1%TFA 中) 与 2  $\mu$ L 的缀合物或蛋白质在 ACN/H<sub>2</sub>O 70:30, 0.1%TFA (5mg mL<sup>-1</sup>) 中的溶液来进行。根据下述公式来计算半抗原密度 ( $\delta_{\text{半抗原}}$ ): [PM (缀合物) - PM (蛋白质)] / PM (半抗原)。

[0178] 所有缓冲液和溶液的 pH 和电导率分别用 pH540GLP pH 计和 LF340 电导计来测量 (WTW, Weilheim, Germany)。聚苯乙烯微量滴定板从 Nunc (Maxisorp, Roskilde, DK) 购得。ELISA 的洗涤步骤在 SLY96PW 微量培养板洗涤器 (SLT Lab Instruments GmbH, Salzburg, Austria) 中进行。在 Spectramax Plus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 中读取吸光度。使用软件 Softmax Pro v2.6 (Molecular Devices) 和 GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA), 用四参数逻辑斯谛方程来分析竞争曲线。

[0179] 化学和免疫化学产品

[0180] 免疫化学产品从 Sigma Chemical Co. (San. Luis, MO) 获得。用于交叉反应性研究的化学产品从 Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI) 购得。

[0181] 缓冲液

[0182] 磷酸缓冲盐水(PBS)为在 0.8% 盐水中的 0.01M 磷酸盐缓冲液,并且 pH 为 7.5。PBST 为具有 0.05% 的 Tween20 的 PBS。硼酸盐缓冲液为 0.2M 硼酸 / 硼酸钠, pH=8.7。包被缓冲液为 0.05M 碳酸盐 - 碳酸氢盐缓冲液, pH9.6。柠檬酸盐缓冲液为 0.04M 柠檬酸钠溶液, pH5.5。底物溶液包含 0.01%TMB (3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺)和 0.004% $H_2O_2$ , 在柠檬酸盐缓冲液中。

[0183] 免疫反应试剂的制备

[0184] 免疫反应试剂 Ie 和 If

[0185] 在具有巯基基团的半抗原的情况下,免疫原性载体的半抗原化通过下面描述的一连串三个步骤来进行。

[0186] 步骤 1 :蛋白质的活化(VII)

[0187] 向蛋白质(15mg)在硼酸盐缓冲液中的溶液逐滴添加相应的琥珀酰亚胺酯 VI (70  $\mu$  mol)在无水 DMF(400  $\mu$  L)中的溶液,并用三乙胺将 pH 调节至 8。将混合物在 4 $^{\circ}$ C 下保持过夜,并且使用 5mL 的 Sephadex G-25Superfine HiTrap 脱盐柱(Amersham Biosciences)和硼酸盐缓冲液(作为洗脱剂),通过分子排阻色谱法来纯化经活化的蛋白质。收集洗脱出的经如此活化的蛋白质的级分(0.5mL),并且合并在 Bradford 蛋白质测定法(3mL) (Bradford, M. M. Analytical Biochemistry 1976, 72, 248-254)中具有阳性结果的那些。保留一部分该溶液用于 MALDI-TOF-MS 分析,并将其余部分用于在步骤 3 中所描述的缀合。

[0188] 以这种方式,使用相应的琥珀酰亚胺酯,制备了下列经活化的蛋白质:

[0189] 3-马来酰亚胺基丙酸酐 BSA (VIIa)。  $\delta_{\text{半抗原}}$  (mol 半抗原 / mol 蛋白质):31.29。

[0190] 碘乙酸酐 BSA (VIIb)。  $\delta_{\text{半抗原}}$  (mol 半抗原 / mol 蛋白质):15.62。

[0191] 步骤 2 :去保护(Id)

[0192] 将具有经保护的巯基基团的半抗原 Ia, b, c (0.18mmol)和茴香醚(2.74mmol)溶解在三氟乙酸(2mL)中,并将所得的混合物于 45 $^{\circ}$ C 搅拌 1.5 小时直至通过 HPLC-UV 观察到起始产物的完全转化。此时,在真空中蒸发溶剂至干,并且将残留物溶解在水中并用二氯甲烷进行洗涤。按照在步骤 3 中所描述的,立即将水性层用于缀合而无需额外的纯化。

[0193] 以这种方式,获得了相应的具有游离巯基基团的半抗原:

[0194] 6-氟-1-(3-巯基丙基)-7-(N-吗啉基)-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-羧酸 (I14, 68% 的产率)。  $^1H$  NMR( $CDCl_3$ )  $\delta$  ppm:1.60(1H, t, J=8.06Hz), 2.21(2H, tt, J=7.08, 6.84Hz), 2.69(2H, q, J=7.57, 6.84, 5.86Hz), 3.32(4H, t, J=4.64Hz), 3.91(4H, t, J=4.64Hz), 4.44(2H, t, J=7.57Hz), 7.01(1H, d, J=6.84Hz), 8.07(1H, d, J=13.18Hz), 8.69(1H, s);  $^{13}C$  NMR( $CDCl_3$ )  $\delta$  ppm:21.43(1C, s)32.39(1C, s)50.51(2C, s)52.80(1C, s)66.80(2C, s)104.05(1C, s)108.70(1C, s)113.28(1C, d, J=26.55Hz), 121.01(1C, s)137.52(1C, s)146.34(1C, d, J=10.98Hz), 148.03(1C, s)153.77(1C, d, J=253.12Hz), 167.42(1C, d, J=0.91Hz), 177.28(1C, d, J=2.29Hz)。

[0195] 6-氟-1-(3-巯基丙基)-4-氧代-7-(N-哌嗪基)-1,4-二氢喹啉-3-羧酸 (I15, 45% 的产率)。  $^1H$  NMR( $D_2O$ )  $\delta$  ppm:1H2.54(2H, s)2.87-3.00(2H, m)3.78-4.06(4H, m)4.07-4.22(4H, m)4.92-5.33(2H, m)7.86(1H, d, J=6.35Hz), 8.46(1H, d, J=12.21Hz), 9.51(1H, s);  $^{13}C$  NMR( $D_2O$ )  $\delta$  ppm:21.49(1C, s), 32.87(1C, s), 44.17(2C, s), 47.44(2C, d, J=5.17Hz), 54.18(1C, s), 106.69(1C, s), 106.82(1C, s), 111.85(1C, d, J=23.92Hz), 120.02(1C, d, J=8.

41Hz), 138.05 (1C, s), 145.78 (1C, d, J=10.34Hz), 149.32 (1C, s), 153.99 (1C, d, J=251.52Hz), 169.54 (1C, s), 176.35 (1C, d, J=1.94Hz)。

[0196] 步骤3:生物缀合(Ie, If)

[0197] 在步骤1的纯化的经活化的蛋白质VII的溶液上逐滴添加步骤2的具有经去保护的巯基基团的半抗原Id的水相。使用三乙胺将pH调节至8。在环境温度下,将混合物在温和搅拌下维持2.5小时。最后,通过逆0.5mM PBS (4x5L)和milliQ水(1x5L)的透析来纯化免疫反应试剂,并进行冻干。

[0198] 使用所述方法,制备了下列免疫反应试剂:

[0199] 1-[3-(2-乙酰胺 BSA) 硫基丙基]-6-氟-7-(N-吗啉基)-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-羧酸(I16)。 $\delta_{\text{半抗原}}$ (mol 半抗原/mol 蛋白质):2.23。

[0200] 1-[3-(2,5-二氧化-1-(3-(甲酰胺 BSA) 丙基)-吡咯烷-3-基硫基)丙基]-6-氟-4-氧代-7-(N-哌嗪基)-1,4-二氢喹啉-3-羧酸(I17)。 $\delta_{\text{半抗原}}$ (mol 半抗原/mol 蛋白质):12.46。

[0201] 1-[3-(2-乙酰胺 HCH) 硫基丙基]-6-氟-7-(N-哌嗪基)-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-羧酸(I18)。 $\delta_{\text{半抗原}}$ (mol 半抗原/mol 蛋白质)(定量UV):14.37。

[0202] 1-[3-(2-乙酰胺 BSA) 硫基丙基]-6-氟-7-(N-哌嗪基)-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-羧酸(I19)。 $\delta_{\text{半抗原}}$ (mol 半抗原/mol 蛋白质):14.15。

[0203] 免疫反应试剂 Ig 和 Ih

[0204] 对于具有酸或胺基团的半抗原的情况,免疫原性载体的半抗原化以下面的方式来实现。

[0205] 向蛋白质(10mg)在milliQ水(1mL)中的溶液添加半抗原Ib, c (10  $\mu$  mol)在DMF (100  $\mu$  L)中的溶液,随后添加EDC (50  $\mu$  mol)在milliQ水(100  $\mu$  L)中的溶液,并在环境温度下将混合物搅拌3小时。通过逆0.5mM PBS (4x5L)和milliQ水(1x5L)的透析来纯化蛋白质缀合物,并进行冻干。

[0206] 使用所述方法,制备了下列免疫反应试剂:

[0207] 6,7-二氟-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 BSA(I20)。 $\delta_{\text{半抗原}}$ (mol 半抗原/mol 蛋白质):7.11。

[0208] 6,7-二氟-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 CONA (I21)。 $\delta_{\text{半抗原}}$ (mol 半抗原/mol 蛋白质):2.60。

[0209] 6,7-二氟-1-丙基-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 BSA (I22)。 $\delta_{\text{半抗原}}$ (mol 半抗原/mol 蛋白质):3.74。

[0210] 6,7-二氟-1-丙基-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 CONA(I23)。 $\delta_{\text{半抗原}}$ (mol 半抗原/mol 蛋白质):1.09。

[0211] 6-氟-7-(N-吗啉基)-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 BSA (I24)。 $\delta_{\text{半抗原}}$ (mol 半抗原/mol 蛋白质):1.37。

[0212] 6-氟-7-(N-吗啉基)-4-氧代-1-丙基-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 BSA (I25)。 $\delta_{\text{半抗原}}$ (mol 半抗原/mol 蛋白质):1.79。

[0213] 7-[2-(乙酰胺 BSA) 乙基氨基]-6-氟-4-氧代-1-丙基-1,4-二氢喹啉-3-羧酸(I26)。 $\delta_{\text{半抗原}}$ (mol 半抗原/mol 蛋白质):5.28。

[0214] 7-(二乙基氨基)-6-氟-4-氧代-1-丙基-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 BSA(I27)。  
 $\delta_{\text{半抗原}}$  (mol 半抗原 / mol 蛋白质): 4.62。

[0215] 7-(二乙基氨基)-6-氟-4-氧代-1-丙基-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 CONA(I28)。  
 $\delta_{\text{半抗原}}$  (mol 半抗原 / mol 蛋白质): 4.30。

[0216] 6-氟-7-(4-甲基哌嗪-1-基)-4-氧代-1-丙基-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 BSA (I29)。  
 $\delta_{\text{半抗原}}$  (mol 半抗原 / mol 蛋白质): 2.16。

[0217] 6-氟-7-(4-甲基哌嗪-1-基)-4-氧代-1-丙基-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 CONA (I30)。  
 $\delta_{\text{半抗原}}$  (mol 半抗原 / mol 蛋白质): 1.36。

[0218] 免疫反应试剂 Ii

[0219] 在具有氨基基团的半抗原的情况下,免疫原性载体的半抗原化也通过以下面所描述的两个步骤进行反应来实现。

[0220] 向蛋白质(6mg)在 pH9.6 的碳酸盐缓冲液(1mL)中的溶液添加氰尿酸氯(1.5  $\mu$ mol)在 DMF (150  $\mu$ L)中的溶液。将混合物在环境温度下维持 2 小时,然后逐滴添加相应的半抗原 Ic (2  $\mu$ mol)在 DMF (60  $\mu$ L)中的溶液。在 37°C 下,将混合物在温和搅拌下维持 4 小时。最后,通过逆 0.5mM PBS (4x5L)和 milliQ 水(1x5L)的透析来纯化免疫反应试剂,并进行冻干。

[0221] 使用所述方法,制备了下列免疫反应试剂:

[0222] 7-[2-(4-氯-6-HRP-1,3,5-三嗪-2-基氨基)乙基氨基]-6-氟-4-氧代-1-丙基-1,4-二氢喹啉-3-羧酸(I31)。  
 $\delta_{\text{半抗原}}$  (mol 半抗原 / mol 蛋白质): 1.76。

[0223] 多克隆抗血清的制备

[0224] 根据以前所描述的(Salvador, Analytical Chemistry. 2007, 79, 3734-3740),在重 1-2kg 的雌性白色新西兰兔中进行免疫接种实验方案。将溶解在 PBS (0.5mL) 中的免疫原(100  $\mu$ g)用弗氏佐剂(第一次为完全的,其余的为不完全的)以 1:1 的比例进行乳化。立即将其以皮内方式注射在宿主动物背部的不同位置(每月注射一次)。通过测量在用相应的免疫反应试剂包被的微量滴定板中不同抗血清的系列稀释物的结合来评价抗体滴度的变化。在观察到可接受的抗体滴度后,将动物放血并将血液收集在装有血清分离凝胶的 Vacutainer 管中。通过离心而获得抗血清,并将其在 0.02%Na<sub>2</sub>N<sub>3</sub> 存在下贮存于 -80°C。

[0225] 用于喹诺酮类的间接竞争性 ELISA 的开发

[0226] 用溶解在包被缓冲液中的相应的包被抗原(间接形式)或抗血清(直接形式)(100  $\mu$ L/孔)在 4°C 下包被微量滴定板整夜或者在环境温度下包被 4 小时,并用不透气的粘合板覆盖。然后,用 PBST (四次,300  $\mu$ L/孔)洗涤平板,并且向所述微量滴定板添加喹诺酮标准品(0.01nM-10000nM,在 PBST 中,50  $\mu$ L/孔),随后添加相应的抗血清(间接形式)或酶促示踪物(直接形式)(50  $\mu$ L/孔)。在环境温度下 30 分钟后,如前面已描述的那样洗涤平板,并且对于间接形式的情况,添加用 HRP 进行标记的抗-兔 IgG 的 IgG 的溶液(1/6000,在 PBST 中)(100  $\mu$ L/孔)并在环境温度下再温育 30 分钟。重新洗涤平板,并且对于所述两种形式,均添加底物溶液(100  $\mu$ L/孔)。在环境温度下 30 分钟后,用 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (50  $\mu$ L/孔)来停止显色,并读取在 450nm 处的吸光度。将标准曲线校正至四参数方程,根据下式:  $Y=[(A-B)/(1+(x/C)^D)]+B$ ,其中 A 为最大吸光度,B 为最小吸光度,C 为产生 50% 的最大吸光度的浓度,和 D 为在 S 形曲线的拐点处的正切。

[0227] 以这种方式,对于环丙沙星,获得了下面的竞争性 ELISA :

[0228] 表 1: 用于检测环丙沙星的竞争性 ELISA 试验的参数,其中使用用在

[0229] 本发明中所描述的免疫反应试剂开发出的免疫反应试剂和抗体。

[0230]

As	IR	[IR] μg/mL	[As] 稀释度	最大 Abs	最小 Abs	IC <sub>50</sub> μg/L	斜率	R <sup>2</sup>
171	I16	2.5	1/16000	1.767	0.137	16.40	-0.857	0.9980
171	I19	0.0156	1/128000	1.615	0.073	4.81	-0.661	0.9985
171	I26	0.25	1/16000	1.360	0.098	1.66	-0.793	0.9691
172	I16	2.5	1/4000	1.900	0.090	38.39	-0.770	0.9959
172	I19	0.0156	1/32000	1.817	0.088	27.60	-0.646	0.9928
172	I26	0.25	1/4000	1.427	0.079	11.56	-0.845	0.9939
173	I16	5	1/16000	1.748	0.144	134.68	-0.538	0.9959
173	I19	0.0156	1/128000	1.710	0.165	48.55	-0.547	0.9939
173	I26	0.25	1/16000	0.915	0.013	1.49	-0.253	0.9825
171	I31	0.0625	1/8000	1.49	0.032	0.81	-1.46	0.9952

[0231] 交叉反应性的测定

[0232] 在氢氧化钠(50mM)中制备关于不同的喹诺酮类和其他抗生素的浓度为 10mM 的母液,并通过 ELISA 来进行测量。根据下述公式来计算交叉反应性的值:(CPFX DI<sub>50</sub>/ 所测试的化合物的 DI<sub>50</sub>) x100。

[0233] 在下面的表中,显示了 IC<sub>50</sub> 和交叉反应性的值,其中使用在本发明中所开发出的免疫反应试剂和抗体。

[0234] 表 2: 关于各种不同抗生素的 IC<sub>50</sub> 和交叉反应性的数据,

[0235] 其中使用用在本发明中所描述的免疫反应试剂开发出的抗体。

化合物	IC <sub>50</sub> (μg·L <sup>-1</sup> )	% CR
环丙沙星	0.77 ± 0.27	100
恩氟沙星	0.65	95
达氟沙星	7.31	8
二氟沙星	0.91	75
马波沙星	4,30	28
氟甲喹	3.91	22
奥索利酸	23.53	4
[0236] 诺氟沙星	0.78	81
沙氟杀星	0.96	80
氧氟沙星	1.84	39
磺胺二甲嘧啶	>1000	<0.2
磺胺噻唑	>1000	<0.2
氯霉素	>1000	<0.2
四环素	>1000	<0.2
多西环素	>1000	<0.2
氨苄青霉素	>1000	<0.2

专利名称(译)	半抗原和免疫反应试剂以及其在获得关于喹诺酮类的家族抗体和免疫测定法中的用途		
公开(公告)号	<a href="#">CN103328448A</a>	公开(公告)日	2013-09-25
申请号	CN201180065600.0	申请日	2011-11-21
[标]申请(专利权)人(译)	科学研究高级委员会		
申请(专利权)人(译)	科学研究高级委员会		
当前申请(专利权)人(译)	科学研究高级委员会		
[标]发明人	MP马克克拉斯 FJ桑谢滋巴埃萨 D冈萨雷斯皮纳乔		
发明人	M·P·马克克拉斯 F·J·桑谢滋巴埃萨 D·冈萨雷斯皮纳乔		
IPC分类号	C07D215/233 G01N33/53		
CPC分类号	C07D215/56 C07D215/233 C07D401/10 C07D401/12 C07K16/44 G01N33/9446		
优先权	2010031721 2010-11-23 ES		
其他公开文献	CN103328448B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及半抗原、免疫原和次级免疫反应试剂，其用于获得针对喹诺酮类型抗生素的广谱抗体的用途，其在免疫化学分析技术中的应用，和使得能够在源自动物来源食品的生物样品中检测所述抗生素的试剂盒。

