

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510044063.8

[43] 公开日 2006年3月1日

[11] 公开号 CN 1740792A

[22] 申请日 2005.7.12

[21] 申请号 200510044063.8

[71] 申请人 山东大学

地址 250100 山东省济南市山大南路 27 号

[72] 发明人 郗日沫 卢圣欣 张玉兰

[74] 专利代理机构 济南圣达专利商标事务所
代理人 郑华清

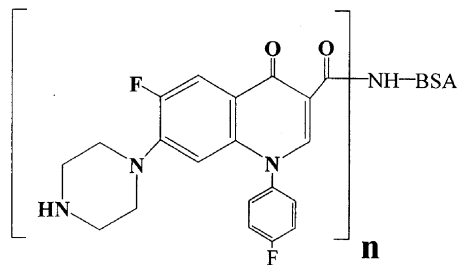
权利要求书 2 页 说明书 5 页

[54] 发明名称

沙拉沙星的偶联物及其制备方法与应用

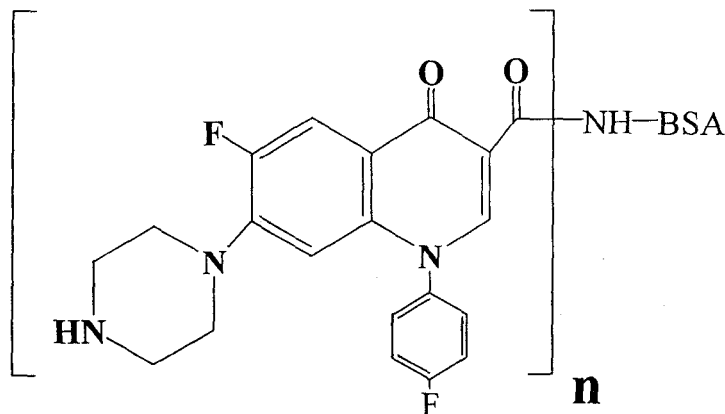
[57] 摘要

本发明公开了一种通式(I)的沙拉沙星的偶联物,由沙拉沙星半抗原与产生免疫原性的载体物质优选牛血清蛋白偶联构成。其中n为与一个牛血清蛋白分子结合的沙拉沙星的分子数,n为整数1~20,BSA为牛血清蛋白,分子量范围是6.6KDa~6.9KDa。本发明还公开了所述的偶联物的制备方法,即将沙拉沙星与产生免疫原性的载体物质连接起来,结合为具有诱发动动物免疫系统产生抗体的偶联物。本发明的方法简便,快速,特异,用制备的沙拉沙星偶联物免疫大白兔,其抗血清效价达1:51200,为进一步制备沙拉沙星的酶联免疫检测试剂盒提供了基础。



(I)

1. 一种沙拉沙星的偶联物，由沙拉沙星半抗原与产生免疫原性的载体物质偶联构成，所述载体物质为蛋白质、蛋白质片段、合成多肽或半合成多肽。
2. 如权利要求1所述的沙拉沙星的偶联物，其中所述的蛋白质是牛血清蛋白。
3. 如权利要求2所述的沙拉沙星的偶联物，其结构通式如(I)



(I)

其中：n：为与一个牛血清蛋白分子结合的沙拉沙星的分子数，n为整数1~20
BSA为牛血清蛋白(Bovine Serum Albumin)，分子量范围是6.6KDa~6.9Kda。

上述偶联物显示出如下物化特征：

- (1) 外观：白色粉末固体
- (2) 紫外吸收光谱：280, 323, 331 nm
- (3) 红外吸收光谱 (cm^{-1} , KBr)：3310, 2960, 1656, 1538, 1452, 1397, 1163, 1075, 948, 860, 547。

4. 如权利要求3所述的沙拉沙星的偶联物，其中n为整数1~10，BSA分子量范围是6.7 KDa~6.8 KDa。

5. 权利要求1~4中任一项所述的沙拉沙星的偶联物的制备方法，其特征是，将沙拉沙星与产生免疫原性的载体物质连接起来，结合为具有诱发动动物免疫系统产生抗体的偶联物，并保持该偶联物的生物活性不变。

6. 如权利要求5所述沙拉沙星的偶联物的制备方法，该方法步骤如下：

- (1) 溶液A的制备：将沙拉沙星，羟基琥珀酰亚胺，碳二亚胺盐溶液，以摩尔比1:3~5:5~7溶解在二甲基甲酰胺中，反应4~6小时，生成沙拉沙星与碳二亚胺的活性中间体，备用；
- (2) 溶液B的制备：把上述BSA溶于磷酸缓冲溶液中，配成9.5~15 mg/ml的溶液，

备用;

- (3) 在 20℃~30℃条件下, 以不断搅拌方式, 把溶液 A 逐渐加入到溶液 B 中, 反应 4~6 小时, 得到溶液 C;
- (4) 将溶液 C 用磷酸缓冲液透析 70~78 小时, 每 10~12 小时更换一次透析液;
- (5) 以 20, 000g, 30 分钟的条件, 离心上述透析后的溶液 C, 取上清液;
- (6) 冻干上清液, 得到沙拉沙星的偶联物粗品;
- (7) 用葡聚糖凝胶层析作纯化分离, PBS 缓冲溶液为洗脱液, 收集沙拉沙星的偶联物纯品, 再经冻干得到白色固体粉末状的, 具有诱发动动物免疫系统产生抗体的沙拉沙星免疫原偶联物。

7. 如权利要求 6 所述的沙拉沙星的偶联物的制备方法, 其特征是, 步骤(1)所述沙拉沙星, 羟基琥珀酰亚胺, 碳二亚胺盐的摩尔比为 1:4:6。

8. 如权利要求 6 所述的沙拉沙星的偶联物的制备方法, 其特征是, 所述溶液 C 中沙拉沙星与牛血清蛋白的摩尔数比为 6:1。

9. 如权利要求 6 所述的沙拉沙星的偶联物的制备方法, 其特征是, 所述的磷酸缓冲液 pH 为 7.40, 浓度为 0.01 M; 所述的葡聚糖凝胶层析采用 Sephadex-G75。

10. 权利要求 1~4 中任一项所述的沙拉沙星的偶联物作为免疫原在制备沙拉沙星特异反应抗体中的应用。

沙拉沙星的偶联物及其制备方法与应用

技术领域

本发明涉及一种喹诺酮类抗生素的偶联物及其制备方法与应用，尤其涉及一种沙拉沙星(sarafloxacin)的偶联物及其制备方法与应用。

背景技术

本发明涉及的下列名称适用于整个说明书和权利要求书：

BSA = 牛血清蛋白(Bovine Serum Albumin)，Sigma 公司产品

PBS = 磷酸缓冲液 (Phosphate Buffered Saline) (0.01 M, pH = 7.40)

Sephadex-G75 = 葡聚糖凝胶，Sigma 公司产品

Sarafloxacin-EDC = 沙拉沙星与碳二亚胺形成的活性中间体

Glutar = (Glutaraldehyde) 戊二醛，上海化学试剂公司产品

透析膜：美国联合炭化 (United Carbide) 公司产品

沙拉沙星 (sarafloxacin) 属于喹诺酮类抗生素。这类抗生素由于其抗菌谱广，杀菌能力强，是继土霉素之后在畜禽水产养殖中广泛应用的药物。这类药物可以有效地预防和治疗家禽细菌和霉形体疾病。沙拉沙星是最常用最有效的药物之一。但人们通过研究逐渐发现，喹诺酮类抗生素在动物源食品中的残留对人体有毒害。作为一种人畜共用药，喹诺酮类抗生素在食品中的残留通过食物链对人体健康危害很大。新英格兰明尼苏达州卫生署的 KIRK E SMITH 为首的研究小组发现，家禽使用喹诺酮类药物使弯曲杆菌产生了耐药性。根据美国疾病控制与预防中心的调查，一种由食品引起疾病的弯曲杆菌对喹诺酮类药物的耐药性由 1998 年的 13.6% 上升到 1999 年的 17.6%。而我国尚未颁布动物源食品中残留的喹诺酮类药物的检测方法和相应标准。美国由于考虑到这类药物的交叉感染，已经开始在畜禽养殖业中禁用喹诺酮类抗生素。我国虽尚未在畜禽水产养殖业中禁用喹诺酮类抗生素，但有严格的停药期规定。随着人民生活水平的提高及我国加入 WTO，对动物源食品的品质要求也越来越高，食品中药物残留的检测必将法制化，常规化。因此，研究喹诺酮类药物在食品中的残留限量和检测方法是必要的。

在抗生素药物残留的检测中，仪器法如液相色谱和质谱以及液相质谱联用是最广泛应用的方法。这些方法准确，稳定，可靠，可以作为标准方法。但仪器法价格昂贵，费时较长，且造成有机溶剂污染，需要大型仪器设备，需要专门的技术人员，所以难于用于现场操作。酶联免疫检测法 (ELISA) 提供了一种极好的扫描手段。该法具有快速，准确，简易，不需要专门人员操作等优点，这使得 ELISA 法成为一种理想的，可用于常规扫描的检测方法。酶联免疫检测法的核心是需要高质量的抗体。大多数抗生素包括喹

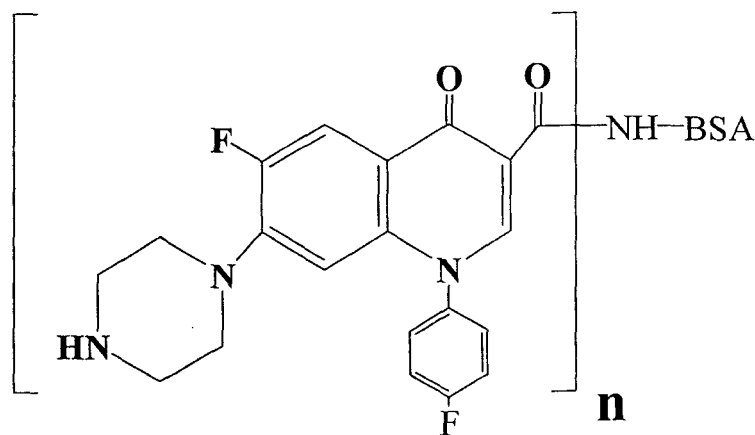
诺酮类药物都是小分子有机化合物，不具有免疫原性，称之为半抗原。所以，必须把这些化合物转变成能引发动动物免疫系统产生抗体的免疫原（又称之为完全抗原）。但是，据我们所知，现在世界上尚未有关于沙拉沙星的免疫原的合成及其抗体制备的报道。

发明内容

针对上述现有技术的不足，本发明要解决的问题是：提供一种沙拉沙星的偶联物及其制备方法与应用，利用本发明提供的沙拉沙星的偶联物可以作为免疫原，引发动动物免疫系统产生针对沙拉沙星有特异反应的抗体，从而获得相应的抗体。

本发明的沙拉沙星（Sarafloxacin）的偶联物，由沙拉沙星半抗原与产生抗原性的载体物质偶联构成，所述载体物质优选为蛋白质、蛋白质片段、合成多肽或半合成多肽。上述的沙拉沙星的偶联物，其中所述的蛋白质优选是牛血清蛋白。

本发明所述的沙拉沙星的偶联物，其结构通式如（I）



（I）

其中：n：为与一个牛血清蛋白分子结合的沙拉沙星的分子数，n为整数1~20

BSA为牛血清蛋白（Bovine Serum Albumin），分子量范围是6.6KDa~6.9 Kda。

上述沙拉沙星的偶联物显示出如下物化特征：

- （1）外观：白色粉末固体
- （2）紫外吸收光谱：280, 323, 331 nm
- （3）红外吸收光谱（ cm^{-1} , KBr）：3310, 2960, 1656, 1538, 1452, 1397, 1163, 1075, 948, 860, 547

上述沙拉沙星的偶联物，优选n为整数1~10，BSA分子量范围是6.7 KDa~6.8 KDa。

上述沙拉沙星的偶联物的制备方法是：将沙拉沙星与产生免疫原性的载体物质连接起来，结合为具有诱发动动物免疫系统产生抗体的偶联物，并保持该偶联物的生物活性不

变。

上述沙拉沙星的偶联物的制备方法具体由如下步骤组成：

- (1) 溶液 A 的制备：将沙拉沙星，羟基琥珀酰亚胺，碳二亚胺盐溶液，以摩尔比 1:3~5:5~7 溶解在二甲基甲酰胺中，反应 4~6 小时，生成沙拉沙星与碳二亚胺的活性中间体，备用；
- (2) 溶液 B 的制备：把上述 BSA 溶于磷酸缓冲溶液中，配成 9.5~15 mg/ml 的溶液，备用；
- (3) 在 20℃~30℃条件下，以不断搅拌方式，把溶液 A 逐渐加入到溶液 B 中，反应 4~6 小时，得到溶液 C；
- (4) 将溶液 C 用磷酸缓冲液透析 70~78 小时，每 10~12 小时更换一次透析液；
- (5) 以 20,000g，30 分钟的条件，离心上述透析后的溶液 C，取上清液；
- (6) 冻干上清液，得到沙拉沙星的偶联物粗品；
- (7) 用葡聚糖凝胶层析作纯化分离，PBS 缓冲溶液为洗脱液，收集沙拉沙星的偶联物纯品，再经冻干得到白色固体粉末状的，具有诱发动动物免疫系统产生抗体的沙拉沙星免疫原偶联物。

其中，步骤 (1) 所述沙拉沙星，羟基琥珀酰亚胺，碳二亚胺盐的摩尔比为 1:4:6。

其中，所述溶液 C 中沙拉沙星与牛血清蛋白的摩尔数比为 6:1。

其中，所述的磷酸缓冲液 pH 为 7.40，浓度为 0.01 M；所述的葡聚糖凝胶层析采用 Sephadex-G75。

上述沙拉沙星的偶联物作为免疫原在制备沙拉沙星特异反应抗体中的应用。

利用本发明的技术方案可以成功地把半抗原沙拉沙星与载体蛋白特别是牛血清白蛋白 BSA 偶联起来，从而合成了能够在动物体内引发免疫反应，产生抗体的完全免疫原。利用此免疫原对新西兰大白兔进行免疫，可以制得对半抗原沙拉沙星有特异反应的抗体。

经 ELISA 实验鉴定，利用本发明方法所合成的沙拉沙星-牛血清蛋白偶合物 (Sarafloxacin-BSA Conjugate) 对新西兰大白兔进行免疫后，其抗血清效价达到 1:51200。这为沙拉沙星的酶联免疫检测方法中所用检测试剂的开发以及制备沙拉沙星的酶联免疫检测试剂盒提供了广阔的应用空间。在实际应用中，只需把该抗体镀在微孔盘内，就可以用来检验动物源食品中沙拉沙星的残留。由于上述方法具有简易，快速，特异，准确的特点，所以可以用于食品检验检疫中的初步扫描检测之用。这样不但可以节省大量的检验时间，还可以便于现场操作，从而弥补了仪器法费时较长，需要大型仪器设备支持，需要专门的技术人员操作，难于用于现场的不足。所以，半抗原沙拉沙星与载体蛋白特别是牛血清蛋白 BSA 偶联物的合成及抗血清的成功制备为这种快速检验法奠定了基础。

具体实施方式

实施例 1

(1) 溶液 A 的制备: 在 50ml 圆形反应瓶内, 搅拌中, 加入沙拉沙星 13.9 mg (0.042 mmol), 羟基琥珀酸亚胺 (NHS) 19.33 mg (0.168 mmol), 乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺盐酸盐 (EDC.HCl) 48.3 mg (0.252 mmol), 溶解于 10ml 二甲基甲酰胺 (DMF) 中。反应 4 小时。得到溶液 A。备用。

(2) 溶液 B 的制备: 在 100 ml 圆形反应瓶内, 将 476 mg BSA 加入 50 ml PBS (pH = 7.4, 0.01 M) 中。得到溶液 B。备用。

(3) 制备沙拉沙星免疫原偶联物: 在 20°C 和搅拌下, 逐步把溶液 A 加入到溶液 B 中。反应 4 小时。得到沙拉沙星免疫原溶液。用 PBS 缓冲液透析三天, 每 12 小时更换一次透析液。高速离心 (20,000g) 30 分钟。冻干上清液, 得到 412 mg 白色固体粉末, 即为沙拉沙星免疫原粗品。用 Sephadex-G75 (Sigma) 进行纯化分离, 以 PBS (0.01M, pH=7.4) 为洗脱液。收集沙拉沙星偶合物纯品。冻干得到沙拉沙星免疫原偶合物固体粉末。通过红外和紫外吸收光谱确定产物的偶联和偶联率。结果为:

紫外吸收光谱: 280, 323, 331 nm

红外吸收光谱 (cm^{-1} , KBr): 3310, 2960, 1656, 1538, 1452, 1397, 1163, 1075, 948, 860, 547

实施例 2

(1) 溶液 A 的制备: 在 50ml 圆形反应瓶内, 搅拌中, 加入沙拉沙星 20.0 mg (0.060 mmol), 羟基琥珀酸亚胺 (NHS) 19.33 mg (0.240 mmol), 乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺盐酸盐 (EDC.HCl) 69.0 mg (0.360 mmol), 溶解于 15ml 二甲基甲酰胺 (DMF) 中。反应 4 小时。得到溶液 A。备用。

(2) 溶液 B 的制备: 在 100 ml 圆形反应瓶内, 将 685 mg BSA 加入 60 ml PBS (pH = 7.4, 0.01 M) 中。得到溶液 B。备用。

(3) 制备沙拉沙星免疫原偶联物: 在 25°C 和搅拌下, 逐步把溶液 A 加入到溶液 B 中。反应 4 小时。得到沙拉沙星免疫原溶液。用 PBS 缓冲液透析 78 小时, 每 12 小时更换一次透析液。高速离心 (20,000g) 30 分钟。冻干上清液, 得到 482 mg 白色固体粉末, 即为沙拉沙星免疫原粗品。用 Sephadex-G75 (Sigma) 进行纯化分离, 以 PBS (0.01M, pH=7.4) 为洗脱液。收集沙拉沙星偶合物纯品。冻干得到沙拉沙星免疫原偶合物固体粉末。通过红外和紫外吸收光谱确定产物的偶联和偶联率。

实施例 3

(1) 溶液 A 的制备: 在 50ml 圆形反应瓶内, 搅拌中, 加入沙拉沙星 40.0 mg (0.120 mmol), 羟基琥珀酸亚胺 (NHS) 38.66 mg (0.480 mmol), 乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺盐酸盐 (EDC.HCl) 138.0 mg (0.720 mmol), 溶解于 15ml 二甲基甲酰胺 (DMF) 中。反应 6 小时。得到溶液 A。备用。

(2) 溶液 B 的制备: 在 100 ml 圆形反应瓶内, 将 1.2 g BSA 加入 80 ml PBS (pH = 7.4, 0.01 M) 中。得到溶液 B。备用。

(3) 制备沙拉沙星免疫原偶联物: 在 30°C 和搅拌下, 逐步把溶液 A 加入到溶液 B

中。反应 6 小时。得到沙拉沙星免疫原溶液。用 PBS 缓冲液透析 70 小时，每 10 小时更换一次透析液。高速离心 (20, 000g) 30 分钟。冻干上清液，得到 762 mg 白色固体粉末，即为沙拉沙星免疫原粗品。用 Sephadex-G75 (Sigma) 进行纯化分离，以 PBS (0.01M, pH=7.4) 为洗脱液。收集沙拉沙星偶合物纯品。冻干得到沙拉沙星免疫原偶合物固体粉末。通过红外和紫外吸收光谱确定产物的偶联和偶联率。

实施例 4

取沙拉沙星-牛血清蛋白偶合物纯品，以浓度为 0.01 M、pH 为 7.40 的磷酸缓冲液稀释为 100mg/ml，按每千克体重 100 mg 的量对 4 只新西兰大白兔进行免疫，间隔 1~2 月，如此重复 1~2 次，取新西兰大白兔血清，检测针对沙拉沙星有特异反应的抗体，经 ELISA 实验鉴定，其抗血清效价为 1:51200。

专利名称(译)	沙拉沙星的偶联物及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN1740792A	公开(公告)日	2006-03-01
申请号	CN200510044063.8	申请日	2005-07-12
[标]申请(专利权)人(译)	山东大学		
申请(专利权)人(译)	山东大学		
当前申请(专利权)人(译)	山东大学		
[标]发明人	郗日沫 卢圣欣 张玉兰		
发明人	郗日沫 卢圣欣 张玉兰		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
代理人(译)	郑华清		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种通式(I)的沙拉沙星的偶联物，由沙拉沙星半抗原与产生免疫原性的载体物质优选牛血清蛋白偶联构成。其中n为与一个牛血清蛋白分子结合的沙拉沙星的分子数，n为整数1~20，BSA为牛血清蛋白，分子量范围是6.6KDa~6.9KDa。本发明还公开了所述的偶联物的制备方法，即将沙拉沙星与产生免疫原性的载体物质连接起来，结合为具有诱发动物免疫系统产生抗体的偶联物。本发明的方法简便，快速，特异，用制备的沙拉沙星偶联物免疫大白兔，其抗血清效价达1:51200，为进一步制备沙拉沙星的酶联免疫检测试剂盒提供了基础。

