

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200610048935.2

[51] Int. Cl.

C07C 211/52 (2006.01)

C07C 209/68 (2006.01)

A61K 31/22 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2006年6月28日

[11] 公开号 CN 1793108A

[22] 申请日 2006.1.6

[21] 申请号 200610048935.2

[71] 申请人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区玉古路 20 号

[72] 发明人 李卫芬 程敬丽 朱国念 黄雅丽
韩 森

[74] 专利代理机构 杭州中成专利事务所有限公司
代理人 唐银益

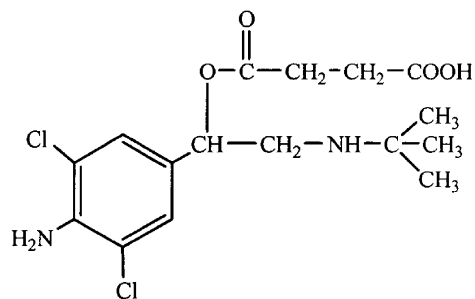
权利要求书 1 页 说明书 7 页

[54] 发明名称

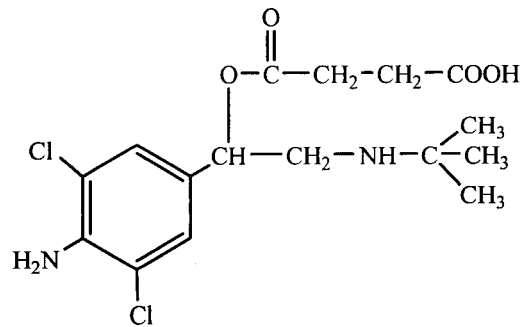
一种克伦特罗半抗原化合物、合成方法及其用途

[57] 摘要

本发明公开了一种克伦特罗人工半抗原，其分子结构式为右式，本发明还公开了上述克伦特罗人工半抗原的合成方法。该种克伦特罗半抗原的用途是用作动物免疫的抗原体系的原料，其最终产物能用于简单、快速检测盐酸克伦特罗的残留量。



1、一种克伦特罗人工半抗原，其特征在于它的分子结构式为：



2、一种如权利要求1所述的克伦特罗人工半抗原的合成方法，其特征在于包括下列步骤：

1)、盐酸克伦特罗原药溶于水，加入氨水调节体系 pH 值在 8~9；析出大量固体，抽滤，得到游离的克伦特罗原药；

2)、将上述游离的克伦特罗原药、琥珀酸酐和无水吡啶依次投入容器内，然后抽真空，充氮气保护，在 10~150℃下搅拌反应 6~48h；所述游离的克伦特罗原药与琥珀酸酐的克分子比为 1: 1~5，所述无水吡啶与游离的克伦特罗原药的克分子比在 1: 100~300；反应结束后，停止加热搅拌，静置，有大量白色固体析出，反应液抽滤，用乙酸乙酯洗涤白色固体，将此白色固体烘干，即得到克伦特罗人工半抗原。

3、一种如权利要求1所述的克伦特罗半抗原的用途，其特征在于：是用作动物免疫的抗原体系的原料。

一种克伦特罗半抗原化合物、合成方法及其用途

技术领域

本发明涉及选择一种具有-COOH的、又最大可能包含克伦特罗原有结构的化合物作为克伦特罗半抗原以及该半抗原的合成方法和用途。

背景技术

本发明属于小分子化合物（分子量小于 1000 道尔顿）免疫化学和残留分析技术领域，涉及有机合成，免疫化学及生物化学等，依靠免疫学、免疫化学基本原理和生物技术手段，设计、合成小分子目标分析物半抗原，并与载体蛋白质偶联，制备有效人工抗原，免疫动物制备对小分子分析物特异性抗体，利用抗原抗体的特异性免疫学反应和易被检测识别的标记物的放大作用，定量地检测样本中超微量小分子目标分析物，具有特异、灵敏、准确、快速、方便、廉价等特点，该技术研究的关键是半抗原的分子设计、合成和人工全抗原及抗体的制备，因此，目标分析物分子免疫学特性以及如何通过化学或生化技术突出和利用这些特性是该领域极为重要的研究内容，这一技术目前已成为兽药残留痕量分析研究的一个崭新领域，被列为当前优先研究、开发和利用的兽药残留分析技术，世界粮农组织（FAO）已向许多国家推荐此项技术，美国化学将免疫分析与气相色谱，液相色谱共同列为兽药残留分析的支柱技术。

影响免疫化学分析质量的根本因素是抗体的选择性（或特异性）与亲和性，这些性质又决定于免疫半抗原分子的结构，因此，免疫半抗原的分子设计与合成是建立小分子免疫化学分析的关键步骤。分子是构成物质的基础结构，化合物内部分子结构特征及分子间的组合方式等结构信息决定了化合物所表现的性质，也就是说，化合物的理化性质，生物活性及免疫原性等都是以分子为主体来表示和解释的。

兽药小分子必须与大分子物质连接后才能刺激动物产生特异性抗体，这已成为小分子免疫分析的基本模式。因此，半抗原的合成与鉴定试验是产生特异性抗体和建立兽药残留快速检测技术研究最基础和最关键的步骤。理想的半抗原一方面应具备待测物的特征结构，特别是立体化学特征，另一方面半抗原与载体连接后应保证待测物的特征结构能最大程度地为免疫活性细胞识别和结合，以制备出具有预期选择性的抗体。①半抗原通常由待

测物衍生化制备，或由原料合成，待测物的代谢或降解产物往往是有用的半抗原；②除待测物特征结构外，在半抗原的末端需有可直接或间接与载体蛋白质偶联的活性基团；③在活性基团与载体之间，必须有一定长度的间隔臂，以便使半抗原突出于载体表面，易为有机免疫系统识别；④间隔臂应远离待测物的特征结构部分和官能团；⑤半抗原的设计应考虑到兽药原药和有毒理学意义的代谢物，以及测定对象是单一的兽药或某一类兽药；⑥机体的免疫应答是个十分复杂的生化过程，半抗原诱导的抗体的选择性和亲合性尚难预测，多数情况下宜合成几种结构的半抗原进行研究。

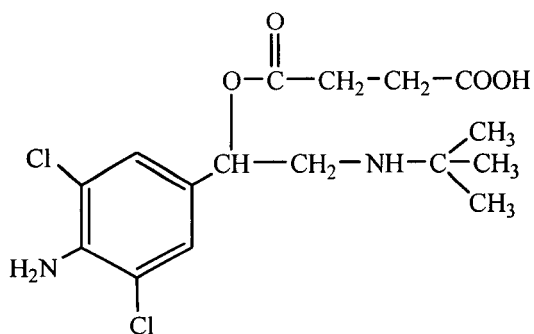
克伦特罗(clenbuterol,CL)是一种人工合成的 β_2 -肾上腺素受体激动剂(β_2 -激动剂)，常作为支气管扩张剂用于防治支气管哮喘、哮喘性慢性支气管炎及肺气肿等呼吸系统疾病所致的支气管痉挛。当其应用剂量达治疗量5-10倍时，CL可增强肌肉发育，降低脂肪沉积，因此又称为“瘦肉精”。由于其特殊的生物学功能，常被作为饲料添加剂非法用于肉用动物的生产之中。更为重要的是，由于CL在动物体内吸收快，分布广，脂溶性高，具有残留性积累和半衰期长等药理特性。人在食用残留CL肉品后引起的中毒事件不断发生。因此，各国政府都禁止CL作为饲料添加剂用于肉用动物的生产之中，我国政府也规定严禁在饲料中添加CL。同时制订了CL的最高残留限量标准。因此加强对该类物质在肉食品中的残留检测和监督就十分必要。免疫分析技术，尤其是酶免疫分析技术具有操作简便快捷，一次检测样品多、灵敏度高、费用价廉等优点，而成为最常用的检测方法。

因此开发一种简单、快速，适于盐酸克伦特罗残留现场监控的痕量分析法—免疫分析方法具有重要的现实意义。

发明内容

针对现有技术中存在的不足之处，本发明提供一种能最终用于简单、快速检测盐酸克伦特罗残留量的克伦特罗人工半抗原以及该半抗原的合成方法和用途。

本发明为达到以上目的，是通过这样的技术方案来实现的：提供一种克伦特罗人工半抗原，其分子结构式为：



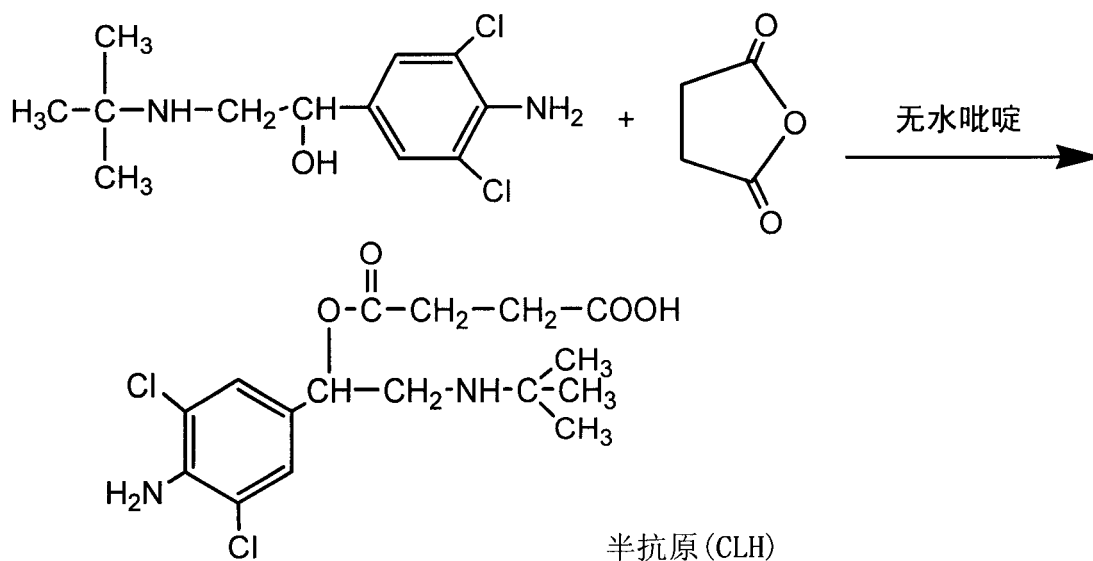
此种半抗原化合物是最大程度保留克伦特罗的结构，又具有可以与氨基偶联的基团-COOH。

本发明还提供了上述克伦特罗人工半抗原的合成方法。

本发明还提供了上述半抗原化合物的用途：是用作动物免疫的抗原体系的原料。

本发明的克伦特罗人工半抗原的合成方法，是通过这样的技术方案来实现的：

本发明的半抗原以游离的克伦特罗为原料，通过与丁二酸酐（即琥珀酸酐）反应得到克伦特罗半抗原化合物（**CLH**），反应路线如下所示：



本发明的克伦特罗半抗原化合物（**CLH**）的合成方法进一步描述如下：

1)、盐酸克伦特罗原药溶于水，加入氨水调节体系 pH 值在 8~9，析出大量固体，抽滤，得到游离的克伦特罗原药。

2)、将游离的克伦特罗原药、琥珀酸酐和无水吡啶依次投入容器内，然后抽真空，充氮气保护，在 10~150℃下搅拌反应 6~48h；游离的克伦特罗原药与琥珀酸酐的克分子比

为 1: 1~5, 无水吡啶与游离的克伦特罗原药的克分子比在 1: 100~300; 反应结束后, 停止加热搅拌, 静置, 有大量白色固体析出, 反应液抽滤, 用乙酸乙酯洗涤白色固体, 将此白色固体烘干, 即得到克伦特罗人工半抗原。

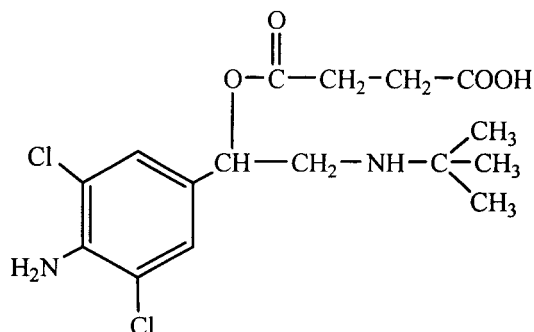
本发明的克伦特罗半抗原的设计的位点在克伦特罗分子结构中—OH 位置, 把—OH 通过化学合成改造成—OCOCH₂CH₂COOH, 使其具有一定的可长可短的连接臂, 同时又具有可以与蛋白质偶联的—COOH。本发明中合成的克伦特罗半抗原化合物为国内外首创的新化合物, 既最大程度地保留了克伦特罗的化学结构, 又具有可调节长度的连接臂, 用这一系列半抗原作为原料, 用于制备适于动物免疫的抗原体系, 免疫动物, 所得的抗体的效价、特异性、亲和力都比较好, 所得的抗体用于 ELISA 方法检测克伦特罗, 最低检测限可达 1.0±1.5μg/L(0.001ppm), 检测灵敏度高, 与其他兽药交叉反应率低。

本发明的半抗原化合物, 不仅合成方法简便、纯度较高, 而且能应用于合成适于动物免疫的抗原体系。

具体实施方式

实施例 1、

一种克伦特罗人工半抗原, 分子结构式为:



是用作动物免疫的抗原体系的原料。

上述克伦特罗人工半抗原合成方法如下:

盐酸克伦特罗原药溶于水, 加入氨水调节体系 pH 值在 8~9, 析出大量固体, 抽滤, 得到游离的克伦特罗原药。

将游离的克伦特罗原药 6.70g (0.023mol)、琥珀酸酐 4.60g(0.046mol)和无水吡啶 300ml 依次投入 500ml 的圆底烧瓶中, 然后抽真空, 充氮气保护, 缓慢加热在 60℃下搅拌反应 24h。

反应结束后，停止加热搅拌，静置 12h。有大量白色固体析出，反应液抽滤，用丙酮和乙酸乙酯洗涤固体，将固体转移到烘箱烘干，最后得到白色固体（即目标产物——克伦特罗人工半抗原）6.65g，收率为 76.7%。

所得的克伦特罗人工半抗原化合物的结构鉴定：

4-(1-(4-氨基-3,5-二氯苯基)-2-(叔丁基氨基)乙氧基)-4-羰基丁酸 (C₁₆H₂₂Cl₂N₂O₄)

白色固体重结晶后用质谱、核磁共振氢谱鉴定结构：

MS (ESIsource, negative): 375(M⁻);

¹H-NMR(δppm): 1.02 (9H,s,-CH₃), 2.48 (2H, m, -CH₂), 2.55 (2H, m, -CH₂), 2.75~2.94 (2H, dd, -CH₂), 5.37 (2H, s, 2-NH₂), 5.52(1H, m, -CH), 7.22 (2H, s, -ArH)。

元素分析 (%，计算值): C: 50.90 (50.94); H: 5.86 (5.88); N: 7.48 (7.43)

实施例 2、

免疫原的制备：

免疫原的合成利用碳二亚胺法。将半抗原化合物 (CLH) (50~80 微摩尔)，溶解在 1~2mL 的 N,N-二甲基甲酰胺中，然后在该溶液中加入等当量的二环己基碳二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺，让其在室温下反应过夜后，离心，取上清液 500~800μL 加入到 4~8mL 15~20mg/mL 的牛血清蛋白碳酸盐缓冲溶液中，加入时应缓慢，然后在伴有磁力搅拌情况下反应 4~6 小时，待反应完成后，装入透析袋，先用蒸馏水透析 2~4 次，然后用 0.8~0.9% 生理盐水透析，分装保存于 -20℃ 的冰箱中。

人工抗原的鉴定：

按合成克伦特罗免疫抗原反应所用半抗原、载体蛋白与偶联产物的比例，进行紫外 (200nm~400nm) 扫描测定，通过比较三者分别在 260nm 和 280nm 的吸光值计算其结合比。

经计算结果如下：半抗原 CLH 与 BSA 的结合比为 16.3 : 1；半抗原 CLH 与 OVA 的结合比为 13.3 : 1。

实施例 3：

动物免疫制备单克隆抗体与多克隆抗体：

1) 多抗制备：

实验选用半岁左右，体重为 2~3 公斤，健康的雄性家兔。每种免疫原免疫三只兔子（由浙江省中医学院负责兔子的饲养工作），分别编号为兔子 1~3。

实验免疫剂量基础免疫为 0.5 ~ 1.0mg/kg，加强免疫剂量为 1.0 ~ 1.5mg/kg，

用生理盐水稀释适量 CLH-BSA，加入等体积弗氏完全佐剂（加强免疫时采用弗氏不完全佐剂），充分乳化，直至滴入水中乳滴不分散。采用背部皮下多点注射与大腿肌肉注射相结合的方法。背部皮下免疫 6 点，大腿肌肉注射 2 点，3 周后进行加强免疫，以后每隔 2 周再次加强免疫。从第三次免疫开始，每次免疫后第 8 天，从兔子心脏或耳缘静脉采血，测定效价和特异性。

待免疫血清效价上去后，就可进行采血。本实验采用心脏取血法。采血后，将采血瓶放置于 37℃ 温箱中半小时，待瓶中的血液凝固，然后用接种针沿瓶内壁将血块与玻璃脱离，再放到 4℃ 冰箱中 3~4 小时，待血块收缩后，用毛细吸管将血清吸入试管中，离心，分离出血清。

2) 单抗制备:

实验选用 6-10 周龄的 BaLb/c 小鼠，20-22g，免疫 5-10 只小鼠。取 6-8 周龄体重 18-20g BALB/C 雌性小鼠，将制备的 QW-PS-BSA 交联物与等体积弗氏完全佐剂混合，充分乳化后，经背腹部皮下多点注射，剂量为 50μg/每只，以后每隔 3 周，取抗原（与一免等剂量）和等体积的弗氏不完全佐剂充分乳化后腹腔和皮下注射加强免疫，加强免疫共 4 次，未免以加倍剂量的抗原进行腹腔注射，3 天后取脾细胞进行融合。后经 3-4 次有限稀释法克隆筛选得到一株细胞株 2E3，经多次体外传代和多次冻存复苏后，细胞株均能良好生长，并稳定分泌抗体。经扩大培养后，用于抗体制备和液氮保存。

抗体的纯化:

辛酸-硫酸铵盐析法是一个经典的方法。辛酸在偏酸性的条件下能将血清中除 IgG 以外的蛋白质都沉淀下来，上清液中只有 IgG。辛酸加入因抗体的来源不同而不同，人血清为 70ul/ml,兔血清为 75ul/ml,小鼠血清为 40ul/ml,小鼠腹水为 33ul/ml。这种方法 IgG 的回收率达 90%以上。最后将抗体制成冻干粉，分装，-20℃ 保存。

抗血清效价测定:

免疫原复合物按常规方法免疫了三只兔子。从加强免疫第二次开始，在每次免疫后第 8 天于兔子耳缘静脉采血，血清经适当稀释后用间接 ELISA 测定效价。第 4 次免疫后，兔子获得了高效价的抗体，抗血清的效价为 256000:1~512000:1（指 OD_{490nm} 值等于 1.0）。小鼠腹水效价在 10⁶ 左右。

抗体的交叉反应性：以抗体对克伦特罗抑制质量浓度（IC₅₀）与对竞争物的 IC₅₀ 之比的百分数为其交叉反应率（CR%），所测竞争物为沙丁胺醇、肾上腺素、去甲肾上腺素和

来克多巴胺。结果表明：抗体与沙丁胺醇的交叉反应率为 19.50%，来克多巴胺为 1.74%，肾上腺素和 去甲肾上腺素小于 0.01%，克伦特罗为 100%。

由此可知，除克伦特罗以外，所制备的抗体的特异性均较强。

最后，还需要注意的是，以上列举的仅是本发明的若干个具体实施例。显然，本发明不限于以上实施例，还可以有许多变形。本领域的普通技术人员能从本发明公开的内容直接导出或联想到的所有变形，均应认为是本发明的保护范围。

专利名称(译)	一种克伦特罗半抗原化合物、合成方法及其用途		
公开(公告)号	CN1793108A	公开(公告)日	2006-06-28
申请号	CN200610048935.2	申请日	2006-01-06
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	李卫芬 程敬丽 朱国念 黄雅丽 韩森		
发明人	李卫芬 程敬丽 朱国念 黄雅丽 韩森		
IPC分类号	C07C211/52 A61K31/22 C07C209/68 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种克伦特罗人工半抗原，其分子结构式为右式，本发明还公开了上述克伦特罗人工半抗原的合成方法。该种克伦特罗半抗原的用途是用作动物免疫的抗原体系的原料，其最终产物能用于简单、快速检测盐酸克伦特罗的残留量。

