

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810219298.X

[51] Int. Cl.

C07D 263/26 (2006.01)

C07K 16/06 (2006.01)

G01N 33/536 (2006.01)

[43] 公开日 2009年4月15日

[11] 公开号 CN 101407501A

[22] 申请日 2008.11.21

[21] 申请号 200810219298.X

[71] 申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路483号

[72] 发明人 沈玉栋 张世伟 孙远明 王弘
雷红涛 肖治理 杨金易

[74] 专利代理机构 广州粤高专利代理有限公司

代理人 林丽明 任重

权利要求书3页 说明书11页

[54] 发明名称

5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物
半抗原、抗原和抗体的制备方法

[57] 摘要

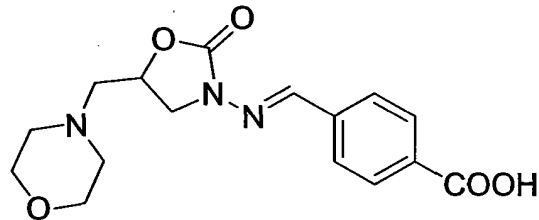
本发明公开了一种5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物半抗原、抗原和抗体的制备方法。本发明针对5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物设计和制备得到的半抗原在分子结构、立体化学和电子分布上与5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物对应体相似，半抗原结构中的连接臂不易于诱导产生“臂抗体”，并且使用了一定长度的饱和碳链，使机体更易于识别；采用所述半抗原偶连载体蛋白制备的抗原能使机体产生效价高，特异性好的针对5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物的抗体；所述抗体应用于检测动物源性食品5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮的残留量中，灵敏快捷，结果稳定。

1、一种 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物半抗原的制备方法，其特征在于包括以下步骤：

(1) 将 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮与带羧基的苯甲醛衍生物在室温条件下于甲醇中进行氨醛缩合反应；

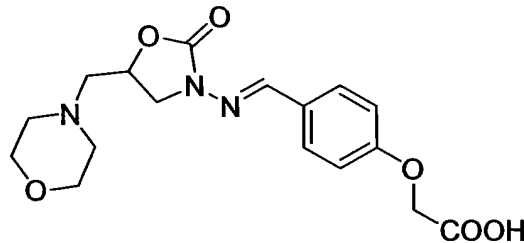
(2) 洗涤得到的沉淀得到目标半抗原。

2、一种权利要求 1 所述制备方法制备得到的 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物半抗原，其特征在于具有式 (I) 所示结构：



(I)

3、一种权利要求 1 所述制备方法制备得到的 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物半抗原，其特征在于具有式 (II) 所示结构：



(II)

4、一种 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物抗原的制备方法，将 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物半抗原偶连载体蛋白制备得到，其特征在于包括以下步骤：

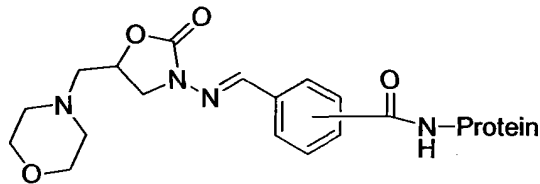
(1) 将 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物半抗原与 N, N' -

二环己基碳二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺反应形成活泼酯：

(2) 将活泼酯滴加入蛋白溶液中，反应过夜；

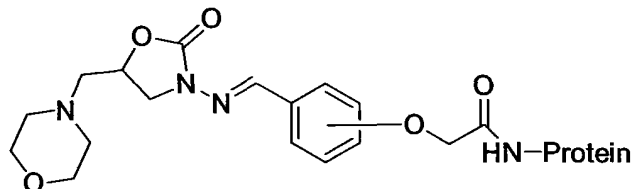
(3) 偶连有 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物半抗原的蛋白经过 3 天的透析纯化得到目标抗原。

5、一种权利要求 4 所述制备方法制备得到的 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物抗原，其特征在于具有式 (III) 所示结构：



(III)

6、一种权利要求 4 所述制备方法制备得到的 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物抗原，其特征在于具有式 (IV) 所示结构：



(IV)

7、一种 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物抗体的制备方法，其特征在于包括以下步骤：

(1) 将 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物抗原配合弗氏佐剂免疫实验动物；

(2) 免疫 4 次后抽取血液，分离血清；

(3) 血清经过抗体纯化得到目标抗体。

8、一种权利要求 7 所述制备方法制备得到的抗体在 ELISA 法检测 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮中的应用。

5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物半抗原、抗原和抗体的制备方法 技术领域

本发明属于免疫学技术领域,具体涉及5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物半抗原、抗原和抗体的制备方法,以及制备得到的5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物半抗原、抗原和抗体及抗体的应用。

背景技术

呋喃它酮,属硝基呋喃类药物,为广谱抗生素,对革兰阳性及阴性菌均有一定抗菌作用。但有关研究证明,硝基呋喃类药物及其代谢物具有相当大的毒性,有致畸胎副作用,且能诱发癌症,因而引起了人们的高度重视。1990年7月欧盟颁布2377/90/EEC 条例,将硝基呋喃类药物及其代谢产物列为A 类禁用药物,规定其在动物源性食品中的残留检测限为 $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。自1995年起欧盟全面规定禁止使用呋喃类抗菌物质,在动物源性食品中呋喃类残留物的检出限为不得检出。2004 年美国FDA 公布了禁止在进口动物源性食品中使用的11 种药物名单,其中包括呋喃唑酮和呋喃它酮。我国农业部文件农牧发[2002]1号也规定动物源性食品中呋喃它酮的检出限为不得检出。

因为呋喃它酮原药分子在体内很快就代谢,而蛋白结合态代谢产物能在组织中存留较长时间,所以在分析此类药物的残留时必须分析其代谢后的产物(AMOZ),5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮。

传统的5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮分析方法是利用色谱、质谱等物化手段定性定量,但这些方法繁琐、仪器化程度高及分析速度慢,

不能满足及时、快速的检测要求。免疫学检测方法具有简便、快速、灵敏、高特异性等优点，越来越被关注。国际权威学术刊物将其列为近年来首位优先发展的新分析技术。

大多数药物、毒素、环境污染物分子质量小于1000u，属于仅有反应原性而无免疫原性的半抗原。目前制备小分子半抗原抗体的常规方法为：选择具有毒理学意义的代谢产物或原形药物作为待测物，设计合成保留待测物分子结构特征并带有活性基团的半抗原，通过共价键使半抗原与大分子蛋白质载体偶联，制备人工免疫原，经动物免疫程序制备针对半抗原的特异性抗体。

理论上制备所有原形药物的小分子半抗原抗体都可以实现，但也需要具体的、特定的技术方案才能实现按目标药物的特异性抗体的制备，目前尚无可用于ELISA检测的5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮半抗原、抗原和抗体的相关报道，使得5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮ELISA检测方法暂时还未建立。

发明内容

本发明的目的是克服现有技术的不足，提供一种 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮半抗原、抗原和抗体的制备方法。

本发明的另一个目的是提供所述制备方法制备的 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮半抗原、抗原和抗体。

本发明还有一个目的是提供所述抗体在 ELISA 法检测 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮中的应用。

本发明的目的通过以下技术方案来予以实现：

提供一种 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物半抗原的制备方法，包括以下步骤：

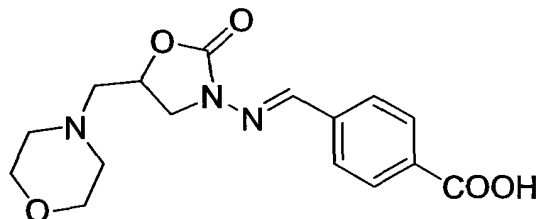
(1) 将 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮与带羧基的苯甲醛衍生物在室温条件下于甲醇中进行氨醛缩合反应；

(2) 洗涤得到的沉淀得到目标半抗原。

所述带羧基的苯甲醛衍生物优选对羧基苯甲醛或 2-(4-甲酰基苯氧基)乙酸。所述洗涤是用水洗两遍，用甲醇洗两遍。

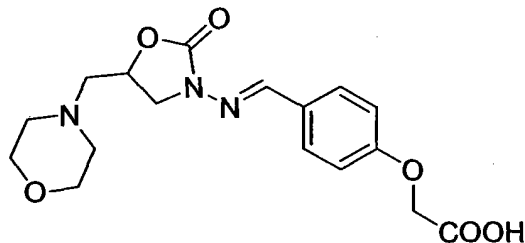
本发明提供了两种采用上述方法制备得到的半抗原，如果带羧基的苯甲醛衍生物选择对羧基苯甲醛得到半抗原 (MCPAMOZ) 具有式

(I) 所示结构：



(I)

如果带羧基的苯甲醛衍生物选择 2-(4-甲酰基苯氧基)乙酸得到半抗原 (CEPAMOZ) 具有式 (II) 所示结构：



(II)

由上述半抗原结构可以看出，本发明针对 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物设计和制备得到的半抗原在分子结构、立体化学和电

子分布上与 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物对应体相似，半抗原结构中的连接臂不易于诱导产生“臂抗体”，并且使用了一定长度的饱和碳链，使机体更易于识别。

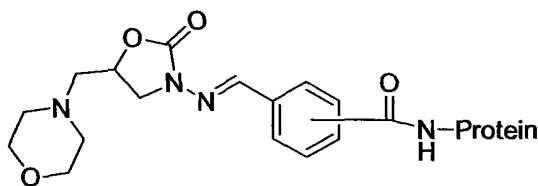
本发明提供了 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物抗原的制备方法，将 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物半抗原偶连载体蛋白得到人工抗原，具体包括以下步骤：

(1) 将 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物半抗原与 N,N'-二环己基碳二亚胺 (DCC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 反应形成活泼酯；

(2) 将活泼酯滴加入蛋白溶液中，反应过夜；

(3) 偶连有 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物半抗原的蛋白经过 3 天的透析纯化得到目标抗原。

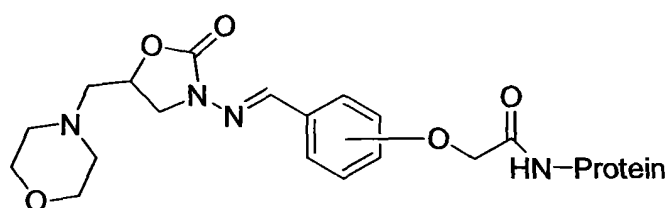
采用半抗原 MCPAMTZ 经上述方法制备得到的抗原具有式 (III) 所示结构：



(III)

采用半抗原 CEPAMTZ 经上述方法制备得到的抗原具有式 (IV) 所示结构：

所示结构：



(IV)

本发明提供了 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物抗体的制备方法，用上述人工抗原免疫实验动物，使其机体产生特异地针对 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物的抗体，所述抗体是能与 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物发生特异性免疫反应的免疫球蛋白 G。制备方法具体包括以下步骤：

(1) 将 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物抗原配合福式佐剂免疫实验动物；

(2) 免疫 4 次后抽取血液，分离血清；

(3) 血清经过抗体纯化步骤得到目标抗体。

本发明还提供了所述半抗原、抗原和抗体在 ELISA 法检测 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮中的应用，具体涉及包被原的制备。

与现有技术相比，本发明具有以下有益效果：

(1) 本发明针对 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物设计和制备的半抗原在分子结构、立体化学和电子分布上与 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物对应体相似，半抗原结构中的连接臂不易于诱导产生“臂抗体”，并且使用了一定长度的饱和碳链，使机体更易于识别。半抗原分子具有便于与蛋白载体偶联的活性基团，且活性基团的

存在对待测物分子的电子分布没有影响。

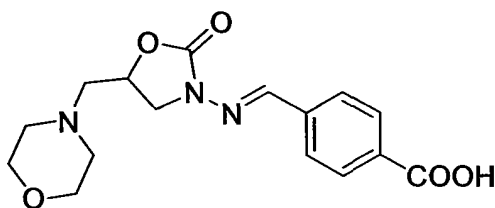
(2) 本发明采用设计和制备得到的半抗原偶连载体蛋白得到抗原，免疫机体后能使机体产生效价高、特异性好的、针对 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物的抗体。所述抗体用于 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮的免疫学分析灵敏度高，结果稳定。

具体实施方式

下面结合具体实施例来进一步详细说明本发明。

实施例 1 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物半抗原 MCPAMOZ 的制备方法

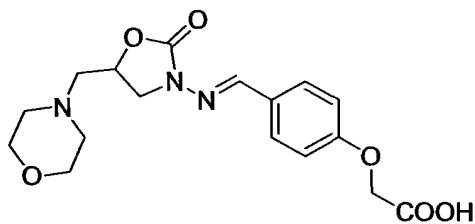
在 50ml 圆底烧瓶中加入对羧基苯甲醛 1.15g，缓慢加入甲醇直至对羧基苯甲醛完全溶解，搅拌中加入 0.5g 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮，室温搅拌过夜。反应结束过滤，水洗两遍，甲醇洗两遍，干燥，得 0.80g 白色粉末，其结构式如 (I) 所示。ESI-MS (negative) m/z : 332 (M-H). $^1\text{H NMR}$ (400MHz, d_5 -Pyridine, TMS): δ 8.44(d, $J=8.3$, 2H); 7.99(d, $J=8.3$, 2H) 7.94(s, 1H); 4.96 (qd, $J_1=6.2$, $J_2=6.2$, $J_3=6.3$, $J_4=8.4$, 1H); 4.09 (t, $J=8.9$ Hz, 1H); 3.78 (dd, $J_1=6.7$, $J_2=8.8$, 1H); 3.69-3.64 (m, 4H); 2.67 (dd, $J_1=6.2$, $J_2=13.3$, 1H); 2.61(dd, $J_1=5.7$, $J_2=13.4$); 2.51-2.46(m, 4H)



(I)

实施例 2 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物半抗原 CEPAMOZ 的制备方法

圆底烧瓶中加入 2-(4-甲酰基苯氧基)乙酸 1.06g, 缓慢加入甲醇直至对羧基苯甲醛完全溶解, 搅拌中加入 0.5g 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮, 室温搅拌过夜。反应结束过滤, 水洗两遍, 甲醇洗两遍, 干燥, 得 0.93g 白色粉末, 其结构式如式 (II) 所示。ESI -MS (negative) m/z : 362 (M-H)⁻. ¹H NMR(600MHz, *d*₅- Pyridine, TMS): δ 7.89-7.87(m, 3H); 7.22(d, *J*=8.8, 2H); 5.02(s, 2H); 4.88 (qd, *J*₁=6.31, *J*₂=6.31, *J*₃=6.35, *J*₄=8.5, 1H); 4.01(t, *J*=8.8Hz, 1H); 3.70(dd, *J*₁=6.8, *J*₂=8.7, 1H); 3.67-3.65(m, 4H); 2.63(dd, *J*₁=6.2, *J*₂=13.3, 1H); 2.56(dd, *J*₁=5.6, *J*₂=13.4); 2.51-2.44(m, 4H)

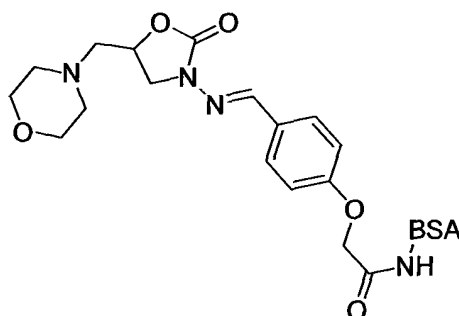


(II)

实施例 3 免疫原 CEPAMOZ-BSA 的制备方法

取半抗原 CEPAMOZ 0.1mmol 溶于 2ml DMF 中, 搅拌加入 DCC27.5mg 和 NHS14.4mg, 4℃下磁力搅拌反应过夜, 离心后上清液为 A 液; 称取 BSA140mg 溶于 10ml 浓度为 0.1mol/L 的 PBS(PH8.0) 中, 加入 DMF1ml, 搅拌溶解制备 B 液; 磁力搅拌下, A 液逐渐滴入

B 液中，4℃下反应 12h。离心后，取上清液，4℃下用生理盐水透析 3d，每天更换 3 次透析液，得到的全抗原以 1mg/ml 的浓度分装于 0.5ml 离心管中，冻存于-20℃冰箱中，供免疫用。制备的 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮衍生物免疫原 CEPAMOZ-BSA 结构如式 (V) 所示：



(V)

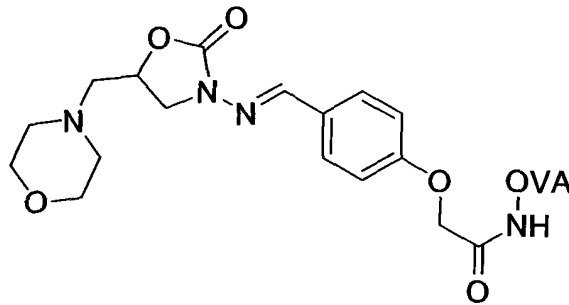
免疫原鉴定：对载体蛋白 BSA，半抗原 CEPAMOZ 和免疫原 CEPAMOZ-BSA 进行紫外扫描测定（200~400nm），发现免疫原 CEPAMOZ-BSA 与 BSA 和半抗原 IV 相比，吸收曲线有明显改变，说明半抗原 CEPAMOZ 与 BSA 偶连成功。三硝基苯磺酸法（TNBS）测得半抗原 IV 与 BSA 的偶连比为 15:1。

实施例 4 包被原 CEPAMOZ-OVA 的制备方法

取半抗原 CEPAMOZ 0.1mmol 溶于 2ml DMF 中，搅拌加入 DCC 27.5mg 和 NHS 14.4mg。4℃下磁力搅拌反应过夜，离心后上清液为 A 液，称取 OVA 140mg 溶于 10ml 浓度为 0.1mol/L 的 PBS(PH8.0)中。加入 DMF 1ml，搅拌溶解制备 B 液，磁力搅拌下，A 液逐渐滴入 B 液中，4℃下反应 12h。离心后，取上清液，4℃下用生理盐水透析 3d，

每天更换 3 次透析液。得到的全抗原以 1mg/ml 的浓度分装于 0.5ml 离心管中。冻存于 -20℃ 冰箱中，供包被用。

制备的包被原 CEPAMOZ-OVA 结构如式 (VI) 所示：



(VI)

包被原鉴定：对载体蛋白 OVA，半抗原 CEPAMOZ 和包被原 CEPAMOZ-OVA 进行紫外扫描测定（200~400nm），发现包被原 CEPAMOZ-OVA 与载体蛋白 OVA 及半抗原 CEPAMOZ 相比，吸收曲线有明显改变，说明半抗原 CEPAMOZ 与载体蛋白 OVA 偶连成功。TNBS 法测得半抗原 CEPAMOZ 与载体蛋白 OVA 的偶连比为 12:1。

实施例 5 多克隆抗体的制备方法及抗体效价测定

多克隆抗体的制备：将免疫原慢慢解冻，然后加入等量的佐剂完全乳化后，采用背部皮下、各部位皮下、腿部肌肉和耳缘静脉多种注射方式免疫 6 只体重为 2.5~3kg 的健康新西兰大白兔，第 1 次免疫用弗氏完全佐剂，以后加强免疫均用弗氏不完全佐剂。第 4 次加强免疫后 1 周耳缘静脉采血，并利用间接 ELISA 测定血清效价。当效价不再上升时，采用耳缘静脉免疫兔子。1 周后心脏采血，室温静置 0.5~1 h，于 4℃ 冰箱过夜后吸取上层析出的血清。抗血清采用硫酸

铵沉淀法纯化得到多克隆抗体，透析后冷冻干燥成粉末，于-20℃下保存备用。

抗体效价的检测：间接竞争 ELISA 测定抗体阳性滴度以 2.1 倍于阴性血清的测定值为准，测得抗体的阳性滴度为 1:1280000。

实施例 6 抗体亲和性及特异性试验

将不同浓度的 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮的邻硝基苯甲醛的衍生物 NPAMOZ 与抗体一起进行间接竞争 ELISA 反应，测定其抑制率，以确定抗体对 NPAMOZ 的亲和性。其 IC₅₀ 为 0.5 ng/mL。

将 NPAMOZ (AMOZ 的硝基苯甲醛缩合物)、邻硝基苯甲醛、苯甲醛、硝基苯、NPAOZ (AOZ 的硝基苯甲醛缩合物)、NPAHD (AHD 的硝基苯甲醛缩合物) 和 NPSEM (SEM 的硝基苯甲醛缩合物) 配成不同浓度溶液，测定其交叉反应率，结果发现与同类药物无交叉反应，见表 1。

以上实验结果说明免疫产生的抗体具有灵敏度高，特异性好等优点。

表 1 交叉反应试验结果

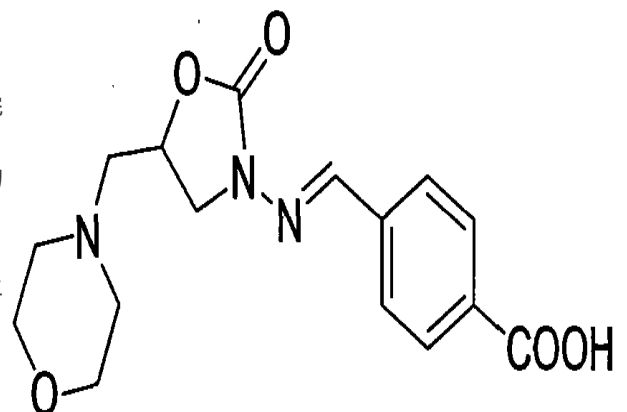
竞争药物	交叉反应率(%)
NPAMOZ	100%
邻硝基苯甲醛	<0.01
苯甲醛	<0.01
硝基苯	<0.01

NPAOZ	<0.01
NPAHD	<0.01
NPSEM	<0.01

专利名称(译)	5 - 甲基吗啉 - 3 - 氨基 - 2 - 噁唑烷酮衍生物半抗原、抗原和抗体的制备方法		
公开(公告)号	CN101407501A	公开(公告)日	2009-04-15
申请号	CN200810219298.X	申请日	2008-11-21
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	沈玉栋 张世伟 孙远明 王弘 雷红涛 肖治理 杨金易		
发明人	沈玉栋 张世伟 孙远明 王弘 雷红涛 肖治理 杨金易		
IPC分类号	C07D263/26 C07K16/06 G01N33/536		
代理人(译)	林丽明 任重		
其他公开文献	CN101407501B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种5 - 甲基吗啉 - 3 - 氨基 - 2 - 噁唑烷酮衍生物半抗原、抗原和抗体的制备方法。本发明针对5 - 甲基吗啉 - 3 - 氨基 - 2 - 噁唑烷酮衍生物设计和制备得到的半抗原在分子结构、立体化学和电子分布上与5 - 甲基吗啉 - 3 - 氨基 - 2 - 噁唑烷酮衍生物对应体相似，半抗原结构中的连接臂不易于诱导产生“臂抗体”，并且使用了一定长度的饱和碳链，使机体更易于识别；采用所述半抗原偶连载体蛋白制备的抗原能使机体产生效价高，特异性好的针对5 - 甲基吗啉 - 3 - 氨基 - 2 - 噁唑烷酮衍生物的抗体；所述抗体应用于检测动物源性食品5 - 甲基吗啉 - 3 - 氨基 - 2 - 噁唑烷酮的残留量中，灵敏快捷，结果稳定。



(I)