



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109824599 A

(43)申请公布日 2019.05.31

(21)申请号 201910153401.3

G01N 33/535(2006.01)

(22)申请日 2019.02.28

(71)申请人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

(72)发明人 温凯 王战辉 江海洋 周旭平

段长飞 马立才 谢冰 刘河冰

张英杰 覃丹凤

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司

公司 11002

代理人 王文君 陈征

(51)Int.Cl.

C07D 235/30(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

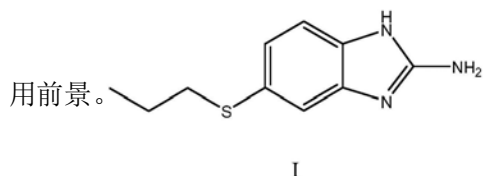
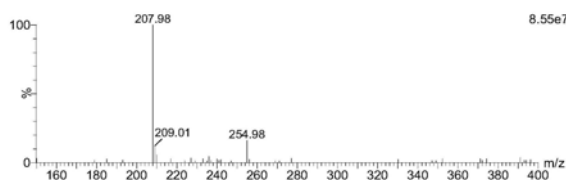
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

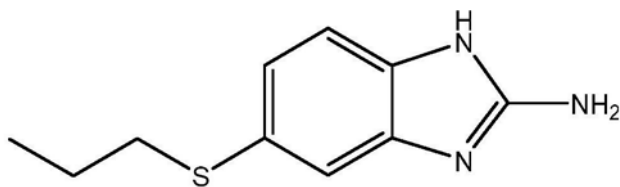
一种阿苯达唑半抗原及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明涉及半抗原制备领域,具体涉及一种阿苯达唑半抗原及其制备方法和应用。所述阿苯达唑半抗原具有式I所示结构,在制备过程中,以阿苯达唑和盐酸为原料经反应制得。利用所述半抗原与载体蛋白偶联可制得阿苯达唑全抗原,并可进一步制备阿苯达唑抗体。本发明所提供的阿苯达唑半抗原本身含有氨基端,无需对结构进行改变即可与载体偶联,且与载体蛋白连接后更容易暴露出特异性结合位点,灵敏度更高;所述阿苯达唑半抗原的合成方法简单、产率和纯度高;所制得的阿苯达唑抗体具有广谱识别性能,灵敏度高,在阿苯达唑相关残留检测中具有良好的应用前景。



1. 一种阿苯达唑半抗原,其特征在于,其结构如式I所示:



I。

2. 制备权利要求1所述的半抗原的方法,其特征在于,以阿苯达唑和盐酸为原料经反应制得。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,所述阿苯达唑与所述盐酸的摩尔比为4~6:1,优选为5:1;

所述盐酸的浓度优选为25~35%,更优选为32%。

4. 根据权利要求2或3所述的方法,其特征在于,反应温度为70~90℃;优选为80℃。

5. 根据权利要求2~4中任一项所述的方法,其特征在于,在反应结束后,调节体系pH值为6~7,加入硅胶对其进行吸附,用洗脱液洗脱所得硅胶体系,收集洗脱溶液,经分离得所述半抗原。

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,所述洗脱液包括二氯甲烷和甲醇。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述二氯甲烷和所述甲醇的体积比为40~50:1,优选为30:1。

8. 一种阿苯达唑全抗原,其特征在于,由权利要求1所述的半抗原或权利要求2~7中任一项所述的方法制备而成的半抗原与载体蛋白偶联后得到;

所述载体蛋白优选为牛血清蛋白或卵清蛋白;

偶联方法优选为N,N-羰基二咪唑法。

9. 一种阿苯达唑抗体,其特征在于,以权利要求8所述的全抗原为免疫原,免疫动物获得;

优选所述抗体为多克隆抗体。

10. 权利要求1所述的半抗原或权利要求2~7中任一项所述的方法制备而成的半抗原或权利要求8所述的全抗原或权利要求9所述的抗体在阿苯达唑、阿苯达唑砒、阿苯达唑亚砒、芬苯达唑、氟苯达唑检测中的应用,优选通过ELISA免疫分析、或制备检测试剂或胶体金检测试纸条或试剂盒来进行检测。

一种阿苯达唑半抗原及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及半抗原制备领域,具体涉及一种阿苯达唑半抗原及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 阿苯达唑是一种咪唑衍生物类广谱驱肠虫药物。其高效、低毒、广谱,临床可用于驱蛔虫、蛲虫、绦虫、鞭虫、钩虫、粪圆线虫等。在体内代谢为亚砷类或砷类后,抑制寄生虫对葡萄糖的吸收,导致虫体糖原耗竭,或抑制延胡索酸还原酶系统,阻碍ATP的产生,使寄生虫无法存活和繁殖。

[0003] 2004年4月国家食品药品监督管理局药品评价中心第六期《药品不良反应信息通报》中曾对服用阿苯达唑等驱虫药引起脑炎的风险进行通报。中华人民共和国农业部235号公告《动物性食品中兽药最高残留限量》对阿苯达唑在动物组织中残留也制定了最高残留限量。因此,加强对动物性食品中阿苯达唑的监控、检测很有必要。

[0004] 目前有关阿苯达唑及其代谢物的残留检测方法主要是液相色谱、液质联用等仪器分析法等。虽然这些方法特异性强、灵敏度高,但是样品前处理操作步骤繁琐,成本较高,不适用于大批量样品的筛选检测。而免疫分析方法鉴于在抗原抗体的定性定量方面独特的优势和操作简便快速、成本低、灵敏度较高、分析样本量大的优点弥补了仪器分析的不足,在阿苯达唑的残留检测中起着越来越重要的作用。

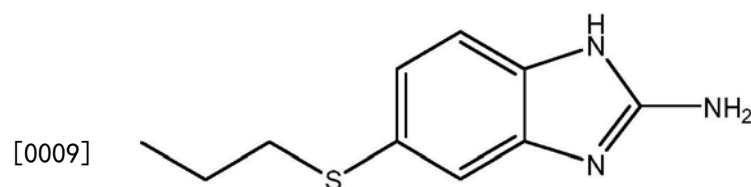
[0005] 影响免疫分析质量的根本因素是抗体的特异性与灵敏度,这些性质又取决于免疫半抗原分子的结构,因此免疫半抗原的分子设计与合成是产生特异性抗体和建立小分子兽药残留快速检测技术的最基础和最关键的步骤。

发明内容

[0006] 为了解决上述问题,本发明提供了一种阿苯达唑半抗原及其制备方法和应用。

[0007] 为了实现上述目的,本发明的技术方案如下:

[0008] 一种阿苯达唑半抗原,结构如式I所示:



I。

[0010] 相较于其他对阿苯达唑修饰得到的半抗原,本发明的半抗原本身含有氨基端,可直接通过交联剂与载体偶联,无需对结构进行改变即可作为半抗原使用;同时,在与载体连接时连接臂更短,减少了连接臂上的折叠,使得其与载体蛋白连接后更容易暴露出特异性结合位点,灵敏度更高。

[0011] 本发明进一步提出了一种制备上述半抗原的方法,包括以下步骤:以阿苯达唑和盐酸为原料经反应制得。

[0012] 通过多种方法可以不同程度地得到本发明所提供的半抗原,但是本发明所提出的反应方法相对于脱羧或者强酸制弱酸的反应来说,不可逆性更强,反应所得化合物产率和纯度更高。

[0013] 作为本发明的优选方案,在上述半抗原的制备过程中,所述阿苯达唑与所述盐酸的摩尔比为4~6:1,优选为5:1。

[0014] 作为本发明的优选方案,在上述半抗原的制备过程中,所述盐酸的浓度优选为25~35%,更优选为32%。

[0015] 作为本发明的优选方案,在上述半抗原的制备过程中,反应温度为70~90℃;优选为80℃。

[0016] 在研发中发现,当通过控制温度来调节反应条件时,在上述反应温度范围内,反应会在合适的位点进行取代,进而得到预想的半抗原结构。在80℃时,反应效果最好。

[0017] 优选在上述半抗原的制备过程中,在反应结束后,调节体系pH值为6~7,加入硅胶对其进行吸附,用洗脱液洗脱所得硅胶体系,收集洗脱溶液,经分离得所述半抗原。

[0018] 本发明中,使用上述分离纯化方法,可以更好的纯化本发明中的半抗原。

[0019] 优选在上述分离纯化过程中,所述洗脱液包括二氯甲烷和甲醇;优选所述二氯甲烷和所述甲醇的体积比为40~50:1,优选为30:1。

[0020] 使用二氯甲烷和甲醇作为洗脱液,可以更好地洗脱所需的化合物,提高洗脱率和纯度;尤其是当所述二氯甲烷和所述甲醇的体积比为30:1时,洗脱液的用量和洗脱时间变小,对阿苯达唑半抗原的洗脱达到最佳,洗脱率高达95%,纯度提高至99%。

[0021] 优选的,本发明中使用NaHCO₃调节pH值。

[0022] 优选地,本发明中阿苯达唑半抗原的制备方法如下:

[0023] S1、将50ml圆底烧瓶冲洗干净,用乙醇吹干,将其固定在搅拌器上,加入搅拌子。

[0024] S2、称取阿苯达唑原料500mg加入到S1步骤准备好的容器中,加入5ml乙醇溶解,搅拌,加入10ml盐酸,加热到80℃,用薄层色谱法检测至反应完全。

[0025] S3、加入NaHCO₃调节PH值6~7,加入硅胶1g进行拌样,旋干样品进行柱层析,以二氯甲烷:甲醇体积比为30:1的混合液洗脱,收集所需要的溶液,旋干,收集,即得到式I所示的半抗原。

[0026] 本发明的制备方法各合成步骤中所述的固定值仅是优化后数值,但是本发明的保护范围不限于此,只要能够合成相应的阿苯达唑半抗原和全抗原化合物,应均属于本发明的保护范围。

[0027] 本发明进一步提出一种阿苯达唑全抗原,由上述的半抗原与载体蛋白偶联后得到;所述载体蛋白优选为牛血清蛋白或卵清蛋白;偶联方法优选为N,N-羰基二咪唑法(即生物偶联法)。

[0028] 针对本发明中的半抗原,优选载体蛋白为牛血清蛋白或卵清蛋白,偶联方法为N,N-羰基二咪唑法,偶联效果达到最佳。

[0029] 本发明进一步提出一种阿苯达唑抗体,以上述全抗原为免疫原,免疫动物获得所述阿苯达唑抗体;

[0030] 优选所述抗体为多克隆抗体。

[0031] 本发明进一步提出了上述抗体在阿苯达唑、阿苯达唑砒、阿苯达唑亚砒、芬苯达唑、氟苯达唑检测中的应用,优选通过制备检测试剂或胶体金检测试纸条或试剂盒来进行检测。

[0032] 本发明进一步提出了上述抗体在阿苯达唑的ELISA免疫分析检测中的应用。

[0033] 本发明的有益效果如下:

[0034] (1) 本发明的阿苯达唑半抗原相较于现有技术中的半抗原,本身含有氨基端,可直接通过交联剂与载体偶联,且与载体蛋白连接后更容易暴露出特异性结合位点,灵敏度更高;在制备特异性抗体时,半抗原和蛋白质偶联之后使阿苯达唑半抗原能够很好的与B淋巴细胞发生特异性结合,并产生很好的免疫应答效果。

[0035] (2) 本发明的半抗原合成方法简单,制成的产品纯度达到99%,产率高达94%,可以直接与蛋白偶联后免疫动物产生针对阿苯达唑的特异性抗体。

[0036] (3) 本发明所提供的抗体可以用于检测阿苯达唑,尤其是多克隆抗体具有广谱识别性能,与阿苯达唑、阿苯达唑砒、阿苯达唑亚砒、芬苯达唑、氟苯达唑的交叉反应率分别为100%、85.6%、56.9%、34.1%、17%;抗血清效价为1:8000,最佳小鼠多抗血清IC₅₀为0.351ng/mL。

附图说明

[0037] 图1为实施例1中的阿苯达唑半抗原的质谱检测结果图。

[0038] 图2为实施例2中的BSA的MALDI-TOF-MAS图。

[0039] 图3为实施例2中的阿苯达唑-BSA复合物的MALDI-TOF-MAS图。

[0040] 图4为对比例1中的阿苯达唑半抗原的质谱检测结果图。

[0041] 图5为对比例2中的阿苯达唑-BSA复合物的MALDI-TOF-MAS图。

具体实施方式

[0042] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0043] 实施例1

[0044] 阿苯达唑半抗原的制备及结构鉴定

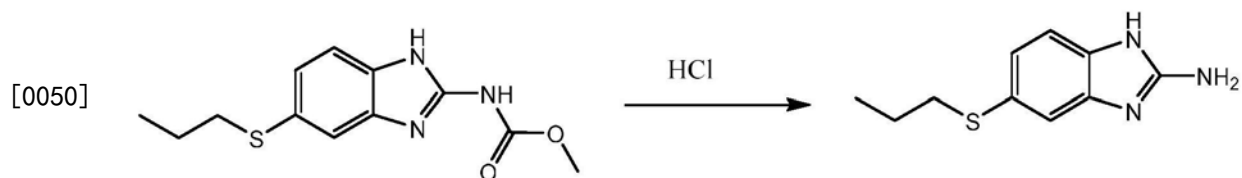
[0045] 1) 阿苯达唑半抗原的制备

[0046] S1、将50ml圆底烧瓶冲洗干净,用乙醇吹干,将其固定在搅拌器上,加入搅拌子。

[0047] S2、称取阿苯达唑原料500mg加入到S1步骤准备好的容器中,加入5ml乙醇(浓度为100%)溶解,搅拌,加入10ml盐酸(浓度为32%),加热到80℃,用薄层色谱法检测至反应完全。

[0048] S3、加入NaHCO₃调节PH值6-7,加入硅胶1g进行拌样,旋干样品进行柱层析,以二氯甲烷:甲醇体积比为30:1的混合液洗脱,收集所需要的溶液,旋干,收集,即得到想要的半抗原。结构如式(I)所示。

[0049] 反应方程式如下:



[0051] 2) 阿苯达唑半抗原的结构鉴定

[0052] 对所得产品进行质谱鉴定, 鉴定结果如图1所示。可以明显看到M/Z 207.98的峰 (M+H⁺), 与目标分子量 (207.30) 相符, 说明阿苯达唑半抗原合成成功。产品的纯度达到99%, 产率达到94%。

[0053] 实施例2

[0054] 阿苯达唑人工抗原的制备及结构鉴定

[0055] 一、阿苯达唑人工抗原的制备

[0056] 1、免疫原的合成

[0057] (1) 将实施例1制备得到的半抗原 (式I) 9.2mg溶解于1.5mL二甲基甲酰胺 (DMF) 中, 完全溶解后, 加入N,N'-羰基二咪唑 (CDI) 7.62mg, 室温下搅拌活化2-3小时, 得到溶液I。

[0058] (2) 称取50mg牛血清白蛋白 (BSA), 溶解于3.5mL 0.1M碳酸缓冲液中, 200rpm搅拌10min, 充分溶解, 得到溶液II。

[0059] 其中, 所述0.1M碳酸缓冲液的pH为9.6, 溶剂为水, 溶质及其浓度如下: Na₂CO₃ 1.59g/L, NaHCO₃ 2.94g/L。

[0060] (3) 取上述溶液I, 在冰水浴 (4℃) 环境下逐滴加入到上述溶液II中, 边加边搅拌, 室温 (20-25℃) 磁力搅拌 (500rpm) 反应24h, 得到溶液III。

[0061] (4) 将所述溶液III装入1个蒸馏水冲洗干净透析袋 (10cm), 1L0.01M PBS (pH=7.4) 透析3天, 4℃搅拌透析, 每天更换透析液3次, 透析产物5000rpm离心6min, 1.5ml/管分装, 将抗原编号, -20℃保存备用。

[0062] 其中, 所述0.01M PBS (pH=7.4) 的溶剂为水, 溶质及其浓度如下: 磷酸二氢钾 0.27g/L, 磷酸氢二钠1.42g/L, 氯化钠8g/L, 氯化钾0.2g/L。

[0063] 2、包被原的合成

[0064] 用33.6mg OVA代替步骤1中的50mg BSA, 得到包被原溶液。

[0065] 二、阿苯达唑人工抗原的鉴定

[0066] 免疫原MALDI-TOF-MS鉴定结果显示偶联比为: R = (69708.349-66392.153) / 207.30 = 15.997 (图2和图3)。即免疫原中, 所述阿苯达唑半抗原 (式I) 与牛血清白蛋白 (BSA) 偶联的摩尔比为15.997:1。

[0067] 实施例3

[0068] 阿苯达唑抗体的制备及检测

[0069] 一、Balb/c小鼠免疫

[0070] 阿苯达唑-BSA的蛋白浓度以总蛋白量计, 即总蛋白浓度乘以加入体积即为阿苯达唑-BSA的加入量。

[0071] 6周龄的雌性Balb/c小鼠首次免疫时, 取阿苯达唑-BSA免疫原稀释至1mg/mL (用0.01mol/L PBS稀释), 与弗氏完全佐剂等体积混合, 并充分乳化, 颈背部皮下多点接种小鼠5只, 接种抗原剂量为100μg/只, 每只小鼠0.2mL; 14天后进行第2次免疫, 用弗氏不完全佐剂

与免疫原等体积乳化,免疫剂量和首次免疫剂量相同,加强免疫次数为3次。

[0072] 二、阿苯达唑小鼠抗血清的检测

[0073] 三免一周后小鼠尾部采血20 μ L,离心,收集血清,用经典棋盘法测效价及用间接竞争ELISA法测灵敏度。

[0074] 1、抗血清效价的测定,其步骤如下:

[0075] (1)包被:将包被抗原(阿苯达唑-OVA)用0.05mol/L的碳酸盐缓冲液(pH 9.6)稀释成0.2 μ g/mL,100 μ L/孔加入到酶标板中,置于37 $^{\circ}$ C温箱中孵育2小时。倾去孔内液体,用PBST缓冲液(pH 7.2)洗板3次,甩干洗涤液。

[0076] (2)封闭:每孔加150 μ L的封闭液(2%脱脂牛奶),37 $^{\circ}$ C封闭1h,甩干孔内液体,用PBST缓冲液(pH 7.2)洗板3次,拍干洗涤液。

[0077] (3)加抗血清:各列孔加入50 μ L 0.01M PBS(pH7.4),再加入50 μ L稀释后的阿苯达唑抗血清,抗体从1:4000开始,以2为梯度用0.01M PBS开始稀释,共稀释4个梯度。加样量为每孔50 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育30min,PBST缓冲液(pH 7.2)洗涤3次,拍干。孵育30min,PBST缓冲液(pH 7.2)洗涤3次,拍干。

[0078] 同时设置未经免疫的Balb/c小鼠血清作为阴性对照。

[0079] (4)加酶标二抗:每孔加入100 μ L HRP-羊抗鼠IgG(PBS稀释5000倍),37 $^{\circ}$ C孵育30min,PBST缓冲液(pH 7.2)洗涤3次,拍干。

[0080] (5)显色:将辣根过氧化物酶底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺溶液和质量分数为30%的过氧化氢按照1:1的体积比混合,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育15min。然后每孔加入50 μ L的终止液(2mol/L H₂SO₄)。

[0081] (6)读数测定:在波长450nm条件下用酶标仪读取吸光值(OD)。以阴性OD值不大于0.15,以最大OD_{450nm}值在1.5-1.8之间对应的抗体稀释度为抗血清的效价。

[0082] 结果表明血清中的抗体效价为1:8000。

[0083] 2、抗血清灵敏度的测定,其步骤如下:

[0084] (1)包被、封闭过程同上述“1、抗血清效价的测定”中包被与封闭过程。

[0085] (2)加标准品和抗体

[0086] 每孔加入50 μ L阿苯达唑标准品溶液和50 μ L三免一周后小鼠血清稀释液,37 $^{\circ}$ C孵育30min,然后用PBST溶液洗涤3次,拍干。

[0087] 标准品溶液的溶剂为PBS缓冲液,标准品浓度分别为0、0.003、0.01、0.03、0.09、0.27、0.81和2.43ng/mL的溶液,每个浓度三个平行。

[0088] (3)加酶标二抗

[0089] 每孔加入100 μ L酶标二抗稀释液,37 $^{\circ}$ C孵育30min,然后用PBST溶液洗涤3次,拍干。

[0090] (4)显色

[0091] 每孔加入100 μ L显色液,37 $^{\circ}$ C孵育15min。

[0092] (5)终止

[0093] 每孔加入50 μ L 2mol/L浓硫酸。

[0094] (6)读数

[0095] 以OD_{450nm}波长测定各孔OD值。

[0096] 以 $-\log_{10}$ (竞争物)值为横坐标,以OD_{450nm}值为纵坐标,利用Origin 8.0的四参数

方程进行拟合,建立标准曲线获得IC₅₀值。

[0097] 结果表明,获得免疫效果最佳小鼠多抗血清IC₅₀为0.351ng/mL,该血清具有广谱识别性能,与阿苯达唑、阿苯达唑砒、阿苯达唑亚砒、芬苯达唑、氟苯达唑的交叉反应率分别为100%、85.6%、56.9%、34.1%、17% (见表1)。

[0098] 表1小鼠多克隆抗体三免抗血清检测结果

[0099]

药物名称	IC ₅₀ (ng/ml)	交叉反应率 (%)
阿苯达唑	0.351	100
阿苯达唑砒	0.41	85.61
阿苯达唑亚砒	0.617	56.89
芬苯达唑	1.031	34.05
氟苯达唑	2.066	17

[0100] 对比例1

[0101] 本对比例与实施例1的区别在于:将盐酸替代为硫酸。

[0102] 对所得产品进行质谱鉴定,鉴定结果如图4,产物的纯度值为10%,产率为25%。

[0103] 对比例2

[0104] 本对比例与实施例2的区别在于:使用戊二醛法制备阿苯达唑全抗原。

[0105] 免疫原MALDI-TOF-MS鉴定结果如图5,经计算偶联比为:R=2.9。即免疫原中,所述阿苯达唑半抗原与牛血清白蛋白 (BSA) 偶联的摩尔比为2.9:1。

[0106] 对比例3

[0107] 本对比例与实施例3的区别在于:使用对比例2中的全抗原作为免疫原。

[0108] 结果表明血清中的抗体效价为1:2000。免疫效果最佳小鼠多抗血清IC₅₀为150ng/mL,与阿苯达唑、阿苯达唑砒、阿苯达唑亚砒、芬苯达唑、氟苯达唑的交叉反应率分别为60%、15.6%、12%、13.5%、8.1%。

[0109] 虽然,上文中已经用一般性说明、具体实施方式及试验,对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

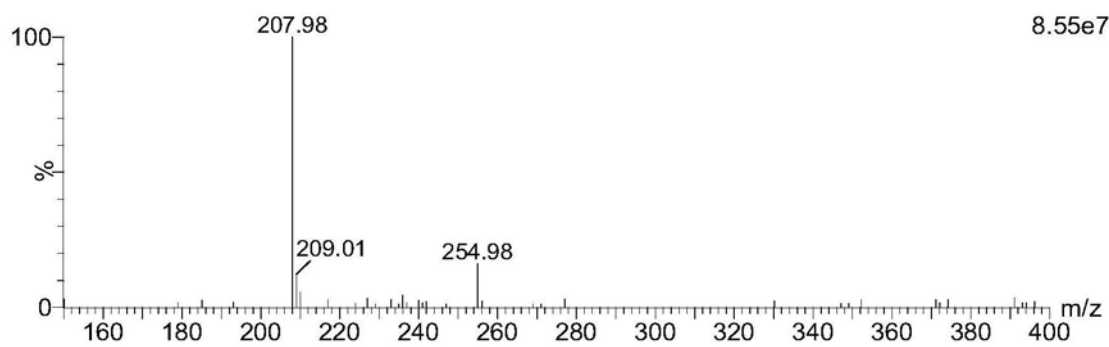


图1

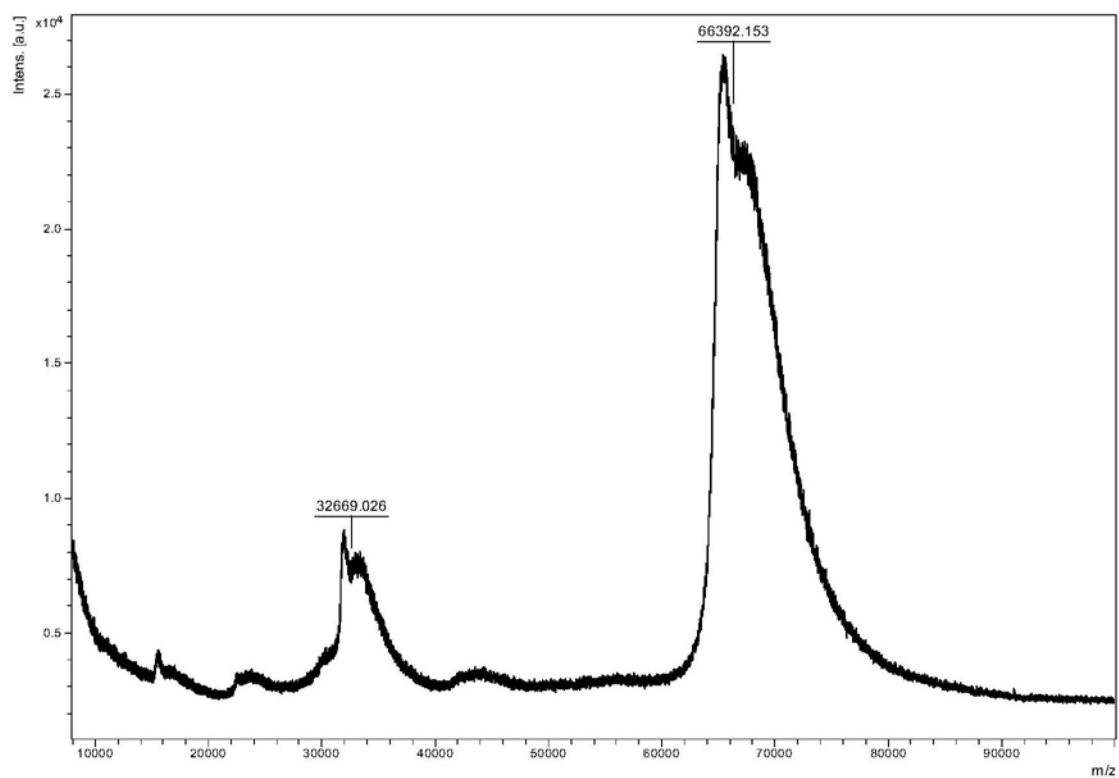


图2

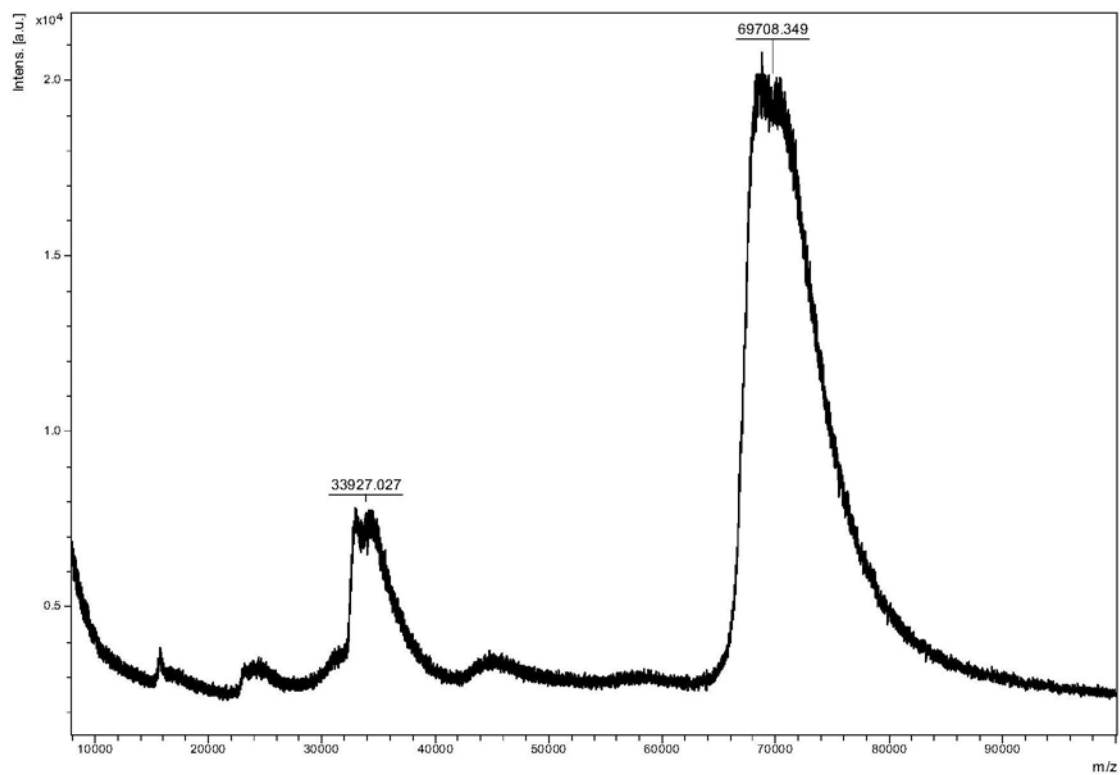


图3

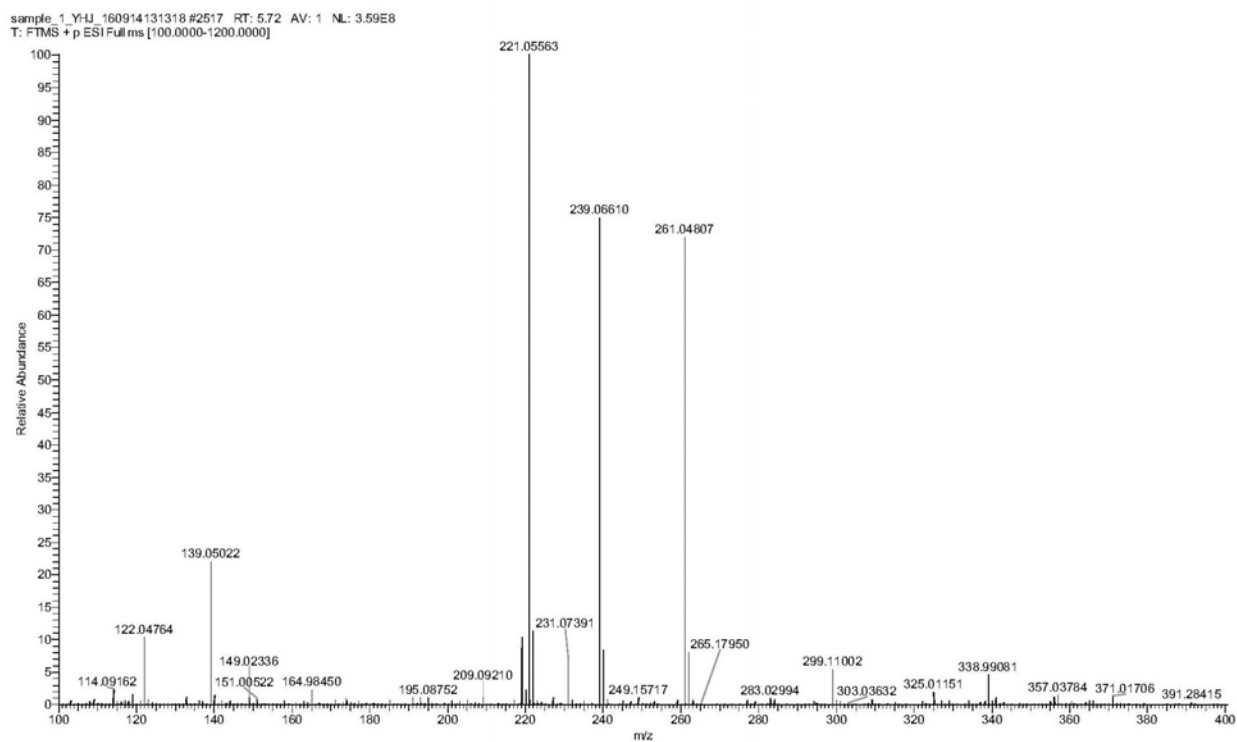


图4

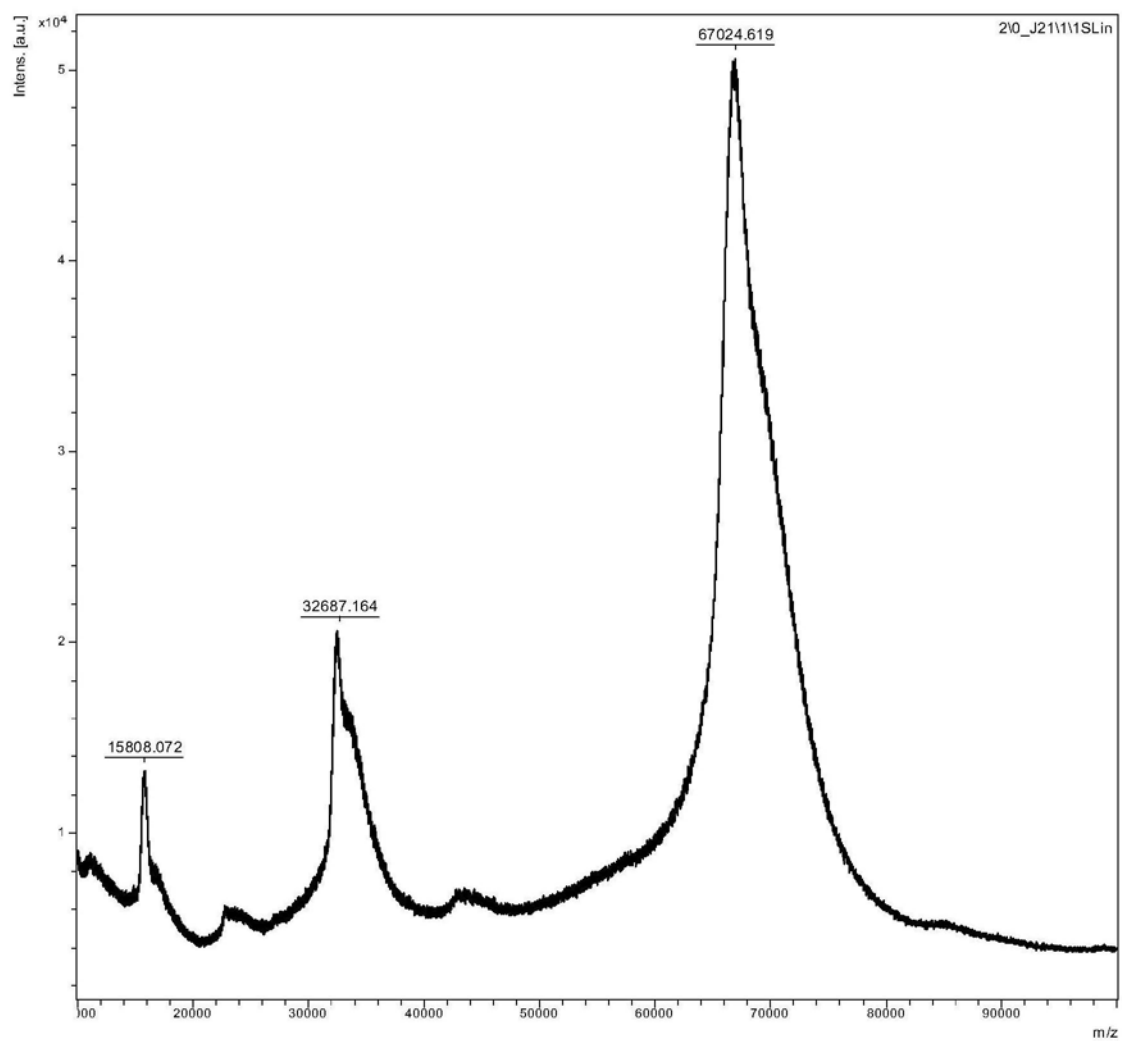


图5

专利名称(译)	一种阿苯达唑半抗原及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN109824599A	公开(公告)日	2019-05-31
申请号	CN201910153401.3	申请日	2019-02-28
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	温凯 王战辉 江海洋 周旭平 马立才 谢冰 刘河冰 张英杰 覃丹凤		
发明人	温凯 王战辉 江海洋 周旭平 段长飞 马立才 谢冰 刘河冰 张英杰 覃丹凤		
IPC分类号	C07D235/30 C07K14/765 C07K14/77 C07K16/44 G01N33/535		
代理人(译)	王文君 陈征		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及半抗原制备领域，具体涉及一种阿苯达唑半抗原及其制备方法和应用。所述阿苯达唑半抗原具有式I所示结构，在制备过程中，以阿苯达唑和盐酸为原料经反应制得。利用所述半抗原与载体蛋白偶联可制得阿苯达唑全抗原，并可进一步制备阿苯达唑抗体。本发明所提供的阿苯达唑半抗原本身含有氨基端，无需对结构进行改变即可与载体偶联，且与载体蛋白连接后更容易暴露出特异性结合位点，灵敏度更高；所述阿苯达唑半抗原的合成方法简单、产率和纯度高；所制得的阿苯达唑抗体具有广谱识别性能，灵敏度高，在阿苯达唑相关残留检测中具有良好的应用前景。

