



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107973836 A

(43)申请公布日 2018.05.01

(21)申请号 201710977334.8

(22)申请日 2017.10.19

(71)申请人 苏州博源医疗科技有限公司
地址 215000 江苏省苏州市苏州高新区锦峰路8号9号楼北二层

(72)发明人 虞留明 周洲

(74)专利代理机构 广州市越秀区哲力专利商标事务所(普通合伙) 44288
代理人 胡拥军 赵赛

(51) Int. Cl.
C07J 43/00(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)
G01N 33/531(2006.01)

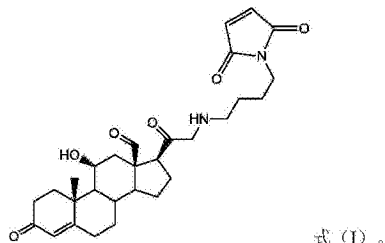
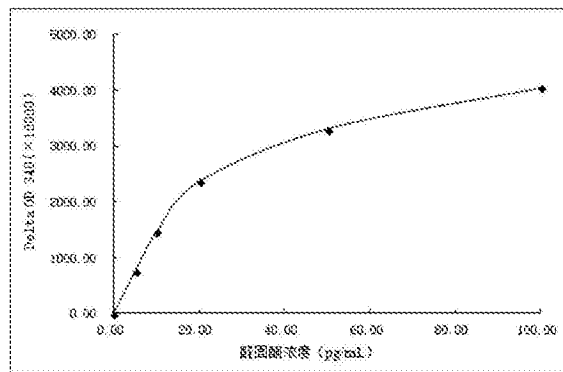
权利要求书4页 说明书22页 附图2页

(54)发明名称

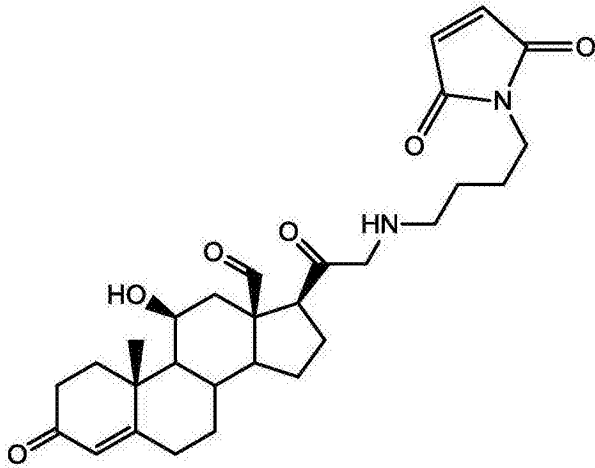
醛固酮衍生物及其制备方法、醛固酮均相酶免疫检测试剂

(57)摘要

本发明公开了一种醛固酮衍生物及其制备方法、醛固酮均相酶免疫检测试剂及其制备方法、检测方法。醛固酮衍生物具有如式(I)所示的结构,由该醛固酮衍生物制备免疫原性强的醛固酮免疫原及其抗体,用该抗体制备的醛固酮均相酶免疫检测试剂可以实现在全自动生化分析仪上对醛固酮高通量、快速化的检测。

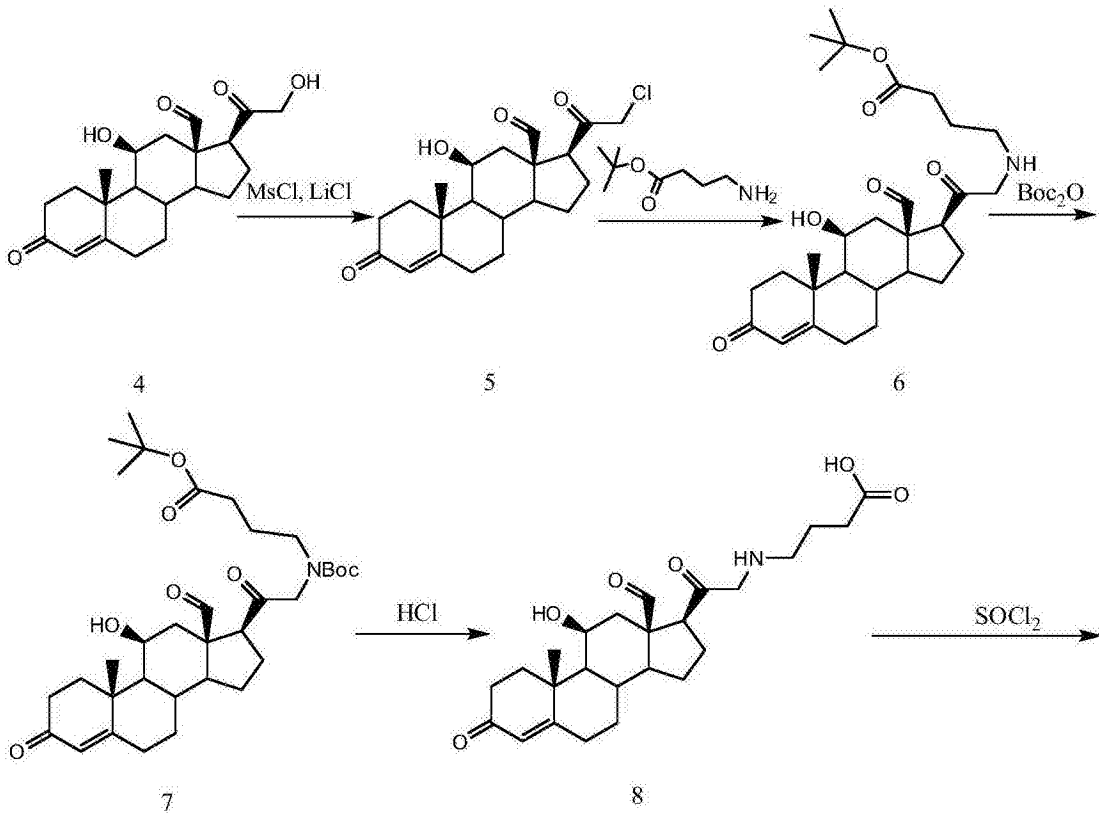


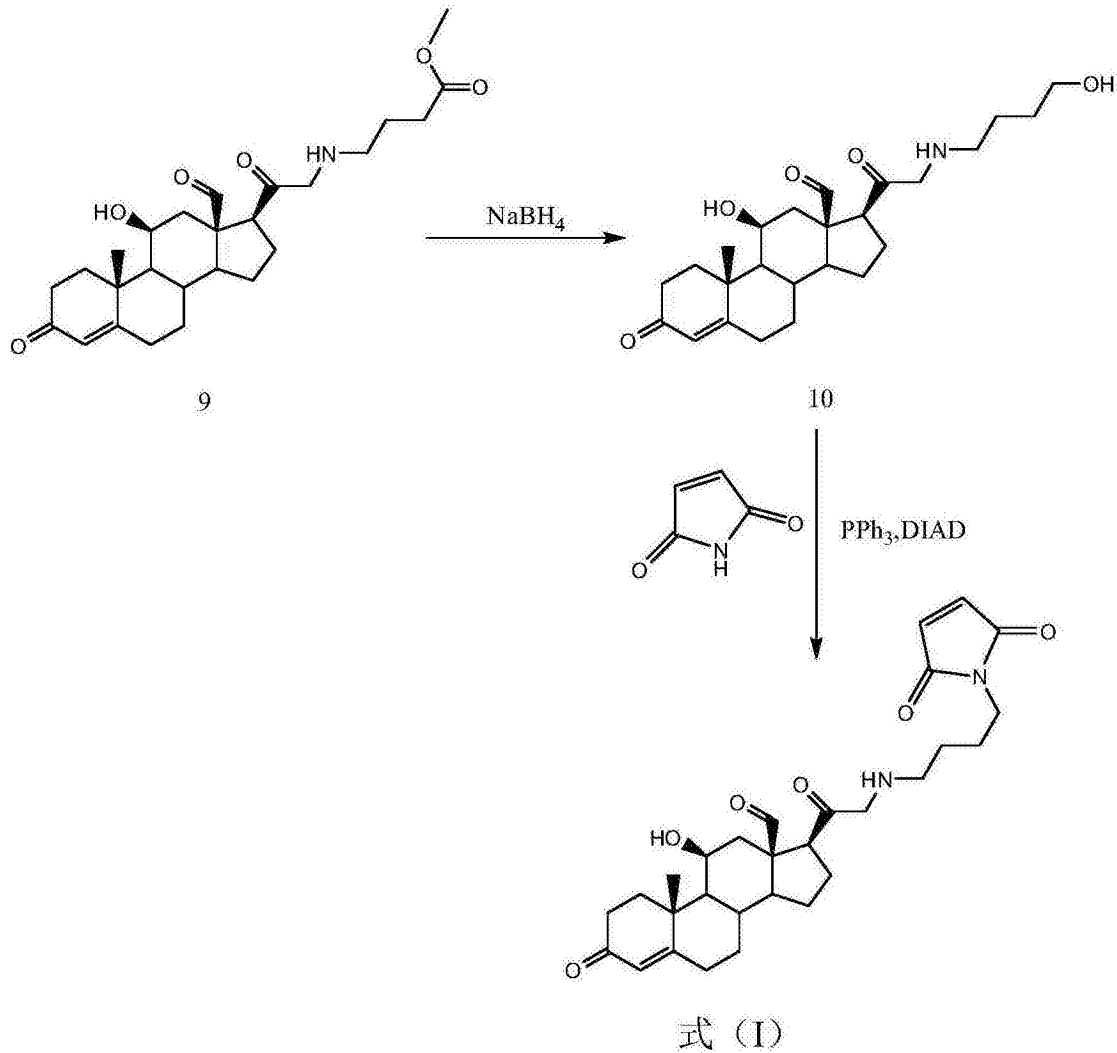
1. 一种醛固酮衍生物,其特征在于,所述醛固酮衍生物具有如式(I)所示的结构,



式(I)。

2. 一种醛固酮衍生物的制备方法,其特征在于,所述醛固酮衍生物具有如式(I)所示的结构,所述制备方法包括以下步骤:





(1) 化合物4与甲磺酰卤和氯化锂反应生成化合物5；

(2) 化合物5与  反应生成化合物6；

(3) 化合物6与Boc酸酐反应生成化合物7；

(4) 化合物7与HCl反应生成化合物8；

(5) 化合物8与SOCl₂反应生成化合物9；

(6) 化合物9与NaBH₄反应生成化合物10；

(7) 化合物10与马来酰亚胺、PPh₃、DIAD反应生成式(I)所示的醛固酮衍生物。

3. 一种醛固酮均相酶免疫检测试剂,其特征在于,包括:抗醛固酮特异性抗体、用于检测抗醛固酮特异性抗体-醛固酮复合物的指示试剂;所述抗醛固酮特异性抗体由醛固酮免疫原免疫实验动物得到,所述醛固酮免疫原由权利要求1所述的醛固酮衍生物与载体连接而成,所述载体为具有免疫原性的蛋白质;所述指示试剂选自酶试剂、放射性同位素试剂、荧光试剂或化学发光试剂。

4. 根据权利要求3所述的醛固酮均相酶免疫检测试剂,其特征在于,所述指示试剂选自酶试剂,包括:酶标偶联物和酶的底物;所述酶标偶联物包括葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物;所述酶的底物为葡萄糖-6-磷酸;所述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联

物由葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与由权利要求1所述的醛固酮衍生物反应形成。

5. 一种如权利要求4所述的醛固酮均相酶免疫检测试剂的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 醛固酮免疫原的合成:使由权利要求1所述的醛固酮衍生物与具有免疫原性的蛋白质载体连接,生成醛固酮免疫原;

(2) 抗醛固酮特异性抗体的制备:使用所述醛固酮免疫原免疫实验动物,由实验动物得到抗醛固酮特异性抗体;

(3) 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物的制备:制备葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液,激活由权利要求1所述的醛固酮衍生物,使葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与由权利要求1所述的醛固酮衍生物连接,得到葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物;

(4) 醛固酮均相酶免疫检测试剂的制备:

试剂A的制备:由所述抗醛固酮特异性抗体和均相酶底物混合而成;

试剂B的制备:由所述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物与Tris缓冲液混合而成。

6. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中,蛋白质载体为BSA,所述醛固酮免疫原的合成步骤如下:

a. 称取2.72g磷酸二氢钾、4.26g磷酸氢二钠、8.5g氯化钠、0.95g氯化镁,共同溶解于1L去离子水中,调节pH至7.4,制成缓冲溶液A;

b. 称取3mg BSA,室温下溶解于3mL上述缓冲溶液A中,制成BSA溶液;

c. 称取3mg由权利要求1所述的醛固酮衍生物,溶解于300uL上述缓冲溶液A中,制成醛固酮衍生物溶液;

d. 当上述醛固酮衍生物溶液刚变澄清时,将其逐滴加入上述BSA溶液中,然后将此混合溶液在2-8℃下搅拌1小时;

e. 将反应后的上述混合溶液用上述缓冲溶液A进行透析,透析后所得溶液即为醛固酮免疫原溶液,在醛固酮免疫原溶液中加入质量分数0.1%的NaN₃,于-20℃下储存。

7. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于,所述的步骤(2)包括:

a. 用PBS将步骤(1)中的醛固酮免疫原稀释至1.0mg/mL,得到抗原溶液,然后用1.0mL所述抗原溶液与弗氏完全佐剂混合,对实验动物进行注射;

b. 2~3周后,再用1.0mL相同的抗原溶液与弗氏不完全佐剂混合,对上述实验动物注射一次,之后每隔3-4周注射一次,共计注射4-6次;

c. 对免疫后的实验动物取血,分离纯化得到效价为1:30000-1:50000的抗醛固酮特异性抗体。

8. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于,所述的步骤(3)包括:

a. 称取1.09g磷酸二氢钾、1.70g磷酸氢二钠、8.5g氯化钠、0.95g氯化镁,共同溶解于1L去离子水中,调节pH至7.4,制成缓冲溶液B;

b. 称取3mg葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,室温下溶解于3mL上述缓冲溶液B中,制成葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液;

c. 称取3mg由权利要求1所述的醛固酮衍生物,溶解于300uL上述缓冲溶液B中,制成醛固酮衍生物溶液;

d. 当上述醛固酮衍生物溶液刚变澄清时,将其逐滴加入上述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中,然后将此混合溶液在2-8℃下搅拌1小时;

e. 将反应后的上述混合溶液用上述缓冲溶液B进行透析,透析后所得溶液即为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物溶液,在葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物溶液中加入质量分数0.5%的BSA和质量分数0.1%的 NaN_3 ,于2-8℃下储存。

9. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于,所述的步骤(4)包括:

试剂A的制备:将5.0g的氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、2.5g的葡萄糖-6-磷酸用1L、55mM、pH=8.0的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物;将制备的抗醛固酮特异性抗体加到上述均相酶底物中,抗体与均相酶底物的体积比为1:100~1:10000;

试剂B的制备:将制备的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物加到120mM、pH=8.2的Tris缓冲液中,上述偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:100~1:10000。

10. 一种醛固酮均相酶免疫检测试剂的检测方法,其特征在于,所述醛固酮均相酶免疫检测试剂为权利要求3或4所述的醛固酮均相酶免疫检测试剂;所述检测方法包括以下步骤:

(1) 将待测样本与抗醛固酮特异性抗体接触;

(2) 根据待测样本中醛固酮与抗醛固酮特异性抗体的结合情况,利用指示试剂判断样本中醛固酮的含量;

所述待测样本为生物样本,所述生物样本为血清、血浆、尿液、唾液或乳汁。

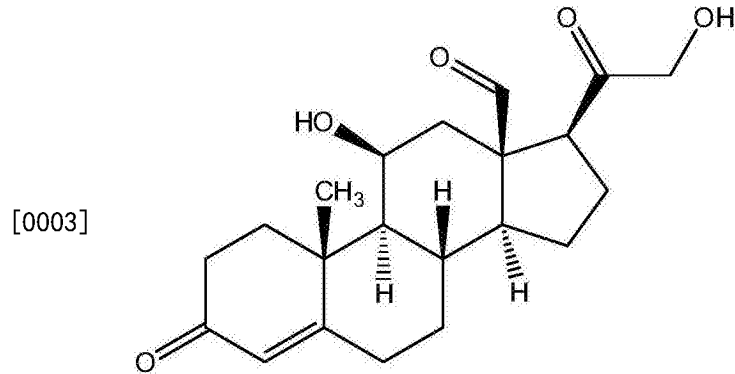
醛固酮衍生物及其制备方法、醛固酮均相酶免疫检测试剂

技术领域

[0001] 本发明涉及醛固酮检测技术领域,尤其涉及一种醛固酮衍生物及其制备方法、醛固酮均相酶免疫检测试剂及其制备方法、检测方法。

背景技术

[0002] 醛固酮(Aldosterone)的结构如式(II)所示:



式(II)。

[0004] 醛固酮是由肾上腺皮质球状带细胞合成和分泌的一种盐皮质激素,主要作用于肾脏远曲小管和肾皮质集合管,增加对钠离子的重吸收和促进钾离子的排泄,也作用于髓质集合管,促进氢离子的排泄,酸化尿液。醛固酮的分泌是通过肾素-血管紧张素-醛固酮系统实现的。当细胞外液容量下降时,刺激肾小球旁细胞分泌肾素,激活肾素-血管紧张素-醛固酮系统,醛固酮分泌增加,使肾脏重吸收钠增加,进而引起水重吸收增加,细胞外液容量增多;相反细胞外液容量增多时,通过上述相反的机制,使醛固酮分泌减少,肾重吸收钠和水减少,细胞外液容量下降。血钠降低,血钾升高同样刺激肾上腺皮质,使醛固酮分泌增加。

[0005] 醛固酮分泌增加提示可能与以下临床病症有关:1、肾上腺皮质增生等原因引起的原发性醛固酮增多症;2、下丘脑-垂体功能紊乱、异位促肾上腺皮质激素分泌等原因造成的高继发性醛固酮增多症;3、肝硬化、肾性高血压、多发性肾囊肿等原因诱发的醛固酮非特异性增多症。醛固酮病理性降低主要见于原发性肾上腺皮质功能减退症,也称Addison's病。

[0006] 肾素-血管紧张素-醛固酮系统是由身体多个器官合成、分泌的一系列循环激素,在体内起着调节血压、水和电解质平衡,维持机体内环境稳定的作用,其作用机理包括调节全身血容量和控制外周阻力。大量临床试验研究表明,肾素-血管紧张素-醛固酮系统协调作用于心血管系统、泌尿系统、神经系统等多个系统,在维持机体血压和血容量平衡中发挥着重要的生理作用。当机体出现高血压、呼吸系统及泌尿系统疾病时,肾素-血管紧张素-醛固酮水平均出现了一系列异常改变,准确的测量肾素-血管紧张素-醛固酮水平,对相应疾病的诊断和治疗均有着极为重要的意义。

[0007] 目前,临床上测定血清、血浆或尿液中醛固酮含量的方法较多,主要有酶联免疫吸附法、化学发光法、磁微粒化学发光法、增强化学发光免疫分析法、高效液相色谱法等,但现

有方法都有一定的局限性,如操作复杂、稳定性较差、需要配备专用仪器、检测成本较高等,都不适合大批量临床样品的测定。目前市场上缺乏稳定性好、灵敏度高、特异性强的醛固酮检测试剂,尤其是质量好的自动化检验试剂。因此,研发生产质量达到临床要求、实用性强、性价比高,可应用于全自动生化分析仪的醛固酮测定试剂盒已成为国内外体外诊断试剂行业的热点。

发明内容

[0008] 为了克服现有技术的不足,本发明的目的之一在于提供一种醛固酮衍生物,由该醛固酮衍生物制备免疫原性强的醛固酮免疫原及其抗体,用该抗体制备的醛固酮均相酶免疫检测试剂可以实现在全自动生化分析仪上对醛固酮高通量、快速化的检测。

[0009] 本发明的目的之二在于提供一种醛固酮衍生物的制备方法。

[0010] 本发明的目的之三在于提供一种由上述醛固酮衍生物制成的醛固酮均相酶免疫检测试剂。

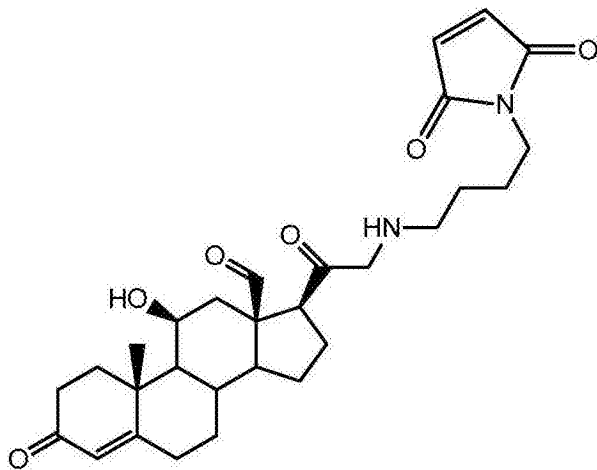
[0011] 本发明的目的之四在于提供一种上述醛固酮均相酶免疫检测试剂的制备方法,

[0012] 本发明的目的之五在于提供一种醛固酮均相酶免疫检测试剂的检测方法。

[0013] 本发明的目的之一采用以下技术方案实现:

[0014] 一种醛固酮衍生物,所述醛固酮衍生物具有如式(I)所示的结构,

[0015]

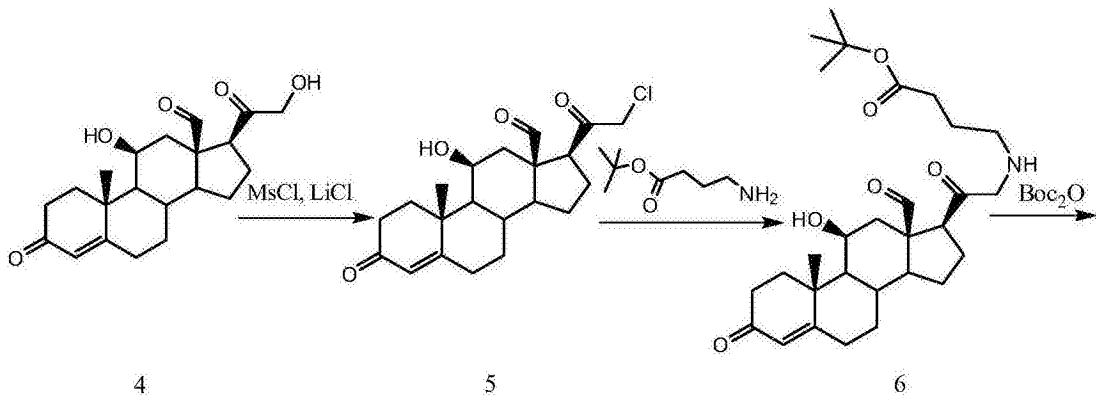


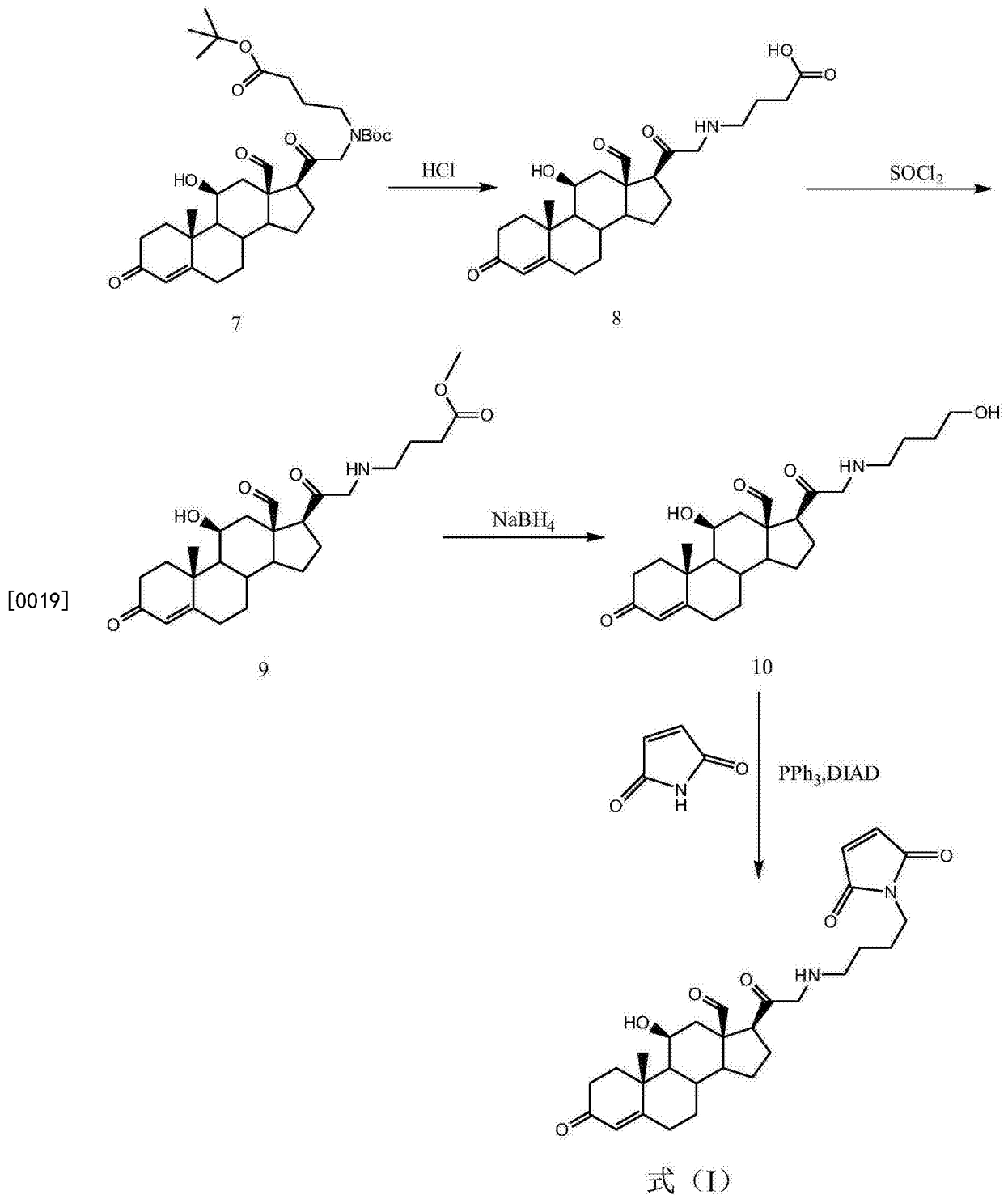
式(I)。

[0016] 本发明的目的之二采用以下技术方案实现:

[0017] 一种醛固酮衍生物的制备方法,所述醛固酮衍生物具有如式(I)所示的结构,所述制备方法包括以下步骤:

[0018]





[0020] (1) 化合物4与甲磺酰卤和氯化锂反应生成化合物5;

[0021] (2) 化合物5与  反应生成化合物6;

[0022] (3) 化合物6与Boc酸酐反应生成化合物7;

[0023] (4) 化合物7与HCl反应生成化合物8;

[0024] (5) 化合物8与SOCl₂反应生成化合物9;

[0025] (6) 化合物9与NaBH₄反应生成化合物10;

[0026] (7) 化合物10与马来酰亚胺、PPh₃、DIAD反应生成式(I)所示的醛固酮衍生物。

[0027] 本发明的目的之三采用以下技术方案实现：

[0028] 一种醛固酮均相酶免疫检测试剂，包括：抗醛固酮特异性抗体、用于检测抗醛固酮特异性抗体-醛固酮复合物的指示试剂；所述抗醛固酮特异性抗体由醛固酮免疫原免疫实验动物得到，所述醛固酮免疫原由式(I)所示的醛固酮衍生物与载体连接而成，所述载体为具有免疫原性的蛋白质；所述指示试剂选自酶试剂、放射性同位素试剂、荧光试剂或化学发光试剂。

[0029] 可选地，所述指示试剂选自酶试剂，包括：酶标偶联物和酶的底物；所述酶标偶联物包括葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物；所述酶的底物为葡萄糖-6-磷酸；所述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物由葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与由式(I)所示的醛固酮衍生物反应形成。

[0030] 本发明的目的之四采用以下技术方案实现：

[0031] 一种如上述的醛固酮均相酶免疫检测试剂的制备方法，包括如下步骤：

[0032] (1) 醛固酮免疫原的合成：使由式(I)所示的醛固酮衍生物与具有免疫原性的蛋白质载体连接，生成醛固酮免疫原；

[0033] (2) 抗醛固酮特异性抗体的制备：使用所述醛固酮免疫原免疫实验动物，由实验动物得到抗醛固酮特异性抗体；

[0034] (3) 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物的制备：制备葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液，激活由式(I)所示的醛固酮衍生物，使葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与由式(I)所示的醛固酮衍生物连接，得到葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物；

[0035] (4) 醛固酮均相酶免疫检测试剂的制备：

[0036] 试剂A的制备：由所述抗醛固酮特异性抗体和均相酶底物混合而成；

[0037] 试剂B的制备：由所述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物与Tris缓冲液混合而成。

[0038] 可选地，所述步骤(1)中，蛋白质载体为BSA，所述醛固酮免疫原的合成步骤如下：

[0039] a. 称取2.72g磷酸二氢钾、4.26g磷酸氢二钠、8.5g氯化钠、0.95g氯化镁，共同溶解于1L去离子水中，调节pH至7.4，制成缓冲溶液A；

[0040] b. 称取3mg BSA，室温下溶解于3mL上述缓冲溶液A中，制成BSA溶液；

[0041] c. 称取3mg由式(I)所示的醛固酮衍生物，溶解于300uI上述缓冲溶液A中，制成醛固酮衍生物溶液；

[0042] d. 当上述醛固酮衍生物溶液刚变澄清时，将其逐滴加入上述BSA溶液中，然后将此混合溶液在2-8℃下搅拌1小时；

[0043] e. 将反应后的上述混合溶液用上述缓冲溶液A进行透析，透析后所得溶液即为醛固酮免疫原溶液，在醛固酮免疫原溶液中加入质量分数0.1%的NaN₃，于-20℃下储存。

[0044] 可选地，所述的步骤(2)包括：

[0045] a. 用PBS将步骤(1)中的醛固酮免疫原稀释至1.0mg/ml，得到抗原溶液，然后用1.0ml所述抗原溶液与弗氏完全佐剂混合，对实验动物进行注射；

[0046] b. 2~3周后，再用1.0ml相同的抗原溶液与弗氏不完全佐剂混合，对上述实验动物注射一次，之后每隔3-4周注射一次，共计注射4-6次；

[0047] c. 对免疫后的实验动物取血，分离纯化得到效价为1:30000-1:50000的抗醛固酮

特异性抗体。

[0048] 可选地,所述的步骤(3)包括:

[0049] a.称取1.09g磷酸二氢钾、1.70g磷酸氢二钠、8.5g氯化钠、0.95g氯化镁,共同溶解于1L去离子水中,调节pH至7.4,制成缓冲溶液B;

[0050] b.称取3mg葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,室温下溶解于3mL上述缓冲溶液B中,制成葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液;

[0051] c.称取3mg由式(I)所示的醛固酮衍生物,溶解于300 μ L上述缓冲溶液B中,制成醛固酮衍生物溶液;

[0052] d.当上述醛固酮衍生物溶液刚变澄清时,将其逐滴加入上述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中,然后将此混合溶液在2-8 $^{\circ}$ C下搅拌1小时;

[0053] e.将反应后的上述混合溶液用上述缓冲溶液B进行透析,透析后所得溶液即为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物溶液,在葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物溶液中加入质量分数0.5%的BSA和质量分数0.1%的 NaN_3 ,于2-8 $^{\circ}$ C下储存。

[0054] 可选地,所述的步骤(4)包括:

[0055] 试剂A的制备:将5.0g的氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、2.5g的葡萄糖-6-磷酸用1L、55mM、pH=8.0的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物;将制备的抗醛固酮特异性抗体加到上述均相酶底物中,抗体与均相酶底物的体积比为1:100~1:10000;

[0056] 试剂B的制备:将制备的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物加到120mM、pH=8.2的Tris缓冲液中,上述偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:100~1:10000。

[0057] 本发明的目的之五采用以下技术方案实现:

[0058] 一种醛固酮均相酶免疫检测试剂的检测方法,所述醛固酮均相酶免疫检测试剂为上述的醛固酮均相酶免疫检测试剂;所述检测方法包括以下步骤:

[0059] (1)将待测样本与抗醛固酮特异性抗体接触;

[0060] (2)根据待测样本中醛固酮与抗醛固酮特异性抗体的结合情况,利用指示试剂判断样本中醛固酮的含量;

[0061] 所述待测样本为生物样本,所述生物样本为血清、血浆、尿液、唾液或乳汁。

[0062] 相比现有技术,本发明的有益效果在于:

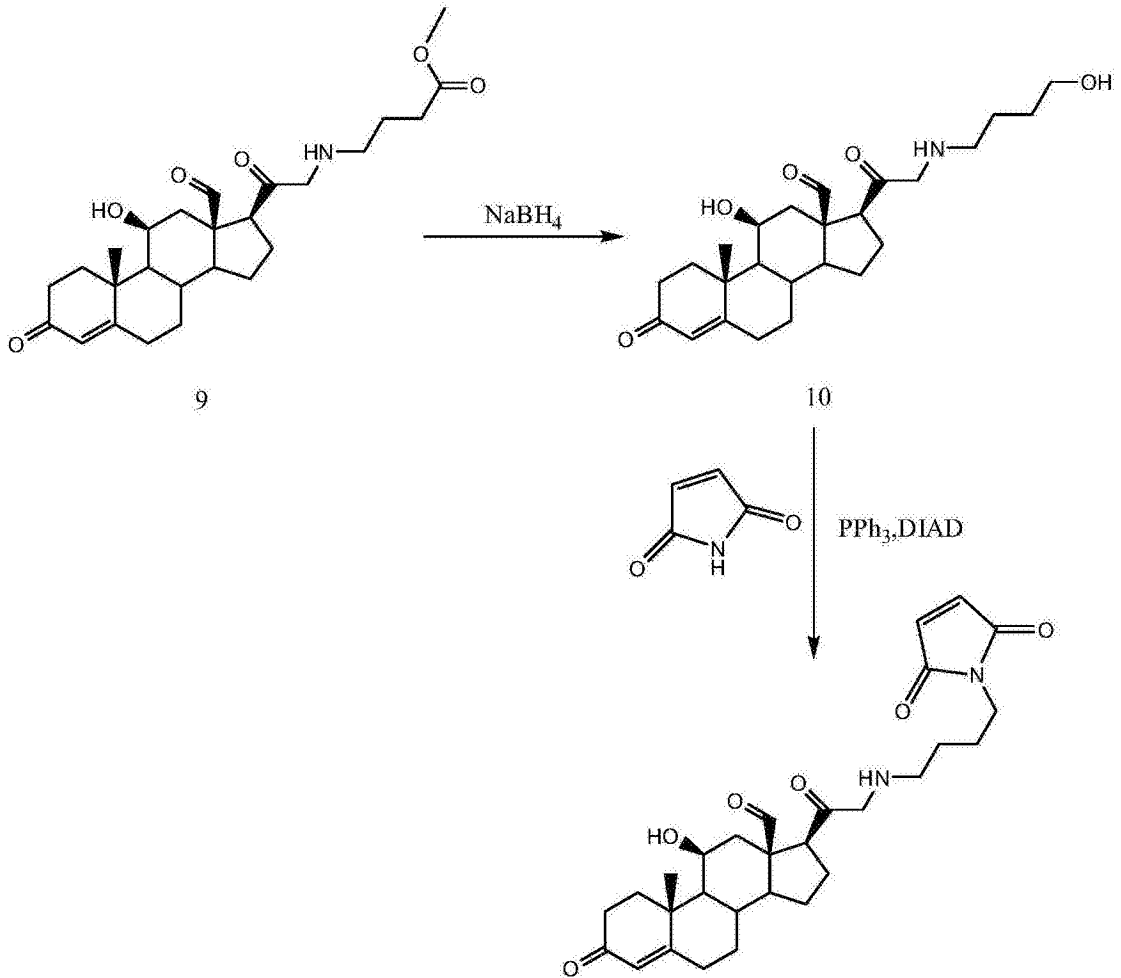
[0063] 本发明中,由式(1)所示醛固酮衍生物制备的醛固酮免疫原特异性强、免疫原性高,制备出的抗醛固酮特异性抗体特异性强、效价高,并且与常见的92种干扰物无任何交叉反应;含有上述抗醛固酮特异性抗体的均相酶免疫检测试剂可以方便、快速、准确地确定样品中的醛固酮含量,并且可以在全自动生化分析仪上同时测定多个样品,实现醛固酮的高通量快速化测定,准确度高,特异性强,精确度和检测效率相比之前都有了较大的提高,同时实现了检测过程的全自动化,对检测人员的要求不高,易于实现和推广使用,能有效满足国内日益增长的临床检测需求。

附图说明

[0064] 图1是本发明的醛固酮的ELISA检测反应曲线。


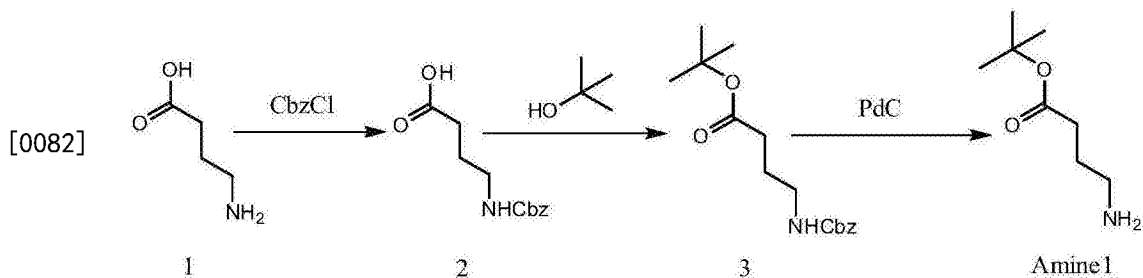
[0065] 图2是本发明的醛固酮的均相酶免疫检测反应曲线。

[0066] 图3是本发明的醛固酮均相酶免疫法与高效液相色谱法相关性分析图。




[0072]

[0073] 具体地说,式(I)所示醛固酮衍生物的制备方法包括以下步骤:


[0074] (1) 化合物4与甲磺酰卤(MsCl)和氯化锂(LiCl)反应生成化合物5;[0075] (2) 化合物5与  反应生成化合物6;[0076] (3) 化合物6与Boc酸酐(Boc_2O)反应生成化合物7;[0077] (4) 化合物7与 HCl 反应生成化合物8;[0078] (5) 化合物8与 SOCl_2 反应生成化合物9;[0079] (6) 化合物9与 NaBH_4 反应生成化合物10;[0080] (7) 化合物10与马来酰亚胺、 $\text{PPh}_3, \text{DIAD}$ 反应生成式(I)所示的醛固酮衍生物。[0081] 其中,  的合成路线如下:

[0082]

[0083]  的制备方法包括以下步骤:

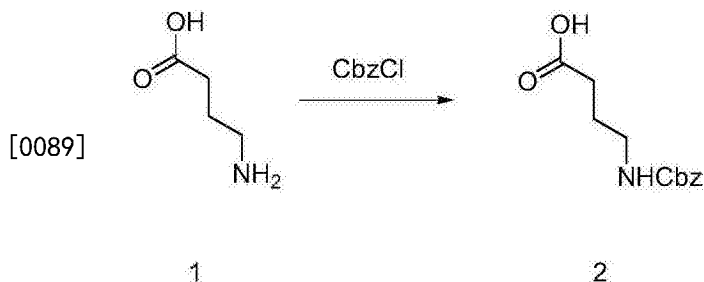
[0084] (1) 化合物1与氯甲酸苄酯 (CbzCl) 反应生成化合物2;

[0085] (2) 化合物2与叔丁醇反应生成化合物3;

[0086] (3) 化合物3与钯碳 (Pd/C) 反应生成  (Amine1)。

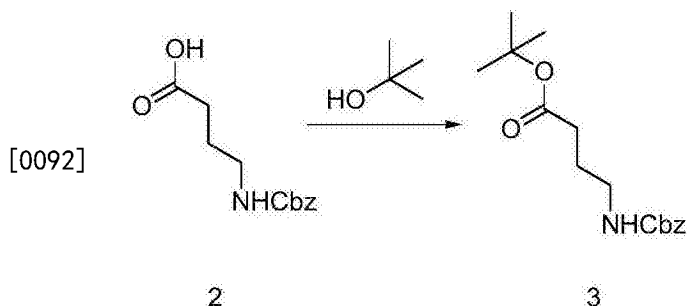
[0087] 具体的合成步骤如下:

[0088] 化合物2的合成:



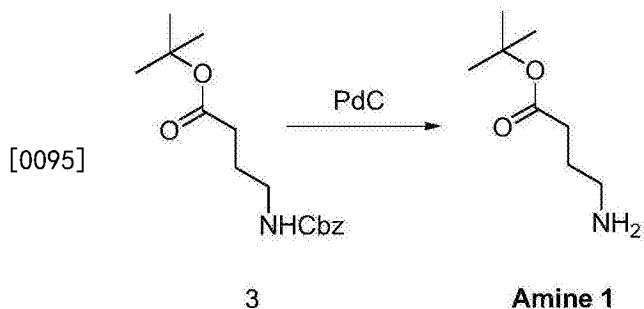
[0090] 10℃条件下,在溶解有30克化合物1 (4-氨基丁酸)的2N当量浓度 (2mol/L) 的氢氧化钠溶液中一次性加入55克催化剂 (Cbz-Cl, 氯甲酸苄酯)。混合物在室温下搅拌过夜。期间,通过TLC监控反应过程直至反应完全。反应后的混合物利用乙酸乙酯萃取 (3×300mL, 3次,每次用量300mL)。水层用1N当量浓度的盐酸调整pH=3,用二氯甲烷萃取 (3×300mL)。合并有机层,用清水 (200mL)、盐水 (200mL) 洗涤,真空干燥,浓缩得到白色固体的化合物2 (33g,产率48.8%)。

[0091] 化合物3的合成



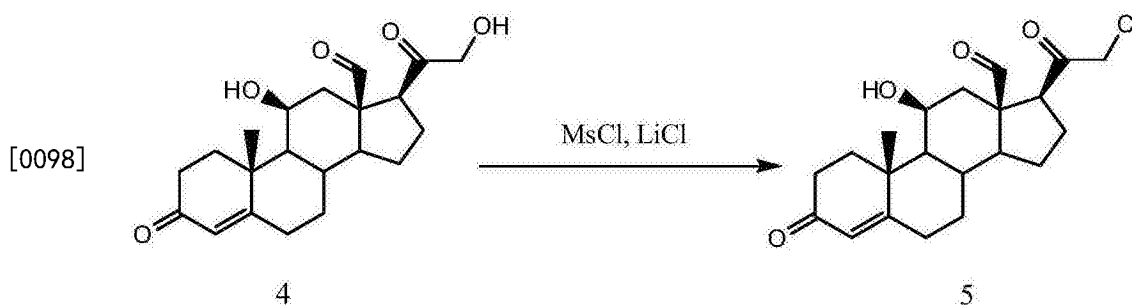
[0093] 10℃条件下,在由500mL二氯甲烷溶解33克的化合物2、17克的4-二甲氨基吡啶 (DMAP)、41mL的叔丁醇的溶液中一次性加入87克的二环己基碳二亚胺 (DCC)。混合物在室温下搅拌过夜。期间,通过TLC监控反应过程直至反应完全。反应后的溶液经过滤收集滤液。滤液用水稀释后,用1N当量浓度的盐酸调节pH=3。得到的混合物利用二氯甲烷 (3×500mL) 萃取,合并有机层,并用水 (300mL)、盐水 (300mL) 洗涤。经过洗涤后,真空干燥、浓缩得到粗品。对粗品进行硅胶柱层析纯化,得到白色固体的化合物3 (26g,产率62.4%)。

[0094] 化合物Amine 1的合成



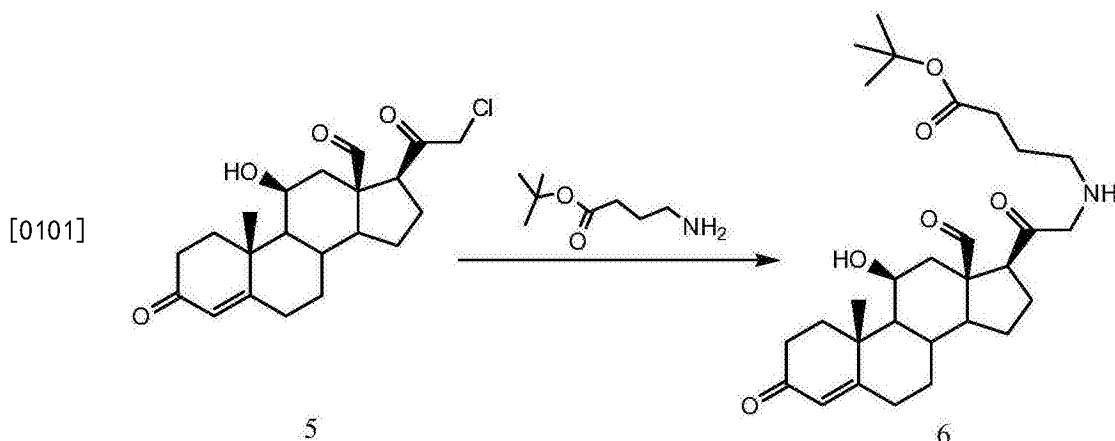
[0096] 在由26克的化合物3溶解于250mL的甲醇的溶液中,加入8克钯碳(Pd/C),得到混合物。以氢气为保护气,使混合物在50℃下搅拌过夜。TLC控制反应进程,直至起始反应物消失,得到的溶液被过滤。滤液经过真空干燥、浓缩得到粗品。粗品通过硅胶柱层析纯化,得到白色固体的Amine1(14g,产率99.2%)。

[0097] 化合物5的合成



[0099] 在0℃的条件下,将4.1克的甲磺酰氯(MsCl)滴加入由200mL的二氯甲烷溶解10克的化合物4、0.34克的4-二甲氨基吡啶、5.6克的三乙基胺(TEA)得到的溶液中制备混合物。混合物在室温下搅拌1小时。TLC控制反应进程,直至反应完全,然后用50mL的甲醇冷却反应体系,并真空干燥、浓缩得到黄色油状物。用150mL的二甲基甲酰胺(DMF)溶解黄色油状物,并加入1.53克氯化锂(LiCl),混合物,在60℃下搅拌2小时后将反应物加入水中,过滤收集沉淀,既得白色固体的化合物5(8.5克,产率80.9%)。

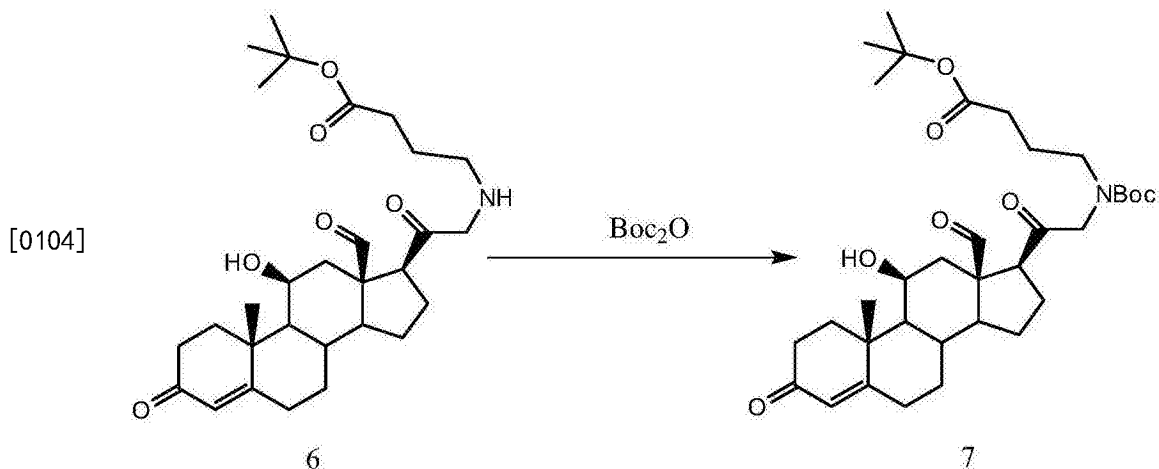
[0100] 化合物6的合成



[0102] 由15mL二甲基亚砷溶解1克的化合物5和0.68克的N,N-二异丙基乙胺(DIEA)得到溶液,然后,在室温条件下,向溶液中加入0.84克的Amine1。混合物在40℃的条件下搅拌3小时。通过液质联用(LC/MS)监控反应进程,直至反应完全。反应后的溶液用100mL水骤冷,然后用乙酸乙酯(3×300mL)萃取,并合并有机层。有机相被用水(100mL)、盐水(100mL)洗涤。

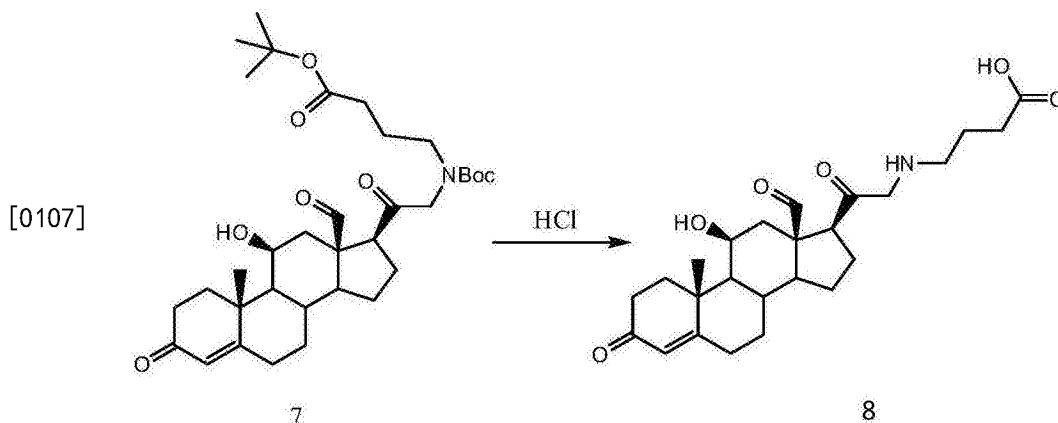
经过洗涤后,真空干燥、浓缩得到粗品。粗品用硅胶柱层析纯化得到黄色固体的化合物6 (0.41克,产率30.8%)。

[0103] 化合物7的合成



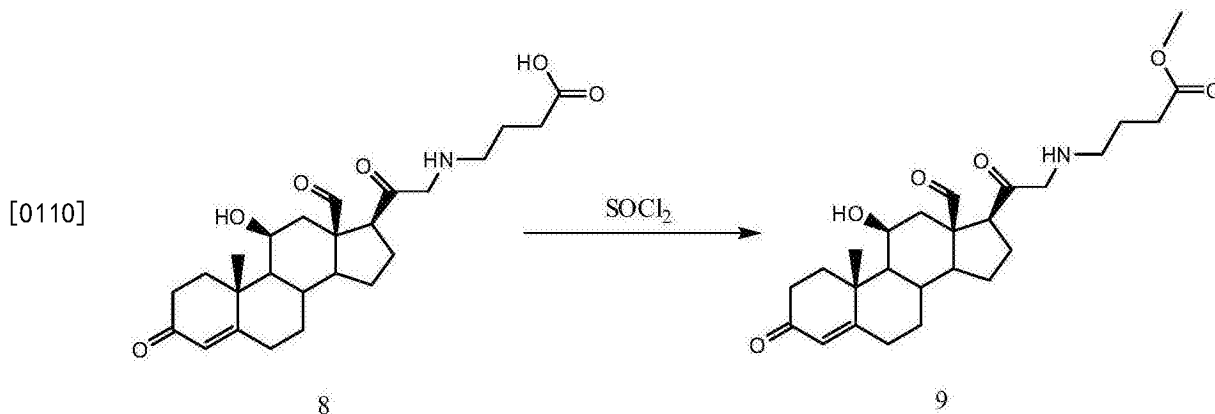
[0105] 将6.3克的化合物6、2.54克的三乙基胺 (TEA) 用60mL的二氯甲烷溶解得到溶液。在10℃的条件下,将5.5克的Boc酸酐 (Boc₂O) 滴加入前述的溶液中。混合物在室温下搅拌1小时。TLC控制反应进程,直至反应完全。反应后的溶液通过真空干燥、浓缩得到粗品。粗品通过硅胶柱层析纯化得到黄色固体的化合物7 (6克,产率79.4%)。

[0106] 化合物8的合成



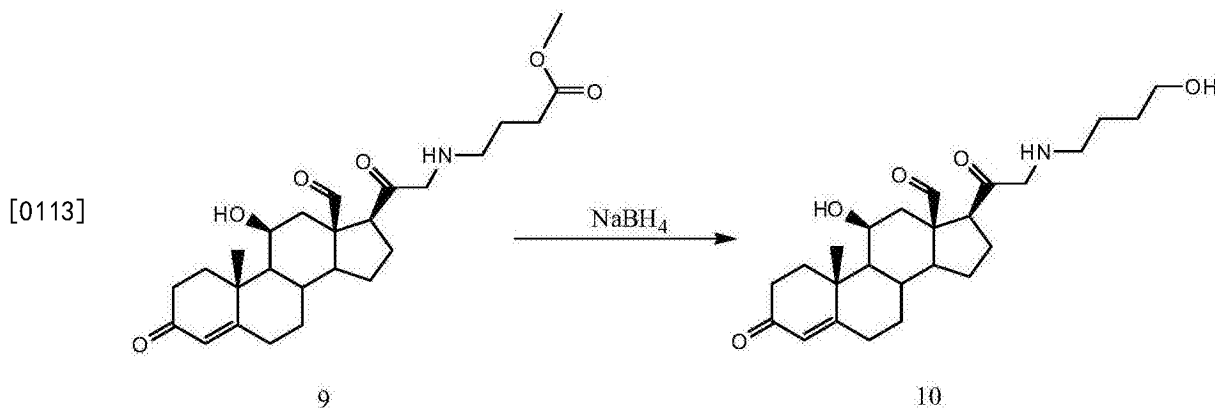
[0108] 将3.5克的化合物7溶解在6N当量浓度的盐酸/二氧己环 (80mL) 的溶液中,在室温下搅拌5小时。通过液质联用 (LC/MS) 监控反应进程,直至起始反应物消失。反应后的混合物用200mL的甲基叔丁基醚 (MTBE) 稀释,过滤沉淀得到白色固体的化合物8 (2.3克,产率82.1%)。

[0109] 化合物9的合成



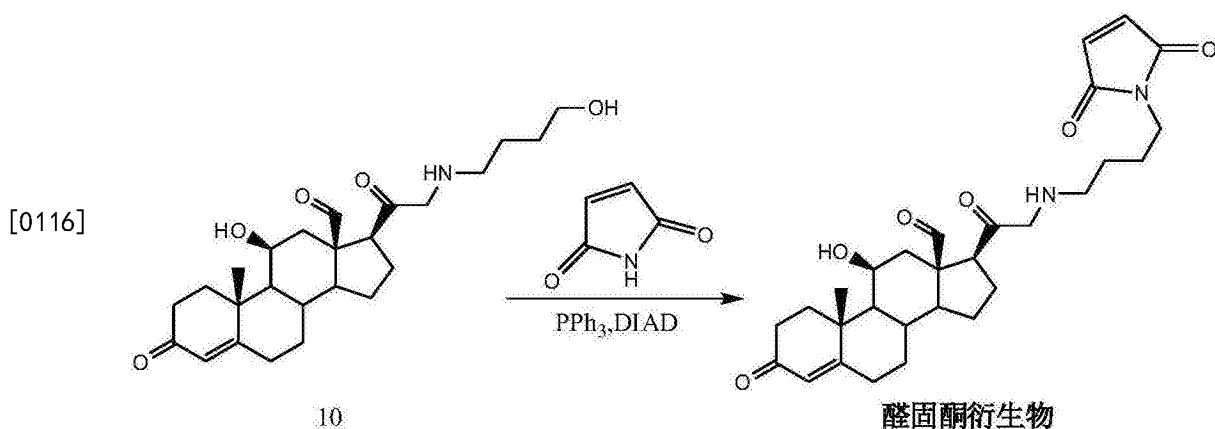
[0111] 称取5.5g化合物8,溶解于50mL的MeOH中,0℃下逐滴加入4.0g (34.1mmol) SOCl_2 ,然后将此反应混合液在70℃下搅拌过夜,通过减压方法使溶剂蒸发,将残留物通过200mL的DCM和200mL的 NaHCO_3 饱和水溶液进行分离,将有机相用卤水冲洗,然后通过 Na_2SO_4 进行干燥,并进行浓缩得到5.1g白色固体化合物9,产率93%。

[0112] 化合物10的合成



[0114] 称取5.1g化合物9,溶解于100mL的MeOH中,0℃下分多次加入1.3g (33.3mmol) NaBH_4 ,然后将此反应混合液在室温下搅拌过夜,将反应后的混合物进行浓缩,浓缩后得到的残渣通过硅胶干燥柱 (DCM:MeOH=10:1) 进行纯化,得到4.6g无色油状的化合物10,产率90%。

[0115] 式(1)所示醛固酮衍生物的合成



[0117] 称取2.3g化合物10,溶解于40mL的THF中,在0℃和氮气保护条件下加入1.2g (12.6mmol) 马来酰亚胺、3.8g (14.56mmol) PPh_3 及2.9g (14.56mmol) DIAD,然后将此反应混

合液在70℃下搅拌过夜,将反应后的混合物进行浓缩,浓缩后得到的残渣通过硅胶干燥柱(DCM:MeOH=50:1)进行纯化,最终得到800mg黄褐色固体最终化合物,产率35%。该最终化合物即为式(I)所示的醛固酮衍生物。

[0118] 实施例二:醛固酮免疫原的合成

[0119] 醛固酮免疫原由牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin,BSA)与式(I)所示的醛固酮衍生物连接而成,该免疫原的合成方法具体步骤如下:

[0120] a.称取2.72g磷酸二氢钾、4.26g磷酸氢二钠、8.5g氯化钠、0.95g氯化镁,共同溶解于1L去离子水中,调节pH至7.4,制成缓冲溶液A;

[0121] b.称取3mg BSA,室温下溶解于3mL上述缓冲溶液A中,制成BSA溶液;

[0122] c.称取3mg式(I)所示的醛固酮衍生物,溶解于300 μ l上述缓冲溶液A中,制成醛固酮衍生物溶液;

[0123] d.当上述醛固酮衍生物溶液刚变澄清时,将其逐滴加入上述BSA溶液中,然后将此混合溶液在2-8℃下搅拌1小时;

[0124] e.将反应后的上述混合溶液用上述缓冲溶液A进行透析,透析后所得溶液即为醛固酮免疫原溶液,在醛固酮免疫原溶液中加入质量分数0.1%的NaN₃,于-20℃下储存。0.1%的NaN₃是指加入量占最终所得的免疫原溶液的质量百分比,具体的加入量根据透析后所得的免疫原溶液的具体质量而定。

[0125] 实施例三:抗醛固酮特异性抗体的制备

[0126] 将实施例二制备得到的醛固酮免疫原接种实验动物,本实施例的实验动物以实验动物兔为例,加强免疫后取抗血清,具体步骤如下:

[0127] 1.用PBS将上述合成的醛固酮免疫原稀释至1.0mg/ml,得到抗原溶液,然后用1.0ml抗原溶液与弗氏完全佐剂混合,对实验动物兔进行注射。

[0128] 2.3周后,再用1.0ml相同的抗原溶液与弗氏不完全佐剂混合,对上述实验动物兔注射一次,之后每隔4周注射一次,共计注射6次。

[0129] 3.对免疫后的实验动物兔取血,分离纯化得到效价为1:30000-1:50000的抗醛固酮特异性抗体。

[0130] 实施例四:醛固酮ELISA检验

[0131] 1.醛固酮ELISA检测标准曲线的建立

[0132] (1)标准品的制备

[0133] 将醛固酮粉末(购于Sigma公司)溶解于甲醇溶液,制备成1mg/ml的储存液。用ELISA缓冲液将储存液依次稀释为160.00pg/mL、80.00pg/mL、40.00pg/mL、20.00pg/mL、10.00pg/mL和0.00pg/mL的标准溶液。其中,ELISA缓冲液含有50.0mM Tris,145mM NaCl和0.25%的BSA。

[0134] (2)利用醛固酮的ELISA检验方法制备标准曲线

[0135] 用PBS将实施例三中所制备的抗醛固酮抗体稀释成1:9000的终浓度溶液,100 μ L/孔包被在96孔酶联板上,4℃放置12-24h;用PBS将上述包被有抗醛固酮抗体的96孔酶联板洗涤3次后,加入200 μ L/孔的0.5%的BSA溶液,4℃封闭放置8-16h。然后用PBS洗涤3次,加入20 μ L/孔的标准品。再加入100 μ L/孔工作浓度的HRP-醛固酮偶联物;室温下孵育30min后PBS洗板5次;然后每孔加入100 μ L TMB底物,室温孵育30min。再每孔加入100 μ L终止液(2M硫

酸)。测定450nm的吸光值。根据各标准品所对应的450nm的吸光值定标,制作标准曲线,结果如附图1所示。

[0136] 2. 待测样品中醛固酮含量的检测

[0137] (1) 制作待测样品

[0138] 制备方法:将醛固酮粉末(购于Sigma公司)溶解于甲醇溶液制成1 μ g/mL的储存液,并将此储存液稀释于空白血浆中,至终浓度分别为0.00,1.00,20.00,100.00pg/mL,形成空白、低、中、高浓度的血浆样本。该空白血浆为不含醛固酮的健康人血浆。

[0139] (2) 测试方法

[0140] 利用上述醛固酮的ELISA检验方法,将上述空白、低、中、高浓度的血浆样本代替标准品,测试上述空白、低、中、高浓度的血浆样本在450nm的吸光值。

[0141] (3) 测试结果

[0142] 对照图1中所示的醛固酮ELISA检验的标准曲线,计算每个样本中醛固酮含量,并对每个样本进行3个复孔测定,根据上述样本中醛固酮的实际含量计算回收率,结果如表1所示。

[0143] 表1醛固酮的ELISA检测回收实验

血清样品	空白	低	中	高
样品浓度 (pg/mL)	0.00	1.00	20.00	100.00
测试 1	0.01	1.03	21.08	96.27
测试 2	0.02	0.96	20.23	99.75
测试 3	0.01	1.01	19.91	100.90
平均值(pg/mL)	0.01	1.00	20.41	98.97
回收率(%)	-	100.00	102.03	98.97

[0145] 由表1中结果可知:采用本发明醛固酮ELISA检测试剂测定不同浓度样品中的醛固酮回收率都较高,均大于95%,说明本发明所述的抗醛固酮特异性抗体可以用于样本中醛固酮的检测,并且结果准确度高。

[0146] 实施例五:葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物的制备

[0147] a. 称取1.09g磷酸二氢钾、1.70g磷酸氢二钠、8.5g氯化钠、0.95g氯化镁,共同溶解于1L去离子水中,调节pH至7.4,制成缓冲溶液B;

[0148] b. 称取3mg葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,室温下溶解于3mL上述缓冲溶液B中,制成葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液;

[0149] c. 称取3mg式(1)所示的醛固酮衍生物,溶解于300 μ l上述缓冲溶液B中,制成醛固酮衍生物溶液;

[0150] d. 当上述醛固酮衍生物溶液刚变澄清时,将其逐滴加入上述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中,然后将此混合溶液在2-8 $^{\circ}$ C下搅拌1小时;

[0151] e. 将反应后的上述混合溶液用上述缓冲溶液B进行透析,透析后所得溶液即为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物溶液,在葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物溶液中加入质量分数0.5%的BSA和质量分数0.1%的Na₃N,于2-8 $^{\circ}$ C下储存。0.5%的BSA和0.1%的

NaN₃是指加入量占最终所得的偶联物溶液的质量百分比,具体的加入量根据透析后所得的偶联物溶液的具体质量而定。

[0152] 实施例六:醛固酮均相酶免疫检测试剂的制备

[0153] 醛固酮均相酶免疫检测试剂在使用之前,为了避免指示试剂中的酶标偶联物和酶的底物发生反应,酶标偶联物和酶的底物是分开放置的,不混合,所以将酶的底物与上述抗醛固酮特异性抗体混合在一起。也就是说,醛固酮均相酶免疫检测试剂包括两种分开设置的试剂,具体如下:

[0154] 试剂A的制备:将5.0g的氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、2.5g的葡萄糖-6-磷酸用1L、55mM、pH=8.0的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物;将制备的抗醛固酮特异性抗体加到上述均相酶底物中,抗体与均相酶底物的体积比为1:100~1:10000;

[0155] 本实施例中抗醛固酮特异性抗体与均相酶底物的体积比具体为1:700。

[0156] 试剂B的制备:将制备的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物加到120mM、pH=8.2的Tris缓冲液中,上述偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:100~1:10000。

[0157] 本实施例中醛固酮酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比具体为1:2800。

[0158] 实施例七:醛固酮均相酶免疫检验及结果

[0159] 1.获得标准曲线:

[0160] (1)设置迈瑞BS480全自动生化分析仪反应参数(见表2)。

[0161] (2)操作步骤为:先加试剂A,再加入标准品,最后加入试剂B。加入试剂B后,测定不同时间点的OD340吸光值,算出不同标准品浓度时的反应速率,实际操作过程中需不断调整试剂A和试剂B的体积比例,同时调整测光点,最后得出较理想的反应标准曲线图,如图2所示。

[0162] 表2迈瑞BS480全自动生化分析仪反应参数

迈瑞 BS480 参数	
项目名称	醛固酮
试剂 1	200 μ l
试剂 2	50 μ l
样本量	12 μ l
分析方法	终点法
主波长	340 nm
次波长	412 nm
反应时间	10 分钟
孵育时间	5 分钟
反应方向	上升
结果	pg/ml
结果精度	0.01
定标方法	Logistic-Log 5P
标准品浓度	0.00,5.00,10.00,20.00,50.00,100.00 pg/ml

[0163]

[0164] 2. 样本检测: 通过本发明的均相酶免疫检测试剂得到的标准曲线, 重复测定低、中、高浓度质控样本10次, 上述质控样本为: 将醛固酮标准品溶解于人血浆中, 至浓度分别为2.00, 25.00, 90.00pg/ml。检测数据及数据分析见表3。

[0165] 表3样品测定及精密度和回收率评估

血液样品	低	中	高
样品浓度 (pg/ml)	2.00	25.00	90.00
[0166] 1	2.09	25.21	90.00
2	2.07	25.52	88.92
3	2.01	25.00	89.53
4	1.96	25.13	88.70
5	2.10	24.70	90.90
6	2.01	24.94	91.23
7	2.09	25.39	89.09
8	1.98	25.32	89.92
[0167] 9	2.06	24.68	89.81
10	2.08	25.11	90.15
平均值(pg/ml)	2.05	25.10	89.83
标准差 (SD)	0.051	0.278	0.816
精密度 (CV%)	2.49%	1.11%	0.91%
回收率 %	102.50	100.40	99.81

[0168] 检测结果: 本发明的均相酶免疫检测试剂测定的准确度高, 回收率达到95% - 105%, 精密度高, CV均低于3%。

[0169] 实施例八: 药物与激素干扰试验

[0170] 选取62种常见药物与30种常见激素及激素代谢物进行干扰检测, 调整浓度至1.00ng/ml, 采用实施例七的均相酶免疫方法进行测定:

[0171] 1. 将待测干扰物与实施例六制备的试剂A接触反应, 再加入试剂B;

[0172] 2. 检测上述混合溶液的OD340吸光值, 根据实施例七的标准曲线得到相应物质的浓度。

[0173] 62种常见药物与30种常见激素及激素代谢物名称以及测定结果具体参见表4。

[0174] 表4常见干扰物测定结果

[0175]

ID#	化合物名称	等价于醛固酮的浓度 (pg/ml)	ID#	化合物名称	等价于醛固酮的浓度 (pg/ml)
1	阿司匹林	0.0	2	苯丙醇胺	0.0
3	β -苯基乙胺	0.0	4	普鲁卡因酰胺	0.0
5	安非他命	0.0	6	普鲁卡因	0.0

[0176]

ID#	化合物名称	等价于醛固酮的浓度 (pg/ml)	ID#	化合物名称	等价于醛固酮的浓度 (pg/ml)
7	氨苄青霉素	0.0	8	奎尼丁	0.0
9	甲氨二氮卓	0.0	10	佐美酸	0.0
11	氯丙嗪	0.0	12	苯肾上腺素	0.0
13	氯拉卓酸	0.0	14	桂皮酰艾克宁	0.0
15	二甲苯氧庚酸	0.0	16	芽子碱	0.0
17	非诺洛芬	0.0	18	地西洋	0.0
19	甲基苯丙胺	0.0	20	可替宁	0.0
21	龙胆酸	0.0	22	阿替洛尔	0.0
22	吉非贝齐	0.0	24	心得安	0.0
25	氢可酮	0.0	26	苯乙哌啶酮	0.0
27	布洛芬	0.0	28	苯基丁氮酮	0.0
29	丙咪嗪	0.0	30	麦角酸二乙基酰胺	0.0
31	二氨基二苯砒	0.0	32	大麻酚	0.0
33	萘普生	0.0	34	洛哌丁胺	0.0
35	氢氯噻嗪	0.0	36	异克舒令	0.0
37	哌替啶	0.0	38	苯基丙氨酸	0.0
39	烯丙羟吗啡酮	0.0	40	盐酸氟西汀	0.0
41	麻黄素	0.0	42	柳丁氨醇	0.0
43	烟酰胺	0.0	44	青霉素	0.0
45	甲胺呋硫	0.0	46	甲基二乙醇胺	0.0
47	异戊巴比妥	0.0	48	二亚甲基双氧苯丙胺	0.0
49	甲撑二氧苯丙胺	0.0	50	琥珀酸多西拉敏	0.0
51	四氢大麻酚	0.0	52	纳布啡	0.0
53	制霉菌素	0.0	54	去甲吗啡	0.0
55	乙酰吗啡	0.0	56	羟考酮	0.0
57	苯非他明	0.0	58	克他命	0.0

[0177]

ID#	化合物名称	等价于醛固酮的浓度 (pg/ml)	ID#	化合物名称	等价于醛固酮的浓度 (pg/ml)
59	异丙嗪	0.0	60	苯海拉明	0.0
61	阿司帕坦	0.0	62	苯丁胺	0.0
63	皮质醇(氢化可的松)	0.0	64	香草扁桃酸	0.0
65	雄烯二酮	0.0	66	雄甾酮	0.0
67	皮质脂酮	0.0	68	皮质酮(可的松)	0.0
69	去氧皮质酮	0.0	70	脱氢表雄酮	0.0
71	硫酸脱氢表雄酮	0.0	72	二氢睾酮	0.0
73	雌二醇	0.0	74	雌三醇	0.0
75	雌酮	0.0	76	本胆烷醇酮	0.0
77	17-羟孕烯醇酮	0.0	78	17-羟孕酮	0.0
79	孕烯醇酮	0.0	80	孕酮	0.0
81	睾酮	0.0	82	孕三醇	0.0
83	孕二醇	0.0	84	17 α -羟基黄体酮	0.0
85	雄烯二酮	0.0	86	17-酮类固醇	0.0
87	17-羟皮质类固醇	0.0	88	肾上腺素	0.0
89	去甲肾上腺素	0.0	90	多巴胺	0.0
91	高香草酸	0.0	92	二羟基杏仁酸	0.0

[0178] 测定结果显示:上述62种常见药物与30种常见激素及激素代谢物等价于醛固酮的浓度均小于1.00pg/ml。由此可见,本发明的抗体是抗醛固酮的特异性抗体,与常见干扰物无交叉反应。

[0179] 实施例九:相关性分析

[0180] 对100例临床标本分别使用高效液相色谱法和本发明的均相酶免疫试剂进行相关性分析,测定的数据参见表5。

[0181] 表5临床样本测定值

[0182]

样本号	均相酶免疫法 测定值 (pg/ml)	高效液相色谱 法测定值 (pg/ml)
1	31.32	30.83
2	13.72	13.87
3	5.93	6.00
4	33.76	34.13
5	22.65	22.43
6	12.83	13.04
7	57.63	58.65
8	85.31	87.13
9	66.71	67.02
10	13.53	13.49
11	20.89	20.81
12	44.39	44.99
13	10.93	10.88
14	67.22	66.50
15	44.32	44.79
16	22.31	22.52
17	14.58	14.60
18	9.74	10.03
19	73.76	75.10
20	90.90	90.05
21	52.06	52.28
22	71.26	71.58
23	18.80	18.69
24	37.69	37.36
25	64.10	63.60
26	8.63	8.70
27	26.42	26.69
28	52.86	53.05
29	60.79	61.75
30	33.68	34.10
31	18.83	18.71
32	96.52	95.07
33	22.38	22.50
34	82.61	81.28
35	21.16	21.20
36	47.64	48.18
37	29.83	30.00
38	13.00	13.11

[0183]

39	79.60	80.13
40	50.02	49.56
41	7.99	8.01
42	25.94	26.11
43	33.33	34.52
44	53.47	54.06
45	78.25	78.91
46	42.18	42.96
47	60.34	61.57
48	32.36	32.01
49	24.95	25.13
50	10.09	10.15
51	53.95	53.51
52	77.69	78.53
53	42.83	43.39
54	20.92	21.10
55	18.53	18.73
56	12.05	12.30
57	63.81	62.96
58	38.58	39.06
59	72.90	74.13
60	37.83	38.01
61	28.92	29.13
62	19.95	20.03
63	90.21	89.10
64	53.51	54.13
65	38.38	38.70
66	52.83	52.52
67	22.28	22.10
68	73.82	74.68
69	43.82	43.32
70	83.06	83.59
71	22.93	23.18
72	26.58	26.69
73	19.69	19.80
74	53.88	53.01
75	66.29	66.52
76	56.09	56.67
77	28.86	28.74
78	40.58	41.26
79	18.77	18.89

	80	92.91	91.76
	81	63.33	65.22
	82	30.00	29.51
	83	10.60	10.65
	84	27.05	27.14
	85	24.57	25.08
	86	42.76	43.29
	87	73.35	74.93
	88	32.16	32.98
[0184]	89	15.05	15.65
	90	33.38	33.05
	91	52.43	52.96
	92	62.66	64.00
	93	30.82	31.17
	94	50.15	50.51
	95	32.73	32.89
	96	19.85	20.09
	97	12.07	12.11
	98	85.60	86.18
	99	25.77	26.09
	100	26.52	26.60

[0185] 对上述数据作图,参见图3,得到的线性方程为: $y=1.0015x+0.1489$,相关系数 $R^2=0.9994$,表明本发明的检测试剂测定醛固酮临床标本的准确度高。

[0186] 对本领域的技术人员来说,可根据以上描述的技术方案以及构思,做出其它各种相应的改变以及形变,而所有的这些改变以及形变都应该属于本发明权利要求的保护范围之内。

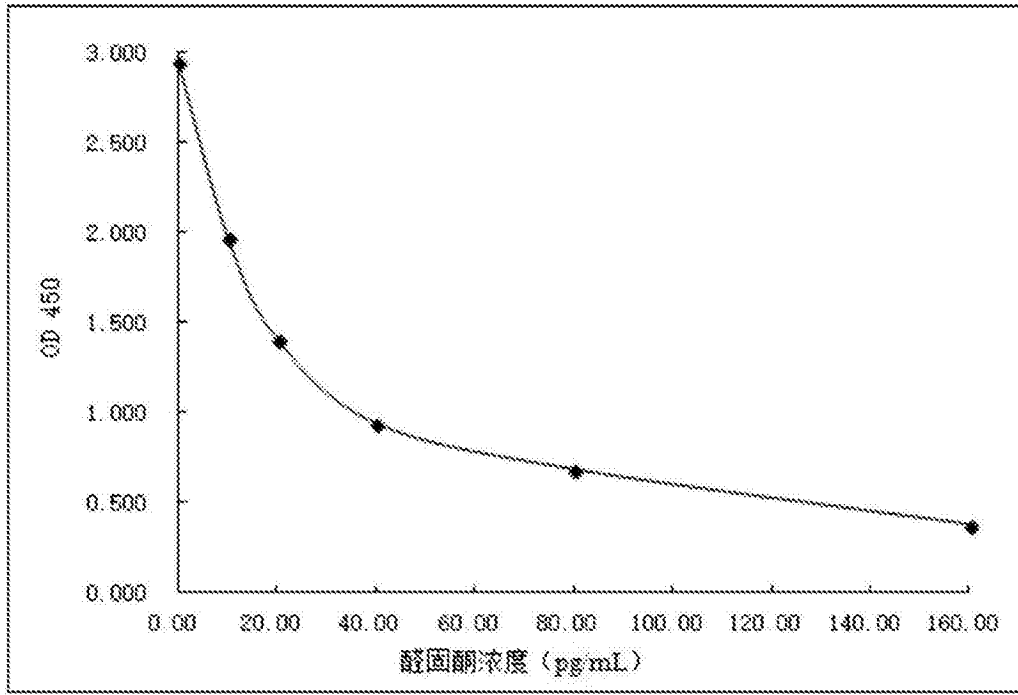


图1

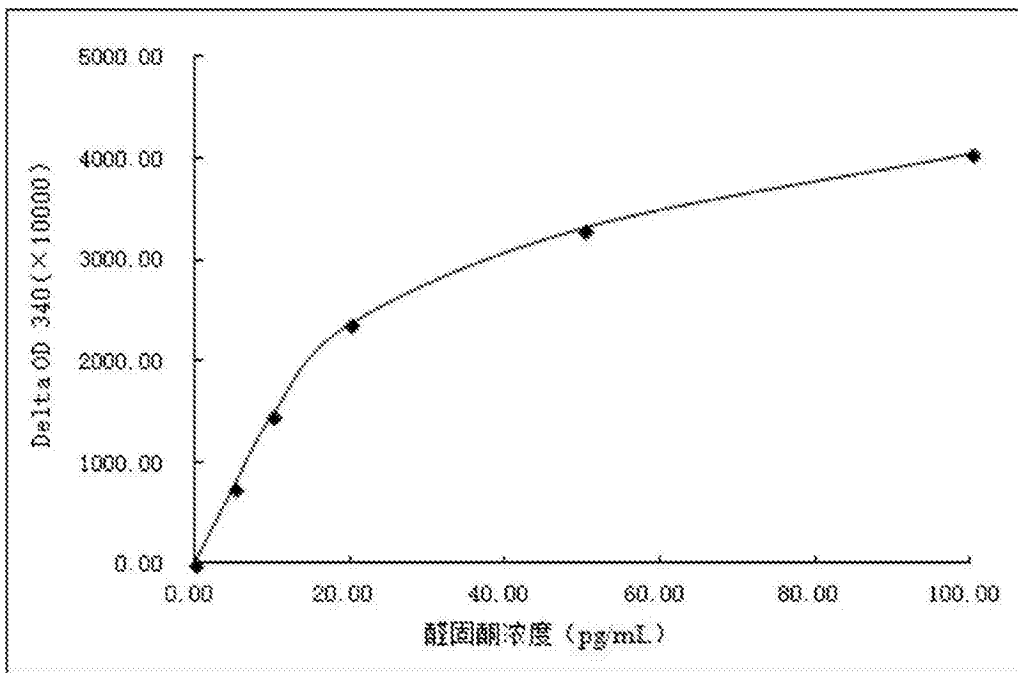


图2

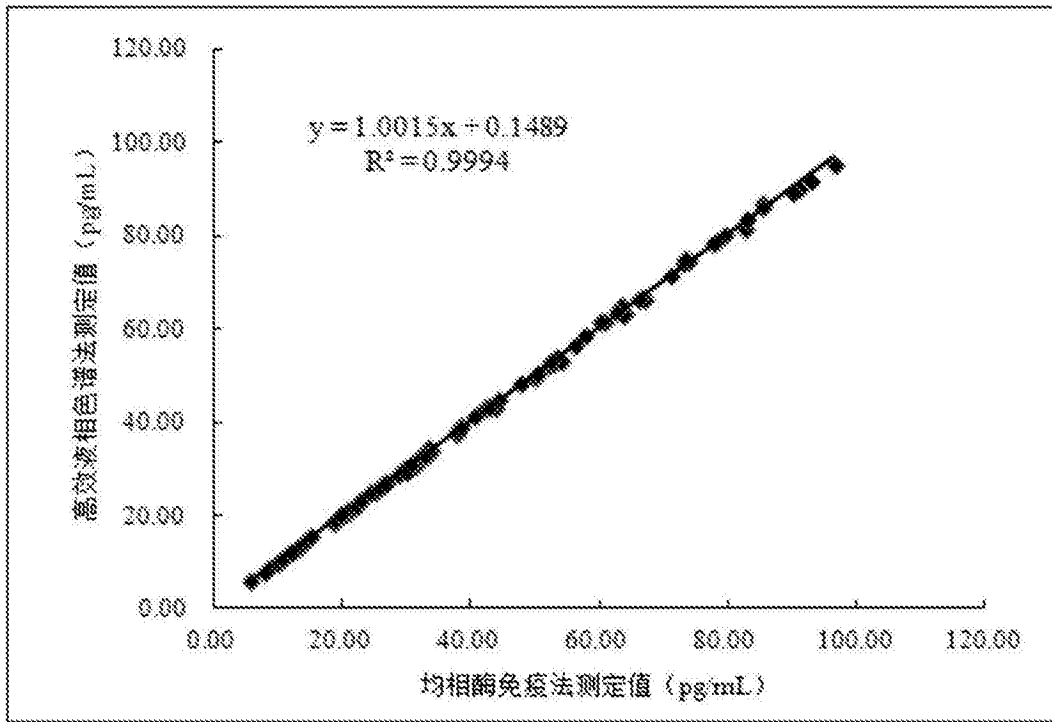


图3

专利名称(译)	醛固酮衍生物及其制备方法、醛固酮均相酶免疫检测试剂		
公开(公告)号	CN107973836A	公开(公告)日	2018-05-01
申请号	CN2017110977334.8	申请日	2017-10-19
[标]申请(专利权)人(译)	苏州博源医疗科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州博源医疗科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州博源医疗科技有限公司		
[标]发明人	虞留明 周洲		
发明人	虞留明 周洲		
IPC分类号	C07J43/00 G01N33/53 G01N33/531		
CPC分类号	C07J43/003 G01N33/53 G01N33/531		
代理人(译)	胡拥军 赵赛		
其他公开文献	CN107973836B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种醛固酮衍生物及其制备方法、醛固酮均相酶免疫检测试剂及其制备方法、检测方法。醛固酮衍生物具有如式(I)所示的结构，由该醛固酮衍生物制备免疫原性强的醛固酮免疫原及其抗体，用该抗体制备的醛固酮均相酶免疫检测试剂可以实现在全自动生化分析仪上对醛固酮高通量、快速化的检测。

