



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106749477 B

(45)授权公告日 2019.04.05

(21)申请号 201611117364.3

G01N 33/535(2006.01)

(22)申请日 2016.12.07

G01N 33/539(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

G01N 33/532(2006.01)

申请公布号 CN 106749477 A

G01N 33/543(2006.01)

(43)申请公布日 2017.05.31

(56)对比文件

(73)专利权人 武汉博仁凯润药业有限公司

CN 103739703 A, 2014.04.23, 全文, 尤其是说明书第0005、0011、0014-0026、0028-0030、0051段.

地址 430000 湖北省武汉市东湖新技术开发区高新大道858号生物医药园中小企业园服务中心

CN 103760348 A, 2014.04.30, 全文, 尤其是说明书第0062-0070、0077-0081段.

(72)发明人 杨锋 李波 刘天成 胡川闽 陈安

CN 103940816 A, 2014.07.23, 全文.

CN 105481977 A, 2016.04.13, 全文, 尤其是说明书第0010-0014、0019-0021、0030-0033段.

(74)专利代理机构 北京超凡志成知识产权代理事务所(普通合伙) 11371

成慧娟 等.《血清结合甘胆酸放射免疫分析药盒研制(阻断法)》.《原子能科学技术》.1986, 第20卷(第4期), 第413-419页.

代理人 毕翔宇

审查员 蒋薇薇

(51)Int.Cl.

C07J 41/00(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

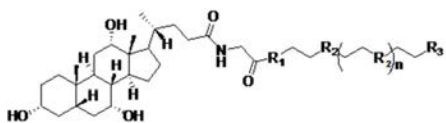
权利要求书1页 说明书17页

(54)发明名称

用于测定血清甘胆酸的化合物及制备方法

(57)摘要

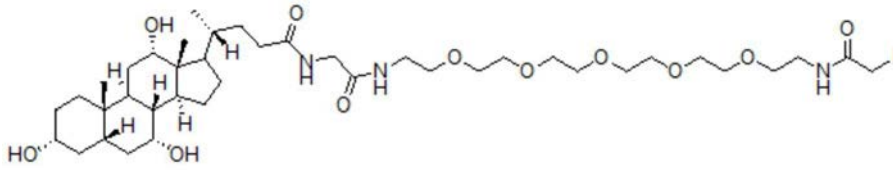
本发明公开一种测定血清甘胆酸的化合物, 该化合物具有如式(A)所示的结构:



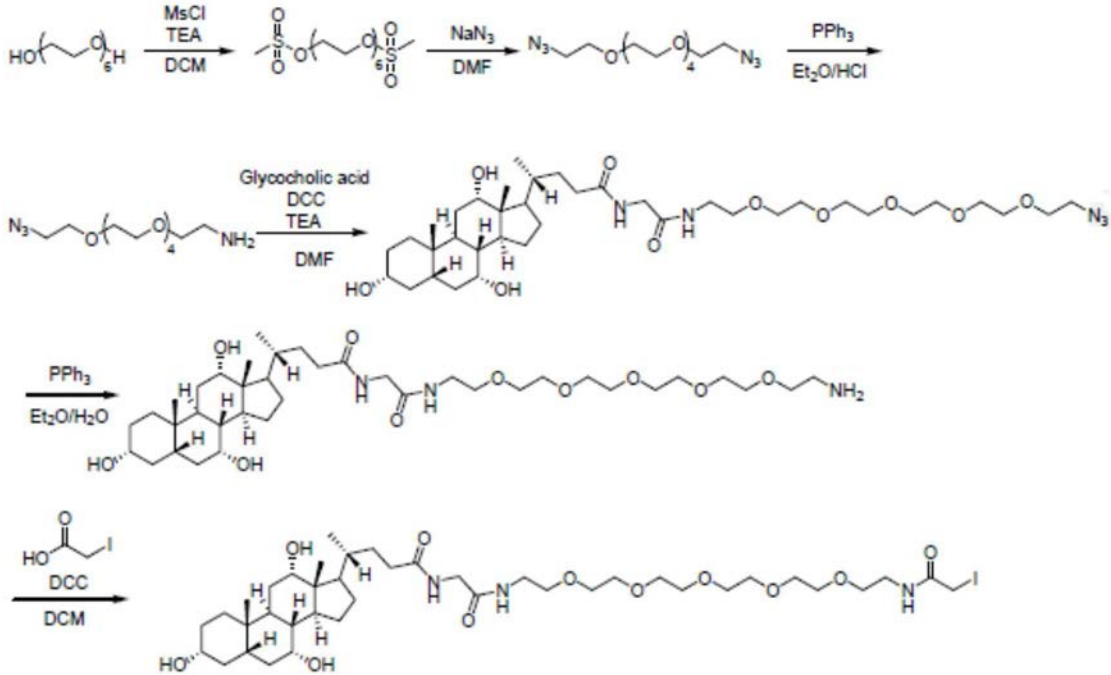
(A)

式(A)中, n为0或正整数; R<sub>1</sub>选自NH, O, S; R<sub>2</sub>选自O, NH, CH<sub>2</sub>; R<sub>3</sub>选自亲水性基团、生物素或免疫类蛋白质载体。该化合物有利于减少甘胆酸与蛋白质交联时的位阻效应, 同时增加交联后的蛋白抗原的水溶性, 便于刺激免疫。用此修饰后的甘胆酸化合物作为免疫原制备的抗体, 能特异性识别和结合甘胆酸。应用修饰后的甘胆酸和抗体, 可以建立免疫比浊、竞争酶联免疫吸附分析、胶体金免疫层析等免疫检测方法, 实现对标本中甘胆酸的浓度水平的准确测定。

1. 一种用于测定血清甘胆酸的化合物,其特征在于,所述化合物结构如下:



2. 权利要求1所述化合物的制备方法,其特征在于:合成路径如下:



3. 一种甘胆酸特异性抗体,由权利要求1所述的化合物免疫宿主动物后分离纯化得到。

4. 一种甘胆酸特异性抗体,其特征在于:所述抗体为用权利要求1所述的化合物免疫小鼠,通过杂交瘤技术制备的单克隆抗体,或者为用所述化合物免疫新西兰大白兔或波尔羊后分离纯化得到的多克隆抗体。

5. 一种甘胆酸检测试剂,其特征在于:含有权利要求3或权利要求4中所述的甘胆酸特异性抗体,和权利要求1所述的化合物,基于均相酶免疫检测法的原理建立。

6. 一种甘胆酸检测试剂,其特征在于:含有权利要求3或权利要求4中所述的甘胆酸特异性抗体,和权利要求1所述的化合物,基于免疫比浊的原理建立。

## 用于测定血清甘胆酸的化合物及制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及甘胆酸检测技术领域。更具体地涉及用于测定血清甘胆酸的化合物及制备方法,尤其涉及一种测定血清甘胆酸的抗体抗原的制备方法及聚乙二醇链接剂修饰的甘胆酸的化合物的合成。

### 背景技术

[0002] 血清甘胆酸(cholyglycine,CG)是胆酸与甘氨酸结合而成的结合型胆酸之一。在肝细胞内,胆固醇经过极其复杂的酶促反应,转变成初级胆汁酸。其中有胆酸(cholic acid,CA)和鹅去氧胆酸(chenodeoxycholic acid,CD-CA)。胆酸的类固醇核上有三个羟基(C3、C7和C12),侧链末端的羟基以肽键与甘氨酸结合,分子量为462U。胆酸由肝细胞合成,经毛细胆管、胆管排入胆囊,随同胆汁进入十二指肠,帮助食物消化。95%的胆酸在回肠末端重吸收,经门静脉再回肝脏,由肝细胞摄取再利用。肝细胞能高效地从门静脉摄取大量的甘胆酸,以致血液中的甘胆酸量小于1.9g/mL。重吸收的甘胆酸又进入肝肠循环。通过这种机制,机体能充分利用甘胆酸。在血清中胆酸主要以蛋白结合形式存在。正常情况下,外周血中胆酸含量甚微,正常成人无论空腹或餐后,其血清甘胆酸浓度稳定在低水平。一旦肝细胞病变,肝细胞摄取甘胆酸能力下降,血中的甘胆酸浓度升高,其中急性肝炎、慢性肝炎轻度升高,肝硬变,肝癌病人显著升高。胆汁郁滞时,肝脏排泄胆酸发生障碍,而返流入血液循环的甘胆酸增加,也使血甘胆酸含量增高。因此,测定血清甘胆酸是评价肝细胞功能及其肝胆系物质循环功能的敏感指标之一。

[0003] 孕妇在怀孕的中后期,由于胎儿增大,会压迫肝脏,使肝脏排泄胆酸发生障碍而导致甘胆酸偏高;另外由于妊娠期胎盘合成和分泌大量雌激素和孕激素以及代谢负荷增大,可诱发肝胆系统的变化,使孕妇易患妊娠肝内胆汁淤积症(intrahepatic cholestasis of pregnancy, ICP),对胎儿产生严重的影响。随ICP患者血清甘胆酸增高使羊水污染率、早产率、胎儿宫内窘迫率及剖宫产率增高,严重者可导致胎儿的死亡。测定孕妇血清甘胆酸,对及早发现ICP和了解ICP的严重程度,从而降低围产儿病死率有着非常重要的意义,因此甘胆酸的测定可作为筛查和随访ICP的指标。

[0004] 目前,体外定量测定甘胆酸主要使用放射免疫分析法(RIA),化学发光免疫分析法(CLIA)、酶联免疫吸附法(ELISA)等。放射免疫法需要有专业放免设施,普通实验室难以开展,且放免法准确度较低,放射性射线还会对操作人员的健康产生一定的危害,国际上已较少使用。化学发光法灵敏度较高,但是测定速度偏慢,需要昂贵的专用化学发光检测设备,不利于常规实验室开展,临床应用局限性明显。固相酶联免疫法一般用于半定量测定,且操作繁琐,检测时间长,自动化程度低,重复性较差,不利于广泛应用于临床检验。

[0005] 均相酶免疫检测法,以其检测速度快、操作简单、灵敏度高、特异性强且可以在全自动生化分析仪上实现对小分子物质的高通量快速检测的优点,正在得到越来越多的关注。均相酶免疫检测法需借助能够用于检测血清甘胆酸的酶标化合物半抗原与能识别甘胆酸的特异抗体的作用复合体来定量血清中的甘胆酸,所以抗体对甘胆酸的识别性越好,检

测中释放有活性的酶就越迅速,这个方法就越灵敏。

[0006] 免疫比浊分析是基于可溶性抗原与相应抗体特异性结合,二者在一定浓度比例条件下形成一定大小的抗原抗体复合物,使反应体系出现浊度,利用光学分析设备测定浊度,从而计算抗原或者抗体的含量。该方法仅需要一种抗体参与,可以在目前生物医学实验室中广泛应用的全自动生化分析仪等检测设备中对抗原和抗体物质进行准确定量分析。该分析方法也引起人们越来越多的关注。

[0007] 在CN103739703B以及CN103940816B的专利文献中均给出了适用于测定血清甘胆酸的化合物,但是其化合物的合成路径复杂,成本高。

[0008] 针对现有技术存在的上述问题,特提出本发明。

## 发明内容

[0009] 本发明的一个目的在于提供一种用于测定血清甘胆酸的化合物及制备方法,即测定血清甘胆酸的抗体抗原的制备方法及聚乙二醇链接剂修饰的甘胆酸的化合物的合成,该化合物有利于减少甘胆酸与蛋白质交联时的位阻效应,同时增加交联后的蛋白抗原的水溶性,便于刺激免疫。

[0010] 本发明的另一个目的在于提供一种甘胆酸特异性抗体,该抗体由本发明制备的化合物免疫宿主动物后分离纯化得到。

[0011] 本发明的第三个目的在于提供含有上述抗体的检测甘胆酸的试剂盒,包括酶免疫测定试剂盒和免疫比浊测定试剂盒。

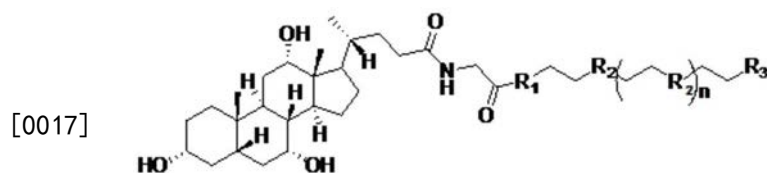
[0012] 本发明的最后一个目的在于提供上述化合物的制备方法,该方法合成路径快速且成本低。

[0013] 由于直接用甘胆酸免疫动物无法获得甘胆酸特异性抗体,所以需要将甘胆酸交联到非免疫原性蛋白质上刺激动物免疫以产生相应的抗体,还需要调节甘胆酸交联到蛋白质上的位阻效应从而制备出特异性更强的甘胆酸检测试剂,本发明提供了不同长度的聚乙二醇链接剂修饰过的甘胆酸的化合物及其合成方法,此类化合物能够很方便的交联到非免疫蛋白质或者是活性酶上,并通过交联时链接剂的长度来调节动物免疫抗体的特异性。

[0014] 为达到上述目的,本发明采用下述技术方案:

[0015] 一种用于测定血清甘胆酸的化合物,所述化合物为链接有甘胆酸并修饰有亲水性基团的水溶性的聚合物。

[0016] 优选地,所述化合物具有如式(A)所示的结构:



(A),

[0018] 式(A)中,

[0019] n为0或正整数,优选,n=0,1,2,3...20,更优选,n=0,1,2,3...10;

[0020] R<sub>1</sub>选自NH, O, S;

[0021] R<sub>2</sub>选自O, NH, CH<sub>2</sub>;

[0022] R<sub>3</sub>选自亲水性基团、生物素或免疫类蛋白质载体。

[0023] 优选地,所述亲水性基团选自羟基,巯基,硫乙酰基,叠氮基,氨基,NHBoc,N-琥珀酰亚胺基,溴乙酰氨基,碘乙酰氨基,双硫吡啶,甲酸基,N-羟基马来酰胺甲酸基活化酯,五氟苯酚甲基活化酯,羧基,N-羟基马来酰胺活化酯,丙炔基或醛基;优选巯基、叠氮基、碘乙酰氨基、N-琥珀酰亚胺基或双硫吡啶。

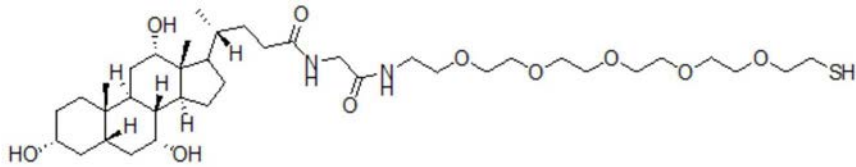
[0024] 优选地,所述免疫类蛋白质载体选自牛血清白蛋白、人血清白蛋白、卵白蛋白或血蓝蛋白。

[0025] 用于测定血清甘胆酸的化合物的制备方法,该方法包括将甘胆酸与修饰有亲水性基团的水溶性的聚合物链接。

[0026] 优选地,所述水溶性的聚合物选自聚乙二醇,其中,聚乙二醇的聚合度为n,n为正整数;优选,n=0,1,2,3,...20,更优选,n=0,1,2,3,...10;

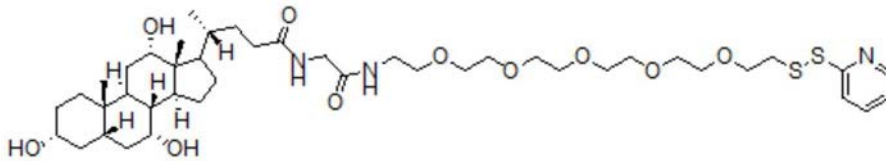
[0027] 所述亲水性基团选自羟基,巯基,硫乙酰基,叠氮基,氨基,NHBoc,N-琥珀酰亚胺基,溴乙酰氨基,碘乙酰氨基,双硫吡啶,甲酸基,N-羟基马来酰胺甲酸基活化酯,五氟苯酚甲基活化酯,羧基,N-羟基马来酰胺活化酯,丙炔基或醛基;优选地,所述亲水性基团选自碘乙酰氨基、N-琥珀酰亚胺基、巯基、双硫吡啶、氨基或叠氮基团。

[0028] 优选地,以聚合度为6的聚乙二醇为起始反应物制备具有式(8)或式(9)所示结构的化合物的合成路径如下,



(8) ;

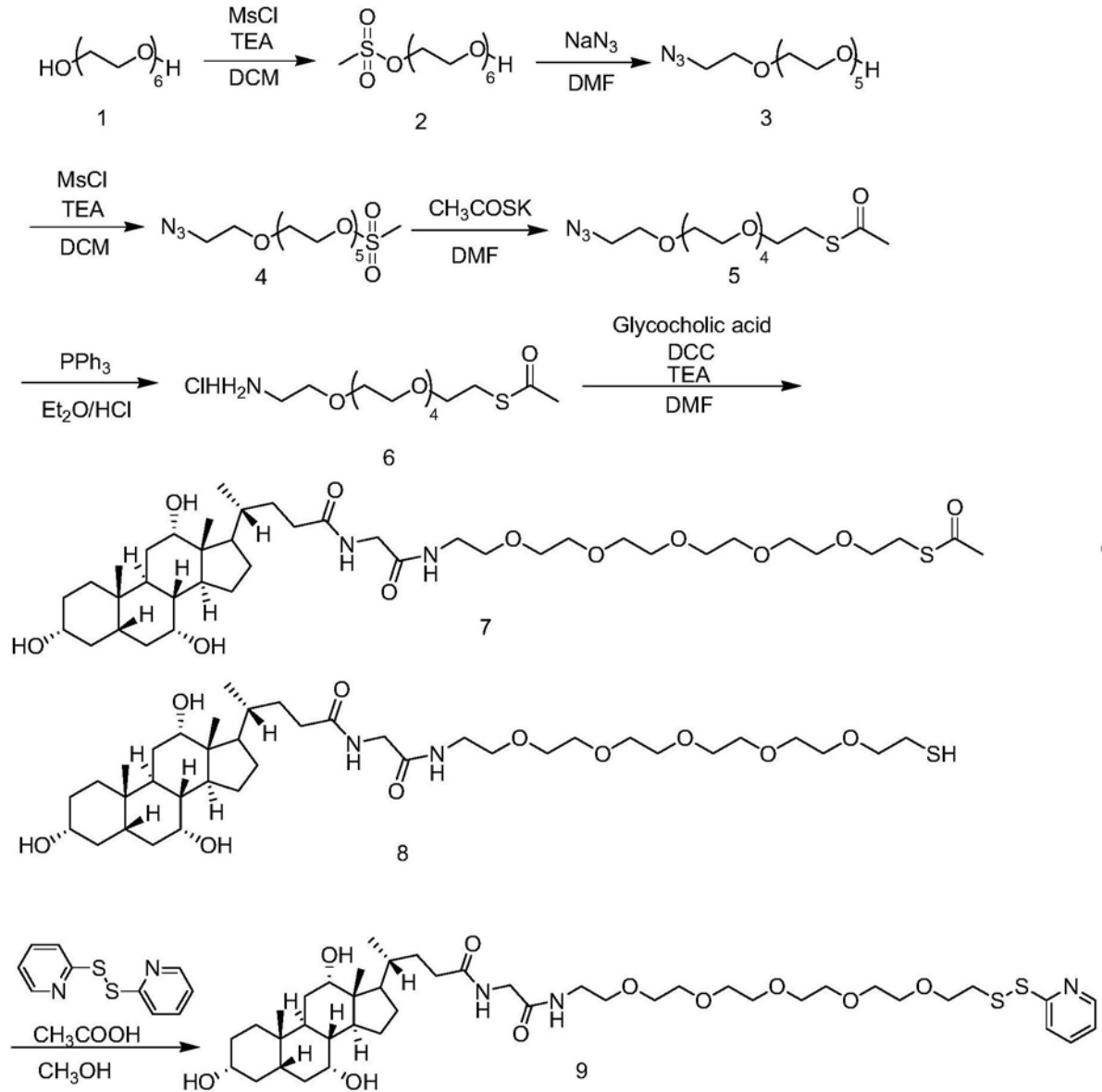
[0029]



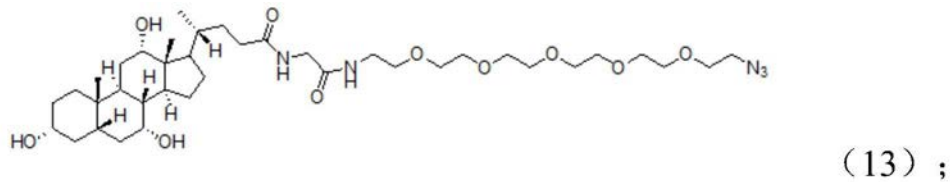
(9) ;

[0030] 合成路径:

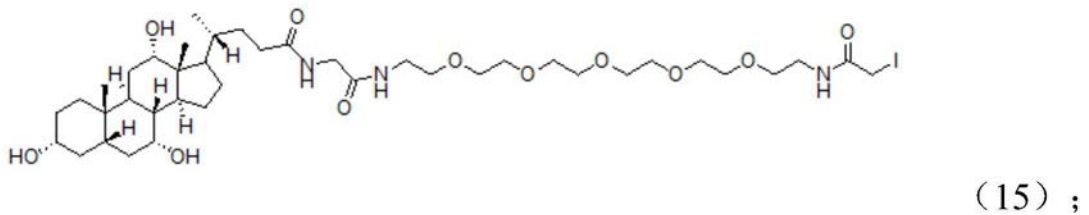
[0031]



[0032] 优选地,以聚合度为6的聚乙二醇为起始反应物制备具有式(13)或式(15)所示结构的化合物的合成路径如下,

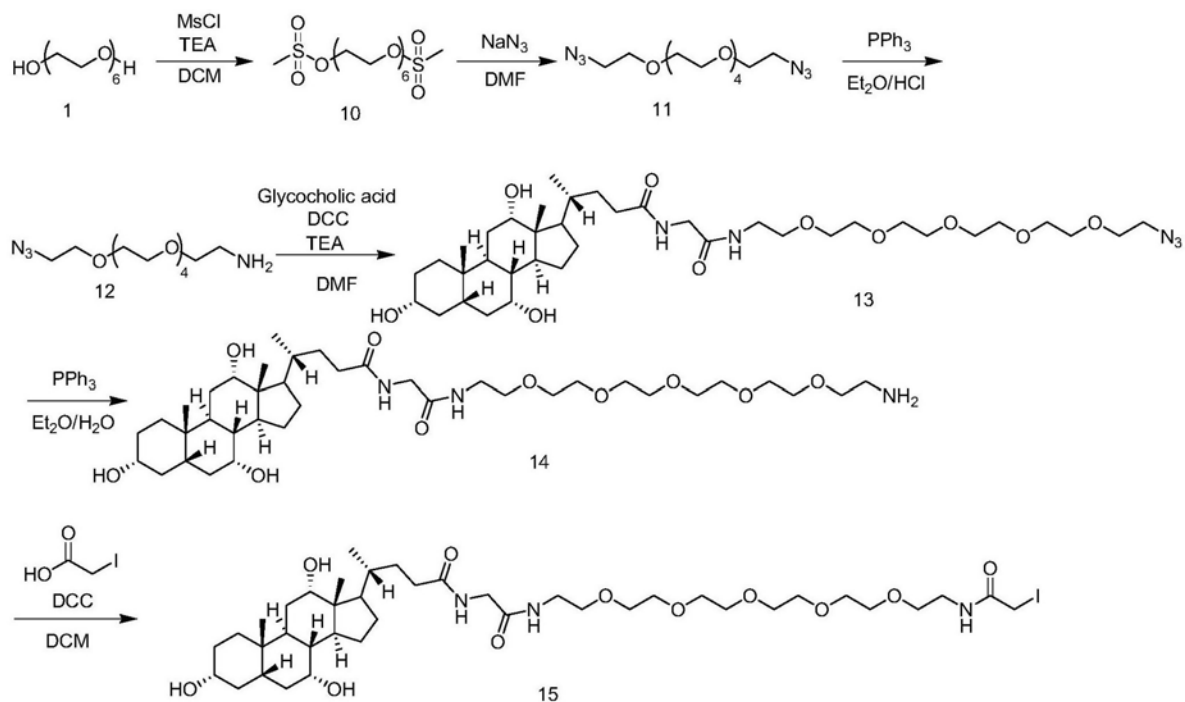


[0033]



[0034] 合成路径:

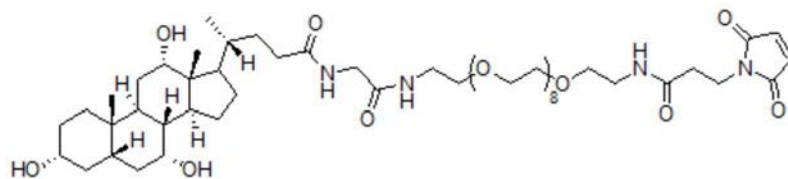
[0035]



。

[0036] 优选地,以聚合度为10的聚乙二醇为起始反应物制备具有式(22)所示结构的化合物的合成路径如下,

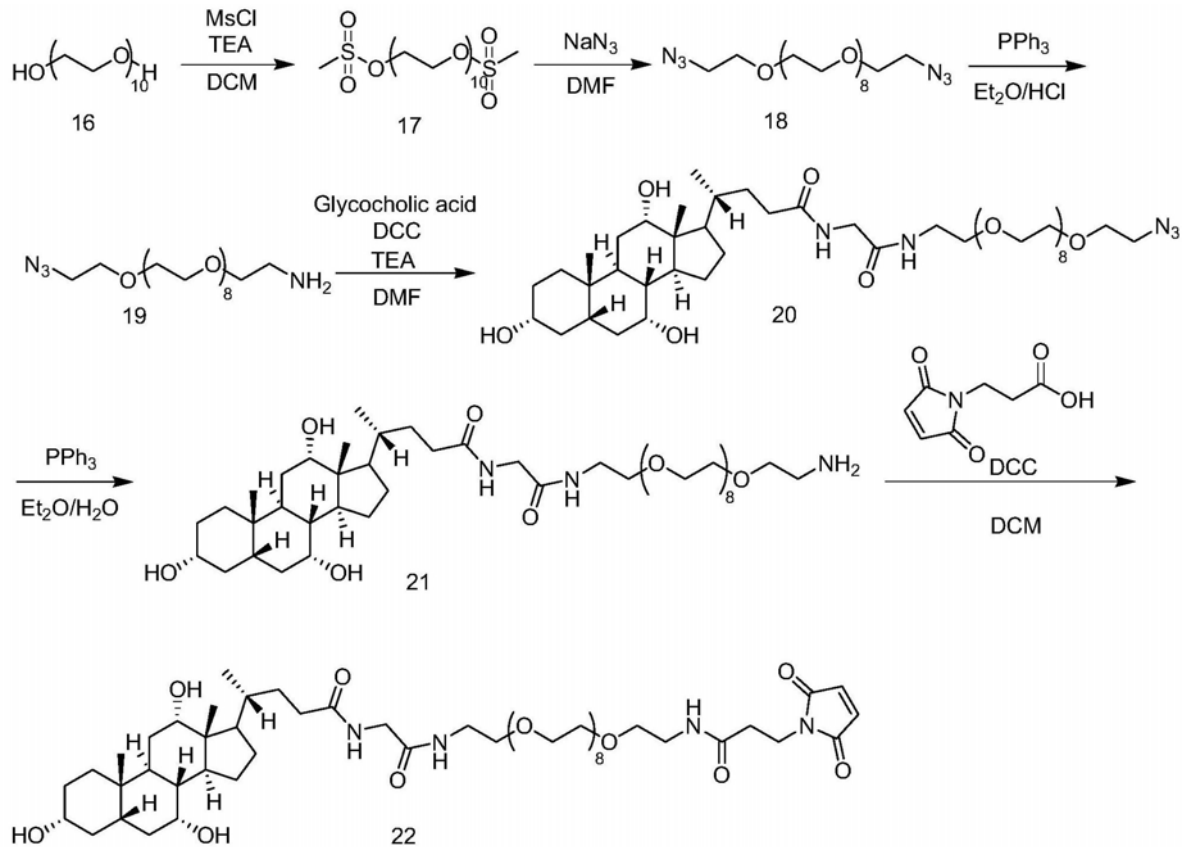
[0037]



(22),

[0038] 合成路径:

[0039]



[0040] 一种甘胆酸特异性抗体,由上述测定血清甘胆酸的化合物免疫宿主动物后分离纯化得到。

[0041] 一种甘胆酸特异性抗体,所述抗体为用上述测定血清甘胆酸的化合物免疫小鼠,通过杂交瘤技术制备的单克隆抗体,或者为用上述测定血清甘胆酸的化合物免疫新西兰大白兔或波尔羊等宿主后分离纯化得到的多克隆抗体。

[0042] 一种甘胆酸检测试剂,含有上述的甘胆酸特异性抗体,和上述的测定血清甘胆酸的化合物,基于均相酶免疫检测法的原理建立。

[0043] 一种甘胆酸检测试剂,含有上述的甘胆酸特异性抗体,和上述的测定血清甘胆酸的化合物,基于免疫比浊的原理建立。

[0044] 本发明的有益效果如下:

[0045] 本发明合成了一系列不同长度聚乙二醇链接剂修饰过的甘胆酸抗原化合物,此类抗原化合物的合成为筛选更加专一识别血清甘胆酸的抗体提供了更多的选择性,从而有可能开发出检测速度更快、操作更简单、灵敏度更高、特异性更强且可以在全自动生化分析仪上实现对小分子物质的高通量快速化检测的检测试剂。

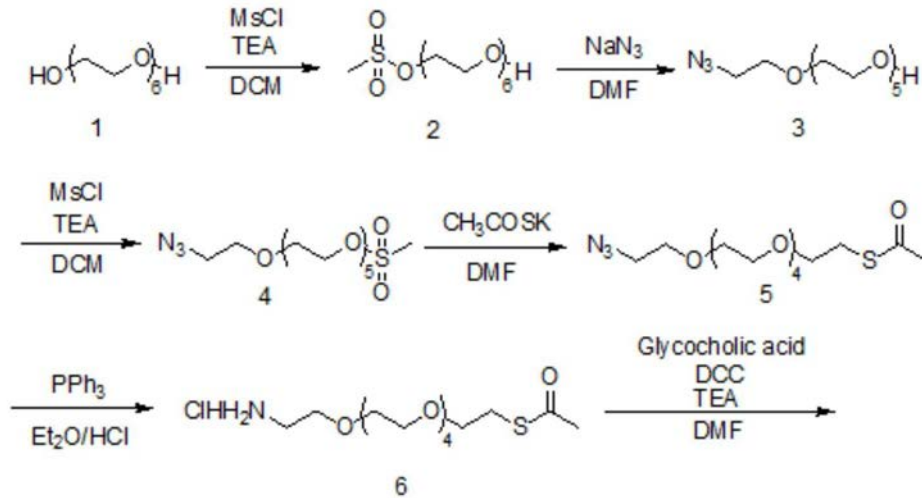
### 具体实施方式

[0046] 为了更清楚地说明本发明,下面结合优选实施例对本发明做进一步的说明。本领域技术人员应当理解,下面所具体描述的内容是说明性的而非限制性的,不应以此限制本发明的保护范围。

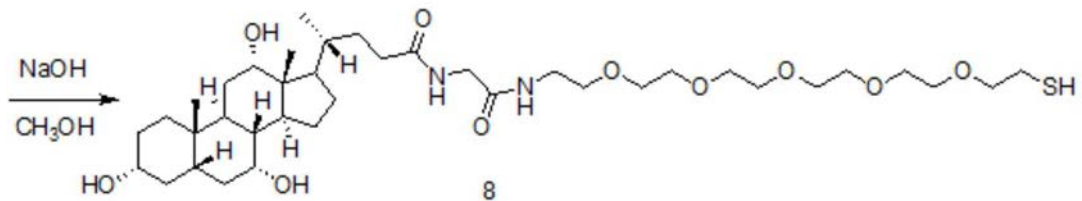
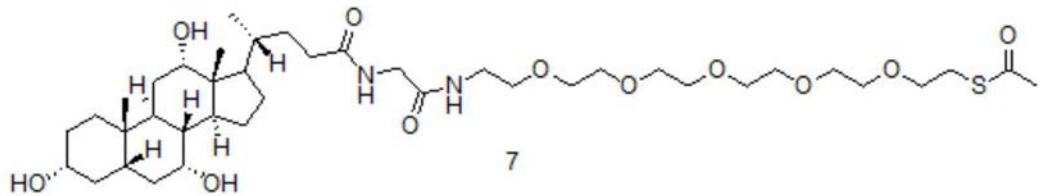
[0047] 实施例1

[0048] 制备具有式 (8) 结构的化合物

[0049] 其合成路径如下:

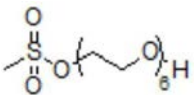


[0050]



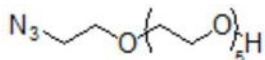
[0051] 具体的制备步骤如下:

[0052] 1. 合成具有式 (2) 结构的化合物

[0053]  式 (2) 中  $n=6$ ;

[0054] 将聚合度为6的聚乙二醇 (46g, 0.163mol), 甲磺酰氯 (18.6g, 0.287mol) 加入 1000mL 的单口烧瓶中, 然后加入 500mL 的 DCM, 降温至 5°C; 在此温度下缓慢滴加三乙胺 (20g, 0.2445mol), 滴毕后室温搅拌 3h, TLC 检测反应完毕, 将反应液过滤, 旋干溶剂, 得到的粗品溶于乙酸乙酯, 加水萃取 2 遍后, 用饱和食盐水萃取 1 遍, 合并有机相, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干得到 50g 具有式 (2) 结构的淡黄色液体, 所得的淡黄色液体直接用于下一步反应。

[0055] 2. 合成具有式 (3) 结构的化合物

[0056]  (3);

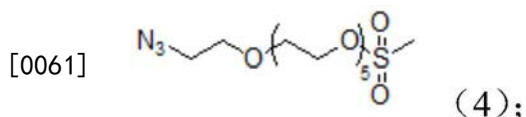
[0057] 将具有式 (2) 结构的化合物 (50g, 0.139mol) 溶于 500mL 的 DMF 中, 然后加入固体叠

氮钠 (18g, 0.276mol) 升温至 90℃ 搅拌过夜; TLC 检测反应完毕, 将反应液倒入 400mL 的水中, 用乙酸乙酯萃取两次 (400mL × 2), 收集有机相用水萃取 2 次 (200mL × 2), 饱和食盐水萃取一次, 合并有机相, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干过柱, 得到 26g 具有式 (3) 结构的淡黄色液体, 本步骤的产率为 60.1%。

[0058] 所得淡黄色液体的核磁共振氢谱数据如下:

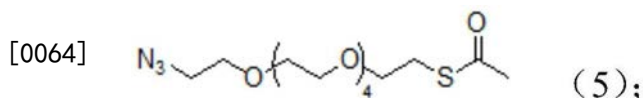
[0059]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2.64 (1H, t, J 8.0), 3.38 (2H, t, J 8.0), 3.59–3.74 (22H, t, J 4.0)

[0060] 3. 合成具有式 (4) 结构的化合物



[0062] 将具有式 (3) 结构的化合物 (10g, 32.54mmol), 甲磺酰氯 (4.1g, 35.8mmol) 溶于 100mL 的 DCM 中, 降温至 5℃; 在此温度下缓慢滴加三乙胺 (3.95g, 39mmol), 滴毕后室温搅拌 3h, TLC 检测反应完毕, 将反应液过滤, 旋干溶剂, 得到的粗品溶于乙酸乙酯, 加水萃取 2 遍后, 用饱和食盐水萃取 1 遍, 合并有机相, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干得到 12g 具有式 (4) 结构的无色液体, 得到的无色液体直接用于下一步反应。

[0063] 4. 合成具有式 (5) 结构的化合物

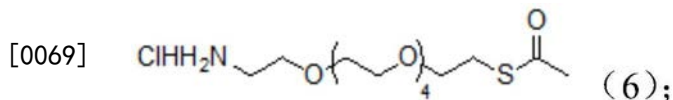


[0065] 将具有式 (4) 结构的化合物 (11g, 28.5mmol) 溶于 200mL 的 DMF 中, 加入硫代乙酸钾 (6g, 56mmol) 室温搅拌 0.5h 后, 反应变粘稠, 加热至 40℃ 反应 1h 后, TLC 检测反应完毕, 将反应液加入 200mL 的水, 用 EA 萃取两次, 收集有机相, 再用水萃取两次, 饱和食盐水萃取一次, 收集有机相, 加无水硫酸钠干燥, 过滤, 脱溶后, 过柱纯化得到 10.5g 具有式 (5) 结构的无色液体, 本步骤的产率为 96%。

[0066] 所得的无色液体的核磁共振氢谱数据如下:

[0067]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2.33 (3H, s), 3.09 (2H, t, J 8.0), 3.39 (2H, t, J 8.0), 3.58–3.68 (20H, m)

[0068] 5. 合成具有式 (6) 结构的化合物



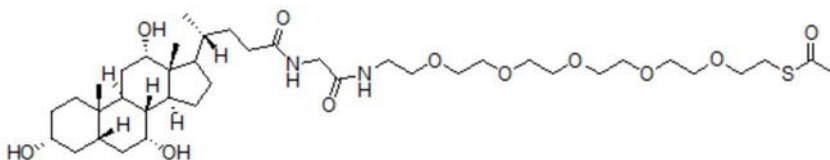
[0070] 将具有式 (5) 结构的化合物 (1g, 2.74mmol) 溶于 5mL 的乙醚和 5mL 的盐酸水溶液中 (1M), 加入三苯基膦 (0.76g, 2.87mmol), 室温下搅拌过夜, TLC 检测反应完毕, 将反应液过滤, 将滤液用乙酸乙酯萃取 4 次 (2mL × 4), 将萃取后的水相减压蒸馏得到 0.75g 具有式 (6) 结构的白色油状液体, 本步骤的产率为 72.4%。

[0071] 所得白色油状液体的核磁共振氢谱的数据如下:

[0072]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2.32 (3H, s), 3.09–3.15 (4H, m), 3.59–3.95 (20H, m), 3.58–3.68 (20H, m), 8.06 (3H, s)

[0073] 6. 合成具有式 (7) 结构的化合物

[0074]



(7);

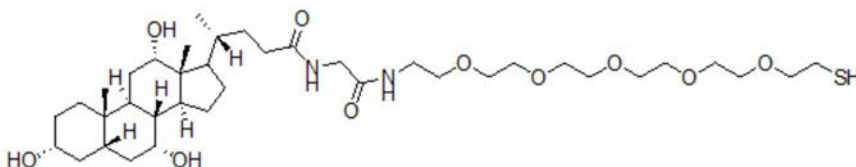
[0075] 将具有式(6)结构的化合物(0.75g, 1.997mmol)溶于3mL的DMF中,加入甘胆酸(0.97g, 2.09mmol), DCC(0.453g, 2.19mmol), 三乙胺(0.242g, 2.396mmol);室温搅拌过夜, TLC检测反应完毕,用油泵拉掉DMF,然后过柱纯化,得到0.6g具有式(7)结构的白色的粘稠液体,本步骤的产率为38.7%。

[0076] 所得的白色的粘稠液体的核磁共振氢谱的数据如下:

[0077]  $^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.68 (3H, s), 0.89 (3H, s), 0.99 (3H, d, J 8.0), 1.09-1.13 (1H, m), 1.25-1.29 (2H, m), 1.35-1.45 (2H, m), 1.50-1.60 (6H, m), 1.62-1.76 (6H, m), 1.91-1.98 (4H, m), 2.14-2.26 (4H, m), 2.35 (3H, s), 2.67-2.72 (1H, m), 3.08 (1H, t, J 4.0), 3.42-3.48 (2H, m), 3.55-3.67 (20H, m), 3.84 (1H, s), 3.91-3.96 (2H, m), 6.78 (1H, s), 7.32 (1H, s)

[0078] 7.合成具有式(8)结构的化合物

[0079]



(8);

[0080] 将具有式(7)结构的化合物(0.6g, 0.76mmol)溶于5mL的甲醇和5mL的NaOH(1M)的水溶液中,置换氮气,在氮气保护下,室温搅拌过夜, TLC检测反应完毕,加5mL的乙酸乙酯萃取,水相再用二氯甲烷和异丙醇(v:v=3:1)的混合溶剂萃取两次,合并有机相,加无水硫酸钠干燥,过滤,滤液脱溶得到0.6g的粗品,过柱纯化得到0.3g具有式(8)结构的白色固体,本步骤的产率为46.6%。

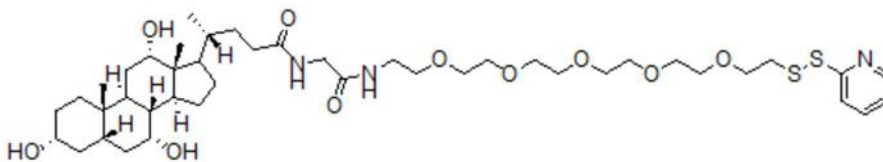
[0081] 所得的白色固体的核磁共振氢谱的数据如下:

[0082]  $^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.69 (3H, s), 0.89 (3H, s), 0.99 (3H, d, J 8.0), 1.09-2.32 (m), 2.69 (2H, m), 3.42-3.76 (18H, m), 3.84 (1H, s), 3.93-3.97 (3H, m), 6.75 (1H, s)

[0083] 实施例2

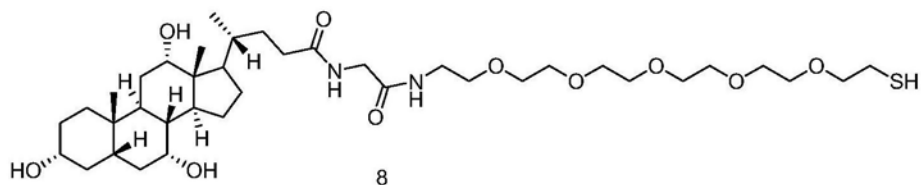
[0084] 制备具有式(9)结构的化合物

[0085]

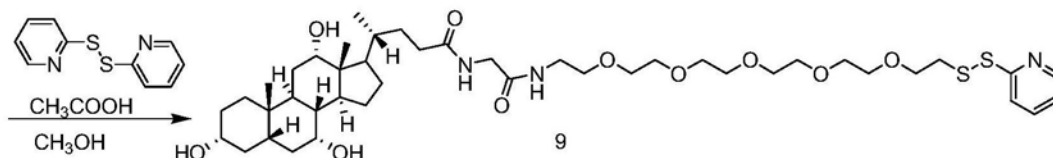


(9);

[0086] 其合成路径如下:



[0087]



[0088] 与实施例1合成具有式(8)结构的化合物的步骤相同,合成具有式(9)结构的化合物的步骤还包括:

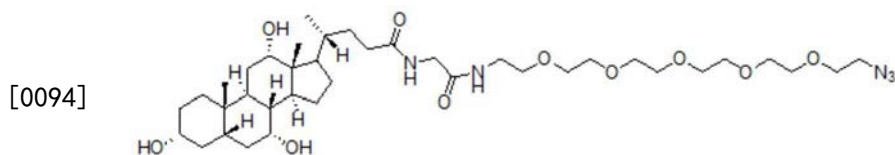
[0089] 取10mL的拇指烧瓶,氮气置换两次,依次加入具有式(8)结构的化合物(0.3g, 0.4mmol),双硫吡啶(0.17g,0.8mmol),甲醇溶液(8mL),滴加0.008g(约一滴)的乙酸,室温下搅拌过夜,TLC检测,反应完毕,旋掉甲醇,得到的粗产品过柱,最终拿到0.15g具有式(9)结构的白色固体,本步骤的产率为41.8%。

[0090] 所得的白色固体的核磁共振氢谱的数据如下:

[0091]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.69 (3H, s), 0.89 (3H, s), 0.99 (3H, d, J 8.0), 1.09–1.19 (1H, m), 1.20–1.28 (4H, m), 1.29–1.53 (10H, m), 1.75–2.32 (14H, m), 2.99 (1H, t, J 8.0), 3.42–3.49 (2H, m), 3.55–3.76 (20H, m), 3.84 (1H, s), 3.93–3.97 (2H, m), 6.63 (1H, s), 7.08 (1H, t, J 4.0), 7.65 (1H, t, J 8.0), 7.76 (1H, d, J 8.0), 8.45 (1H, d, J 4.0)

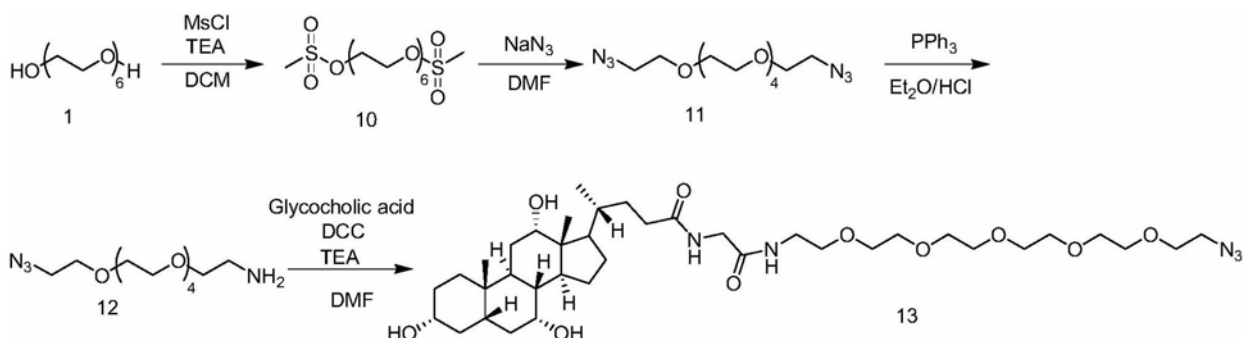
[0092] 实施例3

[0093] 制备具有式(13)结构的化合物

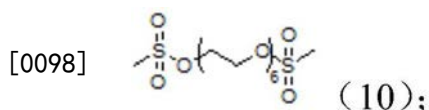


[0095] 其合成路径如下:

[0096]

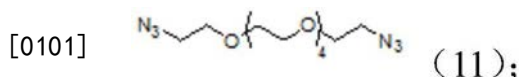


[0097] 1. 合成具有式(10)结构的化合物



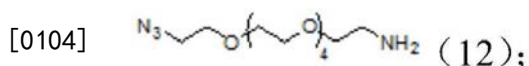
[0099] 将聚合度为6(六甘醇)的聚乙二醇(50g,0.177mol)溶于500mL二氯甲烷,加入对甲基磺酰氯(41.44g,0.363mol),置于冰水浴中至温度降至5℃以下,缓慢滴加三乙胺(44.77g,0.443mol)的二氯甲烷溶液,控制反应体系温度在5℃以下,滴毕,缓慢升至室温,室温搅拌3h,TCL检测,反映完毕,反应液一次用水(300mL×2),饱和食盐水(300mL)洗涤,有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,旋干,得72.3g具有式(10)结构的深黄色液体,本步骤的产率为93.1%。

[0100] 2.合成具有式(11)结构的化合物



[0102] 将具有式(10)结构的化合物(50g,0.114mol)溶于500mL的N,N-二甲基甲酰胺中,加入叠氮钠(18.55g,0.285mol),升温至80℃,反应过夜,TCL检测,反映完毕,反应液乙酸乙酯(500mL),用水(300mL×4)萃取,有机相用无水硫酸钠干燥,过滤旋干,然后进行过柱纯化,得到33.6g具有式(10)结构的淡黄色液体,本步骤的产率为88.65%。

[0103] 3.合成具有式(12)结构的化合物



[0105] 将具有式(11)结构的化合物(30g,0.09mol)溶于乙醚(150mL)与盐酸(1mol/L,150mL)中,加入三苯基膦(23.69g,0.09mol),升温至40℃,反应过夜,TCL检测反映完毕。旋干乙醚,过滤,滤液用乙酸乙酯(50mL×3)萃取,水相加入碳酸氢钠至pH为9~10,旋干水相,加入二氯甲烷(300mL),用少量无水硫酸钠干燥,过滤,旋干,得20.74g具有式(12)结构的淡黄色液体,本步骤的产率为75%。

[0106] 所得淡黄色液体的核磁共振氢谱数据如下:

[0107]  $^1\text{H}$  NMR(400MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ):2.92(2H,t,J 4.0),3.45(2H,t,J 4.0),3.61(2H,t,J4.0),3.67-3.71(18H,m)

[0108] 4.合成具有式(13)结构的化合物

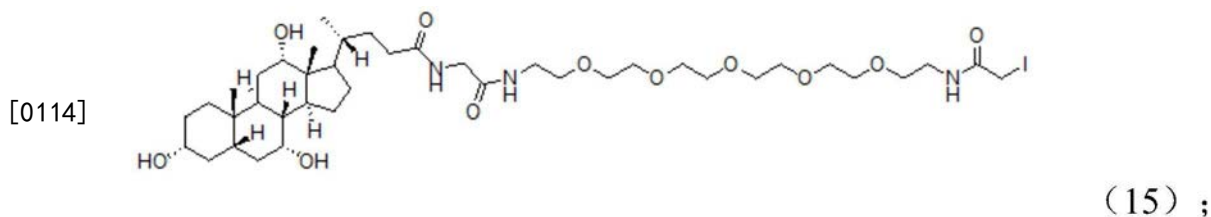
[0109] 将甘胆酸(1g,2.15mmol)溶于N,N-二甲基甲酰胺(10mL),加入N,N-二环己基碳二亚胺(0.444g,2.15mmol)常温搅拌10min,再加入具有式(12)结构的化合物(0.66g,2.15mmol)与三乙胺(3mL),常温反应过夜,TCL检测反应完毕,旋干N,N-二甲基甲酰胺,过柱纯化,得0.9g具有式(13)结构的淡黄色油状液体,本步骤的产率为55.56%。

[0110] 所得淡黄色油状液体的核磁共振氢谱数据如下:

[0111]  $^1\text{H}$  NMR(400MHz, $\text{CDCl}_3$ ):0.68(3H,s),0.90(3H,s),0.99(3H,d,J 8.0),1.11-1.18(1H,m),1.19-1.21(1H,d,J 8.0),1.23-1.29(4H,m),1.31-1.48(4H,m),1.49-1.54(4H,m),1.65-1.84(6H,m),1.86-2.03(4H,m),2.08-2.35(6H,m),3.38(2H,t,J 8.0),3.56(2H,t,J 4.0),3.61-3.76(14H,m),3.83-3.87(1H,m),3.92-3.98(2H,m),6.48(1H,s),7.04(1H,s)

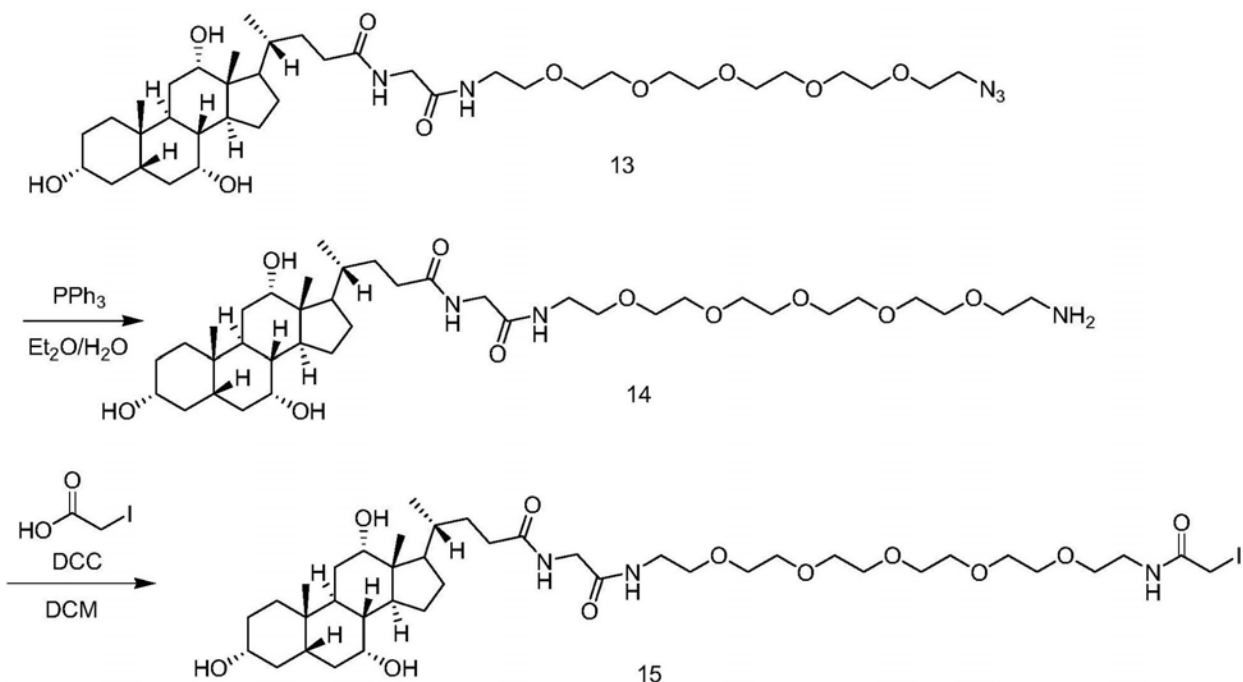
[0112] 实施例4

[0113] 制备具有式(15)结构的化合物



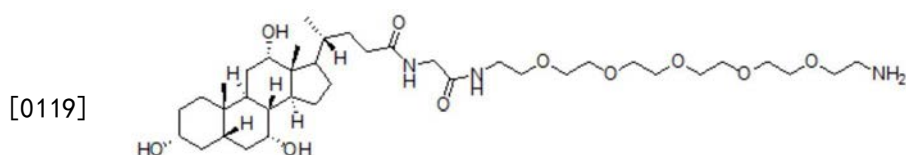
[0115] 其合成路径如下:

[0116]



[0117] 与实施例3合成具有式(13)结构的化合物的步骤相同,合成具有式(15)结构的化合物的合成步骤还包括:

[0118] 1. 合成具有式(14)结构的化合物



(14);

[0120] 将具有式(13)结构的化合物(0.9g, 1.2mmol)溶于10mL乙醚与10mL的水中,然后加入三苯基膦(0.313g, 1.2mmol),升温至40℃搅拌过夜,TCL检测反应完毕,旋干乙醚,过滤,滤液用乙酸乙酯:石油醚=1:3(5mL×3)洗涤,水相旋干,过柱纯化,得0.65g具有式(14)结构的淡黄色液体,本步骤的产率为74.8%。

[0121] 2. 合成具有式(15)结构的化合物

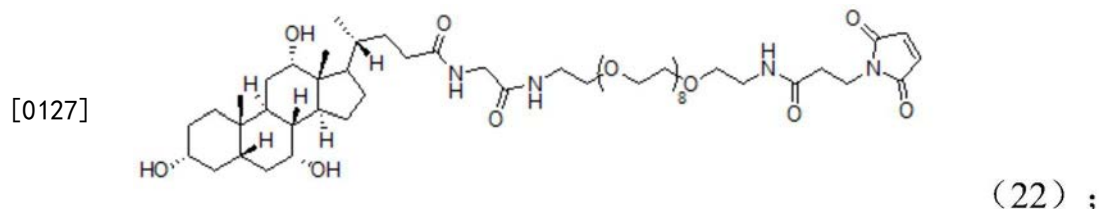
[0122] 将具有式(14)结构的化合物(0.65g, 0.89mmol)溶于10mL的二氯甲烷,加入碘乙酸(0.166g, 0.89mmol),全部溶解后加入N,N-二环己基碳二亚胺(0.184g, 0.89mmol),常温反应搅拌过夜,TCL检测反应完毕,将二氯甲烷旋干,过柱纯化,得0.301g具有式(15)结构的淡黄色胶状固体,本步骤的产率为37.63%。

[0123] 所得淡黄色胶状固体的核磁共振氢谱数据如下:

[0124]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.68 (3H, s), 0.89 (3H, s), 0.99 (3H, d, J 8.0), 1.02–1.08 (1H, m), 1.24–1.58 (12H, m), 1.61–1.67 (2H, m), 1.78–1.82 (2H, m), 1.84–1.96 (4H, m), 2.10–2.38 (6H, m), 3.42–3.48 (4H, m), 3.53–3.58 (4H, m), 3.59–3.70 (18H, m), 3.76 (2H, s), 3.81–3.86 (1H, m), 3.95–3.98 (2H, m), 6.68 (1H, s), 7.51 (1H, s), 7.64 (1H, s)

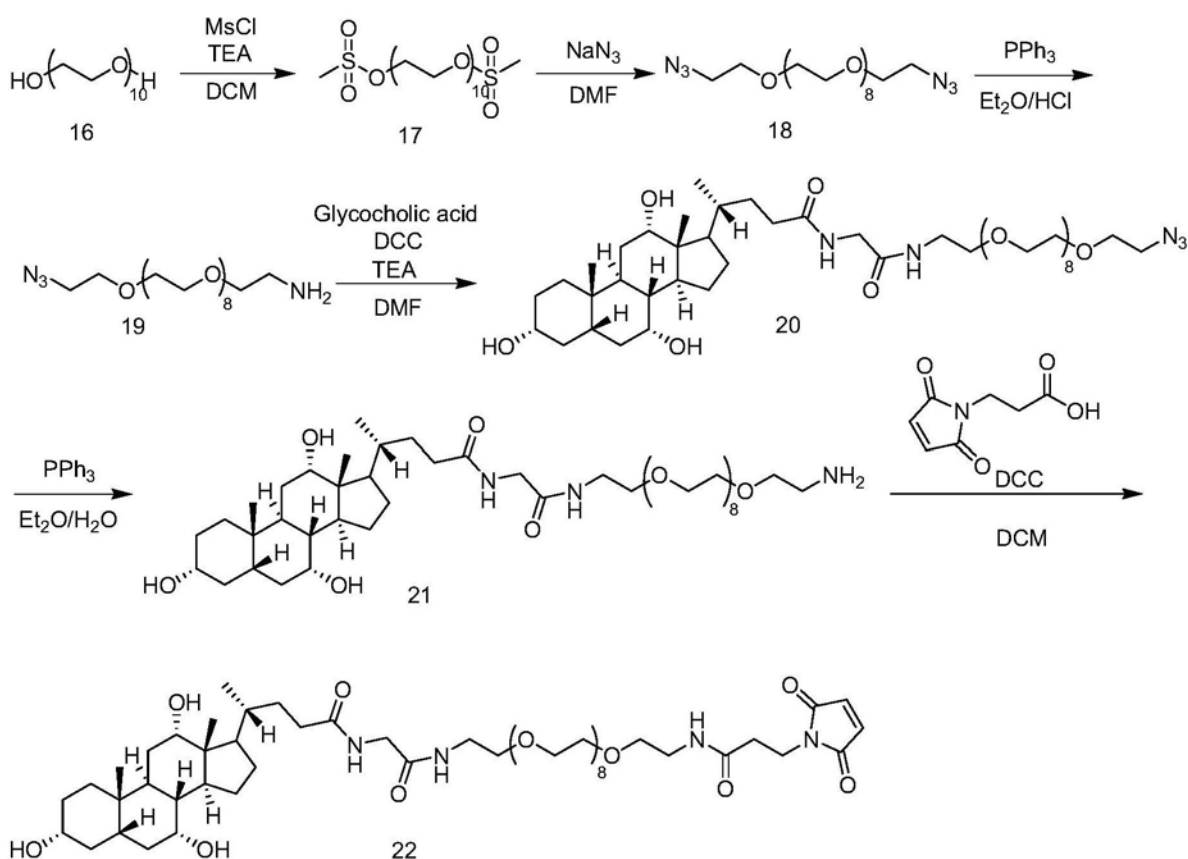
[0125] 实施例5

[0126] 制备具有式(22)结构的化合物

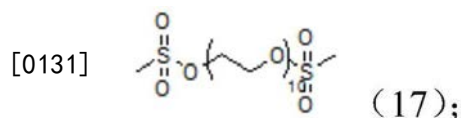


[0128] 其合成路径如下:

[0129]



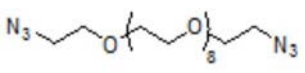
[0130] 1. 合成具有式(17)结构的化合物



[0132] 将十甘醇(18.2g, 0.0397mol)溶于100mL二氯甲烷,加入对甲基磺酰氯(9.3g, 0.081mol),置于冰水浴中至温度降至5℃以下,缓慢滴加三乙胺(10g, 0.1mol)的二氯甲烷溶液,控制反应体系温度在5℃以下,滴毕,缓慢升至室温,室温搅拌3h, TLC检测,反应完毕,反应液一次用水(50mL×2),饱和食盐水(50mL)洗涤,有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,旋

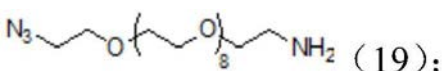
干,得23g具有式(17)结构的深黄色液体,本步骤的产率为94.3%;

[0133] 2.合成具有式(18)结构的化合物

[0134]  (18);

[0135] 将具有式(17)结构的化合物(23g,0.0375mol)溶于150mL的N,N-二甲基甲酰胺中,加入叠氮钠(6.1g,0.0936mol),升温至80℃,反应过夜,TCL检测反应完毕,反应液乙酸乙酯(150mL),用水(100mL×4)萃取,有机相用无水硫酸钠干燥,过滤旋干,然后进行过柱纯化,得到15g具有式(18)结构的淡黄色液体,本步骤的产率为78.8%。

[0136] 3.合成具有式(19)结构的化合物

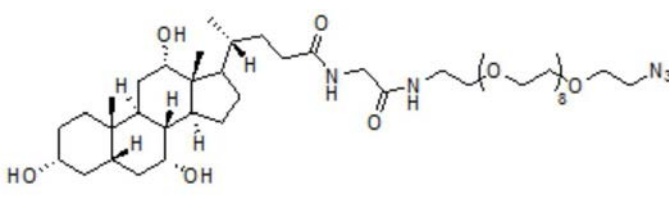
[0137]  (19);

[0138] 将具有式(18)结构的化合物(15g,0.0295mol)溶于乙醚(100mL)与盐酸(1mol/L,100mL)中,加入三苯基膦(7.74g,0.0295mol),升温至40℃,反应过夜,TCL检测反应完毕,旋干乙醚,过滤,滤液用乙酸乙酯(30ml×3)萃取,水相加入碳酸氢钠至pH为9~10,旋干水相,加入二氯甲烷(100mL),用少量无水硫酸钠干燥,过滤,旋干,得8g具有式(19)结构的淡黄色液体,本步骤的产率为56.2%。

[0139] 所得的淡黄色液体的核磁共振氢谱数据如下:

[0140]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2.98 (2H, t, J 4.0), 3.37 (2H, t, J 4.0), 3.62-3.71 (36H, m)

[0141] 4.合成具有式(20)结构的化合物

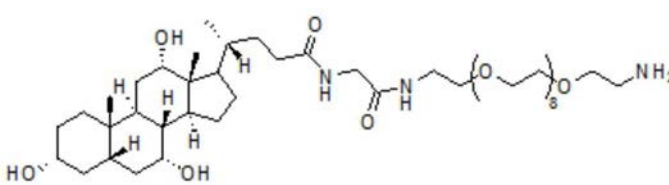
[0142]  (20);

[0143] 将甘胆酸(1g,2.15mmol)溶于N,N-二甲基甲酰胺(15mL),加入N,N-二环己基碳二亚胺(0.444g,2.15mmol)常温搅拌10min,再加入具有式(19)结构的化合物(1.04g,2.15mmol)与三乙胺(3mL),常温反应过夜.TCL检测反应完毕,旋干N,N-二甲基甲酰胺,过柱纯化.得1.1g具有式(20)结构的淡黄色油状液体,本步骤的产率为55%。

[0144] 所得的淡黄色油状液体的核磁共振氢谱的数据如下:

[0145]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.68 (3H, s), 0.90 (3H, s), 0.99 (3H, d, J 8.0), 1.09-1.13 (1H, m), 1.26-1.29 (2H, m), 1.36-1.46 (4H, m), 1.51-2.31 (22H, m), 3.07 (1H, dd, J 8.0, 4.0), 3.31-3.78 (36H, m), 3.83 (1H, s), 3.94-3.96 (2H, m), 6.72 (1H, s), 7.30 (1H, s)

[0146] 5.合成具有式(21)结构的化合物

[0147]  (21);

[0148] 将具有式(20)结构的化合物(1.1g, 1.18mmol)溶于10mL乙醚与10mL的水中,然后加入三苯基膦(0.31g, 1.18mmol),升温至40℃搅拌过夜,TCL检测反应完毕,旋干乙醚,过滤,滤液用乙酸乙酯:石油醚=1:3(5mL×3)洗涤,水相旋干,过柱纯化,得0.61g具有式(21)结构的淡黄色液体,本步骤的产率为57%。

[0149] 6.合成具有式(22)结构的化合物

[0150] 将具有式(21)结构的化合物(0.2g, 0.221mmol)溶于3mL的二氯甲烷,加入3-马来酰亚胺基丙酸(0.0374g, 0.221mmol),全部溶解后加入N,N-二环己基碳二亚胺(0.0456g, 0.221mmol),常温反应搅拌过夜,TCL检测未反应完,再加入1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(0.127g, 0.663mmol)与N,N-二环己基碳二亚胺(0.075g, 0.422mmol),TCL检测反应完毕,旋干二氯甲烷,过柱纯化,得50mg具有式(22)结构的无色油状液体,本步骤的产率为31.4%。

[0151] 所得无色油状液体的核磁共振氢谱数据如下:

[0152]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.69 (3H, s), 0.89 (3H, s), 0.99 (3H, d, J 8.0), 1.11-1.17 (2H, m), 1.21-1.34 (8H, m), 1.85-2.02 (8H, m), 2.10-2.36 (8H, m), 2.60 (2H, t, J 8.0), 2.67 (2H, t, J 8.0), 3.41-3.66 (40H, m), 3.83 (4H, t, J 8.0), 3.91-3.97 (4H, m), 7.40 (1H, s), 7.61 (1H, s), 7.77 (1H, s)

[0153] 实施例6

[0154] 一种甘胆酸特异性抗体,由实施例4制备的化合物免疫宿主动物后分离纯化得到,其具体步骤如下:

[0155] 实施例4制备的化合物与蛋白质交联生成免疫原,即将具有式(15)所示结构的化合物(10mg)与巯基修饰过的KLH、BSA、OVA各10mg在1mL pH值为8.0的磷酸缓冲溶液中交联,室温反应2h后,取反应液在PBS中透析,完毕后收集抗原溶液为免疫原。将免疫原与佐剂混合后免疫新西兰大白兔或波尔羊,经过3~4次免疫,达到理想的抗体滴度后,采血分离血清,应用抗原亲和层析法纯化抗体,此为甘胆酸特异性多克隆抗体。

[0156] 实施例7

[0157] 一种甘胆酸特异性抗体,由实施例4制备的化合物免疫小鼠后应用杂交瘤技术制备而成,其具体步骤如下:

[0158] 实施例4制备的化合物与蛋白质交联生成免疫原,即将具有式(15)结构的化合物(10mg)与巯基修饰过的KLH、BSA、OVA各10mg在1mL pH值为8.0的磷酸缓冲溶液中交联,室温反应2h后,取反应液在PBS中透析,完毕后收集抗原溶液为免疫原。将免疫原与佐剂混合后免疫Ba1b/C小鼠,经过3~4次免疫,达到理想的抗体滴度后,无菌分离小鼠脾细胞和淋巴结细胞,在聚乙二醇(PEG)存在的条件下与小鼠骨髓瘤细胞sp2/0融合,经过克隆化培养和筛选,得到能产生甘胆酸特异性抗体的杂交瘤细胞株。通过小鼠腹腔注射法,应用SPA亲和层析法从小鼠腹水中纯化甘胆酸特异性抗体。

[0159] 实施例8

[0160] 一种基于竞争ELISA的甘胆酸检测方法,检测试剂中含有已知数量的辣根过氧化物酶(HRP)标记的实施例4合成的用于测定血清甘胆酸的化合物(甘胆酸衍生物),将待测标本与试剂加入包被有实施例6制备的甘胆酸特异性抗体的反应孔中,待测标本中的甘胆酸与试剂中的酶标记甘胆酸竞争与包被抗体的结合,洗涤后加入HRP作用底物,显色并终止反

应后测定反应孔的吸光度。标本中的甘胆酸浓度越高,与包被抗体结合的HRP标记甘胆酸衍生物就越少,测得吸光度越低,即检测得到的吸光度与标本中的待测甘胆酸浓度负相关。因此,根据待测标本和校准品所产生的吸光度就可计算待测标本中甘胆酸的浓度。

#### [0161] 实施例9

[0162] 一种基于竞争ELISA的甘胆酸检测方法,检测试剂中含有已知数量的辣根过氧化物酶(HRP)标记的实施例4合成的用于测定血清甘胆酸的化合物(甘胆酸衍生物),将待测标本与试剂加入包被有实施例7制备的甘胆酸特异性抗体的反应孔中,待测标本中的甘胆酸与试剂中的酶标记甘胆酸竞争与包被抗体的结合,洗涤后加入HRP作用底物,显色并终止反应后测定反应孔的吸光度。标本中的甘胆酸浓度越高,与包被抗体结合的HRP标记甘胆酸衍生物就越少,测得吸光度越低,即检测得到的吸光度与标本中的待测甘胆酸浓度负相关。因此,根据待测标本和校准品所产生的吸光度就可计算待测标本中甘胆酸的浓度。

#### [0163] 实施例10

[0164] 一种基于均相酶免疫分析的甘胆酸检测方法,反应体系中包含与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶偶联的实施例4合成的用于测定血清甘胆酸的化合物(甘胆酸衍生物)和实施例7制备的甘胆酸特异性抗体。反应时,待测标本中的游离甘胆酸与试剂中葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-甘胆酸偶联物竞争与甘胆酸特异性抗体的结合。标本中的甘胆酸与抗体结合后,该抗体就会从葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-甘胆酸偶联物中释放,从而葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性得到恢复。待测标本中的甘胆酸越多,结合的抗体越多,释放出的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性越高,即反应体系中的酶活性与标本中待测甘胆酸的浓度正相关。因此,在检测体系中,分别测定待测标本和校准品反应后的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性,就可计算待测标本中甘胆酸的浓度。

#### [0165] 实施例11

[0166] 一种基于免疫比浊分析的甘胆酸检测方法,反应体系中包含实施例7制备的甘胆酸特异性抗体。将检测试剂与待测样本混合,试剂中的抗体和标本中的抗原结合,形成抗原抗体复合物,该复合物会形成浊度。在一定的浓度比例条件下,该浊度与标本中的待测物浓度成正比。因此,检测时,应用生化分析仪、分光光度计等比色设备分别测定待测标本和已知浓度校准品的浊度,即可计算待测标本中甘胆酸的浓度。

#### [0167] 实施例12

[0168] 一种基于免疫层析的甘胆酸检测方法,在免疫层析的试纸条(卡)上,从样品端开始,依次放置胶体金标记的实施例6制备的甘胆酸特异性抗体、实施例4合成的用于测定血清甘胆酸的化合物(甘胆酸衍生物)和山羊抗小鼠IgG。反应时,将标本加在试纸条上,标本中液体会携带胶体金标记的甘胆酸特异性抗体移动,如果标本中含有一定数量的甘胆酸,该甘胆酸就会和胶体金标记的甘胆酸特异性抗体结合,后者就不会再与试纸条(卡)上固定的甘胆酸衍生物结合,不会形成红色的反应条带。相反,如果标本中没有甘胆酸或者甘胆酸的浓度很低,那么较多的游离的胶体金标记的甘胆酸特异性抗体就会与试纸条(卡)上固定的甘胆酸衍生物结合形成红色的反应条带。因此根据反应后是否有红色条带出现和红色条带的强度即可对待测标本中甘胆酸进行定性或者半定量分析。

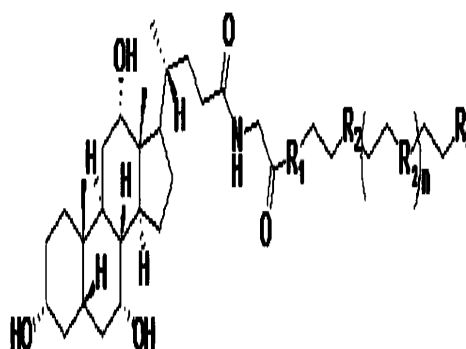
[0169] 显然,本发明的上述实施例仅仅是为清楚地说明本发明所作的举例,而并非是对本发明的实施方式的限定,对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可

以做出其它不同形式的变化或变动,这里无法对所有的实施方式予以穷举,凡是属于本发明的技术方案所引伸出的显而易见的变化或变动仍处于本发明的保护范围之列。

专利名称(译)	用于测定血清甘胆酸的化合物及制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN106749477B</a>	公开(公告)日	2019-04-05
申请号	CN201611117364.3	申请日	2016-12-07
[标]申请(专利权)人(译)	武汉博仁凯润药业有限公司		
申请(专利权)人(译)	武汉博仁凯润药业有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	武汉博仁凯润药业有限公司		
[标]发明人	杨锋 李波 刘天成 胡川闽 陈安		
发明人	杨锋 李波 刘天成 胡川闽 陈安		
IPC分类号	C07J41/00 C07K16/44 G01N33/535 G01N33/539 G01N33/532 G01N33/543		
CPC分类号	C07J41/0066 C07K16/44 G01N33/532 G01N33/535 G01N33/539 G01N33/543		
代理人(译)	毕翔宇		
审查员(译)	蒋薇薇		
其他公开文献	CN106749477A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开一种测定血清甘胆酸的化合物，该化合物具有如式(A)所示的结构：式(A)中，n为0或正整数；R1选自NH，O，S；R2选自O，NH，CH2；R3选自亲水性基团、生物素或免疫类蛋白质载体。该化合物有利于减少甘胆酸与蛋白质交联时的位阻效应，同时增加交联后的蛋白抗原的水溶性，便于刺激免疫。用此修饰后的甘胆酸化合物作为免疫原制备的抗体，能特异性识别和结合甘胆酸。应用修饰后的甘胆酸和抗体，可以建立免疫比浊、竞争酶联免疫吸附分析、胶体金免疫层析等免疫检测方法，实现对标本中甘胆酸的浓度水平的准确测定。



(A),