



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107021952 A

(43)申请公布日 2017.08.08

(21)申请号 201710306622.0

(22)申请日 2017.05.04

(71)申请人 深圳市新产业生物医学工程股份有限公司

地址 518052 广东省深圳市坪山新区金沙社区金辉路16号

(72)发明人 饶微 杜凯 刘蕾 雷斗剑

(51)Int.Cl.

C07D 403/14(2006.01)

C07D 405/14(2006.01)

C09K 11/06(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书5页 说明书24页

(54)发明名称

一种异鲁米诺衍生物及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种发光强度高的增强型异鲁米诺衍生物及其制备方法,用于增强现有鲁米诺-过氧化物体系的发光强度,提高测试灵敏度与检出限;同时,降低发光标记物对抗体或抗原的标记量,减少过量标记对抗体或抗原活性的影响。本发明还公开了包含上述异鲁米诺衍生物的化学发光底液,或包含上述异鲁米诺衍生物标记的抗原或抗体的化学发光试剂盒以及化学发光免疫分析系统,已解决采用现有鲁米诺-过氧化物体系测试时灵敏度和检出限差的技术问题。本发明还提供了上述异鲁米诺衍生物在化学发光免疫定量分析中的应用。

$-\text{N}(\text{H})\text{C}(=\text{O})-\text{CH}(\text{R}^1\text{R}^2)$ 或
 $-\text{N}(\text{H})\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{R}^1\text{R}^2)$ 或
 $-\text{N}(\text{H})\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{R}^1\text{R}^2)$ 或
 $-\text{N}(\text{H})\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}(\text{R}^1\text{R}^2)$ 或
 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})-\text{CH}(\text{R}^1\text{R}^2)$ 或
 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{R}^1\text{R}^2)$ 或
 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{R}^1\text{R}^2)$ 或
 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}(\text{R}^1\text{R}^2)$ 或
 $-\text{N}(\text{H})\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}(\text{R}^1\text{R}^2)$ 或
 $-\text{N}(\text{H})\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}(\text{R}^1\text{R}^2)$ 或
 $-\text{N}(\text{H})\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{NH}-\text{CH}(\text{R}^1\text{R}^2)$ 或
 $-\text{N}(\text{H})\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{R}^1\text{R}^2)$ 或
 $-\text{N}(\text{H})\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}^1\text{R}^2)$ 或
 $-\text{N}(\text{H})\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}^1\text{R}^2)$ 或
 $-\text{N}(\text{H})\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}^1\text{R}^2)$ 或
 $-\text{N}(\text{H})\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}^1\text{R}^2)$ 或
 $-\text{N}(\text{H})\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{R}^1\text{R}^2)$ 或
 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}^1\text{R}^2)$ 或
 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}^1\text{R}^2)$ 或
 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}^1\text{R}^2)$ 或
 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}^1\text{R}^2)$ 或
 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{R}^1\text{R}^2)$;

其中, R^1 、 R^2 基团相互独立,且分别表示通式(I)中的 $-(\text{CH}_2)_c-$ 和 $-(\text{CH}_2)_d-$ 的结构。

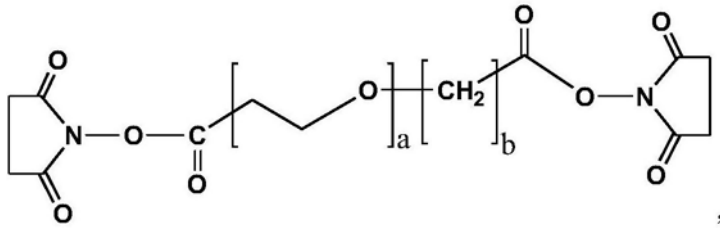
6. 根据权利要求5所述的异鲁米诺衍生物,其特征在于,所述烷基为与 R^1 、 R^2 基团连接的原子为N且碳原子数为1~2的直链烷基。

7. 一种如权利要求1-6中任一项所述的异鲁米诺衍生物的制备方法,包括下述步骤:

- 1) 合成N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺环内酯;
- 2) 所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺环内酯与小分子物质I反应,获得第一中间产物;
- 3) 所述第一中间产物、N-羟基琥珀酰亚胺、交联剂反应,后添加化合物I继续反应,获得第二中间产物;
- 4) 所述第二中间产物、N-羟基琥珀酰亚胺、交联剂反应,获得异鲁米诺衍生物;

其中,所述小分子物质I为至少含有两个氨基且C原子数为2~10的脂肪酸,所述脂肪酸的碳链可插入0~2个N原子;

所述化合物I为 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_a-(\text{CH}_2)_b-\text{NH}_2$,或



其中, a选自4~24的整数, b选自0~20的整数, 且 $a+b \leq 24$ 。

8. 根据权利要求7所述的方法, 其特征在于,

所述小分子物质I为含有两个氨基且C原子数为3~10的脂肪酸, 所述脂肪酸的碳链可插入0~1个N原子;

和/或

所述化合物I中, a选自4~12的整数, b选自0~12的整数;

和/或

所述步骤1)~4)中, 反应均在液相中进行, 所述液相使用的溶剂为非质子溶剂, 进一步优选为非质子极性溶剂;

和/或

所述步骤1)具体为: N-(4-氨基)-N-乙基异鲁米诺与酸酐反应, 后加入交联剂继续反应, 获得所述N-(4-氨基)-N-乙基异鲁米诺环内酯。

9. 根据权利要求8所述的方法, 其特征在于, 所述

所述小分子物质I的同一个碳原子上连接的两个活性基团不相同; 优选地, 所述小分子物质I任选自3-(N,N-二胺乙基氨基)丙酸、2,4-二氨基戊酸、4-氨基-3-氨基丁酸、2-(N,N-二胺乙基氨基)乙酸、3,5-二氨基戊酸、3-(N,N-二胺丙基氨基)丙酸、2-(N,N-二胺丙基氨基)乙酸;

和/或

所述步骤1)~3)中, 交联剂为碳化二亚胺类交联剂, 优选为二环己基碳二亚胺、N,N'-二异丙基碳二亚胺、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、N-环己基-N'-(2-吗啉乙基)碳二亚胺对甲苯磺酸盐中的任一种或两种以上混合物;

和/或

所述酸酐为丁二酸酐、戊二酸酐、己二酸酐、庚二酸酐、辛二酸酐、二甘醇酸酐中的任一种;

和/或

所述溶剂为二甲基甲酰胺、N-甲基-2-吡咯烷酮, N,N-二甲基乙酰胺、二甲基亚砷、六甲基磷酰胺、乙酸乙酯、四氢呋喃、乙腈、吡啶、丙酮中的任一种或两种以上混合物;

和/或

所述步骤1)~4)中, 反应中均通入保护性气体, 且都在避光条件下进行;

和/或

所述步骤1)~4)中, 在反应后和获得相应产物前, 都还包括后处理步骤, 所述后处理至少包括萃取、洗涤、干燥、分离步骤中的任一种;

和/或

所述步骤4)还包括将获得的所述异鲁米诺衍生物在-4~-40℃下进行保存的步骤; 优

选地,所述异鲁米诺衍生物在-4~-20℃下进行保存。

10. 一种如权利要求1-6中任一项所述的异鲁米诺衍生物的制备方法,包括下述步骤:

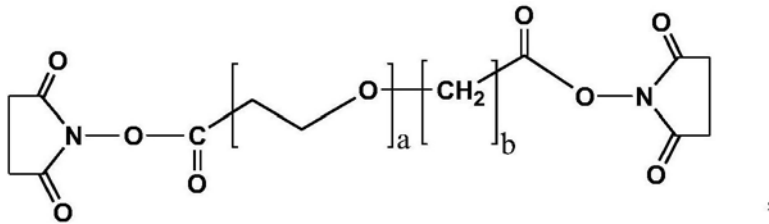
(a) N-(4-氨基)-N-乙基异鲁米诺、小分子物质II、交联剂反应,获得第三中间产物;

(b) 溶解所述第三中间产物,并加入缚酸剂反应,获得第四中间产物;

(c) 将所述第四中间产物与化合物I反应,获得异鲁米诺衍生物;

其中,所述小分子物质II含有至少两个不与同一原子相连的羧基和至少一个连接有氨基保护基团的亚氨基;

所述化合物I为 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_a-(\text{CH}_2)_b-\text{NH}_2$,或



其中,a选自4~24的整数,b选自0~20的整数,且 $a+b \leq 24$ 。

11. 根据权利要求10所述的方法,其特征在于,

所述小分子物质II中可插入0~1个N原子,且所述N原子与亚氨基中的N不相同;优选地,所述小分子物质II选自3-叔丁氧羰基氨基戊二酸、3-叔丁氧羰基氨基庚二酸、3-苄氧羰基氨基戊二酸、3-苄氧羰基氨基庚二酸、3-苄氧羰基氨基戊二酸、3-苄氧羰基氨基庚二酸、N-叔丁氧羰基氨基丙基-N-羧甲基氨基乙酸、N-叔丁氧羰基乙基-N-羧甲基氨基乙酸、N-叔丁氧羰基氨基丙基-N-羧乙基氨基丙酸、N-叔丁氧羰基乙基-N-羧乙基氨基丙酸、N-苄氧羰基氨基丙基-N-羧甲基氨基乙酸、N-苄氧羰基乙基-N-羧甲基氨基乙酸、N-苄氧羰基氨基丙基-N-羧乙基氨基丙酸、N-苄氧羰基乙基-N-羧乙基氨基丙酸、N-苄氧羰基氨基丙基-N-羧甲基氨基乙酸、N-苄氧羰基乙基-N-羧甲基氨基乙酸、N-苄氧羰基氨基丙基-N-羧乙基氨基丙酸、N-苄氧羰基乙基-N-羧乙基氨基丙酸中的任一种;

和/或

所述氨基保护基团任选自甲氧羰基、乙氧羰基、叔丁氧羰基、苄氧羰基、苄氧羰基、邻苯二甲酰基、2,4-二甲氧基苄基、对甲氧基苄基、烯丙氧羰基;

和/或

所述化合物I中,a选自4~12的整数,b选自0~12的整数;

和/或

所述缚酸剂为有机弱碱,优选为三乙胺、三丁胺、吡啶、二甲基氨基吡啶中的任一种;

和/或

所述步骤(a)~(c)中,反应均在液相中进行,所述液相使用的溶剂为非质子溶剂;优选为非质子极性溶剂;进一步优选为二甲基甲酰胺、N-甲基-2-吡咯烷酮,N,N-二甲基乙酰胺、二甲基亚砷、六甲基磷酰胺、乙酸乙酯、四氢呋喃、乙腈、吡啶、丙酮中的任一种或两种以上混合物;

和/或

所述交联剂为碳化二亚胺类交联剂,优选为二环己基碳二亚胺、N,N'-二异丙基碳二亚胺、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、N-环己基-N'-(2-吗啉乙基)碳二亚胺对

甲苯磺酸盐中的任一种或两种以上混合物；

和/或

所述步骤(a)~(c)中,反应中均通入保护性气体,且都在避光条件下进行；

和/或

所述步骤(a)~(c)中,在反应后和获得相应产物前,都还包括后处理步骤,所述后处理至少包括干燥、分离、离心、重溶、洗涤步骤中的任一种；

和/或

所述步骤4)还包括将获得的所述异鲁米诺衍生物在-4~-40℃下进行保存的步骤；优选地,所述异鲁米诺衍生物在-4~-20℃下进行保存。

12.一种化学发光底液,其包含权利要求1-6中任一项所述的异鲁米诺衍生物,或者权利要求7-9中任一项所述的异鲁米诺衍生物的制备方法得到的异鲁米诺衍生物,或者权利要求10-11中任一项所述的异鲁米诺衍生物的制备方法制备得到的异鲁米诺衍生物；优选地,所述化学发光底液还包括发光增强剂。

13.一种免疫诊断试剂,其包含权利要求1-6中任一项所述的异鲁米诺衍生物,或者权利要求7-9中任一项所述的异鲁米诺衍生物的制备方法制备得到的异鲁米诺衍生物,或者权利要求10-11中任一项所述的异鲁米诺衍生物的制备方法制备得到的异鲁米诺衍生物；

优选地,所述免疫诊断试剂还包含检测抗原或检测抗体,所述检测抗原或检测抗体用所述异鲁米诺衍生物标记。

14.一种化学发光试剂盒,其包含权利要求13所述的免疫诊断试剂,且进一步包含固体支持物；

优选地,所述固体支持物是微粒；

进一步优选地,所述微粒为纳米磁性微球,其粒径大小为0.1-5 μm ；

进一步优选地,所述微粒与捕获抗原或捕获抗体连接。

15.一种化学发光免疫分析系统,其特征在于,包含根据权利要求14所述的化学发光试剂盒和半自动或全自动免疫分析仪。

16.一种根据权利要求1-6中任一项所述的异鲁米诺衍生物,或者根据权利要求7-9中任一项所述的异鲁米诺衍生物的制备方法制备得到的异鲁米诺衍生物,或者根据权利要求10-11中任一项所述的异鲁米诺衍生物的制备方法制备得到的异鲁米诺衍生物,或者根据权利要求13所述的免疫诊断试剂,或者根据权利要求14所述的化学发光试剂盒,或者根据权利要求15所述的化学发光免疫分析系统在化学发光免疫定量分析中的应用,其特征在于,所述异鲁米诺衍生物用于对人血清中各种激素、肿瘤标志物、传染病、心血管及心肌标志物中的至少一种进行化学发光免疫定量测定。

一种异鲁米诺衍生物及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物免疫学检测领域,具体涉及一种异鲁米诺衍生物及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 鲁米诺(Luminol)、异鲁米诺(Isoluminol)及其衍生物是最早在化学发光法中使用的化学发光物质。鲁米诺化学名3-氨基邻苯二甲酰肼,最早由Albrecht报道其发光特性。这类物质通过氧化产生 α -羟基过氧化物的中间体,该中间体的分解可释放出光能,所发光的性质与反应系统的pH值有关。鲁米诺类化合物的氧化步骤与溶剂组分有关,在非质子溶剂中,化学发光只需要氧气和一种强碱;在质子溶剂中,需要酶来催化各种氧的衍生物氧化鲁米诺。鲁米诺体系的发光效率并不高,标记后发光强度会降低,而通过对非杂环进行化学修饰可以提高部分发光强度。

[0003] 上世纪三十年代中后期,Gleu发现了可以大大增强酶催化鲁米诺化学发光体系发光强度的物质,即增强剂-羟高铁血红素(haematin),其可以明显增强发光强度,延长发光时间,提高信噪比及灵敏度。与不含增强剂的体系相比,加入增强剂后组成的鲁米诺体系的发光强度可提高1000倍,发光时间延长至几个小时,使原来的瞬时发光变为了持续发光,1978年,Schroeder报道了ABEI及其类似物的合成方法,并指出在 H_2O_2 -haematin底物系统中,N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺(以下简称为ABEI)几乎与鲁米诺具有相当的发光效率和检测灵敏度,并建立了甲状腺素(T4)的化学发光免疫分析法,鉴于此,ABEI作为一种化学发光标记物,被广泛应用于临床诊断中。

[0004] 目前ABEI的主要标记方法有EDC法、半琥珀酰胺活泼酯法、环内酯法,但这些方法均存在发光强度不够、背景值偏高,灵敏度有待改善等缺陷,同时,过多的标记又会对抗体或蛋白活性产生影响,限制了其在化学发光免疫分析的应用。因此为适应科学研究及市场的实际需求,有必要提供一种增强型异鲁米诺衍生物,以提供更高检测的灵敏度,且减少对蛋白活性产生的影响。

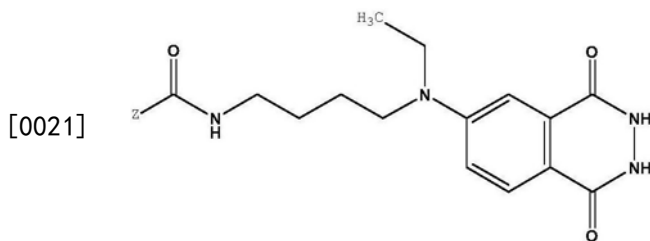
发明内容

[0005] 针对以上缺陷,本发明的目的在于提供一种发光强度高的增强型异鲁米诺衍生物及其制备方法,用于增强现有鲁米诺-过氧化物体系的发光强度,提高测试灵敏度与检出限;同时,降低发光标记物对抗体或抗原的标记量,减少过量标记对抗体或抗原活性的影响。

[0006] 本发明的另一目的在于提供一种包含上述异鲁米诺衍生物的化学发光底液,或包含上述异鲁米诺衍生物标记的抗原或抗体的化学发光试剂盒以及化学发光免疫分析系统,已解决采用现有鲁米诺-过氧化物体系测试时灵敏度和检出限差的技术问题。

[0007] 本发明的再一目的在于上述异鲁米诺衍生物在化学发光免疫定量分析中的应用。

[0008] 根据本发明,提供了一种异鲁米诺衍生物,其通式(I)为下式所示:



[0022] ,其中Z表示通式(I)中除去A的基团。

[0023] 优选地,X可任选自以下结构:

[0024] (B1): $-N(H)C(=O)-$ 烷基-,且烷基中插入至多一个亚氨基,其中,烷基的碳原子数为1~6;或

[0025] (B2): $-N(H)C(=O)-$ 烷基次氨基-,且烷基的碳原子数为1~6;或

[0026] (B3): $-C(=O)N(H)-$ 烷基-,且烷基的碳原子数为1~6;或

[0027] (B4): $-C(=O)N(H)-$ 烷基次氨基-,且烷基的碳原子数为1~6。

[0028] 进一步优选地,当X的结构为上述B1或B2时, $m=n=1$;

[0029] 进一步优选地,当X的结构为上述B3或B4时, $m=n=0$ 。

[0030] 在上述异鲁米诺衍生物中,通过控制插入的间隔臂,即通过多个亚甲基和/或1,3-亚乙氧基形成的长链,尤其是通过1,3-亚乙氧基形成的长链保证该异鲁米诺衍生物标记抗原或抗体后保持其在溶液中的稳定,进一步保证发光反应的稳定性,本发明a优选为4~12的整数;b优选为0~12的整数;同样,将s、t进一步优选为3~6的整数,c、d进一步优选自0~3的整数。

[0031] 上述通式(I)中,X结构式的烷基的碳原子数优选为1~3,进一步优选为下述结构:

[0032] $-N(H)C(=O)-CH(R^1R^2)$ 或

[0033] $-N(H)C(=O)-CH_2-CH(R^1R^2)$ 或

[0034] $-N(H)C(=O)-CH_2-CH_2-CH(R^1R^2)$ 或

[0035] $-N(H)C(=O)-CH_2-CH(CH_3)-CH(R^1R^2)$ 或

[0036] $-C(=O)N(H)-CH(R^1R^2)$ 或

[0037] $-C(=O)N(H)-CH_2-CH(R^1R^2)$ 或

[0038] $-C(=O)N(H)-CH_2-CH_2-CH(R^1R^2)$ 或

[0039] $-C(=O)N(H)-CH_2-CH(CH_3)-CH(R^1R^2)$ 或

[0040] $-N(H)C(=O)-CH_2-NH-CH(R^1R^2)$ 或

[0041] $-N(H)C(=O)-CH_2-CH_2-NH-CH(R^1R^2)$ 或

[0042] $-N(H)C(=O)-CH_2-CH(CH_3)-NH-CH(R^1R^2)$ 或

[0043] $-N(H)C(=O)-CH_2-NH-CH_2-CH(R^1R^2)$ 或

[0044] $-N(H)C(=O)-CH_2-N(R^1R^2)$ 或

[0045] $-N(H)C(=O)-CH_2-CH_2-N(R^1R^2)$ 或

[0046] $-N(H)C(=O)-CH_2-CH_2-CH_2-N(R^1R^2)$ 或

[0047] $-N(H)C(=O)-CH_2-CH_2-N(R^1R^2)$ 或

[0048] $-N(H)C(=O)-CH_2-CH(CH_3)-N(R^1R^2)$ 或

[0049] $-C(=O)N(H)-CH_2-N(R^1R^2)$ 或

[0050] $-C(=O)N(H)-CH_2-CH_2-N(R^1R^2)$ 或

[0051] $-C(=O)N(H)-CH_2-CH_2-CH_2-N(R^1R^2)$ 或

[0052] $-C(=O)N(H)-CH_2-CH_2-N(R^1R^2)$ 或

[0053] $-C(=O)N(H)-CH_2-CH(CH_3)-N(R^1R^2)$

[0054] 上述 R^1 、 R^2 基团相互独立,且分别表示通式(I)中的 $-(CH_2)_c-$ 和 $-(CH_2)_d-$ 的结构。

[0055] 特别优选地,为保证本发明的异鲁米诺衍生物易于参加后续发光反应,烷基为碳原子数优选为1~2的直链烷基,尤其优选为与 R^1 、 R^2 基团连接的原子为N且碳原子数为1~2的直链烷基。

[0056] 本发明的异鲁米诺衍生物通过插入有限长度的间隔臂,且通过优化基团和成倍添加发光单元,不仅降低现有ABEI发光标记物对抗体或抗原的标记量,减少过量标记对抗体或抗原活性的影响,提高抗原和抗体的结合率;且保证异鲁米诺衍生物标记抗原或抗体后的稳定性,更显著增强现有鲁米诺-过氧化物体系的发光强度,提高测试灵敏度与检出限。

[0057] 本发明还提供一种制备上述异鲁米诺衍生物的方法,包括下述步骤:

[0058] 1) 合成N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺环内酯;

[0059] 2) 将所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺环内酯与小分子物质I反应,获得第一中间产物;

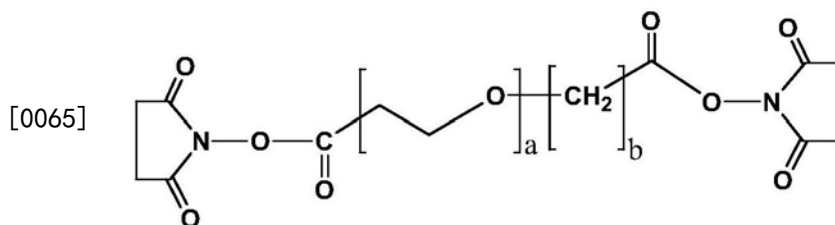
[0060] 3) 将所述第一中间产物、N-羟基琥珀酰亚胺(以下简称为NHS)、交联剂反应,后添加化合物I继续反应,获得第二中间产物;

[0061] 4) 将第二中间产物、NHS、交联剂反应,获得异鲁米诺衍生物;

[0062] 其中,所述小分子物质I为至少含有两个氨基且C原子数为2~10的脂肪酸,所述脂肪酸的碳链可插入0~2个N原子;

[0063] 所述化合物I为 $HOOOC-(CH_2CH_2O)_a-(CH_2)_b-NH_2$

[0064] 或



[0066] 其中,a选自4~24的整数,b选自0~20的整数,且 $a+b \leq 24$ 。

[0067] 上述步骤1)中合成N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺环内酯的方法可以为现有技术,但优选采用下述步骤:N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺与酸酐反应,后加入交联剂继续反应,获得所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺环内酯。其中,酸酐优选为丁二酸酐、戊二酸酐、己二酸酐、庚二酸酐、辛二酸酐、二甘醇酸酐中的任一种。

[0068] 在一些具体实施例中,将N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺与酸酐反应的步骤具体为:将N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺与酸酐溶于溶剂,并通入保护性气体,在40~100℃下水浴搅拌反应10~60分钟,后移到室温下避光继续反应1~3小时。上述反应温度在40度以上,则反应速度不会下降,且缩短反应时间,较为适当;反应温度在100度以下,则不发生副反应。

[0069] 上述步骤1)中,加入的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺、酸酐、交联剂的摩尔比优选为1:1~3:1~3;在合成过程中,加入适当过量的酸酐和交联剂可以保证反应的彻底性,

同时也将副产物的产率控制在合理范围,方便后续分离纯化。在一些具体实施例中,上述加入的N-(4-氨基)-N-乙基异鲁米诺、酞酐、交联剂的摩尔比为1:1.25:1.25。

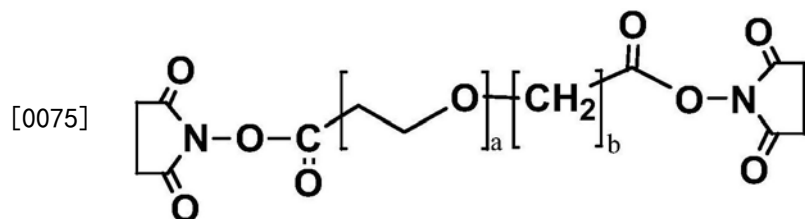
[0070] 上述步骤2)中,获得的N-(4-氨基)-N-乙基异鲁米诺环内酯与小分子物质I,反应获得第一中间产物的步骤具体为:将所述N-(4-氨基)-N-乙基异鲁米诺环内酯与小分子物质I溶于溶剂,并通入保护性气体,在30~50℃下避光反应3~6小时,室温静止过夜,获得所述第一中间产物。

[0071] 需要说明,本制备方法中小分子物质I的分子量小于500。其中,小分子物质I为含有两个氨基且C原子数为3~10的脂肪酸,所述脂肪酸的碳链可插入0~1个N原子。优选地,所述小分子物质I的同一个碳原子上连接的两个活性基团不相同,包括但不限于两个羧基、或两个氨基。进一步优选地,所述小分子物质I 任选自3-(N,N-二胺乙基氨基)丙酸、2,4-二氨基戊酸、4-氨基-3-氨基丁酸、2-(N,N-二胺乙基氨基)乙酸、3,5-二氨基戊酸、3-(N,N-二胺丙基氨基)丙酸、2-(N,N-二胺丙基氨基)乙酸。

[0072] 上述步骤(2)中,反应温度在30度以上,则反应速度不会下降,且缩短反应时间,较为适当;且为防止反应产物分解及确保中间产物的稳定性,反应温度应在50度以下。

[0073] 在一些具体实施例中,上述加入的N-(4-氨基)-N-乙基异鲁米诺环内酯与小分子物质I的摩尔比为1:0.5~2.5,在合成过程中,加入适量过量的小分子物质I可以保证可以保证反应的彻底性,同时也将副产物的产率控制在合理范围,方便后续分离纯化。进一步优选地,加入的N-(4-氨基)-N-乙基异鲁米诺环内酯与小分子物质I的摩尔比为1:0.625。

[0074] 上述步骤3)中,化合物I为 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_a-(\text{CH}_2)_b-\text{NH}_2$,或



[0076] 其中,为保证获得的异鲁米诺衍生物参与发光反应时的反应效率,即维持抗原或抗体在溶液中的稳定性,本发明a优选为4~12的整数;b优选为0~12的整数。

[0077] 需要说明,为便于后续描述,在一些具体实施例中,当化合物I中a、b的数量作出以下变化时,采用以下相应简称表示化合物I,其中下述的PEG表示1,3-亚乙氧基,ME表示亚甲基,C表示羧基,A表示氨基,BS表示两个NHS基团:

[0078] (1) 化合物I为 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_a-(\text{CH}_2)_b-\text{NH}_2$ 时,

[0079] a=4,b=2,化合物I简称为CA(PEG)₄(ME)₂;

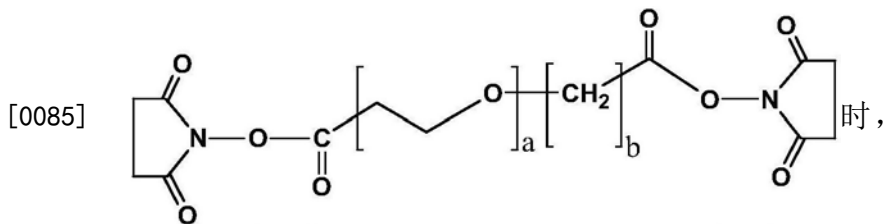
[0080] a=4,b=4,化合物II简称为CA(PEG)₄(ME)₄;

[0081] a=4,b=12,化合物II简称为CA(PEG)₄(ME)₁₂;

[0082] a=12,b=2,化合物II简称为CA(PEG)₁₂(ME)₂;

[0083] a=12,b=4,化合物II简称为CA(PEG)₁₂(ME)₄;

[0084] (2) 化合物I为



[0086] $a=5, b=2$, 化合物I简称为BS (PEG)₅ (ME)₂;

[0087] $a=4, b=4$, 化合物I简称为BS (PEG)₄ (ME)₄;

[0088] $a=4, b=12$, 化合物I简称为BS (PEG)₄ (ME)₁₂。

[0089] 在一些具体实施例中,上述加入的第一中间产物、NHS、交联剂的摩尔比为1:1~3:1~3;。为进一步控制反应的正向进行,加入的第一中间产物、NHS、交联剂的优选为摩尔比为1:1.25:1.25。在另一些具体的实施例中,上述加入的第一中间产物、化合物II的摩尔比为1:1~5。

[0090] 在一些具体实施例中,将第一中间产物、NHS、交联剂反应,后添加化合物I继续反应,获得第二中间产物的步骤具体为:将第一中间产物、NHS、交联剂溶于溶剂,并通入保护性气体,室温下搅拌且避光反应1~3小时,后添加化合物I在30~50℃下避光反应1~3小时,获得所述第二中间产物。上述反应温度在30度以上,则反应速度不会下降,且缩短反应时间,较为适当;且为防止反应产物分解及确保中间产物的稳定性,反应温度应在50度以下。

[0091] 优选地,上述在室温下搅拌且避光反应1~3小时之后,且在添加所述化合物I之前,还包括判断是否有沉淀,如有沉淀,离心去掉沉淀取上清溶液,后在上清溶液中加入化合物II继续反应。更优选地,当交联剂为DCC或DIC时,进行离心去掉沉淀取上清溶液的步骤。

[0092] 在一些具体实施例中,再处理步骤具体为:氮气吹干所述反应液,后重溶于甲醇、分离,获得所述第二中间产物。其中,分离的步骤可以采用现有技术,但优选为硅胶柱层析分离。

[0093] 上述步骤4)中,第二中间产物、NHS、交联剂的摩尔比为1:1~3:1~3;在合成过程中,加入适量过量的NHS和交联剂可以保证反应正向进行。进一步优选地,加入的第二中间产物、NHS、交联剂的摩尔比为1:1.25:1.25。

[0094] 其中,步骤4)具体为:将第二中间产物、NHS、交联剂溶于溶剂,并通入保护性气体,室温反应1~3小时,获得异鲁米诺衍生物。

[0095] 本制备方法步骤1)~4)中。在反应后和获得相应产物前,都还包括后处理步骤,所述后处理步骤至少包括萃取、洗涤、干燥、分离步骤中的任一种,所述各步骤的操作顺序和次数以具体情况而定。优选地:步骤1)和2)中,反应后依次进行萃取、洗涤、干燥、旋蒸、分离,获得所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺环内酯或第一中间产物;步骤3)中,添加化合物I避光反应后,氮气吹干反应液,后进行重溶、分离,获得第二中间产物。在一些具体实施例中,萃取采用的萃取剂包括但不限于酯类化合物,例如乙酸乙酯、甲酸乙酯,或者甲苯、二氯甲烷等,可以独自使用也可以混合使用。洗涤可以进行单次或多次,使用的洗涤剂以具体情况而定,包括但不限于超纯水、稀盐酸、饱和氯化钠等,且洗涤顺序可根据实际需要而定。干燥剂包括但不限于无水硫酸钠、无水硫酸镁、无水氯化钙等。分离的步骤应以具体情况而

定,例如可以是硅胶柱分离或采用离心步骤或液相色谱等,也可以分多次进行,在此不加以赘述,但本制备方法的分离优选为步骤简化且成本可控的硅胶柱分离。为进一步纯化、去除反应的副产物,本发明也可包括对产物进行旋蒸的步骤,旋蒸根据获得的目标产物的物化性质而定,例如,步骤2)中还包括的旋蒸过程就需要在低温条件下($<30^{\circ}\text{C}$)进行。重溶可以进行单次或多次,采用的溶剂优选为甲醇、乙醇等醇类溶剂,溶剂可以是独自使用或至少两种以上混合使用,优选为独自使用。

[0096] 本制备方法步骤1)~4)中,反应均在液相中进行,所述液相均使用溶剂溶解反应物,包括溶解N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺环内酯与小分子物质I;或者溶解第一中间产物、NHS、交联剂;或者溶解第二中间产物、NHS、交联剂,使用的溶剂均为无水溶剂,优选为非质子溶剂,进一步优选为非质子极性溶剂。考虑ABEI衍生物可溶性差,所述溶剂更优选自二甲基甲酰胺(以下简称为DMF)、N-甲基-2-吡咯烷酮(以下简称为NMP),N,N-二甲基乙酰胺(以下简称为DMAc)、二甲基亚砷(以下简称为DMSO)、六甲基磷酰胺、乙酸乙酯、四氢呋喃、乙腈、吡啶、丙酮中的任一种或两种以上混合物。该溶剂可以独自使用或至少两种以上混合使用,优选为独自使用。

[0097] 本制备方法步骤1)~3)中,交联剂优选为碳化二亚胺类交联剂,进一步优选为二环己基碳二亚胺(简称为DCC)、N,N'-二异丙基碳二亚胺(简称为DIC)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(简称为EDC)、N-环己基-N'-(2-吗啉乙基)碳二亚胺对甲苯磺酸盐(简称为CMC)中的任一种或两种以上混合物。特别优选为DCC和DIC。为易于后续异鲁米诺衍生物的标记,也可以采用水相的EDC和CMC。可以理解,交联剂在不同步骤的作用并不相同,例如,步骤1)中加入交联剂可促进ABEI衍生物内部脱水缩合形成环内酯;在步骤3)交联剂可促进NHS脱水形成活化酯,同时为防止化合物I自身交联,交联剂必须在加入化合物I之前加入;步骤(4)中交联剂用于羧基的活化从而形成活泼酯的结构。

[0098] 本制备方法步骤1)~4)中,为避免氧气、防止部分反应物氧化,在反应中均通入优选自氩气、氦气或氮气的所述保护性气体。另外,考虑到异鲁米诺衍生物见光易分解,因此本制备方法的所有步骤都需在避光条件下进行。

[0099] 本制备方法获得的异鲁米诺衍生物在 $-4\sim-40^{\circ}\text{C}$ 下进行保存;为保证异鲁米诺衍生物稳定性,优选地,异鲁米诺衍生物在 $-4\sim-20^{\circ}\text{C}$ 下进行保存。

[0100] 本制备方法在现有技术的基础上大力优化反应体系,通过加入小分子物质(I)成倍添加发光单元,后再添加化合物I,以确保降低该衍生物参与反应时的空间效应,且保证异鲁米诺衍生物参与反应时的效率与稳定性,以及NHS和DCC的协同作用,获得增强型ABEI衍生物,该制备方法不仅简易可行,且获得的异鲁米诺衍生物不仅增强了现有鲁米诺-过氧化物体系的发光强度,提高测试灵敏度与检出限;同时,降低发光标记物对抗体或抗原的标记量,减少过量标记对抗体或抗原活性的影响。

[0101] 本发明还提供另一种制备上述异鲁米诺衍生物的方法,包括下述步骤:

[0102] (a) 将N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺与小分子物质II、交联剂反应,获得第三中间产物;

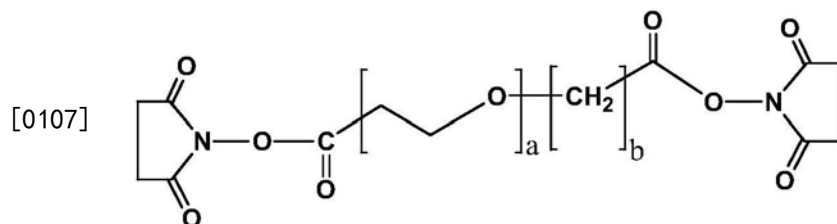
[0103] (b) 溶解所述第三中间产物,并加入缚酸剂反应,获得第四中间产物;

[0104] (c) 将所述第四中间产物与化合物I反应,获得异鲁米诺衍生物;

[0105] 其中,所述小分子物质II含有至少两个不与同一原子相连的羧基和至少一个连接

有氨基保护基团的亚氨基；

[0106] 所述化合物I为 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_a-(\text{CH}_2)_b-\text{NH}_2$ ，或



[0108] 其中，a选自4~24的整数，b选自0~20的整数，且 $a+b \leq 24$ 。

[0109] 需要说明，本制备方法中小分子物质II的分子量小于500。

[0110] 上述步骤(a)中，为保护氨基，防止小分子物质II自身交联，所述氨基保护基团任选自甲氧羰基、乙氧羰基、叔丁氧羰基、苄氧羰基、苄氧羰基、邻苯二甲酰基、2,4-二甲氧基苄基、对甲氧基苄基、烯丙氧羰基。在一些具体实施例中，为更利于反应的正向进行，所述氨基保护基团任选自叔丁氧羰基、苄氧羰基、苄氧羰基。

[0111] 优选地，小分子物质II中可插入0~1个N原子，且该N原子与亚氨基中的N不相同。在一些具体实施例中，所述小分子物质II选自3-叔丁氧羰基氨基戊二酸、3-叔丁氧羰基氨基庚二酸、3-苄氧羰基氨基戊二酸、3-苄氧羰基氨基庚二酸、3-苄氧羰基氨基戊二酸、3-苄氧羰基氨基庚二酸、N-叔丁氧羰基氨基丙基-N-羧甲基氨基乙酸、N-叔丁氧羰基乙基-N-羧甲基氨基乙酸、N-叔丁氧羰基氨基丙基-N-羧乙基氨基丙酸、N-叔丁氧羰基乙基-N-羧乙基氨基丙酸、N-苄氧羰基氨基丙基-N-羧甲基氨基乙酸、N-苄氧羰基乙基-N-羧甲基氨基乙酸、N-苄氧羰基氨基丙基-N-羧乙基氨基丙酸、N-苄氧羰基乙基-N-羧乙基氨基丙酸、N-苄氧羰基氨基丙基-N-羧甲基氨基乙酸、N-苄氧羰基乙基-N-羧甲基氨基乙酸、N-苄氧羰基氨基丙基-N-羧乙基氨基丙酸、N-苄氧羰基乙基-N-羧乙基氨基丙酸中的任一种。

[0112] 优选地，为将羧基活化后与氨基形成肽键，加入的交联剂优选为碳化二亚胺类交联剂，进一步优选为DCC、DIC、EDC、CMC中的任一种或两种以上混合物。特别优选为DCC和DIC。为易于后续异鲁米诺衍生物的标记，也可以采用水相的EDC和CMC。

[0113] 其中，上述步骤加入的N-(4-氨基)-N-乙基异鲁米诺、小分子物质II和交联剂的摩尔比为1:0.5~2.5:0.5~2.5，在合成过程中，加入适量过量的小分子物质II和交联剂可以保证反应的彻底性，同时有效控制副产物的产率。进一步优选地，N-(4-氨基)-N-乙基异鲁米诺、小分子物质II与交联剂的摩尔比为1:0.625:0.625。

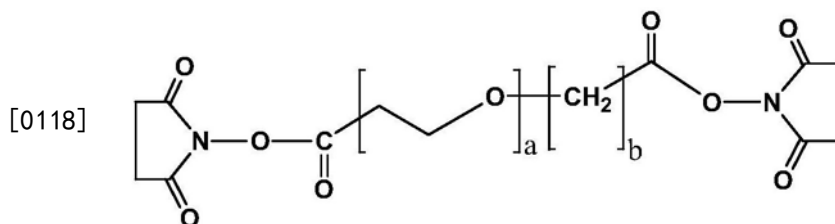
[0114] 优选地，上述在加入交联剂反应后，以及在获得第三反应产物前，还包括判断反应是否产生沉淀的步骤，如有沉淀，离心去掉沉淀取上清溶液。

[0115] 上述步骤(b)中，为避免酸影响反应或反应平衡，防止副产物的生成，且更易于脱去所述氨基保护基团，在反应时可以加入缚酸剂。本发明中的缚酸剂指在反应过程中能中和掉酸的一类物质，包括但不限于有机碱或无机碱，进一步优选为有机弱碱。在一些具体实施例中，更优选为三乙胺、三丁胺、吡啶、二甲基氨基吡啶中的任一种。缚酸剂相对于第三中间产物使用比例是缚酸剂/第三中间产物摩尔比为0.2~1:1；优选为0.3~0.5:1。

[0116] 上述步骤(c)具体为：将第四中间产物、化合物I溶于溶剂，并通入保护性气体，室温反应1~3小时，后依次用氮气吹干反应液、重溶、分离，获得最终异鲁米诺衍生物；在一些具体实施例中，反应1~3小时后及用氮气吹干反应液前，还包括判断反应是否有沉淀，如有

沉淀,离心去掉沉淀取上清溶液,后用氮气吹干所述上清溶液。进一步优选地,当交联剂为DCC或DIC时,进行离心去掉沉淀取上清溶液的步骤。在另一些具体实施例中,第四中间产物与化合物I的摩尔比为1:1~3,优选为1:1.25。

[0117] 上述步骤(c)中,化合物I为 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_a-(\text{CH}_2)_b-\text{NH}_2$,或



[0119] 为保证获得的异鲁米诺衍生物参与液相反应时的反应效率,即抗原或抗体在溶液中的稳定性,本制备方法a优选为4~12的整数;b优选为0~12的整数。需要说明,为便于后续描述,在一些具体实施例中,当化合物I中a、b的数值作出以下变化时,采用以下相应简称表示化合物I,其中下述的PEG表示1,3-亚乙氧基,ME表示亚甲基,C表示羧基,A表示氨基,BS表示两个NHS基团:

[0120] (1) 化合物I为 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_a-(\text{CH}_2)_b-\text{NH}_2$ 时,

[0121] $a=4, b=2$, 化合物I简称为CA (PEG)₄ (ME)₂;

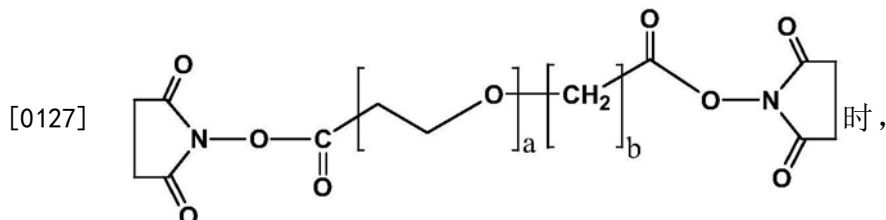
[0122] $a=4, b=4$, 化合物I简称为CA (PEG)₄ (ME)₄;

[0123] $a=4, b=12$, 化合物I简称为CA (PEG)₄ (ME)₁₂;

[0124] $a=12, b=2$, 化合物I简称为CA (PEG)₁₂ (ME)₂;

[0125] $a=12, b=4$, 化合物II简称为CA (PEG)₁₂ (ME)₄;

[0126] (2) 化合物I为



[0128] $a=5, b=2$, 化合物I简称为BS (PEG)₅ (ME)₂;

[0129] $a=4, b=4$, 化合物I简称为BS (PEG)₄ (ME)₄;

[0130] $a=4, b=12$, 化合物I简称为BS (PEG)₄ (ME)₁₂。

[0131] 本制备方法步骤(a)~(c)中,反应均在液相中进行,所述液相均使用溶剂溶解反应物,包括先将N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺与小分子物质II溶于溶剂,后加入交联剂反应;或者溶解所述第三中间产物;或者将第四中间产物、化合物I溶于溶剂。其中,使用的溶剂均为无水溶剂,优选为非质子溶剂,进一步优选为非质子极性溶剂。考虑ABEI衍生物可溶性差,所述溶剂更优选自二甲基甲酰胺(以下简称为DMF)、N-甲基-2-吡咯烷酮(以下简称为NMP)、N,N-二甲基乙酰胺(以下简称为DMAc)、二甲基亚砷(以下简称为DMSO)、六甲基磷酰胺、乙酸乙酯、四氢呋喃、乙腈、吡啶、丙酮中的任一种或两种以上混合物。该溶剂可以独自使用或至少两种以上混合使用,优选为独自使用。

[0132] 本制备方法步骤(a)~(c)中。在反应后和获得相应产物前,都还包括后处理步骤,所述后处理步骤至少包括干燥、分离、离心、重溶、洗涤步骤中的任一种,所述各步骤的操作

顺序和次数以具体情况而定。优选地：步骤(a)中，反应后依次进行采用氮气吹干所述第三反应产物，后重溶、分离，获得所述第三中间产物；步骤(b)中，在避光条件下反应后，氮气吹干反应液、分离，获得所述第四中间产物。在一些具体实施例中，重溶可以进行单次或多次，采用的溶剂优选为甲酸乙酯、乙酸乙酯等酯类溶剂，溶剂可以是独自使用或至少两种以上混合使用，优选为独自使用。分离的步骤应以具体情况而定，例如可以是硅胶柱分离或采用离心步骤或液相色谱等，也可以分多次进行，但本制备方法的分离优选为步骤简化且成本可控的硅胶柱分离。为进一步纯化、去除反应的副产物，本发明也可包括对产物进行旋蒸、萃取、洗涤、干燥等步骤，该部分与上述第一种制备方法的限定相同，在此不加以赘述。

[0133] 本制备方法步骤(a)~(c)中，为避免氧气、防止部分反应物氧化，在反应中均通入优选自氩气、氦气或氮气的所述保护性气体。另外，考虑到异鲁米诺衍生物见光易分解，因此本制备方法的所有步骤都优选在避光条件下进行。

[0134] 本制备方法获得的异鲁米诺衍生物在-4~-40℃下进行保存；为保证异鲁米诺衍生物的稳定性，优选地，异鲁米诺衍生物在-4~-20℃下进行保存。

[0135] 本制备方法直接通过氨基和羧基缩合，后脱去保护基团，再与化合物I反应扩链，一方面成倍添加发光单元，增强发光强度；另一方面增长第一中间产物的线性结构，不仅降低该衍生物参与反应时的空间效应，且保证异鲁米诺衍生物标记的抗原或抗体的稳定性，以及在NHS和DCC的协同作用下，获得增强型ABEI衍生物。该制备方法不仅简易可行，且获得的异鲁米诺衍生物增强了现有鲁米诺-过氧化物体系的发光强度，提高测试灵敏度与检出限；同时，降低发光标记物对抗体或抗原的标记量，减少过量标记对抗体或抗原活性的影响。

[0136] 本发明提供一种化学发光底液，其至少包括本发明的异鲁米诺衍生物或者由本发明的两种独立的异鲁米诺衍生物的制备方法制备得到的异鲁米诺衍生物，还可包括辅助性的成分，包括但不限于本领域人员公知的发光增强剂。该化学发光底液与酶配合实现化学发光，所述酶包括但不限于碱性磷酸酶、过氧化物酶。所述化学发光底液可以包括在试剂盒中也可单独放置并应用于化学发光系统。

[0137] 本发明提供一种免疫诊断试剂，其包括本发明的异鲁米诺衍生物或者由本发明的两种独立的异鲁米诺衍生物的制备方法制备得到的异鲁米诺衍生物。在本文中已证实，上述异鲁米诺衍生物能增强现有鲁米诺-过氧化物体系的发光强度，同时降低发光标记物对抗体或抗原的标记量，减少过量标记对抗体或抗原活性的影响。

[0138] 本发明的诊断试剂还包括一种或多种检测抗原或检测抗体，其中检测抗原或检测抗体可以但不需要一定被上述异鲁米诺衍生物标记。可以理解，其中标记可以是直接标记或间接标记，间接标记的方式包括但不限于通过异硫氰酸荧光素(FITC)与抗FITC抗体体系或通过链霉亲和素(SA)与生物素(Biotin)体系与检测抗原或抗体连接进行标记。所述抗FITC抗体优选为羊抗FITC多克隆抗体。为降低非特异性吸附，且提高测试灵敏度，本发明优选为直接标记，也就是异鲁米诺衍生物直接标记检测抗原或检测抗体。其中，标记方法为现有技术，在此不加以限定。如上所述，被本发明的异鲁米诺衍生物标记的检测抗原或检测抗体在溶液中不会沉淀，性质稳定。

[0139] 优选地，本发明的异鲁米诺衍生物可标记检测抗原或检测抗体，底物除了至少存在碱性溶液和H₂O₂以外，还可包括微过氧化物酶、过氧化氢酶、乳过氧化物酶、次氯血红素、

氯化血红素、次氯酸盐、 CoCl_2 、过硫酸盐、过氧化钾、高碘酸钠、 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 、黄嘌呤氧化酶、次黄嘌呤氧化酶、叔丁醇钾中的至少一种,进一步优选为次氯血红素或者 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 。

[0140] 本发明更进一步提供一种化学发光试剂盒,其包含含有本发明的异鲁米诺衍生物标记的检测抗原或检测抗体的诊断试剂。优选地,试剂盒还包括固体支持物,例如微粒、珠子、试管、微孔滴定板、比色皿、膜、支架分子、薄膜、滤纸或芯片。优选为具有超顺磁性和高含量表面功能基团的纳米磁性微球,且粒径大小为 $0.1\text{--}5\mu\text{m}$,进一步优选为 $1\text{--}3\mu\text{m}$ 。表面功能基团包括但不限于羧基、氨基、羟基等活性基团,但为避免磁性微球表面基团自身发生交联,基团不能为巯基等基团。可以理解,试剂盒还可以任选地包括捕获抗原或捕获抗体,其中捕获抗原或捕获抗体可与微粒连接,其中连接可以是直接连接或间接连接,间接连接的方式包括但不限于通过异硫氰酸荧光素(FITC)与抗FITC抗体体系或通过链霉亲和素(SA)与生物素(Biotin)体系与捕获抗原或捕获抗体连接。所述抗FITC抗体优选为羊抗FITC多克隆抗体。为降低非特异性吸附,且提高测试灵敏度,本发明优选为直接标记,也就是异鲁米诺衍生物直接标记检测抗原或检测抗体。其中,标记方法为现有技术,在此不加以限定。所述试剂盒包含的任选的捕获抗原或捕获抗体用以与试验样本中的待测抗原或抗体接触,在接触之前,任选的捕获抗原或捕获抗体先与固相支持物结合。

[0141] 任选地,所述试剂盒包含执行测定必须的所有成分,即试剂、标准物、缓冲液、底物、稀释液和待测抗体或待测抗原的免疫诊断试剂说明书等。所述试剂盒可以另外包括一种或多种对照物。用于分离和/或处理试验样品的其它组分(诸如缓冲液、稀释液、预处理剂)也可以包括在试剂盒中。所述预处理剂、稀释液、缓冲液可以是一种或多种溶剂。试剂盒的一种或多种组分可以被低压冻干,且试剂盒的一种或多种组分可以是液体或固体。

[0142] 本发明还进一步提供一种化学发光免疫分析系统,其包含含有本发明的异鲁米诺衍生物标记的检测抗原或检测抗体的试剂盒和半自动或全自动免疫分析仪。优选为全自动化学发光分析仪,尤其是采用深圳市新产业生物医学工程股份有限公司的全自动化学发光测定仪系列。所述分析仪包含执行测定必须的所有模块,即反应杯加载模块、加样模块、试剂仓、样品仓、温育模块、清洗站、测量室、数据处理模块、控制系统等。各模块的结构及其相互位置关系为本领域的公知技术。

[0143] 本发明还提供了用于确定含有本发明的异鲁米诺衍生物标记的检测抗原或检测抗体的试剂盒中待测抗原或待测抗体的存在、量或浓度的方法。本领域已知的任意合适的测定可以用在这样的方法中,只要这样的测定使用本发明的异鲁米诺衍生物。例子包括但不限于免疫测定,诸如夹心免疫测定或酶联免疫吸附测定、竞争性抑制免疫测定等。通常,以1-步或2-步形式进行免疫测定,但在特定测定中,还可以包括特殊2-步形式进行免疫测定,例如在1-步中就形成夹心复合物,后在2-步中再加入标记物(例如采用本发明的异鲁米诺衍生物)标记的检测抗原或检测抗体。优选直接化学发光免疫测定,尤其是采用深圳市新产业生物医学工程股份有限公司的全自动化学发光测定仪系列的免疫测定。

[0144] 本发明再提供一种含有本发明的异鲁米诺衍生物,或者含有由本发明提供的两种制备方法分别制备得到的异鲁米诺衍生物,或者含有本发明的异鲁米诺衍生物的免疫诊断试剂,或者包含含有本发明的异鲁米诺衍生物标记的检测抗原或检测抗体的诊断试剂的试剂盒,或者包含本发明试剂盒和自动化免疫分析仪的化学发光免疫分析系统在化学发光免疫定量分析中的应用。尤其是用于异鲁米诺衍生物对人血清中各种激素、肿瘤标志物、传染

病、心血管及心肌标志物中的至少一种进行化学发光免疫定量的测定。

[0145] 任选地,所述激素为:

[0146] 1) 甲状腺功能系列:其中,用于检测甲状腺功能的激素为促甲状腺素、血清甲状腺素、血清三碘甲状腺原氨酸、血清游离四碘甲状腺原氨酸、血清游离三碘甲状腺原氨酸、甲状腺球蛋白、甲状腺球蛋白抗体、甲状腺微粒体抗体、促甲状腺激素受体抗体、抗甲状腺过氧化物酶抗体、血清反三碘甲状腺原氨酸;

[0147] 2) 性腺激素:其中,所述性腺激素为卵泡刺激素、黄体生成素、人绒毛膜促性腺激素、催乳素、雌二醇、游离雌三醇、孕酮、睾酮、游离睾酮、抗缪勒氏管激素、17羟基孕酮;

[0148] 3) 糖代谢系列:其中,所述糖代谢系列为C肽、胰岛素、抗人胰岛素抗体、胰岛素原、谷氨酸脱羧酶抗体、抗胰岛细胞抗体、抗蛋白酪氨酸磷酸酶样蛋白质抗体。

[0149] 任选地,所述肿瘤标志物为血清甲胎蛋白、癌胚抗原、前列腺特异性抗原、游离前列腺特异性抗原、糖类抗原50、糖类抗原125、糖类抗原153、糖类抗原199、细胞角蛋白十九片段、糖类抗原242、糖类抗原724、Sangtec-100蛋白质、胃蛋白酶原I、胃蛋白酶原II、胃泌素17、幽门螺旋杆菌。

[0150] 任选地,所述用于检测传染病的系列为甲型肝炎病毒总抗体、甲型肝炎病毒总抗体IgM抗体、乙肝病毒表面抗原、乙肝病毒表面抗体、乙肝病毒e抗原、乙肝病毒e抗体、乙肝病毒核心抗体、丙型肝炎病毒抗体、人类免疫缺陷病毒P24抗原、梅毒螺旋体抗体、人类免疫缺陷病毒、人T淋巴细胞病毒1型抗体、人T淋巴细胞病毒2型抗体、克氏锥虫。

[0151] 任选地,所述用于检测心血管及心肌疾病的标志物为肌钙蛋白I、脑自然肽N端前体蛋白、D-二聚体、醛固酮、血管紧张素I、血管紧张素II、肾素、人血清脂蛋白相关磷脂酶A2。

[0152] 本发明的异鲁米诺衍生物通过插入有限长度的间隔臂,且通过优化基团和成倍添加发光单元,不仅降低现有ABEI发光标记物对抗体或抗原的标记量,减少过量标记对抗体或抗原活性的影响,提高抗原和抗体的结合率;且保证异鲁米诺衍生物参与反应时的效率与稳定性,更显著增强现有鲁米诺-过氧化物体系的发光强度,提高测试灵敏度与检出限。并且,本发明提供的两种异鲁米诺衍生物的制备方法是在现有技术的基础上大力优化反应体系,且该制备方法简易可行。此外,本发明提供的免疫诊断试剂能构成稳定性好、检测范围宽、灵敏度高的化学发光试剂盒,可应用于实现对人血清中各种激素、肿瘤标志物、传染病、心血管及心肌标志物中的至少一种进行化学发光免疫定量的快速测定。

具体实施方式

[0153] 下面将通过具体实施例对本发明做进一步说明,但应理解,本发明的范围并不限于此。

[0154] 以下实施例采用深圳市新产业生物医学工程股份有限公司生产的Maglumi 2000plus全自动化学发光免疫分析仪进行检测。

[0155] 乙肝病毒表面抗原(以下简称为HBsAg),来源:美国Meridian公司。

[0156] 抗HBsAg单克隆抗体1,来源:美国RA Biosources公司。

[0157] 抗HBsAg多克隆抗体2,来源:美国RA Biosources公司。

[0158] 反三碘甲状腺原氨酸抗原,来源:从Sigma公司采购。

- [0159] 抗反三碘甲状腺原氨酸抗体,来源:从Biogenesis公司采购。
- [0160] 17 α -羟孕酮抗体来源:购自CalBioagents公司。
- [0161] 17 α -羟孕酮抗原来源:购自Sigma公司。
- [0162] 抗胃泌素-17抗体来源:两株抗体(第一抗胃泌素-17抗体和第二抗胃泌素-17抗体)均购自芬兰biohit公司。
- [0163] 血管紧张素I(以下简称为AI)抗原:购于Sigma公司。
- [0164] 抗AI抗体:购于Biogenesis公司。
- [0165] 磁性微球来源:深圳市新产业生物医学工程股份有限公司生产。
- [0166] Maglumi2000化学发光分析仪,来源:深圳市新产业生物医学工程股份有限公司。
- [0167] N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺(以下简称为ABEI),来源:深圳新产业生物医学股份有限公司生产。
- [0168] 实施例1
- [0169] 异鲁米诺衍生物的制备
- [0170] 1) 合成ABEI环内酯;
- [0171] 取500mg ABEI和200mg丁二酸酐,溶于30ml无水DMSO溶剂,通入氩气保护,50 $^{\circ}$ C水浴搅拌反应30min,转移到室温避光继续反应120min,加入400mg EDC,室温搅拌反应24h,结束反应。加入乙酸乙酯萃取,超纯水洗涤,无水硫酸钠干燥,旋转蒸干,硅胶柱分离得到ABEI环内酯。
- [0172] 2) 第一中间产物的制备
- [0173] 将步骤1)中获得的100mg ABEI环内酯,34mg3-(N,N-二胺丙基氨基)丙酸,溶于5ml无水DMSO,在氩气保护下,37 $^{\circ}$ C避光反应4h,室温静止过夜。加入大量乙酸乙酯萃取,依次用稀盐酸,饱和氯化钠和超纯水洗涤3次,无水硫酸钠干燥得有机相,低温(<30 $^{\circ}$ C)旋蒸。硅胶柱层析分离得第一中间产物。
- [0174] 3) 第二中间产物的制备
- [0175] 取步骤2)中纯化得到的第一中间产物100mg,加入25.2mg NHS,45.1mg DCC,置于5ml无水DMF,氩气保护,室温搅拌避光反应2h。离心去掉沉淀并取上清溶液,后加入92.9mg CA(PEG)₄(ME)₂,37 $^{\circ}$ C水浴搅拌避光反应2h。氮气吹干反应液,重溶于甲醇,硅胶柱层析分离得到第二中间产物。
- [0176] 4) 终产物的制备
- [0177] 取10mg步骤3)中的第二中间产物,1.2mg NHS,2mg DCC,溶于1ml无水DMF,氩气保护下室温避光反应2h,得到终产物异鲁米诺衍生物,-20 $^{\circ}$ C保存。
- [0178] 实施例2
- [0179] 异鲁米诺衍生物的制备
- [0180] 1) 合成ABEI环内酯;
- [0181] 取500mg ABEI和290mg己二酸酐,溶于30ml无水DMF溶剂,通入氩气保护,40 $^{\circ}$ C水浴搅拌反应50min,转移到室温避光继续反应3小时,加入440mg DCC,室温搅拌反应24h,结束反应。加入甲酸乙酯萃取,超纯水洗涤,无水硫酸镁干燥,旋转蒸干,硅胶柱分离得到ABEI环内酯。
- [0182] 2) 第一中间产物的制备

[0183] 将步骤1)中获得的100mg ABEI环内酯,21mg 2,4-二氨基戊酸,溶于5ml无水DMF,在氩气保护下,37℃避光反应3h,室温静止过夜。加入大量甲酸乙酯萃取,依次用稀盐酸,饱和氯化钠和超纯水洗涤3次,无水硫酸镁干燥得有机相,低温(<30℃)旋蒸。硅胶柱层析分离得第一中间产物。

[0184] 3) 第二中间产物的制备

[0185] 取步骤2)中纯化得到的第一中间产物100mg,加入15.3mg NHS,25.8mg DCC,置于5ml无水DMSO,氩气保护,室温搅拌避光反应2h,离心取上清液,加入35.2mg CA (PEG)₄(ME)₄,37℃水浴搅拌避光反应2h。氮气吹干反应液,重溶于甲醇,硅胶柱层析分离得到第二中间产物。

[0186] 4) 终产物的制备

[0187] 取10mg步骤3)中的第二中间产物,1.2mg NHS,2mg DCC,溶于1ml无水DMF,氩气保护下室温避光反应2h,得到终产物异鲁米诺衍生物,-20℃保存。

[0188] 实施例3

[0189] 异鲁米诺衍生物的制备

[0190] 1) 合成ABEI环内酯;

[0191] 取500mg ABEI和270mg戊二酸酐,溶于30ml无水DMAc溶剂,通入氩气保护,60℃水浴搅拌反应20min,转移到室温避光继续反应60min,加入450mg EDC,室温搅拌反应24h,结束反应。加入乙酸乙酯萃取,超纯水洗涤,无水硫酸钠干燥,旋转蒸干,硅胶柱分离得到ABEI环内酯。

[0192] 2) 第一中间产物的制备

[0193] 将步骤1)中获得的100mg ABEI环内酯,25mg 3,5-二氨基戊酸,溶于5ml无水DMAc,在氩气保护下,37℃避光反应4h,室温静止过夜。加入大量乙酸乙酯萃取,依次用稀盐酸,饱和氯化钠和超纯水洗涤3次,无水硫酸钠干燥得有机相,低温(<30℃)旋蒸。硅胶柱层析分离得第一中间产物。

[0194] 3) 第二中间产物的制备

[0195] 取步骤2)中纯化得到的第一中间产物100mg,加入16mg NHS,28mg EDC,置于5ml无水DMF,氩气保护,室温搅拌避光反应2h,加入60mg CA (PEG)₄(ME)₁₂,37℃水浴搅拌避光反应2h。氮气吹干反应液,重溶于甲醇,硅胶柱层析分离得到第二中间产物。

[0196] 4) 终产物的制备

[0197] 取10mg步骤3)中的第二中间产物,1.15mg NHS,1.91mg EDC,溶于1ml无水DMF,氩气保护下室温避光反应2h,得到终产物异鲁米诺衍生物,-20℃保存。

[0198] 实施例4

[0199] 异鲁米诺衍生物的制备

[0200] 1) 合成ABEI环内酯;

[0201] 取500mg ABEI和250mg丁二酸酐,溶于30ml无水NMP溶剂,通入氩气保护,50℃水浴搅拌反应30min,转移到室温避光继续反应120min,加入450mg DCC,室温搅拌反应24h,结束反应。加入乙酸乙酯萃取,超纯水洗涤,无水硫酸钠干燥,旋转蒸干,硅胶柱分离得到ABEI环内酯。

[0202] 2) 第一中间产物的制备

[0203] 将步骤1)中获得的100mg ABEI环内酯,22.5mg 4-氨基-3-氨基丁酸,溶于5ml无水无水NMP,在氩气保护下,37℃避光反应4h,室温静止过夜。加入大量乙酸乙酯萃取,依次用稀盐酸,饱和氯化钠和超纯水洗涤3次,无水硫酸钠干燥得有机相,低温(<30℃)旋蒸。硅胶柱层析分离得第一中间产物。

[0204] 3) 第二中间产物的制备

[0205] 取步骤2)中纯化得到的第一中间产物100mg,加入18.4mg NHS,31.5mg DCC,置于5ml无水NMP,氩气保护,室温搅拌避光反应2h,离心取上清液,加入66.4mg CA(PEG)₁₂(ME)₂,37℃水浴搅拌避光反应2h。氮气吹干反应液,重溶于甲醇,硅胶柱层析分离得到第二中间产物。

[0206] 4) 终产物的制备

[0207] 取10mg步骤3)中的第二中间产物,1.21mg NHS,2.04mg DCC,溶于1ml无水DMF,氩气保护下室温避光反应2h,得到终产物异鲁米诺衍生物,-20℃保存。

[0208] 实施例5

[0209] 异鲁米诺衍生物的制备

[0210] 1) 合成ABEI环内酯;

[0211] 取500mg ABEI和330mg庚二酸酐,溶于30ml无水DMSO溶剂,通入氩气保护,50℃水浴搅拌反应30min,转移到室温避光继续反应120min,加入400mg DCC,室温搅拌反应24h,结束反应。加入甲酸乙酯萃取,超纯水洗涤,无水硫酸钠干燥,旋转蒸干,硅胶柱分离得到ABEI环内酯。

[0212] 2) 第一中间产物的制备

[0213] 将步骤1)中获得的100mg ABEI环内酯,29.4mg 2-(N,N-二胺丙基氨基)乙酸,溶于5ml无水DMSO,在氩气保护下,37℃避光反应4h,室温静止过夜。加入大量甲酸乙酯萃取,依次用稀盐酸,饱和氯化钠和超纯水洗涤3次,无水硫酸钠干燥得有机相,低温(<30℃)旋蒸。硅胶柱层析分离得第一中间产物。

[0214] 3) 第二中间产物的制备

[0215] 取步骤2)中纯化得到的第一中间产物100mg,加入16.8mg NHS,28.4mg DCC,置于5ml无水DMSO,氩气保护,室温搅拌避光反应2h,离心取上清液,加入69.2mg CA(PEG)₁₂(ME)₄,37℃水浴搅拌避光反应2h。氮气吹干反应液,重溶于乙醇,硅胶柱层析分离得到第二中间产物。

[0216] 4) 终产物的制备

[0217] 取10mg步骤3)中的第二中间产物,1.15mg NHS,1.94mg DCC,溶于1ml无水DMF,氩气保护下室温反应2h,得到终产物异鲁米诺衍生物,-20℃保存。

[0218] 实施例6

[0219] 异鲁米诺衍生物的制备

[0220] 1) 第三中间产物的制备

[0221] 取100mg ABEI和61.40mg 3-叔丁氧羰基氨基戊二酸,溶于5ml无水DMF,加入45.63mg DCC,氮气保护下,室温避光搅拌2h,离心取上清液。氮气吹干上清液,重溶于甲酸乙酯,硅胶柱分离得第三中间产物。

[0222] 2) 第四中间产物的制备

[0223] 取步骤1)中的第三中间产物50mg溶于20ml无水DMF,加入3.7ul三乙胺,氮气保护下,室温避光反应1h。氮气吹干,硅胶柱分离得第四中间产物。3)终产物的制备

[0224] 取步骤2)中的第四中间产物100mg,BS (PEG)₅(ME)₂95.07mg,溶于5ml无水DMF中,氮气保护下,室温搅拌避光反应2h,离心取上清液,氮气吹干上清液,重溶于乙酸乙酯,得到终产物异鲁米诺衍生物,-20℃保存。

[0225] 实施例7

[0226] 异鲁米诺衍生物的制备

[0227] 1) 第三中间产物的制备

[0228] 取100mg ABEI和93.2mg N-苄氧羰基氨基丙基-N-羧甲基氨基乙酸,溶于5ml无水DMSO,加入44.93mg EDC,氮气保护下,室温避光搅拌1h。氮气吹干,重溶于乙酸乙酯,硅胶柱分离得第三中间产物。

[0229] 2) 第四中间产物的制备

[0230] 取步骤1)中的第三中间产物50mg溶于20ml无水DMSO,加入2.2ul吡啶,氮气保护下,室温避光反应1h。氮气吹干,硅胶柱分离得第四中间产物。

[0231] 3) 终产物的制备

[0232] 取步骤2)中的第四中间产物100mg,BS (PEG)₄(ME)₄156.21mg,溶于5ml无水DMSO中,氮气保护下,室温搅拌避光1h。氮气吹干反应液,重溶于甲酸乙酯,得到终产物异鲁米诺衍生物(结构见下式7-3),-20℃保存。

[0233] 实施例8

[0234] 异鲁米诺衍生物的制备

[0235] 1) 第三中间产物的制备

[0236] 取100mg ABEI和65.2mg N-叔丁氧羰基乙基-N-羧甲基氨基乙酸,溶于5ml无水DMAc,加入43.88mg DCC,氮气保护下,置于室温避光搅拌30分钟,离心取上清液,氮气吹干上清液,重溶于乙酸乙酯,硅胶柱分离得第三中间产物。

[0237] 2) 第四中间产物的制备

[0238] 取步骤1)中的第三中间产物50mg溶于20ml无水DMAc,加入7.3ul三丁胺,氮气保护下,室温避光反应1h。氮气吹干,硅胶柱分离得第四中间产物。3)终产物的制备

[0239] 取步骤2)中的第四中间产物100mg,BS (PEG)₄(ME)₁₂122.49mg,溶于5ml无水DMAc中,氮气保护下,室温搅拌2h,离心取上清液,氮气吹干上清液,重溶于乙酸乙酯,得到终产物异鲁米诺衍生物,-20℃保存。

[0240] 实施例9 乙肝病毒表面抗原的检测

[0241] 按照专利CN104698172B中实施例1的试剂盒和检测方法检测样本中的乙肝病毒表面抗原含量,区别在于:将该专利CN104698172B实施例1中的标记物替换为本实施例1制备的异鲁米诺衍生物。具体区别如下,以下为本实施例标记物体系的制备步骤:

[0242] 标记物体系的制备。

[0243] 1) 透析液的配制:在5000ml烧杯中加入Na₂CO₃ 14.31g,NaHCO₃ 26.46g,加水定容至4500ml,即得0.1mol/L的碳酸缓冲液。

[0244] 2) 选用截留量为14000的透析袋,量取合适的尺寸,取1mg抗HBsAg多克隆抗体2用透析液调整到1ml,放入透析液中,室温搅拌透析2小时将透析好的溶液加入本实施例1制备

的异鲁米诺衍生物404 μg , 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应2小时。

[0245] 3) 以G-25凝胶柱纯化上述反应得到的标记异鲁米诺衍生物的抗HBsAg多克隆抗体2。

[0246] 4) 在纯化后的标记异鲁米诺衍生物的抗HBsAg多克隆抗体2溶液中加入等体积的5g/ml的BSA保护液, 即得。

[0247] 实施例10 乙肝病毒表面抗原的检测

[0248] 按照专利CN104698172B中实施例1的试剂盒和检测方法检测样本中的乙肝病毒表面抗原含量, 区别在于: 将该专利CN104698172B中实施例1的“加入300 μg ABEI-半琥珀酰胺酸N-羟基琥珀酰亚胺酯”替换为“加入本实施例2制备的异鲁米诺衍生物403 μg ”。

[0249] 实施例11 乙肝病毒表面抗原的检测

[0250] 按照专利CN104698172B中实施例1的试剂盒和检测方法检测样本中的乙肝病毒表面抗原含量, 区别在于: 将该专利CN104698172B实施例1的“加入300 μg ABEI-半琥珀酰胺酸N-羟基琥珀酰亚胺酯”替换为“加入本实施例3制备的异鲁米诺衍生物440 μg ”。

[0251] 实施例12 乙肝病毒表面抗原的检测

[0252] 按照专利CN104698172B中实施例1的试剂盒和检测方法检测样本中的乙肝病毒表面抗原含量, 区别在于: 将该专利CN104698172B实施例1的“加入300 μg ABEI-半琥珀酰胺酸N-羟基琥珀酰亚胺酯”替换为“加入本实施例4制备的异鲁米诺衍生物410 μg ”。

[0253] 实施例13 乙肝病毒表面抗原的检测

[0254] 按照专利CN104698172B中实施例1的试剂盒和检测方法检测样本中的乙肝病毒表面抗原含量, 区别在于: 将该专利CN104698172B实施例1的“加入300 μg ABEI-半琥珀酰胺酸N-羟基琥珀酰亚胺酯”替换为“加入本实施例5制备的异鲁米诺衍生物500 μg ”。

[0255] 实施例14 乙肝病毒表面抗原的检测

[0256] 按照专利CN104698172B中实施例1的试剂盒和检测方法检测样本中的乙肝病毒表面抗原含量, 区别在于: 将该专利CN104698172B实施例1的“加入300 μg ABEI-半琥珀酰胺酸N-羟基琥珀酰亚胺酯”替换为“加入本实施例6制备的异鲁米诺衍生物321 μg ”。

[0257] 实施例15 乙肝病毒表面抗原的检测

[0258] 按照专利CN104698172B中实施例1的试剂盒和检测方法检测样本中的乙肝病毒表面抗原含量, 区别在于: 将该专利CN104698172B实施例1的“加入300 μg ABEI-半琥珀酰胺酸N-羟基琥珀酰亚胺酯”替换为“加入本实施例7制备的异鲁米诺衍生物427.8 μg ”。

[0259] 实施例16 乙肝病毒表面抗原的检测

[0260] 按照专利CN104698172B中实施例1的试剂盒和检测方法检测样本中的乙肝病毒表面抗原含量, 区别在于: 将该专利CN104698172B实施例1的“加入300 μg ABEI-半琥珀酰胺酸N-羟基琥珀酰亚胺酯”替换为“加入本实施例8制备的异鲁米诺衍生物380.8 μg ”。

[0261] 实施例17 rT3的检测

[0262] 按照专利CN104730257A中实施例1的试剂盒和检测方法检测样本中的反三碘甲状腺原氨酸含量, 区别在于: 将该专利CN104730257A实施例1中的“加入300 μg ABEI-半琥珀酰胺酸N-羟基琥珀酰亚胺酯”替换为“加入本实施例1制备的异鲁米诺衍生物404 μg ”。

[0263] 实施例18 17 α -羟孕酮的检测

[0264] 按照专利CN105651990A中实施例1的试剂盒和检测方法检测样本中的17 α -羟孕酮

的含量,区别在于:将该专利CN105651990A实施例1中制备3的“加入300 μ g ABEI活化酯”替换为“加入本实施例1制备的异鲁米诺衍生物404 μ g”。

[0265] 实施例19 胃泌素-17的检测

[0266] 按照专利CN104614536A中实施例1的试剂盒和检测方法检测样本中的胃泌素-17抗原的含量,区别在于:将该专利CN104614536A实施例1中的“300 μ g ABEI-半琥珀酰胺酸N-羟基琥珀酰亚胺酯”替换为“加入本实施例1制备的异鲁米诺衍生物404 μ g”。

[0267] 实施例20 血管紧张素I的检测

[0268] 按照专利CN104634965A中实施例1的试剂盒和实施例9的检测方法检测样本中的血管紧张素I的含量,区别在于:将该专利CN104634965A实施例1中的“300 μ g ABEI活化酯”替换为“404 μ g本实施例1制备的异鲁米诺衍生物”。

[0269] 实施例21 rT3的检测

[0270] 按照专利CN104730257A中实施例1的试剂盒和检测方法检测样本中的反三 碘甲状腺原氨酸的含量,区别在于:将该专利CN104730257A实施例1中的“加入300 μ g ABEI-半琥珀酰胺酸N-羟基琥珀酰亚胺酯”替换为“加入本实施例6制备的异鲁米诺衍生物321 μ g”。

[0271] 实施例22 17 α -羟孕酮的检测

[0272] 按照专利CN105651990A中实施例1的试剂盒和检测方法检测样本中的17 α -羟孕酮的含量,区别在于:将该专利CN105651990A实施例1中制备3的“加入300 μ g ABEI活化酯”替换为“加入本实施例6制备的异鲁米诺衍生物321 μ g”。

[0273] 实施例23 胃泌素-17的检测

[0274] 按照专利CN104614536A中实施例1的试剂盒和检测方法检测样本中的胃泌素-17抗原的含量,区别在于:将该专利CN104614536A实施例1中的“300 μ g ABEI-半琥珀酰胺酸N-羟基琥珀酰亚胺酯”替换为“加入本实施例6制备的异鲁米诺衍生物321 μ g”。

[0275] 实施例24 血管紧张素I的检测

[0276] 按照专利CN104634965A中实施例1的试剂盒和实施例9的检测方法检测样本中的血管紧张素I的含量,区别在于:将该专利CN104634965A实施例1中的“300 μ g ABEI活化酯”替换为“321 μ g本实施例6制备的异鲁米诺衍生物”。

[0277] 对比例1 乙肝病毒表面抗原的检测

[0278] 按照专利CN104698172B中实施例1的试剂盒和检测方法检测样本中的乙肝病毒表面抗原含量,区别在于:标记物体系不同,具体如下:

[0279] 标记物体系的制备:1) 透析液的配制:在5000ml烧杯中加入Na₂CO₃ 14.31g,NaHCO₃ 26.46g,加水定容至4500ml,即得0.1mol/L的碳酸缓冲液。

[0280] 2) 选用截留量为14000的透析袋,量取合适的尺寸,取1mg抗HBsAg多克隆抗体用透析液调整到1ml,放入透析液中,室温搅拌透析2小时将透析好的溶液加入169 μ g ABEI,37 $^{\circ}$ C反应2小时。

[0281] 3) 以G-25凝胶柱纯化上述反应得到的标记ABEI的抗HBsAg多克隆抗体。

[0282] 4) 在纯化后的标记ABEI的抗HBsAg多克隆抗体溶液中加入等体积的5g/ml的BSA保护液,即得。

[0283] 对比例2 乙肝病毒表面抗原的检测

[0284] 与对比例1基本相同,区别在于:标记物不同,即ABEI替换为ABEI-环内酯,具体步

骤如下:

[0285] 1) 透析液的配制:在5000ml烧杯中加入 Na_2CO_3 14.31g, NaHCO_3 26.46g,加水定容至4500ml,即得0.1mol/L的碳酸缓冲液。

[0286] 2) 选用截留量为14000的透析袋,量取合适的尺寸,取1mg抗HBsAg多克隆抗体用透析液调整到1ml,放入透析液中,室温搅拌透析2小时将透析好的溶液加入226 μg ABEI-环内酯,37 $^\circ\text{C}$ 反应2小时。

[0287] 3) 以G-25凝胶柱纯化上述反应得到的标记ABEI的抗HBsAg多克隆抗体。

[0288] 4) 在纯化后的标记ABEI的抗HBsAg多克隆抗体溶液中加入等体积的5g/ml的BSA保护液,即得。

[0289] 对比例3 乙肝病毒表面抗原的检测

[0290] 按照专利CN104698172B中实施例1的试剂盒和检测方法检测样本中的乙肝病毒表面抗原含量。

[0291] 对比例4 rT3的检测

[0292] 按照专利CN104730257A中实施例1的试剂盒和检测方法检测样本中的反三碘甲状腺原氨酸含量。

[0293] 对比例5 17 α -羟孕酮的检测

[0294] 按照专利CN105651990A中实施例1的试剂盒和检测方法检测样本中的17 α -羟孕酮的含量。

[0295] 对比例6 胃泌素-17的检测

[0296] 按照专利CN104614536A中实施例1的试剂盒和检测方法检测样本中的胃泌素-17含量。

[0297] 对比例7 血管紧张素I的检测

[0298] 按照专利CN104634965A中实施例1的试剂盒和实施例9的检测方法检测样本中的血管紧张素I的含量。

[0299] 测量结果及分析:

[0300] 1、灵敏度分析

[0301] 1) 按照实施例9~16和对比例1-3中所示的检测乙肝病毒表面抗原的试剂盒及其检测方法进行实验,测试样本包括:采购自中国药品生物制品检定所的HBsAg定量参考品和定性参考品(批号:300003-201002),测量结果如下表一~二所示。其中,按照上述试剂盒提供的HBsAg标准品的十点曲线(A-J点),其中A点为稀释液,B点为1IU/ml,C点为3.162IU/ml,J点为10000IU/ml,对A,B,J点进行检测,RLU:相对光单位。

[0302] 2) 按照实施例17、实施例21和对比例4中所示的检测反三碘甲状腺原氨酸的试剂盒和及其检测方法进行实验,测试结果如下表三所示。

[0303] 3) 按照实施例18、实施例22和对比例5中所示的检测17 α -羟孕酮的试剂盒和及其检测方法进行实验,测试结果如下表四所示。

[0304] 4) 按照实施例19、实施例23和对比例6中所示的检测胃泌素-17的试剂盒和及其检测方法进行实验,测试结果如下表五所示。

[0305] 5) 按照实施例20、实施例24和对比例7中所示的检测血管紧张素I的试剂盒和及其检测方法进行实验,测试结果如下表六所示。

[0306] 2、加速稳定性分析

[0307] 采用乙肝病毒表面抗原标准品,用购买自美国scantibody公司的去激素人血清为溶剂配制成浓度为4ng/ml和12ng/ml的两份样品,其中,样本1为低浓度样品,样本2为高浓度样品。为验证试剂的稳定性,将本实施例9、实施例14、对比例1~3提供的试剂盒分别置于37℃环境下,对样本1和样本2连续监测7天,记录其RLU值的变化,结果如表七所示。

[0308] 表一、乙肝病毒表面抗原十点曲线RLU光强度检测数据

[0309]

浓度 IU/ml	实施例 9 (RLU)	实施例 10 (RLU)	实施例 11 (RLU)	实施例 12 (RLU)	实施例 13 (RLU)	实施例 14 (RLU)	实施例 15 (RLU)	实施例 16 (RLU)	对比例 1 (RLU)	对比例 2 (RLU)	对比例 3 (RLU)
0	900	926	1026	913	859	1089	891	956	1205	938	869
1	3014	3031	3074	2915	3014	2879	3019	3118	1021	1425	1504
3.162	6520	6021	6747	6904	6520	6720	6001	6650	6562	5545	4954
10	8790	9148	8907	9122	9302	8902	9320	9109	9556	9012	9012
31.623	11924	13046	12646	12566	10101	13046	11656	11542	11046	11053	12646
100	24717	24568	23565	21764	26251	20436	24648	28764	22455	28764	24564
316.228	50631	52869	59796	51201	54005	52221	51925	50864	47643	46465	58354
1000	700791	719803	709844	719189	798436	798455	709831	709840	709882	719877	729845
3162.28	984764	978762	913645	886251	904678	945368	945872	888764	914678	106725	112536
10000	1302145	1249217	1202146	1382114	1182125	1372144	1182155	1202127	782145	912145	892056

[0310] 按照实施例9~16中所示的检测乙肝病毒表面抗原的试剂盒及其检测方法进行实验,测试样本包括:采购自中国药品生物制品检定所的HBsAg定量参考品和定性参考品(批号:300003-201002),测量结果如上表所示。

[0311] 其中,按照上述试剂盒提供的HBsAg标准品的十点曲线,其中0点为稀释液,RLU:相对光单位。

[0312] 从上表可以看出采用新方案合成的八种ABEI衍生物标记的抗体,具有更高的灵敏度,其中实施例12的灵敏度最高,A/J点的比例达到了1514,从ABC三点可以看出实施例9-16在低点的灵敏度均优于对比例(1-3),同时相对于对比例2和对比例3,本发明ABEI衍生物的用量(物质的量)比前两者的用量少一半左右,说明对比例2和对比例3过多的标记也会对抗体的活性产生影响,从而导致灵敏度的降低。

[0313] 表二、国家参考品测定结果

[0314]

配置浓度 (IU/ml)	实施例 9 (RLU)	实施例 10 (RLU)	实施例 11 (RLU)	实施例 12 (RLU)	实施例 13 (RLU)	实施例 14 (RLU)	实施例 15 (RLU)	实施例 16 (RLU)	对比例 1 (RLU)	对比例 2 (RLU)	对比例 3 (RLU)
5.9	5.923	5.926	5.648	5.815	6.02	5.323	5.826	5.648	4.34.2	5.815	6.02
8.8	8.92	8.631	8.459	8.485	8.789	9.02	8.531	8.459	6.418	8.485	8.789

[0315]

13.2	13.114	13.017	13.814	13.991	14.008	13.514	13.417	13.814	9.445	13.989	14.018
19.8	19.932	19.335	19.981	18.879	19.745	20.032	19.205	19.551	18.254	18.879	19.745
29.6	29.771	30.343	28.369	29.153	30.003	28.771	30.773	29.369	28.052	29.223	30.093
44.4	44.809	44.098	44.18	44.998	46.727	45.165	44.628	45.18	32.157	43.998	42.727
66.7	66.597	69.347	68.729	71.259	67.245	64.237	69.307	65.729	48.261	71.259	69.245
100	100.375	98.587	103.217	105.645	100.18	102.375	98.517	103.217	61.024	105.645	101.18

[0316] 从上述结果可以看出,在5.9-100IU/ml浓度范围内,对比例2和对比例3与实施本发明实施例9-16比较,并没有明显差异,而对比例1的测试结果远偏离国家参考品的标准浓度,说明EDC法直接标记ABEI时,既存在ABEI偶联抗体,也有可能就会导致抗体与抗体之间的偶联,从而影响检测结果的准确性。本发明实施例9-16和对比例2、对比例3均属于定向与抗体偶联,其检测结果无明显差异。

[0317] 表三、rT3十点曲线RLU光强度检测数据

[0318]

配置浓度 (ng/ml)	实施例 17(RLU)	实施例 21 (RLU)	对比例 4(RLU)
0	692546	695463	666205
0.2	554646	565021	570122
0.326	434446	458693	495057
0.532	384764	401246	395453
0.867	286123	284642	294465
1.414	200846	225364	212886
2.306	135476	141458	144084
3.761	90456	94633	92766
6.132	50565	54458	54115
10	32253	32822	34371

[0319] 从上述十点曲线结果可以看出,在0-10ng/ml浓度下,实施例17和实施例21比对比例4的的曲线范围更大,其中实施例17的曲线范围最大,RLU从692546到32253,有利于测试精确度,本发明中实施例17在低值区域(0、0.2、0.236)的灵敏度要明显优于对比例4,这说明采用第一制备方法获得的异鲁米诺衍生物亲水性更好,且增加一定长度的手臂能提高检测的灵敏度。

[0320] 表四、17 α -OH孕酮十点曲线RLU光强度检测数据

[0321]

配置浓度 (ng/ml)	实施例 18 (RLU)	实施例 22 (RLU)	对比例 5 (RLU)
0	378862	369585	368752

[0322]

0.25	307952	310863	317728
0.433	264762	291410	277210
0.748	224564	225646	230845
1.294	184642	198887	191407
2.238	124556	129464	144409
3.869	100131	99472	107642
6.690	71464	79432	75573
11.567	42464	45886	45564
20	26143	27513	29108

[0323] 从上述十点曲线结果可以看出,在0-20ng/ml浓度下,实施例18和实施例22对比比例5的的曲线范围更大,其中实施例18的曲线范围最大,有利于测试精确度,本发明中实施例18在低值区域(0、0.25、0.433)的灵敏度要明显优于对比例5,这说明采用第一制备方法获得的异鲁米诺衍生物亲水性更好,且增加一定长度的手臂能提高检测的灵敏度。

[0324] 表五、胃泌素-17十点曲线RLU光强度检测数据

[0325]

配置浓度 (pmol/L)	实施例 19 (RLU)	实施例 23 (RLU)	对比例 6 (RLU)
0.000	990	1152	1352
1.000	3997	3647	3817
2.174	8247	7898	8007
4.729	17953	16891	17218
10.283	36557	34556	34467
22.361	74434	74025	71035
48.624	156412	134776	146397
105.737	377364	332463	324112
229.932	742611	755898	702608
500	1401236	1314542	1375074

[0326] 从上述十点曲线结果可以看出,在0-500pmol/L浓度下,实施例19和实施例29对比比例6的的曲线范围更大,其中实施例19的曲线范围最大,有利于测试精确度,本发明中实施例19在低值区域(0、1、2.174)的灵敏度要明显优于对比例5,这说明采用第一制备方法获得的异鲁米诺衍生物来标记抗体,能有效改善胃泌素-17测试的灵敏度。

[0327] 表六、血管紧张素I十点曲线RLU光强度检测数据

[0328]

配置浓度 (ng/ml)	实施例 20 (RLU)	实施例 24 (RLU)	对比例 7 (RLU)
0.000	414686	395055	384753
0.400	305647	327817	322087
0.667	264165	299982	296986
1.113	224558	261435	258189
1.857	204528	220462	218839
3.098	154640	180545	174037
5.169	119475	122525	129998
8.623	60158	64589	65624
14.386	69845	70998	75021
24	41135	47553	48711

[0329] 从上述十点曲线结果可以看出,在0-24ng/ml浓度下,实施例20和实施例24对比比例7的曲线范围大,其中实施例19的曲线范围最大,有利于测试精确度,本发明中实施例20在低值区域(0、1、2.174)的灵敏度要明显优于对比例7,说明采用第一制备方法获得的异鲁米诺衍生物有效改善AI测试的灵敏度。

[0330] 表七 乙肝病毒表面抗原试剂盒稳定性

天数	实施例 9		实施例 14		对比例 1		对比例 2		对比例 3	
	样本 1 /RLU	样本 2 /RLU	样本 1 /RLU	样本 2 /RLU	样本 1 /RLU	样本 2 /RLU	样本 1 /RLU	样本 2 /RLU	样本 1 /RLU	样本 2 /RLU
1	8325	7952	8201	7653	9830	9750	9533	9256	9125	8916
2	7962	7652	8014	7502	8932	9322	9258	9015	8978	8259
3	7852	7529	7822	7201	7822	9021	8945	8925	8526	8169
4	7806	7533	7509	7211	7689	8688	8536	8624	8201	7652
5	7782	7420	7449	7102	7295	8230	8426	8102	7865	7145
6	7750	7339	7426	7096	6932	7520	8024	7826	7220	7025
7	7729	7426	7453	7068	6142	6423	7698	7225	6958	6620
相对偏差	7.1%	7.7%	9.1%	7.6%	37.5%	34.1%	19.3	21.9%	23.7%	25.7%

[0331] 注:相对偏差=(第七天RLU-第一天RLU)/第一天RLU

[0332] 表七中,实施例9和实施例14的相对偏差均小于10%,说明在37℃条件下,试剂相对稳定。而对比例1的相对偏差约在34%到37%之间,可知对比例1的试剂盒对于温度已经非常敏感;对比例2的相对偏差约20%,对比例3的相对偏差在23%-26%。说明在37℃条件下,对比例2和对比例3相对于实施例9和实施例14,试剂较不稳定,这对于对周围环境要求非常高的直接化学发光检测(测量结果往往达到纳克级别甚至皮克级别)而言影响是非常大的。而对比例1中的试剂对温度相当敏感,可能是由于在37℃下,对比例1中抗体稳定性会发生较大的变化,导致测试结果出现很大的偏差。

[0333] 综上,上述实施例1-24结果表明,通过优化异鲁米诺衍生物的结构,各实施例制备

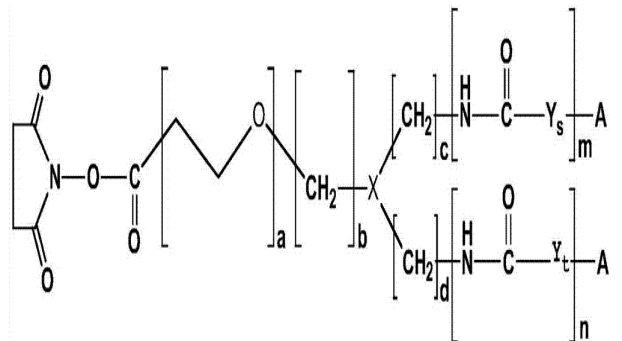
获得的异鲁米诺衍生物在标记各抗原或抗体后组成的不同试剂盒在用于检测时不仅增强现有鲁米诺-过氧化物体系的发光强度,提高测试灵敏度与检出限,且标记的抗原或抗体稳定性好。而且还降低现有ABEI发光标记物对抗体或抗原的标记量,减少过量标记对抗体或抗原活性的影响。

[0335] 虽然本发明已作了详细描述,但对本领域技术人员来说,在本发明精神和范围内的修改将是显而易见的。此外,应当理解的是,本发明记载的各方面、不同具体实施方式各部分、和列举的各种特征可被组合或全部或部分互换。在上述的各个具体实施方式中,那些参考另一个具体实施方式的实施方式可适当地与其它实施方式组合,这是将由本领域技术人员所能理解的。此外,本领域技术人员将会理解,前面的描述仅是示例的方式,并不旨在限制本发明。

专利名称(译)	一种异鲁米诺衍生物及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN107021952A	公开(公告)日	2017-08-08
申请号	CN2017110306622.0	申请日	2017-05-04
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市新产业生物医学工程股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市新产业生物医学工程股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市新产业生物医学工程股份有限公司		
[标]发明人	饶微 杜凯 刘蕾 雷斗剑		
发明人	饶微 杜凯 刘蕾 雷斗剑		
IPC分类号	C07D403/14 C07D405/14 C09K11/06 G01N33/533		
其他公开文献	CN107021952B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种发光强度高的增强型异鲁米诺衍生物及其制备方法，用于增强现有鲁米诺-过氧化物体系的发光强度，提高测试灵敏度与检出限；同时，降低发光标记物对抗体或抗原的标记量，减少过量标记对抗体或抗原活性的影响。本发明还公开了包含上述异鲁米诺衍生物的化学发光底液，或包含上述异鲁米诺衍生物标记的抗原或抗体的化学发光试剂盒以及化学发光免疫分析系统，已解决采用现有鲁米诺-过氧化物体系测试时灵敏度和检出限差的技术问题。本发明还提供了上述异鲁米诺衍生物在化学发光免疫定量分析中的应用。



(I)