



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107607702 A

(43)申请公布日 2018.01.19

(21)申请号 201710602802.3

(22)申请日 2017.07.21

(71)申请人 上海科华生物工程股份有限公司
地址 200233 上海市徐汇区钦州北路1189号

(72)发明人 杨晨辰 彭珊 何建文 姚姣妮

(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266
代理人 崔佳佳 马莉华

(51) Int. Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/74(2006.01)

G01N 33/64(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

C09K 11/07(2006.01)

权利要求书4页 说明书11页 附图2页

(54)发明名称

甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物的制备方法及其应用

(57)摘要

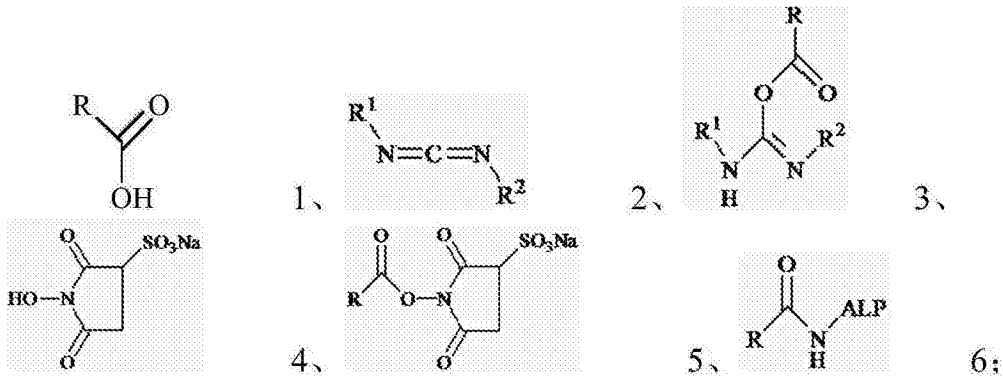
本发明公开了一种甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物及其制备方法。本发明利用修饰过的甾醇或甾醇类分子衍物所含有的羧基进行标记,利用碳二亚胺和N-羧基琥珀酰亚胺将甾醇或甾醇类分子衍物标记到碱性磷酸酶分子上。本发明的制备碱性磷酸酶标记甾醇类半抗原的方法效率高;本发明的交联物的各组分的活性好;本发明的交联物的灵敏度高;本发明的方法操作简便,制备周期短;本发明的甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物。

1. 甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物的制备方法,包括以下步骤:

1) 将式1所示含羧基的甾醇类半抗原与式2所示碳二亚胺类化合物反应得到式3所示O-酰基异脲中间体;

2) 将步骤1)得到的O-酰基异脲中间体与式4所示的N-羟基琥珀酰亚胺磺酸盐反应,得到式5所示的N-羟基琥珀酰亚胺中酯中间体;

3) 将步骤2)得到N-羟基琥珀酰亚胺中酯中间体与碱性磷酸酶进行交联反应,得到式6所示的甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物;



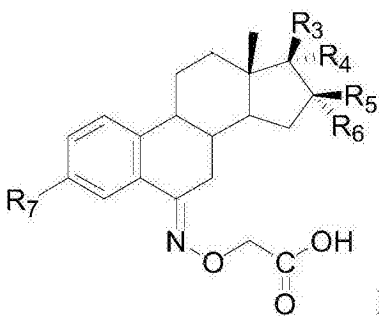
其中,R为甾醇类化合物;

R¹是取代或未取代的C₂₋₁₀烷基,优选C₂₋₆烷基,更优选C₂₋₃烷基,所述烷基由选自以下的取代基任选取代:卤素、羟基、巯基、氰基、硝基、C₁₋₃烷基、C₆₋₁₀芳基、C₁₋₃烷氧基、C₅₋₇杂环基和C₁₋₃卤代烷基;

R²是取代或未取代的环己烷基、异丙烷基、二甲基氨基丙基团和吗啉乙基,取代基任选取代:卤素、羟基、巯基、氰基、硝基、C₁₋₃烷基、C₆₋₁₀芳基、C₁₋₃烷氧基、C₅₋₇杂环基和C₁₋₃卤代烷基;

ALP为碱性磷酸酶。

2. 如权利要求1所述的制备方法,其特征在于,式1所示含羧基的甾醇类半抗原是:6位修饰了O-羧甲基脲结构的式II所示雌激素类化合物:



其中,R³是羟基、氢、取代或未取代的C₁₋₃烷基、取代或未取代的C₂₋₃烯基、取代或未取代的C₂₋₃炔基、取代或未取代的C₁₋₃烷氧基;

R⁴是羟基、氢、取代或未取代的C₁₋₃烷基、取代或未取代的C₂₋₃烯基、取代或未取代的C₂₋₃炔基、取代或未取代的C₁₋₃烷氧基;

R⁵是羟基、氢、取代或未取代的C₁₋₃烷基、取代或未取代的C₂₋₃烯基、取代或未取代的C₂₋₃炔基、取代或未取代的C₁₋₃烷氧基;

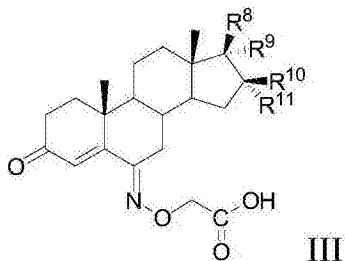
R⁶是羟基、氢、取代或未取代的C₁₋₃烷基、取代或未取代的C₂₋₃烯基、取代或未取代的C₂₋₃

炔基、取代或未取代的C₁₋₃烷氧基；

R⁷是羟基、氢、取代或未取代的C₁₋₃烷基、取代或未取代的C₂₋₃烯基、取代或未取代的C₂₋₃炔基、取代或未取代的C₁₋₃烷氧基；

或为：

6位修饰了O-羧甲基肟结构的式III所示雄激素类化合物：



其中，R⁸是羟基、氢、取代或未取代的C₁₋₃烷基、取代或未取代的C₂₋₃烯基、取代或未取代的C₂₋₃炔基、取代或未取代的C₁₋₃烷氧基；

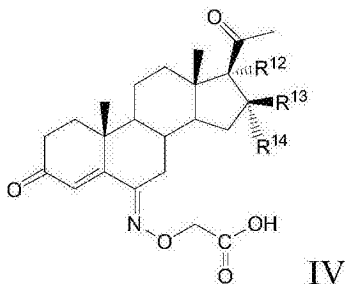
R⁹是羟基、氢、取代或未取代的C₁₋₃烷基、取代或未取代的C₂₋₃烯基、取代或未取代的C₂₋₃炔基、取代或未取代的C₁₋₃烷氧基；

R¹⁰是羟基、氢、取代或未取代的C₁₋₃烷基、取代或未取代的C₂₋₃烯基、取代或未取代的C₂₋₃炔基、取代或未取代的C₁₋₃烷氧基；

R¹¹是羟基、氢、取代或未取代的C₁₋₃烷基、取代或未取代的C₂₋₃烯基、取代或未取代的C₂₋₃炔基、取代或未取代的C₁₋₃烷氧基；

或为：

6位修饰了O-羧甲基肟结构的式IV所示孕激素类化合物：



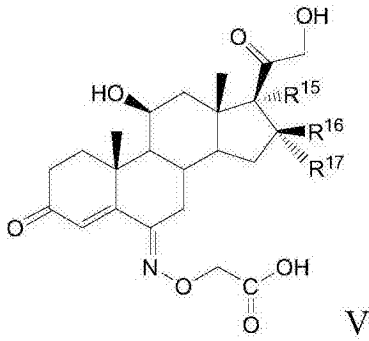
其中，R¹²是羟基、氢、取代或未取代的C₁₋₃烷基、取代或未取代的C₂₋₃烯基、取代或未取代的C₂₋₃炔基、取代或未取代的C₁₋₃烷氧基；

R¹³是羟基、氢、取代或未取代的C₁₋₃烷基、取代或未取代的C₂₋₃烯基、取代或未取代的C₂₋₃炔基、取代或未取代的C₁₋₃烷氧基；

R¹⁴是羟基、氢、取代或未取代的C₁₋₃烷基、取代或未取代的C₂₋₃烯基、取代或未取代的C₂₋₃炔基、取代或未取代的C₁₋₃烷氧基；

或为：

6位修饰了O-羧甲基肟结构的式V所示盐皮质激素类化合物：



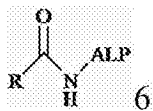
其中, R^{15} 是羟基、氢、取代或未取代的 C_{1-3} 烷基、取代或未取代的 C_{2-3} 烯基、取代或未取代的 C_{2-3} 炔基, 取代或未取代的 C_{1-3} 烷氧基;

R^{16} 是羟基、氢、取代或未取代的 C_{1-3} 烷基链, 取代或未取代的 C_{2-3} 烯基, 取代或未取代的 C_{2-3} 炔基, 取代或未取代的 C_{1-3} 烷氧基;

R^{17} 是羟基、氢、取代或未取代的 C_{1-3} 烷基链, 取代或未取代的 C_{2-3} 烯基, 取代或未取代的 C_{2-3} 炔基, 取代或未取代的 C_{1-3} 烷氧基。

3. 如权利要求2所述的制备方法, 其特征在于, 所述雌激素类化合物是雌二醇; 所述雄激素类化合物是睾酮; 所述孕激素类化合物是孕酮; 所述盐皮质激素类化合物是皮质醇。

4. 式6所示的甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物,



其中, R为甾醇类化合物;

ALP为碱性磷酸酶。

5. 如权利要求4所述的甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物, 其特征在于, 所述的甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物通过权利要求1-3中任一项所述的方法制备。

6. 如权利要求5所述的甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物, 其特征在于,

所述甾醇类化合物是雌激素类化合物、雄激素类化合物、孕激素类化合物、盐皮质激素类化合物;

优选地, 所述雌激素类化合物是雌二醇; 所述雄激素类化合物是睾酮; 所述孕激素类化合物是孕酮; 所述盐皮质激素类化合物是皮质醇。

7. 权利要求4-6中任一项所述的甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物或者权利要求1或2所述的制备方法制备的甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物在制备化学发光免疫检测试剂盒中的用途;

优选地, 所述化学发光免疫检测试剂盒是甾体激素检测试剂盒;

更优选地, 所述的甾体激素检测试剂盒包括但不限于: 孕酮测定试剂盒、睾酮测定试剂盒、雌二醇测定试剂盒和皮质醇测定试剂盒。

8. 一种化学发光免疫检测试剂盒, 所述试剂盒装有权权利要求4-6中任一项所述的甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物或者权利要求1或2所述的制备方法制备的甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物。

9. 如权利要求8所述的检测试剂盒的制备方法, 所述方法包括:

将权利要求4-6中任一项所述的甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物或者权利要求1或2

所述的制备方法制备的甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物制成检测试剂盒。

10. 一种检测方法,所述检测方法包括利用权利要求4-6中任一项所述的甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物或者权利要求1或2所述的制备方法制备的甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物进行化学发光免疫检测;

优选地,所述检测方法检测人血清或血浆样本中的孕酮、睾酮、雌二醇和皮质醇。

甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物的制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及体外诊断免疫分析领域。具体地说,本发明涉及甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物的交联物及其制备方法和包含所述交联物的化学发光检测试剂盒。

背景技术

[0002] 免疫分析法是利用抗原-抗体的特异性结合反应检测各种物质(例如药物、激素、蛋白质、微生物等)的分析方法。

[0003] 目前临床上进行免疫分析的方法主要有胶体金法、免疫比浊法、免疫荧光法、化学发光免疫分析法等。化学发光免疫分析法是一种较为先进的免疫学方法,具有反应时间短、灵敏度高、特异性好、线性范围宽、重复性好等优点,因此是市场应用前景最好且诊断最可靠的方法学为化学发光免疫分析法。

[0004] 化学发光免疫分析法需要利用酶,例如碱性磷酸酶的交联物。酶结合物的好坏取决于酶本身的活性和优秀的制备工艺。而酶交联物的好坏直接影响免疫分析最后的测定结果,因此是免疫试剂的关键技术。

[0005] 目前比较主流的酶标记技术有过碘酸钠法以及戊二醛法。然而,由于甾醇类半抗原不含伯氨基团,无法与碱性磷酸酶形成希夫氏碱,用传统的过碘酸钠法无法将碱性磷酸酶标记到甾醇类半抗原上;同样地,甾醇类半抗原也无法通过戊二醛与碱性磷酸酶结合。

[0006] 因此,本领域急需能够高效地将碱性磷酸酶标记到甾醇类半抗原上的方法。

发明内容

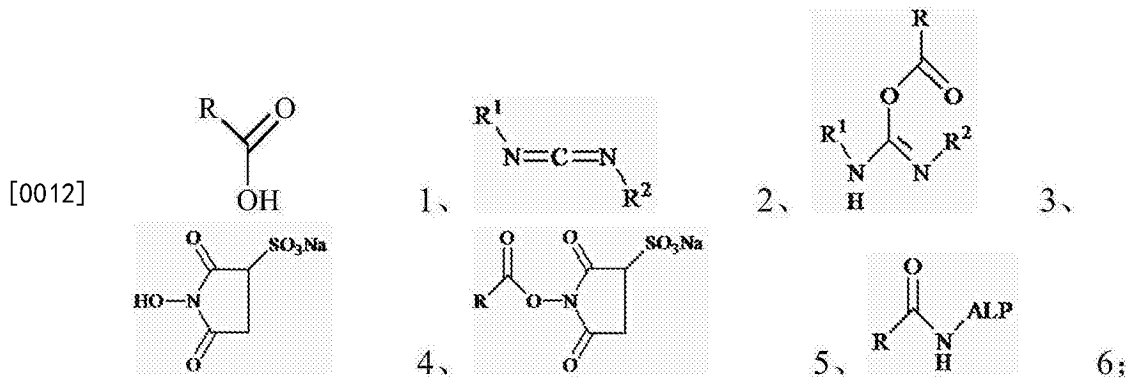
[0007] 本发明的目的在于提供高效地将碱性磷酸酶标记到甾醇类半抗原上的方法以及由此得到的甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物。

[0008] 在第一方面,本发明提供甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物的制备方法,包括以下步骤:

[0009] 1) 将式1所示含羧基的甾醇类半抗原与式2所示碳二亚胺类化合物反应得到式3所示O-酰基异脲中间体;

[0010] 2) 将步骤1)得到的O-酰基异脲中间体与式4所示的N-羟基琥珀酰亚胺磺酸盐反应,得到式5所示的N-羟基琥珀酰亚胺中酯中间体;

[0011] 3) 将步骤2)得到N-羟基琥珀酰亚胺中酯中间体与碱性磷酸酶进行交联反应,得到式6所示的甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物;



[0013] 其中,R为甾醇类化合物;

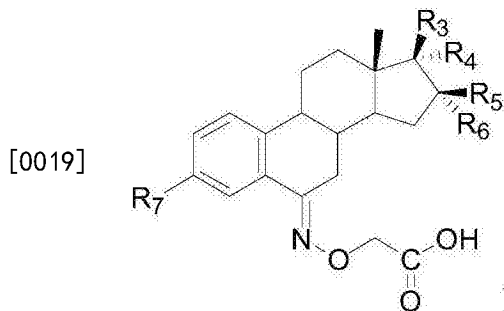
[0014] R¹是取代或未取代的C₂₋₁₀烷基,优选C₂₋₆烷基,更优选C₂₋₃烷基,所述烷基由选自以下的取代基任选取代:卤素、羟基、硫基、氰基、硝基、C₁₋₃烷基、C₆₋₁₀芳基、C₁₋₃烷氧基、C₅₋₇杂环基和C₁₋₃卤代烷基;

[0015] R²是取代或未取代的环己烷基、异丙烷基、二甲基氨丙基团和吗啉乙基,取代基任选取代:卤素、羟基、硫基、氰基、硝基、C₁₋₃烷基、C₆₋₁₀芳基、C₁₋₃烷氧基、C₅₋₇杂环基和C₁₋₃卤代烷基;

[0016] ALP为碱性磷酸酶。

[0017] 在具体的实施方式中,式I所示含羧基的甾醇类半抗原是:

[0018] 6位修饰了O-羧甲基脒结构的式II所示雌激素类化合物:



[0020] 其中,R³是羟基、氢、取代或未取代的C₁₋₃烷基、取代或未取代的C₂₋₃烯基、取代或未取代的C₂₋₃炔基、取代或未取代的C₁₋₃烷氧基;

[0021] R⁴是羟基、氢、取代或未取代的C₁₋₃烷基、取代或未取代的C₂₋₃烯基、取代或未取代的C₂₋₃炔基、取代或未取代的C₁₋₃烷氧基;

[0022] R⁵是羟基、氢、取代或未取代的C₁₋₃烷基、取代或未取代的C₂₋₃烯基、取代或未取代的C₂₋₃炔基、取代或未取代的C₁₋₃烷氧基;

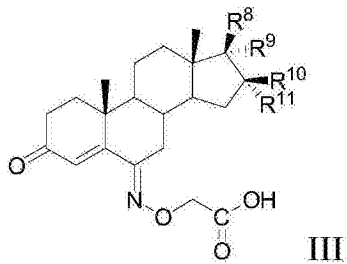
[0023] R⁶是羟基、氢、取代或未取代的C₁₋₃烷基、取代或未取代的C₂₋₃烯基、取代或未取代的C₂₋₃炔基、取代或未取代的C₁₋₃烷氧基;

[0024] R⁷是羟基、氢、取代或未取代的C₁₋₃烷基、取代或未取代的C₂₋₃烯基、取代或未取代的C₂₋₃炔基、取代或未取代的C₁₋₃烷氧基;

[0025] 或为:

[0026] 6位修饰了O-羧甲基脒结构的式III所示雄激素类化合物:

[0027]



[0028] 其中, R^8 是羟基、氢、取代或未取代的 C_{1-3} 烷基、取代或未取代的 C_{2-3} 烯基、取代或未取代的 C_{2-3} 炔基、取代或未取代的 C_{1-3} 烷氧基;

[0029] R^9 是羟基、氢、取代或未取代的 C_{1-3} 烷基、取代或未取代的 C_{2-3} 烯基、取代或未取代的 C_{2-3} 炔基、取代或未取代的 C_{1-3} 烷氧基;

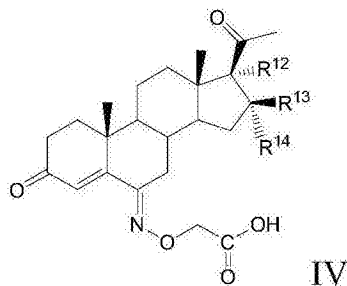
[0030] R^{10} 是羟基、氢、取代或未取代的 C_{1-3} 烷基、取代或未取代的 C_{2-3} 烯基、取代或未取代的 C_{2-3} 炔基、取代或未取代的 C_{1-3} 烷氧基;

[0031] R^{11} 是羟基、氢、取代或未取代的 C_{1-3} 烷基、取代或未取代的 C_{2-3} 烯基、取代或未取代的 C_{2-3} 炔基、取代或未取代的 C_{1-3} 烷氧基;

[0032] 或为:

[0033] 6位修饰了O-羧甲基脒结构的式IV所示孕激素类化合物:

[0034]



[0035] 其中, R^{12} 是羟基、氢、取代或未取代的 C_{1-3} 烷基、取代或未取代的 C_{2-3} 烯基、取代或未取代的 C_{2-3} 炔基、取代或未取代的 C_{1-3} 烷氧基;

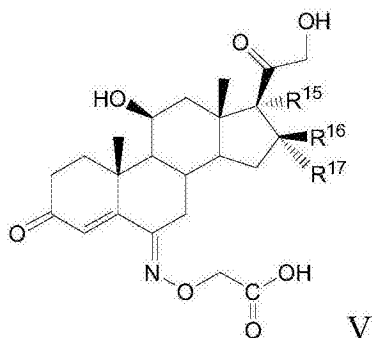
[0036] R^{13} 是羟基、氢、取代或未取代的 C_{1-3} 烷基、取代或未取代的 C_{2-3} 烯基、取代或未取代的 C_{2-3} 炔基、取代或未取代的 C_{1-3} 烷氧基;

[0037] R^{14} 是羟基、氢、取代或未取代的 C_{1-3} 烷基、取代或未取代的 C_{2-3} 烯基、取代或未取代的 C_{2-3} 炔基、取代或未取代的 C_{1-3} 烷氧基;

[0038] 或为:

[0039] 6位修饰了O-羧甲基脒结构的式V所示盐皮质激素类化合物:

[0040]



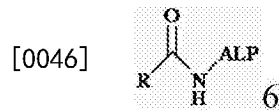
[0041] 其中, R^{15} 是羟基、氢、取代或未取代的 C_{1-3} 烷基、取代或未取代的 C_{2-3} 烯基、取代或未取代的 C_{2-3} 炔基, 取代或未取代的 C_{1-3} 烷氧基;

[0042] R^{16} 是羟基、氢、取代或未取代的 C_{1-3} 烷基链,取代或未取代的 C_{2-3} 烯基,取代或未取代的 C_{2-3} 炔基,取代或未取代的 C_{1-3} 烷氧基;

[0043] R^{17} 是羟基、氢、取代或未取代的 C_{1-3} 烷基链,取代或未取代的 C_{2-3} 烯基,取代或未取代的 C_{2-3} 炔基,取代或未取代的 C_{1-3} 烷氧基。

[0044] 在具体的实施方式中,所述雌激素类化合物是雌二醇;所述雄激素类化合物是睾酮;所述孕激素类化合物是孕酮;所述盐皮质激素类化合物是皮质醇。

[0045] 在第二方面,本发明提供式6所示的甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物,



[0047] 其中,R为甾醇类化合物;

[0048] ALP为碱性磷酸酶。

[0049] 在具体的实施方式中,所述的甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物通过本发明第一方面所述的方法制备。

[0050] 在具体的实施方式中,所述甾醇类化合物是雌激素类化合物、雄激素类化合物、孕激素类化合物、盐皮质激素类化合物;

[0051] 优选地,所述雌激素类化合物是雌二醇;所述雄激素类化合物是睾酮;所述孕激素类化合物是孕酮;所述盐皮质激素类化合物是皮质醇。

[0052] 在第三方面,本发明提供本发明第二方面所述的甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物或者本发明第一方面所述的制备方法制备的甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物在制备化学发光免疫检测试剂盒中的用途;

[0053] 优选地,所述化学发光免疫检测试剂盒是甾体激素检测试剂盒;

[0054] 更优选地,所述的甾体激素检测试剂盒包括但不限于:孕酮测定试剂盒、睾酮测定试剂盒、雌二醇测定试剂盒和皮质醇测定试剂盒。

[0055] 在第四方面,本发明提供一种化学发光免疫检测试剂盒,所述试剂盒装有本发明第二方面所述的甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物或者本发明第一方面所述的制备方法制备的甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物。

[0056] 在第五方面,本发明提供本发明第四方面所述的检测试剂盒的制备方法,所述方法包括:

[0057] 将本发明第二方面所述的甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物或者本发明第一方面所述的制备方法制备的甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物制成检测试剂盒。

[0058] 在第六方面,本发明提供一种检测方法,所述检测方法包括利用本发明第二方面所述的甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物或者本发明第一方面所述的制备方法制备的甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物进行化学发光免疫检测;

[0059] 优选地,所述检测方法检测人血清或血浆样本中的孕酮、睾酮、雌二醇和皮质醇。

[0060] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图说明

[0061] 图1是本发明的甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物制备方法的步骤1的示意图；

[0062] 图2是本发明的甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物制备方法的步骤2的示意图；和

[0063] 图3是本发明的甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物制备方法的步骤3的示意图。

具体实施方式

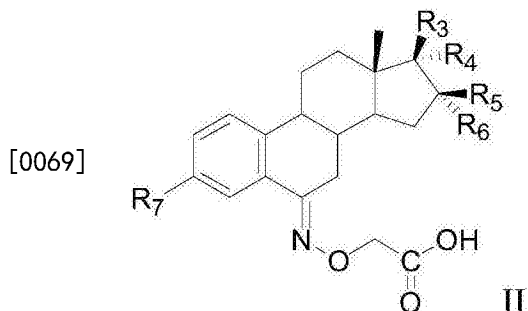
[0064] 发明人经过广泛而深入的研究,出乎意料地发现利用修饰过的甾醇或甾醇类分子衍物所含有的羧基基团进行标记,从而能够利用碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺将甾醇或甾醇类分子衍物标记到碱性磷酸酶分子上。在此基础上完成了本发明。

[0065] 甾醇类半抗原和甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物

[0066] 在本发明中,甾醇类化合物与甾醇类半抗原具备相同的意义。具体地说,甾醇类化合物是一类不具备免疫原性,但是具备免疫反应性的半抗原。甾体类化合物具有极重要的医药价值,在维持生命、调节性功能,对机体发展、免疫调节、皮肤疾病治疗及生育控制方面有明确的作用。

[0067] 为制备甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物,本发明在甾醇类化合物的6位修饰了O-羧甲基脒结构,包括但不限于:

[0068] 6位修饰了O-羧甲基脒结构的式II所示雌激素类化合物:



[0070] 其中, R^3 是羟基、氢、取代或未取代的 C_{1-3} 烷基、取代或未取代的 C_{2-3} 烯基、取代或未取代的 C_{2-3} 炔基、取代或未取代的 C_{1-3} 烷氧基;

[0071] R^4 是羟基、氢、取代或未取代的 C_{1-3} 烷基、取代或未取代的 C_{2-3} 烯基、取代或未取代的 C_{2-3} 炔基、取代或未取代的 C_{1-3} 烷氧基;

[0072] R^5 是羟基、氢、取代或未取代的 C_{1-3} 烷基、取代或未取代的 C_{2-3} 烯基、取代或未取代的 C_{2-3} 炔基、取代或未取代的 C_{1-3} 烷氧基;

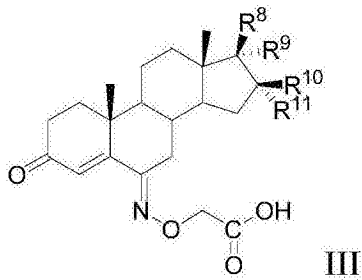
[0073] R^6 羟基、氢、取代或未取代的 C_{1-3} 烷基、取代或未取代的 C_{2-3} 烯基、取代或未取代的 C_{2-3} 炔基、取代或未取代的 C_{1-3} 烷氧基;

[0074] R^7 是羟基、氢、取代或未取代的 C_{1-3} 烷基、取代或未取代的 C_{2-3} 烯基、取代或未取代的 C_{2-3} 炔基、取代或未取代的 C_{1-3} 烷氧基;

[0075] 或

[0076] 6位修饰了O-羧甲基脒结构的式III所示雄激素类化合物:

[0077]



[0078] 其中, R^8 是羟基、氢、取代或未取代的 C_{1-3} 烷基、取代或未取代的 C_{2-3} 烯基、取代或未取代的 C_{2-3} 炔基、取代或未取代的 C_{1-3} 烷氧基;

[0079] R^9 是羟基、氢、取代或未取代的 C_{1-3} 烷基、取代或未取代的 C_{2-3} 烯基、取代或未取代的 C_{2-3} 炔基、取代或未取代的 C_{1-3} 烷氧基;

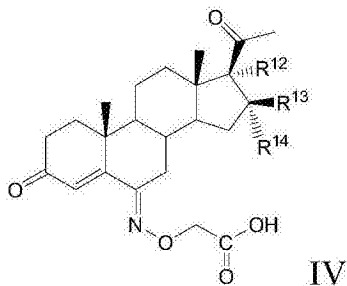
[0080] R^{10} 是羟基、氢、取代或未取代的 C_{1-3} 烷基、取代或未取代的 C_{2-3} 烯基、取代或未取代的 C_{2-3} 炔基、取代或未取代的 C_{1-3} 烷氧基;

[0081] R^{11} 是羟基、氢、取代或未取代的 C_{1-3} 烷基、取代或未取代的 C_{2-3} 烯基、取代或未取代的 C_{2-3} 炔基、取代或未取代的 C_{1-3} 烷氧基;

[0082] 或为:

[0083] 6位修饰了O-羧甲基脒结构的式IV所示孕激素类化合物:

[0084]



[0085] 其中, R^{12} 是羟基、氢、取代或未取代的 C_{1-3} 烷基、取代或未取代的 C_{2-3} 烯基、取代或未取代的 C_{2-3} 炔基、取代或未取代的 C_{1-3} 烷氧基;

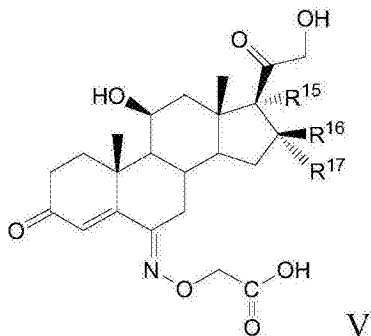
[0086] R^{13} 是羟基、氢、取代或未取代的 C_{1-3} 烷基、取代或未取代的 C_{2-3} 烯基、取代或未取代的 C_{2-3} 炔基、取代或未取代的 C_{1-3} 烷氧基;

[0087] R^{14} 是羟基、氢、取代或未取代的 C_{1-3} 烷基、取代或未取代的 C_{2-3} 烯基、取代或未取代的 C_{2-3} 炔基、取代或未取代的 C_{1-3} 烷氧基;

[0088] 或为:

[0089] 6位修饰了O-羧甲基脒结构的式V所示盐皮质激素类化合物:

[0090]



[0091] 其中, R^{15} 是羟基、氢、取代或未取代的 C_{1-3} 烷基、取代或未取代的 C_{2-3} 烯基、取代或未

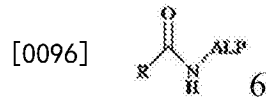
取代的C₂₋₃炔基,取代或未取代的C₁₋₃烷氧基;

[0092] R¹⁶是羟基、氢、取代或未取代的C₁₋₃烷基链,取代或未取代的C₂₋₃烯基,取代或未取代的C₂₋₃炔基,取代或未取代的C₁₋₃烷氧基;

[0093] R¹⁷是羟基、氢、取代或未取代的C₁₋₃烷基链,取代或未取代的C₂₋₃烯基,取代或未取代的C₂₋₃炔基,取代或未取代的C₁₋₃烷氧基。

[0094] 在具体的实施方式中,所述雌激素类化合物是雌二醇;所述雄激素类化合物是睾酮;所述孕激素类化合物是孕酮;所述盐皮质激素类化合物是皮质醇。

[0095] 在本发明的6位修饰了O-羧甲基脲结构的甾醇类化合物的基础上,本发明提供式6所示的甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物:



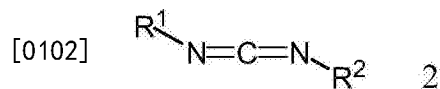
[0097] 其中,R为上述甾醇类化合物;ALP为碱性磷酸酶。

[0098] 本发明的方法

[0099] 目前,大多数交联技术都无法高效地将甾醇类半抗原标记到碱性磷酸酶分子上。因为在不经修饰的情况下,甾醇或甾醇类分子衍生物不含有胺基基团,而绝大多数交联技术都需要待标记分子上含有胺基基团。此外,目前将小分子半抗原交联到大蛋白分子也存在一定缺陷,因为在经过化学修饰的小分子半抗原需要经过化学分离技术,例如TLC或HPCL进行分离纯化,其过程复杂且得率较低。

[0100] 为解决现有技术中的上述缺陷,本发明提供的方法利用修饰过的甾醇或甾醇类分子衍生物所含有的羧基基团进行标记,利用碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺将甾醇或甾醇类分子衍生物标记到碱性磷酸酶分子上。因此,本发明主要用于偶联含有羧基基团的甾醇类半抗原衍生物。

[0101] 本发明方法中所用的碳二亚胺类化合物碳二亚胺化合物或它的盐具有式2所示结构:



[0103] 其中,R¹可以是取代或未取代的C₂₋₁₀烷基、优选C₂₋₆烷基、更优选C₂₋₃烷基,烷基由选自以下的取代基任选取代:卤素、羟基、硫基、氰基、硝基、烷基、芳基、烷氧基、杂环基和卤代烷基;

[0104] R²可以是取代或未取代的环己烷基、异丙烷基、二甲基氨基丙基团和吗啉乙基,取代基任选取代:卤素、羟基、硫基、氰基、硝基、烷基、芳基、烷氧基、杂环基和卤代烷基。

[0105] 具体地说,本发明的方法包括以下步骤:

[0106] 步骤一:

[0107] 通过零长度交联剂(碳二亚胺类化合物)与含有羧基基团的甾醇类半抗原反应,生成有O-酰基异脲中间体。

[0108] 上述步骤一如图1所示,其中分子式1为含有羧基基团的甾醇类半抗原,R为甾醇化合物;分子式2为碳二亚胺类化合物;分子式3为O-酰基异脲中间体;

[0109] 步骤二:

[0110] 将步骤一得到的O-酰基异脲中间体与N-羟基琥珀酰亚胺磺酸盐反应,得到N-羟基

琥珀酰亚胺中酯中间体。该中间体具有能够与含有胺基基团的分子反应的特性。

[0111] 上述步骤二如图2所示,其中分子式4为N-羟基琥珀酰亚胺磺酸盐;分子式5为O-酰基异脲中间体;

[0112] 步骤三:

[0113] 将N-羟基琥珀酰亚胺中酯中间体与碱性磷酸酶进行交联反应,经过一定的摩尔比例混合,形成标记有甾醇类半抗原的碱性磷酸酶交联物。

[0114] 上述步骤三如图3所示,其中ALP-N⁺H₃为含有伯胺基团的碱性磷酸酶;分子式6为标记有甾醇类半抗原的碱性磷酸酶交联物。

[0115] 本发明的优点:

[0116] 1. 本发明提供的制备碱性磷酸酶标记甾醇类半抗原的方法解决了现有的技术难点,高效地将碱性磷酸酶标记到甾醇类半抗原上,该交联物各个组分活性良好,标记物灵敏度优异,高于国外购买的碱性磷酸酶甾醇类半抗原标记物;

[0117] 2. 本发明所提供的交联技术不需要进行额外的化学分离操作,只需按照本发明所提供工艺参数进行操作,就能高效地标记甾醇类半抗原到碱性磷酸酶分子上。并且本发明所提供的交联技术,制备周期很短,只需一天即可完成制备过程。

[0118] 3. 利用本发明所提供的交联技术制备的甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物,其灵敏度远高于国外购买的甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物。

[0119] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

[0120] 除非另行定义,文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外,任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明方法中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

[0121] 实施例1

[0122] 将10mg碱性磷酸酶溶解于4mL 10mM PBS缓冲液(pH7.5)中,使碱性磷酸酶溶液终浓度为2.5mg/mL;同时将5mg的6位修饰了O-羧甲基肟结构的甾醇类化合物溶解于0.5mL DMF溶剂中,使其终浓度达到10mg/mL;将15mg EDAC溶解于0.5mL DMF溶剂中,使其终浓度达到30mg/mL;将15mg NHS溶解于0.5mL DMF溶剂中,使其终浓度达到30mg/mL。

[0123] 将上述的6位修饰了O-羧甲基肟结构的甾醇类化合物和EDAC溶液充分混合,室温反应15分钟;再加入上述NHS溶液,继续室温反应15分钟;随后吸取该混合溶液100 μ L,加入上述2.5mg/mL的碱性磷酸酶溶液中,充分混匀后室温反应2小时。

[0124] 将反应好的碱性磷酸酶溶液,经行脱盐纯化步骤,脱盐柱为3个串联的HiTrap 5mL Desalting(来源:GE Healthcare),脱盐平衡缓冲液为20mM Tris-HCl(pH8.0),得到的脱盐后的碱性磷酸酶溶液就是最终目标产物。

[0125] 对比例1. 雌激素类:雌二醇

[0126] 本实验的待测样本为含有1068pg/mL的雌二醇校准品,0pg/mL的雌二醇校准品,固相为包被有抗雌二醇抗体的磁微粒,酶标记物为标记有雌二醇半抗原的碱性磷酸酶交联物(通过实施例1方法制得),化学发光底物为Lumiphos 530(购自贝克曼库尔特公司),用

C1800型全自动化学发光免疫分析仪(上海科华实验系统有限公司)进行化学发光酶免疫分析检测,采用竞争法进行测定,碱性磷酸酶标记的雌二醇与样本中的雌二醇竞争结合抗体,经过洗脱未反应的酶,加入底物后检测发光值,使得检测样本的浓度与发光值成一定的反比例关系。仪器设置参数为样本加样量50uL,磁微粒加样量50uL,酶标记物溶液50uL,化学发光底物200uL,仪器设置为一步法反应;用3份样本进行测量,取平均值,结果见表1。样本所得发光值越大说明酶标记物的灵敏度高,特异性好。

[0127] 表1.各方法标记的雌二醇半抗原的碱性磷酸酶交联物检测发光值对比结果
[0128]

酶标记物	1068 pg/mL (结果为发光值)	0 pg/mL (结果为发光值)
本发明方法	541855	1501736
对比例(EDC、聚赖氨酸、戊二醛法)	180587	500478
外购商品化的酶标记物(来源:Fitzgerald)	33031	102860

[0129] 由表1结果可知,采用本发明的标记工艺制备的雌二醇半抗原碱性磷酸酶交联物,试剂的性能显著优于其它标记方法。

[0130] 对比例2.孕激素类:孕酮

[0131] 本实验的待测样本为含有43ng/mL的孕酮校准品,0ng/mL的孕酮校准品,固相为包被有抗孕酮抗体的磁微粒,酶标记物为标记有孕酮半抗原的碱性磷酸酶交联物(通过实施例1方法制得),化学发光底物为Lumiphos 530(购自贝克曼库尔特公司),用C1800型全自动化学发光免疫分析仪(上海科华实验系统有限公司)进行化学发光酶免疫分析检测,采用竞争法进行测定,碱性磷酸酶标记的孕酮与样本中的孕酮竞争结合抗体,经过洗脱未反应的酶,加入底物后检测发光值,使得检测样本的浓度与发光值成一定的反比例关系。仪器设置参数为样本加样量50uL,磁微粒加样量50uL,酶标记物溶液50uL,化学发光底物200uL,仪器设置为一步法反应;用3份样本进行测量,取平均值,结果见表2。样本所得发光值越大说明酶标记物的灵敏度高,特异性好。

[0132] 表2.孕酮半抗原的碱性磷酸酶交联物与外购商品化的酶标记物检测发光值对比结果

酶标记物	43 ng/mL (结果为发光值)	0 ng/mL (结果为发光值)
本发明方法	314987	2491178
外购商品化的酶标记物 (来源:Fitzgerald)	30377	239116

[0134] 由表2结果可知,采用本发明的标记工艺制备的孕酮半抗原碱性磷酸酶交联物,试剂的性能显著优于外购商品化的酶标记物。

[0135] 对比例3. 雄激素类: 睾酮

[0136] 本实验的待测样本为含有1500ng/dL的睾酮校准品,0ng/dL的睾酮校准品,固相为包被有抗睾酮抗体的磁微粒,酶标记物为标记有睾酮半抗原的碱性磷酸酶交联物(通过实施例1方法制得),化学发光底物为Lumiphos 530(购自贝克曼库尔特公司),用C1800型全自动化学发光免疫分析仪(上海科华实验系统有限公司)进行化学发光酶免疫分析检测,采用竞争法进行测定,碱性磷酸酶标记的睾酮与样本中的睾酮竞争结合抗体,经过洗脱未反应的酶,加入底物后检测发光值,使得检测样本的浓度与发光值成一定的反比例关系。仪器设置参数为样本加样量50uL,磁微粒加样量50uL,酶标记物溶液50uL,化学发光底物200uL,仪器设置为一步法反应;用3份样本进行测量,取平均值,结果见表3。样本所得发光值越大说明酶标记物的灵敏度高,特异性好。

[0137] 表3. 睾酮半抗原的碱性磷酸酶交联物与外购商品化的酶标记物检测发光值对比结果

[0138]

酶标记物	1500 ng/dL (结果为发光值)	0 ng/dL (结果为发光值)
本专利方法	153423	2389768
外购商品化的酶标记物(来源: Fitzgerald)	26296	216169

[0139] 由表3结果可知,采用本发明的标记工艺制备的睾酮半抗原碱性磷酸酶交联物,试剂的性能显著优于外购商品化的酶标记物。

[0140] 对比例4. 盐皮质激素类: 皮质醇

[0141] 本实验的待测样本为含有71.7ug/dL的皮质醇校准品,0ug/dL的皮质醇校准品,固相为包被有抗皮质醇抗体的磁微粒,酶标记物为标记有皮质醇半抗原的碱性磷酸酶交联物(通过实施例1方法制得),化学发光底物为Lumiphos 530(购自贝克曼库尔特公司),用C1800型全自动化学发光免疫分析仪(上海科华实验系统有限公司)进行化学发光酶免疫分析检测,采用竞争法进行测定,碱性磷酸酶标记的皮质醇与样本中的皮质醇竞争结合抗体,经过洗脱未反应的酶,加入底物后检测发光值,使得检测样本的浓度与发光值成一定的反比例关系。仪器设置参数为样本加样量50uL,磁微粒加样量50uL,酶标记物溶液50uL,化学发光底物200uL,仪器设置为一步法反应;用3份样本进行测量,取平均值,结果见表4。样本所得发光值越大说明酶标记物的灵敏度高,特异性好。

[0142] 表4. 皮质醇半抗原的碱性磷酸酶交联物与外购商品化的酶标记物检测发光值对比结果

[0143]

酶标记物	71.7 ug/dL	0 ug/dL
------	------------	---------

[0144]

	(结果为发光值)	(结果为发光值)
本专利方法	45559	2201036
外购商品化的酶标记物 (来源: Fitzgerald)	10125	45559

[0145] 由表4结果可知,采用本发明的标记工艺制备的皮质醇半抗原碱性磷酸酶交联物,试剂的性能显著优于外购商品化的酶标记物。

[0146] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

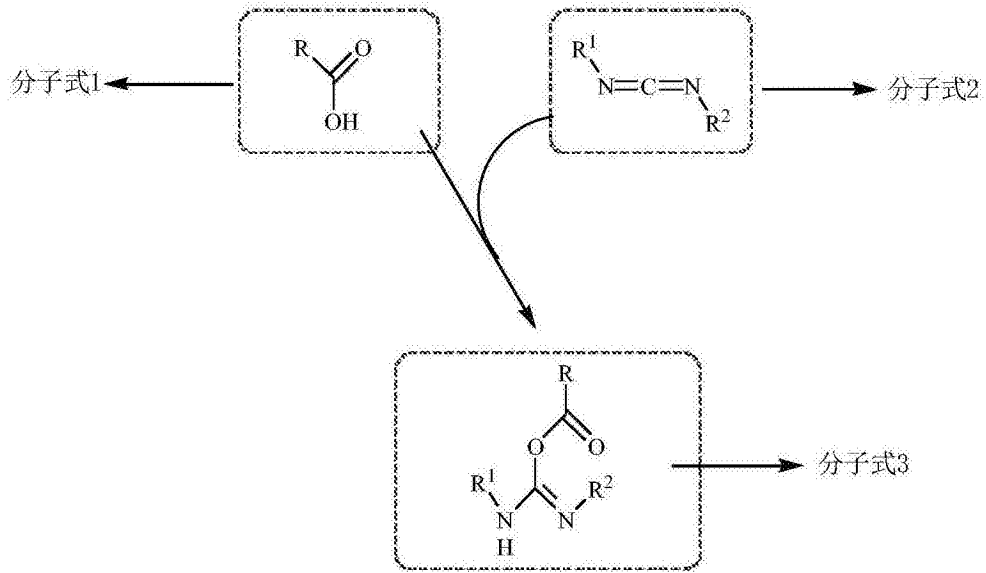


图1

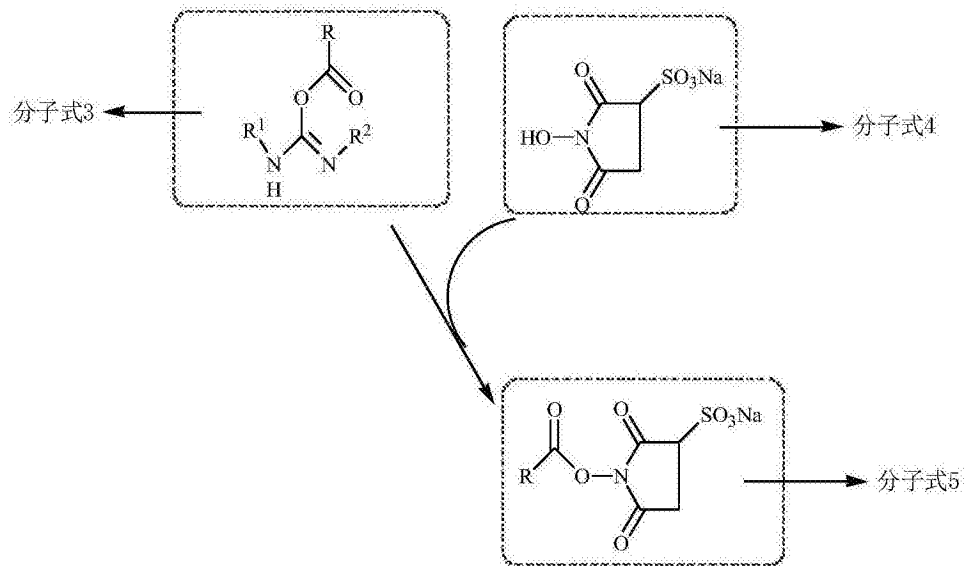


图2

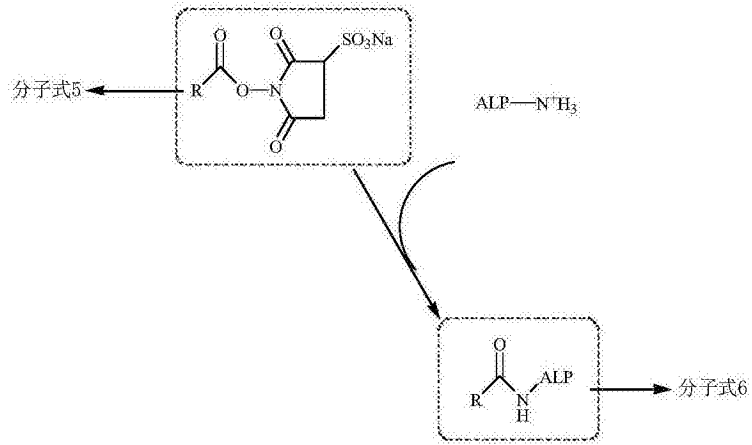


图3

专利名称(译)	甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物的制备方法及其应用		
公开(公告)号	CN107607702A	公开(公告)日	2018-01-19
申请号	CN2017110602802.3	申请日	2017-07-21
[标]申请(专利权)人(译)	上海科华生物工程股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海科华生物工程股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海科华生物工程股份有限公司		
[标]发明人	杨晨辰 彭珊 何建文 姚姣妮		
发明人	杨晨辰 彭珊 何建文 姚姣妮		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/74 G01N33/64 G01N21/76 C09K11/07		
代理人(译)	崔佳佳 马莉华		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物及其制备方法。本发明利用修饰过的甾醇或甾醇类分子衍物所含有的羧基进行标记，利用碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺将甾醇或甾醇类分子衍物标记到碱性磷酸酶分子上。本发明的制备碱性磷酸酶标记甾醇类半抗原的方法效率高；本发明的交联物的各组分的活性好；本发明的交联物的灵敏度高；本发明的方法操作简便，制备周期短；本发明的甾醇类半抗原-碱性磷酸酶交联物。

