



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 109928958 A

(43)申请公布日 2019.06.25

(21)申请号 201910212538.1

G01N 33/531(2006.01)

(22)申请日 2019.03.20

G01N 33/94(2006.01)

(71)申请人 苏州博源医疗科技有限公司

地址 215000 江苏省苏州市高新区锦峰路8号9号楼

(72)发明人 虞留明 张有涛

(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 糜婧

(51)Int.Cl.

C07D 403/14(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

C07K 14/435(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

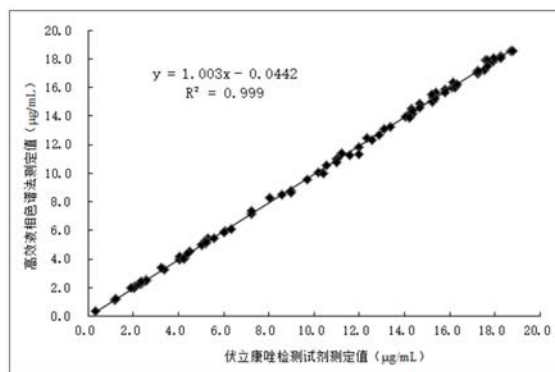
权利要求书5页 说明书20页 附图2页

(54)发明名称

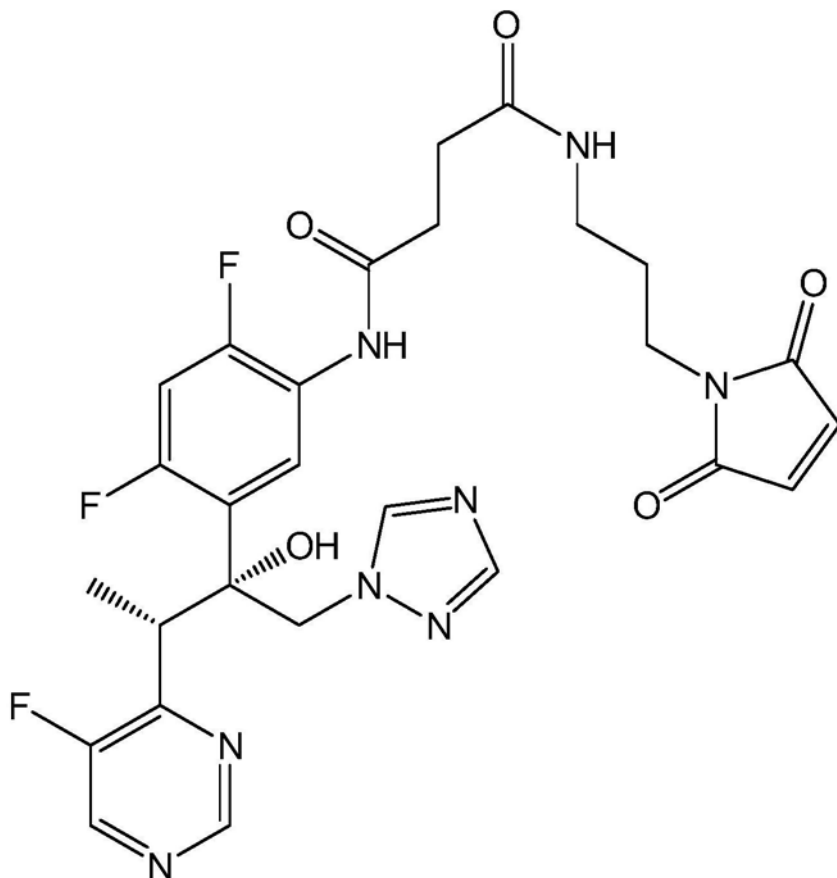
一种伏立康唑衍生物、其合成方法及一种伏立康唑免疫原、其制备方法及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种伏立康唑衍生物、其合成方法及一种伏立康唑免疫原、其制备方法及其应用;以伏立康唑衍生物制得的抗伏立康唑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,因此能够体现出较高的准确性、精密度、灵敏度和特异性;伏立康唑免疫原的应用为将伏立康唑免疫原用于制备抗伏立康唑特异性抗体和将抗伏立康唑特异性抗体用于制备伏立康唑检测试剂,该检测试剂可以实现在全自动生化分析仪上对伏立康唑高通量、快速化的检测。

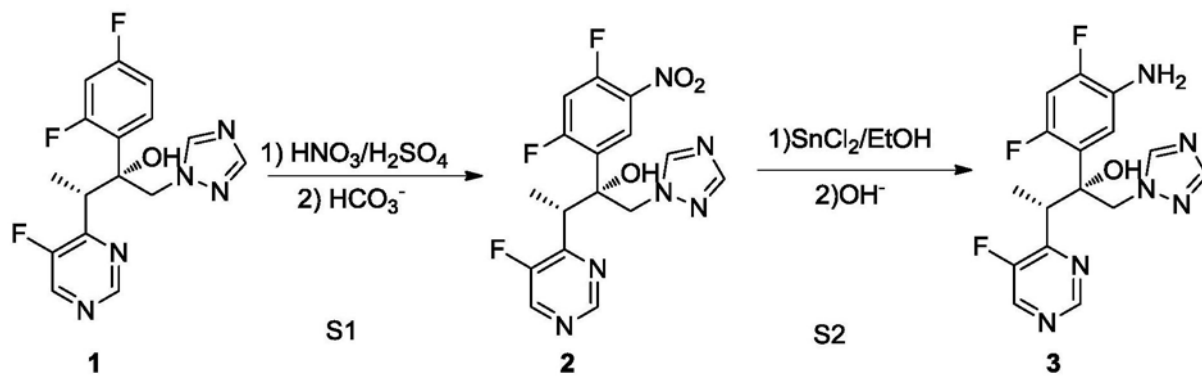


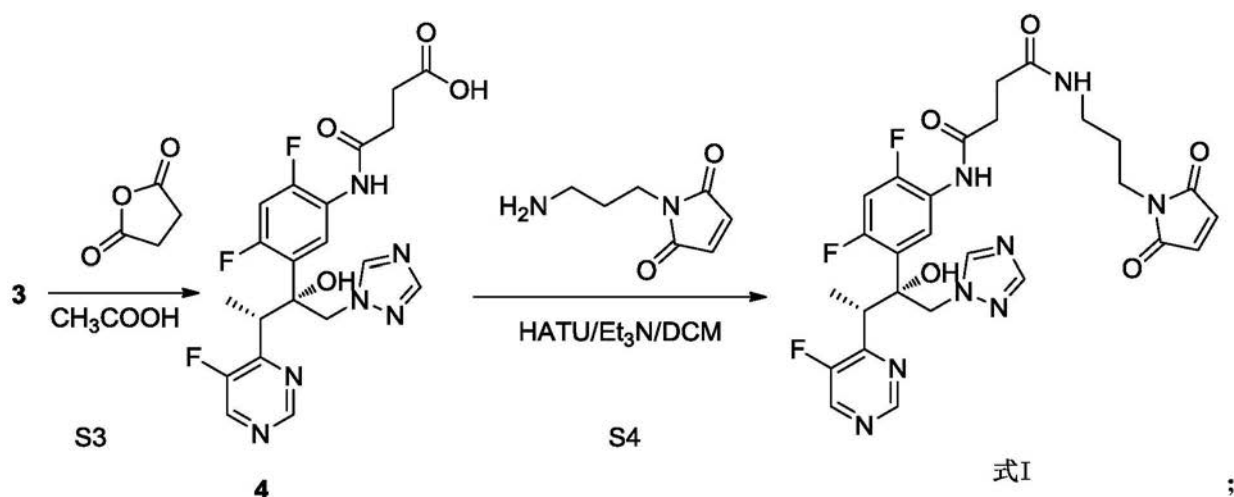
1. 一种伏立康唑衍生物, 其特征在于, 其结构式如式I所示:



式 I。

2. 一种如权利要求1所述的伏立康唑衍生物的合成方法, 其特征在于, 合成路线如下式所示:





反应过程包括以下步骤：

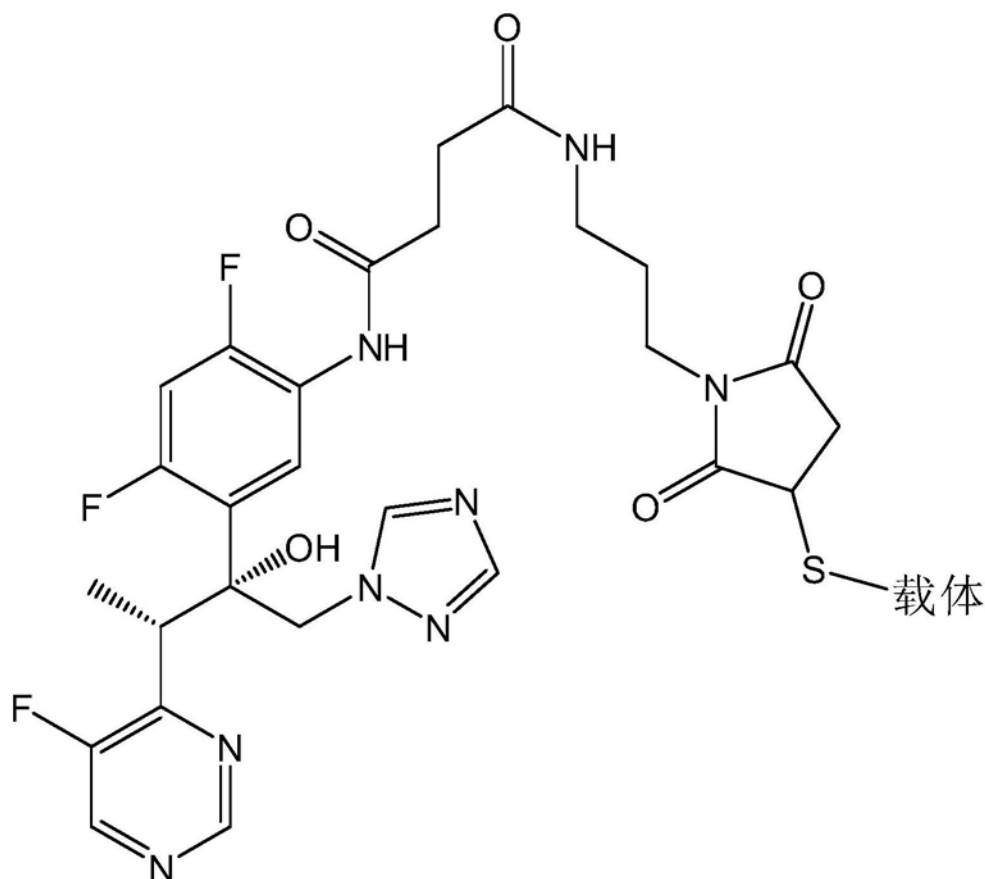
S1, 将化合物1与混酸反应, 加至饱和NaHCO₃溶液中, 并加入NaHCO₃调节pH至中性, 萃取、干燥、减压蒸馏, 得到化合物2;

S2, 将化合物2与SnCl₂加乙醇中, 减压蒸馏, 加入水、NaOH水溶液至中性, 萃取、干燥、减压蒸馏, 得到化合物3;

S3, 将化合物3、二氢-呋喃-2,5-二酮和冰醋酸混合, 减压蒸馏, 得到化合物4;

S4, 将化合物4、HATU、1-(3-氨基-丙基)-吡咯-2,5-二酮、Et₃N加二氯甲烷反应, 加入水用二氯甲烷萃取、干燥、减压蒸馏, 得到式I所示的伏立康唑衍生物。

3. 一种伏立康唑免疫原, 其特征在于, 其结构式如式 II 所示:



式 II；

其中,载体为具有免疫原性的蛋白质或多肽,优选地,载体为血清蛋白、血蓝蛋白和甲状腺球蛋白中的一种。

4. 根据权利要求3所述的伏立康唑免疫原的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

a. 称取磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠、氯化镁,共同溶解于去离子水中,调节pH至7.5-8.5,制成缓冲溶液A;

b. 称取载体蛋白,0-8℃下溶解于上述缓冲溶液A中,制成载体蛋白溶液;

c. 称取由权利要求1所述的伏立康唑衍生物,0-8℃下溶解于上述缓冲溶液A中,制成伏立康唑衍生物溶液;

d. 当上述伏立康唑衍生物溶液刚变澄清时,将其逐滴加入上述载体蛋白溶液中,然后将此混合溶液在-4~-8℃下搅拌2-8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伏立康唑免疫原溶液,在伏立康唑免疫原溶液中加入质量分数0.1-0.5%的NaN₃,于-20℃下储存。

5. 一种如权利要求3-4任一所述的伏立康唑免疫原的应用,其特征在于,包括将伏立康唑免疫原用于制备抗伏立康唑特异性抗体,和将抗伏立康唑特异性抗体用于制备伏立康唑均相酶免疫检测试剂。

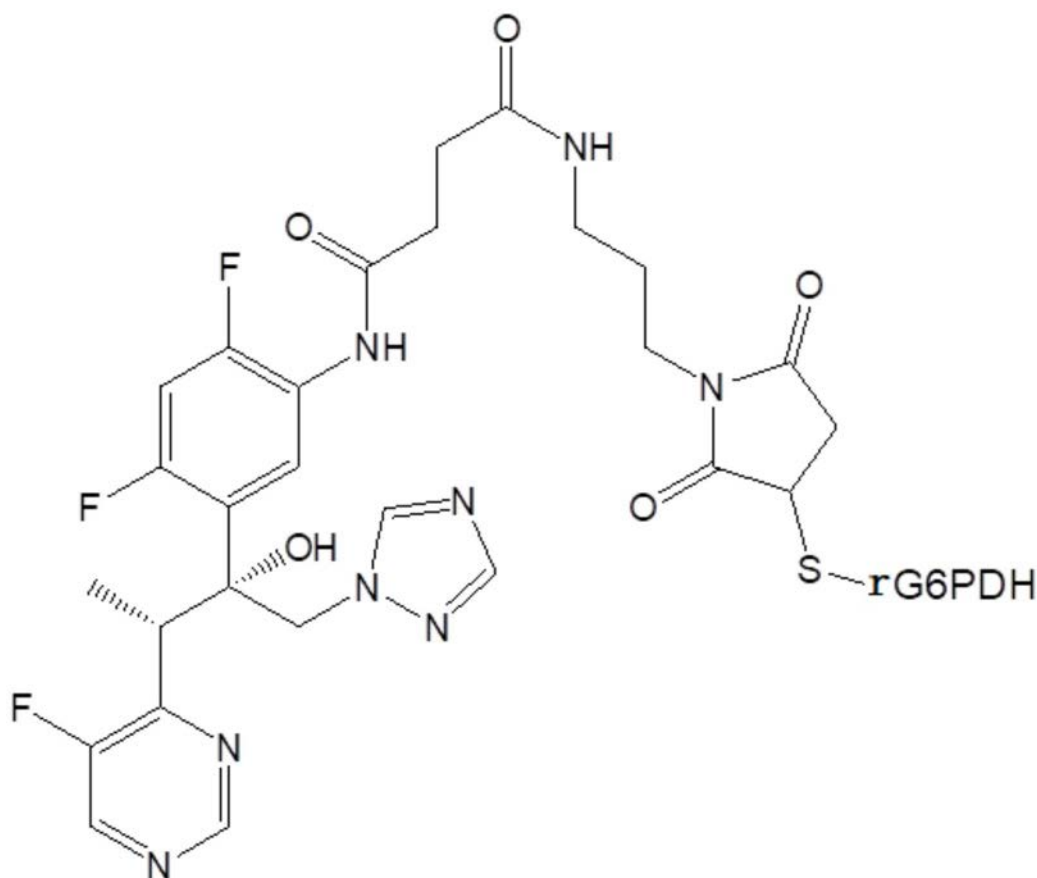
6. 根据权利要求5所述的伏立康唑免疫原的应用,其特征在于,所述抗伏立康唑特异性抗体为免疫实验动物后产生的完整抗体分子,具有与伏立康唑特异性结合能力的抗体片段和抗体衍生物中的一种;所述完整抗体分子、抗体片段和抗体衍生物,为采用所述的伏立康

唑免疫原对实验动物加强免疫所得到的多克隆抗体,或者为免疫后经体细胞杂交所得到的单克隆抗体;所述的实验动物为兔、山羊、小鼠、绵羊、豚鼠或马中的一种,优选地,所述实验动物为兔。

7. 根据权利要求6所述的伏立康唑免疫原的应用,其特征在于,所述抗伏立康唑特异性抗体的制备方法为:用PBS将伏立康唑免疫原进行稀释,得到抗原溶液,然后将抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合,对实验动物进行第一次注射;2-3周后,将抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂混合进行第二次注射;之后每隔3-6周将抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂混合注射一次,免疫步骤中共注射3至6次;对经免疫的实验动物取血并分离纯化,得到抗伏立康唑特异性抗体。

8. 根据权利要求5所述的伏立康唑免疫原的应用,其特征在于,所述伏立康唑酶标偶联物包括抗伏立康唑特异性抗体、伏立康唑酶标偶联物和酶的底物;所述伏立康唑酶标偶联物为重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与权利要求1所述的伏立康唑衍生物偶联而成的酶标偶联物;所述酶的底物为葡萄糖-6-磷酸;

所述伏立康唑酶标偶联物,其结构式如式III所示:



式III;

式中,rG6PDH代表重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶。

9. 根据权利要求8所述的伏立康唑免疫原的应用,其特征在于,所述伏立康唑酶标偶联物通过以下方法制备得到:

a. 称取磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠、氯化镁,共同溶解于去离子水中,调节pH至

7.5-8.5,制成缓冲溶液B;

b.称取重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,-4-4℃下溶解于上述缓冲溶液B中,制成重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液;

c.称取由权利要求1所述的伏立康唑衍生物,-4-4℃下溶解于上述缓冲溶液B中,制成伏立康唑衍生物溶液;

d.当上述伏立康唑衍生物溶液刚变澄清时,将其逐滴加入上述重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中,然后将此混合溶液在-4~-8℃下搅拌2-8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重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-伏立康唑酶标偶联物溶液,在重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-伏立康唑酶标偶联物溶液中加入质量分数0.1-0.5%的BSA和质量分数0.1-0.5%的NaN₃,于0~8℃下储存。

10.根据权利要求8所述的伏立康唑免疫原的应用,其特征在于,所述伏立康唑均相酶免疫检测试剂包括试剂A和试剂B:

所述试剂A为抗伏立康唑特异性抗体与酶的底物的混合液,通过以下步骤制备得到:将氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和葡萄糖-6-磷酸用浓度为55mmol/L、pH=8.0的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物;将抗伏立康唑特异性抗体加到均相酶底物中,抗伏立康唑特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:100-10000,得到试剂A;

所述试剂B为伏立康唑酶标偶联物溶液,通过以下步骤制备得到:将伏立康唑酶标偶联物加到浓度为120mmol/L、pH=8.2的Tris缓冲液中,伏立康唑酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:100-10000,得到试剂B。

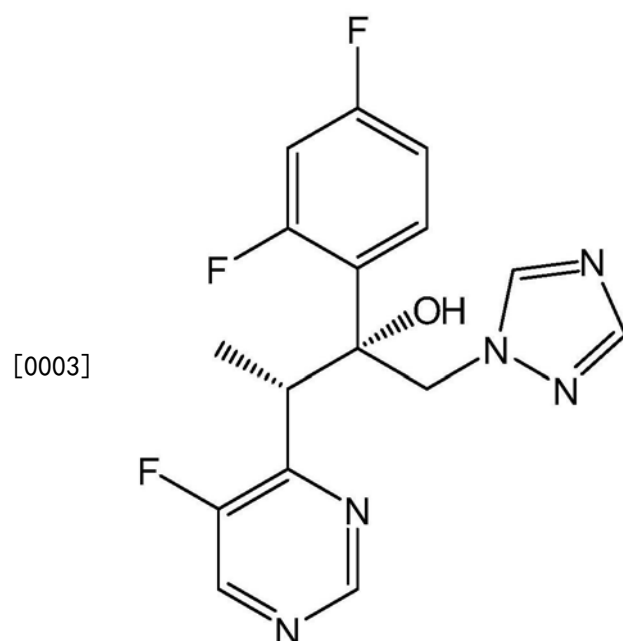
一种伏立康唑衍生物、其合成方法及一种伏立康唑免疫原、其制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种伏立康唑衍生物、其合成方法及一种伏立康唑免疫原、其制备方法及其应用,属于生物技术领域。

背景技术

[0002] 伏立康唑 (Voriconazole), 其结构式如式IV所示:



式IV;

[0004] 伏立康唑是一种三唑类抗真菌药,于2002年被FDA批准上市,对新型隐球菌、念珠菌、病原性酵母菌等有良好的抗菌活性,可用于治疗侵入性曲霉病、足放线病菌属、镰刀菌属等所致严重感染及非中性粒细胞减少的念珠菌血症,并经其他抗真菌药治疗后无效或不能耐受者。

[0005] 临床上,因伏立康唑的药动力学特征呈现剂量依赖性的非线性动力学特征,导致存在较大的个体差异。在标准给药方案下,伏立康唑的谷浓度 $C_{\min}$ 在 $0.2\text{--}12\mu\text{g/mL}^{-1}$ 范围内均有分布。英国指南推荐伏立康唑的 $C_{\min}$ 目标范围应在 $1\text{--}5\mu\text{g/mL}^{-1}$ 范围内以同时保证用药的安全性和有效性。

[0006] 在临床上,在给药后的静脉采血并通过色谱仪鉴定可以提供的实时监控,但对患者的介入性损害大,实施的实用性存疑。随着分析技术、药效指标测定、药动力学和药效学原理的发展,计算机技术的广泛应用,采用群体药动力学 (PPK) 模型优化个体给药,能有效在安全性和有效性中得到平衡。但建立这一模型的群体周期长,个体差异与群体动力学的参数的匹配稳定性存在一定的难度,耗资大而难以建立安全稳定的PPK指导。

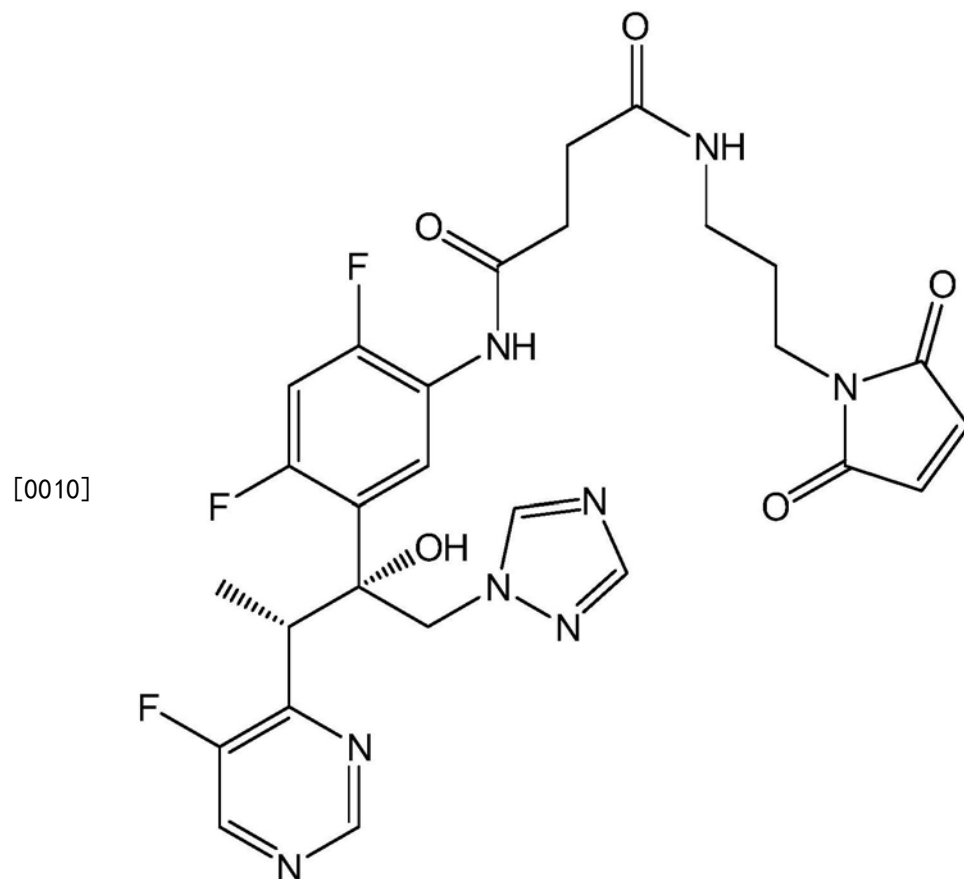
[0007] 目前,检测伏立康唑的常用方法为气相色谱-质谱法 (GC-MS)、高效液相色谱法

(HPLC) 和酶联免疫分析法 (ELISA) 等,但是这些方法操作复杂,在临床大规模推广应用方面均具有一定的局限性。目前市场上缺乏稳定性好、灵敏度高、特异性强的伏立康唑检测试剂,尤其是质量好的高通量自动化检验试剂。因此,研发一种质量达到临床要求、实用性强、性价比高,可应用于全自动生化分析仪的伏立康唑检测试剂已成为国内外体外诊断试剂行业的热点。均相酶免疫检测试剂可以实现在全自动生化分析仪上对伏立康唑的高通量、快速化检测,且具有操作简便、灵敏度高、特异性强、结果准确等优点,能有效满足国内日益增长

发明内容

[0008] 为了克服现有技术的不足,本发明的第一个目的在于提供一种伏立康唑衍生物,该衍生物为新合成物质,自然界中不存在。

[0009] 实现本发明的目的可以通过采取如下技术方案达到:一种伏立康唑衍生物,其结构式如式I所示:

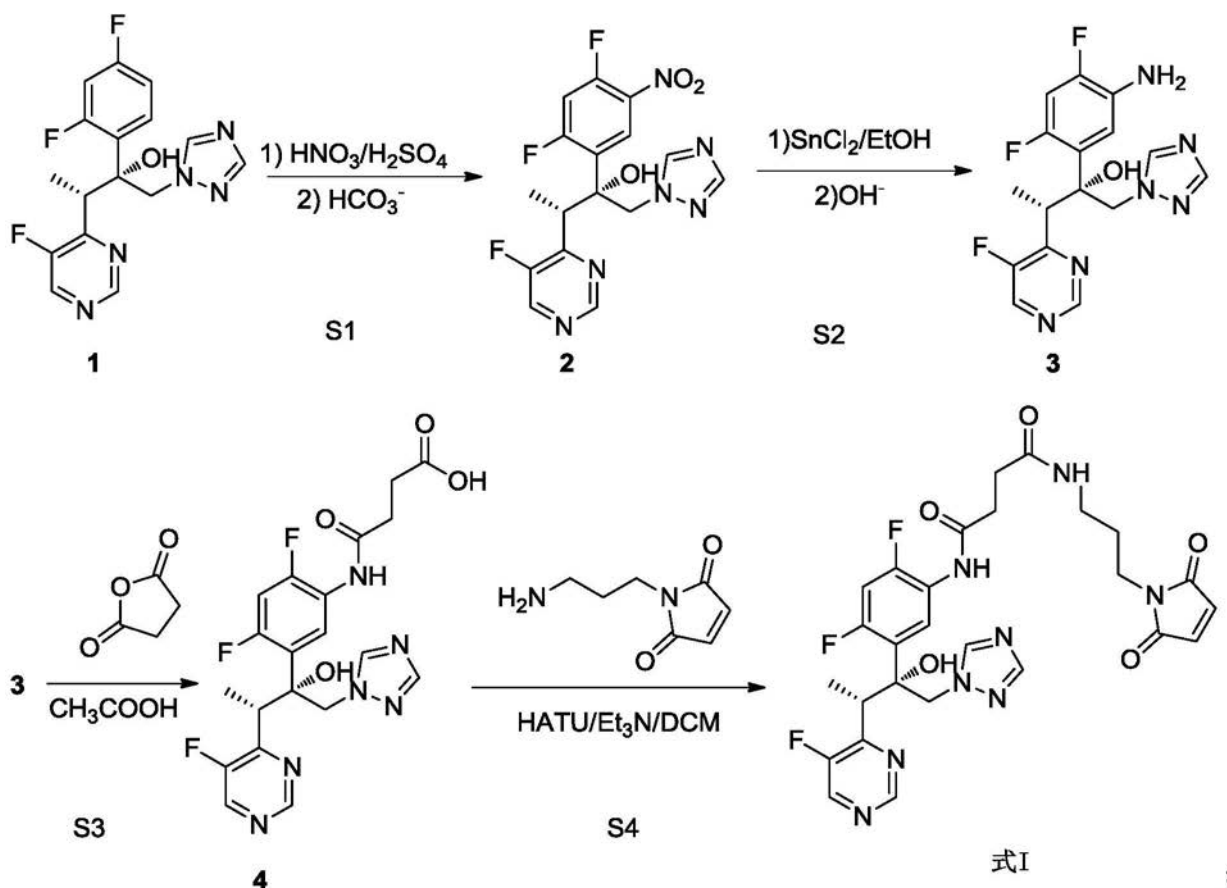


式 I。

[0011] 本发明的第二个目的在于提供一种伏立康唑衍生物的合成方法,该合成方法有别于常规合成方法,并具有良好的合成效果,显著提高伏立康唑衍生物的合成效率。

[0012] 实现本发明的目的可以通过采取如下技术方案达到:一种如上所述的伏立康唑衍生物的合成方法,合成路线如下式所示:

[0013]



[0014] 反应过程包括以下步骤:

[0015] S1, 将化合物1与混酸反应, 加至饱和 NaHCO_3 溶液中, 并加入 NaHCO_3 调节pH至中性, 萃取、干燥、减压蒸馏, 得到化合物2;

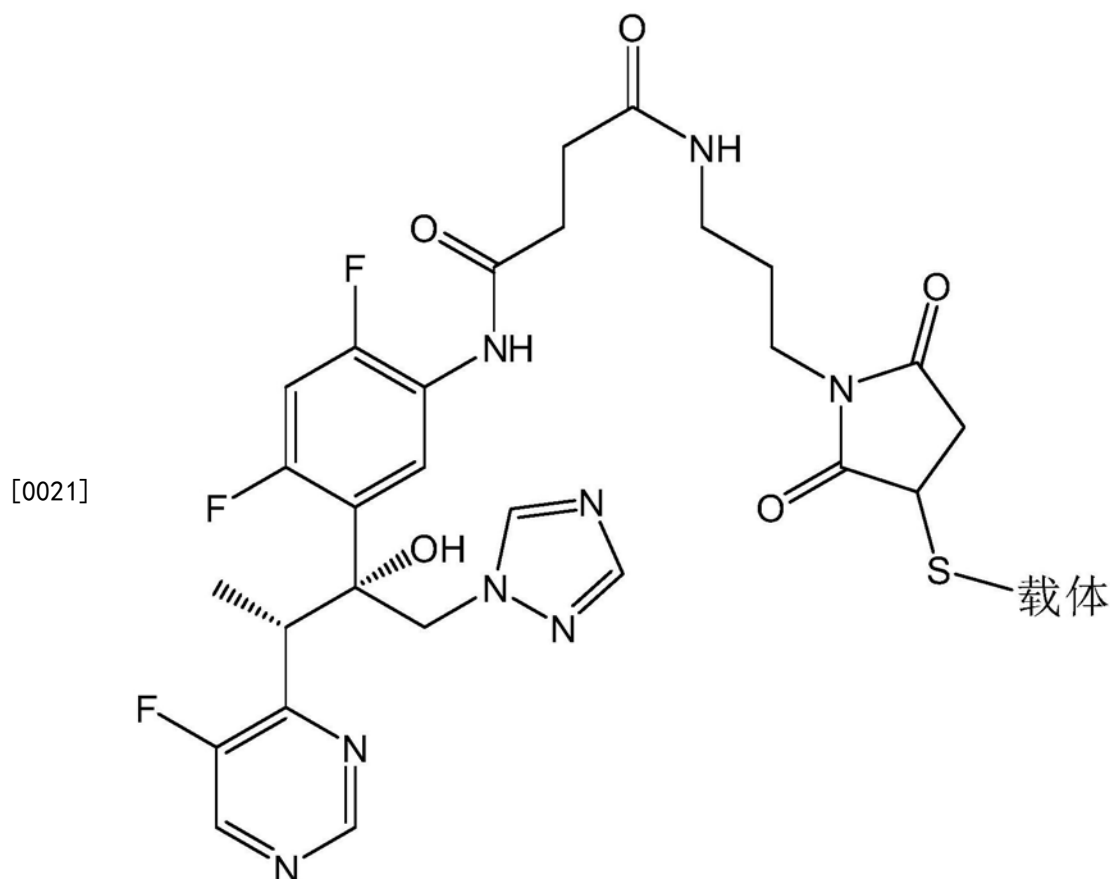
[0016] S2, 将化合物2与 SnCl_2 加乙醇中, 减压蒸馏, 加入水、 NaOH 水溶液至中性, 萃取、干燥、减压蒸馏, 得到化合物3;

[0017] S3, 将化合物3、二氢-呋喃-2,5-二酮和冰醋酸混合, 减压蒸馏, 得到化合物4;

[0018] S4, 将化合物4、HATU、1-(3-氨基-丙基)-吡咯-2,5-二酮、 Et_3N 加二氯甲烷反应, 加入水用二氯甲烷萃取、干燥、减压蒸馏, 得到式I所示的伏立康唑衍生物。

[0019] 本发明的第三个目的在于提供一种伏立康唑免疫原。

[0020] 实现本发明的目的可以通过采取如下技术方案达到: 一种如上所述的伏立康唑免疫原, 其结构式如式II所示:



式II；

[0022] 其中,载体为具有免疫原性的蛋白质或多肽,优选地,载体为血清蛋白、血蓝蛋白和甲状腺球蛋白中的一种,更优选地,载体为牛血清蛋白。

[0023] 本发明的第四个目的在于提供一种伏立康唑免疫原的制备方法。

[0024] 实现本发明的目的可以通过采取如下技术方案达到:一种伏立康唑免疫原的制备方法,包括以下步骤:

[0025] a.称取磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠、氯化镁,共同溶解于去离子水中,调节pH至7.5-8.5,制成缓冲溶液A;

[0026] b.称取载体蛋白,0-8℃下溶解于上述缓冲溶液A中,制成载体蛋白溶液;

[0027] c.称取由上述的伏立康唑衍生物,0-8℃下溶解于上述缓冲溶液A中,制成伏立康唑衍生物溶液;

[0028] d.当上述伏立康唑衍生物溶液刚变澄清时,将其逐滴加入上述载体蛋白溶液中,然后将此混合溶液在-4~-8℃下搅拌2-8小时;

[0029] 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伏立康唑免疫原溶液,在伏立康唑免疫原溶液中加入质量分数0.1-0.5%的 Na_3N_3 ,于-20℃下储存。

[0030] 本发明的第五个目的在于提供一种如上所述的伏立康唑免疫原的应用。

[0031] 实现本发明的目的可以通过采取如下技术方案达到:一种如上所述的伏立康唑免疫原的应用,包括将伏立康唑免疫原用于制备抗伏立康唑特异性抗体,和将抗伏立康唑特

异性抗体用于制备伏立康唑均相酶免疫检测试剂,该检测试剂可以实现在全自动生化分析仪上对伏立康唑高通量、快速化的检测。

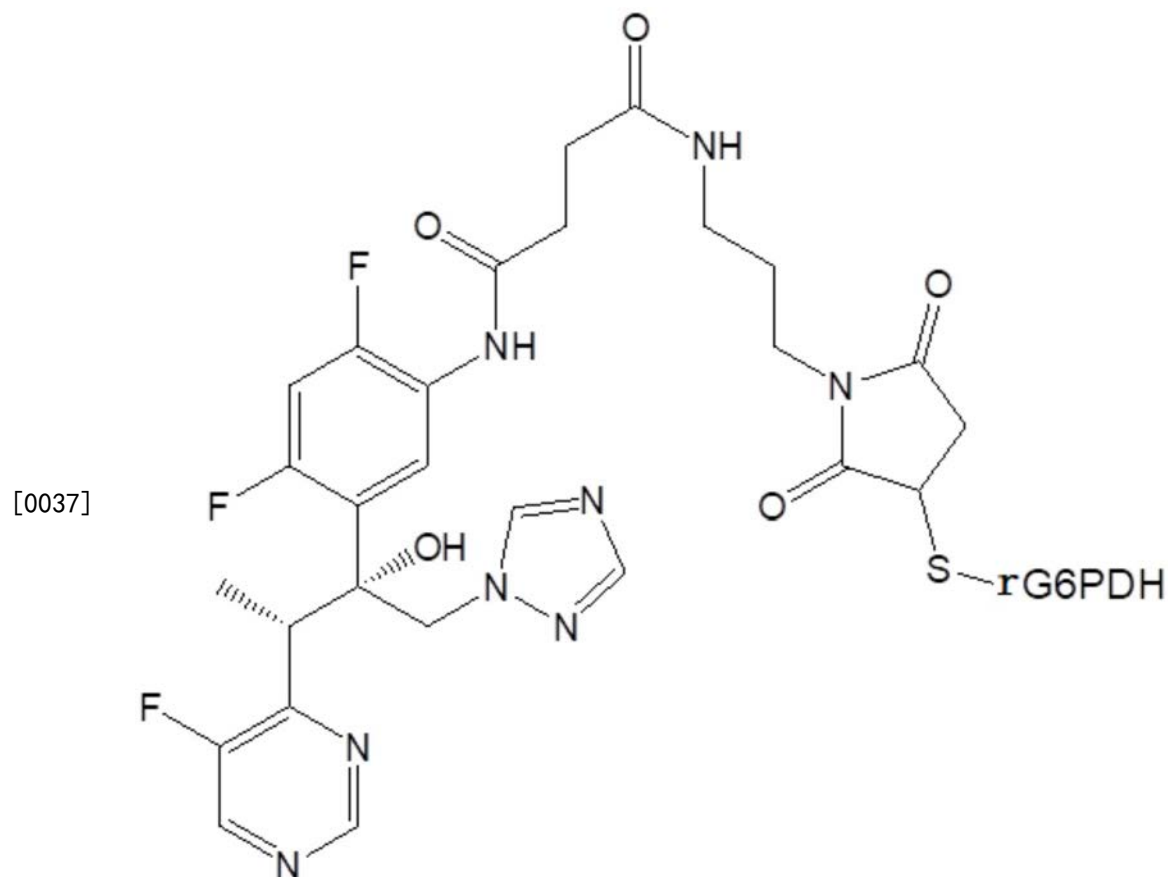
[0032] 进一步地,上述抗伏立康唑特异性抗体为免疫实验动物后产生的完整抗体分子,具有与伏立康唑特异性结合能力的抗体片段和抗体衍生物中的一种;完整抗体分子、抗体片段和抗体衍生物,为采用上述的伏立康唑免疫原对实验动物加强免疫所得到的多克隆抗体,或者为免疫后经体细胞杂交所得到的单克隆抗体;所述的实验动物为兔、山羊、小鼠、绵羊、豚鼠或马中的一种;优选地,所述实验动物为兔。

[0033] 进一步地,上述抗伏立康唑特异性抗体的制备方法为:

[0034] 用PBS将伏立康唑免疫原进行稀释,得到抗原溶液,然后将抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合,对实验动物进行第一次注射;2-3周后,将抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂混合进行第二次注射;之后每隔3-6周将抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂混合注射一次,免疫步骤中共注射3至6次;对经免疫的实验动物取血并分离纯化,得到抗伏立康唑特异性抗体。

[0035] 进一步地,上述伏立康唑均相酶免疫检测试剂包括抗伏立康唑特异性抗体、伏立康唑酶标偶联物和酶的底物;所述伏立康唑酶标偶联物为重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(rG6PDH)与上述式I所示的伏立康唑衍生物偶联而成的酶标偶联物;上述酶的底物为葡萄糖-6-磷酸。

[0036] 进一步地,上述伏立康唑酶标偶联物,其结构式如式III所示:



式III;

[0038] 式中,rG6PDH代表重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶。

[0039] 进一步地,上述伏立康唑酶标偶联物通过以下方法制备得到:

[0040] a.称取磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠、氯化镁,共同溶解于去离子水中,调节pH至7.5-8.5,制成缓冲溶液B;

[0041] b.称取重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,-4-4℃下溶解于上述缓冲溶液B中,制成重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液;

[0042] c.称取上述的伏立康唑衍生物,-4-4℃下溶解于上述缓冲溶液B中,制成伏立康唑衍生物溶液;

[0043] d.当上述伏立康唑衍生物溶液刚变澄清时,将其逐滴加入上述重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中,然后将此混合溶液在-4~-8℃下搅拌2-8小时;

[0044] 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重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-伏立康唑酶标偶联物溶液,在重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-伏立康唑酶标偶联物溶液中加入质量分数0.1-0.5%的BSA和质量分数0.1-0.5%的NaN₃,于0~8℃下储存。

[0045] 进一步地,上述伏立康唑均相酶免疫检测试剂包括试剂A和试剂B:

[0046] 所述试剂A为抗伏立康唑特异性抗体和酶的底物混合液,通过以下步骤制备得到:

[0047] 将氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和葡萄糖-6-磷酸用浓度为55mmol/L、pH=8.0的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物;将抗伏立康唑特异性抗体加到均相酶底物中,抗伏立康唑特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:100-10000,得到试剂A;

[0048] 所述试剂B为伏立康唑酶标偶联物溶液,通过以下步骤制备得到:

[0049] 将伏立康唑酶标偶联物加到浓度为120mmol/L、pH=8.2的Tris缓冲液中,伏立康唑酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:100-10000,得到试剂B。

[0050] 抗伏立康唑特异性抗体与均相酶底物的体积比优选为1:850;

[0051] 伏立康唑酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比优选为1:1700。

[0052] 相比现有技术,本发明的有益效果在于:

[0053] 1、本发明的伏立康唑衍生物及合成方法均为针对性的新研究与设计,在现有技术中并不存在;

[0054] 2、本发明以伏立康唑衍生物制得的伏立康唑免疫原和抗体其灵敏度、特异性都比直接用伏立康唑原物制备的免疫原和抗体高,制备出的抗伏立康唑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,因此能够体现出较高的准确性、精密度、灵敏度和特异性;

[0055] 3、本发明制备伏立康唑酶标偶联物的过程中,使用了通过基因克隆与基因重组技术对编码葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)的基因进行特异位点修饰与重组,然后再利用转基因技术与微生物发酵手段制备出的重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(rG6PDH),从而使检测灵敏度提高了10~30倍。

[0056] 4、本发明的伏立康唑均相酶免疫检测试剂可以实现在全自动生化分析仪上对伏立康唑高通量、快速化的检测,能同时测定多个样品,具有操作简便、灵敏度高、特异性强、结果准确等优点,还能有效降低伏立康唑检测成本,有利于临床推广使用。

附图说明

[0057] 图1为实施例4ELISA检测的标准曲线；

[0058] 图2为实施例7伏立康唑均相酶免疫检测方法的标准曲线；

[0059] 图3为实施例9伏立康唑临床标本免疫检测与高效液相色谱检测对比数据的散点图。

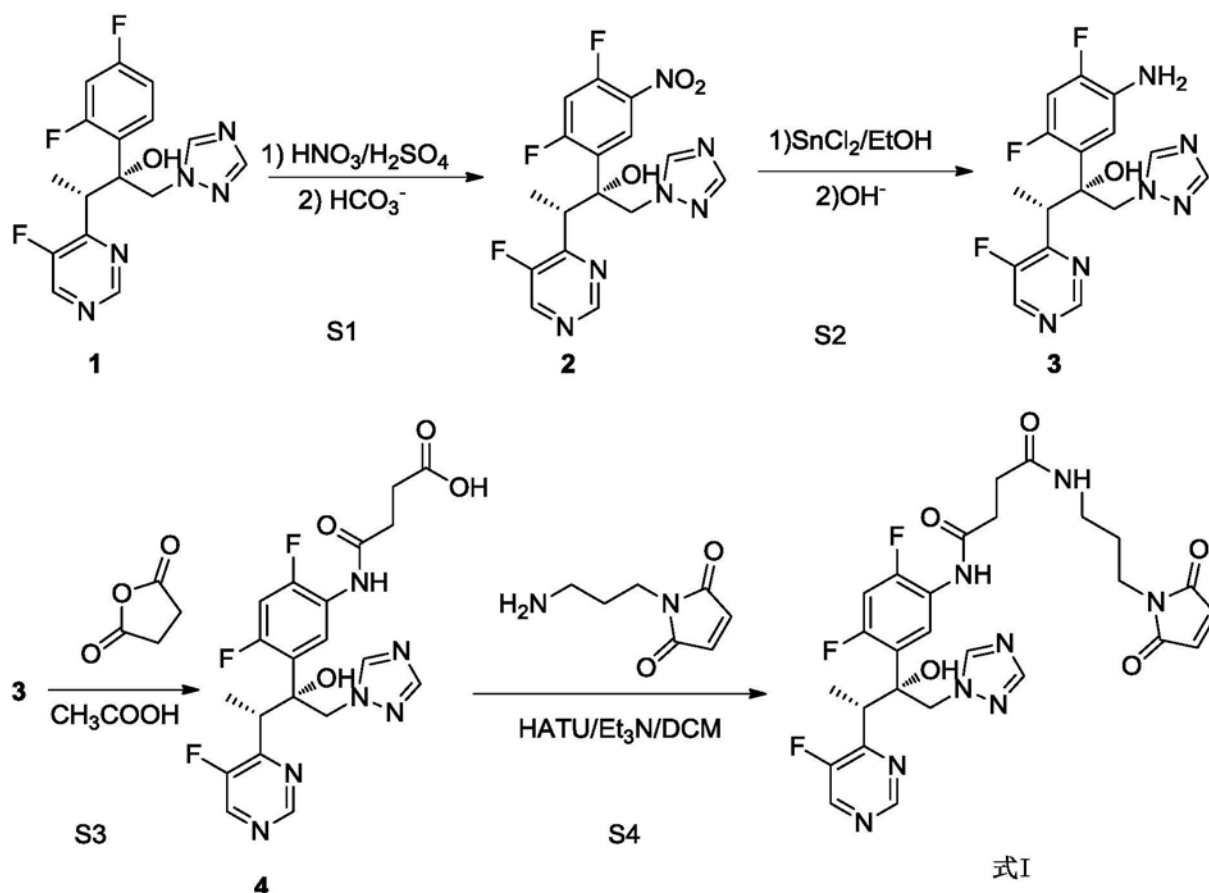
具体实施方式

[0060] 下面,结合附图以及具体实施方式,对本发明做进一步描述:

[0061] 实施例1:伏立康唑衍生物的合成及其分析鉴定

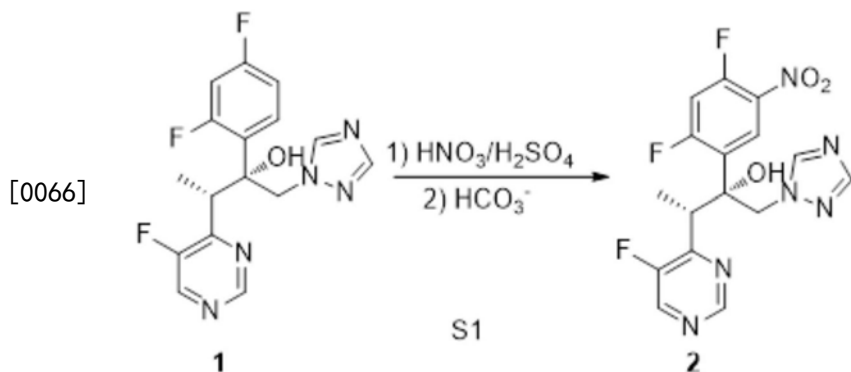
[0062] 通过以下合成路线合成伏立康唑衍生物:

[0063]



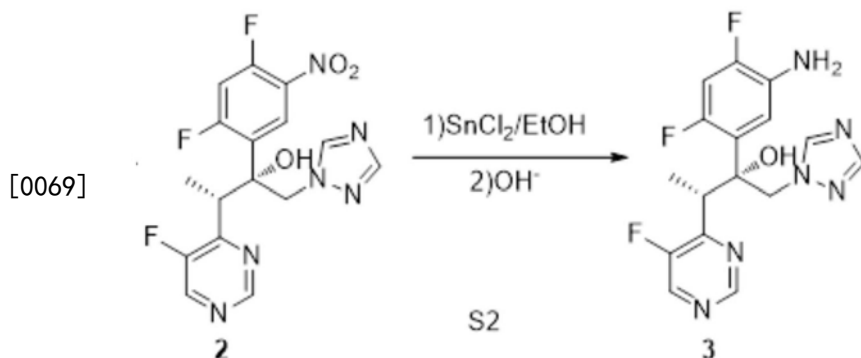
[0064] 具体的合成步骤如下:

[0065] 1) 化合物2的合成:



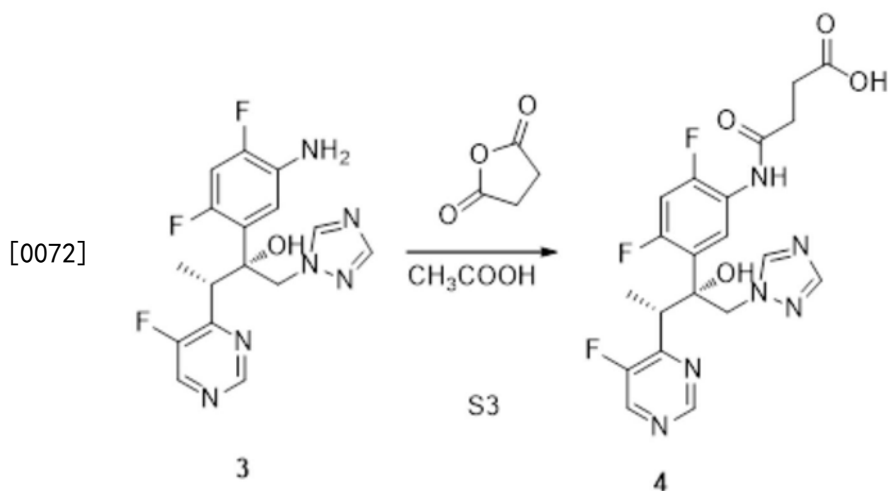
[0067] 将化合物1 (5.0g, 14.3mmol)、发烟 HNO_3 (3mL) 和浓 H_2SO_4 (15mL) 混合, 于室温下搅拌3h; 反应后的物料倒入冷的饱和 NaHCO_3 溶液中, 加入 NaHCO_3 调节pH至中性, 用乙酸乙酯萃取。有机相用无水硫酸钠干燥, 减压蒸馏, 得到类白色固体。通过快速色谱法 (0-50% 乙酸乙酯: 己烷) 纯化得到的残余物, 得到化合物2, 为白色固体, 5g (88%)。

[0068] 2) 化合物3的合成:



[0070] 将化合物2 (5.0g, 12.7mmol), SnCl_2 (11.5g, 50.8mmol) 和 EtOH (50mL) 混合, 于室温下搅拌1小时, 减压蒸馏。加入水 (50mL) 并通过加入1N NaOH 水溶液将pH调节至7。将溶液用乙酸乙酯萃取。有机相用无水硫酸钠干燥, 并减压蒸馏, 得到化合物3, 为白色固体, 4g (86%)。

[0071] 3) 化合物4的合成:



[0073] 将化合物3 (4.0g, 11.1mmol), 二氢-呋喃-2,5-二酮 (1.3g, 13.2mmol) 和冰醋酸 (50mL) 混合, 在室温下搅拌1小时, 减压蒸馏。通过快速色谱法 (0-10% 甲醇: 二氯甲烷) 纯化

得到的残余物,得到化合物4,为白色固体,4g (78%) ;

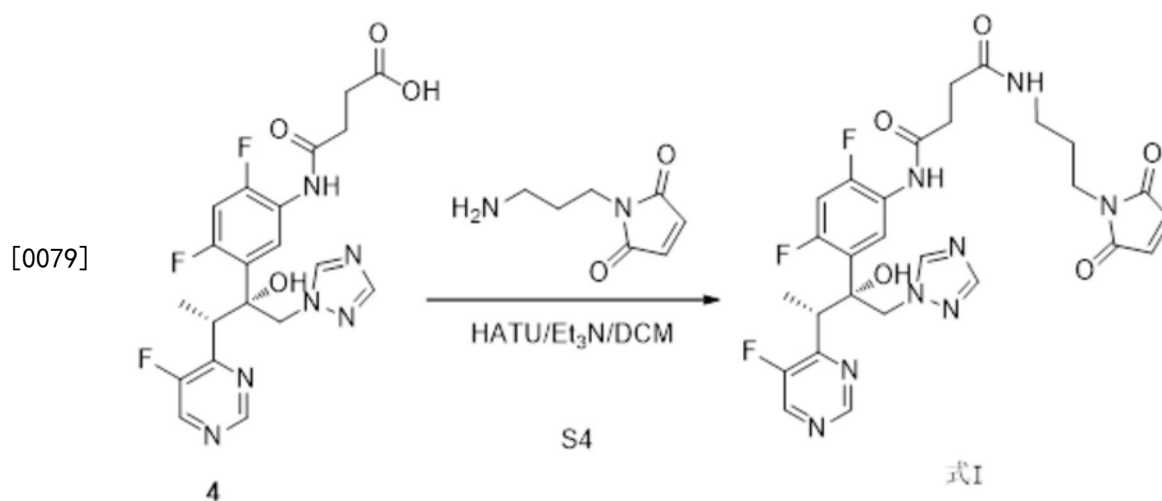
[0074] 化合物4的结构鉴定:利用Bruker Avance III plus 400MHz和VARIAN MERCURY plus 300M对上述白色固体化合物4进行核磁共振光谱扫描,采用TMS作为内标。结果如下:

[0075] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO-d_6) : δ 1.10-1.12 (m, 3H) , 2.24-2.25 (m, 2H) , 2.59-2.61 (m, 2H) , 2.64-2.67 (m, 1H) , 3.88-3.90 (m, 1H) , 4.33-4.37 (d, 1H) , 4.78-4.81 (d, 1H) , 5.98 (s, 1H) , 7.22-7.27 (t, 1H) , 7.64 (s, 1H) , 7.70-7.75 (t, 1H) , 8.25 (s, 1H) , 8.85 (s, 1H) , 9.03 (s, 1H) , 9.77 (brs, 1H) .

[0076] LC-MS: m/z = 465 (M+1)

[0077] 表征为上述结构式所示的化合物4。

[0078] 4) 最终产物(伏立康唑衍生物)的合成:



[0080] 将化合物4 (2.0g, 4.3mmol) , HATU (2.0g, 5.3mmol) , Et_3N (0.5g, 5.6mmol) , 1-(3-氨基-丙基)-吡咯-2,5-二酮 (0.7g, 4.7mmol) 在二氯甲烷 (30mL) 中混合,于室温下搅拌3h。加入水 (50mL) 后用DCM萃取。有机相用无水硫酸钠干燥。通过快速色谱法 (0-10% 甲醇:二氯甲烷) 纯化得到的残余物,得到式I所示的伏立康唑衍生物,为白色固体,550mg (21%) 。

[0081] 伏立康唑衍生物的结构鉴定:利用Bruker Avance III plus 400MHz和VARIAN MERCURY plus 300M对上述白色固体化合物(伏立康唑衍生物)进行核磁共振光谱扫描,采用TMS作为内标。结果如下:

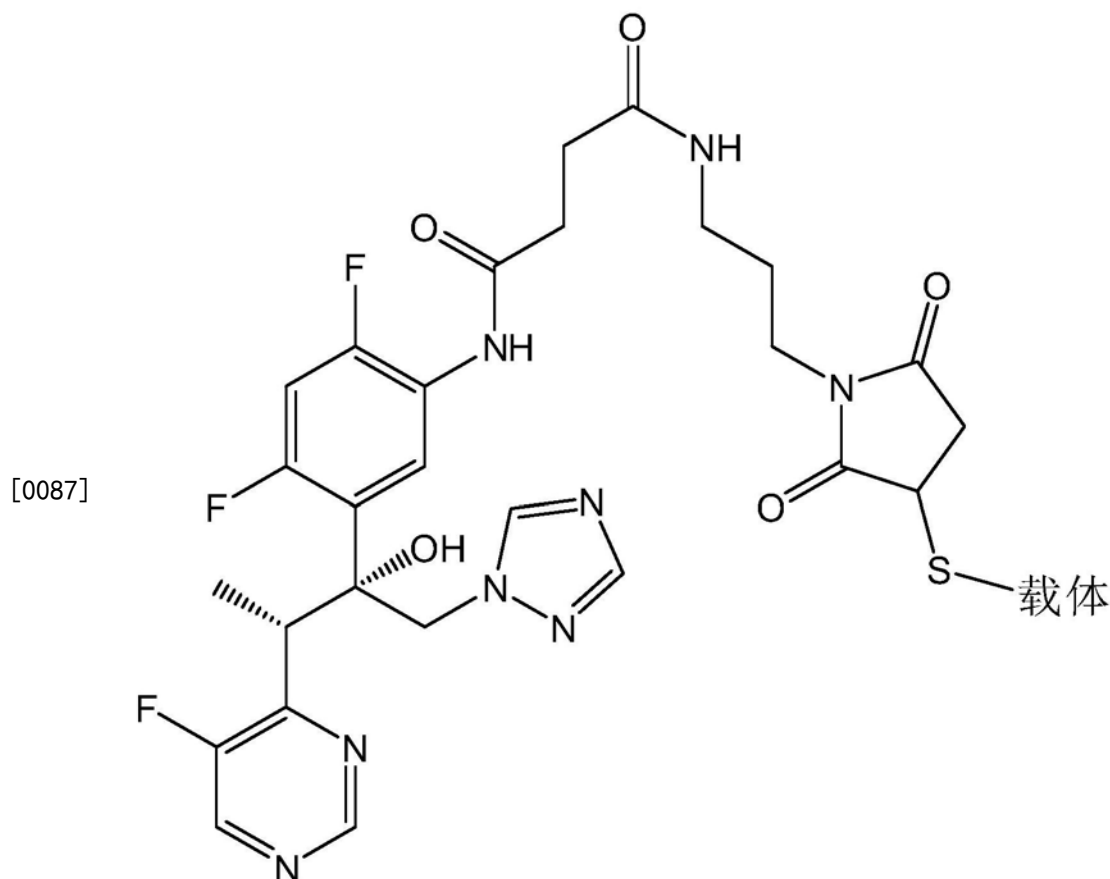
[0082] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO-d_6) : δ 1.10-1.13 (d, 3H) , 1.75-1.82 (m, 2H) , 2.62-2.65 (m, 2H) , 2.72-2.75 (m, 2H) , 3.20-3.25 (m, 2H) , 3.57-3.61 (t, 2H) , 4.10-4.12 (m, 1H) , 4.35-4.38 (d, 1H) , 4.67-4.70 (d, 1H) , 6.29-6.32 (m, 1H) , 6.54 (s, 1H) , 6.73 (s, 2H) , 6.84-6.89 (t, 1H) , 7.51 (s, 1H) , 8.03 (s, 1H) , 8.25 (s, 1H) , 8.45-8.49 (t, 1H) , 8.59 (s, 1H) , 8.87 (brs, 1H) .

[0083] LC-MS: m/z = 601 (M+1)

[0084] 表征为结构式I所示的伏立康唑衍生物。

[0085] 实施例2:伏立康唑免疫原的合成

[0086] 伏立康唑免疫原的结构式如式II所示:



式 II;

[0088] 伏立康唑免疫原由载体与实施例1制备的伏立康唑衍生物偶联而成;本实施例中载体为牛血清白蛋白 (BSA)。

[0089] 该伏立康唑免疫原的制备方法具体步骤如下:

[0090] a.称取5.0g磷酸二氢钾、10.0g磷酸氢二钠、7.5g氯化钠、1.0g氯化镁,共同溶解于800mL去离子水中,调节pH至8.0,制成缓冲溶液A;

[0091] b.称取5mg载体蛋白,0℃下溶解于10mL上述缓冲溶液A中,制成载体蛋白溶液;

[0092] c.称取5mg实施例1制备的伏立康唑衍生物,0℃下溶解于300μl上述缓冲溶液A中,制成伏立康唑衍生物溶液;

[0093] d. 当上述伏立康唑衍生物溶液刚变澄清时, 将其逐滴加入上述载体蛋白溶液中, 然后将此混合溶液在-8℃下搅拌5小时;

[0094] 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伏立康唑免疫原溶液,在伏立康唑免疫原溶液中加入质量分数0.3%的 NaN_3 ,于 -20°C 下储存。

[0095] 实施例3:抗伏立康唑特异性抗体的制备

[0096] 抗伏立康唑特异性抗体的制备方法为:

[0097] 1) 用PBS将伏立康唑免疫原稀释至0.8mg/mL,得到抗原溶液,然后用1.5mL抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合,对实验动物兔进行第一次注射;3周后,用1.5mL抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂混合进行第二次注射;之后每隔5周用3.5mL抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂混合注射一次,免疫步骤中共注射5次;

[0098] 2) 对经免疫的实验动物兔取血并分离纯化,得到效价为1:50000的抗伏立康唑特异性抗体。

[0099] 实施例4:ELISA法检验抗伏立康唑特异性抗体的质量

[0100] 1、伏立康唑的ELISA检测标准曲线的建立:

[0101] 1) 标准品的制备:

[0102] 将伏立康唑粉末(购于Sigma公司)溶解于甲醇溶液中,制备成1mg/mL的储存液。用ELISA缓冲液将储存液依次稀释为16 μ g/mL、8 μ g/mL、4 μ g/mL、2 μ g/mL、1 μ g/mL和0 μ g/mL的标准溶液。其中,ELISA缓冲液含有50mM Tris,145mM NaCl和体积百分比0.25%的BSA。

[0103] 2) 利用伏立康唑的ELISA检验方法制备标准曲线:

[0104] 用PBS将实施例3中所制备的抗伏立康唑抗体稀释成1:10000的终浓度溶液,100 μ L/孔包被在96孔酶联板上,4 $^{\circ}$ C放置12-24h;用PBS将上述包被有抗伏立康唑抗体的96孔酶联板洗涤3次后,加入200 μ L/孔的体积百分比0.5%的BSA溶液,4 $^{\circ}$ C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-伏立康唑偶联物;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,结果如图1所示。

[0105] 2、待测样品中伏立康唑含量的检测:

[0106] 1) 制作待测样品:

[0107] 制备方法:将伏立康唑粉末(购于Sigma公司)溶解于甲醇溶液中制成1mg/mL的储存液,并将此储存液稀释于空白血清中,至终浓度分别为0,2,8,16 μ g/mL,分别形成空白、低、中、高浓度的血清样本。空白血清为不含伏立康唑的健康人血清。

[0108] 2) 测试方法:

[0109] 利用上述伏立康唑的ELISA检验方法,将上述空白、低、中、高浓度的血清样本代替标准品,测试上述空白、低、中、高浓度的血清样本在450nm的吸光值。

[0110] 3) 测试结果:

[0111] 对照图1中所示的伏立康唑的ELISA检验的标准曲线,计算每个样本中伏立康唑含量,并对每个样本进行3个复孔测定,根据上述样本中伏立康唑的实际含量计算回收率,结果如表格1所示。

[0112] 表格1伏立康唑的ELISA检测结果

[0113]

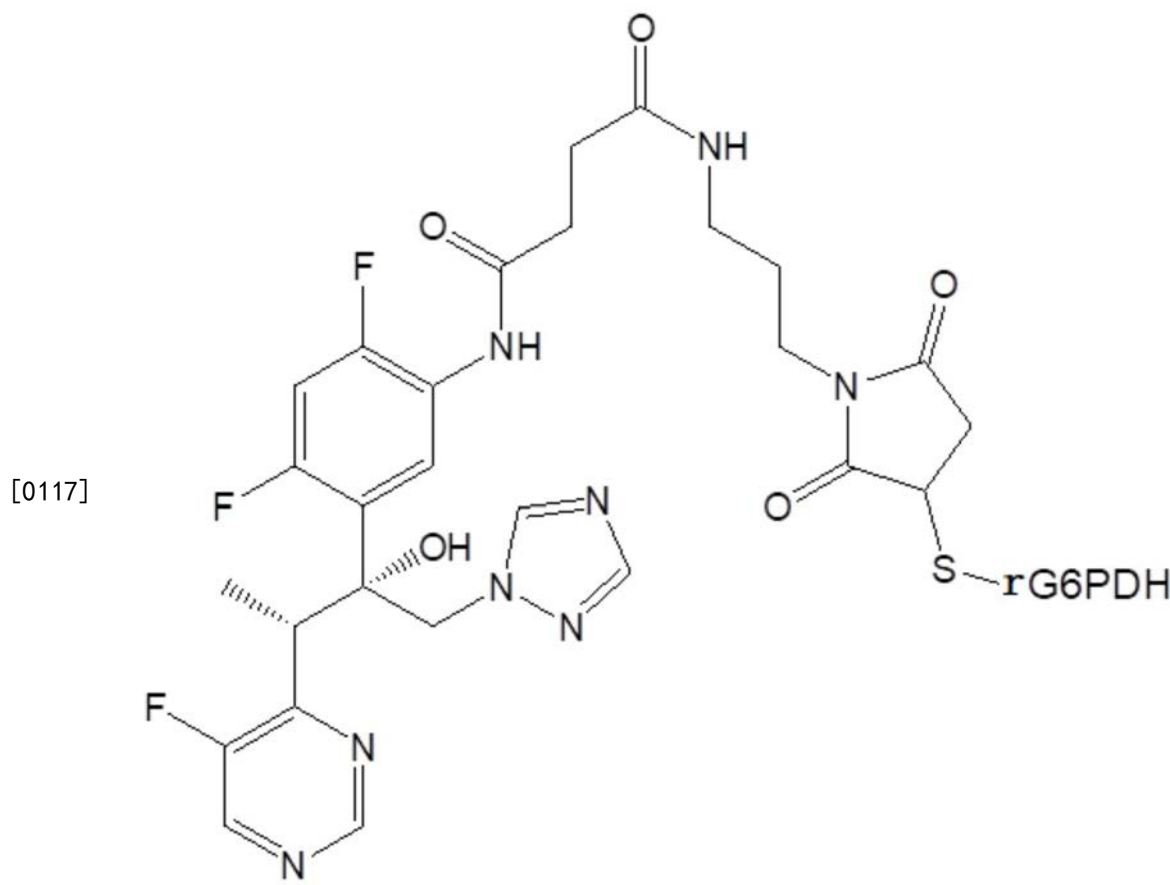
血清样品	空白	低	中	高
样品浓度(μ g/mL)	0.00	2.00	8.00	16.00
测定1	0.00	1.98	8.10	16.53
测定2	0.00	2.07	7.95	15.68
测定3	0.00	2.05	8.02	15.41
平均值(μ g/mL)	0.00	2.03	8.02	15.87
回收率(%)	-	101.7	100.3	99.2

[0114] 由表格1中结果可知:采用本发明伏立康唑的ELISA检测试剂测定不同浓度样品中的伏立康唑回收率都较高,均在95%-105%之间,说明本发明所述的抗伏立康唑特异性抗

体可以用于样本中伏立康唑的检测,并且结果准确度高。

[0115] 实施例5:伏立康唑酶标偶联物的制备

[0116] 伏立康唑酶标偶联物的结构式如式III所示:



式III

[0118] 伏立康唑酶标偶联物由重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与实施例1制备的伏立康唑衍生物偶联而成。

[0119] 该伏立康唑酶标偶联物的制备方法包括以下步骤:

[0120] a. 称取1.5g磷酸二氢钾、2.5g磷酸氢二钠、12.0g氯化钠、1.2g氯化镁,共同溶解于800mL去离子水中,调节pH至8.0,制成缓冲溶液B;

[0121] b. 称取5mg重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,-4℃下溶解于8mL上述缓冲溶液B中,制成重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液;

[0122] c. 称取5mg实施例1制备的伏立康唑衍生物,-4℃下溶解于800μL上述缓冲溶液B中,制成伏立康唑衍生物溶液;

[0123] d. 当上述伏立康唑衍生物溶液刚变澄清时,将其逐滴加入上述重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中,然后将此混合溶液在-8℃下搅拌5小时;

[0124] 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重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-伏立康唑酶标偶联物溶液,在重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-伏立康唑酶标偶联物溶液中加入质量分数0.3%的BSA和质量分数0.3%的NaN₃,于4℃下储存。

[0125] 实施例6:伏立康唑均相酶免疫检测试剂的制备

[0126] 伏立康唑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不混合且分开放置的,所以将酶的底物与上述抗伏立康唑特异性抗体混合在一起。因此,伏立康唑均相酶免疫检测试剂包括两种试剂,试剂A和试剂B:

[0127] 试剂A的制备:

[0128] 将8.5g氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+)和2.5g葡萄糖-6-磷酸(G6P)置于烧杯中,用1.5L浓度为55mmol/L、pH=8.0的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物;将实施例3中制备的抗伏立康唑特异性抗体加到均相酶底物中,抗体与均相酶底物的体积比为1:850,得到试剂A。

[0129] 试剂B的制备:

[0130] 将实施例5制备的重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-伏立康唑酶标偶联物加到浓度为120mmol/L、pH=8.2的Tris缓冲液中,伏立康唑酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:1700,得到试剂B。

[0131] 实施例7:伏立康唑均相酶免疫检验及结果

[0132] 1、获得标准曲线:

[0133] 1) 设置迈瑞BS-480全自动生化分析仪反应参数,如表格2所示。

[0134] 表格2生化分析仪参数设置

[0135]

迈瑞 BS-480 参数	
项目名称	伏立康唑
试剂 A	200 μL
试剂 B	50 μL
样本量	12 μL
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	$\mu\text{g/mL}$
结果精度	0.01
定标方法	Logistic-Log 5P
标准品浓度	0, 1, 2, 4, 8, 16 $\mu\text{g/mL}$

[0136] 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。

[0137] 2、样本检测:通过本发明的伏立康唑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:将伏立康唑标准品溶解于人血清中,至浓度分别为2,8,16 μ g/mL。检测数据及数据分析见表格3。

[0138] 表格3质控样本的检测结果

[0139]	血清样品	低	中	高
	样品浓度(μ g/mL)	2.00	8.00	16.00
	1	1.95	8.26	15.43
[0140]	2	2.04	7.75	16.71
	3	2.01	8.30	16.86
	4	1.97	8.07	15.58
	5	1.96	7.89	15.30
	6	2.08	8.12	16.92
	7	1.93	8.24	15.80
	8	1.99	7.86	16.06
	9	2.02	7.98	16.55
	10	2.05	8.03	15.64
	平均值(μ g/mL)	2.00	8.05	16.09
	标准差 (SD)	0.05	0.18	0.62
	精密度 (CV%)	2.50	2.24	3.85
	回收率 %	100.0	100.6	100.6

[0141] 检测结果:本发明的伏立康唑检测试剂测定质控样本的准确度高,回收率均在95%–105%之间,精密度高,CV均低于5%。

[0142] 实施例8:药物与激素干扰试验

[0143] 干扰物选取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1.0 μ g/mL,采用实施例7的伏立康唑免疫检验进行测定:

[0144] 将待测干扰物与实施例6制备的试剂A接触反应,再加入试剂B;

[0145] 检测上述混合溶液的OD₃₄₀吸光值,根据图2得到相应物质的浓度。

[0146] 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格4。

[0147] 表格4常见干扰物测定结果

[0148]

ID#	化合物名称	等价于伏立康唑的浓度 (µg/mL)	ID#	化合物名称	等价于伏立康唑的浓度 (µg/mL)
1	阿司匹林	0.00	2	苯丙醇胺	0.0

[0149]

ID#	化合物名称	等价于伏立康唑的浓度 (µg/mL)	ID#	化合物名称	等价于伏立康唑的浓度 (µg/mL)
3	β-苯基乙胺	0.00	4	普鲁卡因酰胺	0.0
5	安非他命	0.00	6	普鲁卡因	0.0
7	氨苄青霉素	0.00	8	奎尼丁	0.0
9	甲氨二氮卓	0.00	10	佐美酸	0.0
11	氯丙嗪	0.00	12	苯肾上腺素	0.0
13	氯拉卓酸	0.00	14	桂皮酰艾克宁	0.0
15	二甲苯氧庚酸	0.00	16	芽子碱	0.0
17	非诺洛芬	0.00	18	地西洋	0.0
19	甲基苯丙胺	0.00	20	可替宁	0.0
21	龙胆酸	0.00	22	阿替洛尔	0.0
23	吉非贝齐	0.00	24	心得安	0.0
25	氢可酮	0.00	26	苯乙哌啶酮	0.0
27	布洛芬	0.00	28	苯基丁氮酮	0.00
29	丙咪嗪	0.00	30	麦角酸二乙基酰胺	0.00
31	二氨基二苯砒	0.00	32	大麻酚	0.00
33	萘普生	0.00	34	洛哌丁胺	0.00
35	氢氯噻嗪	0.00	36	异克舒令	0.00
37	哌替啶	0.00	38	苯基丙氨酸	0.00
39	烯丙羟吗啡酮	0.00	40	盐酸氟西汀	0.00
41	麻黄素	0.00	42	柳丁氨醇	0.00
43	烟酰胺	0.00	44	青霉素	0.00
45	甲胺呋硫	0.00	46	甲基二乙醇胺	0.00
47	异戊巴比妥	0.00	48	二亚甲基双氧苯丙胺	0.00
49	甲撑二氧苯丙胺	0.00	50	琥珀酸多西拉敏	0.00
51	四氢大麻酚	0.00	52	纳布啡	0.00

[0150]

ID#	化合物名称	等价于伏立康唑的浓度 (μg/mL)	ID#	化合物名称	等价于伏立康唑的浓度 (μg/mL)
53	制霉菌素	0.00	54	去甲吗啡	0.00
55	乙酰吗啡	0.00	56	羟考酮	0.00
57	苡非他明	0.00	58	克他命	0.00
59	异丙嗪	0.00	60	苯海拉明	0.00
61	阿司帕坦	0.00	62	苯丁胺	0.00
63	皮质醇 (氢化可的松)	0.00	64	醛固酮	0.00
65	雄烯二酮	0.00	66	雄甾酮	0.00
67	皮质脂酮	0.00	68	皮质酮 (可的松)	0.00
69	去氧皮质酮	0.00	70	脱氢表雄酮	0.00
71	硫酸脱氢表雄酮	0.00	72	二氢睾酮	0.00
73	雌二醇	0.00	74	雌三醇	0.00
75	雌酮	0.00	76	本胆烷醇酮	0.00
77	17-羟孕烯醇酮	0.00	78	17-羟孕酮	0.00
79	孕烯醇酮	0.00	80	孕酮	0.00
81	睾酮	0.00	82	孕三醇	0.00
83	孕二醇	0.00	84	17α-羟基黄体酮	0.00
85	雄烯二酮	0.00	86	17-酮类固醇	0.00
87	17-羟皮质类固醇	0.00	88	肾上腺素	0.00
89	去甲肾上腺素	0.00	90	多巴胺	0.00
91	高香草酸	0.00	92	二羟基杏仁酸	0.00

[0151] 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伏立康唑的浓度均小于0.01μg/mL。由此可见,本发明的抗体是抗伏立康唑的特异性抗体,与常见干扰物无交叉反应。

[0152] 实施例9:相关性分析

[0153] 对100例临床标本分别使用高效液相色谱法和实施例6的伏立康唑均相酶免疫检测试剂进行测定,并作相关性分析,测定的数据参见表格5。

[0154] 表格5临床标本测定结果对比数据

[0155]

样本号	伏立康唑检测试剂测定值 (μg/mL)	高效液相色谱法测定值 (μg/mL)
1	14.11	14.32
2	15.98	16.09
3	5.49	5.32
4	2.32	2.38
5	13.23	13.35
6	11.02	11.06
7	14.85	14.66
8	17.85	17.94
9	7.13	7.24
10	2.04	2.05
11	5.95	6.08
12	5.10	5.23
13	10.03	10.17
14	2.25	2.36
15	3.24	3.36
16	15.3	15.26
17	11.81	11.98
18	14.58	14.69
19	14.54	14.33
20	3.98	4.03
21	15.01	15.21
22	18.17	18.25
23	16.05	16.22
24	14.26	14.25
25	17.21	17.55
26	0.36	0.33
27	4.98	5.03
28	1.99	2.02
29	16.01	16.23
30	15.05	15.25
31	17.85	17.89
32	17.15	17.23
33	11.41	11.22
34	10.59	10.55
35	18.03	18.25
36	13.96	14.06

[0156]

37	18.56	18.69
38	17.15	17.22
39	16.04	16.23
40	13.09	13.12
41	2.58	2.56
42	5.87	6.01
43	1.15	1.18
44	1.20	1.23
45	5.19	5.23
46	2.35	2.36
47	5.21	5.23
48	18.59	18.79
49	5.31	5.22
50	17.03	17.25
51	9.56	9.69
52	5.02	5.02
53	12.69	12.87
54	14.16	14.35
55	17.01	17.22
56	2.06	2.03
57	3.99	4.03
58	1.18	1.22
59	11.35	11.96
60	10.02	10.39
61	13.88	14.21
62	11.23	11.56
63	2.01	2.03
64	15.21	15.36
65	8.27	8.03
66	18.05	17.96
67	12.49	12.33
68	16.34	16.13
69	4.03	4.28
70	5.88	6.01
71	2.26	2.23
72	4.52	4.47
73	15.69	15.38
74	17.15	17.29
75	14.41	14.35
76	10.96	10.99
77	16.23	16.33
78	15.86	15.79
79	3.41	3.22

[0157]

80	4.21	4.05
81	5.46	5.55
82	17.91	17.58
83	10.76	10.99
84	17.89	17.68
85	2.42	2.35
86	4.02	4.22
87	8.79	8.99
88	15.48	15.23
89	4.42	4.39
90	8.49	8.56
91	7.36	7.22
92	5.16	5.23
93	8.67	8.97
94	1.96	1.88
95	12.34	12.58
96	2.45	2.55
97	6.09	6.34
98	15.62	15.79
99	17.52	17.69
100	2.38	2.33

[0158] 对上述数据作图,参见图3,得到的线性方程为: $y=1.003x-0.0442$,相关系数 $R^2=0.999$,表明本发明的伏立康唑检测试剂测定伏立康唑临床标本的准确度高,与高效液相色谱法的一致性较好。

[0159] 对于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变形,而所有的这些改变以及变形都应该属于本发明权利要求的保护范围之内。

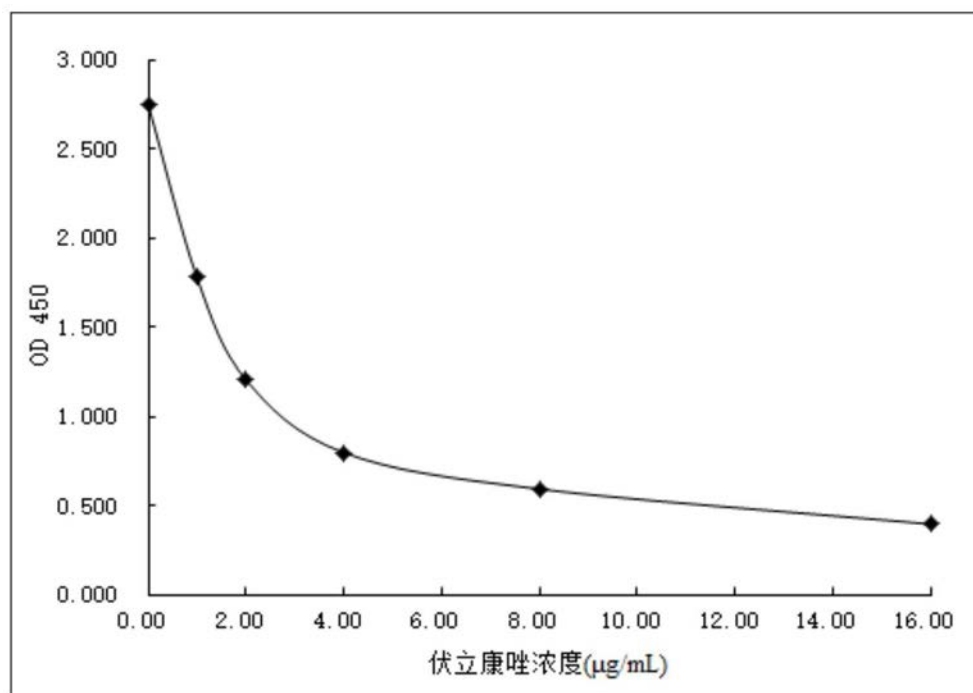


图1

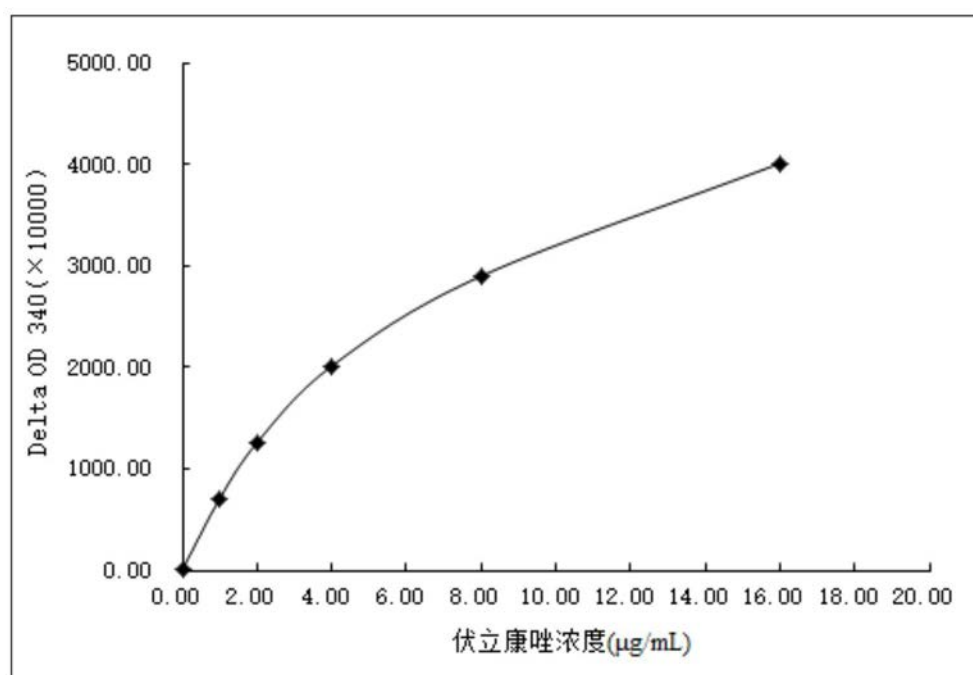


图2

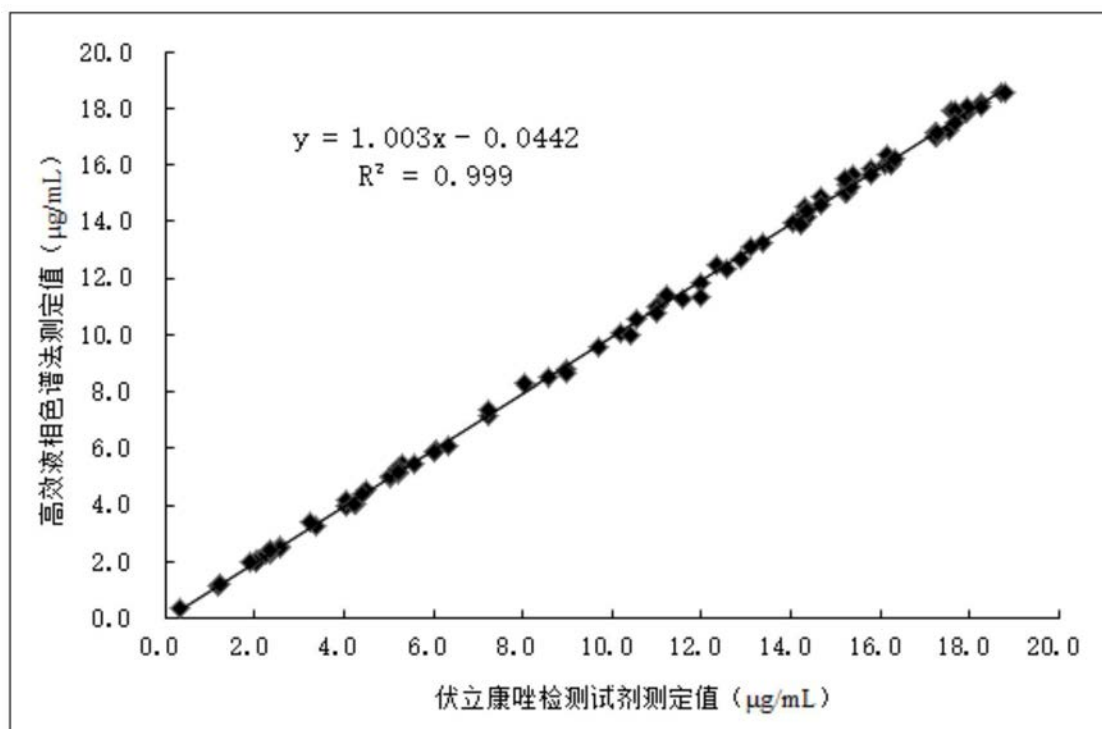


图3

专利名称(译)	一种伏立康唑衍生物、其合成方法及一种伏立康唑免疫原、其制备方法及其应用		
公开(公告)号	CN109928958A	公开(公告)日	2019-06-25
申请号	CN201910212538.1	申请日	2019-03-20
[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 张有涛		
发明人	虞留明 张有涛		
IPC分类号	C07D403/14 C07K14/765 C07K14/795 C07K14/435 C07K16/44 G01N33/531 G01N33/94		
代理人(译)	胡拥军		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种伏立康唑衍生物、其合成方法及一种伏立康唑免疫原、其制备方法及其应用；以伏立康唑衍生物制得的抗伏立康唑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，因此能够体现出较高的准确性、精密度、灵敏度和特异性；伏立康唑免疫原的应用为将伏立康唑免疫原用于制备抗伏立康唑特异性抗体和将抗伏立康唑特异性抗体用于制备伏立康唑检测试剂，该检测试剂可以实现在全自动生化分析仪上对伏立康唑高通量、快速化的检测。

