



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110078711 A

(43)申请公布日 2019.08.02

(21)申请号 201910337086.X

C12N 9/96(2006.01)

(22)申请日 2019.04.25

C12N 9/04(2006.01)

(66)本国优先权数据

G01N 33/535(2006.01)

201910315888.0 2019.04.19 CN

(71)申请人 北京九强生物技术股份有限公司

地址 100083 北京市海淀区花园东路15号
旷怡大厦5层

(72)发明人 封建新 张启飞 曹琦 龚俊
王贵利 刘希

(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

代理人 程伟 程云

(51)Int.Cl.

C07D 403/12(2006.01)

C07D 223/22(2006.01)

权利要求书3页 说明书13页 附图2页

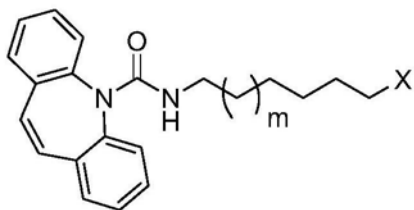
(54)发明名称

一种卡马西平衍生物及其在免疫检测中的用途

(57)摘要

本申请公开了一种卡马西平衍生物及其在免疫检测中的用途。具体而言,本申请涉及一种卡马西平衍生物及其制备方法,以及与含有上述卡马西平衍生物的试剂盒及其配制方法。本申请的技术方案使用了一种新型的卡马西平衍生物,并使用了选择性较高的偶联方法,使衍生物和酶进行一比一偶联,大大降低了常规偶联过程所形成的批间差。本申请的卡马西平检测试剂盒简便、快捷、成本低,可以在多种主流机型上进行自动化检测。

1. 一种卡马西平衍生物, 其具有式I所示的结构:



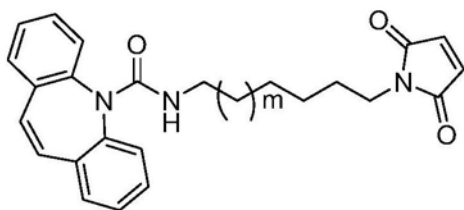
式 I

其中

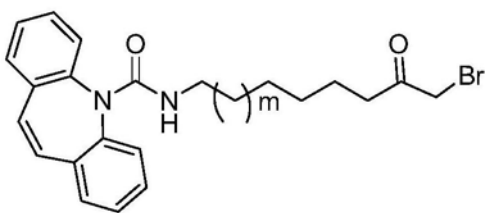
m为0至20的整数, 优选1至10的整数, 优选1至6的整数;

X选自: 马来酰亚胺、溴乙酰基、乙烯基砷或氮丙啶; 更优选马来酰亚胺;

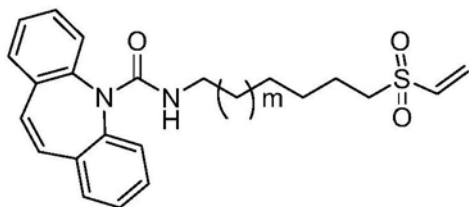
优选地, 所述卡马西平衍生物, 其具有选自下式的结构:



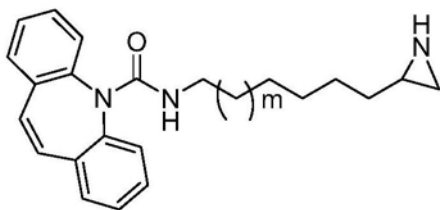
式 II、



式 III、



式 IV、



式 V。

2. 一种酶标记物, 其包含:

- 权利要求1所述的卡马西平衍生物、和

- 酶;

其中,

优选, 所述酶和所述卡马西平衍生物共价结合;

所述酶为葡萄糖6磷酸脱氢酶。

3. 一种试剂,其包含:

权利要求1所述的卡马西平衍生物、和/或

权利要求2所述的酶标记物。

4. 一种酶标记物的制备方法,其包括步骤:

1) 提供权利要求1所述的卡马西平衍生物,优选在非质子性溶剂中提供权利要求1所述的卡马西平衍生物;

2) 提供酶,优选在缓冲液中提供酶;

3) 在18℃至28℃,将所述卡马西平衍生物和所述酶接触1小时至4小时,优选2小时至3小时,使得所述卡马西平衍生物和所述酶发生偶联,得到所述酶标记物;

4) 任选,对所述酶标记物进行纯化,优选脱盐;

步骤1) 和2) 可互换;

所述缓冲液选自:PBS、Tris、TAPS、TAPSO,所述缓冲液pH为6.0至8.0;

所述非质子性溶剂选自以下一种或组合:乙腈、二甲基甲酰胺、二甲基亚砷;

所述的酶为葡萄糖6磷酸脱氢酶;

优选,在步骤3) 之前,所述酶包含至少一个游离的巯基;更优选,所述酶的第56位氨基酸取代为Cys;

步骤3) 中,所述卡马西平衍生物和所述酶的摩尔比范围为1:1至50:1;优选1:1。

5. 根据权利要求4所述的酶标记物的制备方法,其包括步骤:

1) 将权利要求1所述的卡马西平衍生物溶于DMF中;

2) 将含有一个游离巯基的葡萄糖6磷酸脱氢酶溶于缓冲液中;

3) 将步骤1) 和步骤2) 的溶液混合,在20℃至25℃下充分震荡2至4小时;

4) 脱盐处理,得到葡萄糖6磷酸脱氢酶标记的卡马西平衍生物。

6. 一种酶标记物,其是权利要求4或5所述方法制备得到的。

7. 一种试剂,其包含权利要求6所述的酶标记物。

8. 一种卡马西平检测试剂盒,其包含:

-第一试剂,其包含:抗卡马西平抗体、底物、缓冲液;

-第二试剂,其包含:缓冲液、权利要求2或6所述的酶标记物;

-任选地,质控品和/或校准品;

其中,

所述抗卡马西平抗体源自:小鼠、大鼠、猫、犬、灵长类、牛、马、羊、骆驼科、禽、人;

所述抗卡马西平抗体选自:单抗、多抗、重组抗体、嵌合抗体、抗原结合片段;

所述质控品包含4μg/ml至15μg/ml卡马西平;

所述校准品包含0μg/ml至20μg/ml卡马西平。

9. 一种卡马西平检测试剂盒,其包含:

-第一试剂,其包含:

10mM至500mM缓冲液、

5mM至50mM葡萄糖-6-磷酸、

5mM至50mM氧化型β-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、

0.01μg/ml至10μg/ml抗卡马西平单克隆抗体、

0.1g/L至5g/L稳定剂、
0.1g/L至5g/L表面活性剂、
0.1g/L至5g/L防腐剂；
-第二试剂,其包含：
10mM至500mM缓冲液、
0.01μg/ml至10μg/ml权利要求2或6所述的酶标记物、
0.1g/L至5g/L稳定剂、
0.1g/L至5g/L表面活性剂、
0.1g/L至5g/L防腐剂；
-任选,质控品和/或校准品；
其中，
所述缓冲液选自：磷酸缓冲液、甘氨酸缓冲液、Tris缓冲液、硼酸缓冲液、MOPS缓冲液、
HEPES缓冲液；
所述缓冲液pH为5.0至8.5,优选7.0至8.0；
优选,第一试剂的缓冲液是HEPES缓冲液,且第二试剂的缓冲液是Tris缓冲液；
所述稳定剂选自：牛血清白蛋白、海藻糖、蔗糖、甘露醇、甘油、甘氨酸、聚乙二醇6000或
其组合,优选牛血清白蛋白；
所述表面活性剂选自：Triton X-100、TritonX-405、Tween 80、Tween 20、Brij 35、
Brij 23或其组合,优选Tween 20；
所述防腐剂选自：叠氮化合物、MIT、生物防腐剂PC；
优选,所述叠氮化合物是叠氮钠或叠氮锂；
优选,所述生物防腐剂PC是PC-300；
所述质控品包含10mM至500mM缓冲液和4μg/mL至15μg/mL卡马西平；
所述校准品包含10mM至500mM缓冲液和0μg/mL至20μg/mL卡马西平。
10.选自以下的任一项或组合在制备检测装置中的用途：
权利要求1所述的卡马西平衍生物、权利要求2所述的酶标记物、权利要求6所述的酶标
记物；
所述检测装置选自以下一种或组合：试剂、试剂盒、孔板、颗粒、芯片、试纸；
优选,所述检测装置是均相免疫检测试剂。

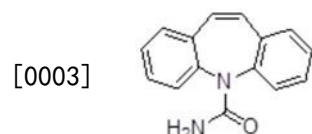
一种卡马西平衍生物及其在免疫检测中的用途

技术领域

[0001] 本申请涉及一种卡马西平衍生物及其制备方法、一种卡马西平均相酶免疫检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 卡马西平 (Carbamazepine) 结构式如下所示：



[0004] 卡马西平亦名酰胺咪嗪,是一种常见精神性药物,于1950年合成,结构类似于三环类抗抑郁药丙咪嗪,为亚胺基二苯乙烯衍生物,但无抗抑郁活性。口服吸收慢且不规则,服药2至4d后达稳态血浓度,有效血浓度为4 μ g/mL至12 μ g/mL,进食同时服用可增加吸收。主要通过肝脏代谢生成具有药理活性的卡马西平10,11-环氧化物,大部分以代谢物的形式从尿中排出,少量从粪便排出。

[0005] 卡马西平是治疗癫痫发作(如全身或局部性癫痫发作、简单或复杂部分性癫痫发作)的首选药物,同时也在治疗三叉神经痛具有较好疗效。

[0006] 血液中卡马西平浓度监测有以下三个方面原因:

[0007] 1) 卡马西平的药理活性与血液中药物浓度相关,而非使用剂量;

[0008] 2) 卡马西平代谢过程会由于个体化不同和长期治疗会有较大差异,特别是与其他药物同时使用时;

[0009] 3) 血液中卡马西平浓度在一个较窄的范围内安全且有效。

[0010] 基于上述原因,卡马西平血药浓度监测,是辅助临床治疗、改善治疗效果、降低毒性风险的有效方式。

[0011] 目前临床上监测卡马西平有多种方法,如直接化学发光法、荧光偏振免疫比浊法、酶联免疫吸附法、均相酶免疫测定法、胶乳凝集比浊法等。直接化学发光法、荧光偏振免疫比浊法、酶联免疫吸附法前者灵敏度高,但是需要昂贵的化学发光仪器,操作繁琐,检测时间长,自动化程度低,重复性较差。现有的均相酶免疫测定法、胶乳凝集比浊法也因稳定性差、制备工艺复杂、批间差大,应用受到一定限制。

[0012] 现有技术中描述了一种卡马西平衍生物-G6PDH酶偶联物及其制备方法:

[0013] 1) 将G6PDH室温溶解于含有Tris、MgCl₂和NaCl的溶液中(pH=9.0);

[0014] 2) 加入NADH、葡萄糖-6-磷酸以及卡必醇;

[0015] 3) 再逐滴加入二甲基亚砷;

[0016] 4) 在无水状态下称取卡马西平衍生物,溶解于DMF中;使溶液温度降到-2至-8 $^{\circ}$ C;加入三丁胺;

[0017] 5) 加入氯甲酸异丁酯,-2至-8 $^{\circ}$ C搅拌30分钟;

[0018] 6) 将上述激活的卡马西平衍生物溶液逐滴加入到溶解的G6PDH溶液中,2至8 $^{\circ}$ C搅

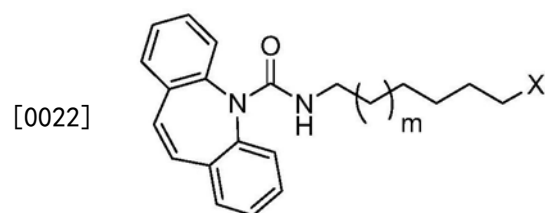
拌过夜；

[0019] 7) 通过层析柱纯化步骤6) 所得溶液, 获得的最终产物为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-卡马西平衍生物的偶联物, 于2至8℃储存(例如, 但不限于CN102768284A中所述方法)。

[0020] 然而, 现有技术的方法依赖于对卡马西平的反应基团进行激活, 之后再与酶进行反应。这样的策略难以保证定向反应, 也难以实现卡马西平和酶之间进行1:1偶联, 而导致批间差不稳定。因而, 本领域仍需一种改进的卡马西平衍生物, 以及一种改进的偶联方法。

发明内容

[0021] 基于上述需求, 根据一些实施方案, 提供了一种卡马西平衍生物, 其具有式I所示的结构:



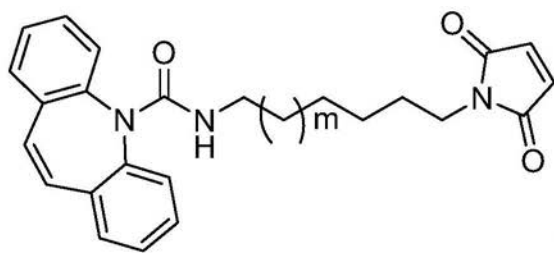
式 I。

[0023] 在一些实施方案中, m为0至20的整数, 优选1至10的整数, 优选1至6的整数, 例如1、2、3、4、5、6。

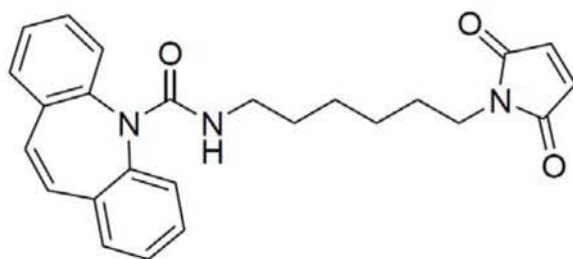
[0024] 在一些实施方案中, X是马来酰亚胺、溴乙酰基、乙烯基砜或氮丙啶。

[0025] 技术人员能够理解, X的功能在于和酶的巯基进行反应。马来酰亚胺、溴乙酰基、乙烯基砜、氮丙啶和巯基的共价结合是可以预期的。尽管实施例, 采用具体的特定基团, 但不意图限制于此。

[0026] 在一些具体的实施方案中, 所述卡马西平衍生物, 其具有选自下式的结构:

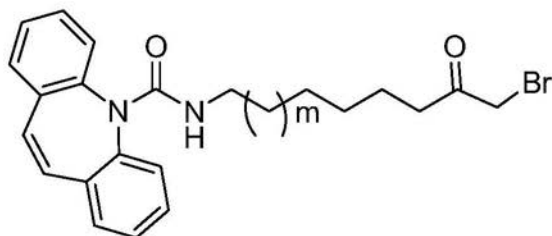


式 II、

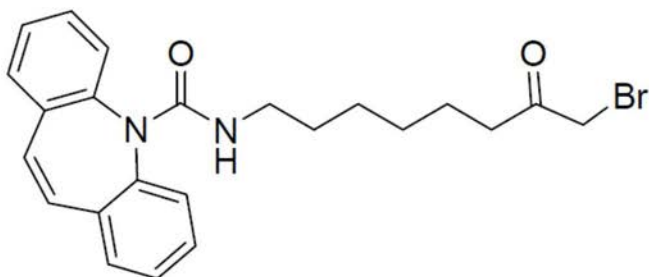


式 II-1、

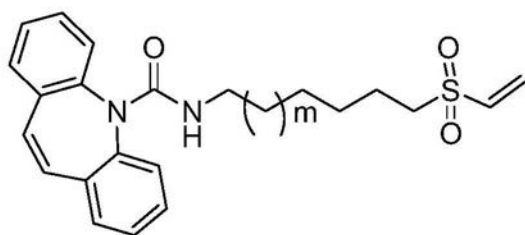
[0027]



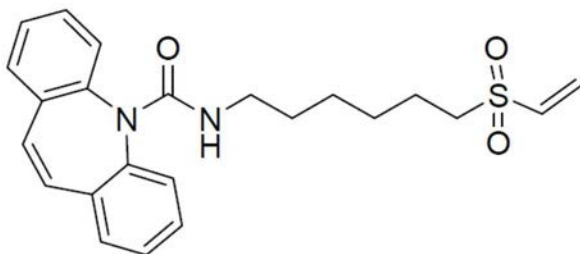
式 III、



式 III-1、

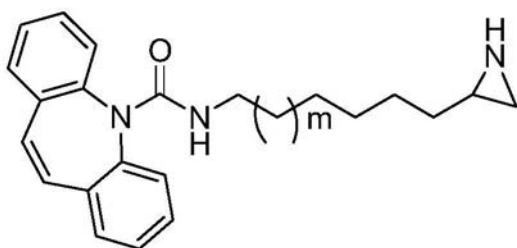


式 IV、

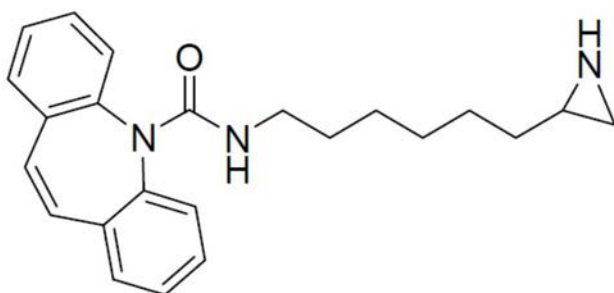


式 IV-1、

[0028]



式 V、



式 V-1。

[0029] 根据一些实施方案,提供了一种酶标记物,其包含根据本申请的卡马西平衍生物(如上述)和酶;所述酶和所述卡马西平衍生物共价结合。

[0030] 根据一些实施方案,提供了一种酶标记物,其包含根据本申请的卡马西平衍生物(如上述)和葡萄糖6磷酸脱氢酶,二者共价结合。

[0031] 根据一些实施方案,提供了一种试剂,其包含根据本申请的酶标记物。

[0032] 根据一些实施方案,提供了一种试剂,其包含根据本申请的卡马西平衍生物。

[0033] 根据一些实施方案,提供了一种酶标记物的制备方法,包括步骤:

[0034] 1) 提供根据本申请的卡马西平衍生物,尤其是在非质子性溶剂(例如但不限于乙腈、二甲基甲酰胺、二甲基亚砜)中提供根据本申请的卡马西平衍生物;

[0035] 2) 提供酶,优选在缓冲液(其提供反应环境,例如但不限于PBS、Tris、TAPS、TAPSO,所述缓冲液pH为6.0至8.0)中提供酶;

[0036] 3) 在18℃至28℃,将所述卡马西平衍生物和所述酶接触1小时至4小时(优选2小时至3小时)使得所述卡马西平衍生物和所述酶发生偶联,得到所述酶标记物;

[0037] 4) 根据需要,任选对所述酶标记物进行纯化,优选脱盐处理等。

[0038] 在一些具体的实施方案中,步骤1)和2)可互换。

[0039] 在一些具体的实施方案中,所述卡马西平衍生物和所述酶的摩尔比范围为1:1至50:1;优选1:1。

[0040] 在一些具体的实施方案中,所述酶是葡萄糖6磷酸脱氢酶。

[0041] 在一些具体的实施方案中,在偶联之前,所述酶包含至少一个游离的巯基,从而允许和卡马西平实现定向反应。

[0042] 在一些具体的实施方案中,天然葡萄糖6磷酸脱氢酶不含游离的巯基,因此在本申请的方法中,葡萄糖6磷酸脱氢酶是经过基因工程改造的,使其在56位的氨基酸突变为Cys,从而带有一个游离巯基。

[0043] 根据一些实施方案,提供了一种卡马西平检测试剂盒,其包含:

[0044] -第一试剂,其包含抗卡马西平抗体、底物、缓冲液;

[0045] -第二试剂,其包含本申请的酶标记物、缓冲液;

[0046] -任选,质控品(含4 μ g/ml至15 μ g/ml卡马西平)和/或校准品(含0 μ g/ml至20 μ g/ml已知浓度的卡马西平)。

[0047] 在一些具体的实施方案中,所述抗卡马西平抗体源自:小鼠、大鼠、猫、犬、灵长类、牛、马、羊、骆驼科、禽、人。在一些具体的实施方案中,所述抗卡马西平抗体选自:单抗、多抗、重组抗体、嵌合抗体、抗原结合片段。在本申请上下文中,批间差异方面的改进不依赖于特定的抗体类型,其作用仅在于和抗原发生识别和结合。

[0048] 在一些具体的实施方案中,提供了一种卡马西平检测试剂盒,其包含:

[0049] -第一试剂,其包含:

[0050] 10mM至500mM缓冲液、

[0051] 5mM至50mM葡萄糖-6-磷酸、

[0052] 5mM至50mM氧化型 β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、

[0053] 0.01 μ g/ml至10 μ g/ml抗卡马西平单克隆抗体、

[0054] 0.1g/L至5g/L稳定剂、

[0055] 0.1g/L至5g/L表面活性剂、

[0056] 0.1g/L至5g/L防腐剂;

[0057] -第二试剂,其包含:

[0058] 10mM至500mM缓冲液、

[0059] 0.01 μ g/ml至10 μ g/ml本申请的酶标记物、

[0060] 0.1g/L至5g/L稳定剂、

[0061] 0.1g/L至5g/L表面活性剂、

[0062] 0.1g/L至5g/L防腐剂;

[0063] -任选,质控品和/或校准品;

[0064] 在一些具体的实施方案中,所述缓冲液选自:磷酸缓冲液、甘氨酸缓冲液、Tris缓冲液、硼酸缓冲液、MOPS缓冲液、HEPES缓冲液;所述缓冲液pH为5.0至8.5,优选7.0至8.0。

[0065] 在一些具体的实施方案中,第一试剂的缓冲液是HEPES缓冲液,且第二试剂的缓冲液是Tris缓冲液。

[0066] 在一些具体的实施方案中,所述稳定剂选自:牛血清白蛋白、海藻糖、蔗糖、甘露醇、甘油、甘氨酸、聚乙二醇6000或其组合,优选牛血清白蛋白。

[0067] 在一些具体的实施方案中,所述表面活性剂选自:Triton X-100、TritonX-405、Tween 80、Tween 20、Brij 35、Brij 23或其组合,优选Tween 20。

[0068] 在一些具体的实施方案中,所述防腐剂选自:叠氮化合物(叠氮钠或叠氮锂)、MIT、生物防腐剂PC(如PC-300)。

[0069] 根据一些实施方案,提供了根据本申请的卡马西平衍生物在制备检测装置中的用途。

[0070] 根据一些实施方案,提供了根据本申请的酶标记物在制备检测装置中的用途。

[0071] 在一些具体的实施方案中,检测装置可以表现为以下形式:试剂、试剂盒、孔板、颗粒、芯片、试纸。在一些具体的实施方案中,检测试剂是均相免疫检测型的试剂。

附图说明

[0072] 图1A至图1D是卡马西平衍生物的合成路线图。

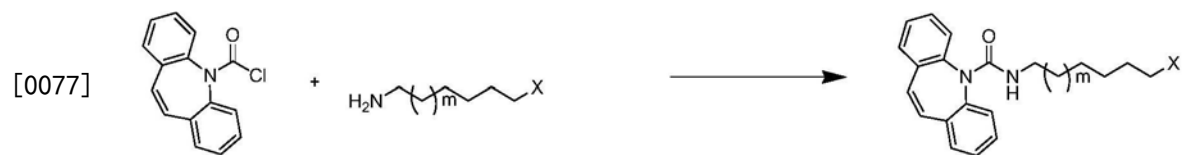
[0073] 图2是本申请试剂盒的相关性分析图。

具体实施方式

[0074] 以下结合具体示例对本申请做出具体说明,示例中仅详细介绍下图所列卡马西平衍生物的合成方法,以及利用该衍生物与葡萄糖6磷酸脱氢酶进行偶联的具体方法。

[0075] 实施例1.卡马西平衍生物的合成及其结构确认

[0076] 卡马西平衍生物合成路线如下所示:



[0078] 根据图1A至图1D所示,将0.51mmol化合物2(或化合物3、化合物4、化合物5)和1.53mmol三乙胺溶于10mL二氯甲烷中。

[0079] 然后,向反应体系中加入0.51mmol化合物1,室温反应过夜。反应体系中加入水,并使用乙酸乙酯萃取,有机相用饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,减压除去有机溶剂,层析柱纯化,得到各卡马西平衍生物。

[0080] 实施例2.酶标记物制备方法(本申请方法)

[0081] 1.将实施例1制备的卡马西平衍生物(例如,含马来酰亚胺基团)溶于DMF中(10mg/ml);

[0082] 2.提供葡萄糖6磷酸脱氢酶(经人工改造使其含有单一游离巯基,在第56位氨基酸,将Lys替换为Cys)溶液(5mg/mL酶、100mmol PB、100mmol NaCl, pH=8.0);

[0083] 3.将2ml葡萄糖6磷酸脱氢酶溶液、7.5ml PB溶液和0.5ml卡马西平衍生物溶液,在室温(18至28℃,优选20至25℃)震荡反应4h;

[0084] 4.脱盐柱处理(脱盐溶液100mM PB、0.1%NaN₃、1%NaCl, pH=8.0),收集蛋白峰,得到卡马西平标记的葡萄糖6磷酸脱氢酶。

[0085] 实施例3.酶标记物制备方法(对照方法)

[0086] 1.准确称取15mg规格为100KU的G6PDH,室温溶解于12mL含有72.6mg(0.05M) Tris、

8mg MgCl_2 (3.3mM) 和100mg NaCl 的溶液中 (该溶液 $\text{pH}=9.0$) ;

[0087] 2. 在上述烧杯中加入225mg还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸NADH, 135mg葡萄糖-6-磷酸以及0.75mL卡必醇 (Carbitol) ;

[0088] 3. 在上述烧杯中再逐滴加入2mL二甲基亚砷;

[0089] 4. 在无水状态下称取10mg卡马西平衍生物, 溶解于600 μL DMF中; 使上述溶液温度降到-2~-8 $^{\circ}\text{C}$; 加入3 μL 三丁胺;

[0090] 5. 加入1.5 μL 氯甲酸异丁酯, -2~-8 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌30分钟;

[0091] 6. 将上述激活的卡马西平衍生物溶液逐滴加入到上述溶解的G6PDH溶液中, 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌过夜;

[0092] 7. 通过G-25凝胶层析柱纯化步骤6中的溶液, 获得的最终产物为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物, 于2至8 $^{\circ}\text{C}$ 储存。

[0093] 实施例4. 试剂的制备

[0094] 1. 第一试剂的制备:

HEPES 缓冲液	50mM, PH 7.0
-----------	--------------

抗卡马西平抗体	0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$
---------	-----------------------------

β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化型	10mmol/L
------------------------	----------

[0095] 葡萄糖-6-磷酸	10mmol/L
-----------------	----------

牛血清白蛋白	1g/L
--------	------

Tween 20	1g/L
----------	------

叠氮钠	1 g/L;
-----	--------

[0096] 2. 第二试剂的制备:

Tris 缓冲液	200mM, PH8.0
----------	--------------

[0097] 酶偶联物	0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$
-------------	-----------------------------

牛血清白蛋白	1g/L
--------	------

[0098] Tween 20	1g/L
-----------------	------

叠氮钠	1 g/L;
-----	--------

[0099] 3. 质控品、校准品:

[0100] 所述质控品为卡马西平纯品由缓冲溶液 (20mM HEPES缓冲液) 稀释所得, 其浓度分别为4.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、8.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、12.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0101] 所述校准品为卡马西平纯品由缓冲溶液 (20mM HEPES缓冲液) 稀释所得, 其浓度分别为0.0、2.0、4.0、8.0、12.0、20.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0102] 4. 试剂盒组装:

[0103] 将上述试剂 (任选包含质控品、校准品), 组装成卡马西平均相酶免疫检测试剂盒。

[0104] 实施例5. 卡马西平均相酶免疫检测试剂盒的性能实验

[0105] 1. 生化分析仪设置参数如下:

[0106] 表1. 日立7180参数

[0107]

分析点	[Rate-A] [10] [25] [34]
WAVE (SUB/MAIN)	[410] [340]
S.VIL.	[2.0]
S.R1	[150]
S.R3	[50]
ABS.LIMIT:	[32000] [递增]
CALIB TYPE:	[Spline]
POINT:	[6] SPAN PONIT[6]
校准品	0.0、2.0、4.0、8.0、12.0、20.0 μ g/ml
样本	待检样本为各种生理样本,如血清、血浆

[0108] 2.准确度、精密度、线性实验

[0109] 表2.准确度、精密度

[0110]

血清样品	本申请试剂			实施例3方法所得试剂		
样品浓度 (μ g/ml)	4.2	8.8	12.7	4.2	8.8	12.7
1	4.32	8.66	12.54	4.29	9.16	13.00
2	4.23	8.69	12.46	4.49	9.26	13.13
3	4.19	8.76	12.60	4.49	9.26	13.56
4	4.26	8.74	12.76	4.60	9.20	13.58
5	4.23	8.73	12.76	4.41	9.48	13.27
6	4.26	8.83	12.73	4.55	9.14	13.20
7	4.21	8.86	12.78	4.67	9.47	14.03
8	4.18	8.86	12.86	4.80	9.52	13.32
9	4.21	8.82	13.05	4.51	9.32	13.41

[0111]

10	4.26	8.85	12.88	4.75	9.48	13.55
11	4.11	8.73	12.29	4.16	9.29	13.42
12	4.09	8.71	12.94	4.22	9.33	12.99
13	4.17	8.80	12.86	4.20	9.17	13.25
14	4.26	8.74	12.60	4.65	9.39	13.14
15	4.20	8.86	12.58	4.38	9.33	13.15
16	4.26	9.00	12.73	4.49	9.39	13.35
17	4.29	8.92	12.75	4.43	9.38	13.39
18	4.27	8.83	12.67	4.59	9.35	13.12
19	4.28	8.89	12.64	4.65	9.38	13.41
20	4.23	8.85	12.72	4.56	9.31	13.45
准确度 (前三次测定)	0.71%	0.57%	0.16%	8.57%	5.80%	5.91%
均值	4.23	8.81	12.71	4.49	9.33	13.34
SD	0.058	0.085	0.173	0.179	0.111	0.240
CV	1.37%	0.97%	1.36%	3.97%	1.19%	1.80%

[0112] 表3.线性

[0113]

样品	测 1	测 2	测 3	均值	理论值	相对偏差	绝对偏差
0	1.63	1.58	1.59	1.60	1.79		-0.19
0.1	3.58	3.60	3.52	3.57	3.57	-0.07%	0.00
0.2	5.31	5.42	5.33	5.35	5.35	0.03%	0.00
0.3	7.16	7.22	7.26	7.21	7.13	1.10%	0.08
0.4	8.91	9.04	8.93	8.98	8.92	0.64%	0.06
0.5	10.78	10.96	10.97	10.90	10.70	1.90%	0.20
0.6	12.74	12.40	12.54	12.56	12.48	0.61%	0.08
0.7	14.11	14.35	14.42	14.29	14.27	0.19%	0.03
0.8	16.00	15.90	15.74	15.88	16.05	-1.05%	-0.17
0.9	17.66	17.94	17.64	17.75	17.83	-0.48%	-0.09
1.0	19.58	19.26	20.00	19.61	19.61	-0.01%	0.00

[0114] 3. 常见药物抗干扰的测定

[0115] 当存在以下浓度的常见药物时,未检测到干扰。

[0116] 表4. 常见药物抗干扰的测定结果

[0117]

编号	干扰物	浓度 ($\mu\text{g/ml}$)
1	N-乙酰半胱氨酸	150
2	阿米替林	2
3	氨苄西林钠	100
4	K-羟苯磺酸盐 (氢醌磺酸钾盐)	200
5	羟嗪二盐酸盐	1
6	甲基多巴倍半水合物	20
7	异丙嗪	100

[0118]

8	抗坏血酸	30
9	四环素	50
10	乙酰水杨酸	1000
11	丙磺舒	500
12	左旋多巴 (3,4-二羟基-L 苯丙氨酸)	20
13	甲硝唑	100
14	吩噻嗪	200
15	布洛芬	500
16	保泰松	16
17	对乙酰氨基酚	200
18	氯丙嗪	100
19	甲琥	50
20	去甲替林	1
21	头孢西丁	2500
22	西替利嗪二盐酸盐	3
23	环孢素	5
24	地昔帕明	3
25	乙苯	50
26	5- (对羟基苯基-5-苯基海)	1000
27	丙咪嗪	6
28	苯巴比妥	500
29	苯妥英钠	500
30	茶碱	100
31	丙戊酸	1000
32	乙琥胺	1000
33	扑痫酮	1000
34	利福平	60

[0119] 4. 相关性分析

[0120] 4.1 试验方法:

[0121] 取新鲜血清样本80例,每例样本均分为两份,每份体积不少于500 μ l,使用本申请的试剂在日立7180仪器上测定其中一份样本两次,使用岛津HPLC测定另一份样本。两种方法测值使用散点图进行相关性分析(图2)。

[0122] 4.2 试验结果:

[0123] 所得函数为 $y=1.0022x-0.0154$,相关系数 $R^2=0.9962$ 。

[0124] 结果表明本申请的试剂测定样本中卡马西平浓度值,与HPLC法(可视为金标准)测定样本中卡马西平浓度值具有良好相关性。表5. 相关性分析(单位: μ g/ml)

[0125]

样本号	本申请试剂	HPLC法	样本号	本申请试剂	HPLC法
样本1	6.43	6.48	样本41	10.48	10.82
样本2	7.33	7.31	样本42	1.05	1.05
样本3	3.19	3.16	样本43	6.39	6.36

样本4	6.89	6.51	样本44	17.78	17.39
样本5	12.00	11.99	样本45	2.92	2.85
样本6	4.79	4.89	样本46	3.39	3.35
样本7	13.60	13.40	样本47	8.28	7.97
样本8	8.35	8.60	样本48	7.27	7.54
样本9	3.19	3.03	样本49	2.44	2.62
样本10	5.06	5.24	样本50	11.97	11.46
样本11	2.60	2.51	样本51	19.44	19.79
样本12	1.76	1.79	样本52	14.21	14.19
样本13	7.65	7.74	样本53	7.03	7.06
样本14	18.02	18.55	样本54	7.88	7.51
样本15	5.84	5.97	样本55	3.36	3.13
样本16	4.45	4.51	样本56	8.46	8.08
样本17	15.87	15.97	样本57	6.07	6.16
样本18	5.33	5.02	样本58	11.78	11.07
样本19	13.12	13.57	样本59	7.84	7.69
样本20	3.90	3.96	样本60	10.03	10.30
样本21	3.39	3.31	样本61	1.74	1.77
样本22	6.02	6.28	样本62	10.23	10.30
样本23	16.13	15.68	样本63	2.57	2.54
样本24	4.02	3.89	样本64	5.98	5.94
样本25	2.54	2.59	样本65	17.36	17.95
样本26	7.50	7.40	样本66	10.27	10.36
样本27	10.42	10.75	样本67	8.09	7.91
样本28	8.70	8.94	样本68	8.74	8.39
样本29	13.97	13.39	样本69	10.52	10.52
样本30	7.51	7.43	样本70	5.47	5.11
样本31	3.68	3.78	样本71	6.52	6.74
样本32	10.03	10.60	样本72	10.75	11.38
样本33	8.39	8.17	样本73	4.00	4.26
样本34	2.77	2.84	样本74	7.26	7.17
样本35	2.61	2.61	样本75	1.20	1.27
样本36	3.82	3.78	样本76	4.60	4.51
样本37	3.66	3.61	样本77	4.08	4.22
样本38	3.12	3.17	样本78	9.35	9.91
样本39	9.65	9.55	样本79	13.97	13.71
样本40	8.99	8.52	样本80	4.79	5.09

[0126] 实施例6.批间差对比分析

[0127] 检测原理：

[0128] 样本中的游离卡马西平与葡萄糖六磷酸脱氢酶-卡马西平偶联物竞争性结合抗卡马西平特异性抗体。样本中游离的卡马西平越多,竞争结合的抗体就越多,而未与抗体结合的酶-卡马西平偶联物就越多。游离的酶-卡马西平偶联物催化 β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化型(NAD^+)转化为 β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸还原型(NADH),样本中的卡马西平浓度与 NADH 的生成量成正比,通过340nm吸光度的变化可得到样本中卡马西平的含量。

[0129] 使用三批次本申请试剂和对照试剂(实施例3的制备方法)分别定标,计算不同批次吸光度变化差异。

[0130] 表6.批次间的定标数据

[0131]

试剂	校准品	ΔAbs			偏差	
		第一批	第二批	第三批	1/3	2/3
本申请试剂	S1	1116	1157	1148	-2.79%	0.78%
	S2	1384	1436	1423	-2.74%	0.91%
	S3	1663	1708	1698	-2.06%	0.59%
	S4	2036	2092	209	-2.58%	0.10%
	S5	2249	228	2307	-2.51%	-1.17%
	S6	2488	2555	2561	-2.85%	-0.23%
对照方法试剂	S1	7349	4297	7013	4.79%	-38.73%
	S2	7620	4507	7309	4.26%	-38.34%
	S3	8119	4863	7841	3.55%	-37.98%
	S4	9541	5724	8810	8.30%	-35.03%
	S5	10547	6308	9791	7.72%	-35.57%
	S6	11183	6914	10365	7.89%	-33.29%
本申请试剂: 速率法; 对照试剂: 终点法。						

[0132] 表7.批次间的比较

[0133]

试剂	校准品	校准品间吸光度变化梯度		
		第一批	第二批	第三批
本申请试剂	S1/S1	0.0%	0.0%	0.0%
	S2/S1	24.0%	24.1%	24.0%
	S3/S1	49.0%	47.6%	47.9%
	S4/S1	82.4%	80.8%	82.1%
	S5/S1	101.5%	97.1%	101.0%
	S6/S1	122.9%	120.8%	123.1%
对照方法试剂	S1/S1	0.0%	0.0%	0.0%
	S2/S1	3.7%	4.9%	4.2%
	S3/S1	10.5%	13.2%	11.8%
	S4/S1	29.8%	33.2%	25.6%
	S5/S1	43.5%	46.8%	39.6%
	S6/S1	52.2%	60.9%	47.8%
本申请试剂：速率法；对照试剂：终点法。				

[0134] 实施例7. 替代方案

[0135] 参照实施例4的制备方法,分别配置不同的测试试剂盒和对照试剂盒,区别仅在于将实施例4制备的试剂盒进行如下替换:

[0136] 方案1:第一试剂和第二试剂中的缓冲液在50至100mM PH 7.0-8.0范围内替换为磷酸缓冲液、甘氨酸缓冲液、硼酸缓冲液、或者MOPS缓冲液;

[0137] 方案2:第一试剂和第二试剂中的稳定剂替换为0.5至2.5g/L海藻糖、蔗糖、甘露醇、或聚乙二醇6000;

[0138] 方案3:第一试剂和第二试剂中的表面活性剂替换为0.5至2.5g/L Triton X-100、Tween 80、Brij 35、或Brij 23;

[0139] 方案4:第一试剂和第二试剂中的防腐剂替换为叠氮锂或PC-300;

[0140] 方案5:将化合物2分别替换为化合物3、化合物4、化合物5。

[0141] 将上述各方案中三个不同批次的测试试剂盒和对照试剂盒参照实施例6的方法进行测试,比较结果和表7至表8接近,显示测试试剂盒的批间差变异小于对照试剂盒(数据未显示)。

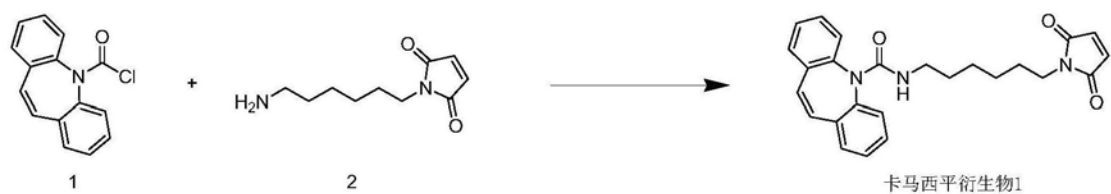


图1A

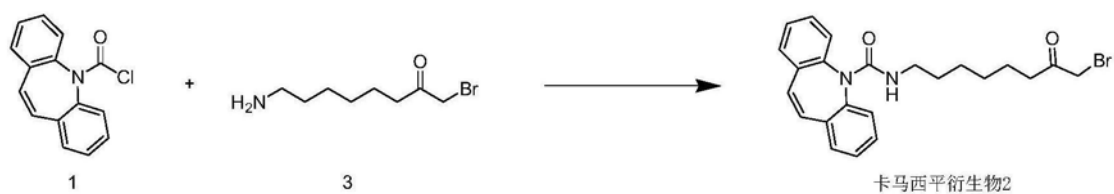


图1B

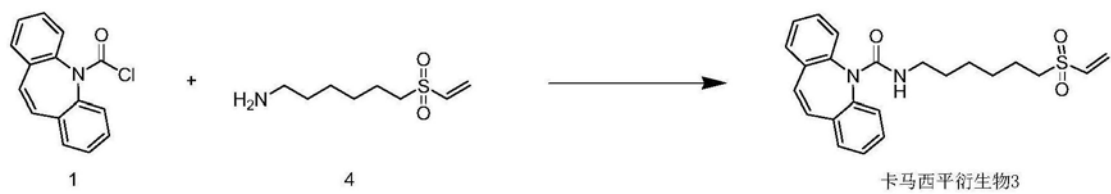


图1C

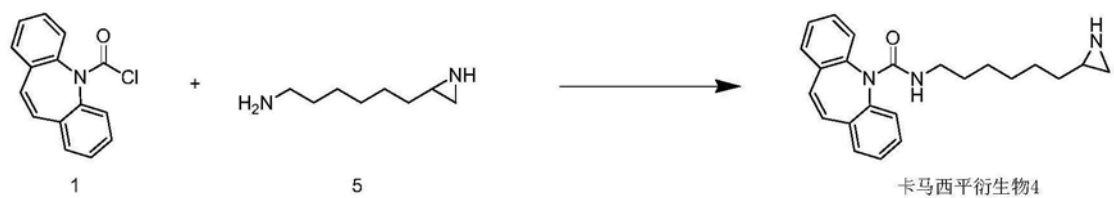


图1D

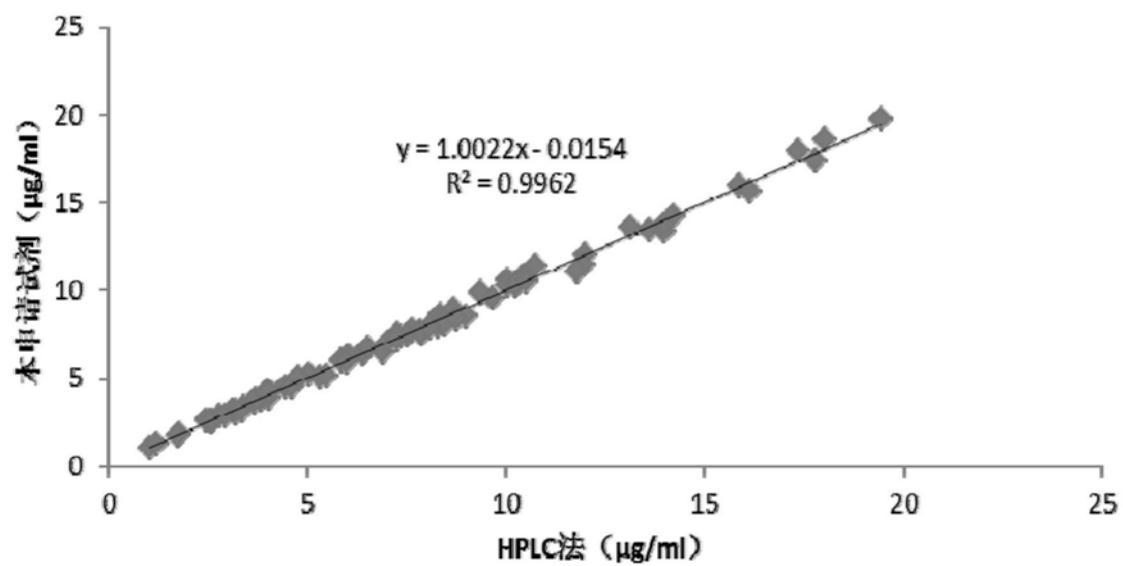
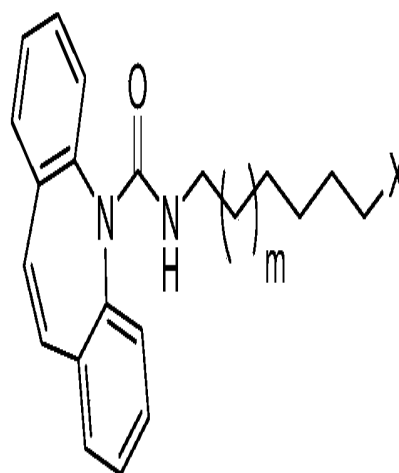


图2

专利名称(译)	一种卡马西平衍生物及其在免疫检测中的用途		
公开(公告)号	CN110078711A	公开(公告)日	2019-08-02
申请号	CN201910337086.X	申请日	2019-04-25
[标]申请(专利权)人(译)	北京九强生物技术股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京九强生物技术股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京九强生物技术股份有限公司		
[标]发明人	封建新 张启飞 曹琦 龚俊 王贵利 刘希		
发明人	封建新 张启飞 曹琦 龚俊 王贵利 刘希		
IPC分类号	C07D403/12 C07D223/22 C12N9/96 C12N9/04 G01N33/535		
CPC分类号	C07D223/22 C07D403/12 C12N9/0006 C12N9/96 C12Y101/01049 G01N33/535		
代理人(译)	程伟 程云		
优先权	201910315888.0 2019-04-19 CN		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本申请公开了一种卡马西平衍生物及其在免疫检测中的用途。具体而言，本申请涉及一种卡马西平衍生物及其制备方法，以及与含有上述卡马西平衍生物的试剂盒及其配制方法。本申请的技术方案使用了一种新型的卡马西平衍生物，并使用了选择性较高的偶联方法，使衍生物和酶进行一比一偶联，大大降低了常规偶联过程所形成的批间差。本申请的卡马西平检测试剂盒简便、快捷、成本低，可以在多种主流机型上进行自动化检测。



式I