



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110954707 A

(43)申请公布日 2020.04.03

(21)申请号 201911042028.0

C07D 207/452(2006.01)

(22)申请日 2019.10.30

C12N 9/04(2006.01)

(66)本国优先权数据

201910598849.6 2019.07.04 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 王贵利 张启飞 李垚艳 龚俊
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.

G01N 33/94(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书3页 说明书9页 附图2页

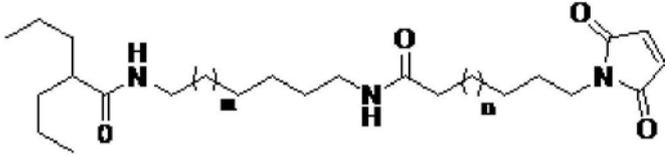
(54)发明名称

丙戊酸衍生物及其在免疫检测中的用途

(57)摘要

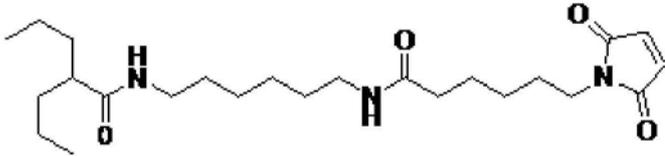
本申请公开了一种丙戊酸衍生物及其在免疫检测中的用途。具体而言,本申请涉及一种丙戊酸衍生物及其制备方法,以及与含有上述丙戊酸衍生物的试剂盒及其配制方法。本申请的技术方案使用了一种新型的丙戊酸衍生物,并使用了选择性较高的马来酰亚胺-巯基的偶联方法,使衍生物和酶进行1:1偶联,大大降低了常规偶联过程所形成的批间差。本申请的丙戊酸检测试剂盒简便、快捷、成本低,可以在多种主流机型上进行自动化检测。

1. 一种酶标记物,其包含以下或由以下组成:
 -丙戊酸衍生物、和
 -葡萄糖六磷酸脱氢酶;
 所述的葡萄糖六磷酸脱氢酶和所述的丙戊酸衍生物共价结合;
 所述的丙戊酸衍生物是式I所示的结构:



式 I

- 其中,n为1至10的整数,优选2至6的整数;
 m为1至10的整数,优选1至5的整数;
 优选,所述的丙戊酸衍生物是式II所示的结构:

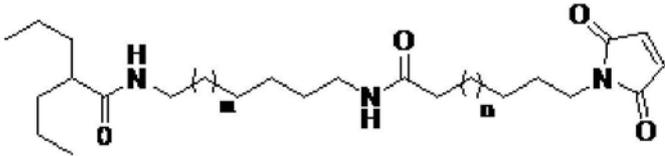


式 II;

优选地,所述的葡萄糖六磷酸脱氢酶源自肠系膜明串珠菌 *Leuconostoc mesenteroides*;

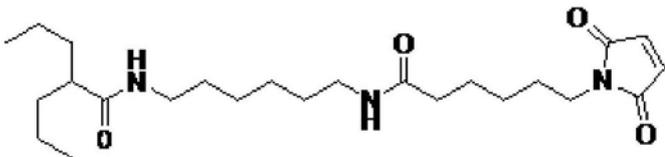
优选地,所述的丙戊酸衍生物在所述的葡萄糖六磷酸脱氢酶第254位氨基酸残基处共价结合。

2. 一种丙戊酸衍生物,其是式I所示的结构:



式 I

- 其中
 n为1至10的整数,优选2至6的整数;
 m为1至10的整数,优选1至5的整数;
 优选,所述丙戊酸衍生物是式II所示的结构:



式 II。

3. 一种试剂,其包含选自以下的一种或组合:
权利要求2所述的丙戊酸衍生物、权利要求1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2所述的丙戊酸衍生物;
优选,在非质子性溶剂中提供权利要求2所述的丙戊酸衍生物;
 - 2) 提供葡萄糖六磷酸脱氢酶;
 - 3) 在18°C至28°C将所述丙戊酸衍生物和所述葡萄糖六磷酸脱氢酶接触1小时至4小时,使得所述丙戊酸衍生物和所述葡萄糖六磷酸脱氢酶发生偶联,得到酶标记物;
优选,在18°C至25°C将所述丙戊酸衍生物和所述葡萄糖六磷酸脱氢酶接触2小时至3小时,使得所述丙戊酸衍生物和所述葡萄糖六磷酸脱氢酶发生偶联,得到酶标记物;
 - 4) 任选,对所述酶标记物进行纯化;
步骤1)和2)可互换;
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;
优选,在步骤3)之前,所述葡萄糖六磷酸脱氢酶包含至少一个游离的巯基,
更优选,将所述葡萄糖六磷酸脱氢酶第254位的脯氨酸取代为半胱氨酸;
步骤3)中,所述丙戊酸衍生物和所述葡萄糖六磷酸脱氢酶的摩尔比范围为1:1至1:200;优选1:50;
优选地,所述的葡萄糖六磷酸脱氢酶源自肠系膜明串珠菌 *Leuconostoc mesenteroides*;
优选地,所述的丙戊酸衍生物在所述的葡萄糖六磷酸脱氢酶第254位氨基酸残基处共价结合。
5. 一种葡萄糖六磷酸脱氢酶变体,相较于肠系膜明串珠菌 *Leuconostoc mesenteroides* 的野生型葡萄糖六磷酸脱氢酶,其第254位或其等同位点的脯氨酸残基取代为半胱氨酸残基。
6. 一种酶标记物,其是权利要求4所述方法制备得到的。
7. 一种试剂,其包含权利要求1或6所述的酶标记物。
8. 一种丙戊酸检测试剂盒,其包含:
 - 第一试剂,其包含缓冲液、抗丙戊酸抗体;
 - 第二试剂,其包含缓冲液、权利要求1或6所述的酶标记物;
 - 任选,质控品和/或校准品;其中,
所述缓冲液选自:TAPSO、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;
所述抗丙戊酸抗体源自:小鼠、大鼠、兔、骆驼、灵长类、马、羊、禽;
所述抗丙戊酸抗体选自: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30µg/ml至120µg/ml丙戊酸;
所述校准品包含0µg/ml至150µg/ml丙戊酸。
9. 根据权利要求8所述的丙戊酸检测试剂盒,其包含:

-第一试剂,其包含:

30mM至300mM缓冲液、

5mM至20mM葡萄糖-6-磷酸、

5mM至20mM氧化型β-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、

0.01μg/ml至10μg/ml抗丙戊酸单克隆抗体、

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:

30mM至300mM缓冲液、

0.01μg/ml至10μg/ml权利要求1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;

所述抗丙戊酸抗体是鼠源抗体。

10. 选自以下的任一项或其组合在制备检测装置中的用途:

权利要求2所述的丙戊酸衍生物、权利要求1所述的酶标记物、权利要求6所述的酶标记物;权利要求5所述的葡萄糖六磷酸脱氢酶变体;

所述检测装置选自以下一种或组合:试剂、试剂盒、孔板、颗粒、微球、芯片、试纸。

丙戊酸衍生物及其在免疫检测中的用途

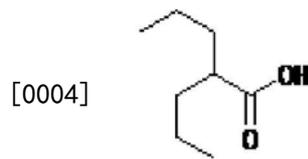
[0001] 本申请要求2019年7月4日提交的申请号为201910598849.6且名称为《一种丙戊酸衍生物及其在免疫检测中的用途》中国专利申请的优先权。

技术领域

[0002] 本申请涉及一种丙戊酸衍生物及其制备方法、一种丙戊酸均相酶免疫检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0003] 丙戊酸(Valproic acid)结构式如下所示：



[0005] 丙戊酸是治疗癫痫的药物。药物成分为丙戊酸钠和丙戊酸,既可作为单药治疗,也可作为添加治疗。丙戊酸用于治疗全身性癫痫:包括失神发作、肌阵挛发作、强直阵挛发作等。治疗部分性癫痫适用于:简单部分性发作、复杂部分性发作、部分继发全身性发作。除用于抗癫痫外,还可用于治疗热性惊厥、运动障碍、舞蹈症、卟啉症、精神分裂症、带状疱疹引发的疼痛、肾上腺功能紊乱,以及预防酒精戒断综合征。

[0006] 丙戊酸疗法的常见不良反应表现为:消化道症状、月经周期改变;较少见脱发、便秘、倦睡、眩晕、疲乏、头痛、共济失调、轻微震颤、异常兴奋、不安和烦躁;长期服用时,偶见胰腺炎、肝损伤、急性肝坏死、血小板减少;偶有过敏;偶有听力下降和可逆性听力损坏。

[0007] 因此,在治疗过程中需要对该药不良反应监测予以重视。由于药物代谢个体存在差异,临床使用时应结合血药浓度监测,制定合理的给药方案,尽量避免不良反应发生。

[0008] 目前临床上监测丙戊酸血药浓度有多种方法,如高效液相色谱分析(HPLC)、化学发光法、均相酶免疫测定法、胶乳凝集比浊法等。HPLC费时且不易自动化;直接化学发光法灵敏度高,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重复性差、线性差,应用受到一定限制。

[0009] 专利申请CN102507917A公开了一种丙戊酸酶标偶联物,先通过向丙戊酸衍生物溶液中加入三丁胺和氯甲酸异丁酯活化丙戊酸衍生物;随后与葡萄糖6磷酸脱氢酶(G6PDH)在-2至-8℃条件下进行偶联,利用凝胶层析柱进行纯化,得到丙戊酸酶标偶联物;最后用缓冲溶液稀释丙戊酸酶标偶联物制得。

[0010] 专利申请CN103242445A公开了一种获取酶标偶联物的制备方法:称取葡萄糖-6-磷酸脱氢酶在室温条件下溶解于磷酸缓冲液中,终浓度为3-5mg/mL;用二甲基甲酰胺溶解丙戊酸衍生物,通过三丁胺法进行活化,并与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶酶溶液进行交联反应,经纯化和透析后得到葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-丙戊酸偶联物。

[0011] 专利申请CN108956971A公开了一种丙戊酸免疫检测试剂及其制备和检测方法,将

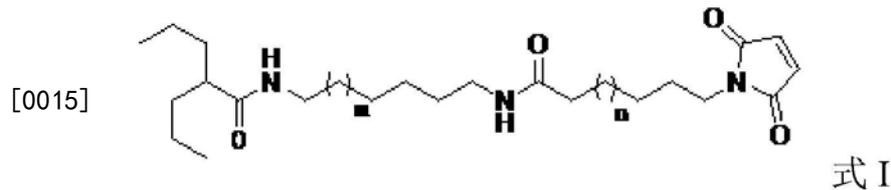
丙戊酸、1-乙基-3-(n -3-二甲氨丙基)碳二亚胺、 N -羟基琥珀酰亚胺溶解于吗啉乙磺酸(MES)溶液中活化后,再与酶偶联。

[0012] 上述三种路线均依赖于对丙戊酸原本携带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,也难以实现衍生物和酶之间进行1:1偶联,而导致批间差不稳定。最优的情况下,上述策略制得的试剂,所报道的批内和批间精密度CV仅在4.7%左右的水平。

[0013] 因而,本领域仍需一种改进的丙戊酸衍生物,以及一种改进的偶联方法。

发明内容

[0014] 根据一些实施方案,提供了一种丙戊酸衍生物,其具有式I所示的结构:

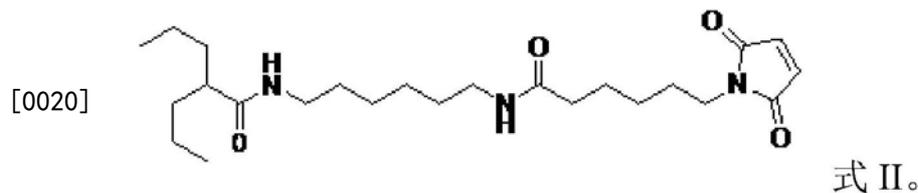


[0016] 其中

[0017] n 为1至10的整数,优选2至6的整数;

[0018] m 为1至10的整数,优选1至5的整数。

[0019] 在一些具体的实施方案中,丙戊酸衍生物具有式II所示的结构:



[0021] 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丙戊酸衍生物和酶。在一些具体的实施方案中,酶和所述丙戊酸衍生物共价结合。在一些具体的实施方案中,酶为葡萄糖六磷酸脱氢酶。

[0022] 根据一些实施方案,提供了一种葡萄糖六磷酸脱氢酶变体,相较于野生型葡萄糖六磷酸脱氢酶,其第254位的脯氨酸残基取代为半胱氨酸残基。应当理解,第254位的脯氨酸残基及其等同位置都包括在范围内,随葡萄糖六磷酸脱氢酶所属物种而定。

[0023] 在具体的实施方案中,葡萄糖六磷酸脱氢酶所属物种可选自:肠系膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)。

[0024] 根据一些实施方案,提供了一种试剂,其包含根据本申请的丙戊酸衍生物。

[0025] 根据另一些实施方案,提供了一种试剂,其包含根据本申请的酶标记物。

[0026] 根据一些实施方案,提供了一种酶标记物的制备方法,其包括步骤:

[0027] 1) 提供根据本申请的丙戊酸衍生物,例如在非质子性溶剂中提供丙戊酸衍生物;

[0028] 2) 提供酶,例如在缓冲液中提供酶;

[0029] 3) 在18°C至28°C,按照丙戊酸衍生物:酶=1:1至1:200的摩尔比(优选1:50),将所述丙戊酸衍生物和所述酶接触1小时至4小时(例如1、1.5、2、2.5、3、3.5、4小时,或之间的任何值),使得所述丙戊酸衍生物和所述酶发生偶联,得到酶标记物。

[0030] 在一些具体的实施方案中,根据需要对制得的酶标记物进行纯化,例如但不限于分子筛层析处理。

[0031] 在本申请上下文中,步骤编号不应理解为步骤的操作顺序。

[0032] 在一些具体的实施方案中,步骤1)和2)可互换顺序。

[0033] 在一些实施方案中,在缓冲液中提供酶,所述缓冲液选自:PBS、Tris、TAPS、TAPSO,所述缓冲液pH为6.0至8.0。

[0034] 在一些实施方案中,非质子性溶剂提供反应媒介环境,其选自以下一种或组合:乙腈、二甲基甲酰胺、二甲基亚砷。

[0035] 在一些实施方案中,酶为葡萄糖六磷酸脱氢酶;尤其是在偶联之前,酶包含至少一个游离的巯基,以允许进行定向且可控的偶联反应。

[0036] 在具体的实施方案中,提供一种酶标记物的制备方法,包括步骤:

[0037] 1) 将丙戊酸衍生物溶于N,N-二甲基甲酰胺中;

[0038] 2) 将含有一个游离巯基的葡萄糖六磷酸脱氢酶溶于缓冲液中;

[0039] 3) 将步骤1)和步骤2)的溶液混合,在18°C至25°C下接触(允许充分混匀,例如适度震荡)2至3小时;

[0040] 4) 对步骤3)所得反应产物进行分子筛层析处理,得到经纯化的葡萄糖六磷酸脱氢酶标记的丙戊酸衍生物。

[0041] 根据一些实施方案,提供了根据本申请方法制备所得的酶标记物。

[0042] 根据一些实施方案,提供了一种丙戊酸检测试剂盒,其包含:

[0043] -第一试剂,其包含抗丙戊酸抗体,其源自:小鼠、大鼠、灵长类、羊、禽、人、兔、马、牛、骆驼;所述抗丙戊酸抗体选自:单抗、多抗、重组抗体、嵌合抗体、抗原结合片段;

[0044] -第二试剂,其包含根据本申请的酶标记物;

[0045] -任选,质控品;和/或

[0046] -任选,校准品。

[0047] 在一些实施方案中,质控品包含30 μ g/ml至120 μ g/ml丙戊酸,例如30、40、50、60、70、80、90、100、110、120 μ g/ml(或之间的任意值)丙戊酸。

[0048] 在一些实施方案中,校准品包含0 μ g/ml至150 μ g/ml丙戊酸,例如0、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150 μ g/ml(或之间的任意值)丙戊酸。

[0049] 在一些具体的实施方案中,丙戊酸检测试剂盒,其包含:

[0050] -第一试剂,其包含:

[0051] 30mM至300mM缓冲液、

[0052] 5mM至20mM葡萄糖-6-磷酸、

[0053] 5mM至20mM氧化型 β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、

[0054] 0.01 μ g/ml至10 μ g/ml抗丙戊酸单克隆抗体、

[0055] 0.1g/L至5g/L稳定剂、

[0056] 0.1g/L至5g/L表面活性剂、

[0057] 0.1g/L至5g/L防腐剂;

[0058] -第二试剂,其包含:

[0059] 30mM至300mM缓冲液、

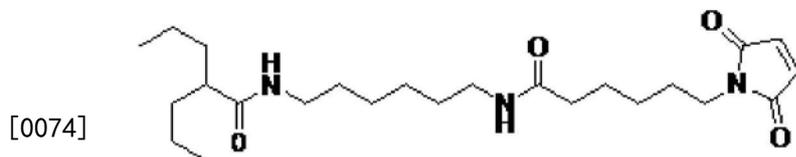
- [0060] 0.01 μ g/ml至10 μ g/ml本申请的酶标记物、
- [0061] 0.1g/L至5g/L稳定剂、
- [0062] 0.1g/L至5g/L表面活性剂、
- [0063] 0.1g/L至5g/L防腐剂；
- [0064] 根据一些实施方案，提供了本申请的丙戊酸衍生物在制备检测装置中的用途。
- [0065] 根据一些实施方案，提供了本申请的酶标记物在制备检测装置中的用途。
- [0066] 根据一些实施方案，提供了本申请的葡萄糖六磷酸脱氢酶变体在制备检测装置中的用途。
- [0067] 在一些实施方案中，检测装置体现为选自以下形式：试剂、试剂盒、孔板、颗粒、芯片、试纸。

附图说明

- [0068] 图1是丙戊酸衍生物的合成路线图。
- [0069] 图2是本申请试剂盒的相关性分析图。
- [0070] 图3本申请试剂和对照试剂的批间吸光度变化差异。

具体实施方式

- [0071] 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丙戊酸衍生物的合成方法，以及利用该衍生物与葡萄糖六磷酸脱氢酶进行偶联的具体方法。
- [0072] 实施例1. 丙戊酸衍生物的合成及其结构确认
- [0073] 按照图1所示的丙戊酸衍生物合成路线，合成式II所示化合物：



式 II

- [0075] 1. 化合物3的合成
- [0076] 化合物1 (100mg, 0.69mmol) 和化合物2 (150mg, 0.69mmol) 溶解于DCM (15mL) 中，向其中加入三乙胺 (209mg, 2.07mmol) 和HATU (314mg, 0.83mmol)，在室温 (18至25 $^{\circ}$ C) 下搅拌6h。减压除去溶剂，柱层析纯化，得到白色固体化合物3 (150mg, 64%收率)。
- [0077] 2. 化合物4的合成
- [0078] 使用甲醇 (10mL) 将化合物3 (150mg, 0.46mmol) 溶解，向其中加入浓HCl (2mL)，室温 (18至25 $^{\circ}$ C) 下搅拌2h。向反应体系中加入水，使用乙酸乙酯进行萃取。水相用NaOH (1N) 调pH到10，用乙酸乙酯萃取，在减压下除去溶剂，得到化合物4 (128mg, 100%)。
- [0079] 3. 丙戊酸衍生物的合成
- [0080] 化合物4 (50mg, 0.18mmol) 和化合物5 (38mg, 0.18mmol) 溶解于DCM (8mL) 中，向其中滴加三乙胺 (55mg, 0.54mmol)，然后加入HATU (82mg, 0.22mmol)，室温 (18至25 $^{\circ}$ C) 下搅拌16h。制备版纯化，得到白色固体丙戊酸衍生物 (55mg, 71%收率)。
- [0081] 4. 经质谱 (测得 M^{+1} 525.5, M^{+23} 574.6) 和核磁 ($^1\text{H-NMR}$) 鉴定，丙戊酸衍生物结构正

确无误。

[0082] 实施例2.酶标记物制备方法(本申请方法)

[0083] 1.将实施例1制得的丙戊酸衍生物溶于N,N-二甲基甲酰胺中(10mg/ml);

[0084] 2.将200 μ l葡萄糖六磷酸脱氢酶(源自肠系膜明串珠菌*Leuconostoc mesenteroides*) (经人工改造使其含有单一游离巯基,即第254位脯氨酸取代为半胱氨酸,而获得游离的巯基)溶液(6.4mg/ml、0.2M磷酸缓冲液,pH 8.0)加入至750 μ l缓冲溶液(0.05M Na_2HPO_4 、150mM NaCl 、10mM EDTA、0.1% NaN_3 、pH 7.2)中;

[0085] 3.然后向其中加入丙戊酸衍生物的N,N-二甲基甲酰胺溶液50 μ l;

[0086] 4.上述混合溶液,在室温(18至28 $^{\circ}\text{C}$)下充分震荡2-3小时;

[0087] 5.分子筛层析处理,得到丙戊酸标记的葡萄糖六磷酸脱氢酶(浓度0.1mg/mL-2.0mg/mL)。

[0088] 实施例3.酶标记物制备方法(对照方法,活化丙戊酸的羧基与G6PDH上的氨基偶联反应)

[0089] 1.将15mg葡萄糖六磷酸脱氢酶溶解于12mL Tris缓冲液中,然后依次加入225mg还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸NADH,135mg葡萄糖-6-磷酸、0.75mL卡必醇(Carbitol)和2.25mL二甲基亚砷;所述Tris缓冲液pH为9.0,各组分浓度为:0.05mol/L Tris、3.3mmol/L氯化镁、145.4mmol/L氯化钠。

[0090] 2.丙戊酸衍生物的活化:将10mg丙戊酸衍生物溶解于420 μ L二甲基亚砷和180 μ L二甲基甲酰胺中,加入6 μ L三丁胺和350 μ L氯甲酸异丁酯在2-8 $^{\circ}\text{C}$ 条件下搅拌30分钟;

[0091] 3.将所述步骤1和2所得的溶液混合,在2至8 $^{\circ}\text{C}$ 条件下搅拌12至16小时,并将偶联的酶标抗原进行G-25凝胶层析柱纯化,得到葡萄糖-6-磷酸脱氢酶标记的丙戊酸衍生物。

[0092] 实施例4.试剂的制备

[0093] 1.第一试剂的制备:

HEPES 缓冲液	100 mM, pH 7.0
-----------	----------------

[0094] 小鼠抗丙戊酸单抗	0.5 $\mu\text{g/ml}$
-----------------	----------------------

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

葡萄糖-6-磷酸	10 mmol/L
----------	-----------

[0095] 牛血清白蛋白	1 g/L
---------------	-------

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

叠氮钠	1 g/L;
-----	--------

[0096] 2.第二试剂的制备:

Tris 缓冲液	200 mM, pH8.0
----------	---------------

酶标记物	0.1 $\mu\text{g/ml}$
------	----------------------

[0097] 牛血清白蛋白	1 g/L
---------------	-------

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

叠氮钠	1 g/L;
-----	--------

[0098] 3. 质控品、校准品:

[0099] 本申请试剂的本质性能和效果不依赖于质控品和校准品,可采用自制的或市售的产品。

[0100] 所述质控品为丙戊酸纯品由缓冲溶液稀释所得,其浓度分别为30-40 $\mu\text{g/ml}$ 、70-80 $\mu\text{g/ml}$ 、115-125 $\mu\text{g/ml}$ 。

[0101] 所述校准品为丙戊酸纯品由缓冲溶液稀释所得,其浓度分别为0 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ 、25 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ 、150 $\mu\text{g/ml}$ 。

[0102] 4. 试剂盒组装:

[0103] 将上述试剂(任选包含质控品、校准品),组装成丙戊酸均相酶免疫检测试剂盒。

[0104] 实施例5. 丙戊酸均相酶免疫检测试剂盒的性能实验

[0105] 1. 本申请试剂盒基于竞争反应,检测原理如下:

[0106] 在均相反应体系中,样本中的丙戊酸和葡萄糖六磷酸脱氢酶-丙戊酸偶联物同时竞争结合抗丙戊酸抗体位点,由于抗体与偶联物结合后酶活性下降,样品中游离的丙戊酸越多,结合的抗体位点越多,抗体与酶标记物的结合就越少,未结合抗体的酶标记物催化 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),样品中的丙戊酸浓度与 NADH 的生成量成正比,通过吸光度的变化即可得到样品丙戊酸的浓度。

[0107] 2. 生化分析仪参数

[0108] 表1. 本申请的丙戊酸试剂盒日立7180参数

[0109] 分析点	[Rate-A] [10] [19] [24]
WAVE (SUB/MAIN)	[410] [340]
S.VIL.	[2.0]
S.R1	[180]
S.R3	[60]
ABS.LIMIT:	[32000] [递增]
CALIB类型	[Logit-Log4p]
POINT参数	[6] SPAN POINT [6]
校准品	0.0、10.0、25.0、50.0、100.0、150.0 $\mu\text{g/ml}$
样本	各种生理样本(如血清、血浆、唾液、全血、尿液等)

[0110] 3. 重复性实验

[0111] 利用如上建立起的定标曲线进行重复性测定,高、中、低质控品分别检测20次。

[0112] 表2. 本申请的丙戊酸试剂盒重复性实验

[0113] 测次	质控1	质控2	质控3
1	28.1	76.6	119.7
2	29.0	77.3	123.0
3	28.2	76.7	119.6
4	28.0	78.3	131.0
5	28.1	79.2	119.1
6	28.1	80.3	127.0
7	27.9	75.1	124.2

8	27.5	76.6	123.9
9	28.0	79.5	121.7
10	27.5	77.8	126.1
11	27.9	77.5	127.0
12	26.7	78.4	122.9
13	27.6	76.7	126.8
14	27.5	76.7	121.8
15	27.4	77.8	124.3
16	26.5	78.7	119.5
17	27.7	77.2	122.8
18	27.4	74.4	126.4
19	26.9	78.1	121.8
20	27.1	78.0	119.6
均值	27.7	77.5	123.4
标准差	0.580	1.40	3.23
CV	2.10%	1.81%	2.62%

[0114] 如表1所示,样本测试重复20次, CV小于2.6%。

[0115] 4. 准确性实验

[0116] 美国药典纯品(USP)以DMSO溶解至不同浓度储液,以相同倍数稀释至血清中(稀释倍数最少20倍),配置成不同浓度血清VPA(variation partition analysis)溶液,试剂测定并计算与理论值偏差。

[0117] 表3. 本申请的丙戊酸试剂盒准确性实验

USP	测值1	测值2	测值3	均值	相对偏差	绝对偏差
25	22.9	23.5	22.9	23.1	-7.6%	-1.9
30	27.4	27.5	28.0	27.6	-7.9%	-2.4
50	49.7	50.3	50.2	50.1	0.1%	0.1
75	78.6	74.6	77.7	77.0	2.6%	2.0
100	100.5	104.7	104.8	103.3	3.3%	3.3
125	123.1	122.4	125.3	123.6	-1.1%	-1.4

[0119] 5. 药物干扰实验

[0120] 选取13种化合物和药物,在丙戊酸浓度为90 μ g/ml左右时,如下浓度的化合物无统计学意义上显著干扰。

[0121] 表4. 抗干扰实验

序号	干扰化合物	测试浓度 ($\mu\text{g/mL}$)
1	卡马西平	1000
2	苯巴比妥	750
3	扑痫酮	120
4	乙琥胺	1000
5	苯妥英	1000
[0122] 6	水杨酸	100
7	卡马西平-10,11 环氧化物	140
8	2-N-丙基-5-羟基-戊酸	50
9	2-N-丙基-3-羟基-戊酸	100
10	2-N-丙基-4-羟基-戊酸	100
11	2-N-丙基-3-氧代-戊酸	100
12	2-丙基-2-戊酸	20
13	2-N-乙基-2-苯丙二酰胺	100

[0123] 6. 线性实验

[0124] 选择低值样本与高值样本按照等差稀释的方法进行稀释,每个样本重复检测3次,所测得线性数据如表5和图2。

[0125] 表5. 丙戊酸试剂盒线性数据

	测值1	测值2	测值3	均值	理论值	相对偏差	绝对偏差
1	10.0	10.2	10.1	10.1	9.8	3.1%	0.3
2	27.5	25.8	25.1	26.1	26.5	-1.4%	-0.4
3	41.6	44.7	43.1	43.1	43.2	-0.2%	-0.1
4	58.0	62.7	65.3	62.0	59.9	3.6%	2.1
5	75.5	75.9	79.0	76.8	76.6	0.3%	0.2
6	88.5	89.3	89.8	89.2	93.2	-4.3%	-4.0
7	108.4	108.2	110.7	109.1	109.9	-0.8%	-0.8
8	130.5	129.1	130.8	130.1	126.6	2.7%	3.5
9	139.8	144.9	147.7	144.1	143.3	0.5%	0.8
10	159.7	155.8	157.9	157.8	160.0	-1.4%	-2.2
11	172.9	180.9	179.7	177.8	176.7	0.6%	1.1

[0127] 7. 批间差

[0128] 使用三批次本申请试剂(实施例2)和对照试剂(实施例3)分别定标,计算不同批次吸光度变化差异,如表6,图3。

[0129] 表6. 试剂批间差数据

[0130]

试剂	校准品	OD			偏差	
		批次 1	批次 2	批次 3	批次 1/ 批次 3	批次 2/ 批次 3
本申请 试剂	S1	0.5885	0.6267	0.6053	-2.78%	3.54%
	S2	0.6302	0.6698	0.6448	-2.87%	3.24%
	S3	0.6807	0.7201	0.6977	-2.4%4	3.20%
	S4	0.7540	0.7852	0.7730	-2.46%	1.58%
	S5	0.8348	0.8592	0.8391	-0.52%	2.39%
	S6	0.8547	0.8914	0.8710	-1.88%	2.34%
对照方 法试剂	S1	0.3661	0.4384	0.4623	-20.8%	-5.2%
	S2	0.3812	0.4573	0.4872	-21.8%	-6.1%
	S3	0.4119	0.4916	0.5291	-22.2%	-7.1%
	S4	0.4554	0.5258	0.5756	-20.9%	-8.7%
	S5	0.5032	0.5635	0.6147	-18.1%	-8.3%
	S6	0.5376	0.5882	0.6442	-16.5%	-8.7%

[0131] 本申请的优势在于使用了一种新型的丙戊酸衍生物,并使用了选择性较高的马来酰亚胺-巯基的偶联方法,使衍生物和酶可以进行一比一的偶联,大大降低了普通偶联过程所形成的批间差。

[0132] 由此方法制得的丙戊酸试剂有较好的特异性,与常见13种药物无明显交叉反应;准确度和精确度非常高,检测CV小于2.6%,回收率偏差小于8%。本申请的丙戊酸检测试剂盒简便、快捷、成本低,可以在多种主流机型上进行自动化检测。

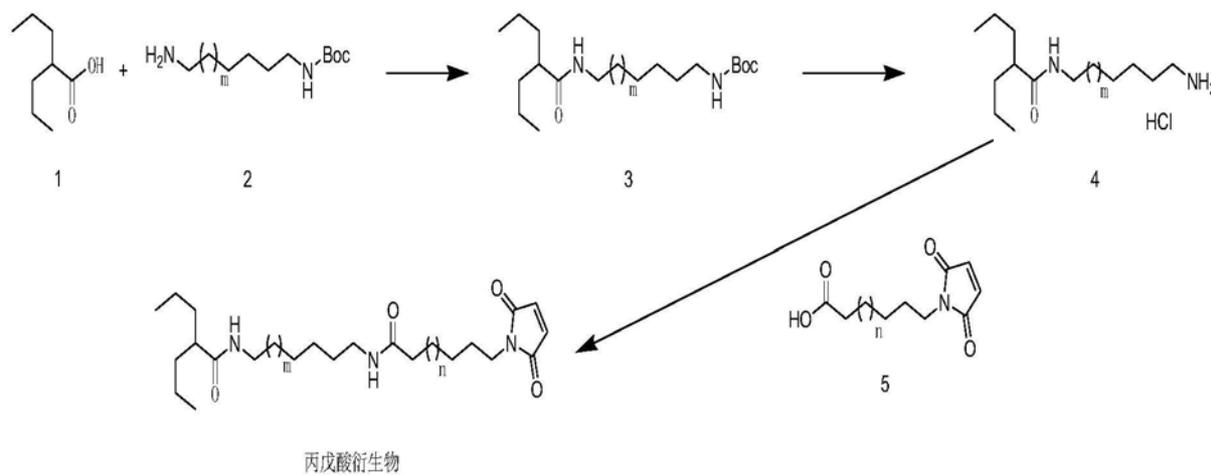


图1

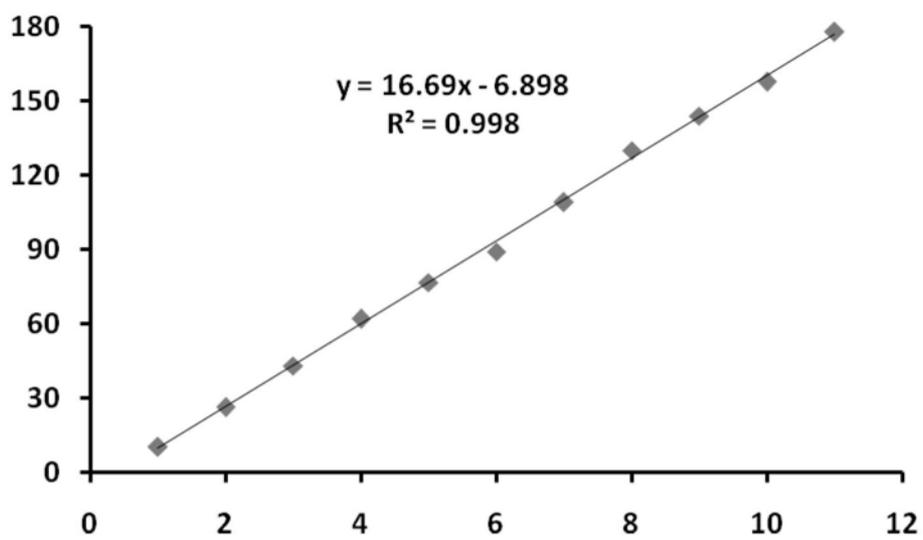


图2

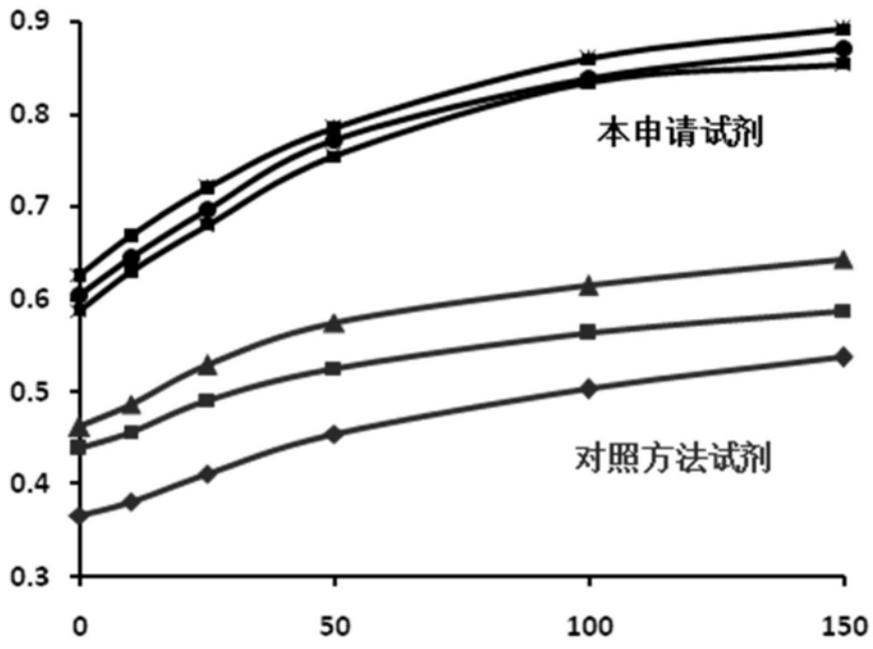
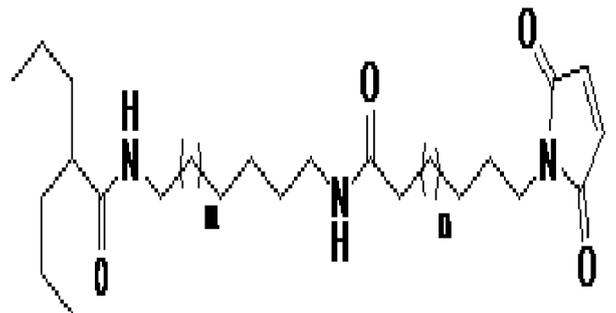


图3

专利名称(译)	丙戊酸衍生物及其在免疫检测中的用途		
公开(公告)号	CN110954707A	公开(公告)日	2020-04-03
申请号	CN201911042028.0	申请日	2019-10-30
[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	王贵利 张启飞 龚俊 刘希		
发明人	王贵利 张启飞 李焱艳 龚俊 刘希		
IPC分类号	G01N33/94 G01N33/535 C07D207/452 C12N9/04		
CPC分类号	C07D207/452 C12N9/0006 C12Y101/01049 G01N33/535 G01N33/94		
代理人(译)	程伟 程云		
优先权	201910598849.6 2019-07-04 CN		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本申请公开了一种丙戊酸衍生物及其在免疫检测中的用途。具体而言，本申请涉及一种丙戊酸衍生物及其制备方法，以及与含有上述丙戊酸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丙戊酸衍生物，并使用了选择性较高的马来酰亚胺-巯基的偶联方法，使衍生物和酶进行1:1偶联，大大降低了常规偶联过程所形成的批间差。本申请的丙戊酸检测试剂盒简便、快捷、成本低，可以在多种主流机型上进行自动化检测。



式I