



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103782167 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 20

(21) 申请号 201280036559. 9

(22) 申请日 2012. 05. 07

(30) 优先权数据

13/114, 218 2011. 05. 24 US

13/160, 370 2011. 06. 14 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 01. 23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/036723 2012. 05. 07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/161948 EN 2012. 11. 29

(73) 专利权人 萨拉戴克斯生物医学公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 S·J·萨拉莫内 J·B·考特尼

H·萨尔德 C·斯佩达列雷

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 过晓东

(51) Int. Cl.

G01N 33/00(2006. 01)

C07H 19/00(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2011/0086111 A1, 2011. 04. 14, 全文.

US 2010/0068827 A1, 2010. 03. 18, 全文.

US 20102/004456 A1, 2010. 08. 12, 全文.

US 2010/0016254 A1, 2010. 01. 21, 全文.

US 7569358 B2, 2009. 08. 04, 全文.

审查员 许珊萍

权利要求书5页 说明书21页

(54) 发明名称

吉西他滨免疫测定

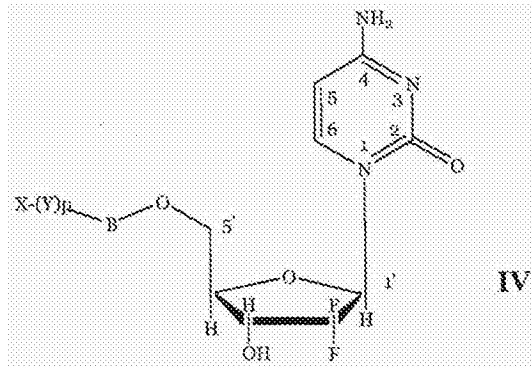
(57) 摘要

本发明包括源自吉西他滨的新缀合物和免疫原以及通过使用吉西他滨连接的免疫原产生的独特抗体,其使免疫原和抗体缀合,用于定量和监测生物流体中的吉西他滨的免疫测定。

1. 一种用于检测样品中的吉西他滨的免疫测定方法,其包括提供 a) 所述样品 ;b) 对吉西他滨具有选择反应性的抗体,并且基于所述抗体与吉西他滨的反应性,所述抗体对 2', 2'-二氟 -2'-脱氧尿苷和四氢尿苷的交叉反应性小于 20% ;以及 c) 缀合物的混合物,

使所述样品中的吉西他滨和所述混合物中的缀合物与所述抗体结合,然后测量所述混合物中结合或未结合所述抗体的缀合物的量,由此能够确定所述样品中吉西他滨的存在,

其中,所述缀合物是具有反应性巯基或氨基的载体与下式的化合物或其盐的缀合物 :



其中 B 是 $-CH_2-$ 或 $\begin{matrix} \text{C-NH-CH}_2- \\ || \\ \text{O} \end{matrix}$,

Y 是有机间隔基团,

X 是能够通过所述氨基或巯基结合所述载体的官能团,并且

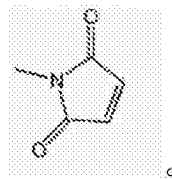
p 是 0-1 的整数 ;并且

所述抗体由包含缀合至式 IV 的化合物或其盐的具有反应性巯基或氨基的免疫原性载体的免疫原产生。

2. 如权利要求 1 所述的免疫测定方法,其中所述样品是人样品。

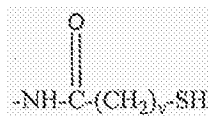
3. 如权利要求 2 所述的免疫测定方法,其中所述载体包含巯基,并且连接至免疫原性聚合物的化合物中的 X 是能够与所述巯基反应的官能团。

4. 如权利要求 3 所述的免疫测定方法,其中 X 是



5. 如权利要求 4 所述的免疫测定方法,其中 Y 是包含 1-10 个碳原子的亚烷基。

6. 如权利要求 5 所述的免疫测定方法,其中所述免疫原性载体包含作为官能团的



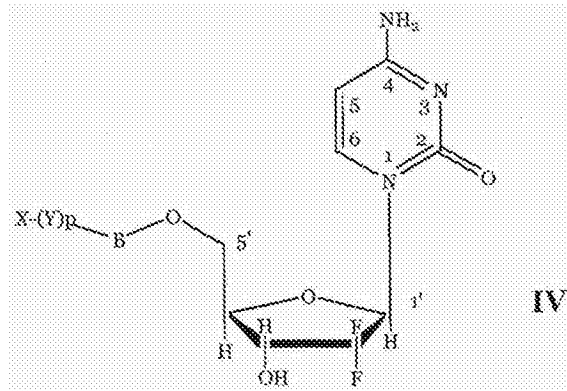
其中 v 是 1-6 的整数。

7. 如权利要求 2 所述的免疫测定方法,其中所述抗体附着至固体支持物。

8. 如权利要求 7 所述的免疫测定方法,其中所述固体支持物是微量滴定板。

9. 如权利要求 7 所述的免疫测定方法,其中所述固体支持物是纳米颗粒。

10. 一种抗体,其选择性地结合吉西他滨,并且基于所述抗体与吉西他滨的反应性,所述抗体对 2', 2'-二氟-2'-脱氧尿苷和四氢尿苷的交叉反应性小于 20%,其中所述抗体源自缀合至选自下式的化合物或其盐的化合物的具有反应性氨基或巯基聚合物的免疫原性载体:



其中 B 是 $-\text{CH}_2-$ 或 $\begin{matrix} \text{C-NH-CH}_2- \\ || \\ \text{O} \end{matrix}$;

Y 是有机间隔基团;

X 是能够通过所述氨基或巯基结合所述载体的官能团;并且

p 是 0-1 的整数。

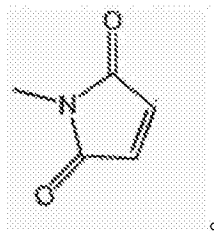
11. 如权利要求 10 所述的抗体,其中所述交叉反应性小于 10%。

12. 如权利要求 10 所述的抗体,其中所述抗体源自小鼠、绵羊、兔或大鼠。

13. 如权利要求 12 所述的抗体,其中所述抗体是单克隆抗体。

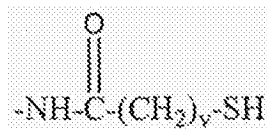
14. 如权利要求 10 所述的抗体,其中所述载体包含巯基,并且缀合至免疫原性聚合物的化合物中的 X 是能够与所述巯基反应的官能团。

15. 如权利要求 14 所述的抗体,其中所述化合物中的 X 是



16. 如权利要求 15 所述的抗体,其中所述化合物中的 Y 是包含 1-10 个碳原子的亚烷基。

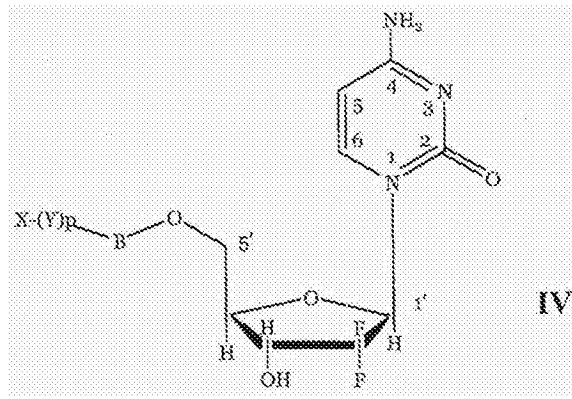
17. 如权利要求 16 所述的抗体,其中所述免疫原性载体包含下式的基团作为官能团:



其中 v 是 1-6 的整数。

18. 如权利要求 17 所述的抗体,其中所述抗体源自小鼠、绵羊、兔或大鼠。

19. 下式的化合物或其盐:



其中 B 是 $-\text{CH}_2-$ 或 $\begin{matrix} \text{C}=\text{N}-\text{CH}_2- \\ \parallel \\ \text{O} \end{matrix}$;

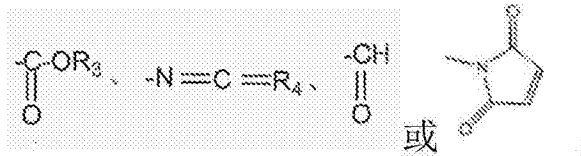
Y 是有机间隔基团 ;

X 是能够通过氨基或巯基结合具有反应性氨基官能团或巯基官能团的免疫原性载体的官能团 ; 并且

p 是 0-1 的整数。

20. 如权利要求 19 所述的化合物, 其中 p 是 0。

21. 如权利要求 20 所述的化合物, 其中 X 是



其中 R_3 是氢, 或与其连接的氧原子一起形成反应性酯, 并且 R_4 是氧或硫。

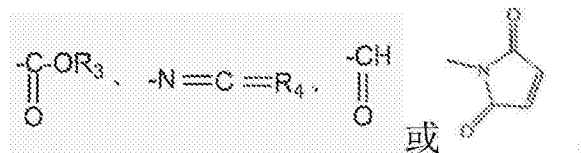
22. 如权利要求 21 所述的化合物, 其中 X 是 $\begin{matrix} \text{C}-\text{OR}_3 \\ \parallel \\ \text{O} \end{matrix}$, 并且 R_3 是氢。

23. 如权利要求 21 所述的化合物, 其中 X 是 $\begin{matrix} \text{C}-\text{OR}_3 \\ \parallel \\ \text{O} \end{matrix}$, 且 OR_3 形成反应性酯。

24. 如权利要求 23 所述的化合物, 其中所形成的酯是低级烷基酯、亚氨基酯或酰氨基酯。

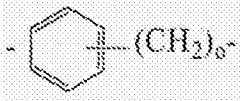
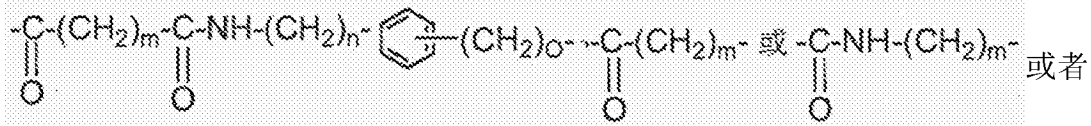
25. 如权利要求 19 所述的化合物, 其中 p 是 1。

26. 如权利要求 25 所述的化合物, 其中 X 是



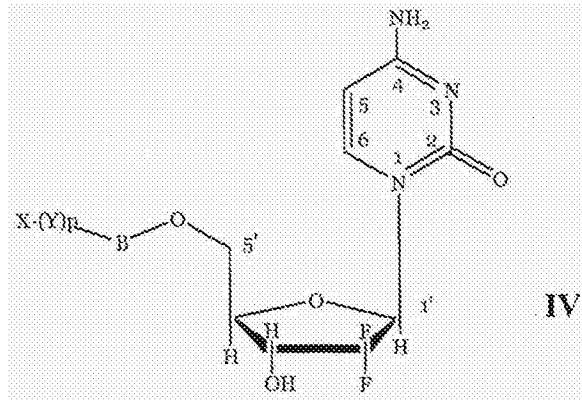
其中 R_3 是氢或与其连接氧原子一起形成反应性酯, 并且 R_4 是氧或硫。

27. 如权利要求 25 所述的化合物, 其中 Y 是包含 1-10 个碳原子的亚烷基、



其中 n 和 o 是 0-6 的整数, 并且 m 是 1-6 的整数。

28. 一种具有巯基或氨基的载体与下式的化合物或其盐的缀合物:



其中 B 是 $-CH_2-$ 或 $-C(=O)-NH-CH_2-$;

Y 是有机间隔基团;

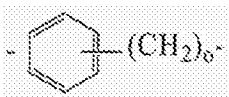
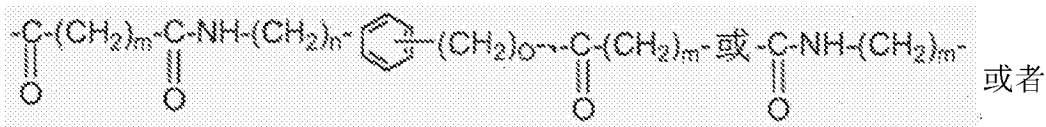
X 是能够通过所述氨基或巯基结合所述载体的官能团; 并且

p 是 0-1 的整数。

29. 如权利要求 28 所述的缀合物, 其中 p 是 0。

30. 如权利要求 28 所述的缀合物, 其中 p 是 1。

31. 如权利要求 30 所述的缀合物, 其中 Y 是包含 1-10 个碳原子的亚烷基、

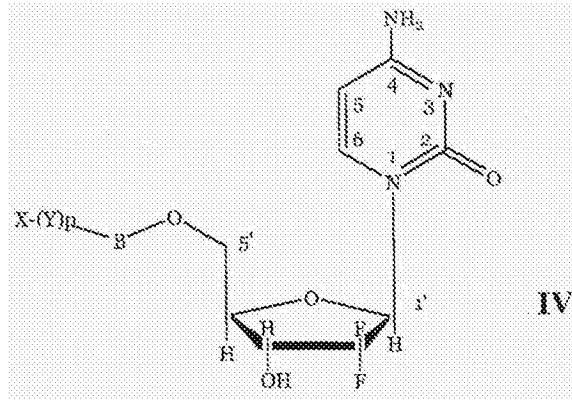


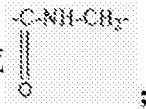
其中 n 和 o 是 0-6 的整数, 且 m 是 1-6 的整数。

32. 如权利要求 31 所述的缀合物, 其中所述载体包含免疫原性聚合物, 其含有一个或

多个由 $-C(=O)-$ 或 $-NH-C(=O)-$ 连接的氨基, 其中 R_4 是氧或硫。

33. 一种用于确定患者样品中存在吉西他滨的试剂盒, 其包含分离容器中的试剂, 所述试剂中的一种是含有官能性氨基或巯基的载体与选自下式的化合物或其盐的化合物的缀合物:



其中 B 是 $-\text{CH}_2-$ 或  ;

Y 是有机间隔基团 ;

X 是能够通过所述氨基或巯基结合所述载体的官能团 ; 并且

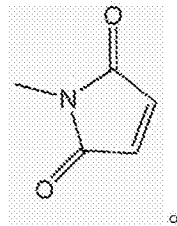
p 是 0-1 的整数 ;

其中所述缀合物以预定量存在于第一容器内, 并且第二容器包含抗体, 所述抗体对吉西他滨具有选择反应性, 并且基于所述抗体与吉西他滨的反应性, 所述抗体对 2', 2'-二氟-2'-脱氧尿苷和四氢尿苷的交叉反应性小于 20%, 所述抗体由包含缀合至式 IV 的化合物或其盐的具有反应性巯基或氨基的免疫原性载体的免疫原产生。

34. 如权利要求 33 所述的试剂盒, 其中所述试剂盒用于确定所述样品中的吉西他滨的量。

35. 如权利要求 34 所述的试剂盒, 其中所述载体具有反应性末端官能性巯基, 并且 X 是能够结合所述巯基的末端官能团。

36. 如权利要求 35 所述的试剂盒, 其中 X 是



吉西他滨免疫测定

技术领域

[0001] 本发明涉及用于确定人生物学样品中的吉西他滨的存在或定量人生物学样品中的吉西他滨的量以快速确定化疗期间最佳的药物浓度的免疫测定领域。

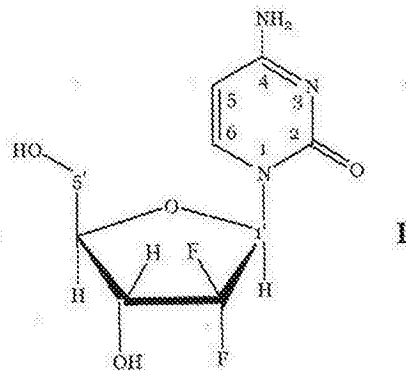
背景技术

[0002] 癌症是用于描述一类都共享身体部位内的细胞开始失控地生长时所带来的共同特性的恶性肿瘤。大多数癌症形成为肿瘤,但也可能显现在通过它们所生长的组织的血液和循环中。癌症恶性肿瘤最通常通过手术、化疗和 / 或放疗的组合来治疗。用于治疗特定癌症的治疗类型取决于若干因素,包括癌症恶性肿瘤的类型和其诊断阶段。

[0003] 吉西他滨是通常使用的细胞毒性剂,其用于治疗胰腺癌 Poplin 等人 J Clin Oncol, 27, 23, 3778-85, 2009 和非小细胞肺癌 Zinner, RG 等人, Int J Radiat Oncol Biol Phys, 73, 1, 119-272009 和 Treat, JA 等人, Ann Oncol, 2009。吉西他滨还用作胰腺癌的辅助疗法 (Saif, MW, JOP, 10, 4, 373-72009 ;Li, J 和 MW Saif, JOP, 10, 4, 361-52009)。虽然得到广泛使用,但该化合物一直伴有变得衰弱的副作用如骨髓抑制,并且伴有肝和肾损伤。通过监测体内的吉西他滨的水平并调整剂量,可以更好地控制并限制患者的这些副作用。

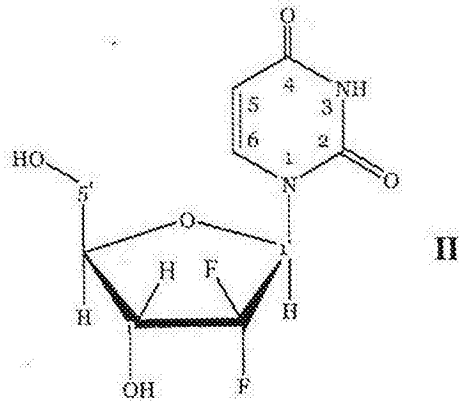
[0004] 吉西他滨是下式的盐酸盐:

[0005]



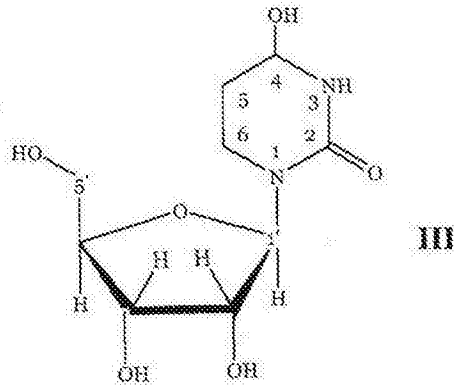
[0006] 在吉西他滨的剂量与所得到的影响治疗效果的血清药物浓度之间存在高度变化的关系。这对女性和老年患者来说是特别重要的。这些组显示较低的清除率,对任何给定剂量产生较高的血浆浓度。吉西他滨 (I) 在体内由胞嘧啶核苷脱氨酶 (CDA) 代谢成其主要的药学上非活性代谢物:2',2'-二氟-2'-脱氧尿苷 (dFdU),其具有下式:

[0007]



[0008] 患者的血液、血浆或血清内至多仅存在痕量的其他吉西他滨代谢物。在准备用于免疫测定的诸如血液和血浆样品的人生物学样品时，必须使用四氢尿苷 (THU)。该保存剂起到在收集患者样品期间抑制胞嘧啶核苷脱氨酶活性的作用以防止吉西他滨进一步代谢成式 II 化合物的非活性代谢物。保存剂四氢尿苷具有下式：

[0009]



[0010] 吉西他滨的个体内或个体间的药物代谢动力学差异度变化极大且受到许多因素的影响，包括：

- [0011] ○器官功能
- [0012] ○遗传调节
- [0013] ○疾病状态
- [0014] ○年龄
- [0015] ○取样时间，
- [0016] ○药物给药模式，以及
- [0017] ○与技术相关的给药。

[0018] 由于此变化，不同个体内的相同剂量的相同药物可能产生显著不同的临床结果，如下面所阐释的 (Hon, YY 以及 WE Evans, Clin Chem, 44, 2, 388-400 1998.)。相同吉西他滨剂量的功效基于个体药物代谢和患者内的最终药物浓度显著变化。治疗药物管理将使临床医师了解患者口腔和静脉内的药物浓度。通过治疗药物管理，药物剂量能够个性化给药至患者，并且有效治疗癌症且没有不期望的副作用的几率将会高得多 (Nieto, Y, Curr Drug Metab, 2, 1, 53-66 2001)。

[0019] 此外，吉西他滨的治疗药物管理将作为极佳的工具来确保以实际处方剂量给药化疗和获得有效的血清浓度水平一致。据发现血清浓度的变化不仅是因为生理因素，

还源于给药技术的变化 (Caffo, O, S Fallani, E Marangon, S Nobili, MI Cassetta, V Murgia, F Sala, A Novelli, E Mini, M Zucchetti 以及 E Galligioni, Cancer Chemother Pharmacol, 2010)。

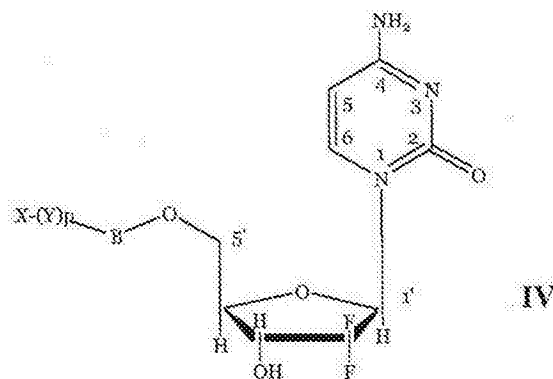
[0020] 吉西他滨的日常治疗药物管理需要获得可适于一般实验室设备的简单自动测试。最符合这些标准的测试是免疫测定,如放射性免疫测定和酶联免疫吸附测定。然而,这些免疫测定中使用的相应抗体必须证明对吉西他滨的宽交叉反应性,而对非药学上活性的吉西他滨代谢物和式 III 的保存剂没有任何明显活性。为了有效地监测吉西他滨的药物水平,抗体应该对活性化合物吉西他滨是最具有特异性的,并且对非药学上活性的代谢物 2', 2'-二氟-2'-脱氧尿苷(式 II 化合物)和保存剂四氢尿苷(式 III 化合物)显示出非常低的交叉反应性到没有交叉反应性。

发明内容

[0021] 根据本发明制备一类新的抗体,其对吉西他滨具有显著的选择反应性以结合吉西他滨,而对其主要的非药学上活性的吉西他滨代谢物 2', 2'-二氟-2'-脱氧尿苷没有任何显著的交叉反应性。此外,这些抗体不与吉西他滨保存剂四氢尿苷反应,这在收集患者样品以使所收集的患者样品中的吉西他滨稳定方面是必要的。就选择反应性而言,其意指这些抗体仅与药学上活性的吉西他滨分子反应,而基本上不与非药学上活性的吉西他滨代谢物(最重要且最基本的阻滞代谢物是 2', 2'-二氟-2'-脱氧尿苷)和保存剂四氢尿苷反应或不与其交叉反应。

[0022] 据发现通过使用免疫原,其是具有反应性巯基或氨基官能团的免疫原性载体与下式的 5-取代的吉西他滨化合物或其盐的缀合物,产生对吉西他滨具有特异性且基本上不与非药学上活性的代谢物 2', 2'-二氟-2'-脱氧尿苷以及四氢尿苷反应或结合的抗体:

[0023]



[0024] 其中

[0025] B 是 $-\text{CH}_2-$ 或 $\begin{array}{c} \text{C} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \text{NH-CH}_2$;

[0026] Y 是有机间隔基团 ;

[0027] X 是能够通过所述氨基或巯基结合所述载体的官能团 ;以及

[0028] p 是 0-1 的整数。

[0029] 提供主要与吉西他滨选择性反应且不与 2', 2'-二氟-2'-脱氧尿苷和四氢尿苷交

又反应的这些抗体使得能产生可以特异性地检测和监测用吉西他滨治疗的患者的流体样品中的吉西他滨的免疫测定方法。本发明还包括用于所述免疫测定方法的试剂和试剂盒。

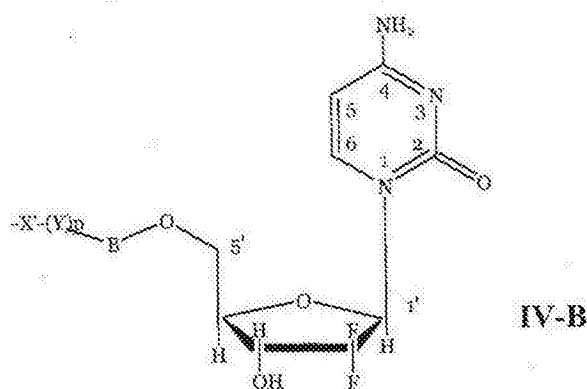
具体实施方式

[0030] 本发明提供一类新抗体,其对吉西他滨具有显著的选择反应性且基本上不与药理学上非活性的吉西他滨代谢物(尤其是2',2'-二氟-2'-脱氧尿苷)和保存剂四氢尿苷反应或基本上不与其交叉反应。据发现通过使用式IV化合物的这些衍生物或其盐作为免疫原,提供本发明的此类新抗体。正是通过使用这些抗体开发了一种用于检测和/或定量血液、血浆或其他体液样品中的吉西他滨的免疫测定方法,其包括使用这样的免疫测定的试剂和试剂盒。通过使用这种免疫测定方法,可以检测和/或定量体液样品,优选血液或血浆样品中的吉西他滨的存在和量。以此方式,可以在治疗期间监测用吉西他滨治疗的患者并根据所述监测调整其治疗。通过本发明,实现对用作为化疗剂的吉西他滨治疗的癌症患者中的吉西他滨的治疗药物管理。

[0031] 本发明的测定方法中所采用的试剂是含有反应性巯基或氨基的载体与式IV化合物或其盐的缀合物。优选地,载体包含聚酰胺聚合物,其包含反应性巯基或氨基。在制备免疫原时,载体是免疫原性聚合物,其优选包含具有反应性巯基或氨基的聚酰胺聚合物。当用在免疫测定方法中时,这些缀合物与样品中存在的吉西他滨是与本发明的抗体结合的竞争性结合配对物(partner)。因此,结合抗体的缀合物试剂的量会与样品中的吉西他滨的量成反比。根据本发明,所述测定方法采用任何常规的测量方式来检测和测量结合或未结合抗体的所述缀合物的量。通过采用所述方式,可以确定结合的或未结合的缀合物的量。通常,通过使由样品中的吉西他滨产生的结合或未结合的缀合物的测量量与由含有已知量(其在待测试的样品预期的范围内)的吉西他滨的样品获得的标准曲线或校准曲线确定的结合或未结合的缀合物的值相关联来确定样品中的吉西他滨的量。使用与样品所使用的相同免疫测定确定关于产生校准曲线的这些研究。

[0032] 包含免疫原的缀合物由式IV化合物或其盐制备。将具有反应性末端氨基或巯基的包含免疫原的载体连接至具有下式的配体部分:

[0033]



[0034] 其中X'是 $-CH_2-$ 或官能连接基团,Y、B和p如上所述。这种配体部分可以连接至含有聚酰胺聚合物的载体上的一个或多个活性巯基或氨基位点。优选地,这些载体包含聚合物,最优选聚酰胺聚合物,其含有反应性巯基或氨基。

[0035] 定义

[0036] 在整个说明书中,理解使用下面的定义:

[0037] 术语吉西他滨包括吉西他滨以及吉西他滨的药学上可接受的盐。

[0038] 术语“免疫原”和“免疫原性”指能够在生物体中引起、导致或产生免疫应答的物质。

[0039] 术语“缀合物”指由两个部分连接在一起形成的任何物质。本发明的代表性缀合物包括诸如式 IV 化合物的小分子和诸如载体或聚酰胺聚合物尤其是蛋白的大分子连接在一起形成的那些缀合物。在缀合物中,小分子可以在大分子上的一个或多个活性位点处连接。术语缀合物包括术语免疫原。

[0040] “半抗原”是部分或不完整的抗原。它们是无载体的物质,主要是不能够刺激抗体形成,但与抗体反应的低分子量物质。抗体通过将半抗原偶联至高分子量免疫原性载体,然后将这种偶联产物即免疫原注入人或动物受试者内来形成。本发明的半抗原是吉西他滨。

[0041] 正如本文中使用的,“间隔基团”或“间隔基”指通过 CH_2 或官能连接基团连接两种或更多种亚结构如半抗原、载体、免疫原、标记物或示踪剂的化学结构的一部分。这些间隔基团将在本申请的下文中进行列举。间隔基团的原子和间隔基团内的链的原子本身由化学键连接。其中优选的间隔基是直链或支链的、饱和或不饱和的碳链。这些碳链也可以在链内或链的末端包含一个或多个杂原子。“杂原子”意指选自氧、氮和硫的非碳原子。间隔基团还可以包含环状基团或芳族基团作为链的一部分或作为链内的一个原子上的取代基。

[0042] 间隔基团内的原子数目由对非氢原子计数决定。间隔基团内的链中的原子数目由对沿着连接的亚结构之间的最短路径的非氢原子的数目计数决定。官能连接基团可以用于活化,如提供半抗原或间隔基团上可用的官能位点,以用于合成半抗原与标记物或载体或聚酰胺聚合物的缀合物。

[0043] 本文中使用的术语“免疫原性载体”是免疫原性物质,通常是蛋白或具有反应性巯基或氨基的修饰的蛋白,其可以与半抗原(在这种情况下是吉西他滨)连接,由此使这些半抗原衍生物诱导免疫应答并引起产生可以特异性地与这些半抗原结合的抗体。免疫原性载体和连接基团将在本申请的下文中进行列举。在免疫原性载体物质中包括可以被认为是外源的且由此引起来自宿主的免疫应答的蛋白、糖蛋白、复合聚氨基-多糖、颗粒以及核酸。聚氨基-多糖可以采用关于此制备已知的任何常规方式由多糖制备。

[0044] 多种蛋白类型也可以用作聚(氨基酸)免疫原性载体。这些类型包括白蛋白、血清蛋白、脂蛋白等。示例性的蛋白包括牛血清白蛋白(BSA)、钥孔血蓝蛋白(KLH)、卵清蛋白、牛甲状腺球蛋白(BTG)等。可选择地,可以采用合成聚(氨基酸)。可选择地,这些蛋白可以被改性以包含反应性巯基。

[0045] 免疫原性载体也可以包含聚氨基-多糖,其是通过单糖反复缩合构建的高分子量聚合物。多糖的示例是淀粉、糖原、纤维素、糖胶如阿拉伯胶、琼脂等。多糖也可以包含聚氨基酸残基和/或脂质残基。

[0046] 免疫原性载体还可以是单独的或缀合至上述聚(氨基酸)或多糖中的一种的聚(核酸)。

[0047] 免疫原性载体还可以包括固体颗粒。颗粒的直径通常是至少约 0.02 微米(μm)且不超过约 100 μm ,并且通常是约 0.05 μm -10 μm 。颗粒可以是有机或无机的,可溶胀的

或不可溶胀的、多孔的或无孔的,最佳地具有近似水的密度,通常约 0.7-1.5g/mL,且包括可以是透明的、部分透明的或不透明的材料。颗粒可以是生物学材料如细胞和微生物,包括非限制性示例,如红细胞、白细胞、淋巴细胞、杂交瘤、链球菌 (*Streptococcus*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌 (*E. coli*) 以及病毒。颗粒还可以包括有机和无机聚合物、脂质体、胶乳、磷脂质载体或脂蛋白。

[0048] “聚(氨基酸)”或“多肽”是由氨基酸形成的聚酰胺。聚(氨基酸)通常在约 2,000 分子量的范围内,没有分子量上限,通常小于 10,000,000,且通常不超过 600,000 道尔顿。通常存在不同的范围,这取决于涉及免疫原性载体,还是酶。

[0049] “肽”是通过酰胺(肽)键连接两个或更多个氨基酸形成的任何化合物,通常是 α -氨基酸的聚合物,其中每个氨基酸残基的 α -氨基(除了 NH_2 末端)连接至线性链中的下一残基的 α -羧基。术语肽、多肽以及聚(氨基酸)在本文中同义使用以指代此类化合物,而并不限制尺寸。此类中的最大成员称为蛋白。这些聚合物肽可以通过常规方式改性以将反应性 NH_2 端基团转化成末端 SH 基团。

[0050] “标记物”、“检测分子”或“示踪剂”是产生或可以被诱导以产生可检测的信号的任何分子。标记物可以缀合至分析物、免疫原、抗体或其他分子如受体或可以结合受体的分子,如配体,尤其是半抗原。标记物的非限制性的示例包括放射性同位素、酶、酶片段、酶底物、酶抑制剂、辅酶、催化剂、荧光团、染料、化学发光剂、发光剂或敏化剂;非磁性颗粒或磁性颗粒、固体支持物、脂质体、配体或受体。

[0051] 术语“抗体”指抗原的特异性蛋白结合配对物且是对抗原具有特异性结合亲和力以排除其他物质的任何物质或物质的组。通用术语抗体包括多克隆抗体、单克隆抗体以及抗体片段。

[0052] 术语“衍生物”指通过一个或多个化学反应由母化合物形成的化合物或分子。

[0053] 术语“载体”指固体颗粒和/或聚合聚合物,如免疫原性聚合物,如上面提到的那些。如果载体是固体颗粒,则固体颗粒可以结合,涂覆有或以其他方式附着至聚酰胺聚合物以提供结合式 IV 化合物中的官能团 X 的一个或多个反应位点。

[0054] 术语“试剂盒”或“测试盒”指用于进行测定的材料的组件。试剂可以提供在相同容器或分离容器中的包装组合内,这取决于它们的交叉反应性和稳定性,且呈液体或冻干形式。提供在试剂盒内的试剂的量和比例可以选择以为特定应用提供最佳的结果。体现本发明特征的试剂盒包括对吉西他滨具有特异性的抗体。试剂盒还可以包括分析物的配体以及校准和对照材料。试剂可以保持呈液体形式或可以是冻干的。

[0055] 短语“校准和对照材料”指含有已知量的待测量的药物的任何标准或参照材料。药物的浓度通过未知物质将所获得的结果与标准品所获得的结果进行比较来计算。这通常通过构建校准曲线来进行。

[0056] 术语“生物学样品”包括但不限于来自活体生物或先前活着的生物的任何量的物质。这样的活体生物包括但不限于人、小鼠、猴、大鼠、兔、马以及其他动物。这样的物质包括但不限于血液、血清、血浆、尿、细胞、器官、组织、骨、骨髓、淋巴、淋巴结、滑膜组织、软骨细胞、滑膜巨噬细胞、内皮细胞以及皮肤。

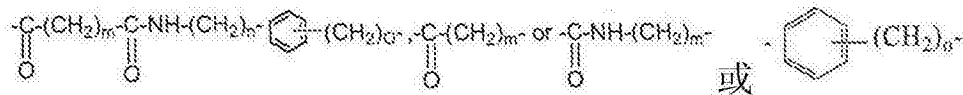
[0057] 试剂和免疫原

[0058] 在构建免疫测定时,构建吉西他滨的缀合物以与样品中的吉西他滨竞争抗体上的

结合位点。在本发明的免疫测定方法中,试剂是式 IV 化合物的 5' 取代的吉西他滨衍生物与具有前述所需特性的抗体的缀合物。在式 IV-B 化合物中,连接基间隔基构成该分子的 $-B-(Y)_p-X'$ 部分。在这些连接基 X' 和间隔基中, $-B-(Y)_p-X'$ 在制备缀合物和免疫原时是常规的。用于制备免疫测定方法的缀合物和免疫原的任何常规间隔基连接基团可以用于式 IV-B 化合物中。这样常规的连接基和间隔基公开在美国专利第 5,501,987 号和第 5,101,015 号中。

[0059] 优选的间隔基团包括前述间隔基团。特别优选的间隔基团是诸如含有 1-10 个碳原子的亚烷基的基团,

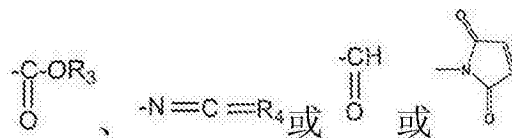
[0060]



[0061] 其中 n 和 o 是 0-6 的整数,并且 m 是 1-6 的整数,并且亚烷基是特别优选的间隔基团。关于由 Y 表示的间隔基团的上述结构,官能团 X 在结构右侧的末端位置处连接,即 $(CH_2)_m$ 和 $(CH_2)_o$ 所处的位置。

[0062] 在式 IV-B 化合物中, X' 是 $-CH_2-$ 或将间隔基连接至聚合载体上的氨基或巯基的官能团。基团 X' 是式 IV 化合物中的末端官能团 X 的结果,其能够结合用作载体或免疫原的聚酰胺聚合物中的氨基或巯基。能够与氨基或巯基反应的任何末端官能团可以用作式 IV 化合物中的官能团 X 。优选包括在 X 内的这些末端官能团是:

[0063]



[0064] 其中 R_3 是氢,或与其连接的氧原子一起形成反应性酯,并且 R_4 是氧或硫。 $-N=C=R_4$ 基团可以是异氰酸酯或异硫氰酸酯。由 $-OR_3$ 形成的活性酯包括亚氨酸酯,如 N -羟基琥珀酰胺、1-羟基苯并三唑以及对-硝基苯基酯。然而,可以使用能够与氨基或巯基反应的任何活性酯。

[0065] 羧基和活性酯通过常规的方式偶联至载体或免疫原性聚合物。诸如蛋白的聚酰胺聚合物上的氨基产生将间隔基连接至聚合免疫原或载体以形成本发明的缀合物的酰胺基团。

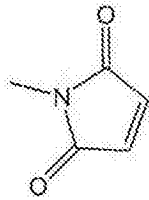
[0066] 当式 IV 化合物中的 X 是

[0067] 时,这些化合物优选地与聚合或免疫原性载体的游离

氨基反应。

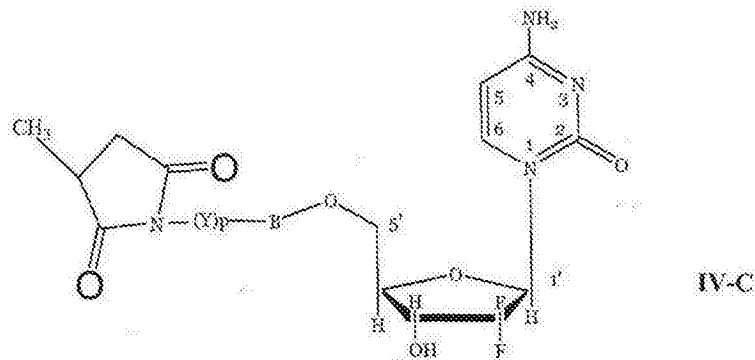
[0068] 另一方面,当式 IV 化合物中的 X 是下式的马来酰亚胺基时

[0069]



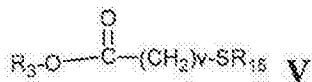
[0070] 该化合物优选与可能存在于包括免疫原在内的聚合或蛋白载体上的巯基（或 SH）反应。在 X 是马来酰亚胺基的情形中，式 IV 化合物具有以下结构：

[0071]



[0072] 根据优选的实施方案，这些式 IV-C 化合物进行反应以附着至已经进行修饰以将氨基转化成巯基的聚合蛋白。这可以通过使聚合蛋白载体的游离氨基与下式的化合物反应来进行

[0073]



[0074] 其中 R_{15} 是巯基保护基团； R_3 如上所述；以及 v 是 1-4 的整数。

[0075] 该反应通过在含水介质中混合含有蛋白的载体与式 V 化合物而在含水介质中进行。在该反应中，温度和压力并不是关键的，并且反应可以在室温和常压下进行。通常优选 10°C - 25°C 的温度。在与式 IV-C 化合物反应的式 V 化合物中，可以采用任何常规的巯基保护剂。巯基保护基团在本领域中是众所周知的，且 2-吡啶二硫代 (2-pyridyldithio) 是优选的保护基团。通过该反应，巯基 SH 成为载体的官能团，其将式 IV 化合物与载体的剩余部分键合。

[0076] 在接下来的步骤中，在式 IV-C 化合物与巯基修饰的载体反应之前，通过常规的方式从通过式 V 化合物与载体反应形成的所得反应产物去除载体的巯基保护基团。用于去除巯基保护基团的任何常规方式可以用于实施该反应。然而，在采用去除巯基保护基团的方式时，必须小心反应物可溶于含水介质且不会以任何方式破坏或损害载体内包含的聚酰胺聚合物。用于去除所述保护基团的优选方式是通过使用二硫苏糖醇作为还原所得缩合产物的物质。该还原可以仅通过向反应介质添加还原剂来实施而无需较高的压力或温度。该还原可以在室温和常压下实施。

[0077] 虽然上述方法表示一种用于将含有聚酰胺聚合物的载体上的反应性末端氨基转化成巯基的方式，但是可以采用实施该转化的任何常规方式。用于将含有聚酰胺聚合物载


体上的末端氨基转化成巯基的方法是本领域众所周知的并且可以根据本发明采用。

[0078] 具有末端反应性巯基的含有聚合聚酰胺的载体与式 IV 化合物（其中 X 是能够结合载体所带有的末端巯基的官能团）的反应可以通过常规方式来实施。IV C 的马来酰亚胺与聚酰胺聚合载体所带有的巯基反应。用于在马来酰亚胺双键两侧添加巯基的任何众所周知的方式可以用于制备通过巯基桥缀合的式 IV 的缀合物。

[0079] 在缀合物中，通过酰胺键键合的缀合物包括本发明的免疫原，含有羧基的吉西他滨半抗原与载体或免疫原上的氨基之间的化学键可以使用本领域技术人员已知的多种方法来获得。通常优选通过使羧基与离去基团试剂（如，N-羟基琥珀酰胺、1-羟基苯并三唑、对-硝基苯基酯等）反应来先活化式 IV 化合物或其药学上可接受的盐中的吉西他滨半抗原的羧酸部分来形成酰胺键。可以使用活化剂，如二环己基碳二亚胺、二异丙基碳二亚胺等。式 IV 化合物或其药学上可接受的盐的吉西他滨半抗原中的羧基的活化形式随后在含有蛋白载体的缓冲溶液中反应。

[0080] 在制备氨基键合的缀合物时，如果式 IV 的吉西他滨的衍生物包含伯氨基或仲氨基以及羧基，则需要在活化和偶联反应期间采用氨基保护基团以防止缀合物与其自身反应。通常，式 IV 的吉西他滨的衍生物上的氨基通过形成相应的 N-三氟乙酰胺、N-叔丁基氧基羰基氨基甲酸乙酯（N-t-BOC 氨基甲酸乙酯）、N-苄氧基羰基氨基甲酸乙酯或类似的结构而受到保护。一旦完成如上所述的对免疫原性聚合物或载体的偶联反应，则可以采用不会以其他方式改变免疫原或缀合物结构的试剂来去除氨基保护基团。这样的试剂和方法对本领域的技术人员来说是已知的，且包括弱的或强的含水酸或无水酸、弱的或强的含水碱或无水碱、含氯化物的试剂如硼氢化钠或氰基硼氢化钠以及催化氢化。使半抗原和载体缀合的多种方法还公开在美国专利第 3,996,344 号和第 4,016,146 号中，这两篇专利援引加入本文。

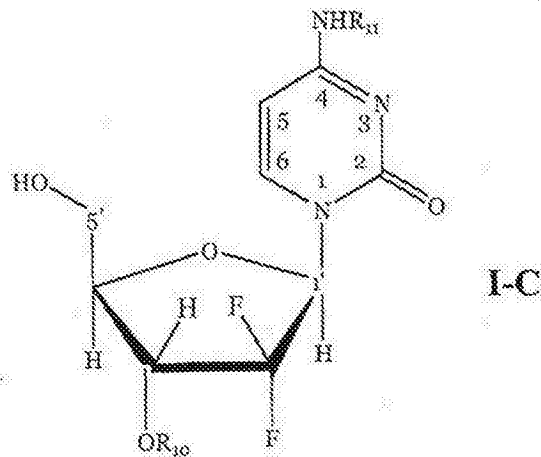
[0081] 另一方面，在制备氨基缀合物其中式 IV 化合物中的 X 是末端异氰酸酯或异硫氰酸酯基团时，这些基团在与聚酰胺聚合物的游离胺反应时产生式 IV-B 的缀合物或免疫原，其中 X' 是 NH

 其中 R₄如上所述，其官能性地与聚酰胺载体上或免疫原性多肽上的氨基连接。

[0082] 在制备式 IV 化合物的氨基缀合物其中 X 是醛基团时，这些化合物可以通过还原性胺化经由胺键连接至聚酰胺多肽或载体的氨基。使醛与胺缩合的任何常规方法如通过还原性胺化可以用于形成该键。在此情形中，式 IV-B- 的配体部分中的 X' 是 -CH₂。

[0083] 式 IV 化合物以及来自该化合物的式 IV-B 化合物由吉西他滨（式 I 的化合物）制备。然而，在由式 I 化合物制备式 IV 化合物时，需要选择性地保护式 I 化合物上的 3' 位的羟基和 4 位的氨基，它们影响 5' 位的游离羟基来制备下式的化合物。

[0084]



[0085] 其中 R_{10} 是可水解的羟基保护基团；并且 R_{11} 是可水解的氨基保护基团。

[0086] 在制备式 I-C 化合物时，将式 I 化合物反应以将游离羟基转化成可水解的羟基保护基团。可以采用将游离羟基转化成可水解的羟基保护基团的任何常规方法。该反应应当在温和的碱性条件下发生，使得 3' 位的羟基受到保护，而在 5' 位上的羟基游离。式 I-C 化合物中的 3' 位上的羟基比 5' 位上的羟基反应性强得多。因此，在温和的碱性含水条件下如使用水性介质中的碳酸氢钠会提供 3' 羟基位置的保护基团而不会影响 5' 位上的羟基。可以使用易于水解的任何常规的羟基保护基团。优选的羟基保护基团是通过在室温下，于温和的碱性含水条件下，使式 I 化合物与叔丁氧基碳酸酯反应形成的叔丁氧基羰基。可以使用任何其他常规的羟基保护基团。优选的保护基团是通过在温和的碱性条件下，使式 I 化合物中的 3' 羟基与链烷酸反应形成 3' 位的酯而在 5' 位留下游离羟基而形成的酯基。具有受保护的 3' 羟基的式 I 化合物可以通过用于保护 3' 位的羟基的相同反应（除了采用升高的温度，即 35°C - 70°C ）转化成式 I-C 化合物。这样，由式 I 化合物形成式 I-C 化合物。

[0087] 其中 B 是 $-\text{CH}_2-$ 的式 IV 的 5' - 取代的化合物通过使吉西他滨的 5' - 羟基与下式的卤化物反应形成：

[0088] 卤素 $-\text{CH}_2-(\text{Y})_p-\text{X}$

[0089] VIII-B

[0090] 其中 p、Y 以及 X 如上所述。

[0091] 在由吉西他滨形成式 IV 化合物时，使醇反应生成醚的任何常规方式可以用于缩合式 VIII-B 化合物与吉西他滨上的 5' 羟基位置。使用式 VIII-B 化合物中的卤化物提供了用于通过与醇缩合形成这样的醚的有效方式。另一方面，如果式 VIII-B 化合物中的 Y 包含可能干扰该反应生成式 II-B 化合物的官能团，则这些官能团可以通过合适的保护基团而受到保护，在如上所述的反应之后，可以去除这些合适的保护基团。

[0092] 通过吉西他滨上的 5' 羟基与下式的氨基化合物反应产生式 IV 的 5' - 取代的化

合物，其中 B 是

[0093] $\text{NH}_2-\text{CH}_2-(\text{Y})_p-\text{X}$ IX

[0094] 其中 X、Y 以及 p 如上所述。

[0095] 在先将吉西他滨上的 5' - 羟基转化成氯仿基团之后，

[0096]



[0097] 可以采用将羟基转化成氯甲酸酯基团的任何常规方式。在形成氯甲酸酯后,氯甲酸酯的卤素基团与式 IX 化合物中的氨基缩合。在该反应之前,吉西他滨和 / 或式 IX 化合物上的反应性基团按照上文描述的方式用常规保护基团进行保护。在该卤化物缩合之后,可以通过诸如上述的常规方式去除这些保护基团。

[0098] 式 IV-B 化合物可以通过使这些化合物与包含末端氨基的聚酰胺或多肽载体反应而转化成本发明的免疫原和 / 或缀合物试剂。相同的多肽可以用作载体和本发明的免疫原中的免疫原性聚合物载体,条件是用于产生抗原的聚酰胺或多肽载体是免疫学活性的。然而,为了形成缀合物,这些聚合物不需要产生免疫原所需的免疫应答。根据本发明,由式 IV-B 化合物中的 X 表示的各种官能团可以通过将官能团附着至聚合载体内所包含的氨基或巯基的常规方式缀合至聚合材料。

[0099] 作为由其制备的包含免疫原的试剂、缀合物的式 IV 化合物可以以其盐形式或以游离碱形式存在于或使用在本发明的免疫测定方法中。式 IV 化合物和由其制备的包含免疫原的缀合物中的游离氨基易于与酸,优选药学上可接受的酸形成盐。式 IV 化合物和由其制备的包含免疫原的缀合物的任何酸式盐可以用在本发明中。这些盐包括无机酸和有机酸的盐,如乙酸、苯磺酸、苯甲酸、樟脑磺酸、柠檬酸、乙烯磺酸、二氯乙酸、甲酸、富马酸、葡糖酸、谷氨酸、马尿酸、氢溴酸、盐酸、羟乙磺酸、乳酸、马来酸、苹果酸、扁桃酸、甲磺酸、粘酸、硝酸、草酸、双羟萘酸、泛酸、磷酸、琥珀酸、硫酸、酒石酸、草酸、对甲苯磺酸等。特别优选富马酸、盐酸、氢溴酸、磷酸、琥珀酸、硫酸以及甲磺酸。

[0100] 抗体

[0101] 本发明还涉及新的抗体,包括通过使用前述免疫原制备的吉西他滨的单克隆抗体。根据本发明,据发现根据本发明制备的这些抗体与吉西他滨具有选择反应性且不与非药理学上活性的代谢物和干扰吉西他滨的免疫测定的其他化合物反应。这些吉西他滨的代谢物中最有问题的是 2', 2' - 二氟 - 2' - 脱氧尿苷且最有问题的保存剂是四氢尿苷。本发明的抗体不与这些非活性代谢物和所述保存剂反应的能力使得这些抗体在提供吉西他滨的免疫测定时是特别有价值的。

[0102] 本发明涉及吉西他滨的新抗体和单克隆抗体。本发明的抗血清可以通过用本发明的免疫原免疫宿主动物方便地制备。合适的宿主动物包括啮齿动物,如小鼠、大鼠、兔、豚鼠等,或高等哺乳动物,如山羊、绵羊、马等。根据引起动物体内的免疫应答的普遍接受的方案,可以给出初始剂量、出血以及加强注射,如在优选的实施方案中,小鼠 i. p. 接受 100 μ g 免疫原 / 小鼠的初始剂量以及 6 个月时段内的 50-100 μ g 免疫原 / 小鼠的一次或多次随后的加强注射。通过定期出血,通过常规免疫测定观察到免疫小鼠的血液样品产生抗吉西他滨的抗体。这些方法提供了筛查产生具有期望活性的抗血清的宿主的便利方式。针对吉西他滨的主要的药学上非活性代谢物,尤其是 2', 2' - 二氟 - 2' - 脱氧尿苷和保存剂四氢尿苷筛查了抗体,并且显示出没有明显结合这些化合物。

[0103] 根据上述方案免疫 Balb/c 小鼠,然后从细胞融合前 4 天开始连续 3 天通过 i. p. 或

i. v. 给小鼠注射 100 μ g 免疫原来便利地产生单克隆抗体。当然也可以采用抗体领域众所周知的其他方案。本文详细描述完整的免疫方案提供对吉西他滨的抗体的血清抗体应答的最佳方案。

[0104] 从宿主的脾、外周血、淋巴结或其他组织获得的 B 淋巴细胞可以用作产生单克隆抗体的细胞。最优选从脾获得 B 淋巴细胞。能够产生本发明的期望单克隆抗体的杂交瘤是通过融合这样的 B 淋巴细胞与永生细胞系来获得的, 该永生细胞系是对杂交细胞赋予长期组织培养稳定性的细胞系。在本发明的优选实施方案中, 永生细胞可以是类淋巴母细胞 (lymphoblastoid cell) 细胞或浆细胞瘤如骨髓瘤细胞。产生吉西他滨单克隆抗体的小鼠杂交瘤通过融合小鼠骨髓瘤细胞和来自针对吉西他滨-蛋白缀合物免疫的小鼠的脾细胞而形成。嵌合和人源化单克隆抗体可以通过如下方法产生: 从杂交瘤细胞克隆产生抗体的基因, 并且采用本领域现在众所周知的重组 DNA 方法将小鼠可变区的亚序列连接至人恒定区, 或使人抗体框架区与来自供体小鼠或大鼠免疫球蛋白的互补决定区 (CDR) 组合。用于实施小鼠单克隆抗体人源化的改进方法 (其提供增强亲和力的抗体) 在国际专利申请第 W092/11018 号中描述。

[0105] 可以产生仅包含一级抗体结构的一部分的多肽片段, 该片段具有一种或多种免疫球蛋白活性。这些多肽片段可以通过本领域众所周知的方法进行完整抗体的蛋白水解性切割, 或通过使用定点诱变将终止密码子插入含有抗体基因的表达载体的期望位置处以产生 Fab 片段或 (Fab')₂ 片段。单链抗体可以通过将 VL 和 VH 区与 DNA 接头相连来产生 (参见 Huston 等人的 Proc. Natl. Acad. Sci. U. SA., 85:5879-5883 (1988) 和 Bird 等人的 Science, 242:423-426 (1988))。

[0106] 本发明的抗体对吉西他滨具有选择性且与吉西他滨主要的药学上非活性的代谢物 2', 2'-二氟-2'-脱氧尿苷和吉西他滨的保存剂四氢尿苷基本上没有任何交叉反应性或反应性。就基本上没有交叉反应性而言, 其意指基于它们与吉西他滨的反应性, 本发明的抗体与吉西他滨的非药学上活性的代谢物 2', 2'-二氟-2'-脱氧尿苷和其保存剂四氢尿苷的交叉反应性小于 20%。优选交叉反应性小于 15% 的这些抗体, 并且特别优选交叉反应性至多 1% 的这些抗体, 百分数是基于这些抗体与吉西他滨的反应性。

[0107] 免疫测定

[0108] 根据本发明, 由 IV 化合物或其盐的免疫原产生的缀合物和抗体可以用作确定患者样品中的吉西他滨的试剂。这种确定通过免疫测定来进行。由 IV 化合物或其盐形成的试剂缀合物与样品中的吉西他滨竞争根据本发明产生的抗体上的结合位点的任何免疫测定可以用于确定患者样品中吉西他滨的存在。进行疑似含有吉西他滨的样品中的吉西他滨的此类测定的方式包括使 (a) 含水介质样品、(b) 根据本发明产生的吉西他滨的抗体以及 (c) 由式 IV 化合物或其盐形成的缀合物组合。样品中的吉西他滨的量可以通过测量对结合添加到样品与抗体的混合物中的已知量的缀合物的特异性抗体的抑制来确定。将对未知样品的已知量的缀合物的此类结合的抑制的结果与通过采用已知的吉西他滨标准溶液在相同测定中获得的结果进行比较。

[0109] 各种方式可以用于测量由式 IV 化合物或其盐形成的缀合物结合抗体的量。一种方法是缀合物结合抗体造成荧光团缀合物的旋转速率降低。液体混合物中荧光团缀合物旋转速率的降低量可以通过诸如美国专利第 4, 269, 511 号和第 4, 420, 568 号中公开的荧光极

化技术来检测。

[0110] 另一方面,抗体可以涂覆或吸附在纳米颗粒上,从而当这些颗粒与式 IV 化合物或其盐形成的吉西他滨缀合物反应时,这些纳米颗粒形成聚集体。然而,当抗体涂覆或吸附的纳米颗粒与样品中的吉西他滨反应时,结合这些纳米颗粒的来自样品的吉西他滨并不会造成抗体纳米颗粒的聚集。聚集或凝集的量可以在测定混合物中通过吸光度测量。

[0111] 另一方面,这些测定可以通过使抗体或吉西他滨缀合物连接于诸如微量滴定板或包括固体颗粒在内的任何其他常规固体支持物的固体支持物来进行。使抗体和蛋白连接于这样的固体颗粒在本领域中是众所周知的。可以采用任何常规的方法来进行这样的连接。在许多情形中,为了辅助测量,可以将标记物置于抗体、缀合物或固体颗粒上,如放射性标记物或酶标记物,以辅助检测与抗体结合或未与抗体结合的由式 IV 化合物或其盐形成的缀合物的量。其他合适的标记物包括发色团、荧光团等。

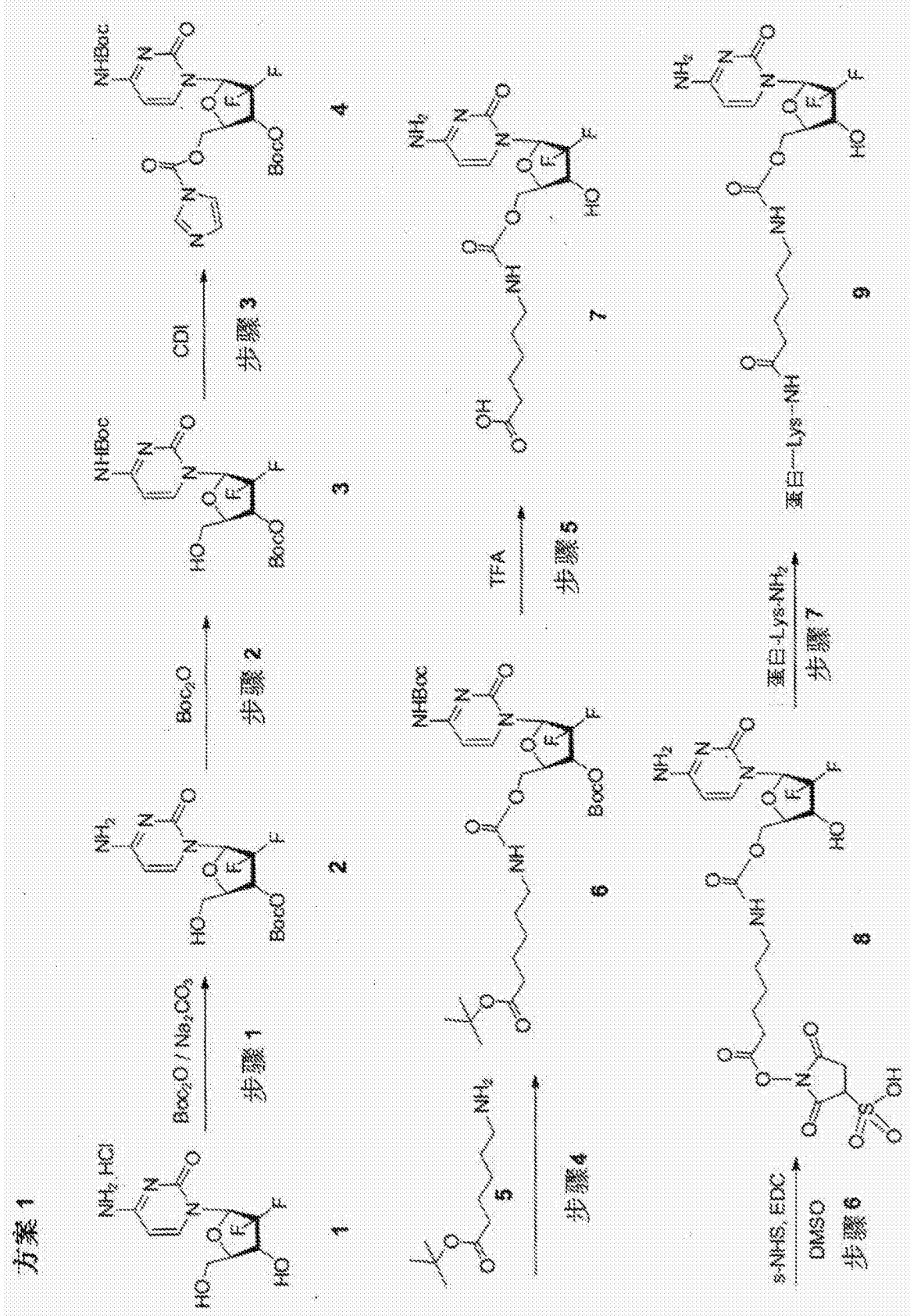
[0112] 为方便起见,本发明的测定组分可以提供在试剂盒中,具有用于吉西他滨的测定所采用的预定量的新试剂的包装组合中。这些试剂包括本发明的抗体以及由式 IV 的化合物或其盐形成的缀合物。除了这些必要的试剂外,诸如辅助试剂的添加剂可以包含在这些试剂盒内,如稳定剂、缓冲剂等。各种试剂的相对量可以广泛变化以提供溶液中的试剂浓度,这显著优化测定的灵敏度。试剂可以以溶液或干粉,通常是冻干的形式提供,包括溶解时会提供具有进行测定的合适浓度的试剂溶液的赋形剂。

[0113] 实施例

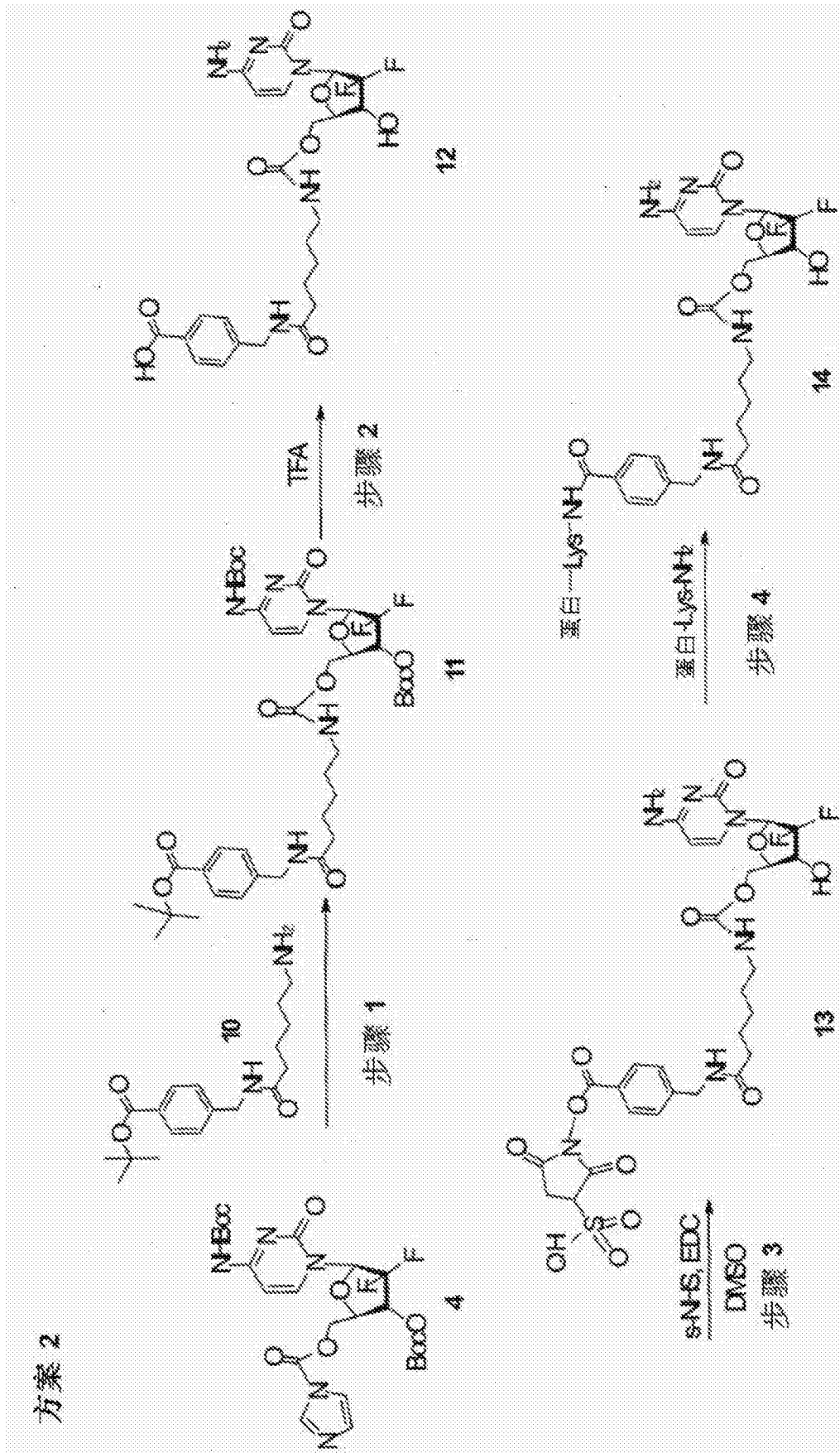
[0114] 在实施例中使用下面的缩写:

- | | | |
|--------|---------------------------------|--------------------------|
| [0115] | EtOAc | 乙酸乙酯 |
| [0116] | Na ₂ CO ₃ | 碳酸二钠 |
| [0117] | Boc ₂ O | 二碳酸二叔丁酯 |
| [0118] | CDI | 1',1'-羰基二咪唑 |
| [0119] | Na ₂ SO ₄ | 硫酸钠 |
| [0120] | CH ₂ Cl ₂ | 二氯甲烷 |
| [0121] | THF | 四氢呋喃 |
| [0122] | N ₂ | 氮气 |
| [0123] | THF | 四氢呋喃 |
| [0124] | TFA | 三氟乙酸 |
| [0125] | DMSO | 二甲亚砜 |
| [0126] | s-NHS | 硫代-N-羟基琥珀酰亚胺 |
| [0127] | EDC | 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸 |
| [0128] | KLH | 钥孔血蓝蛋白 |
| [0129] | BSA | 牛血清白蛋白 |
| [0130] | PBS | 磷酸盐缓冲盐水 |
| [0131] | NaCl | 氯化钠 |
| [0132] | HRP | 辣根过氧化物酶 |
| [0133] | ANS | 8-苯胺基-1-萘硫酸 |
| [0134] | TMB | 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 |

- [0135] TRIS 三(羟甲基)氨基甲烷盐酸
- [0136] di-H₂O 去离子水
- [0137] 磷酸盐缓冲组合物具有含有
- [0138] 15.4mM 磷酸氢二钠 (Na₂HPO₄)
- [0139] 4.6mM 磷酸二氢钠 (NaH₂PO₄) 的水溶液, pH=7.2±0.10。
- [0140] 在实施例中, 下面的方案 1 和方案 2 提供了所制备的特定化合物且由实施例的编号表示。方案如下所示:
- [0141]



[0142]



[0143] 实施例 1

[0144] 制备 5'-O-N-羰基(吉西他滨)-6'-氨基己酸酯 [7] (方案 1)

[0145] 将化合物 [1] (1.2g, 4.0mmol) 和 Boc_2O (0.88g, 4.0mmol) 在二噁烷 (60mL) 中搅拌并添加在水 (15mL) 中的 Na_2CO_3 溶液 (2.12g, 20.0mmol)。在 25°C 下搅拌反应混合物 48 小时以产生混合物中的 [2]。向反应混合物中添加水 (40mL) 并用 EtOAc 萃取产物 [2]。用盐水洗涤 EtOAc 有机相, 干燥 (Na_2SO_4) 并蒸发至白色固体, 随后用 10% CH_2Cl_2 /己烷研制以获得化合物 [2] (1.26g, 87%)。

[0146] 将化合物 [2] (1.25g, 3.44mmol) 和 Boc_2O (7.52g, 34.40mmol) 混合在二噁烷 (100mL) 中并在 37°C 下加热 48 小时以提供 [3]。将溶剂蒸发至白色固体, 并且将白色固体用 10% CH_2Cl_2 /己烷研制以获得化合物 [3] (1.30g, 82%)。

[0147] 将化合物 [3] (1.30g, 2.80mmol) 和 1,1'-羰基二咪唑 (0.52g, 3.20mmol) 混合在 THF (20mL) 中并在 50°C 下加热 6 小时。将溶剂蒸发, 将残余物溶解在 EtOAc 中, 用水洗涤, 用 Na_2SO_4 干燥, 并且将溶剂蒸发以得到白色固体的化合物 [4] (1.60g, 100%)。

[0148] 将化合物 [4] (1.50g, 2.69mmol) 和化合物 [5] (0.60g, 3.23mmol) 混合在 THF (20mL) 中并在 50°C 下加热 24 小时。用 EtOAc 稀释反应混合物, 顺次用水和盐水洗涤, 用 Na_2SO_4 干燥, 并且将溶剂蒸发至白色固体。通过采用 10-50%EtOAc/己烷的快速色谱法来纯化该材料以获得化合物 [6] (1.40g, 77%)。

[0149] 将化合物 [6] (1.40g, 2.07mmol) 溶解在无水 CH_2Cl_2 (15mL) 中并向在 N_2 下于 0°C 下搅拌的溶液中添加 TFA (15mL)。在 0°C 下持续搅拌 3 小时, 然后在 15°C 下搅拌 1 小时。在减压下去除溶剂, 且将所得的残余物溶解在水中并冻干以分离白色粉末的化合物 [7] (1.04g, 94%)。

[0150] 实施例 2

[0151] 制备 5'-O-N-羰基-(吉西他滨)-6'-甲基氨基甲酰基苯甲酸 [12] (方案 2)

[0152] 将化合物 [4] (0.60g, 1.08mmol) 和化合物 [10] (0.38g, 1.19mmol) 混合在 THF (20mL) 中并在回流下加热 24 小时。用 EtOAc 稀释反应混合物, 顺次用水和盐水洗涤, 用 Na_2SO_4 干燥, 并且将溶剂蒸发至白色固体。通过采用 10-90%EtOAc/己烷的快速色谱法来纯化该材料以获得化合物 [11] (0.47g, 54%)。

[0153] 将化合物 [11] (0.47g, 0.58mmol) 溶解在无水 CH_2Cl_2 (10mL) 中并在 N_2 下于 0°C 下添加 TFA (10mL)。在 0°C 下持续搅拌 3 小时, 然后在 15°C 下搅拌 1 小时。在减压下去除溶剂, 且将所得的残余物溶解在水中并冻干以分离米色粉末的化合物 [12] (0.33g, 85%)。

[0154] 实施例 3

[0155] 从相应的酸 [7] 和 [12] 制备 s-NHS 活化的药物衍生物的一般方法

[0156] 在实施例 3a 和 3b 中, 用 EDC 和 s-NHS 活化吉西他滨酸式衍生物 [7] 和 [12] 以产生吉西他滨的 s-NHS 活化的酯 [8] 和 [13] 用于最终缀合至蛋白 (实施例 4 和 5)。

[0157] 实施例 3a

[0158] 制备 s-NHS 活化的酯 5'-O-N-羰基(吉西他滨)-6'-氨基己酸酯 [8]

[0159] 将化合物 [7] (实施例 1, 方案 1) (101.3mg) 溶解在 10mL 的 DMSO 中, 向其添加 s-NHS (121.7mg) 和 EDC (107.1mg)。在氮气氛下, 于环境温度下搅拌反应混合物 20 小时以产生化合物 [8]。将反应混合物直接用于实施例 4 和 5a。

[0160] 实施例 3b

[0161] 制备 s-NHS 活化的酯 5'-O-N-羰基-(吉西他滨)-6'-甲基氨基甲酰基苯甲酸 [13]

[0162] 将化合物 [12] (实施例 2, 方案 2) (22.7mg) 溶解在 2.2mL 的 DMSO 中并添加 s-NHS(19.2mg) 和 EDC(21.9mg)。在氮气氛下,于环境温度下搅拌反应混合物 20 小时以产生化合物 [13]。将反应混合物直接用于实施例 5b。

[0163] 实施例 4

[0164] 制备吉西他滨-KLH 缀合物 [9]

[0165] 通过将 300mg 的 KLH 溶解在 15mL 的磷酸盐缓冲液 (50mM, pH7.5) 中,然后添加 4.74mL 实施例 3a 中制备的化合物 [8] 来制备 KLH 的蛋白溶液。在室温下搅拌 KLH 和化合物 [8] 的反应混合物 20 小时以产生吉西他滨 KLH 缀合物 [9]。然后通过在室温下针对磷酸盐缓冲液 (50mM, pH7.5) 中的 30%DMSO 透析来纯化吉西他滨 KLH 缀合物 [9]。此后,将 DMSO 比例逐步减少:20%、10% 和 0%。在 4°C 下针对磷酸盐缓冲液进行最后一次透析。通过紫外光-可见光光谱表征吉西他滨 KLH 缀合物 [9]。将缀合物在磷酸盐缓冲液中稀释至 2mg/mL 的最终浓度 (50mM, pH7.5)。

[0166] 实施例 5a

[0167] 用活化的半抗原、吉西他滨 [8] 制备 BSA 缀合物 [9]

[0168] 通过将 1g BSA 溶解在磷酸盐缓冲液 (50mM, pH7.5) 中来制备最终浓度 50mg/mL 的 BSA 的蛋白溶液。向该蛋白溶液添加 0.83mL 实施例 3a 中制备的 s-NHS 活化的吉西他滨衍生物 [8]。计算添加到 BSA 的蛋白溶液中的 s-NHS 活化的吉西他滨衍生物 [8] 的量使得吉西他滨衍生物 [8] 与 BSA 之间的摩尔比为 1:1。使 BSA 与活化的吉西他滨衍生物 [8] 的混合物在室温下搅拌 18 小时以产生活化的吉西他滨酯 [8] 与 BSA 的缀合物。然后通过在室温下针对磷酸盐缓冲液 (50mM, pH7.5) 中的 20%DMSO 透析来纯化缀合物。此后,将 DMSO 比例逐步减少:10% 和 0%。在 4°C 下针对磷酸盐缓冲液进行最后一次透析。通过 UV/VIS 光谱表征纯化的吉西他滨 [9]-BSA 缀合物。

[0169] 实施例 5b

[0170] 用活化的半抗原、吉西他滨-[13] 制备 BSA 缀合物 [9]

[0171] 通过将 1g BSA 溶解在磷酸盐缓冲液 (50mM, pH7.5) 中来制备最终浓度 50mg/mL 的 BSA 的蛋白溶液。在冰上搅拌的同时,向 10.0mL 蛋白溶液中添加 0.620mL 实施例 3b 中制备的 s-NHS 活化的吉西他滨衍生物 [13]。计算添加到 BSA 的蛋白溶液中的 s-NHS 活化的吉西他滨衍生物 [13] 的量使得吉西他滨衍生物 [13] 与 BSA 之间的摩尔比为 1:1。使 BSA 与活化的吉西他滨衍生物 [13] 的混合物在室温下搅拌 18 小时以产生活化的吉西他滨酯 [13] 与 BSA 的缀合物。然后通过在室温下针对磷酸盐缓冲液 (50mM, pH7.5) 中的 15%DMSO 透析来纯化缀合物。此后,将 DMSO 比例逐步减少:10%、5% 和 0%。在 4°C 下针对磷酸盐缓冲液进行最后一次透析。通过 UV/VIS 光谱表征纯化的吉西他滨 [9]-BSA 缀合物。

[0172] 实施例 6

[0173] 制备吉西他滨-KLH[9] 的多克隆抗体

[0174] 将 10 只雌性 BALB/c 小鼠用 100 μ g/ 小鼠的吉西他滨-KLH 免疫原 [9] i. p. 免疫,如实施例 4 中制备的,在弗氏完全佐剂中乳化。在用 100 μ g/ 小鼠的乳化在弗氏不完全佐剂中的相同免疫原初始注射后四周,将小鼠加强注射一次。加强注射 20 天后,通过眼眶出血获得了含有来自每只小鼠的多克隆抗体的测试血。在实施例 8 和 9 中评价来自含有吉西他滨抗体的这些测试血液的抗血清。

[0175] 实施例 7a

[0176] 用吉西他滨-BSA 缀合物 [9] 进行的微量滴定板敏化过程

[0177] 在为蛋白结合优化且每板包含 96 个孔的聚苯乙烯微量滴定板 (Nunc MaxiSorp F8Immunomodules) 中进行测量吉西他滨浓度的 ELISA 法。通过添加 300 μ L 的 0.05M 碳酸钠, pH9.6 中的 10 μ g/mL 的吉西他滨-BSA 缀合物 [9] 并在室温下温育 3 小时来用吉西他滨-BSA 缀合物 [9] (如实施例 5a 制备) 涂覆每个孔。在室温下, 用 0.05M 碳酸钠, pH9.6 洗涤孔, 然后用 375 μ L 的 5% 蔗糖、0.2% 酪蛋白酸钠溶液封闭孔 30 分钟。去除涂覆后溶液之后, 将板在 37 $^{\circ}$ C 下干燥过夜。

[0178] 实施例 7b

[0179] 用吉西他滨-BSA 缀合物 [14] 进行的微量滴定板敏化过程

[0180] 在为蛋白结合优化且每板包含 96 个孔的聚苯乙烯微量滴定板 (Nunc MaxiSorp F8Immunomodules) 中进行测量吉西他滨浓度的 ELISA 法。通过添加 300 μ L 的 0.05M 碳酸钠, pH9.6 中的 10 μ g/mL 的吉西他滨-BSA 缀合物 [14] 并在室温下温育 3 小时来用吉西他滨-BSA 缀合物 [14] (如实施例 5b 制备) 涂覆每个孔。在室温下, 用 0.05M 碳酸钠, pH9.6 洗涤孔, 然后用 375 μ L 的 5% 蔗糖、0.2% 酪蛋白酸钠溶液封闭孔 30 分钟。去除涂覆的溶液之后, 将板在 37 $^{\circ}$ C 下干燥过夜。

[0181] 实施例 8

[0182] 抗体筛选过程-滴度

[0183] 这个过程是为了找到用于置换如实施例 9 中的待测试抗体的稀释度。借助用实施例 7a 和 7b 中制备的吉西他滨-BSA 缀合物敏化的微量滴定板进行筛选吉西他滨抗体 (在实施例 6 中制备) 的 ELISA 法。通过将含有多克隆吉西他滨抗体的来自测试血的小鼠血清 (如实施例 6) 在含有 0.1%BSA 和 0.01% 硫柳汞的磷酸盐缓冲盐水中稀释至 1:10、1:100、1:1,000 和 1:10,000 (体积/体积) 来进行抗体筛选测定。向吉西他滨-BSA 敏化的孔 (在实施例 7a 和 7b 中制备) 中的每个孔添加 50 μ L 含有 0.1%BSA 和 0.01% 硫柳汞的磷酸盐缓冲盐水以及 50 μ L 稀释的抗体并在振荡的同时于室温下温育 10 分钟。在温育期间, 抗体结合被动地吸附在孔内的吉西他滨-BSA 缀合物 (实施例 7a 和 7b)。将板的孔用 0.02M TRIS、0.9%NaCl、0.5% 吐温-80 和 0.001% 硫柳汞, pH7.8 洗涤 3 次以去除任何未结合的抗体。为了检测孔中结合吉西他滨-BSA 缀合物的吉西他滨抗体的量, 向每个孔内添加 100 μ L 在具有 0.1%BSA、0.05%ANS、0.01% 硫柳汞的 PBS 中稀释至特异性活性 (约 1/3000) 的山羊抗小鼠抗体-HRP 酶缀合物 (Jackson ImmunoResearch), 所述山羊抗小鼠抗体-HRP 酶缀合物能够在与底物 (在该实施例中为 TMB) 温育时与小鼠免疫球蛋白特异性结合并产生有色产物。在振荡的同时于室温下温育 10 分钟后, 期间山羊抗-小鼠抗体-HRP 酶缀合物结合孔中的吉西他滨抗体, 将板再洗涤三次以去除未结合的山羊抗-小鼠抗体-HRP 酶缀合物。为了在孔内显影可测量的颜色, 洗涤之后添加 100 μ L 的 TMB (TMB 底物, BioF_x), HRP 的底物, 在室温下振荡以显色 10 分钟。在显色温育之后, 在 650nm 下测定吸光度 (Molecular Devices Plate Reader)。孔内抗体的量与所测得的吸光度成比例且表示为得到 1.5 的吸光度的稀释度 (滴度)。将测得的抗体稀释度 (x-轴) 对 650nm 的吸光度 (y-轴) 作图并在 1.5 的吸光度插入滴度来测定滴度。产生 1.5 的吸光度的滴度决定实施例 9 所述的间接竞争性微量滴定板测定中使用的抗体的浓度 (稀释度)。

[0184] 实施例 9

[0185] 测定 IC_{50} 和抗体对吉西他滨的交叉反应性的间接竞争性微量滴定板免疫测定过程

[0186] 借助用如实施例 7a 和 7b 所述的吉西他滨-BSA 缀合物敏化的微量滴定板进行测定 IC_{50} 值和交叉反应性的 ELISA 法。分析物稀释如下：将吉西他滨在含有 0.1%BSA 和 0.01% 硫柳汞的磷酸盐缓冲盐水中稀释至 0.1-500ng/mL 的浓度范围，用于吉西他滨 [9]-BSA 微量滴定板和吉西他滨 [14]-BSA 微量滴定板，将 2', 2'-二氟-2'-脱氧尿苷和四氢尿苷稀释在含有 0.1%BSA 和 0.01% 硫柳汞的磷酸盐缓冲盐水中稀释至 0.02-0.1 μ g/mL 的浓度范围，用于吉西他滨 [9]-BSA 微量滴定板和吉西他滨 [14]-BSA 微量滴定板。通过将 50 μ L 分析物溶液与 50 μ L 选自具有实施例 4 的免疫原的实施例 6 制备的多克隆抗体的一种温育来进行每个测定。通过将每个孔内抗体的浓度稀释至实施例 8 中测定的滴度来进行所有测定。在 10 分钟温育期间（在室温下，振荡），孔内的吉西他滨-BSA 缀合物（实施例 7a 和 7b 中制备）与溶液中的分析物之间存在抗体结合竞争。在温育之后，将板的孔用 0.02M TRIS、0.9%NaCl、0.5%吐温-80 和 0.001% 硫柳汞，pH7.8 洗涤三次以去除未结合的任何物质。为了检测结合孔内的吉西他滨-BSA 缀合物（实施例 7a 和 7b 中制备）的吉西他滨抗体的量，向每个孔内添加 100 μ L 在具有 0.1%BSA、0.05%ANS、0.01% 硫柳汞的 PBS 中稀释至预定特异性活性（约 1/3000）的山羊抗小鼠抗体-HRP 酶缀合物（Jackson Immunoresearch），所述山羊抗小鼠抗体-HRP 酶缀合物能够在与底物（在该实施例中是 TMB）温育时与小鼠免疫球蛋白特异性结合并产生有色产物。在振荡的同时于室温下温育 10 分钟后，期间山羊抗小鼠抗体-HRP 酶缀合物结合孔内的吉西他滨抗体，将板再洗涤三次以去除未结合的第二缀合物。为了在孔内显影可测量的颜色，洗涤之后添加 100 μ L 的 TMB（TMB 底物，BioF_x），HRP 的底物，在振荡的同时于室温下温育 10 分钟以显色。在显色温育之后，向每个孔内添加 50 μ L 终止溶液（di-H₂O 中的 1.5% 氟化钠）以终止显色，并且在振荡 20 秒后，测定 650nm 处的吸光度（Molecular Devices Plate Reader）。孔内抗体的量与测得的吸光度成正比，并且与样品中吉西他滨的量成反比。通过用作图的孔内的吸光度对孔内的分析物浓度构建剂量响应曲线来测定吉西他滨和 2', 2'-二氟-2'-脱氧尿苷的 IC_{50} 值。将含有分析物的孔内颜色的吸光度与没有分析物的进行比较并产生标准曲线。给定分析物的 IC_{50} 值定义为具有不含分析物的孔内的 50% 吸光度所需的分析物浓度。交叉反应性计算为吉西他滨的 IC_{50} 比 2', 2'-二氟-2'-脱氧尿苷的 IC_{50} 值的比值，并表示为百分数。在利用该方法筛选单克隆抗体文库后，选择单克隆抗体。根据它们的板和孔数目按照如下对这些所选的抗体进行分类：5H8-24、12A5-24、2F12-24、14G3-15、13B12-10、16D6-p-10 以及 10G1-11。当用这些抗体测量时，相对于吉西他滨，这些抗体对 2', 2'-二氟-2'-脱氧尿苷（dFdU）的交叉反应性的百分比是 0.1-0.8%，而相对于吉西他滨，这些抗体对 3, 4, 5, 6-四氢尿苷（THU）的交叉反应性的百分比是 0.0058-0.028%。下面的表 I 和表 II 给出了有关吉西他滨单克隆抗体的结果。

[0187] 表 I 使用吉西他滨-BSA [9]（实施例 9）的单克隆抗体进行的竞争性免疫测定的交叉反应性

[0188]

亚克隆#	用吉西他滨-BSA[9]缀合物涂覆的板(实施例 9)				
	吉西他滨 IC ₅₀ (ng/mL)	dFdU IC ₅₀ (ng/mL)	THU IC ₅₀ (ng/mL)	dFdU 的交叉 反应性%	THU 的交叉 反应性%
5H8-24	14	2500	>100,100	0.56	<0.014
12A5-24	20	4900	>100,100	0.41	<0.020
2F12-24	27	4300	>100,100	0.63	<0.027
14G3-15	21	3200	>100,100	0.64	<0.021
13B12-10	6	1200	>100,100	0.45	<0.0055
16D6-p-10	27	5600	>100,100	0.48	<0.027
10G1-11	7	1300	>100,100	0.52	<0.0068

[0189] 表 II 使用吉西他滨-BSA[14] (实施例 9) 的单克隆抗体进行的竞争性免疫测定的交叉反应性

[0190]

亚克隆#	用吉西他滨-BSA[14]缀合物涂覆的板(实施例 9)				
	吉西他滨 IC ₅₀ (ng/mL)	dFdU IC ₅₀ (ng/mL)	THU IC ₅₀ (ng/mL)	dFdU 的交叉 反应性%	THU 的交叉 反应性%
5H8-24	11	2000	>100,100	0.57	<0.011
12A5-24	5	4100	>100,100	0.11	<0.0046
2F12-24	28	4200	>100,100	0.68	<0.028
14G3-15	14	2300	>100,100	0.61	<0.014
13B12-10	5	800	>100,100	0.64	<0.0051
16D6-p-10	17	3700	>100,100	0.45	<0.017
10G1-11	8	1300	>100,100	0.61	<0.0082

[0191] 从这些表可以看出,本发明的抗体对吉西他滨的活性形式具有显著的选择反应性,而对非活性的代谢物 2', 2'-二氟-2'-脱氧尿苷和 3, 4, 5, 6-四氢尿苷具有最小的交叉反应性。