



(10) 授权公告号 CN 110054694 B

(45) 授权公告日 2024. 02. 20

(21) 申请号 201910154717.4

(22) 申请日 2013.08.20

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110054694 A

(43) 申请公布日 2019.07.26

(30) 优先权数据

61/691544 2012.08.21 US

(62) 分案原申请数据

201380054988.3 2013.08.20

(73) 专利权人 詹森药业有限公司

地址 比利时.比尔斯.特恩豪特斯路30号

(72) 发明人 E.赫霍伦科 B.桑卡兰

T.R.德科里 T.图布斯 L.科特

B.M.雷梅里伊 R.萨特 R.林

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理师 李进 林毅斌

(51) Int.Cl.

C07K 16/44 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

G01N 33/94 (2006.01)

C12R 1/91 (2006.01)

审查员 李阳

权利要求书2页 说明书41页 附图11页

(54) 发明名称

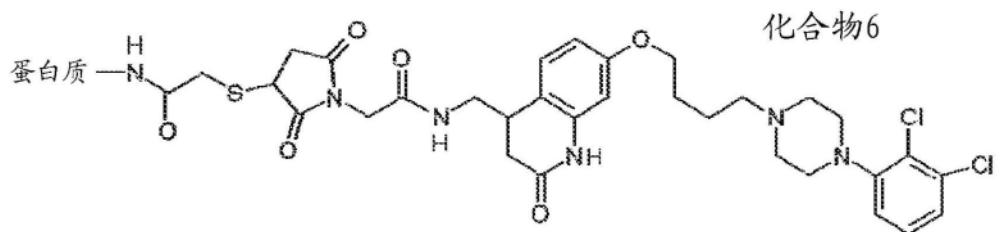
阿立哌唑半抗原的抗体及其用途

(57) 摘要

本发明涉及阿立哌唑半抗原的抗体及其用途。本发明公开了一种结合至阿立哌唑的抗体，该抗体可用于检测样品中的阿立哌唑，诸如在竞争性免疫测定方法中。该抗体可用于阿立哌唑的床旁检测所使用的侧流测定装置中，包括在单个侧流测定装置中的阿立哌唑、奥氮平、喹硫平和利培酮的多重检测。

1. 一种分离的抗体或其结合片段, 所述分离的抗体或其结合片段结合至阿立哌唑, 并且所述分离的抗体或其结合片段是响应于式II的化合物而生成的,

式II:



2. 根据权利要求1所述的抗体, 其中所述抗体片段选自由Fv、F(ab')、F(ab')₂、scFv、微抗体和双体片段组成的片段组。

3. 根据权利要求1所述的抗体, 其中所述抗体为单克隆抗体。

4. 一种测定试剂盒, 包含权利要求1所述的抗体。

5. 一种测定装置, 包含权利要求1所述的抗体。

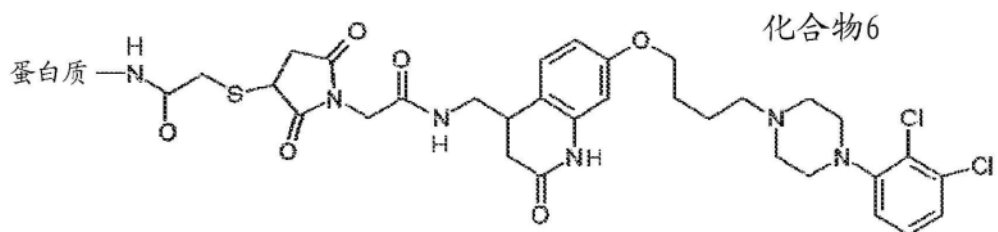
6. 根据权利要求5所述的测定装置, 其中所述装置为侧流测定装置。

7. 一种产生结合至阿立哌唑的抗体的方法, 所述方法包括:

(i) 选择用于抗体产生的宿主; 以及

(ii) 用式II的化合物接种所述宿主, 其中所述宿主产生结合至阿立哌唑的抗体,

式II:



8. 一种产生能够产生结合至阿立哌唑的单克隆抗体的杂交瘤细胞系的方法, 所述方法包括:

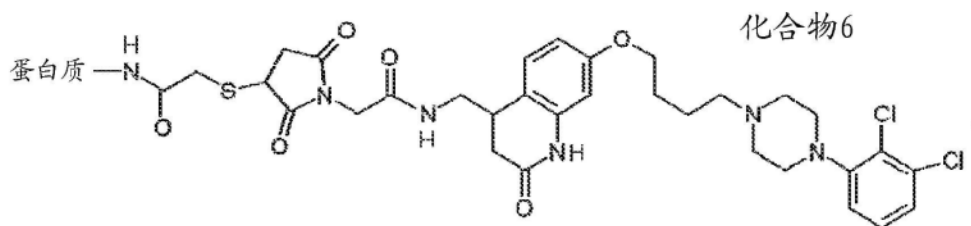
(i) 选择用于抗体产生的宿主;

(ii) 用式II的化合物接种所述宿主;

(iii) 将来自所述接种宿主的细胞系与持续分裂细胞融合以生成能够产生结合至阿立哌唑的单克隆抗体的融合细胞; 以及

(iv) 克隆所述融合细胞以便获得杂交瘤细胞系,

式II:



9. 根据权利要求1-3中任一项所述的抗体在制造的药物中的用途, 所述药物用于检测样品中的阿立哌唑的测定试剂盒或装置。

10. 根据权利要求1-3中任一项所述的抗体在制造的药物中的用途,所述药物用于检测样品中的阿立哌唑的竞争性免疫测定试剂盒或装置。

11. 根据权利要求10所述的用途,其中用可检测标记物标记所述抗体。

12. 根据权利要求10所述的用途,其中在侧流测定装置上执行所述免疫测定,并且将所述样品施加至所述装置。

13. 根据权利要求9或10所述的用途,还包括检测除了阿立哌唑之外的一种或多种分析物的存在。

14. 根据权利要求13所述的用途,其中所述一种或多种分析物为阿立哌唑之外的抗精神病药物。

15. 根据权利要求14所述的用途,其中所述阿立哌唑之外的抗精神病药物选自:利培酮、帕潘立酮、喹硫平、奥氮平以及它们的代谢物。

16. 根据权利要求9或10所述的用途,其中所述阿立哌唑的检测为患者对处方阿立哌唑治疗的遵从性的指示。

17. 根据权利要求9或10所述的用途,其中所述阿立哌唑的检测用于确定患者是否应从口服阿立哌唑方案转变到可注射抗精神病药方案。

18. 根据权利要求9或10所述的用途,其中所述阿立哌唑的检测用于确定是否应增大或减小口服或可注射阿立哌唑的剂量水平或给药间隔以确保达到或维持有效或安全的药物水平。

19. 根据权利要求9或10所述的用途,其中所述阿立哌唑的检测为通过提供达到最小pK水平的证据而发起阿立哌唑治疗的辅助手段。

20. 根据权利要求9或10所述的用途,其中所述阿立哌唑的检测用于确定多种制剂中或来自多种来源的阿立哌唑的生物等效性。

21. 根据权利要求9或10所述的用途,其中所述阿立哌唑的检测用于评估复方用药和潜在药物-药物相互作用的影响。

22. 根据权利要求9或10所述的用途,其中所述阿立哌唑的检测为患者应被排除于或被包括在临床试验中的指示,并且是对临床试验药物要求的遵从性的后续监测的辅助手段。

阿立哌唑半抗原的抗体及其用途

[0001] 本申请是申请日为2013年8月20日,申请号为201380054988.3,发明名称为“阿立哌唑半抗原的抗体及其用途”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2012年8月21日提交的美国临时申请61/691,544的权益。

技术领域

[0004] 本发明涉及免疫测定的技术领域,并且具体地涉及结合至阿立哌唑的抗体,这些抗体可用于检测阿立哌唑的免疫测定中。

背景技术

[0005] 精神分裂症为一种慢性且使人衰弱的精神疾病,影响了约0.45%-1%的世界人口(van Os, J.; Kapur, S. “Schizophrenia” Lancet 2009, 374, 635-645)。治疗的主要目的是实现对精神症状的持续缓解、降低复发的风险和后果并且改善患者机能和总体生活质量。虽然许多患有精神分裂症的患者能够用可用的抗精神病药物实现症状稳定性,但对药物的低遵从性是在每日施用的口服药物下复发的常见原因。若干探索不依从性的后果的研究(Abdel-Baki, A.; Ouellet-Plamondon, C.; Malla, A. “Pharmacotherapy Challenges in Patients with First-Episode Psychosis” Journal of Affective Disorders 2012, 138, S3-S14)显示不按处方服用其药物的患有精神分裂症的患者具有较高的复发率、入院率和自杀率以及增加的死亡率。据估计,40%至75%患有精神分裂症的患者难以遵从每日口服治疗方案(Lieberman, J.A.; Stroup, T.S.; McEvoy, J.P.; Swartz, M.S.; Rosenheck, R.A.; Perkins, D.O.; Keefe, R.S.E.; Davis, S.M.; Davis, C.E.; Lebowitz, B.D.; Severe, J.; Hsiao, J.K. “Effectiveness of Antipsychotic Drugs in Patients with Chronic Schizophrenia” New England Journal of Medicine 2005, 353(12), 1209-1223)。

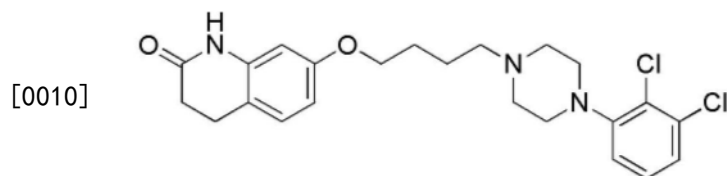
[0006] 治疗药物监测(TDM)是对药物,包括抗精神病药物的血清或血浆浓度的量化,目的是治疗监测和优化。这种监测允许例如识别未遵从其药物方案、未达到治疗剂量、在治疗剂量下无应答、具有次优耐药性、具有药代动力学药物-药物互相作用或具有导致不适当的血浆浓度的异常代谢的患者。患者吸收、分布、代谢以及排出抗精神病药物的能力存在相当大的个体差异。这种不同可由并发症、年龄、伴随药物或遗传特性引起。不同的药物制剂也可影响抗精神病药物的代谢。TDM允许针对个体患者进行剂量优化,改善治疗和功能结果。TDM还允许处方临床医生确保对处方剂量的依从性且确保达到有效血清浓度。

[0007] 至今,用于确定抗精神病药物的血清或血浆浓度的水平的方法涉及具有UV的液相色谱(LC)或质谱检测以及放射免疫测定的使用(参见例如, Woestenborghs等人, 1990年 Methodological Surveys in Biochemistry and Analysis 中的 “On the selectivity of some recently developed RIA's” 20:241-246. Analysis of Drugs and Metabolites, Including Anti-infective Agents; Heykants等人, 1994年 “The Pharmacokinetics of Risperidone in Humans: A Summary”, J Clin Psychiatry 55/5, 增刊:13-17; Huang等人,

1993年“Pharmacokinetics of the novel anti-psychotic agent risperidone and the prolactin response in healthy subjects”, Clin Pharmacol Ther 54:257-268)。放射免疫测定检测利培酮和帕潘立酮之一或二者。在美国专利8,088,594中Salamone等人公开了使用检测利培酮和帕潘立酮二者,但不检测药理学上非活性代谢物的抗体,用于利培酮的竞争性免疫测定。针对特定免疫原开发了竞争性免疫测定中使用的抗体。ID Labs公司(London, Ontario, Canada)出售针对另一种精神病药物奥氮平的ELISA,它也利用了竞争格式。使用说明指示测定被设计用于筛选目的并且旨在用于法医或研究用途,并且具体地不旨在用于治疗用途。使用说明推荐使用气相色谱/质谱(GC-MS)来确认所有阳性样品,并且指示所使用的抗体检测奥氮平和氯氮平(见ID Labs公司,“Instructions For Use Data Sheet IDEL-F083”,修订日期2011年8月8日)。这些方法中的一些,即HPLC和GC/MS可能是昂贵且劳动密集型的,并且通常仅在具有适当设备的大型或专业实验室中执行。

[0008] 存在对用于确定抗精神病药物的水平的其他方法的需要,具体地讲是能够在处方临床医生办公室(在这里可相应地以更加及时的方式调整对个体患者的治疗)和缺乏LC或GC/MS设备或需要快速测试结果的其它医疗设施中执行的方法。

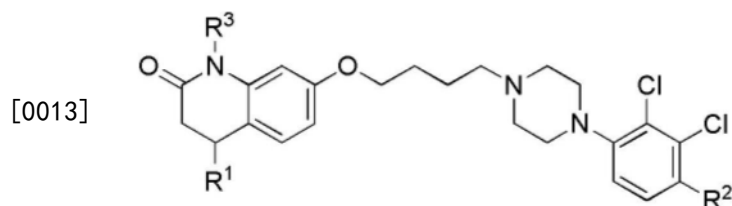
[0009] 阿立哌唑是:



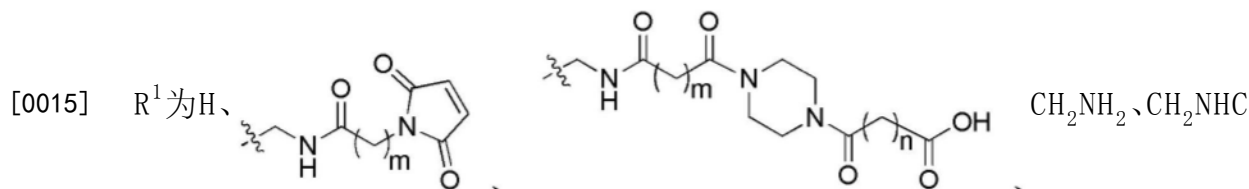
发明内容

[0011] 本发明涉及分离的抗体或其结合片段,该分离的抗体或其结合片段结合至阿立哌唑,并且该分离的抗体或其结合片段:(i)是响应于式I的化合物和免疫原性载体的缀合物而生成的;或(ii)竞争与(i)的抗体所结合的表位相同的表位。

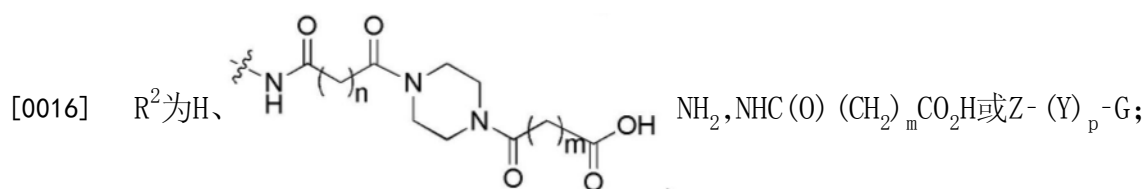
[0012] 式I:



[0014] 其中:



(O) $(CH_2)_m CO_2H$ 或 $Z-(Y)_p-G$;

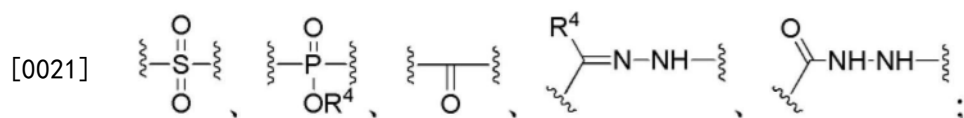


[0017] R^3 为H或 $W-(Y)_p-G$;前提条件是 R^1, R^2, R^3 中的两者必须为H,并且另外的前提条件是 R^1, R^2 和 R^3 不可同时都为H;

[0018] 其中:

[0019] Z选自:

[0020] $-N(R^4)-, -O-, -S-, -烷基-, -烷氧基烷基-, -氨基烷基-, -硫代烷基-, -杂烷基-, 烷基羰基-,$



[0022] 其中:

[0023] W选自:

[0024] $-C(O)-, -烷基-, -烷氧基烷基-, -氨基烷基-, -硫代烷基-, -杂烷基-, -烷基羰基-;$

[0025] R^4 为H、烷基基团、环烷基基团、芳烷基基团或者取代或未取代的芳基基团;

[0026] Y为有机间隔基团;

[0027] G为能够结合至载体的官能连接基团;

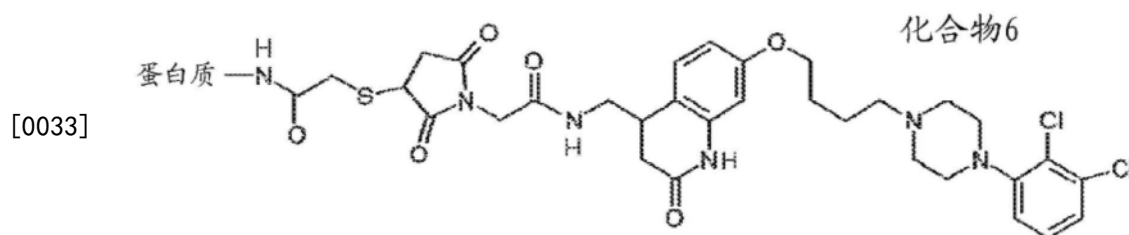
[0028] p为0或1;

[0029] m为1、2、3、4或5;并且

[0030] n为1、2、3、4或5。

[0031] 主题发明的抗体的目前优选实施例为针对具有式II的化合物而生成的命名为3C1、3D7和5C7的抗体。

[0032] 式II(化合物6):



[0034] 主题发明的抗体可提供于测定试剂盒和测定装置中,其中目前优选的装置为提供床旁(point-of-care)分析的侧流测定装置。

[0035] 本发明还提供一种产生结合至阿立哌唑的抗体的方法,该方法包括:(i)选择用于抗体产生的宿主细胞;以及(ii)用式I的化合物和免疫原性载体的缀合物接种宿主,其中该宿主产生结合至阿立哌唑的抗体。还提供一种产生能够产生结合至阿立哌唑的单克隆抗体的杂交瘤细胞系的方法。该方法包括:(i)选择用于抗体产生的宿主;(ii)用式I的化合物和免疫原性载体的缀合物接种宿主;(iii)将来自接种宿主的细胞系与持续分裂细胞融合以生成能够产生结合至阿立哌唑的单克隆抗体的融合细胞;以及(iv)克隆融合细胞以便获得杂交瘤细胞系。

[0036] 本发明还提供一种检测样品中阿立哌唑的方法。该方法包括：(i) 使样品与根据主题发明的抗体接触，该抗体用可检测标记物标记，其中标记抗体和存在于样品中的阿立哌唑形成标记复合物；以及(ii) 检测标记复合物以便检测样品中的阿立哌唑。

[0037] 还提供了一种用于检测样品中阿立哌唑的竞争性免疫测定方法。该方法包括：(i) 使样品与根据主题发明的抗体和阿立哌唑或阿立哌唑的竞争性结合配偶体接触，其中用可检测标记物标记抗体和阿立哌唑或其竞争性结合配偶体中的一者，并且其中样品阿立哌唑与该阿立哌唑或其竞争性结合配偶体竞争结合至抗体；以及(ii) 检测标记以便检测样品阿立哌唑。

[0038] 由下文的优选实施例的详细描述，本发明更多的目的、特征和优点对于本领域技术人员而言是显而易见的。

附图说明

[0039] 图1示出了由杂交瘤3C1生成的竞争性ELISA结果；

[0040] 图2示出了由杂交瘤3D7生成的竞争性ELISA结果；

[0041] 图3示出了在侧流测定装置上使用的竞争性免疫测定格式；

[0042] 图4示出了根据主题发明的侧流测定装置的芯片设计；

[0043] 图5示出了由抗体5C7和标记阿立哌唑竞争性结合配偶体生成的针对阿立哌唑阳性对照的典型剂量反应曲线；

[0044] 图6示出了由抗体4G9-1和标记奥氮平竞争性结合配偶体生成的针对奥氮平阳性对照的典型剂量反应曲线；

[0045] 图7示出了由抗体11和标记喹硫平竞争性结合配偶体生成的针对喹硫平阳性对照的典型剂量反应曲线；

[0046] 图8示出了由抗体5-9和标记利培酮竞争性结合配偶体生成的针对利培酮阳性对照的典型剂量反应曲线；

[0047] 图9示出了在标记阿立哌唑竞争性结合配偶体的存在下，由阿立哌唑抗体5C7生成的针对包含阿立哌唑的样品的典型剂量反应曲线，对于奥氮平、喹硫平或利培酮在其各自的标记竞争性结合配偶体的存在下的无剂量反应曲线；

[0048] 图10示出了在标记奥氮平竞争性结合配偶体的存在下，由奥氮平抗体4G9-1生成的针对包含奥氮平的样品的典型剂量反应曲线，对于阿立哌唑、喹硫平或利培酮在其各自的标记竞争性结合配偶体的存在下的无剂量反应曲线；

[0049] 图11示出了在标记喹硫平竞争性结合配偶体的存在下，由喹硫平抗体11生成的针对包含喹硫平的样品的典型剂量反应曲线，对于阿立哌唑、奥氮平或利培酮在其各自的标记竞争性结合配偶体的存在下的无剂量反应曲线；

[0050] 图12示出了在标记利培酮竞争性结合配偶体的存在下，由利培酮抗体5-9生成的针对包含利培酮的样品的典型剂量反应曲线，对于阿立哌唑、奥氮平或喹硫平在其各自的标记竞争性结合配偶体的存在下的无剂量反应曲线；

[0051] 图13示出了在标记阿立哌唑竞争性结合配偶体的存在下，由阿立哌唑抗体5C7生成的针对包含阿立哌唑的样品的典型剂量反应曲线，对于奥氮平、喹硫平或利培酮在其各自的抗体和标记竞争性结合配偶体的存在下的无剂量反应曲线；

[0052] 图14示出了在标记奥氮平竞争性结合配偶体的存在下,由奥氮平抗体4G9-1生成的针对包含奥氮平的样品的典型剂量反应曲线,对于阿立哌唑、喹硫平或利培酮在其各自的抗体和标记竞争性结合配偶体的存在下的无剂量反应曲线;

[0053] 图15示出了在标记喹硫平竞争性结合配偶体的存在下,由喹硫平抗体11生成的针对包含喹硫平的样品的典型剂量反应曲线,对于阿立哌唑、奥氮平或利培酮在其各自的抗体和标记竞争性结合配偶体的存在下的无剂量反应曲线;

[0054] 图16示出了在标记利培酮竞争性结合配偶体的存在下,由利培酮抗体5-9生成的针对包含利培酮的样品的典型剂量反应曲线,对于阿立哌唑、奥氮平或喹硫平在其各自的抗体和标记竞争性结合配偶体的存在下的无剂量反应曲线;

[0055] 图17示出了作为阳性对照生成的阿立哌唑剂量反应曲线与在多重格式中生成的阿立哌唑剂量反应曲线的比较结果;

[0056] 图18示出了作为阳性对照生成的奥氮平剂量反应曲线与在多重格式中生成的奥氮平剂量反应曲线的比较结果;

[0057] 图19示出了作为阳性对照生成的喹硫平剂量反应曲线与在多重格式中生成的喹硫平剂量反应曲线的比较结果;并且

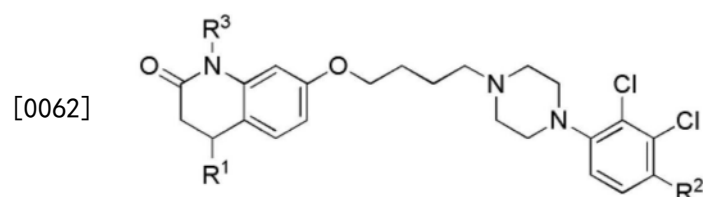
[0058] 图20示出了作为阳性对照生成的利培酮剂量反应曲线与在多重格式中生成的利培酮剂量反应曲线的比较结果。

具体实施方式

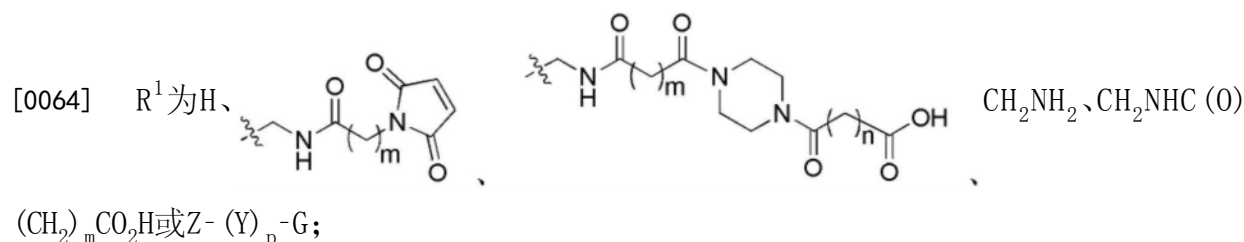
[0059] 本发明提供了一种结合至阿立哌唑的分离的抗体。本发明还提供了包括该抗体的测定试剂盒和测定装置。还提供了产生该抗体和产生能够产生该抗体的杂交瘤细胞系的方法。还提供了检测样品中阿立哌唑的方法,包括竞争性免疫测定方法。

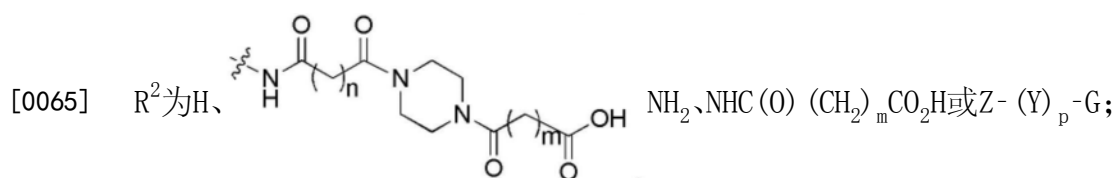
[0060] 在一个实施例中,本发明涉及分离的抗体或其结合片段,该分离的抗体或其结合片段结合至阿立哌唑,并且该分离的抗体或其结合片段:(i)是响应于式I的化合物和免疫原性载体的缀合物而生成的;或(ii)竞争与(i)的抗体所结合的表位相同的表位。

[0061] 式I:



[0063] 其中:



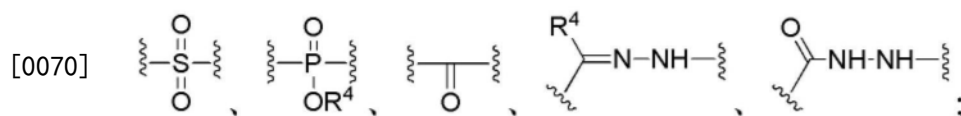


[0066] R^3 为H或 $W-(Y)_p-G$;前提条件是 R^1 、 R^2 、 R^3 中的两者必须为H,并且另外的前提条件是 R^1 、 R^2 和 R^3 不可同时都为H;

[0067] 其中:

[0068] Z选自:

[0069] $-N(R^4)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-烷基-$ 、 $-烷氧基烷基-$ 、 $-氨基烷基-$ 、 $-硫代烷基-$ 、 $-杂烷基-$ 、 $-烷基羰基-$ 、



[0071] 其中:

[0072] W选自:

[0073] $-C(O)-$ 、 $-烷基-$ 、 $-烷氧基烷基-$ 、 $-氨基烷基-$ 、 $-硫代烷基-$ 、 $-杂烷基-$ 、 $-烷基羰基-$;

[0074] R^4 为H、烷基基团、环烷基基团、芳烷基基团或者取代或未取代的芳基基团;

[0075] Y为有机间隔基团;

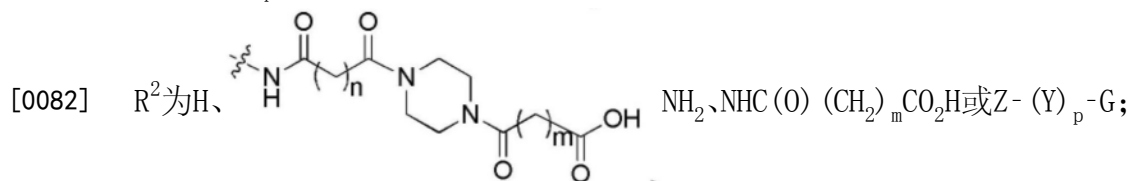
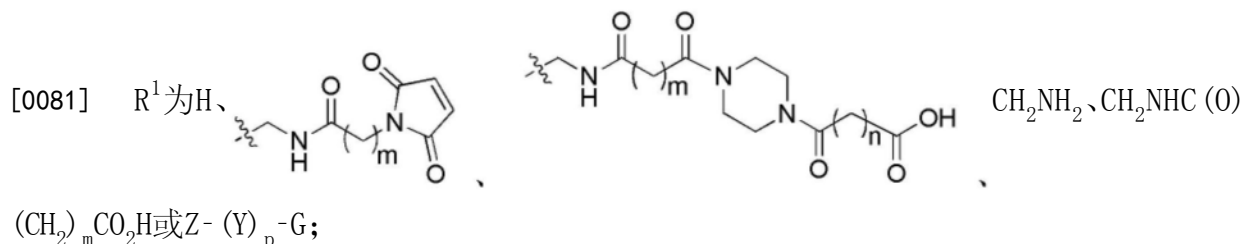
[0076] G为能够结合至载体的官能连接基团;

[0077] p为0或1;

[0078] m为1、2、3、4或5;并且

[0079] n为1、2、3、4或5。

[0080] 在另一个实施例中,本发明涉及分离的抗体或其结合片段,该分离的抗体或其结合片段结合至阿立哌唑,并且该分离的抗体或其结合片段:(i)是响应于式I的化合物和免疫原性载体的缀合物而生成的;或(ii)竞争与(i)的抗体所结合的表位相同的表位;其中:



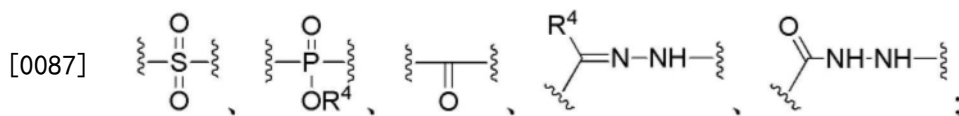
[0083] R^3 为H,前提条件是 R^1 或 R^2 必须为H,并且另外的前提条件是 R^1 和 R^2 两者不可同时为H;

[0084] 其中:

[0085] Z选自:

[0086] $-N(R^4)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-烷基-$ 、 $-烷氧基烷基-$ 、 $-氨基烷基-$ 、 $-硫代烷基-$ 、 $-杂烷基-$ 、 $-烷基羰基-$ 、

基羰基-、



[0088] R^4 为H、烷基基团、环烷基基团、芳烷基基团或者取代或未取代的芳基基团；

[0089] Y为有机间隔基团；

[0090] G为能够结合至载体的官能连接基团；

[0091] p为0或1；

[0092] m为1、2、3、4或5；

[0093] n为1、2、3、4或5。

[0094] 在另一个实施例中，本发明涉及分离的抗体或其结合片段，该分离的抗体或其结合片段结合至阿立哌唑，并且该分离的抗体或其结合片段：(i) 是响应于式I的化合物和免疫原性载体的缀合物而生成的；或(ii) 竞争与(i)的抗体所结合的表位相同的表位；其中：

[0095] R^1 为H或 $\text{CH}_2\text{NH}-(\text{Y})_p-\text{G}$ ；

[0096] R^2 为H或 $\text{NH}-(\text{Y})_p-\text{G}$ ；

[0097] R^3 为H，前提条件是 R^1 或 R^2 必须为H，并且另外的前提条件是 R^1 和 R^2 两者不可同时为H；

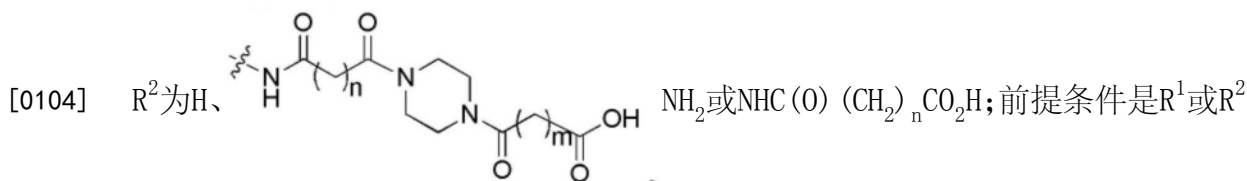
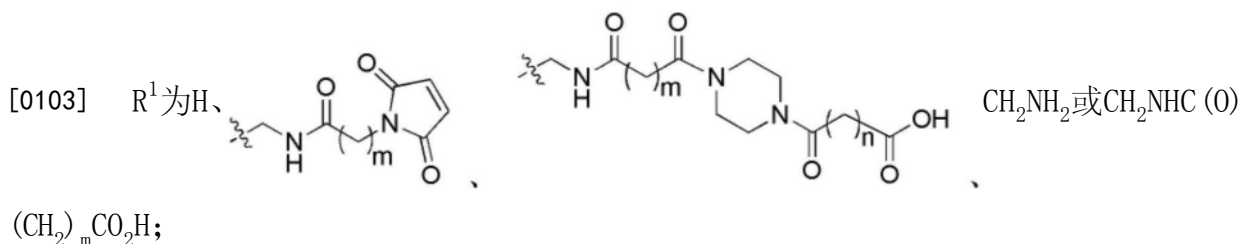
[0098] 其中：

[0099] Y为有机间隔基团；

[0100] G为能够结合至载体的官能连接基团；并且

[0101] p为1。

[0102] 在另一个实施例中，本发明涉及分离的抗体或其结合片段，该分离的抗体或其结合片段结合至阿立哌唑，并且该分离的抗体或其结合片段：(i) 是响应于式I的化合物和免疫原性载体的缀合物而生成的；或(ii) 竞争与(i)的抗体所结合的表位相同的表位；其中：



必须为H，并且另外的前提条件是 R^1 和 R^2 两者不可同时为H；

[0105] R^3 为H；

[0106] m为1、2、3、4或5；

[0107] n为1、2、3、4或5。

[0108] 在另一个实施例中，本发明涉及分离的抗体或其结合片段，该分离的抗体或其结合片段结合至阿立哌唑，并且该分离的抗体或其结合片段：(i) 是响应于式I的化合物和免

疫原性载体的缀合物而生成的;或(ii)竞争与(i)的抗体所结合的表位相同的表位;其中:

[0109] R^1 为H、 CH_2NH_2 或 $CH_2NHC(O)(CH_2)_mCO_2H$; R^2 为H、 NH_2 或 $NHC(O)(CH_2)_nCO_2H$;前提条件是 R^1 或 R^2 必须为H,并且另外的前提条件是 R^1 和 R^2 两者不可同时为H;

[0110] R^3 为H;

[0111] m为1、2或3;

[0112] n为1、2或3。

[0113] 在另一个实施例中,本发明涉及分离的抗体或其结合片段,该分离的抗体或其结合片段结合至阿立哌唑,并且该分离的抗体或其结合片段:(i)是响应于式I的化合物和免疫原性载体的缀合物而生成的;或(ii)竞争与(i)的抗体所结合的表位相同的表位;其中:

[0114] R^1 为H、 CH_2NH_2 或 $CH_2NHC(O)(CH_2)_mCO_2H$;

[0115] R^2 为H、 NH_2 或 $NHC(O)(CH_2)_nCO_2H$;前提条件是 R^1 或 R^2 必须为H,并且另外的前提条件是 R^1 和 R^2 两者不可同时为H;

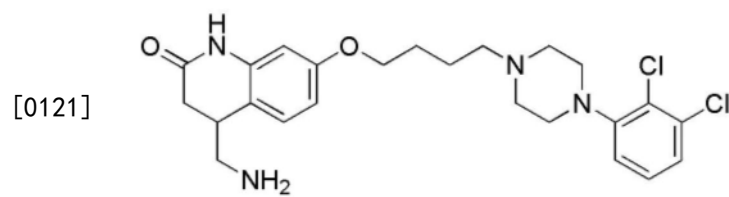
[0116] R^3 为H;

[0117] m为2;

[0118] n为2。

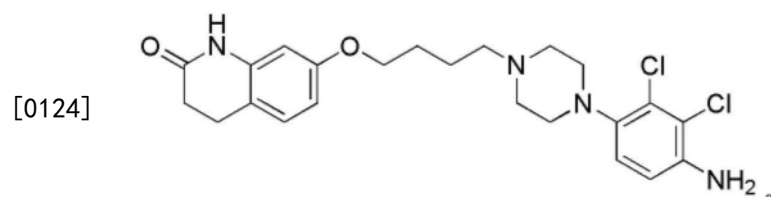
[0119] 在一个优选的实施例中,本发明涉及分离的抗体或其结合片段,该分离的抗体或其结合片段结合至阿立哌唑,并且该分离的抗体或其结合片段:(i)是响应于式III的化合物和免疫原性载体的缀合物而生成的;或(ii)竞争与(i)的抗体所结合的表位相同的表位。

[0120] 式III:



[0122] 在另一个优选的实施例中,本发明涉及分离的抗体或其结合片段,该分离的抗体或其结合片段结合至阿立哌唑,并且该分离的抗体或其结合片段:(i)是响应于式IV的化合物和免疫原性载体的缀合物而生成的;或(ii)竞争与(i)的抗体所结合的表位相同的表位。

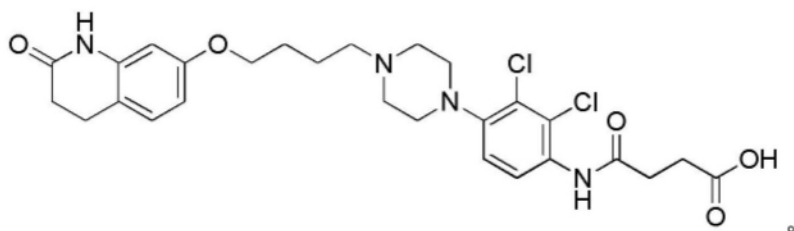
[0123] 式IV:



[0125] 在另一个优选的实施例中,本发明涉及分离的抗体或其结合片段,该分离的抗体或其结合片段结合至阿立哌唑,并且该分离的抗体或其结合片段:(i)是响应于式V的化合物和免疫原性载体的缀合物而生成的;或(ii)竞争与(i)的抗体所结合的表位相同的表位。

[0126] 式V:

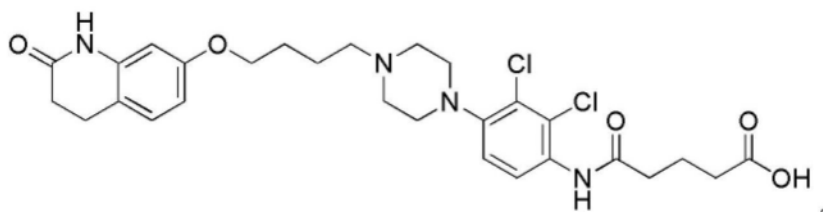
[0127]



[0128] 在附加的优选的实施例中,本发明涉及分离的抗体或其结合片段,该分离的抗体或其结合片段结合至阿立哌唑,并且该分离的抗体或其结合片段:(i) 是响应于式VI的化合物和免疫原性载体的缀合物而生成的;或(ii) 竞争与(i)的抗体所结合的表位相同的表位。

[0129] 式VI:

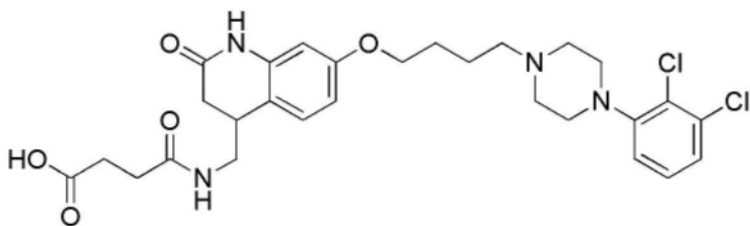
[0130]



[0131] 在另一个附加的优选的实施例中,本发明涉及分离的抗体或其结合片段,该分离的抗体或其结合片段结合至阿立哌唑,并且该分离的抗体或其结合片段:(i) 是响应于式VII的化合物和免疫原性载体的缀合物而生成的;或(ii) 竞争与(i)的抗体所结合的表位相同的表位。

[0132] 式VII:

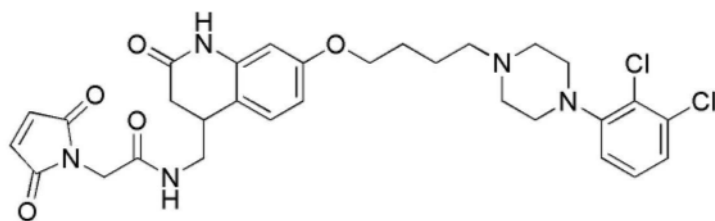
[0133]



[0134] 在附加的优选的实施例中,本发明涉及分离的抗体或其结合片段,该分离的抗体或其结合片段结合至阿立哌唑,并且该分离的抗体或其结合片段:(i) 是响应于式VIII的化合物和免疫原性载体的缀合物而生成的;或(ii) 竞争与(i)的抗体所结合的表位相同的表位。

[0135] 式VIII:

[0136]



[0137] 优选地,主题发明的抗体是响应于选自式I、式III、式IV、式V、式VI、式VII以及式VIII的化合物的化合物和免疫原性载体的缀合物而生成的。

[0138] 由上式所述的化合物和由化合物与免疫原性载体所形成的缀合物的进一步细节提供于下方标题为“化合物、缀合物和免疫原”的节段中。

[0139] 主题发明的抗体的进一步细节提供于下方标题为“抗体”的节段中。

[0140] 主题发明还提供了包含抗体的测定试剂盒以及包含抗体的测定装置。优选地,测定装置为侧流测定装置。测定试剂盒和测定装置的进一步细节提供于下方标题为“测定试剂盒和装置”的节段中。

[0141] 本发明还提供一种产生结合至阿立哌唑的抗体的方法,该方法包括:(i)选择用于抗体产生的宿主细胞;以及(ii)用式I的化合物和免疫原性载体的缀合物接种宿主,其中该宿主产生结合至阿立哌唑的抗体。在另外的实施例中,用于该方法的缀合物可为选自式III、式IV、式V、式VI、式VII以及式VIII的化合物的化合物和免疫原性载体的缀合物。主题发明的抗体的产生的进一步细节提供于下方标题为“抗体”的节段中。

[0142] 还提供一种产生能够产生结合至阿立哌唑的单克隆抗体的杂交瘤细胞系的方法。该方法包括:(i)选择用于抗体产生的宿主;(ii)用式I的化合物和免疫原性载体的缀合物接种宿主;(iii)将来自接种宿主的细胞系与持续分裂细胞融合以生成能够产生结合至阿立哌唑的单克隆抗体的融合细胞;以及(iv)克隆融合细胞以便获得杂交瘤细胞系。在另外的实施例中,用于该方法的缀合物可为选自式III、式IV、式V、式VI、式VII以及式VIII的化合物的化合物和免疫原性载体的缀合物。根据主题发明的杂交瘤的产生的进一步细节提供于下方标题为“抗体”的节段中。

[0143] 本发明还提供一种检测样品中阿立哌唑的方法。该方法包括:(i)使样品与根据主题发明的抗体接触,该抗体用可检测标记物标记,其中标记抗体和存在于样品中的阿立哌唑形成标记复合物;以及(ii)检测标记复合物以便检测样品中的阿立哌唑。根据主题发明的检测阿立哌唑的方法的进一步细节提供于下方标题为“免疫测定”的节段中。

[0144] 还提供了一种用于检测样品中阿立哌唑的竞争性免疫测定方法。该方法包括:(i)使样品与根据主题发明的抗体和阿立哌唑或阿立哌唑的竞争性结合配偶体接触,其中用可检测标记物标记抗体和阿立哌唑或其竞争性结合配偶体中的一者,并且其中样品阿立哌唑与该阿立哌唑或其竞争性结合配偶体竞争结合至抗体;以及(ii)检测标记以便检测样品阿立哌唑。检测根据主题发明的阿立哌唑的竞争性免疫测定方法的进一步细节提供于下方标题为“免疫测定”的节段中。

[0145] 在主题发明的一个优选的实施例中,阿立哌唑的检测伴有阿立哌唑之外的一种或多种分析物的检测。优选地,该一种或多种分析物为阿立哌唑之外的抗精神病药物,并且更优选地,阿立哌唑之外的抗精神病药物选自:利培酮、帕潘立酮、喹硫平、奥氮平以及它们的代谢物。

[0146] 如以上所讨论,主题发明的抗体可用于检测患者样品中抗精神病药物的存在和/或量的测定中。这种检测允许治疗药物监测,从而实现其所有的益处。抗精神病药物的水平检测可用于许多目的,每个目的代表主题发明的另一个实施例,包括:患者对方治疗的遵从性或依从性的确定;用作确定患者是否应从口服抗精神病药方案转变到长效可注射抗精神病药方案的决策工具;用作确定是否应增大或减小口服或可注射抗精神病药的剂量水平或给药间隔以确保达到或维持有效或安全药物水平的决策工具;用作通过提供达到最小pK水平的证据而发起抗精神病药物治疗的辅助手段;用于确定多种制剂中或来自多种来源的抗精神病药物的生物等效性;用于评估复方用药和潜在药物-药物相互作用的影响;以及用作患者应被排除或被包括在临床试验中的指示,并且用作对临床试验药物要求的遵从性的后续监测的辅助手段。

[0147] 化合物、缀合物和免疫原

[0148] 关于化合物和缀合物以及免疫原,使用以下缩写:AIBN为偶氮二异丁腈;AMAS为N-(α -马来酰亚胺基乙酰氧基)琥珀酰亚胺酯;BTG为牛甲状腺球蛋白;Bu₃N为三丁胺;DMF为N,N-二甲基甲酰胺;EDTA为乙二胺四乙酸;EtOH为乙醇;KLH为钥孔血蓝蛋白;NBS为N-溴代琥珀酰亚胺;SATA为N-琥珀酰亚胺S-乙酰基硫代乙酸酯;THF为四氢呋喃;TFA为三氟乙酸;DCC为二环己基碳二亚胺;DIC为二异丙基碳二亚胺;DMAP为N,N-二甲基-4-氨基吡啶;EDC为1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐;NHS为N-羟基琥珀酰亚胺;TFP为四氟苯基;PNP为对硝基苯基;TBTU为O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸盐;HOBT为N-羟基苯并三唑;DEPBT为3-(二乙氧基磷酰氧基)-1,2,3-苯并三嗪-4(3H)-酮;BOP-Cl为双(2-氧代-3-噁唑烷基)膦酰氯;DTT为二硫赤藓糖醇。

[0149] 术语“缀合物”是指由独立的部分接合在一起形成的任何物质。代表性的缀合物包括由小分子诸如式I的化合物与大分子诸如载体或多胺聚合物,特别是蛋白质接合在一起形成的那些物质。在缀合物中,小分子可接合在大分子的一个或多个活性位点处。

[0150] 术语“半抗原”是指部分或不完全抗原。半抗原是无蛋白质的物质,它不能刺激抗体形成,但与抗体反应。抗体是通过将半抗原偶联到高分子量免疫原性载体上,并且然后将这种偶联的产物即免疫原注射到人或动物受检者体内而形成。

[0151] 术语“免疫原”是指能够在生物体中引发、产生或生成免疫应答的物质。

[0152] 如本文所用,“免疫原性载体”是免疫原性物质,通常为蛋白质,其能够在一个或多个位置处与半抗原接合,从而使得能够产生可与这些半抗原结合的抗体。免疫原性载体物质的示例包括但不限于被认定为是外来的并从而引发宿主免疫应答的蛋白质、糖蛋白、复合聚氨基多糖、颗粒以及核酸。聚氨基多糖可使用已知用于此制备的任何常规方法由多糖进行制备。

[0153] 各种蛋白质类型可用作免疫原性载体,包括但不限于白蛋白、血清蛋白、脂蛋白等。示例性的蛋白质包括牛血清白蛋白、钥孔血蓝蛋白、卵白蛋白、牛甲状腺球蛋白、组分V人血清白蛋白、兔白蛋白、南瓜子球蛋白、白喉类毒素、破伤风类毒素、肉毒毒素、琥珀酰化蛋白以及合成聚(氨基酸)诸如聚赖氨酸。

[0154] 免疫原性载体还可包括聚氨基多糖,这些聚氨基多糖是通过单糖的重复缩合而构建的高分子量聚合物。多糖的示例为淀粉、糖原、纤维素、碳水化合物、树胶诸如阿拉伯树胶、琼脂等。多糖还包含聚(氨基酸)残基和/或脂质残基。

[0155] 免疫原性载体还可以为单独的或缀合至上述聚(氨基酸)或多糖中的一者的聚(核酸)。

[0156] 免疫原性载体还可包括固体颗粒。颗粒的直径通常为至少约0.02微米(μm)且不超过约100 μm ,并且通常为约0.05 μm 至10 μm 。颗粒可以为有机或无机的、溶胀性的或非溶胀性的、多孔的或无孔的,最佳为接近于水的密度,一般为约0.7至1.5g/mL,并且由可为透明的、部分透明的或不透明的材料构成。颗粒可以为生物材料,诸如细胞和微生物,包括非限制性的示例诸如红细胞、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*)和病毒。颗粒也可包含有机和无机聚合物、脂质体、胶乳、磷脂囊泡或脂蛋白。

[0157] 术语“衍生物”是指通过一个或多个化学反应由母体化合物制成的化学化合物或

分子。

[0158] 化学化合物的术语“类似物”是指包含碳原子的链和与参考化合物相同的特定的官能团,但类似物的碳链比参考化合物的碳链长或短的化学化合物。

[0159] “标记”、“检测分子”、“报告基因”或“可检测标记物”是产生或能诱导产生可检测信号的任何分子。标记可以缀合至分析物、免疫原、抗体或另一种分子诸如受体或可结合至受体的分子,诸如配体,特别是半抗原或抗体。标记可直接附接或使用连接或桥联部分间接附接。标记的非限制性示例包括放射性同位素(例如, ^{125}I)、酶(例如 β -半乳糖苷酶、过氧化物酶)、酶片段、酶底物、酶抑制剂、辅酶、催化剂、荧光团(例如,罗丹明、荧光素异硫氰酸酯或FITC,或Dylight 649)、染料、化学发光剂和发光剂(例如,二氧杂环丁烷、虫荧光素)或敏化剂。

[0160] 如本文所用,“间隔物”是指化学结构的一部分,该部分通过官能连接基团连接两个或更多个子结构诸如半抗原、载体、免疫原、标记或结合配偶体。这些间隔基团是由通常存在于有机化合物中且以通常见于有机化合物中的方式组装的原子构成的,并因此可被称作“有机间隔基团”。用于组装间隔物的化学构建单元将在本专利申请的下文中进行描述。其间优选的间隔物为直链或支链、饱和或不饱和的碳链。这些碳链还可包括在链内的一个或多个杂原子,在链中或在链的末端替换任一个碳原子的一个或多个氢的一个或多个杂原子。所谓“杂原子”是指碳之外的选自氧、氮、磷和硫的原子,其中氮、磷和硫原子可以任何氧化态存在并且可具有键合到它们的碳或其它杂原子。间隔物还可包括环状或芳族基团作为链的一部分或作为在链中的原子之一上的取代。

[0161] 间隔基团中原子的数量通过计算氢之外的原子的数量来确定。通过沿着被连接的子结构之间的最短路线计算氢之外的原子的数量,来确定间隔基团内的链中的原子数量。优选的链长度在1至20个原子之间。

[0162] “官能连接基团”是指存在于半抗原上并且可用于提供可用的反应性位点的反应性基团,通过该反应性位点,半抗原部分可通过共价化学键的形成而偶联到另一个部分以产生抗原与另一个部分(诸如标记或载体)的缀合物。半抗原可以此方式连接至诸如生物素的部分以形成竞争性结合配偶体。

[0163] 间隔基团可用于将半抗原连接至载体。不同长度的间隔物允许间隔物以距载体不同的距离附接半抗原,以供呈递给被免疫来优化抗体形成过程的动物或人的免疫系统。附接至半抗原分子中的不同位置允许将半抗原上的特定位置呈递给免疫系统以影响抗体识别。间隔物可包含亲水性增溶基团,以使半抗原衍生物更可溶于含水培养基中。亲水性增溶基团的示例包括但不限于聚氧基烷氧基基团,例如聚乙二醇链;羟基、羧酸根以及磺酸根基团。

[0164] 术语“亲核基团”或“亲核物质”是指在反应中贡献电子对以形成化学键的物质。术语“亲电子基团”或“亲电子物质”是指在反应中从亲核物质接受电子对以形成化学键的物质。

[0165] 术语“取代的”是指在母体分子上任何位置处替代碳原子上的氢原子的原子或原子团的取代。取代基的非限制性示例包括卤素原子、氨基、羟基、羧基、烷基、芳基、杂烷基、杂芳基、氰基、烷氧基、硝基、醛和酮基团。

[0166] 术语“烷基”是指至多12个碳原子(除非另外指明)的饱和的或不饱和的、直链和支

链基团,并且具体地旨在包括具有任何饱和程度或水平的基团。烷基包括但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、异戊基、己基、异己基、庚基、辛基、2,2,4-三甲基戊基、壬基、癸基、十一烷基和十二烷基。

[0167] 术语“环烷基”是指由3至10个碳原子构成的饱和或部分不饱和的单环或二环的烃环基团。烷基取代基可任选地存在于环上。示例包括环丙基、1,1-二甲基环丁基、1,2,3-三甲基环戊基、环己基和环己烯基。

[0168] 术语“杂烷基”是指链内包括一个或多个杂原子的烷基基团,一个或多个杂原子在链中或在链的末端替换任何碳原子的一个或多个氢。

[0169] 术语“氨基烷基”是指沿着烷基链与任何碳原子键合的至少一个伯氨基或仲氨基基团。

[0170] 术语“烷氧基”是指具有与氧原子键合的至多12个碳原子(除非另外指明)的直链或支链基团。示例包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基和丁氧基。

[0171] 术语“烷氧基烷基”是指沿着烷基链与任何碳原子键合的至少一个烷氧基基团。

[0172] 术语“硫代烷基”是指沿着烷基链与任何碳原子键合的至少一个硫基团。硫基团可处于任何氧化态并且包括亚砷、砷和硫酸盐。

[0173] 术语“羧酸根基团”包括羧酸和烷基、环烷基、芳基或芳烷基羧酸酯。

[0174] 术语“烷基羰基”是指具有沿着烷基链与任何碳原子键合的羰基基团的基团。

[0175] 术语“杂芳基”是指5元至7元单环的或8元至10元双环的芳环基团,其中任何环均可由选自N、O或S的一至四个杂原子组成,其中氮和硫原子可以任何允许的氧化态存在。例子包括苯并咪唑基、苯并噻唑基、苯并噻吩基、苯并噁唑基、呋喃基、咪唑基、异噻唑基、异噁唑基、噁唑基、吡嗪基、吡唑基、吡啶基、嘧啶基、吡咯基、喹啉基、噻唑基和噻吩基。

[0176] 术语“芳基”是指环中包含6至12个碳的单环或二环的芳环基团。烷基取代基可任选地存在于环上。示例包括苯基、联苯基和萘。

[0177] 术语“芳烷基”是指包含芳基取代基的C₁₋₆烷基基团。示例包括苄基、苯乙基或2-萘基甲基。

[0178] 术语“酰基”是指基团-C(O)R_a,其中R_a为氢、烷基、环烷基、杂烷基、芳基、芳烷基和杂芳基。“酰化剂”将-C(O)R_a基团添加至分子。

[0179] 术语“磺酰基”是指基团-S(O)₂R_b,其中R_b为氢、烷基、环烷基、杂烷基、卤代烷基、芳基、芳烷基和杂芳基。“磺酰化剂”将-S(O)₂R_b基团添加至分子。

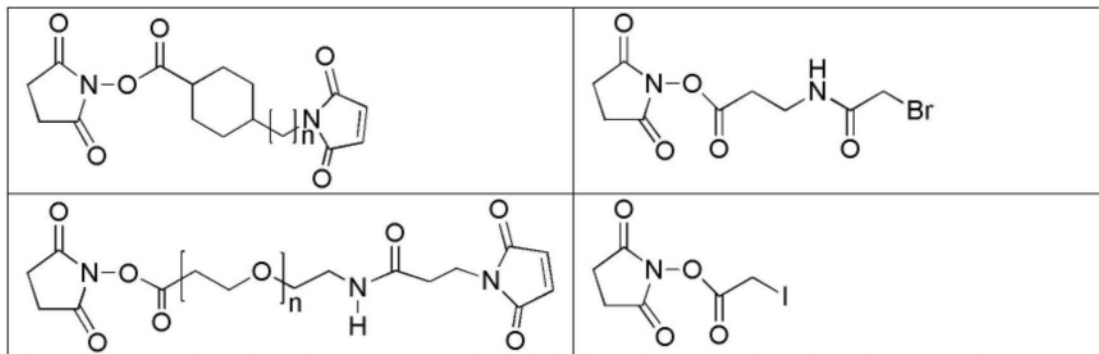
[0180] 可通过多种多样的方法来制备具有用于将半抗原附接至载体部分的反应性官能连接基团的间隔物。使用通过基团在任一端进行差异官能化或活化的分子来形成间隔物以允许与半抗原和载体的选择性顺序反应,但也可在两端使用相同的反应性部分。被选择用于与半抗原反应的基团和待与载体结合的官能化连接基团是由半抗原上的官能团的类型和待与半抗原结合的载体所确定的。间隔物以及附接至半抗原和载体的方法包括但不限于 Brinkley, M., A., Bioconjugate Chem. 1992, 3: 2-13, Hermanson, Greg T., Bioconjugate Techniques, Academic Press, London, Amsterdam, Burlington, MA, USA, 2008 和 Thermo Scientific Pierce Crosslinking Technical Handbook 中描述的那些; 可从 Thermo Scientific 3747 N Meridian Rd, Rockford, IL USA 61101, ph 800-874-3723 或者在: <http://www.piercenet.com/> 及其中的参考文献下载或申请纸质文件。用于间隔基团的形

成的许多差别活化的分子可从供货商例如Thermo Scientific商购获得。

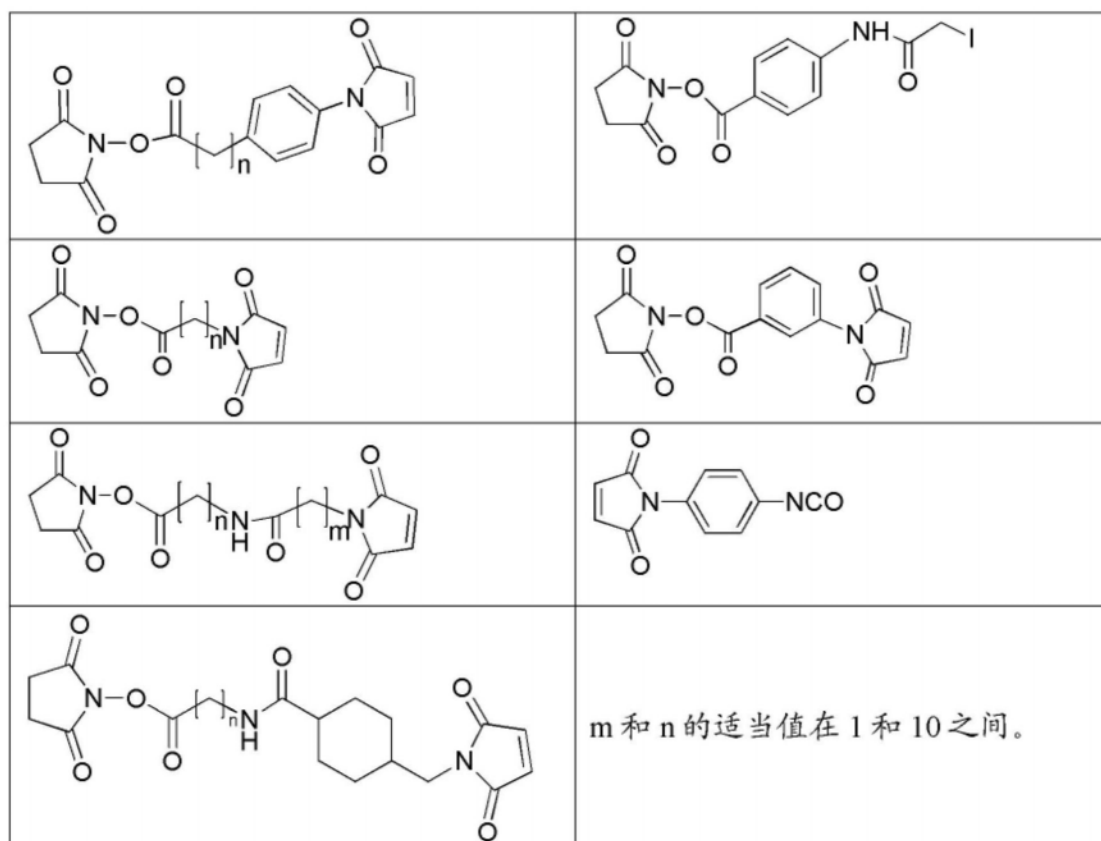
[0181] 对于具有氨基基团的半抗原,间隔物附接至半抗原的模式包括半抗原上的胺与具有酰基卤或活性酯的间隔物构建单元的反应。“活性酯”被定义为与亲核基团例如氨基基团,在温和条件下发生反应以形成稳定键的酯。稳定键被定义为在进一步使用例如后续合成步骤、用作免疫原的条件下或在生物化学测定中保持完整的键。稳定键的一个优选的示例为酰胺键。活性酯和形成方法由Benoiton,N.L.在Houben-Weyl,Methods of Organic Chemistry,Thieme Stuttgart,New York,第E22卷,第3.2节,第443页和Benoiton,N.L.,Chemistry of Peptide Synthesis,Taylor and Francis,NY,2006中有所描述。优选的活性酯包括对硝基苯酯(PNP)、N-羟基琥珀酰亚胺酯(NHS)和四氟苯基酯(TFP)。可通过本领域的技术人员已知的许多方法,例如羧酸与亚硫酸酐或草酰氯的反应来制备酰基卤,参见:Fieser,L.F.和Fieser,M.Reagents for Organic Synthesis,John Wiley and Sons,NY,1967及其中参考文献。这些可被转化成其它活性酯,诸如对硝基苯酯(PNP),其还可用在活性双官能的间隔物中,如Wu等人,Organic Letters,2004,6(24):4407中所述。可如W02012012595中实例35所述,通过N,N-二琥珀酰亚胺基碳酸酯(CAS 74124-79-1)与化合物的羧酸在有机碱诸如在非质子溶剂中的三乙胺或二异丙基乙胺的存在下,在无水条件下反应,或者通过使用N-羟基琥珀酰亚胺和二环己基碳二亚胺(DCC)或其它脱水剂在无水条件下,来制备N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯。可通过羧酸与2,3,5,6-四氟苯基三氟乙酸酯,在有机碱诸如在非质子溶剂中的三乙胺或二异丙基乙胺的存在下,在无水条件下反应来制备四氟苯基酯(TFP),如Wilbur等人Bioconjugate Chem.2004,15(1):203中所报道的那样。本领域的技术人员将认识到使用已知的方法可获得表1中所示的间隔物等,并且利用反应条件的常规优化可将这些间隔物附接至具有氨基的半抗原。这些间隔物允许半抗原附接至载体上的硫醇基团。

[0182] 表1

[0183]



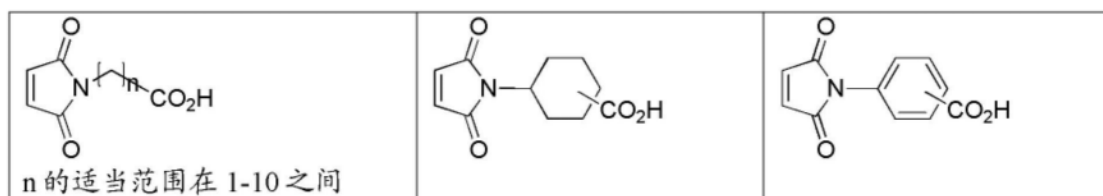
[0184]



[0185] 半抗原上的胺和间隔物构建单元上的羧酸官能团在偶联剂存在下的直接偶联也可用作附接模式。优选的试剂为通常用于肽合成的那些试剂。肽偶联试剂包括但不限于O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸盐(TBTU,CAS#125700-67-6),参见:Pruhs,S.,Org.Process.Res.Dev.2006,10:441;带有碳二亚胺脱水剂例如N-N-二环己基碳二亚胺(DCC)、二异丙基碳二亚胺(DIC)或1-乙基-3(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)的N-羟基苯并三唑(HOBT,CAS#2592-95-2),参见:König W.,Geiger,R.Chem.Ber.,1970,103(3):788;3-(二乙氧基磷酰氧基)-1,2,3-苯三嗪-4(3H)-酮(DEPBT,CAS#165534-43-0),参见:Liu,H.等人Chinese Chemical Letters,2002,13(7):601;双(2-氧代-3-噁唑烷基)膦酰氯;(BOP-Cl,CAS#68641-49-6),参见:Diago-Meseguer,J等人Synthesis,1980,7:547-51以及由Benoiton在Chemistry of Peptide Synthesis,CRC Press,Boca Raton,FL,2005,第2章和由Advanced Automated Peptide Protein Technologies(aapptec),6309Shepardsville Rd.,Louisville KY 40228,ph 888 692 9111提供的技术公报;www.aapptec.com以及其中的参考文献中详细描述的有关试剂。这些方法生成了将半抗原附接至间隔物的稳定的酰胺键。可使用已知方法获得的且可采用以上描述和引用的方法、利用反应条件的常规优化而附接至具有氨基的半抗原的间隔物的示例如表2中所示,但不限于这些。这些间隔物允许半抗原附接至载体上的硫醇基团。

[0186] 表2

[0187]



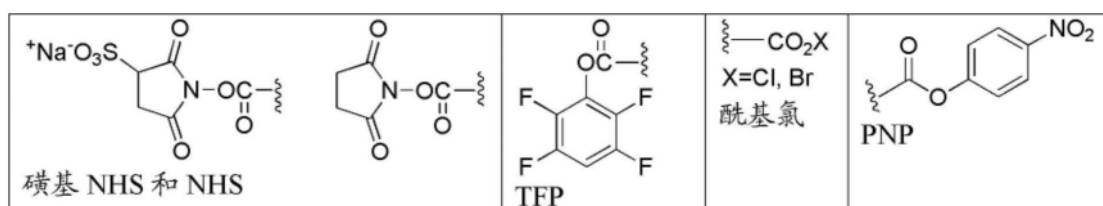
[0188] 还可通过将适当的化学基团顺序附接至半抗原,包括形成能够结合至载体的官能连接基团的步骤,来以分步方式构造间隔物。参见一般反应方案中的示例性实例。

[0189] 另外,当半抗原具有将会成为间隔物的附接点的亲核基团,例如硫醇基团、氨基基团或羟基基团时,也可通过硫醇、胺或羟基基团的烷化反应来构造间隔物。可使用被能够经历取代反应的部分适当地取代的任何烷基基团,例如卤代烷或磺酸酯诸如对甲苯磺酸酯来附接间隔物。本领域的技术人员已知烷化反应的许多示例,并且具体的示例可见于一般化学文献中且可通过常规实验进行优化。具有许多参考文献的烷化反应的讨论可见于March's Advanced Organic Chemistry的第10章,Smith, M.B., and March, J., John Wiley & Sons, Inc. NY, 2001)。也可采用其它键,诸如半抗原上的亲核部分例如胺与异氰酸酯形成尿素的反应或与异硫氰酸酯形成硫脲键的反应,参见:Li, Z. 等人 Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements, 2003, 178 (2): 293-297。通过与异氰酸酯基团的反应,间隔物可附接至具有羟基基团的半抗原,以形成氨基甲酸酯或尿烷键。可在一端用异氰酸酯官能团和能够与载体反应的官能连接基团差别地活化间隔物,参见:Annunziato, M.E., Patel, U.S., Ranade, M. 和 Palumbo, P.S., Bioconjugate Chem., 1993, 4: 212-218。

[0190] 对于具有羧酸基团的半抗原,间隔物部分与半抗原的附接模式包括将羧酸基团活化为酰基卤或活性酯,其示例在表3中示出,其制备先前有所描述,之后与间隔物部分上的氨基(-NH₂-)、胼基(-NH-NH₂-)、酰胼基(-C(O)-NH-NH₂-)或羟基基团(-OH)反应以形成酰胺、酰胼、二酰基胼或酯键,或者羧酸基团与间隔物部分上或者是载体上的氨基基团在肽偶联试剂和/或碳二亚胺脱水试剂存在下的直接偶联,所述试剂如先前描述,其示例在表4和5中示出。可采用先前对于活化酯的形成和肽偶联剂的使用所引用的参考文献中的程序,利用反应条件的常规优化,将具有羧酸的半抗原附接至间隔物构建单元和具有可用氨基基团的蛋白质载体。

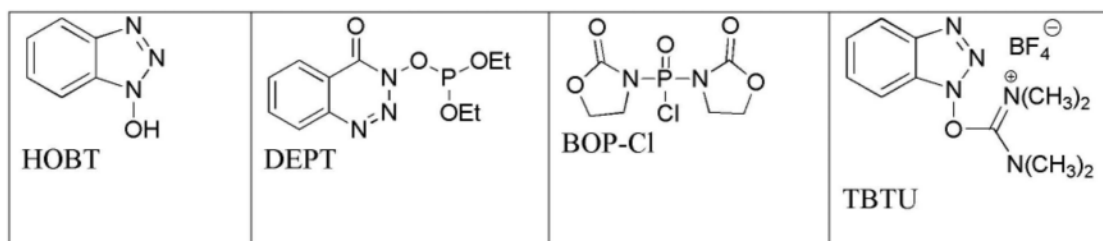
[0191] 表3

[0192]



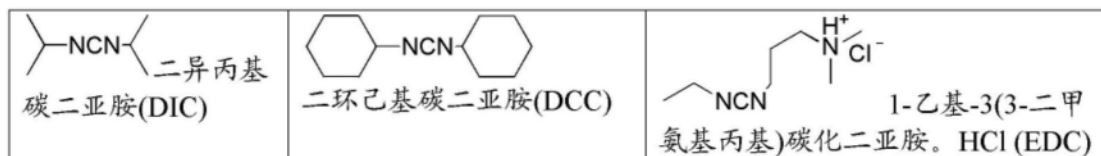
[0193] 表4

[0194]



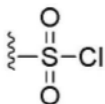
[0195] 表5:

[0196]



[0197] 其它亲电子基团可存在于半抗原上以附接间隔物,例如磺酰卤化物

[0198]



[0199] 或亲电子磷基团,例如:

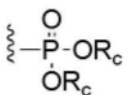
[0200]



[0201] 参见:Malachowski,William P.,Coward,James K.,Journal of Organic Chemistry,1994,59(25):7616

[0202] 或:

[0203]



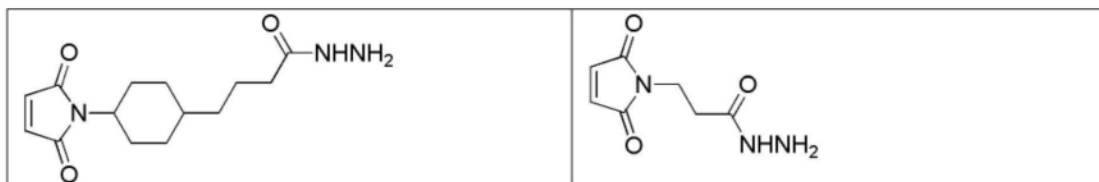
[0204] R_c为烷基、环烷基、芳基、取代的芳基、芳烷基。

[0205] 参见:Aliouane,L.,等人Tetrahedron Letters,2011,52(28):8681。

[0206] 可使用包括但不限于与间隔物上的酰肼基团H₂N-NH-C(=O)-反应以形成酰腙的方法,将具有醛或酮基团的半抗原附接至间隔物,参见:Chamow,S.M.,Kogan,T.P.,Peers,D.H.,Hastings,R.C.,Byrn,R.A.and Askenaszi,A.,J.Biol.Chem.,1992,267(22):15916。允许附接至载体上的硫醇基团的双官能酰肼间隔基团的示例在表6中示出。

[0207] 表6:

[0208]



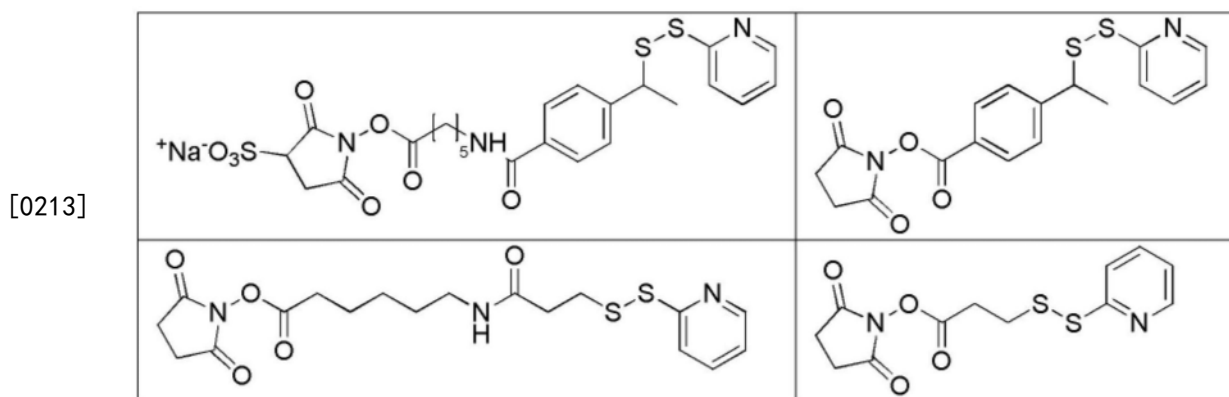
[0209] 半抗原也可包含可与载体反应的硫醇基团,前提条件是载体已被改性以提供可与硫醇反应的基团。可通过包括但不限于附接包含马来酰亚胺官能团的基团的方法来改性载体基团,所述附接是通过使载体上的氨基基团与N-马来酰亚胺基乙酸琥珀酰亚胺酯(AMAS, CAS#55750-61-3)、琥珀酰亚胺基碘乙酸酯(CAS#151199-81-4)或表1中示出的双官能间隔基团中任一个反应,以引入可经历导致半抗原附接至载体的反应的基团。

[0210] 能够与载体形成化学键的官能连接基团可为能够形成稳定键的任何基团,并且可对载体上多个不同的基团具有反应性。官能连接基团可优选地与载体上的氨基基团、羧酸基团或硫醇基团或它们的衍生物反应。官能连接基团的非限制性示例为羧酸基团、酰基卤、活性酯(如先前所定义)、异氰酸酯、异硫氰酸酯、卤代烷、氨基基团、硫醇基团、马来酰亚胺基团、丙烯酸酯基团(H₂C=CH-C(=O)-)或乙烯基砜基团(H₂C=CH-SO₂-),参见:Park,J.W.等人

Bioconjugate Chem., (2012,23(3):350。官能连接基团可作为差别活化的间隔物构建单元的部分存在,该间隔物构建单元可分步与半抗原反应并且所得的半抗原衍生物然后可与载体反应。另选地,半抗原可用间隔物衍生化,该间隔物具有可通过后续反应被转化为官能连接基团的前体基团。当间隔物上的官能连接基团为胺或羧酸基团时,可通过肽偶联试剂的使用直接进行与载体上的羧酸基团或胺的偶联反应,该偶联反应是根据以上针对这些试剂所引用的参考文献中的程序来进行。

[0211] 特定的二硫化物基团例如吡啶基二硫化物可用作间隔物上的官能连接基团,该官能连接基团可与载体上的硫醇基团发生交换以形成混合的二硫键,参见:Ghetie,V.等人,Bioconjugate Chem.,1990,1:24-31。这些间隔物可通过使具有胺的半抗原与活性酯反应来附接,该活性酯是附接至具有吡啶基二硫化物基团的间隔物,其示例包括但不限于表7中示出的那些。

[0212] 表7

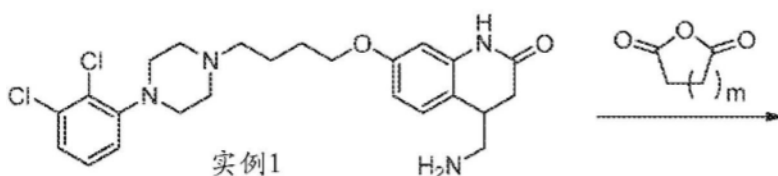


[0214] 最通常地,载体为蛋白质并且赖氨酸残基的 ϵ -氨基基团可用于附接,该附接是通过与胺反应性的官能连接基团反应来直接进行,或者是在用含硫醇基团,包括N-琥珀酰亚胺S-乙酰基硫代乙酸酯(SATA,CAS 76931-93-6)或其类似物衍生后进行,之后用羟胺使乙酸酯基团裂解来暴露硫醇基团,以用于与半抗原上的官能连接基团反应。还可通过用温和的还原试剂还原蛋白质载体内的二硫键来将硫醇基团引入到载体中,这些还原试剂包括但不限于2-巯基乙醇,参见:Bilah,M.等人,Bioelectrochemistry,2010,80(1):49,膦试剂,参见:Kirley,T.L.,Analytical Biochemistry,1989,180(2):231或二硫赤藓糖醇(DTT,CAS 3483-12-3)Cleland,W.,Biochemistry,1964,3:480-482。

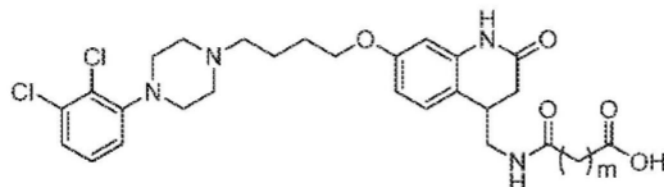
[0215] 一般反应方案

[0216] 可根据下述一般合成方法来合成用于产生根据主题发明的抗体的化合物。式I的化合物可通过本领域的技术人员已知的方法制备。以下反应方案仅意在表示本发明的实例且绝不意在限制本发明。

[0217] 方案1

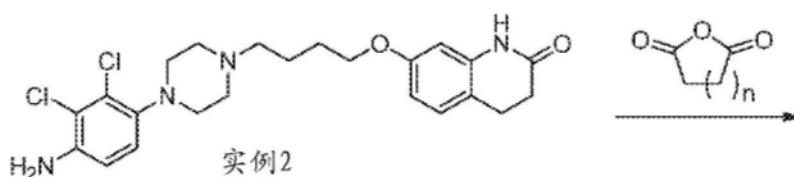


[0218]

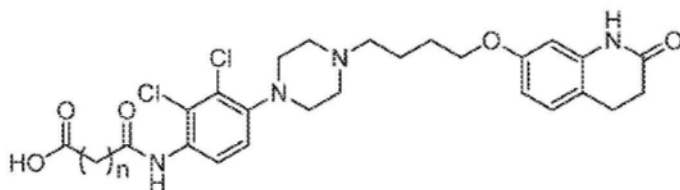


[0219] 如方案1中所示,可通过与环状酸酐化合物诸如琥珀酸酐或戊二酸酐的反应,用间隔物处理实例1的半抗原。该反应可在室温下在溶剂诸如THF中进行过夜。

[0220] 方案2

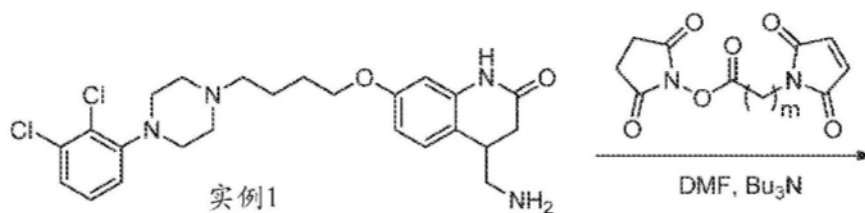


[0221]

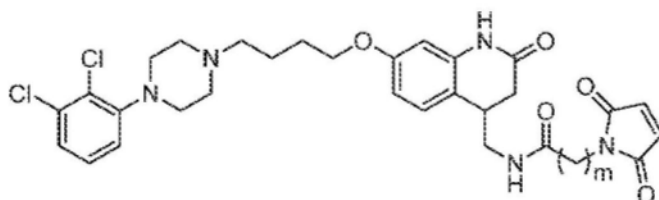


[0222] 如方案2中所示,可通过与环状化合物诸如琥珀酸酐或戊二酸酐的反应,用间隔物处理实例2的半抗原。反应可在溶剂诸如吡啶中进行,并且在微波炉中加热至约110℃,持续3-6小时。

[0223] 方案3



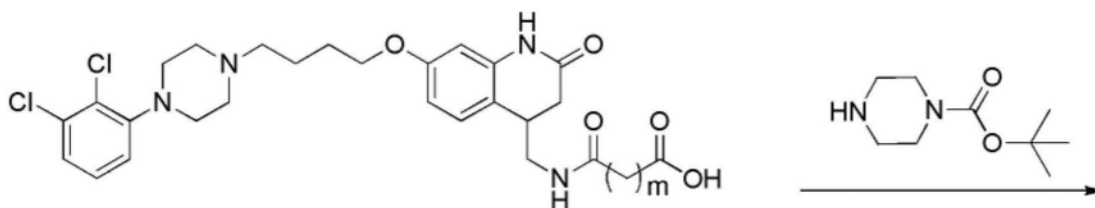
[0224]



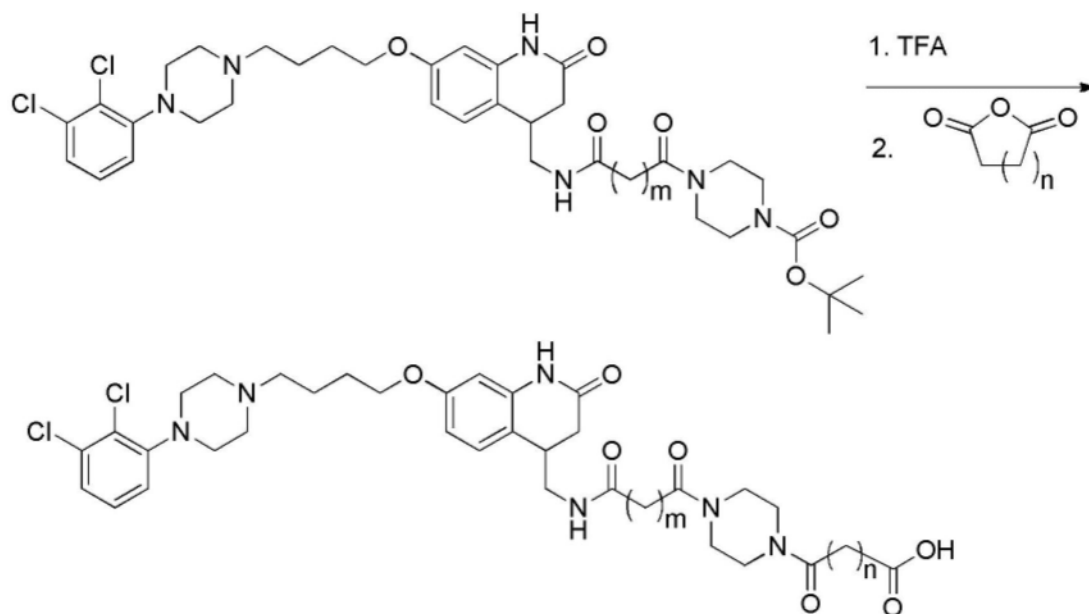
[0225] 可用马来酰亚胺基团进一步官能化末端为烷基胺基团的半抗原诸如实例1。本领域的技术人员将认识到相同的方法将可适用于阿立哌唑的其它烷基氨基衍生物。阿立哌唑衍生物与烷基-马来酰亚胺官能化基团诸如2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙酸2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯在溶剂诸如DMF,在碱诸如三丁胺的存在下,在20℃下反应一小

时,生成具有马来酰亚胺间隔物的阿立哌唑的半抗原。

[0226] 方案4

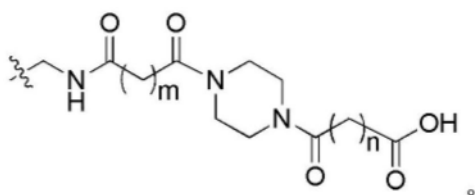


[0227]

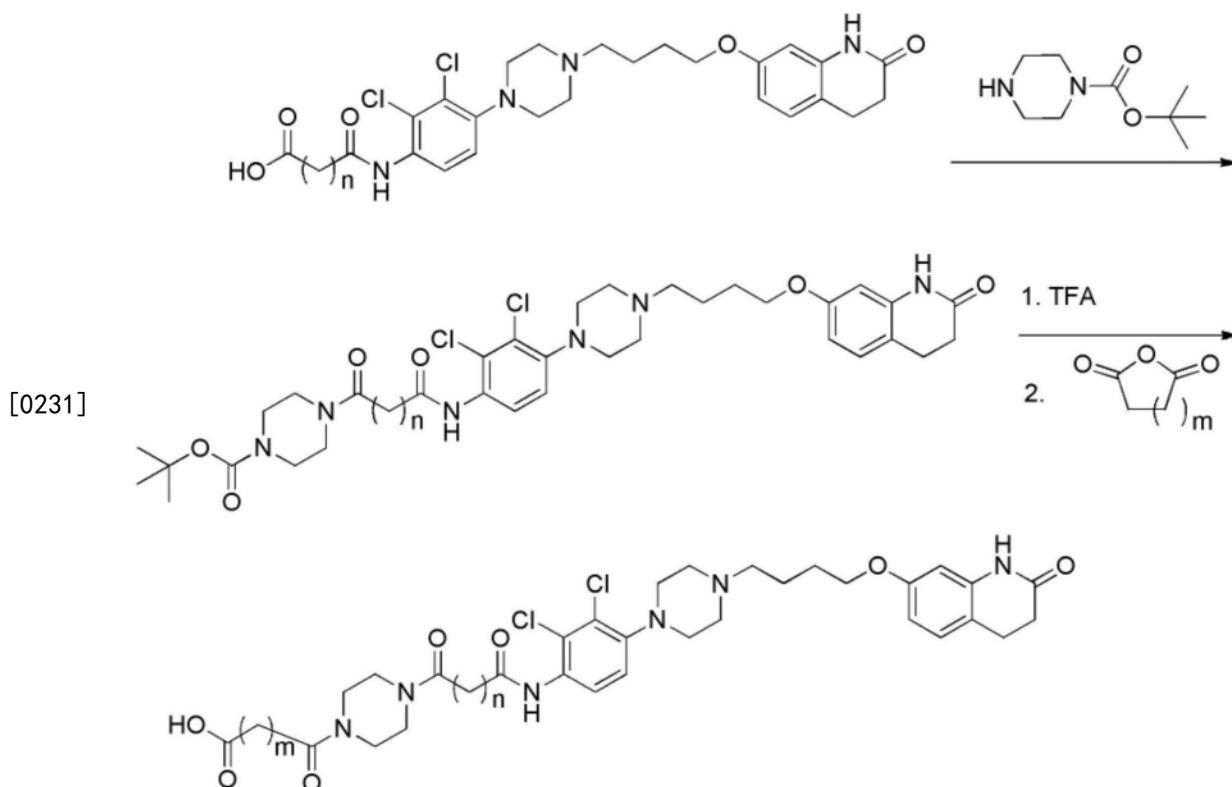


[0228] 半抗原上的间隔物可如方案4中所示延伸。可在惰性气氛下将具有带有羧酸官能团的间隔物的半抗原溶解于合适的溶剂诸如二氯甲烷中,并且用N-叔丁氧基羰基哌嗪和适当的碱诸如二异丙基乙胺进行处理。然后用氰基磷酸二乙酯处理溶液以将哌嗪部分安装到间隔物上。可用三氟乙酸或本领域中已知的其它方法完成哌嗪的去保护。与环状酸酐的反应得到式I的化合物,其中R¹为

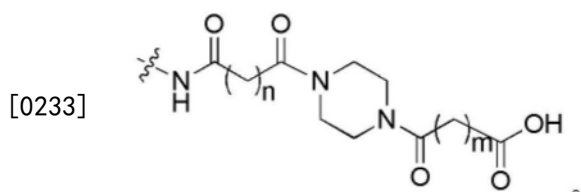
[0229]



[0230] 方案5

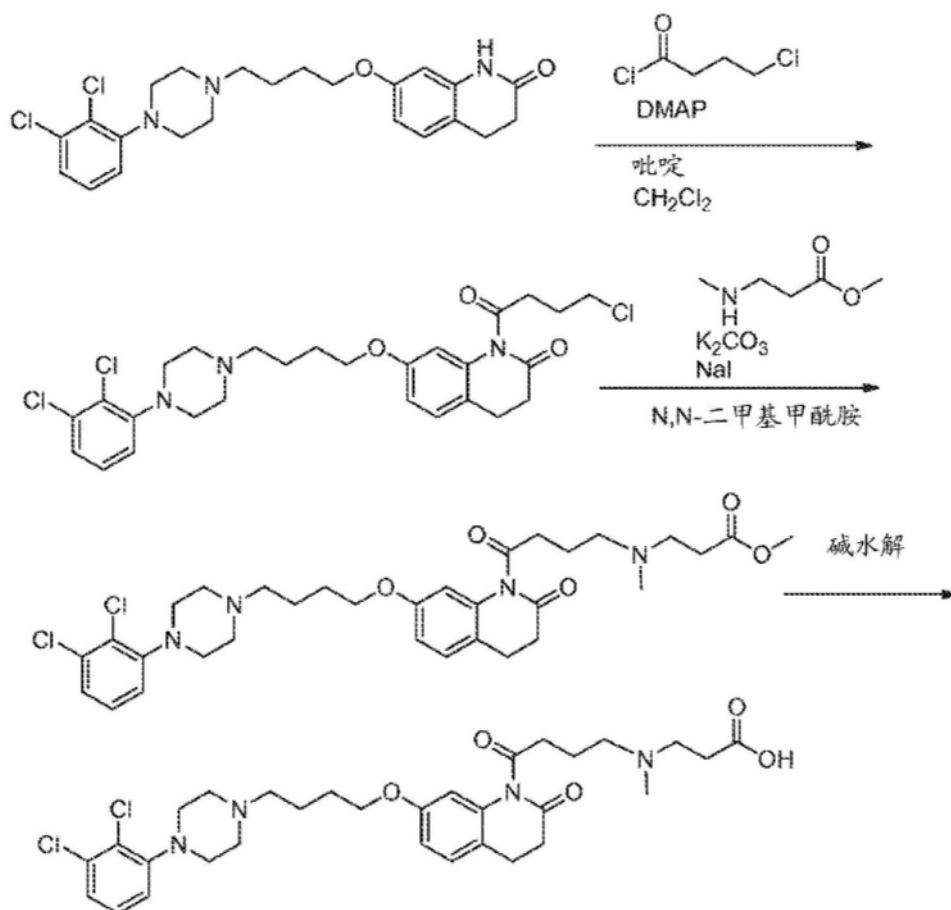


[0232] 半抗原上的间隔物也可如方案5中所示延伸。可在惰性气氛下将具有带有羧酸官能团的间隔物的半抗原溶解于合适的溶剂诸如二氯甲烷中,并且用N-叔丁氧基羰基哌嗪和适当的碱诸如二异丙基乙胺进行处理。然后用氰基磷酸二乙酯处理溶液以将哌嗪部分安装到间隔物上。可用三氟乙酸或本领域中已知的其它方法完成哌嗪的去保护。与环状酸酐的反应得到式I的化合物,其中R²为



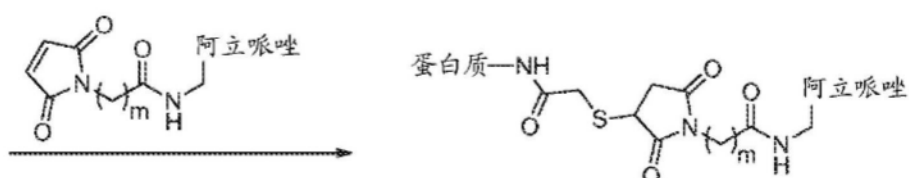
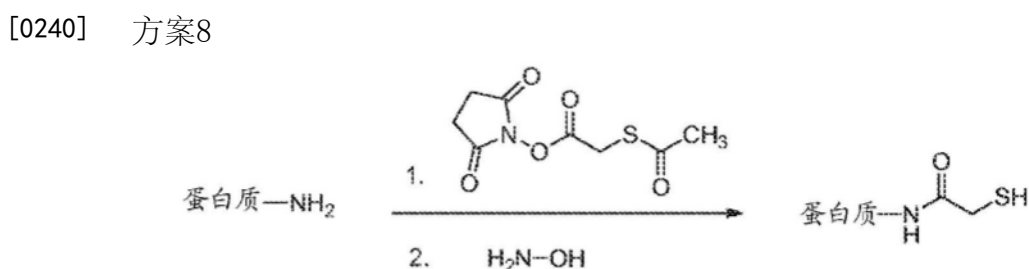
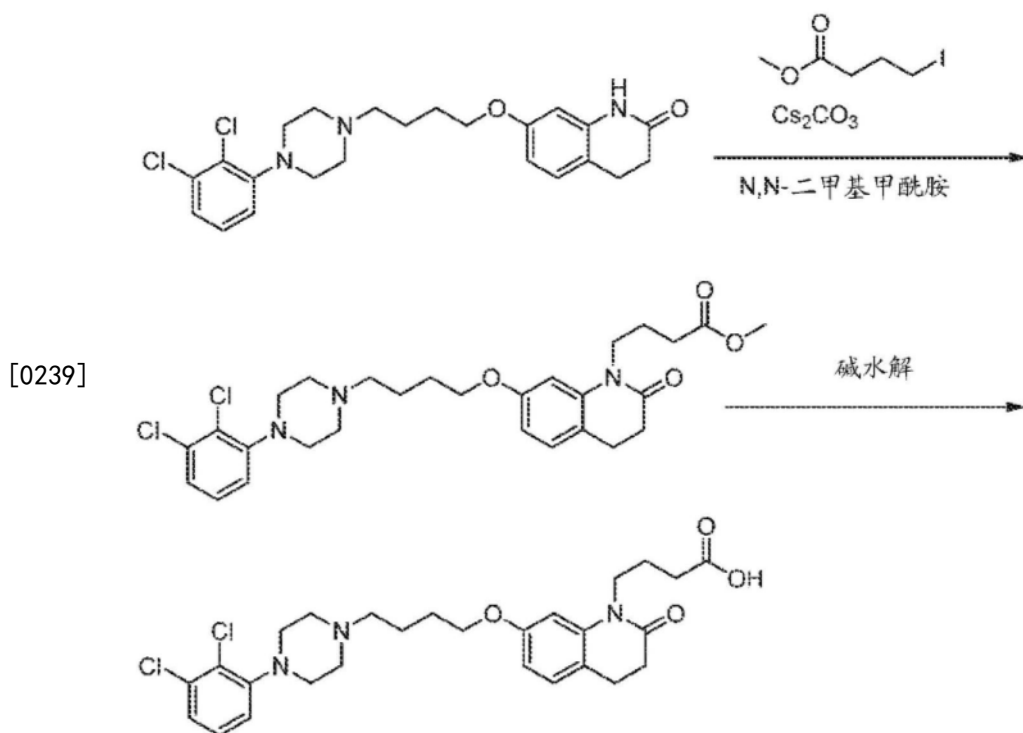
[0234] 也可通过喹啉酮氮的酰化反应或烷化反应,由母体分子阿立哌唑直接生成半抗原。方案6示出了合成路线,其中可使用N,N-二甲基-4-氨基吡啶(DMAP)作为催化剂,在碱诸如吡啶的存在下,在非质子溶剂例如二甲基甲酰胺中,通过与4-氯丁酸的酰基氯的反应,将酰基基团附加至阿立哌唑,参见:实例5,US20110230520。可在碘化钠和碱例如碳酸钾的存在下,在偶极非质子溶剂诸如N,N-二甲基甲酰胺中,进行N-甲基-β-丙氨酸甲酯对氯化物的亲核置换,参见:Penning,T.,D.等人J. Med. Chem, 2002, 45:3482。使用本领域的技术人员已知的标准方法诸如暴露于碱水溶液进行酯基团的水解,产生羧基官能化的半抗原,其可使用先前描述的方法进一步处理,其中一个实例在以下方案9中示出,以提供用于附接至免疫原性载体的适当官能化的化合物。

[0235] 方案6:

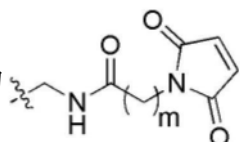


[0237] 方案7示出了使用标准烷化反应化学,烷基基团至阿立哌唑的喹啉酮基团的氮的附接模式。可使用US20120004165中实例6的方法,使碘代化合物,例如4-碘代丁酸甲酯在碱诸如碳酸铯的存在下,在偶极非质子溶剂诸如N,N-二.甲基甲酰胺中与阿立哌唑反应。使用本领域的技术人员已知的标准方法诸如暴露于碱水溶液进行酯基团的水解,产生羧基官能化的半抗原,其可使用先前描述的方法进一步处理,其中一个实例在以下方案9中示出,以提供用于附接至免疫原性载体的适当官能化的化合物。

[0238] 方案7

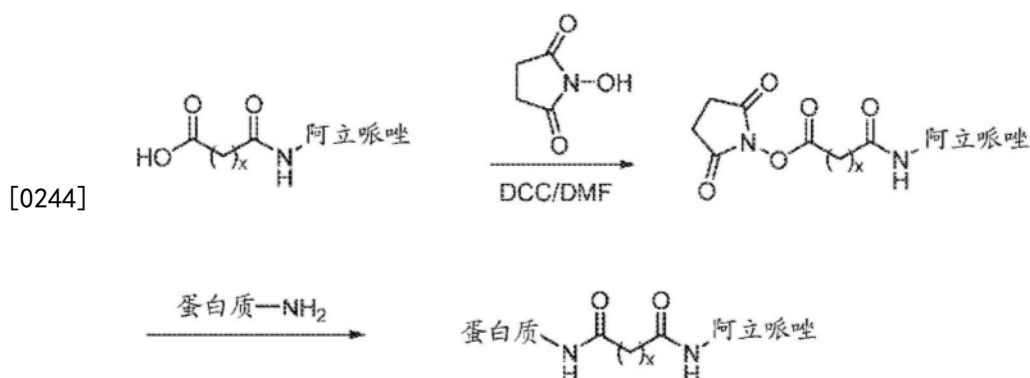


[0242] 可根据方案8中所示的方法,将马来酰亚胺官能化的半抗原缀合至蛋白质。通过使用N-琥珀酰亚胺S-乙酰基硫代乙酸酯(SATA)的 ϵ -氮的酰化,之后是使用羟胺的S-乙酰基基团的后续水解,进行蛋白质赖氨酸残基的活化,产生亲核巯基基团。通过迈克尔加成反应进行巯基活化的蛋白质与马来酰亚胺衍生化的半抗原(如一般方案3所述制备)的缀合。合适的蛋白质是本领域的技术人员已知的并且包括钥孔血蓝蛋白、牛甲状腺球蛋白和牛卵清蛋白。

虽然方案8示出了在 R^1 为的情况下的蛋白质-半抗原缀合,但可使用相

同的化学将任何马来酰亚胺官能化的半抗原缀合至蛋白质。

[0243] 方案9:



[0245] 其中x为m或n,如式I所定义。

[0246] 可根据方案9中所示的方法,将羧酸官能化的半抗原缀合至蛋白质。与N-羟基琥珀酰亚胺和合适的偶联剂诸如二环己基碳二亚胺(DCC)以及碱诸如三丁胺(Bu_3N) 在溶剂诸如DMF,在约20℃的室温下反应约18小时,活化具有羟基吡咯烷-2,5-二酮离去基团的羧酸。然后可在溶剂诸如pH 7.5的磷酸盐缓冲液中,在约20℃下用时约2.5小时,将活化的间隔物和半抗原缀合至蛋白质。合适的蛋白质是本领域的技术人员已知的并且包括钥孔血蓝蛋白、牛甲状腺球蛋白和牛卵清蛋白。虽然方案9示出了在 R^2 为 $\text{NHC(O)(CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$ 的情况下的蛋白质-半抗原缀合,但可使用相同的化学将任何 CO_2H 官能化的半抗原缀合至蛋白质。

[0247] 抗体

[0248] 本发明涉及分离的抗体或其结合片段,该分离的抗体或其结合片段结合至阿立哌唑,并且该分离的抗体或其结合片段:(i) 是响应于式I的化合物和免疫原性载体的缀合物而生成的;或(ii) 竞争与(i)的抗体所结合的表位相同的表位。术语“抗体”是指能够结合抗原或其部分(根据本发明,能够结合至抗精神病药物或其代谢物)的特异性蛋白质。抗体是响应于通过注射被引入到宿主,例如动物或人体内的免疫原而产生。通用术语“抗体”包括多克隆抗体、单克隆抗体和抗体片段。

[0249] “抗体”或“抗原结合抗体片段”是指完整的抗体或其与完整的抗体竞争结合的片段。一般来讲,当解离常数小于或等于 $1\mu\text{M}$,优选地小于或等于 100nM 且最优选地小于或等于 10nM 时,据称抗体或抗原结合抗体片段特异地结合抗原。可通过本领域的技术人员已知的方法来测量结合,其示例为使用BIAcore™器械。

[0250] 抗体片段包括完整抗体的一部分,优选地,完整抗体的抗原结合区或可变区。结合片段包括Fab、Fab'、 F(ab')_2 和Fv片段;双体;线性抗体;单链抗体分子;以及由抗体片段形成的多特异性抗体。“双特异性”或“双功能”抗体之外的抗体应理解为它的每一个结合位点是相同的。

[0251] 如本文所用,“表位”包括能够特异性结合至免疫球蛋白或T细胞受体的任何蛋白决定簇。表位决定簇通常由分子的化学活性表面基团诸如氨基酸或糖侧链组成,并且通常具有特定的三维结构特征,以及比电荷特征。通过本领域的技术人员熟知的任何方法(诸如上述的BIAcore™方法),如果一种抗体在竞争结合测定中表现出与第二抗体竞争,则两种抗体被称为“结合相同的表位”。参考半抗原(诸如阿立哌唑或其它抗精神病药物),可通过将半抗原缀合至免疫原性载体而针对非抗原性的半抗原分子生成抗体。然后生成识别由半抗原所限定的“表位”的抗体。

[0252] 当用于抗体的语境中时,“分离的”是指“人为地”从任何天然状态改变;即意指,如

果它存在于自然界中,那么它已被从原始环境中改变或去除,或以上两者。例如,以其天然状态天然地存在于活体动物中的天然存在的抗体不是“分离的”,但是与其天然状态的共存材料分开的相同的抗体是“分离的”,如该术语在本文的使用。抗体可存在于不是天然存在的组合物的组合物诸如免疫测定试剂中,并且在其中保持如本文所用的该术语的含义内的分离的抗体。

[0253] “交叉反应性”是指抗体与并非用于诱导该抗体的抗原的反应。

[0254] 优选地,主题发明的抗体将结合至药物和任何期望的药理学上活性的代谢物。通过改变免疫原性载体附接至本发明的化合物的位置,可工程化抗体对代谢物的选择性和交叉反应性。对于阿立哌唑而言,与脱氢阿立哌唑的交叉反应性可能是期望的。可生成检测阿立哌唑和脱氢阿立哌唑两者的抗体,或者可生成单独地检测每一个的抗体(由此定义抗体“特异性结合”特性)。当抗体对一种或多种化合物的结合为克分子数相等或基本上克分子数相等的时,该抗体特异性结合这一种或多种化合物。

[0255] 产生此类抗体的方法包括用本文所述的缀合物接种宿主。合适的宿主包括但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、兔、鸡、驴、马、猴、黑猩猩、猩猩、大猩猩、人以及能够引发成熟的免疫应答的任何物种。免疫程序在本领域已完整地建立,且在众多专题论文和出版物包括“The Immunoassay Handbook”,第2版,David Wild编(Nature Publishing Group,2000)以及其中引用的参考文献中被提及。

[0256] 优选地,与佐剂结合,将体现本发明的特征的免疫原施用给宿主受检者,例如动物或人。合适的佐剂包括但不限于弗氏佐剂、粉状氢氧化铝(矾)、连同百日咳博代氏杆菌(*Bordetella pertussis*)的氢氧化铝,以及单磷酸基脂质A-合成海藻糖二霉菌酸酯(MPL-TDM)。

[0257] 通常,通过一次或多次皮下或腹膜内注射,将免疫原或免疫原与佐剂的组合注射到哺乳动物宿主中。优选地,经至少一周,并且更优选地经两周或更多周,进行免疫程序。可利用本领域熟知的方法分离和纯化这样产生的多克隆抗体。

[0258] 可通过Kohler和Milstein完整建立的杂交瘤方法,例如Nature 256:495-497 (1975),来产生单克隆抗体。杂交瘤方法通常涉及免疫宿主或来自宿主的淋巴细胞,收获分泌淋巴细胞或具有分泌淋巴细胞的潜能的单克隆抗体,将淋巴细胞与永生化的细胞融合,并且选择分泌所期望的单克隆抗体的细胞。

[0259] 可使宿主免疫以引出产生或能够产生特异性针对免疫原的抗体的淋巴细胞。另选地,可体外免疫淋巴细胞。如果人细胞是期望的,则可使用外周血淋巴细胞,但来自其它哺乳动物源的脾细胞或淋巴细胞是优选的。

[0260] 可将淋巴细胞与永生化的细胞系融合以形成杂交瘤细胞,可通过使用融合剂例如聚乙二醇来促进此过程。通过例证的方式,可使用通过转化而永生化的突变型啮齿动物、牛或人骨髓瘤细胞。与未融合的永生化的细胞相反,基本上纯的杂交瘤细胞的群体是优选的。因此,在融合后,可使细胞在合适的培养基中生长,该培养基例如通过使用缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT)的突变型骨髓瘤细胞,抑制未融合的永生化的细胞的生长或存活。在此类实例中,可将次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶核苷加入培养基(HAT培养基),以在允许杂交瘤生长的同时阻止HGPRT缺陷细胞的生长。

[0261] 优选地,永生化的细胞有效地融合,可通过在培养基诸如HAT中的选择而从混合群体

中分离,且在融合后支持抗体的稳定而高水平的表达。优选的永生化细胞系包括购自美国典型培养物保藏中心(Manassas,VA)的骨髓瘤细胞系。

[0262] 因为杂交瘤细胞通常胞外分泌抗体,所以可关于特异性针对抗精神病药物的单克隆抗体的存在测定培养基。可使用体外结合测定例如放射性免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)的免疫沉淀来测量单克隆抗体的结合特异性。

[0263] 可通过有限稀释程序将分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞分离成单个克隆且进行传代培养。合适的培养基包括但不限于达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)、RPMI-1640以及无多肽、少多肽或无血清培养基,例如购自Biowhittaker公司(Walkersville,MD)的Ultra DOMA PF或HL-1。另选地,杂交瘤细胞可作为腹水在体内生长。

[0264] 可通过常规免疫球蛋白(Ig)纯化程序,包括但不限于多肽A-SEPHAROSE、羟基磷灰石色谱、凝胶电泳、渗析、硫酸铵沉淀以及亲和色谱,将单克隆抗体从培养基或腹水液中分离和/或纯化。

[0265] 还可通过重组方法,诸如美国专利4,166,452中所述的方法,产生单克隆抗体。可使用常规程序,例如使用特异性结合至抗体重链和轻链基因的寡核苷酸探针,优选地来探测从分泌特异性针对抗精神病药物的抗体的单克隆抗体杂交瘤细胞系分离的DNA,对编码单克隆抗体的DNA进行分离和测序。

[0266] 也可生成包含针对抗精神病药物的特异性结合位点的抗体片段。此类片段包括但不限于可通过抗体分子的胃蛋白酶消化产生的 $F(ab')_2$ 片段和可通过还原 $F(ab')_2$ 片段的二硫键桥生成的Fab片段。另选地,Fab表达文库可被构造成允许快速且容易识别具有期望的特异性的单克隆Fab片段(Huse等人,Science 256:1270-1281(1989))。Fab、Fv和ScFv抗体片段均可在大肠杆菌中表达且分泌,从而允许这些片段的大量产生。另选地,可将Fab'-SH片段从大肠杆菌中直接回收且进行化学偶联以形成 $F(ab')_2$ 片段(Carter等人,BioTechnology 10:163-167(1992))。对于本领域的技术人员,用于抗体片段的产生的其它技术是已知的。还可想到单链Fv片段(scFv)(参见美国专利5,761,894和5,587,458)。Fv和sFv片段是仅有的具有缺乏恒定区的完整结合位点的物质;因此,它们可能表现出降低的非特异性结合。抗体片段也可以是“线性抗体”,例如,如美国专利5,642,870中所述(例如)。此类线性抗体片段可为单特异性或双特异性的。

[0267] 测定试剂盒和装置

[0268] 还可提供包括如上所述的抗体的测定试剂盒(也称为试剂盒)。代表性的试剂盒可包括结合至抗精神病药物阿立哌唑的抗体,即包含抗精神病药物的类似物或其与标记部分偶联的衍生物的复合物,并且可任选地包含一种或多种校准品,该校准品包含已知量的抗精神病药物或相关标准品。

[0269] 短语“测定试剂盒”是指用于执行测定的材料和试剂的组件。试剂可以包装组合的形式提供在相同或分开的容器中,这取决于它们的交叉反应性和稳定性以及是液体或是冻干形式。可选择提供在试剂盒中的试剂的量和比例以提供针对特定应用的最佳结果。体现本发明特征的测定试剂盒包括结合阿立哌唑的抗体。试剂盒还可包括阿立哌唑的竞争结合配偶体以及校准和对照材料。

[0270] 短语“校准和对照材料”是指包含已知量的分析物的任何标准或参考材料。在类似

的条件下测定怀疑包含分析物的样品和对应的校准材料。通过比较未知标本获得的结果与标准品获得的结果来计算分析物的浓度。这常常通过构造校准曲线来进行。

[0271] 体现本发明的特征的抗体可连同它们的使用说明被包括在试剂盒、容器、包装或分配器中。当抗体在试剂盒中提供时,免疫测定的不同组分可被封装于分开的容器中且在使用前混合。这种对于组分的单独封装可允许长期储存而基本上不减少活性组分的功能。此外,试剂可封装在惰性环境下,例如封装在氮气、氩气等的正压下,这对于对空气和/或水分敏感的试剂是特别优选的。

[0272] 体现本发明的特征的被包括在试剂盒中的试剂可在所有方式的容器中提供,使得不同组分的活性得以实质性保存,同时组分本身基本上不被容器的材料吸附或改变。合适的容器包括但不限于安瓿、瓶、试管、小瓶、烧瓶、注射器、封袋例如带金属薄片衬里的等。容器可由任何合适的材料构成,该材料包括但不限于玻璃、有机聚合物例如聚碳酸酯、聚苯乙烯、聚乙烯等、陶瓷、金属例如铝、金属合金例如钢、软木等。此外,容器可包括一个或多个无菌入口,例如用于针的进入,诸如可由隔膜提供的那样。用于隔膜的优选材料包括橡胶和由DuPont (Wilmington, DE) 以商品名TEFLON出售的类型的聚四氟乙烯。此外,容器可包括由可去除以允许组分混合的隔板或膜分开的两个或更多个隔室。

[0273] 体现本发明的特征的试剂盒还可同说明性材料一起提供。说明可例如印刷在纸上并且/或者提供于电子可读介质中。另选地,可通过将用户引导至例如由试剂盒的制造商或分销商所指定的互联网站,和/或通过电子邮件来提供说明。

[0274] 抗体也可作为测定装置的一部分被提供。此类测定装置包括侧流测定装置。一种常见类型的一次性侧流测定装置包括用于接收液体样品的区或区域、缀合区和反应区。这些测定装置通常称为侧流测试条。它们采用多孔材料,如硝化纤维,从而限定能够支持毛细流动的流体流动路径。例子包括在美国专利号5,559,041、5,714,389、5,120,643和6,228,660中示出的那些,这些专利全文均以引用方式并入本文。

[0275] 另一种类型的测定装置为具有突出部以引起毛细流动的无孔测定装置。此类测定装置的示例包括开放侧流装置,如在PCT国际公布W0 2003/103835、W0 2005/089082、W0 2005/118139和W0 2006/137785中所公开,这些专利全文均以引用方式并入本文。

[0276] 在无孔测定装置中,测定装置通常具有至少一个样品添加区、至少一个缀合区、至少一个反应区和至少一个芯吸区。这些区形成流动路径,样品通过该流动路径从样品添加区流至芯吸区。还包括反应区中的捕获元件诸如抗体,其能够结合到分析物、任选地沉积在装置上(诸如通过涂覆);和标记的缀合物材料,其沉积在缀合区中的装置上,也能够参与能确定分析物浓度的反应,其中所述标记的缀合物材料携带在反应区中的检测所用的标记。当样品流过缀合区时,缀合物材料被溶解,形成溶解的标记缀合物材料的缀合物羽流和向下游流至反应区的样品。当缀合物羽流流入反应区时,缀合的材料将诸如通过缀合的材料与分析物的复合物(如在“夹心”测定中)或直接地(如在“竞争性”测定中)被捕获元件所捕获。未结合的溶解的缀合物材料将快速经过反应区进入至少一个芯吸区。此类装置可在流动路径中包括突出部或微柱。

[0277] 诸如美国专利公布US20060289787A1和US 20070231883A1以及美国专利7,416,700和6,139,800中所公布的器械,能够在反应区中检测结合的缀合材料,这些专利全文均以引用方式并入本文。常见的标记包括可由器械检测的荧光染料,该器械激发荧光染料并

且结合了能够检测荧光染料的检测器。

[0278] 免疫测定

[0279] 由此产生的抗体可用于免疫测定以识别/结合至抗精神病药物,从而检测药物在患者样品中的存在和/或量。优选地,测定格式为竞争性免疫测定格式。此类测定格式和其它测定描述于(除了别的以外)Hampton等人(Serological Methods, A Laboratory Manual, APS Press, St. Paul, MN 1990)和Maddox等人(J. Exp. Med. 158:12111, 1983)。

[0280] 术语“分析物”是指其存在或量为待确定的任何一种物质或一组物质。代表性抗精神病药物分析物包括但不限于利培酮、帕潘立酮、奥氮平、阿立哌唑和喹硫平。

[0281] 术语“竞争性结合配偶体”是指诸如可在竞争性免疫测定中采用的,相对于与抗体的结合亲和力,其行为与分析物相似的一种物质或一组物质。代表性竞争性结合配偶体包括但不限于抗精神病药物衍生物等。

[0282] 术语“检测”当与分析物一起使用时,是指任何定量、半定量或定性方法,以及用于总体确定分析物且具体地确定抗精神病药物的所有其它方法。例如,仅检测样品中抗精神病药物的存在或不存在的方法在本发明的范围内,提供关于样品中抗精神病药物的量或浓度的数据的方法也在本发明的范围内。术语“检测”、“确定”、“识别”等在本文中同义使用,并且全部在本发明的范围内。

[0283] 主题发明的优选实施例为竞争性免疫测定,其中结合抗精神病药物的抗体、或药物或其竞争性结合配偶体,被附接至固体支持体(诸如侧流测定装置中的反应区),并且使相应地标记药物或其竞争性结合配偶体或标记抗体和来源于宿主的样品通过固体支持体,并且所检测的附接至固体支持体的标记的量可与样品中药物的量相关联。

[0284] 可根据当前优选实施例的方法来分析怀疑包含分析物例如抗精神病药物的任何样品。如果需要,可预处理样品,并且可在不妨碍测定的任何方便的培养基中制备。优选地,样品包含水性培养基诸如来自宿主的体液,最优选地为血浆或血清。

[0285] 应当理解,采用抗体的所有方式的免疫测定均可预期根据当前优选实施例来使用,包括抗体结合至固相的测定和抗体处于液体培养基中的测定。可用于使用体现本发明的特征的抗体来检测分析物的免疫测定的方法包括但不限于:竞争性(限制试剂)测定,其中标记的分析物(分析物类似物)和样品中的分析物竞争抗体;和单位点免疫测定,其中抗体是经标记的等等。

[0286] 通过以下实例进一步描述本发明。提供的实例仅用于参照具体实施例来说明本发明。虽然这些范例说明了本发明的某些具体方面,但不应解释为对所公开的发明的范围的限制或限定。

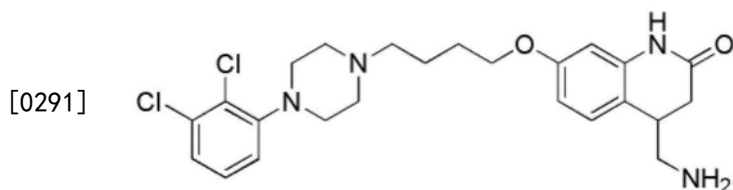
[0287] 使用为本领域的技术人员所熟知且常规的标准技术进行所有实例,除非另有详细描述。可如标准实验室手册中所述来进行以下实例的常规分子生物学技术,标准实验室手册诸如:Sambrook等人Molecular Cloning A Laboratory Manual,第2版,Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)。

[0288] 名称为“Haptens of Aripiprazole”(代理人案卷号PRD3265USPSP,美国临时专利申请61/691,450,2012年8月21日提交),“Haptens of Olanzapine”(代理人案卷号PRD3266USPSP,美国临时专利申请61/691,454,2012年8月21日提交),“Haptens of Paliperidone”(代理人案卷号PRD3267USPSP,美国临时专利申请61/691,459,2012年8月21

日提交), “Haptens of Quetiapine” (代理人案卷号PRD3268USPSP, 美国临时专利申请61/691,462, 2012年8月21日提交), “Haptens of Risperidone and Paliperidone” (代理人案卷号PRD3269USPSP, 美国临时专利申请61/691,469, 2012年8月21日提交), “Antibodies to Olanzapine Haptens and Use Thereof” (代理人案卷号CDS5132USPSP, 美国临时专利申请61/691,572, 2012年8月21日提交), “Antibodies to Paliperidone Haptens and Use Thereof” (代理人案卷号CDS5126USPSP, 美国临时专利申请61/691,634, 2012年8月21日提交), “Antibodies to Quetiapine Haptens and Use Thereof” (代理人案卷号CDS5134USPSP, 美国临时专利申请61/691,598, 2012年8月21日提交), “Antibodies to Risperidone Haptens and Use Thereof” (代理人案卷号CDS5130USPSP, 美国临时专利申请61/691,615, 2012年8月21日提交), “Antibodies to Aripiprazole and Use Thereof” (代理人案卷号CDS5129USPSP, 美国临时专利申请61/691,522, 2012年8月21日提交), “Antibodies to Olanzapine and Use Thereof” (代理人案卷号CDS5133USPSP, 美国临时专利申请61/691,645, 2012年8月21日提交), “Antibodies to Paliperidone and Use Thereof” (代理人案卷号CDS5127USPSP, 美国临时专利申请61/691,692, 2012年8月21日提交), “Antibodies to Quetiapine and Use Thereof” (代理人案卷号CDS5135USPSP, 美国临时专利申请61/691,659, 2012年8月21日提交), “Antibodies to Risperidone and Use Thereof” (代理人案卷号CDS5131USPSP, 美国临时专利申请61/691,675, 2012年8月21日提交), 以及“Antibodies to Risperidone and Use Thereof” (代理人案卷号CDS5145USPSP, 美国临时专利申请61/790,880, 2013年3月15日提交)的共同待审查申请全部全文以引用方式并入本文中。

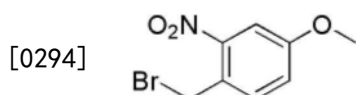
[0289] 实例1

[0290] 4-(氨基甲基)-7-(4-(4-(2,3-二氯苯基)哌嗪-1-基)丁氧基)-3,4-二氢喹啉-2(1H)-酮



[0292] 步骤A

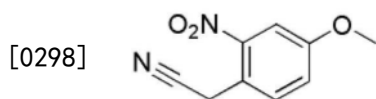
[0293] 1-(溴甲基)-4-甲氧基-2-硝苯基



[0295] 向化合物4-甲氧基-1-甲基-2-硝苯基(218g, 1.30mol)在CCl₄(1500mL)中的充分搅拌溶液中添加AIBN(21.7g, 0.13mol)和NBS(348g, 1.96mol)。在N₂下回流加热反应混合物16小时后,添加水并且用CH₂Cl₂从水相萃取产物。用盐水洗涤所得有机相,用Na₂SO₄干燥并且蒸发溶剂以得到固体,该固体通过硅胶色谱(用石油醚/乙酸乙酯, 20:1)进行纯化以得到呈黄色固体状标题化合物。ESI-MS (M+1) 246。¹H NMR: (CDCl₃, 400MHz): δ (ppm) 7.55 (s, 1H), 7.46-7.42 (d, 1H), 7.14-7.11 (d, 1H), 4.79 (s, 2H), 3.90 (s, 3H)。

[0296] 步骤B

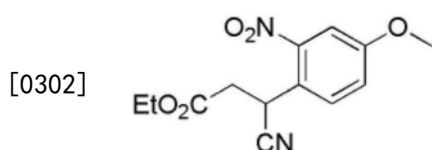
[0297] 2-(4-甲氧基-2-硝基苯基)乙腈



[0299] 向如步骤A中所述制备的1-(溴甲基)-4-甲氧基-2-硝基苯基(40g, 0.163mol)在THF(500mL)和EtOH(100mL)中的搅拌溶液中添加KCN(26.6g, 0.408mol)的水(100mL)溶液。将反应混合物在0℃搅拌1小时,然后在室温下再搅拌3小时。用水(500mL)稀释反应混合物并用DCM(500mL)萃取水相,并且然后用盐水洗涤,用Na₂SO₄干燥,并且在真空中干燥。通过硅胶柱上的色谱纯化残余物以得到标题化合物。ESI-MS (M+1) 193。¹H NMR: (CDCl₃, 400MHz): δ (ppm) 7.72 (s, 1H), 7.63-7.61 (d, 1H), 7.26-7.23 (d, 1H), 4.14 (s, 2H), 3.93 (s, 3H)。

[0300] 步骤C

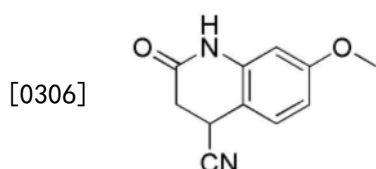
[0301] 3-氰基-3-(4-甲氧基-2-硝基苯基)丙酸乙酯



[0303] 在0℃下,向如步骤B中所述制备的2-(4-甲氧基-2-硝基苯基)乙腈(5.5g, 0.0286mol)的DMF(100mL)溶液中添加BrCH₂CO₂Et(5.71g, 0.034mol)和K₂CO₃(11.86g, 0.086mol)。将反应混合物在0℃下搅拌1小时并且在室温下再搅拌2小时。在通过TLC监测反应完全后,添加水。用乙酸乙酯萃取反应。用盐水洗涤有机相,用Na₂SO₄干燥,并且真空浓缩。通过硅胶柱上的色谱纯化粗产物以得到标题化合物。ESI-MS (M+1) 279。¹H NMR: (CDCl₃, 400MHz): δ (ppm) 7.70-7.68 (d, 1H), 7.57-7.56 (s, 1H), 7.24-7.21 (d, 1H), 5.13-4.98 (m, 1H), 4.20-4.18 (m, 2H), 3.89 (s, 3H), 2.99-2.97 (d, 2H), 1.28-1.24 (t, 3H)。

[0304] 步骤D

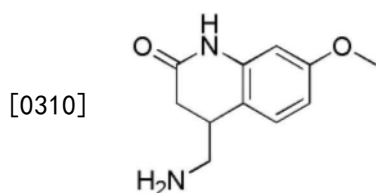
[0305] 7-甲氧基-2-氧代-1,2,3,4-四氢喹啉-4-甲腈



[0307] 向如步骤C中所述制备的3-氰基-3-(4-甲氧基-2-硝基苯基)丙酸乙酯(9.0g, 0.032mol)的MeOH(100mL)溶液中添加Sn(19.3g, 0.162mol),之后全部一次添加盐酸/MeOH(40mL, 1:1)。该反应在室温下搅拌2小时。真空去除溶剂。然后添加乙酸乙酯,并且添加NaHCO₃水溶液以中和该溶液。浓缩有机相以得到粗产物,其无需进一步纯化即用于下一步骤中。

[0308] 步骤E

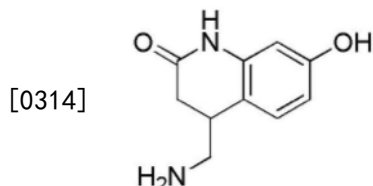
[0309] 4-(氨基甲基)-7-甲氧基-3,4-二氢喹啉-2(1H)-酮



[0311] 将如步骤D中所述制备的粗制的7-甲氧基-2-氧代-1,2,3,4-四氢喹啉-4-甲腈(6g,0.03mol)和雷尼镍(Raney Ni)(10g)悬浮在MeOH(100mL)和3mL的三乙胺的混合物中。在H₂(50Psi)气氛下,在室温将反应混合物搅拌4小时。在通过TLC监测反应完全后,过滤掉催化剂,并且然后在真空中去除溶剂以得到粗产物,其无需进一步纯化即用于下一步骤。

[0312] 步骤F

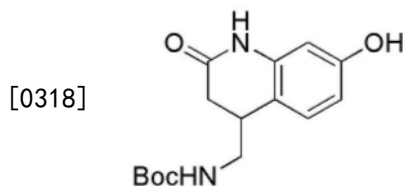
[0313] 4-(氨基甲基)-7-羟基-3,4-二氢喹啉-2(1H)-酮



[0315] 在-14℃下,向如步骤E中所述制备的粗制4-(氨基甲基)-7-甲氧基-3,4-二氢喹啉-2(1H)-酮(8.8g,0.0427mol)的二氯甲烷(100mL)溶液,滴加BBr₃(85g,0.342mol)的二氯甲烷溶液(1M),并且在室温下将反应搅拌过夜。在通过TLC监测反应完全后,在0℃下缓慢添加甲醇以淬灭反应,并且真空蒸发溶剂以得到直接用于下一步骤中的粗产物。

[0316] 步骤G

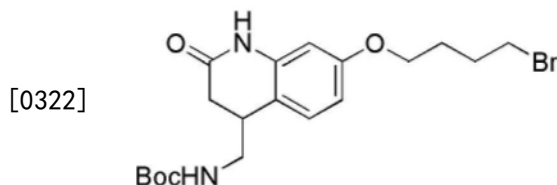
[0317] ((7-羟基-2-氧代-1,2,3,4-四氢喹啉-4-基)甲基)氨基甲酸叔丁酯



[0319] 将如步骤F中所述制备的粗制4-(氨基甲基)-7-羟基-3,4-二氢喹啉-2(1H)-酮(8.2g,0.0427mol)和(Boc)₂O(4.65g,0.021mol)、三乙胺(10mL)添加至100mL的甲醇中。该反应在室温下搅拌2小时。在反应停止后,真空去除溶剂,并且添加乙酸乙酯。用水、NaHCO₃水溶液洗涤有机相,用Na₂SO₄干燥并且在真空中浓缩。通过色谱纯化粗产物以得到标题化合物。ESI-MS (M+1) 292.¹H NMR: (DMSO-d₆,400MHz): δ (ppm) 9.96 (s,1H), 9.31 (s,1H), 6.95-6.89 (m,2H), 6.33 (d,2H), 3.00-2.97 (m,2H), 2.90-2.96 (m,1H), 2.56 (m,1H), 2.30-2.34 (m,1H), 1.37 (s,9H)。

[0320] 步骤H

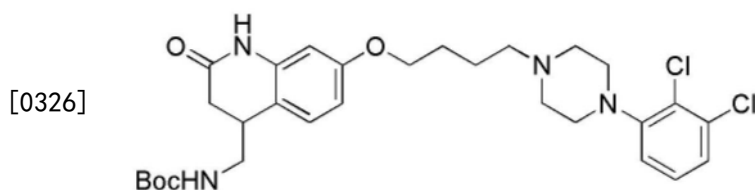
[0321] ((7-(4-溴丁氧基)-2-氧代-1,2,3,4-四氢喹啉-4-基)甲基)氨基甲酸叔丁酯



[0323] 向如步骤H中所述制备的((7-羟基-2-氧代-1,2,3,4-四氢喹啉-4-基)甲基)氨基甲酸叔丁酯(1.0mmol,292mg)和1,4-二溴丁烷(1.1mmol,237.5mg)的DMF(1.5mL)溶液中添加无水K₂CO₃(1.2mmol,166mg)。在室温下将混合物搅拌过夜,直到HPLC和LC/MS显示反应完成而得到标题化合物,其不经纯化即经受下一反应。MS m/z 428 (MH⁺)。

[0324] 步骤I

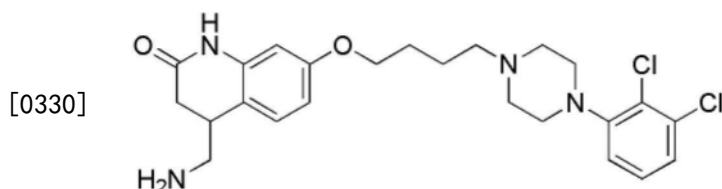
[0325] ((7-(4-(4-(2,3-二氯苯基)哌嗪-1-基)丁氧基)-2-氧代-1,2,3,4-四氢喹啉-4-基)甲基)氨基甲酸叔丁酯



[0327] 向如步骤H中所述制备的((7-(4-(4-(2,3-二氯苯基)哌嗪-1-基)丁氧基)-2-氧代-1,2,3,4-四氢喹啉-4-基)甲基)氨基甲酸叔丁酯的DMF溶液中添加1-(2,3-二氯-苯基)-哌嗪盐酸盐(1.0mmol, 268mg)和 K_2CO_3 (1.23mmol, 170mg)。将混合物在室温下搅拌过夜。在真空中蒸发溶剂并且在二氯甲烷和饱和的 $NaHCO_3$ 水溶液之间分配残余物。分离有机层并且用另外的二氯甲烷萃取含水层。合并、浓缩有机层。然后使残余物以梯度0-10%甲醇/二氯甲烷经受硅胶柱层析以得到呈固体状标题化合物。MS m/z 578(MH^+)。

[0328] 步骤J

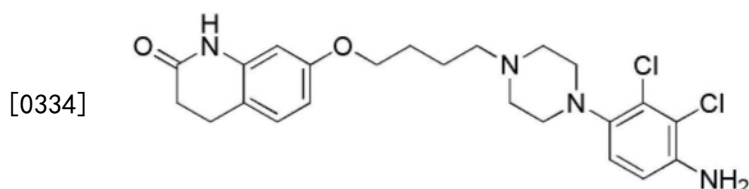
[0329] 4-(氨基甲基)-7-(4-(4-(2,3-二氯苯基)哌嗪-1-基)丁氧基)-3,4-二氢喹啉-2(1H)-酮



[0331] 向如步骤I中所述制备的((7-(4-(4-(2,3-二氯苯基)哌嗪-1-基)丁氧基)-2-氧代-1,2,3,4-四氢喹啉-4-基)甲基)氨基甲酸叔丁酯(200mg, 0.35mmol)的二氯甲烷(5mL)溶液中添加1mL的TFA。将混合物在室温下搅拌2.5小时。在真空下蒸发溶剂并且在二氯甲烷和饱和 $NaHCO_3$ 水溶液之间分配残余物。分离有机层并且用另外的二氯甲烷萃取含水层。合并有机层,用 Na_2SO_4 干燥,过滤并浓缩。然后使残余物以10%甲醇/二氯甲烷、之后是10%7N氨甲醇/二氯甲烷经受硅胶柱层析,以得到呈固体状标题化合物。通过以二氯甲烷和庚烷重结晶进一步纯化该产物,以得到白色固体状最终产物。MS m/z 477(MH^+)。 1H NMR: ($CDCl_3$, 400MHz): δ 7.40 (s, 1H), 7.25-7.05 (m, 3H), 7.00 (d, 1H), 6.60 (d, 1H), 6.30 (s, 1H), 4.00 (m, 2H), 3.10 (m, 4H), 3.00-2.60 (m, 9H), 2.50 (m, 2H), 1.90-1.40 (m, 6H)。计算值 $C_{24}H_{30}Cl_2N_4O_2$ C, 60.38; H, 6.33; N, 11.74。实测值C, 60.32; H, 5.89; N, 11.26。

[0332] 实例2

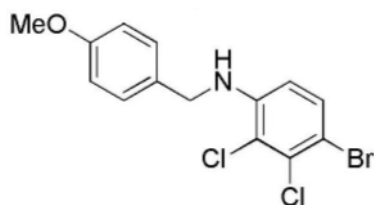
[0333] 7-(4-(4-(4-氨基-2,3-二氯苯基)哌嗪-1-基)丁氧基)-3,4-二氢喹啉-2(1H)-酮



[0335] 步骤A

[0336] 4-溴代-2,3-二氯-N-(4-甲氧基苄基)苯胺

[0337]

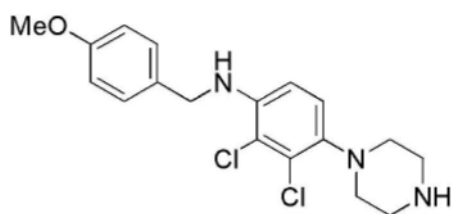


[0338] 向4-溴代-2,3-二氯-苯胺(3.215g, 13.3mmol)和1-氯甲基-4-甲氧基-苯(2.297g, 14.7mmol)在23mL的DMF中的溶液中添加碘化钾(2.214g, 13.3mmol)和647mg的氢化钠(60%油分散体)。在室温下搅拌过夜后,在真空中蒸发反应混合物并且在二氯甲烷和饱和的NaHCO₃水溶液之间分配残余物。分离有机层并且用另外的二氯甲烷萃取含水层。合并有机层,用Na₂SO₄干燥,过滤并浓缩。然后使残余物以30%乙酸乙酯/庚烷经受硅胶柱层析,以得到黄色固体状标题化合物。MS m/z 362 (MH⁺)。

[0339] 步骤B

[0340] 2,3-二氯-N-(4-甲氧基苄基)-4-(哌嗪-1-基)苯胺

[0341]

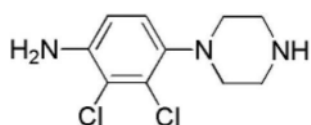


[0342] 搅拌在密封的厚壁瓶中,如先前步骤中所述制备的4-溴代-2,3-二氯-N-(4-甲氧基苄基)苯胺(3.61g, 10mmol)、哌嗪(1.034g, 12mmol)、叔丁醇钠(1.16g, 12mmol)和三(二亚苄基丙酮)二钯(0)(180mg, 2mol%)在16mL甲苯中的混合物,并且在100℃的油浴中加热2.5天。冷却至室温后,在二氯甲烷和水之间分配反应混合物。分离有机层并且用另外的二氯甲烷萃取含水层。合并有机层,用Na₂SO₄干燥,过滤并浓缩。然后以10%甲醇/二氯甲烷、之后是10%7N氨甲醇/二氯甲烷,通过硅胶柱上的柱层析纯化残余物,以得到浅棕色固体状标题化合物。MS m/z 367 (MH⁺)。¹H NMR: (CDCl₃, 400MHz): δ (ppm) 7.28 (d, 2H), 6.98 (d, 2H), 6.50 (d, 1H), 4.60 (s, 1H), 4.30 (m, 2H), 3.80 (m, 3H), 3.10-2.85 (m, 8H), 2.30 (s, 1H)。

[0343] 步骤C

[0344] 2,3-二氯-4-(哌嗪-1-基)苯胺

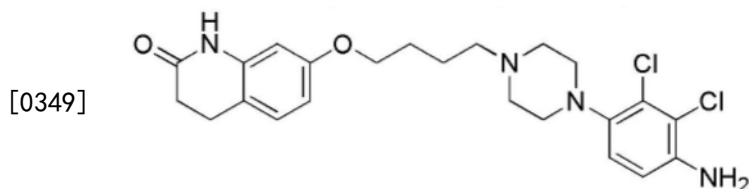
[0345]



[0346] 向如先前步骤所述制备的2,3-二氯-N-(4-甲氧基苄基)-4-(哌嗪-1-基)苯胺(562mg, 1.54mmol)的二氯甲烷(5mL)溶液中添加5mL的TFA。在室温下将反应混合物搅拌5小时,并且然后在真空中蒸发至干。将残余物再次溶解于二氯甲烷中并且蒸发至干。标题化合物无需纯化即用于下一反应中。MS m/z 245 (MH⁺)。

[0347] 步骤D

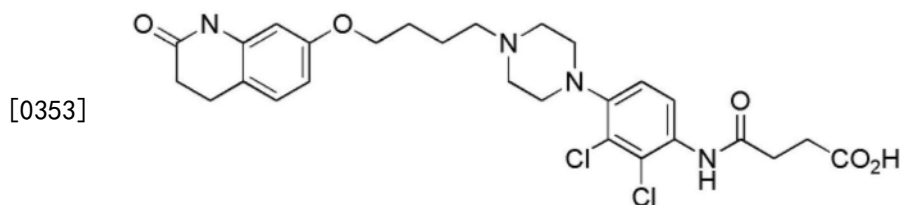
[0348] 7-(4-(4-(4-氨基-2,3-二氯苯基)哌嗪-1-基)丁氧基)-3,4-二氢喹啉-2(1H)-酮



[0350] 向如先前步骤所述制备的作为TFA盐的2,3-二氯-4-(哌嗪-1-基)苯胺(1.535mmol)的DMF(6mL)溶液中添加可商购获得的7-(4-溴代-丁氧基)-3,4-二氢-1H-喹啉-2-酮(1.535mmol)的DMF(1mL)溶液、 K_2CO_3 (2.121g)和1mL的DMF。将所得反应混合物在室温下搅拌过夜。过滤固体并且用二氯甲烷漂洗。在真空中蒸发溶液,并且然后使残余物以梯度0-10%甲醇/二氯甲烷、之后是10%7N氨甲醇/二氯甲烷经受硅胶柱层析,以得到固体状标题化合物。MS m/z 463(MH^+)。 1H NMR: (DMSO- d_6 , 400MHz): δ (ppm) 10.0 (s, 1H), 7.05 (d, 1H), 6.95 (d, 1H), 6.75 (d, 1H), 6.50 (d, 1H), 6.45 (s, 1H), 5.3 (s, 2H), 3.90 (m, 2H), 2.90-2.70 (m, 6H), 2.50-2.30 (m, 8H), 1.80-1.50 (m, 4H)。计算值 $C_{23}H_{28}Cl_2N_4O_2$ 为C, 59.61; H, 6.09; N, 12.09。实测值C, 59.44; H, 5.87; N, 11.77。

[0351] 实例3

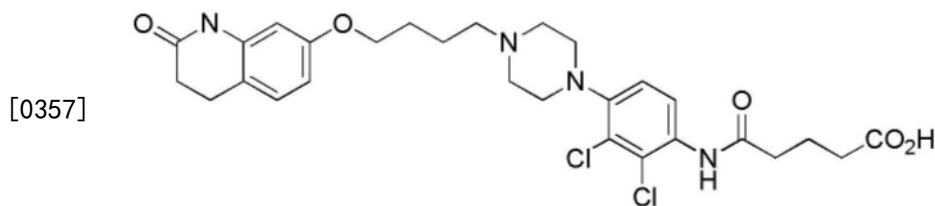
[0352] 4-((2,3-二氯-4-(4-(4-((2-氧代-1,2,3,4-四氢喹啉-7-基)氧基)丁基)哌嗪-1-基)苯基)氨基)-4-氧代丁酸



[0354] 搅拌实例2(115.5mg, 0.25mmol)和琥珀酸酐(50mg, 0.5mmol)的吡啶(1.5mL)溶液,并且在110℃的微波炉中加热5.5小时。在真空中将溶液蒸发至干。将残余物再次溶解于二氯甲烷中并蒸发至干;然后再次溶解于甲醇中并蒸发至干。以梯度0-20%甲醇/二氯甲烷在Agela hilic柱上纯化粗产物以得到固体,该固体通过以甲醇重结晶进一步纯化,并且在40-50℃的真空炉中干燥以得到标题化合物。MS m/z 563(MH^+)。 1H NMR: (DMSO- d_6 , 400MHz): δ (ppm) 12.1 (s, 1H), 10.0 (s, 1H), 9.60 (s, 1H), 7.5 (d, 1H), 7.15 (d, 1H), 7.05 (d, 1H), 6.50 (d, 1H), 6.45 (s, 1H), 3.90 (m, 2H), 3.00 (m, 4H), 2.30 (m, 2H), 2.20-2.30 (m, 12H), 1.80-1.55 (m, 4H)。计算值 $C_{27}H_{33}Cl_2N_4O_5$ 为C, 57.55; H, 5.72; N, 9.94。实测值C, 55.92; H, 5.85; N, 9.58。

[0355] 实例4

[0356] 5-((2,3-二氯-4-(4-(4-((2-氧代-1,2,3,4-四氢喹啉-7-基)氧基)丁基)哌嗪-1-基)苯基)氨基)-5-氧代戊酸



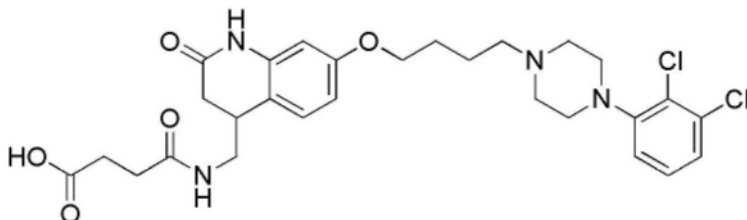
[0358] 搅拌实例2(83mg, 0.18mmol)和戊二酸酐(41mg, 0.36mmol)的吡啶(1.0mL)溶液并且在110℃的微波炉中加热4.5小时。在真空中将溶液蒸发至干。以梯度0-30%甲醇在Agela

hilic柱(12g)上纯化残余物并且在40-50℃的真空炉中干燥以得到标题化合物。MS m/z 578 (M^+)。

[0359] 实例5

[0360] 4-(((7-(4-(4-(2,3-二氯苯基)哌嗪-1-基)丁氧基)-2-氧代-1,2,3,4-四氢喹啉-4-基)甲基)氨基)-4-氧代丁酸

[0361]

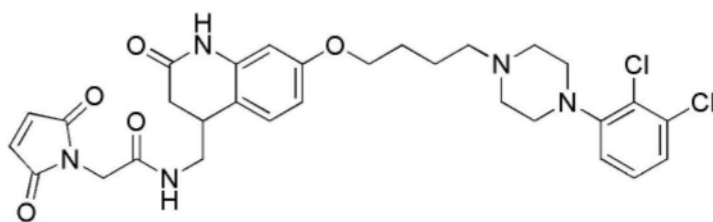


[0362] 将实例1(24.1mg,0.05mmol)和琥珀酸酐(10mg,0.10mmol)的THF(1.0mL)溶液在室温下搅拌过夜。在真空将溶液蒸发至干。以梯度0-30%甲醇/二氯甲烷在硅胶柱(12g)上纯化残余物并且在40-50℃的真空炉中干燥以得到标题化合物。MS m/z 578 (M^+)。

[0363] 实例6

[0364] N-(((7-(4-(4-(2,3-二氯苯基)哌嗪-1-基)丁氧基)-2-氧代-1,2,3,4-四氢喹啉-4-基)甲基)-2-(2,5-二氧化代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙酰胺

[0365]



[0366] 向实例1(分子量477.4,2.2mg,4.61 μ mol)在110 μ L的DMF和2.3 μ L的三丁胺中的溶液中添加116 μ L的N-(α -马来酰亚胺基乙酰氧基)琥珀酰亚胺酯(AMAS,分子量252.2,10mg/mL,1.16mg,4.61 μ mol)的DMF溶液。允许所得溶液在20℃下搅拌90分钟,然后在与硫醇活化的蛋白质的缀合反应中原样使用。

[0367] 实例7

[0368] N-(((7-(4-(4-(2,3-二氯苯基)哌嗪-1-基)丁氧基)-2-氧代-1,2,3,4-四氢喹啉-4-基)甲基)-2-(2,5-二氧化代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙酰胺-钥孔血蓝蛋白缀合物

[0369] 向3.23mL的钥孔血蓝蛋白(KLH分子量100,000,14.6mg,0.146 μ mol)在包含0.46M氯化钠的pH 7.4的100mM磷酸盐缓冲液中的溶液添加33.7 μ L的N-琥珀酰亚胺-S-乙酰基硫代乙酸酯(SATA分子量231.2,25mg/mL,0.84mg,3.65 μ mol)的DMF溶液。将所得溶液在20℃在滚筒混合机上温育1小时。使用包含0.46M氯化钠,5mM EDTA的pH 6.0的100mM磷酸盐缓冲液,通过Sephadex G-25柱纯化该反应。向6.46mL的KLH-SATA溶液(13.7mg,0.137 μ mol)添加646 μ L的pH 7.0的2.5M羟胺和50mM EDTA。将所得溶液在20℃在滚筒混合机上温育1小时。用169.6 μ L的N-(((7-(4-(4-(2,3-二氯苯基)哌嗪-1-基)丁氧基)-2-氧代-1,2,3,4-四氢喹啉-4-基)甲基)-2-(2,5-二氧化代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙酰胺溶液(如实例6中所述制备)(3.43 μ mol)处理反应。将所得浑浊混合物在20℃在滚筒混合机上温育2小时。通过0.2 μ m注射过滤器过滤该反应,然后使用pH 7.4的100mM磷酸盐缓冲液和0.46M氯化钠,通过Sephadex G-25柱纯化以得到实例6的KLH缀合物。

[0370] 实例8

[0371] N-((7-(4-(4-(2,3-二氯苯基)哌嗪-1-基)丁氧基)-2-氧代-1,2,3,4-四氢喹啉-4-基)甲基)-2-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙酰胺-牛甲状腺球蛋白缀合物

[0372] 向2.14mL的牛甲状腺球蛋白(BTG,分子量660,000,21.8mg,0.033 μ mol)在pH 7.5的100mM磷酸盐缓冲液中的溶液中添加61.1 μ L的N-琥珀酰亚胺-S-乙酰基硫代乙酸酯(SATA,分子量231.2,25mg/mL,1.53mg,6.6 μ mol)的DMF溶液。将所得溶液在20℃在滚筒混合机上温育1小时。使用包含5mM EDTA的pH 6.0的100mM磷酸盐缓冲液,通过Sephadex G-25柱纯化该反应。

[0373] 向5.79mL的BTG-SATA溶液(20.5mg,0.031 μ mol)中添加579 μ L的pH 7.0的2.5M羟胺和50mM EDTA。将所得溶液在20℃在滚筒混合机上温育1小时。用304.0 μ L的N-((7-(4-(4-(2,3-二氯苯基)哌嗪-1-基)丁氧基)-2-氧代-1,2,3,4-四氢喹啉-4-基)甲基)-2-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙酰胺溶液(如实例6中所述制备)(6.2 μ mol)处理反应。将所得浑浊混合物在20℃在滚筒混合机上温育2小时。通过0.45 μ m注射过滤器过滤该反应,然后使用pH 7.4的100mM磷酸盐缓冲液和0.14M氯化钠,通过Sephadex G-25柱纯化以得到实例6的牛甲状腺球蛋白缀合物。

[0374] 实例9

[0375] N-((7-(4-(4-(2,3-二氯苯基)哌嗪-1-基)丁氧基)-2-氧代-1,2,3,4-四氢喹啉-4-基)甲基)-2-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙酰胺-卵清蛋白缀合物

[0376] 步骤A

[0377] 向1.0mL的卵清蛋白(分子量44,300,10.0mg,0.23 μ mol)在pH 7.5的100mM磷酸盐缓冲液中的溶液中添加31.3 μ L的N-琥珀酰亚胺-S-乙酰基硫代乙酸酯(SATA,分子量231.2,25mg/mL,0.78mg,3.4 μ mol)的DMF溶液。将所得溶液在20℃在滚筒混合机上温育1小时。用100 μ L的pH 7.0的2.5M羟胺和50mM EDTA处理反应。将所得溶液在20℃在滚筒混合机上温育15分钟。使用pH 6.0的100mM磷酸盐缓冲液和5mM EDTA,在Sephadex G-25柱上纯化该反应。

[0378] 步骤B

[0379] 向如步骤A中所述制备的卵清蛋白-SH(3.1mL,8.3mg,0.1mol)中添加N-((7-(4-(4-(2,3-二氯苯基)哌嗪-1-基)丁氧基)-2-氧代-1,2,3,4-四氢喹啉-4-基)甲基)-2-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙酰胺溶液(如实例6中所述制备)(185.7 μ L,3.75 μ mol)。将所得浑浊混合物在20℃在滚筒混合机上温育2.5小时。通过0.45 μ m注射过滤器过滤该反应,然后使用pH 7.4的包含0.14M氯化钠的100mM磷酸盐缓冲液,在Sephadex G-25柱上纯化以得到实例6的卵清蛋白缀合物。

[0380] 实例10

[0381] 用于阿立哌唑的竞争性免疫测定和用于阿立哌唑、奥氮平、喹硫平和利培酮的多重竞争性免疫测定

[0382] 在用上述具有式II(化合物6)的免疫原进行的一系列免疫后,使用ELISA测试小鼠尾部血液的反应性。还测试了杂交瘤上清液,并且下表8中示出的ELISA数据显示了若干杂交瘤的反应性(融合配偶体为NS0细胞)。

[0383] 表8

[0384]

	平板1				
稀释度	1	2	3	4	5
400	3C1	3D7	5C6	5C7	5H11
400					
1200					
1200					
3600					
3600					
10800					
10800					
400	0.8165	0.7299	0.196	3.2953	0.0373
400	0.7057	0.5671	0.1525	2.9591	0.0371
1200	0.2413	0.2186	0.0701	1.9242	0.0348
1200	0.2474	0.2278	0.0653	1.7829	0.0336
3600	0.102	0.0963	0.0472	0.739	0.0288
3600	0.099	0.0954	0.051	0.7225	0.0281
10800	0.0534	0.0526	0.0381	0.2878	0.0215
10800	0.0644	0.0588	0.0411	0.2799	0.0326

[0385] 然后通过竞争性ELISA测试上清液以确定信号是否特定于阿立哌唑或脱氢阿立哌唑。图1和2示出了两个代表性杂交瘤3C1和3D7的结果。数据示出了对阿立哌唑和脱氢阿立哌唑两者的反应性。

[0386] 图3示出了在侧流测定装置上使用的竞争性免疫测定格式,其中捕获抗体,即阿立哌唑克隆5C7连同由阿立哌唑缀合至荧光团组成的检测缀合物被沉积于芯片上。在如图3所示的这种竞争格式中,低水平的分析物(阿立哌唑)产生高信号,而高水平的分析物(阿立哌唑)产生低信号。

[0387] 图4示出了根据主题发明的一个实施例的侧流测定装置的芯片设计。该装置包括用于接收样品的区或区域、缀合区(包含期望的标记的竞争性结合配偶体)和反应区(显示了反应区内八个区域;每个区域可包含独立的期望的抗体)。样品从样品区流经缀合区并且流至反应区。

[0388] 图5-8示出了用沉积在反应区2中的抗体5C7和缀合区中的标记阿立哌唑竞争性结合配偶体生成的针对阿立哌唑阳性对照(包含阿立哌唑的样品)(图5)、由沉积在反应区4中的抗体4G9-1和缀合区中的标记奥氮平竞争性结合配偶体生成的针对奥氮平阳性对照(包含奥氮平的样品)(图6)、由沉积在反应区6中的抗体11和缀合区中的标记喹硫平竞争性结合配偶体生成的针对喹硫平阳性对照(包含喹硫平的样品)(图7)、以及由沉积在反应区8中的抗体5-9和缀合区中的标记利培酮竞争性结合配偶体生成的针对利培酮阳性对照(包含利培酮的样品)(图8)的典型剂量反应曲线。缀合区中的标记竞争性结合配偶体与存在于样品中的药物竞争结合至抗体。检测标记的量并且该量为存在于样品中的药物量的指示(信号的量与样品中药物的量成反比-见图3)。

[0389] 为了确认标记竞争性结合配偶体的缀合物未结合至沉积于反应区中的抗体,使用不包含药物的样品进行阴性对照。参见表9,不包含阿立哌唑的样品沉积在样品区中,并且通过毛细管作用移动通过缀合区(此次包含标记奥氮平、标记喹硫平和标记利培酮,但不包含标记阿立哌唑)并移动至反应区。反应区再次将阿立哌唑抗体(5C7)包含在反应区2中。下表9示出了结果,确认不存在剂量反应并且通过毛细管作用移动通过反应区的奥氮平、喹硫

平和利培酮缀合物未结合至阿立哌唑抗体。

[0390] 表9

阿立哌唑-克隆5C7-数学模型1 (0ng/mL浓度)						
测定-数学模型	缀合物	反应区	读取位置	峰平均面积	峰平均高度	平均背景
阿立哌唑-数学模型1	奥氮平、喹硫平、利培酮	阿立哌唑	2	0.77	1.56	3.99
阿立哌唑-数学模型1	奥氮平、喹硫平、利培酮		4	-0.02	0.06	4.14
阿立哌唑-数学模型1	奥氮平、喹硫平、利培酮		6	0.09	0.10	4.29
阿立哌唑-数学模型1	奥氮平、喹硫平、利培酮		8	0.13	0.12	4.61
其它缀合物未结合至阿立哌唑						

[0392] 参见表10,不包含奥氮平的样品沉积在样品区中并且通过毛细管作用移动通过缀合区(此次包含标记阿立哌唑、标记喹硫平和标记利培酮,但不包含标记奥氮平)并移动至反应区。反应区再次将奥氮平抗体(4G9-1)包含在反应区4中。下表10示出了结果,确认不存在剂量反应并且通过毛细管作用移动通过反应区的阿立哌唑、喹硫平和利培酮缀合物未结合至奥氮平抗体。

[0393] 表10

奥氮平-克隆4G9-1-数学模型1 (0ng/mL浓度)						
测定-数学模型	缀合物	反应区	读取位置	峰平均面积	峰平均高度	平均背景
奥氮平-数学模型1	阿立哌唑、喹硫平、利培酮		2	-0.03	0.05	4.38
奥氮平-数学模型1	阿立哌唑、喹硫平、利培酮	奥氮平	4	0.74	1.10	4.56
奥氮平-数学模型1	阿立哌唑、喹硫平、利培酮		6	0.06	0.09	4.79
奥氮平-数学模型1	阿立哌唑、喹硫平、利培酮		8	0.11	0.13	5.17
其它缀合物未结合至奥氮平						

[0395] 参见表11,不包含喹硫平的样品沉积在样品区中并且通过毛细管作用移动通过缀合区(此次包含标记阿立哌唑、标记奥氮平和标记利培酮,但不包含标记喹硫平)并移动至反应区。反应区再次将喹硫平抗体(11)包含在反应区6中。下表11示出了结果,确认不存在剂量反应并且通过毛细管作用移动通过反应区的阿立哌唑、奥氮平和利培酮缀合物未结合至喹硫平抗体。

[0396] 表11

喹硫平-克隆11-数学模型1 (0ng/mL浓度)						
测定-数学模型	缀合物	反应区	读取位置	峰平均面积	峰平均高度	平均背景
喹硫平-数学模型1	阿立哌唑、奥氮平、利培酮		2	-0.01	0.07	3.85
喹硫平-数学模型1	阿立哌唑、奥氮平、利培酮		4	0.01	0.12	4.01
喹硫平-数学模型1	阿立哌唑、奥氮平、利培酮	喹硫平	6	0.03	0.08	4.24
喹硫平-数学模型1	阿立哌唑、奥氮平、利培酮		8	0.04	0.07	4.56
其它缀合物未结合至喹硫平						

[0398] 参见表12,不包含利培酮的样品沉积在样品区中并且通过毛细管作用移动通过缀合区(此次包含标记阿立哌唑、标记奥氮平和标记喹硫平,但不包含标记利培酮)并移动至反应区。反应区再次将利培酮抗体(5-9)包含在反应区8中。下表12示出了结果,确认不存在剂量反应并且通过毛细管作用移动通过反应区的阿立哌唑、奥氮平和喹硫平缀合物未结合至利培酮抗体。

[0399] 表12

[0400]

利培酮-克隆5-9-数学模型1 (0ng/mL浓度)						
测定-数学模型	缀合物	反应区	读取位置	峰平均面积	峰平均高度	平均背景
利培酮-数学模型1	阿立哌唑, 奥氮平, 喹硫平		2	0.02	0.11	7.43
利培酮-数学模型1	阿立哌唑, 奥氮平, 喹硫平		4	0.05	0.14	7.73
利培酮-数学模型1	阿立哌唑, 奥氮平, 喹硫平		6	0.20	0.19	8.11
利培酮-数学模型1	阿立哌唑, 奥氮平, 喹硫平	利培酮	8	1.97	3.23	8.85
其它缀合物未结合至利培酮						

[0401] 为了确认标记竞争性结合配偶体的缀合物仅结合至它们沉积在反应区中的相应的抗体,再次使用不含药物的样品进行另外的阴性对照。参见表13,不包含阿立哌唑的样品沉积在样品区中并且通过毛细管作用移动通过缀合区(此次包含标记阿立哌唑)并移动至反应区。反应区再次将阿立哌唑抗体(5C7)包含在反应区2中,以及将奥氮平抗体(4G9-1)包含在反应区4中,将喹硫平抗体(11)包含在反应区6中并且将利培酮抗体(5-9)包含在反应区8中。下表13示出了结果,确认不存在除了阿立哌唑抗体5C7(在反应区2中)之外的剂量反应。

[0402] 表13

[0403]

阿立哌唑-克隆5C7-数学模型1 (0ng/mL浓度)						
测定-数学模型	缀合物	反应区	读取位置	峰平均面积	峰平均高度	平均背景
阿立哌唑-数学模型1	阿立哌唑, 奥氮平, 喹硫平, 利培酮	阿立哌唑	2	60.34	97.53	5.44
阿立哌唑-数学模型1	阿立哌唑, 奥氮平, 喹硫平, 利培酮		4	2.86	3.91	11.66
阿立哌唑-数学模型1	阿立哌唑, 奥氮平, 喹硫平, 利培酮		6	1.12	1.23	11.03
阿立哌唑-数学模型1	阿立哌唑, 奥氮平, 喹硫平, 利培酮		8	3.14	4.19	12.94
仅阿立哌唑反应区结合						

[0404] 参见表14,不包含奥氮平的样品沉积在样品区中并且通过毛细管作用移动通过缀合区(此次包含标记奥氮平)并移动至反应区。反应区再次将阿立哌唑抗体(5C7)包含在反应区2中,以及将奥氮平抗体(4G9-1)包含在反应区4中,将喹硫平抗体(11)包含在反应区6中并且将利培酮抗体(5-9)包含在反应区8中。下表14示出了结果,确认不存在除了奥氮平抗体4G9-1(在反应区4中)之外的剂量反应。

[0405] 表14

[0406]

奥氮平-克隆4G9-1-数学模型1 (0ng/mL浓度)						
测定-数学模型	缀合物	反应区	读取位置	峰平均面积	峰平均高度	平均背景
奥氮平-数学模型1	阿立哌唑, 奥氮平, 喹硫平, 利培酮		2	0.02	0.08	4.86
奥氮平-数学模型1	阿立哌唑, 奥氮平, 喹硫平, 利培酮	奥氮平	4	34.23	51.80	5.39
奥氮平-数学模型1	阿立哌唑, 奥氮平, 喹硫平, 利培酮		6	0.22	0.32	5.39
奥氮平-数学模型1	阿立哌唑, 奥氮平, 喹硫平, 利培酮		8	0.15	0.17	5.59
仅奥氮平反应区结合						

[0407] 参见表15,不包含喹硫平的样品沉积在样品区中并且通过毛细管作用移动通过缀合区(此次包含标记喹硫平)并移动至反应区。反应区再次将阿立哌唑抗体(5C7)包含在反应区2中,以及将奥氮平抗体(4G9-1)包含在反应区4中,将喹硫平抗体(11)包含在反应区6中并且将利培酮抗体(5-9)包含在反应区8中。下表15示出了结果,确认不存在除了喹硫平抗体11(在反应区6中)之外的剂量反应。

[0408] 表15

[0409]

噻硫平-克隆11-数学模型1 (0ng/mL浓度)						
测定-数学模型	缀合物	反应区	读取位置	峰平均面积	峰平均高度	平均背景
噻硫平-数学模型1	阿立哌唑、奥氮平、噻硫平、利培酮		2	0.13	0.41	10.02
噻硫平-数学模型1	阿立哌唑、奥氮平、噻硫平、利培酮		4	0.08	0.23	10.47
噻硫平-数学模型1	阿立哌唑、奥氮平、噻硫平、利培酮	噻硫平	6	140.35	181.33	7.91
噻硫平-数学模型1	阿立哌唑、奥氮平、噻硫平、利培酮		8	1.58	2.61	11.53
仅噻硫平反应区结合						

[0410] 参见表16,不包含利培酮的样品沉积在样品区中并且通过毛细管作用移动通过缀合区(此次包含标记利培酮)并移动至反应区。反应区再次将阿立哌唑抗体(5C7)包含在反应区2中,以及将奥氮平抗体(4G9-1)包含在反应区4中,将噻硫平抗体(11)包含在反应区6中并且将利培酮抗体(5-9)包含在反应区8中。下表16示出了结果,确认不存在除了利培酮抗体5-9(在反应区8中)之外的剂量反应。

[0411] 表16

[0412]

利培酮-克隆5-9-数学模型1 (0ng/mL浓度)						
测定-数学模型	缀合物	反应区	读取位置	峰平均面积	峰平均高度	平均背景
利培酮-数学模型1	阿立哌唑、奥氮平、噻硫平、利培酮		2	1.03	1.51	9.07
利培酮-数学模型1	阿立哌唑、奥氮平、噻硫平、利培酮		4	0.65	0.91	9.60
利培酮-数学模型1	阿立哌唑、奥氮平、噻硫平、利培酮		6	2.61	6.39	10.48
利培酮-数学模型1	阿立哌唑、奥氮平、噻硫平、利培酮	利培酮	8	55.98	100.91	11.58
仅利培酮反应区结合						

[0413] 上方示出的结果确认标记竞争性结合配偶体的缀合物在反应区中仅结合至它们相应的抗体。

[0414] 图9-12示出了特异性抗体反应区中的典型剂量反应曲线,和在其它缀合物的存在下每个具体测定的剂量反应低/高浓度的证据。在图9中,包含阿立哌唑的样品沉积在样品区中并且通过毛细管作用移动通过缀合区(此次包含标记阿立哌唑、标记奥氮平、标记噻硫平和标记利培酮)并移动至反应区。反应区再次将阿立哌唑抗体(5C7)包含在反应区2中。如图9所示,仅生成阿立哌唑而没有奥氮平、噻硫平或利培酮的典型剂量反应曲线。

[0415] 在图10中,包含奥氮平的样品沉积在样品区中并且通过毛细管作用移动通过缀合区(此次包含标记阿立哌唑、标记奥氮平、标记噻硫平和标记利培酮)并移动至反应区。反应区再次将奥氮平抗体(4G9-1)包含在反应区4中。如图10所示,仅生成奥氮平而没有阿立哌唑、噻硫平或利培酮的典型剂量反应曲线。

[0416] 在图11中,包含噻硫平的样品沉积在样品区中并且通过毛细管作用移动通过缀合区(此次包含标记阿立哌唑、标记奥氮平、标记噻硫平和标记利培酮)并移动至反应区。反应区再次将噻硫平抗体(11)包含在反应区6中。如图10所示,仅生成噻硫平而没有阿立哌唑、奥氮平或利培酮的典型剂量反应曲线。

[0417] 在图12中,包含利培酮的样品沉积在样品区中并且通过毛细管作用移动通过缀合区(此次包含标记阿立哌唑、标记奥氮平、标记噻硫平和标记利培酮)并移动至反应区。反应区再次将利培酮抗体(5-9)包含在反应区8中。如图12所示,仅生成利培酮而没有阿立哌唑、奥氮平或噻硫平的典型剂量反应曲线。

[0418] 图13-16示出了在其它缀合物和抗体的存在下,每个测定的典型剂量反应曲线。在图13中,包含阿立哌唑的样品沉积在样品区中并且通过毛细管作用移动通过缀合区(再次

包含标记阿立哌唑、标记奥氮平、标记喹硫平和标记利培酮)并移动至反应区。反应区再次将阿立哌唑抗体(5C7)包含在反应区2中,以及将奥氮平抗体(4G9-1)包含在反应区4中,将喹硫平抗体(11)包含在反应区6中并且将利培酮抗体(5-9)包含在反应区8中。生成了阿立哌唑的典型剂量反应曲线,如图13所示。当包含奥氮平的样品在此芯片的样品区中沉积时,生成奥氮平的典型剂量反应曲线,如图14所示。当包含喹硫平的样品在此芯片的样品区中沉积时,生成喹硫平的典型剂量反应曲线,如图15所示。当包含利培酮的样品在此芯片的样品区中沉积时,生成利培酮的典型剂量反应曲线,如图16所示。

[0419] 图17-20示出了作为阳性对照生成的剂量反应曲线(图5-8)与多重格式中生成的剂量反应曲线(图13-16)的比较结果。阿立哌唑的比较结果在图17中示出;奥氮平的比较结果在图18中示出;喹硫平的比较结果在图19中示出;以及利培酮的比较结果在图20中示出。这些图显示出阳性对照曲线与多重曲线类似。

[0420] 这些数据显示,可使用主题发明的侧流测定装置,在一种便携式床旁装置上使用患者的单个样品,来检测多种抗精神病药物。

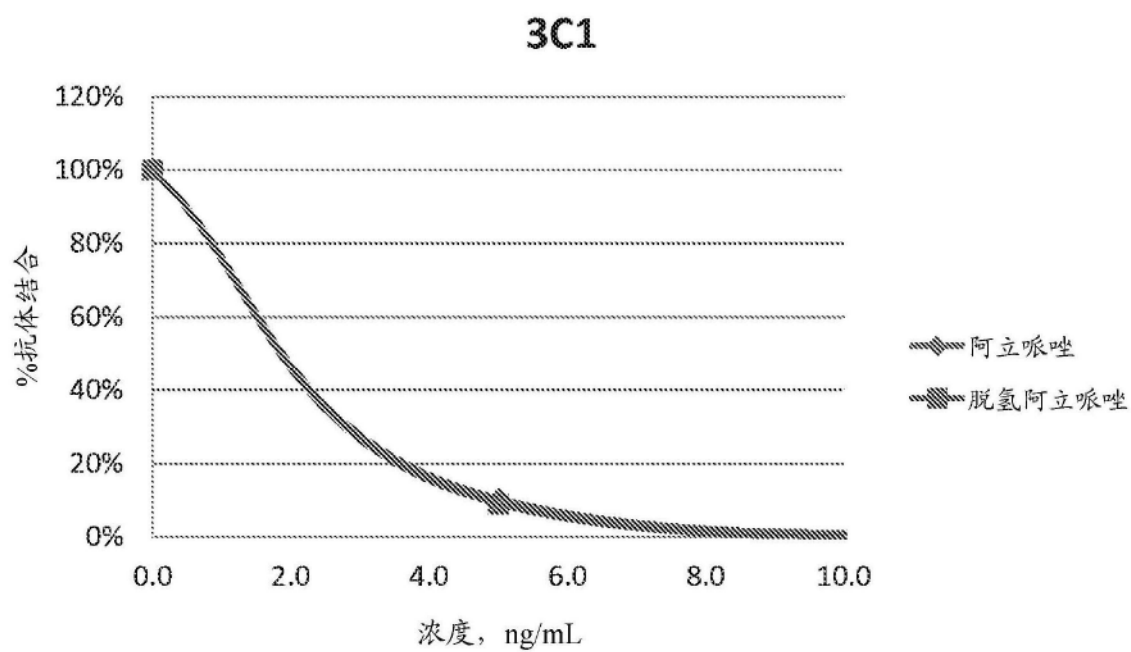


图1

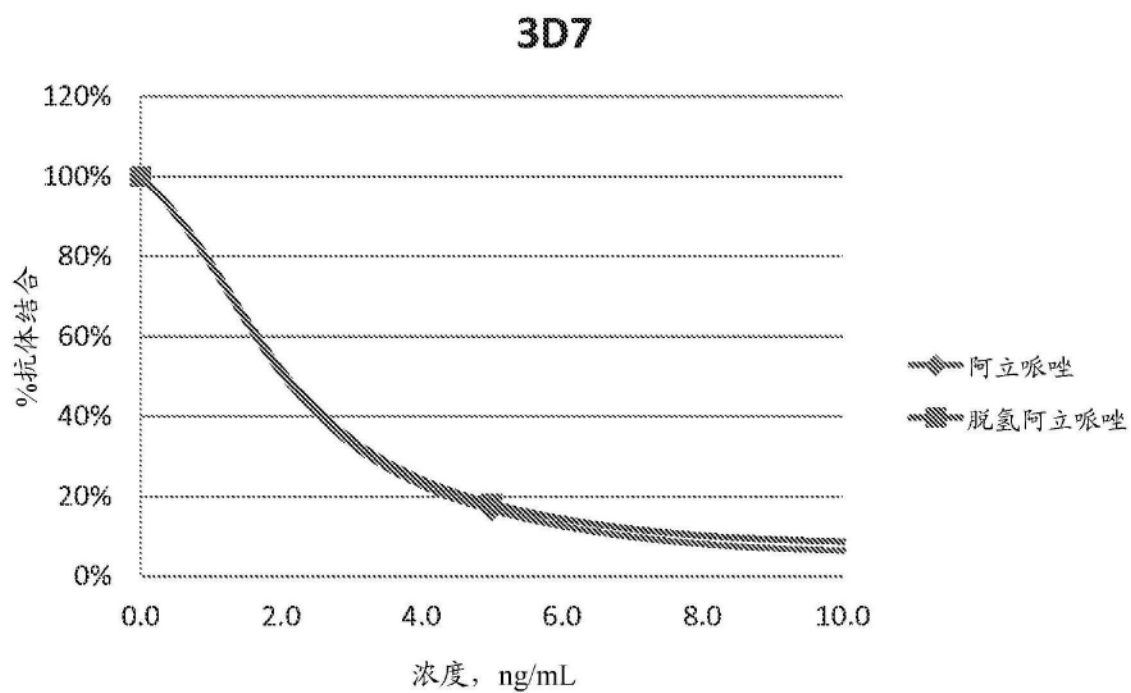


图2

竞争格式：抗体在下

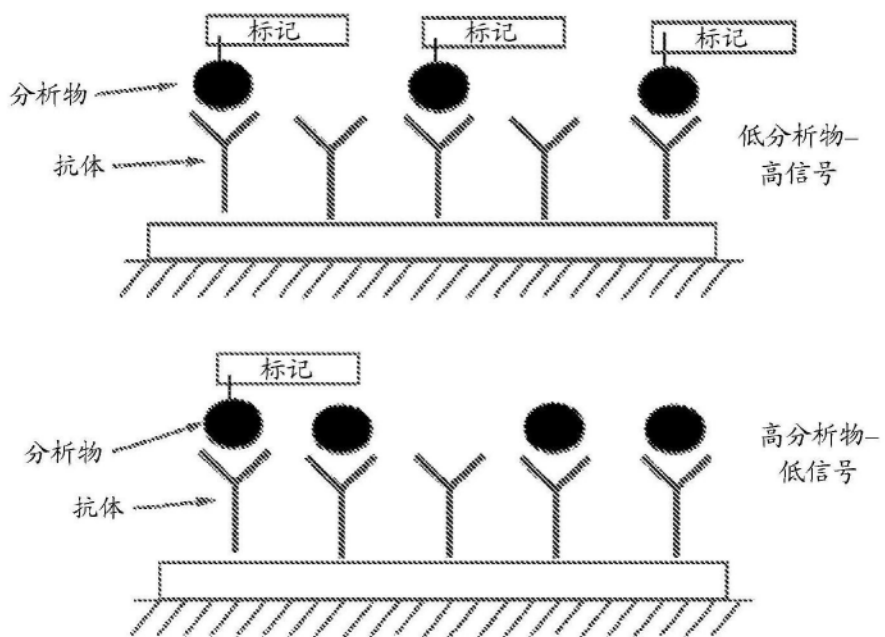


图3

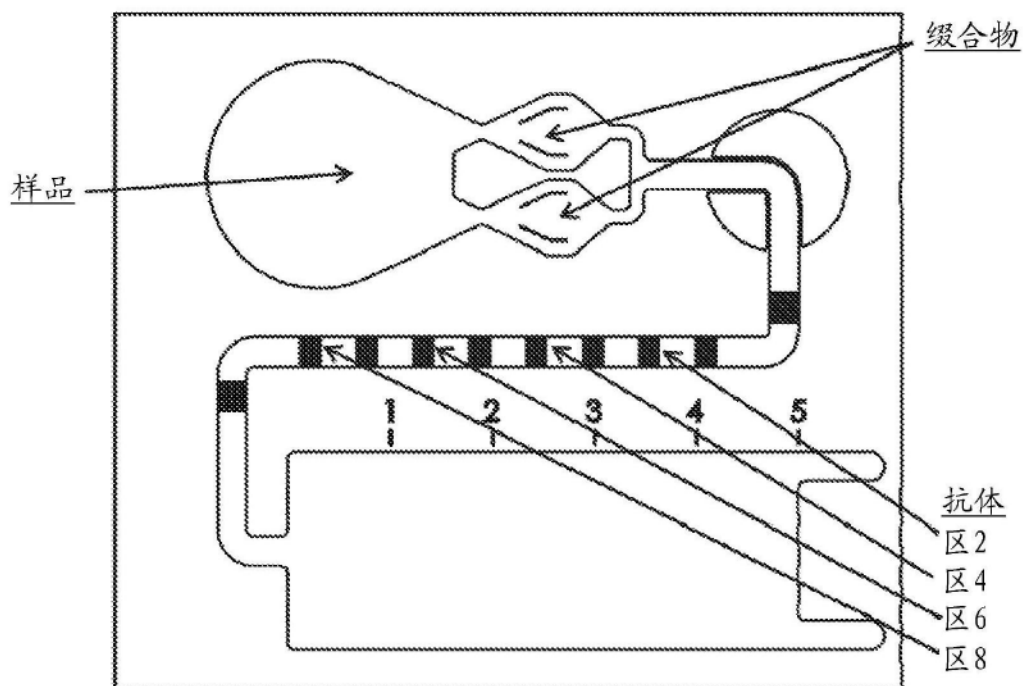


图4

阿立哌唑峰平均面积对浓度
克隆5C7

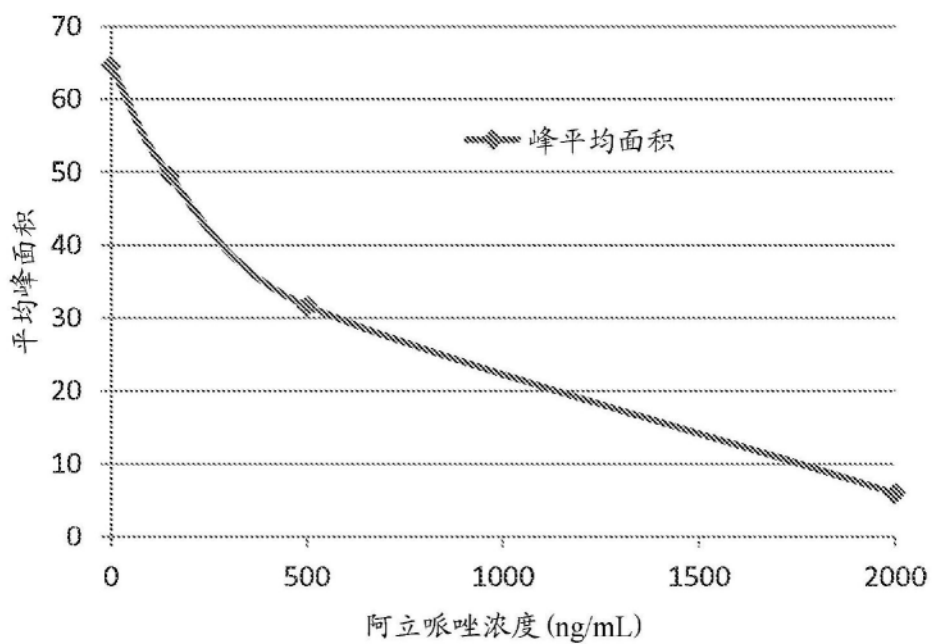


图5

奥氮平峰平均面积对浓度
克隆4G9-1

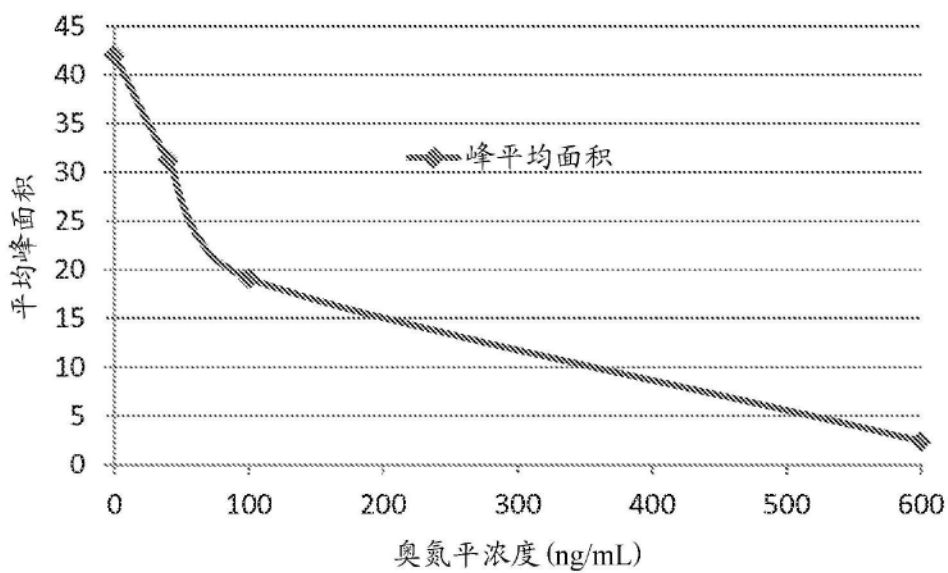


图6

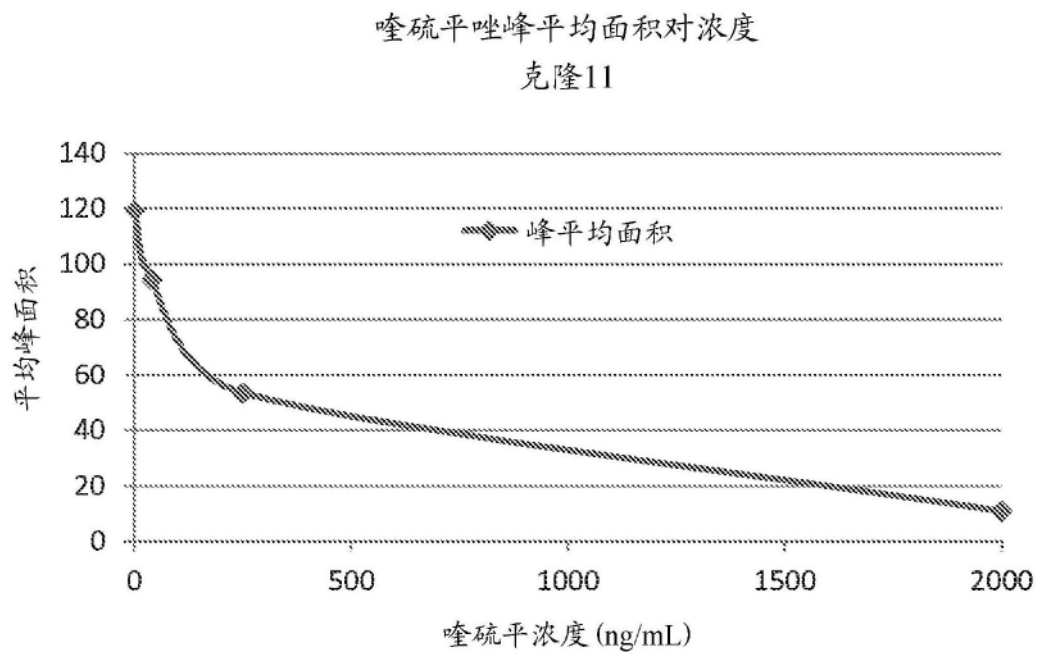


图7

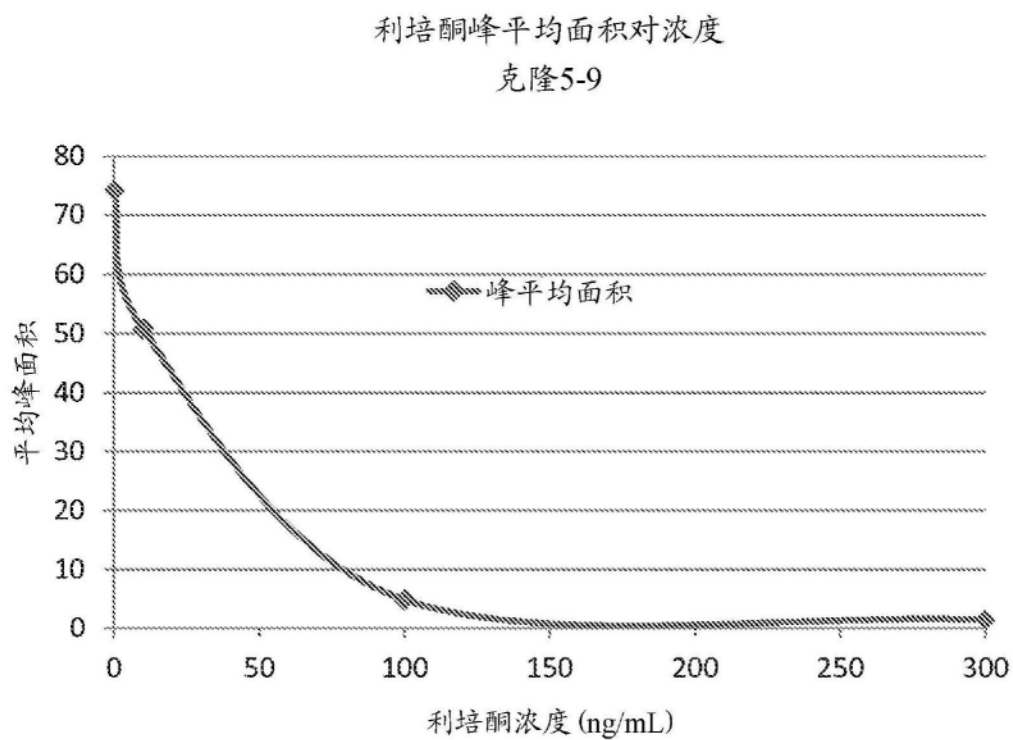
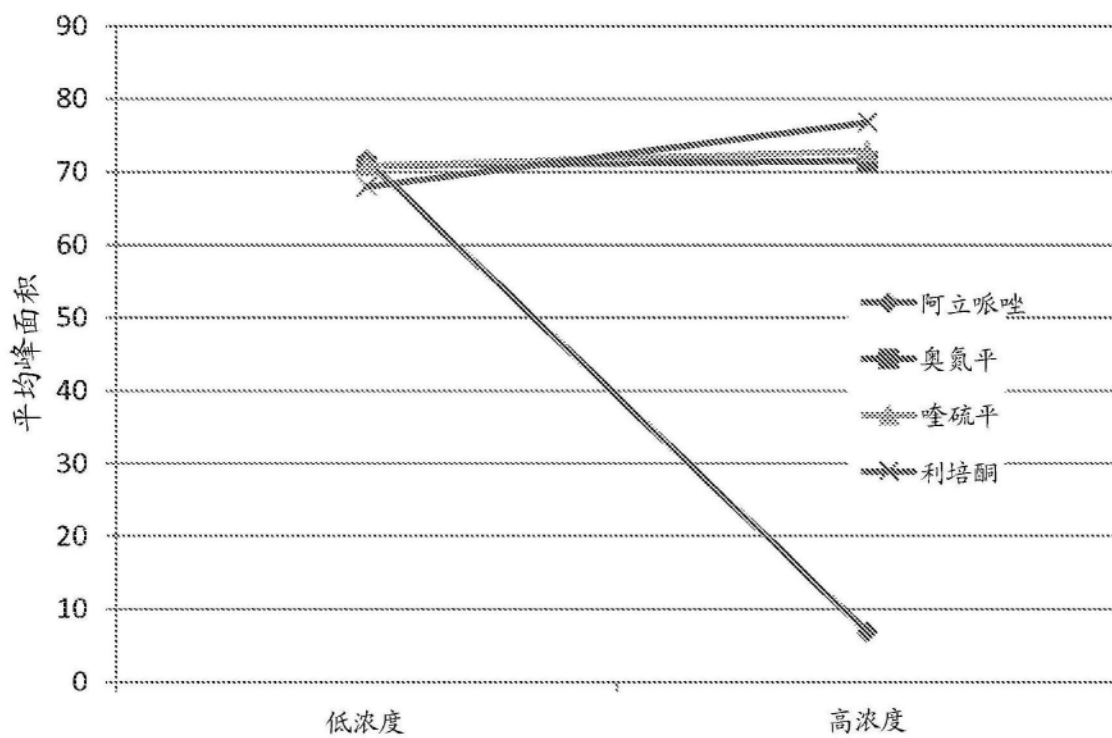


图8

阿立哌唑多重测定：阿立哌唑反应区-缀合区：

阿立哌唑、奥氮平、喹硫平、利培酮



每个测定的低端和高端浓度的流体数学模型

图9

奥氮平多重测定：奥氮平反应区-缀合区：
阿立哌唑、奥氮平、喹硫平、利培酮

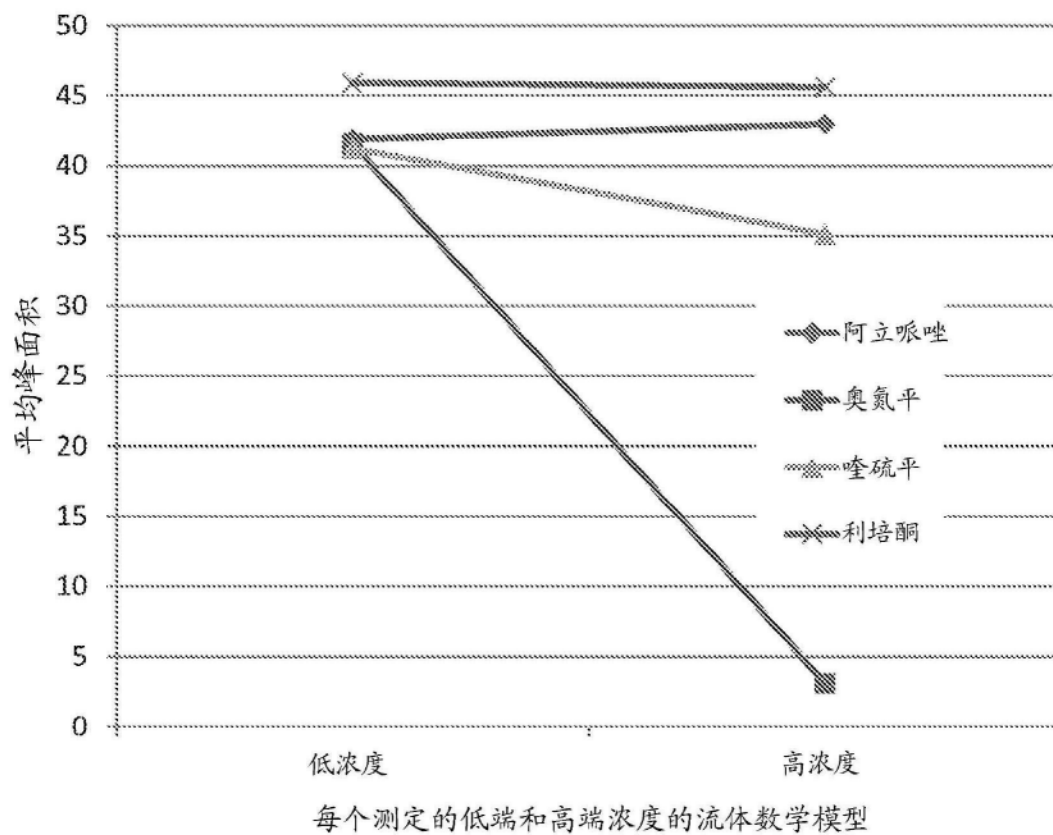


图10

喹硫平多重测定：喹硫平反应区－缀合区：
阿立哌唑、奥氮平、喹硫平、利培酮

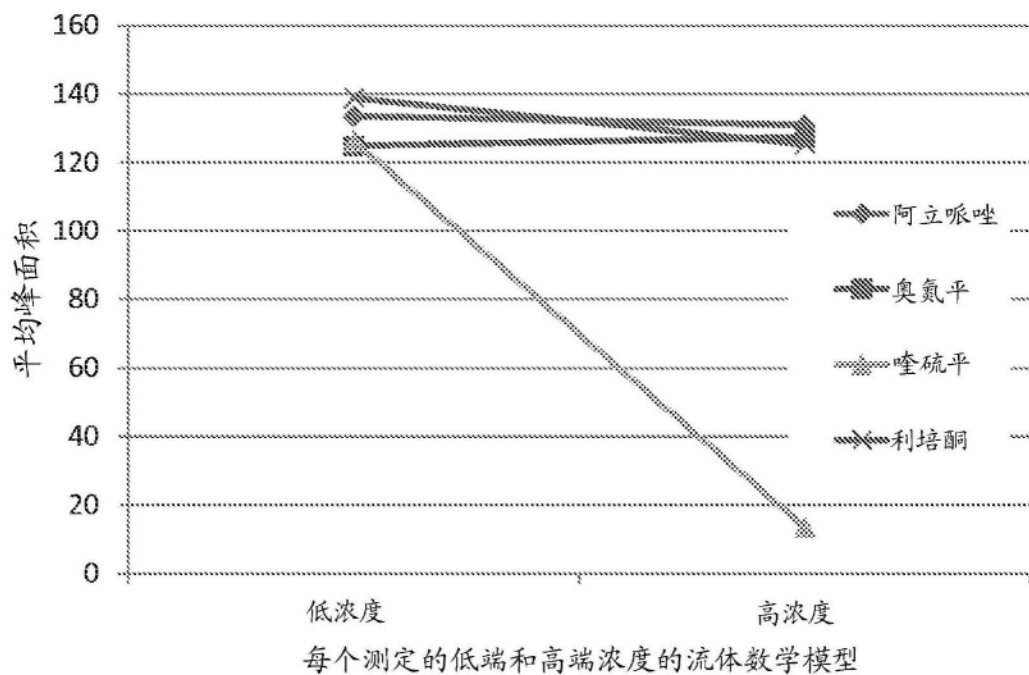


图11

利培酮多重测定：利培酮反应区－缀合区：
阿立哌唑、奥氮平、喹硫平、利培酮

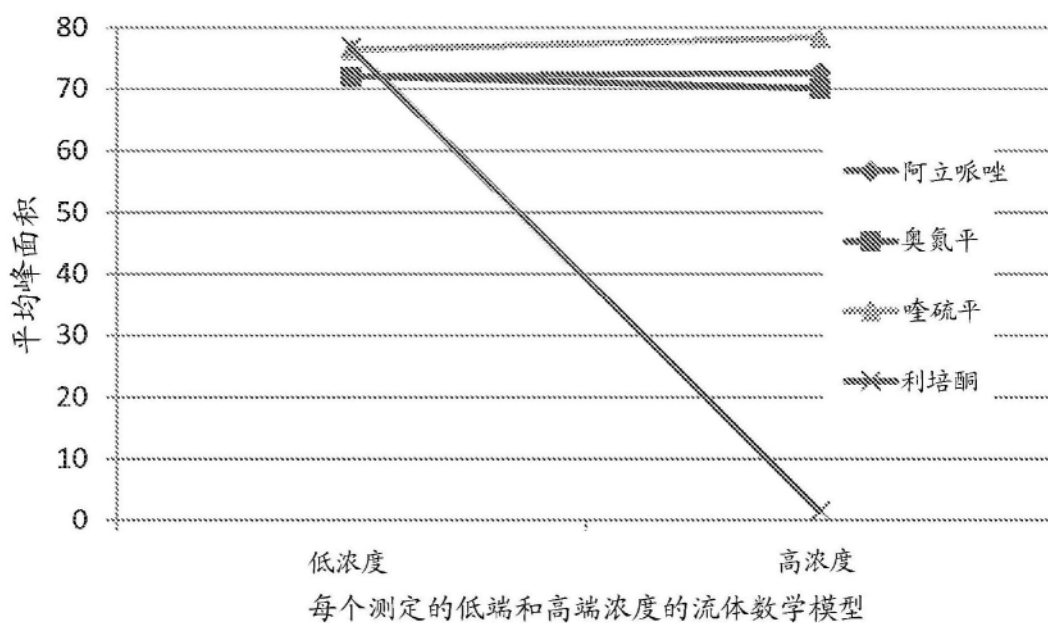


图12

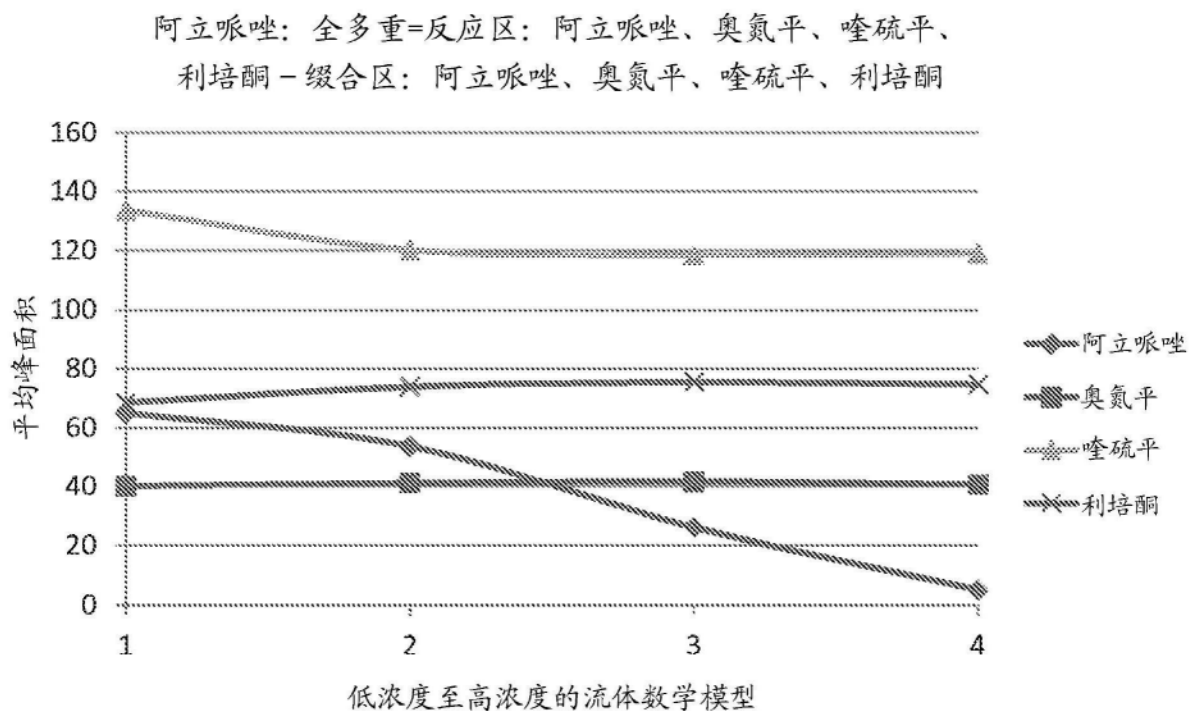


图13

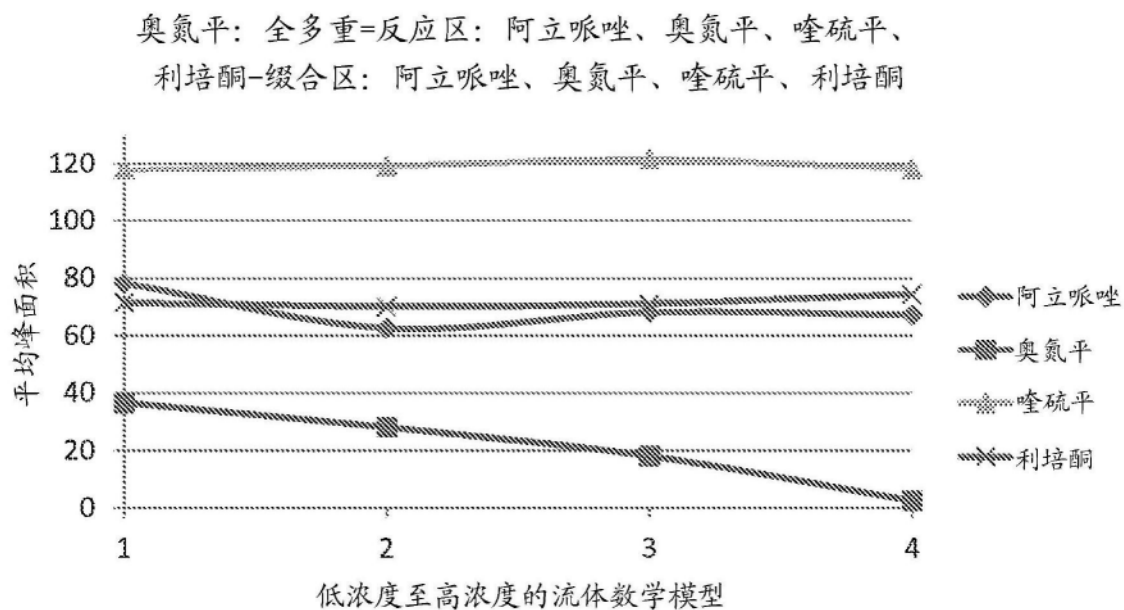


图14

喹硫平：全多重=反应区：阿立哌唑、奥氮平、喹硫平、
利培酮-级合区：阿立哌唑、奥氮平、喹硫平、利培酮

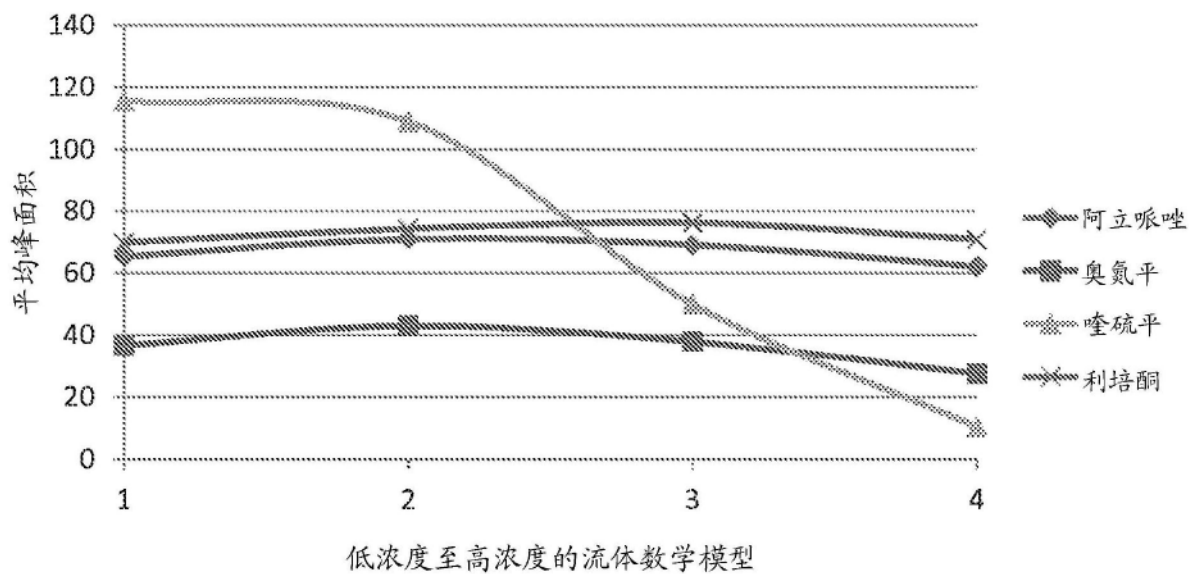


图15

利培酮：全多重=反应区：阿立哌唑、奥氮平、喹硫平、
利培酮-级合区：阿立哌唑、奥氮平、喹硫平、利培酮

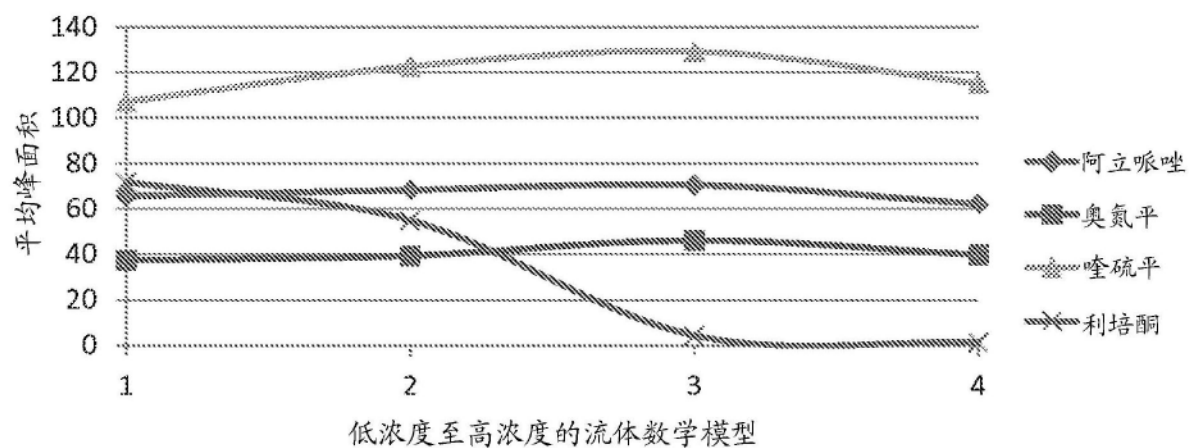


图16

仅阿立哌唑芯片对全多重克隆5C7

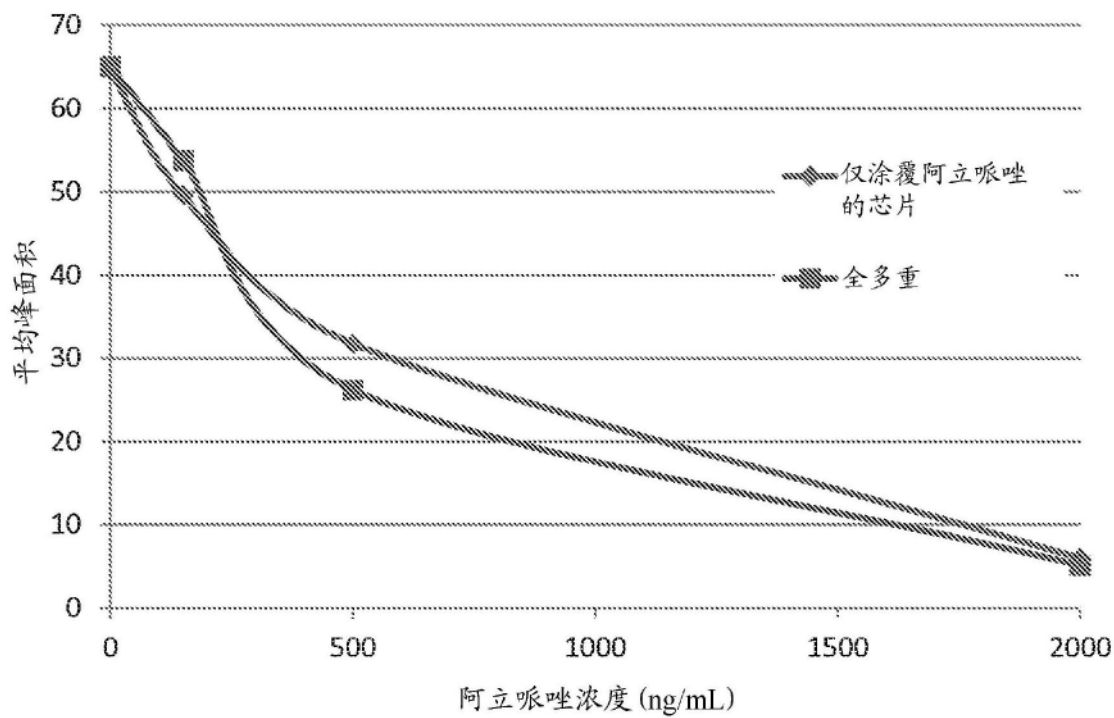


图17

仅奥氮平芯片对全多重4G9-1

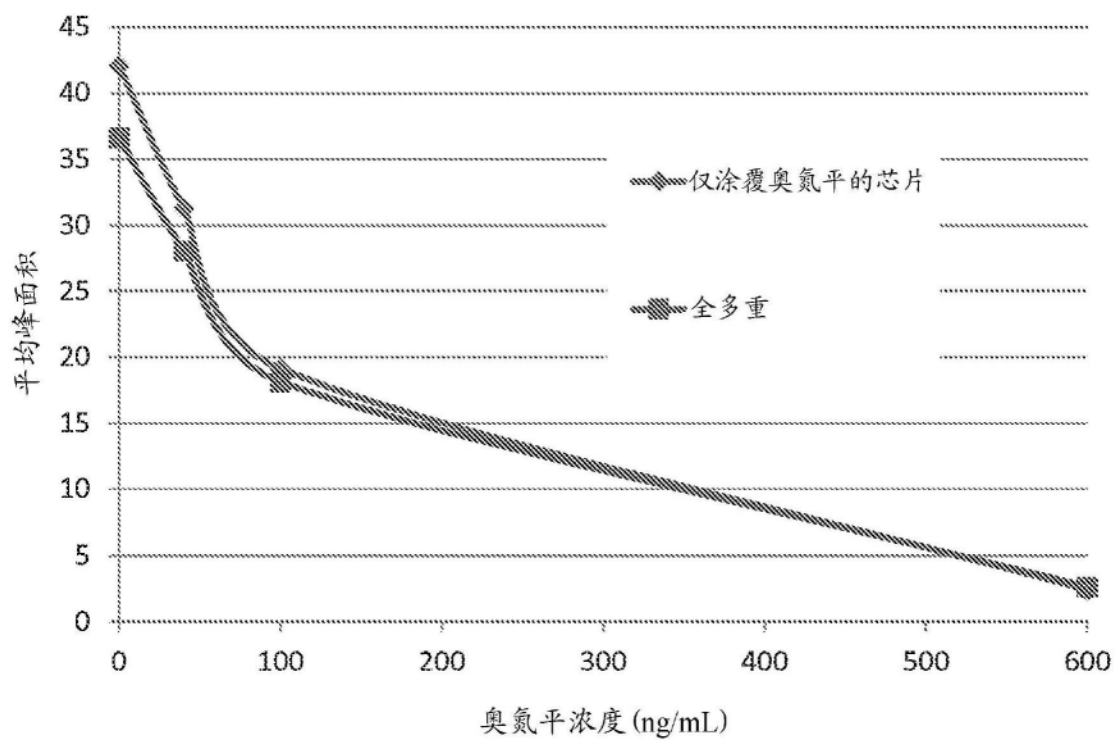


图18

仅喹硫平芯片对全多重克隆11

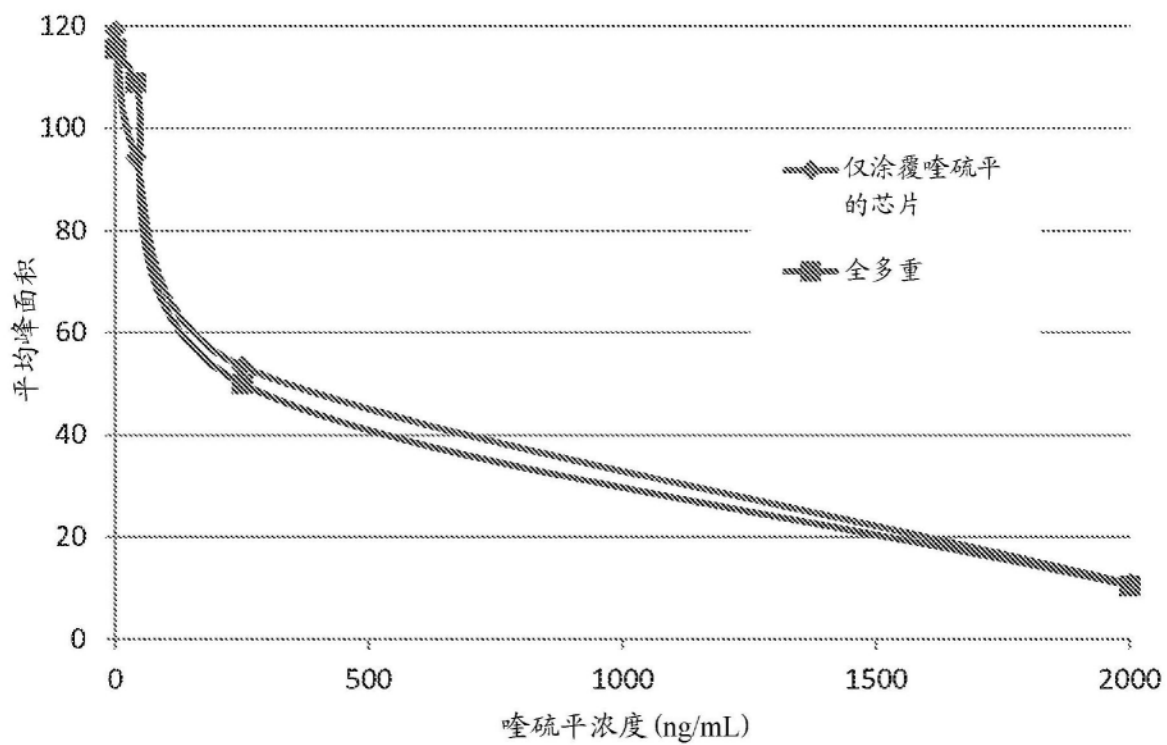


图19

仅利培酮芯片对全多重克隆5-9

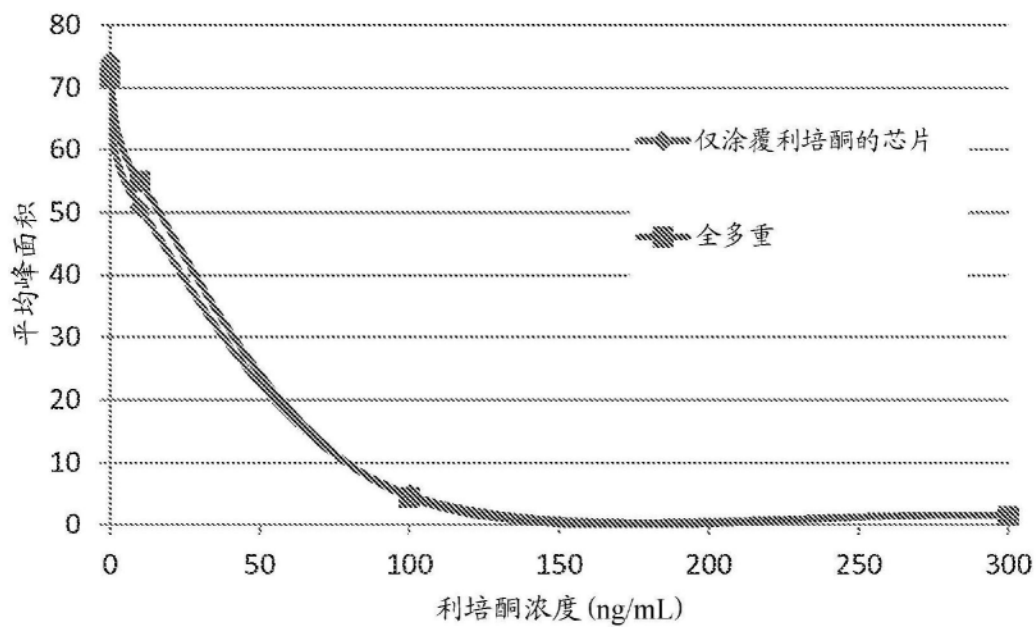


图20