



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101147063 B

(45) 授权公告日 2014.02.12

(21) 申请号 200680009624.3
(22) 申请日 2006.02.02
(30) 优先权数据
11/053,480 2005.02.08 US
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2007.09.24
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2006/003674 2006.02.02
(87) PCT国际申请的公布数据
W02006/086208 EN 2006.08.17
(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·萨拉莫内 J·B·考特尼
D·斯托克
(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002
代理人 林晓红
(51) Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/551 (2006.01)
G01N 37/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 1/10 (2006.01)
C07D 291/06 (2006.01)

(56) 对比文件

TATSURO OUCHI, ET AL..Synthesis of Poly(ethylene Glycols)-Capped with 5-Fluorouracil Units through Ester Bonds and Their Antitumor Activities. 《Journal of polymer science: Part C: Polymer letters》.1987, 第25卷 279 - 285.

孙昌俊,等.5-氟尿嘧啶衍生物的合成及其抗肿瘤活性.《中国药物化学杂志》.1998, 第8卷(第2期),93 - 95.

Toshio nagase, et al..Application of the benzyloxycarbonyloxymethyl moiety to a protective group of 5-fluorouracil. Selective alkylation of amide nitrogen of the uracil ring. 《Chemistry Letters》.1988, 第8卷 1381 - 1384.

Helmu Pischel, et al..Synthesis and biological activity of N-substituted 5-fluorouracil-1-acetamides. 《Collection of czechoslovak chemical communications》.1982, 第47卷(第10期), 2806 - 2813.

审查员 陈宁

权利要求书4页 说明书22页

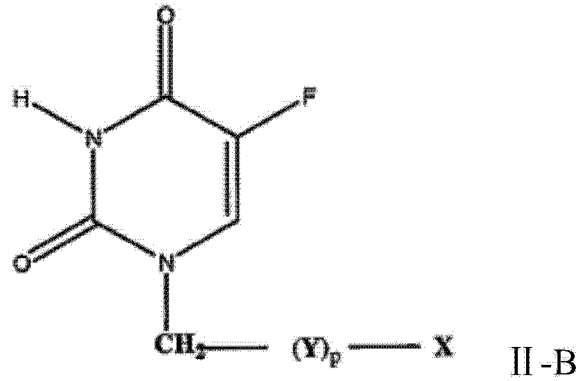
(54) 发明名称

5-氟-尿嘧啶免疫测定

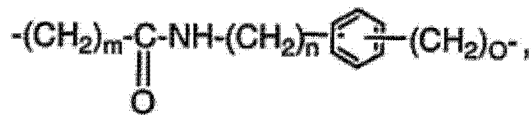
(57) 摘要

新型5-氟-尿嘧啶的缀合物和新型5-氟-尿嘧啶免疫原以及由这些免疫原产生的单克隆抗体,这些免疫原用于定量和监控生物分泌物中5-氟-尿嘧啶的免疫测定。

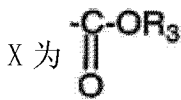
1. 与 5-氟-尿嘧啶选择性反应的抗体和载体与式 II-B 的化合物、或式 II-A 的化合物或者它们的混合物的缀合物在制备用于检测样品中 5-氟-尿嘧啶的免疫测定中所用的组合物中的应用,所述与 5-氟-尿嘧啶选择性反应的抗体相对于具有不超过 12% 的尿嘧啶、胞嘧啶和喃氟啶的 5-氟-尿嘧啶具有交叉反应性,其中使样品中的 5-氟-尿嘧啶和所述缀合物与所述抗体结合以及随后测量在所述混合物中结合或未结合所述抗体的所述缀合物的量,由此可以测定样品中 5-氟-尿嘧啶的存在,



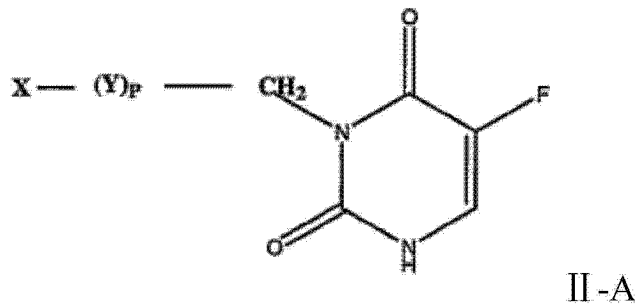
其中, Y 为含有 1-10 个碳原子的亚烷基;或者



其中 n 和 o 为 0-6 的整数, m 为 1-6 的整数;



其中 R₃ 为氢或者与它的附着氧原子一起形成反应性酯;并且 p 为 1;



其中 X、Y 和 p 与上述相同。

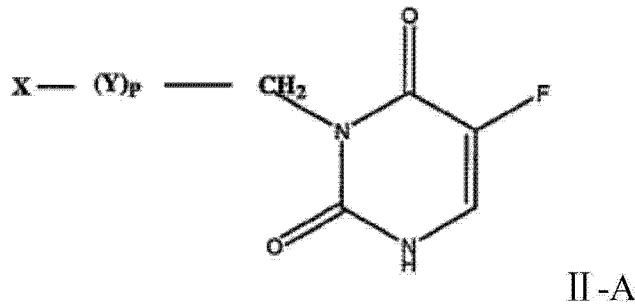
2. 根据权利要求 1 所述的应用,其中 X 为 $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OR}_3$ 并且 R₃ 为氢。

3. 根据权利要求 1 所述的应用,其中 X 为 $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OR}_3$ 并且 R₃ 形成反应性酯。

4. 根据权利要求 3 所述的应用,其中所形成的酯为低级烷基酯、亚氨酸酯或者氨基酯。

5. 根据权利要求 1 所述的应用,其中所述样品为人样品。

6. 根据权利要求 5 所述的应用,其中所述抗体由含有免疫原性载体的免疫原产生,所述免疫原性载体含有与下式化合物缀合的多胺聚合物:



其中 p、X 和 Y 如权利要求 1-4 任一项所限定。

7. 根据权利要求 5 所述的应用,其中所述抗体结合到固体载体上。

8. 根据权利要求 7 所述的应用,其中所述固体载体为微量滴定板。

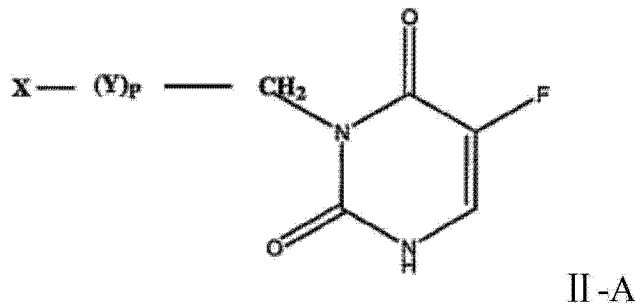
9. 根据权利要求 7 所述的应用,其中所述固体载体为纳米粒子。

10. 一种选择性地结合到 5-氟-尿嘧啶且相对于具有不超过 12% 的尿嘧啶、胞嘧啶和嘧啶的 5-氟-尿嘧啶具有交叉反应性的抗体。

11. 根据权利要求 10 所述的抗体,其中所述抗体为单克隆抗体。

12. 根据权利要求 11 所述的抗体,其中所述抗体衍生自小鼠、兔子或大鼠。

13. 根据权利要求 10 所述的抗体,其中,所述抗体衍生自免疫原性载体,所述免疫原性载体含有缀合到下式化合物的多胺聚合物:

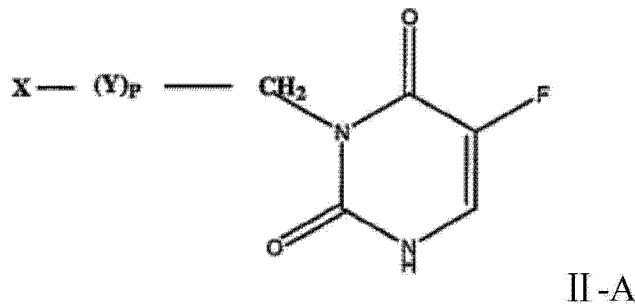


其中 p、X 和 Y 如权利要求 1-4 任一项所限定。

14. 根据权利要求 13 所述的抗体,其中所述抗体为单克隆抗体。

15. 根据权利要求 13 所述的抗体,其中所述抗体衍生自小鼠、兔子或大鼠。

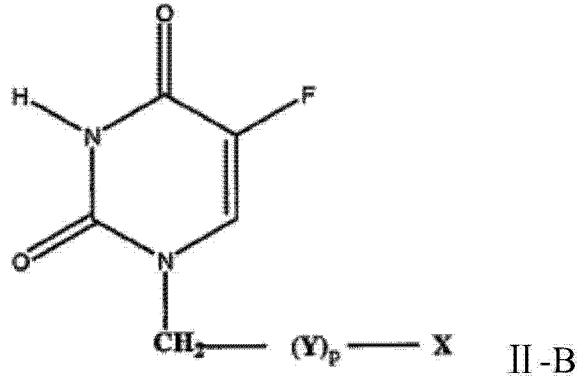
16. 一种载体与下式化合物的缀合物:



其中 p、X 和 Y 如权利要求 1-4 任一项所限定。

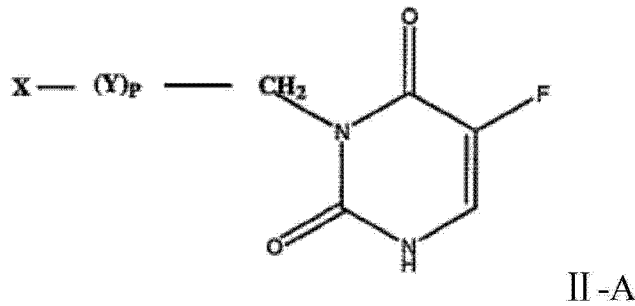
17. 根据权利要求 16 所述的缀合物,其中所述载体含有由 $\begin{matrix} -C- \\ || \\ O \end{matrix}$ 或 $\begin{matrix} -NH-C- \\ || \\ R_4 \end{matrix}$ 连接的一个或多个氨基,其中 R_4 为氧或硫。

18. 一种载体与下式化合物的缀合物:



其中 p、X 和 Y 如权利要求 1-4 任一项所限定。

19. 一种含有免疫原性载体的免疫原,所述免疫原性载体含有连接到下式化合物的多胺聚合物:

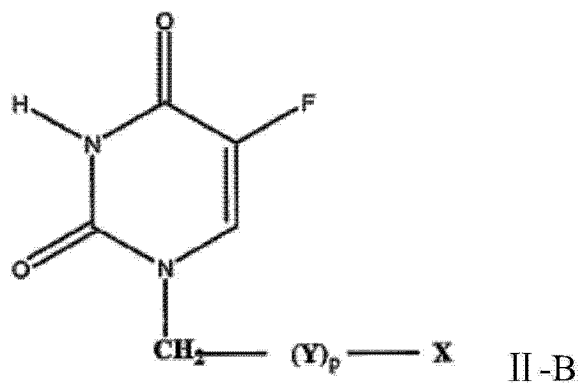


其中 p、X 和 Y 如权利要求 1-4 任一项所限定。

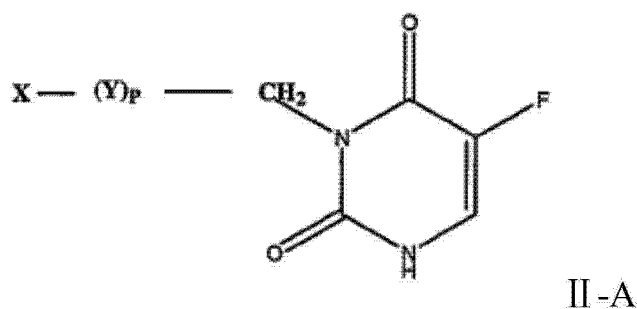
20. 根据权利要求 19 所述的免疫原,其中所述多胺聚合物含有由 $\begin{matrix} -C- \\ || \\ O \end{matrix}$ 或 $\begin{matrix} -NH-C- \\ || \\ R_4 \end{matrix}$ 连接的一个或多个氨基,其中 R_4 为氧或硫。

21. 一种用于测定患者样品中 5- 氟 - 尿嘧啶的存在的试剂盒,该试剂盒包括在分隔的容器中的试剂,试剂中的一种为载体与式 II -B 的化合物、或者 II -A 化合物或者它们的混合物的缀合物;

并且第二容器含有基本上与 5- 氟 - 尿嘧啶选择性反应并且相对于具有不超过 12% 的尿嘧啶、胞嘧啶和喃氟啶的 5- 氟 - 尿嘧啶具有交叉反应性的抗体,



其中 p、X 和 Y 如权利要求 1-4 任一项所限定；

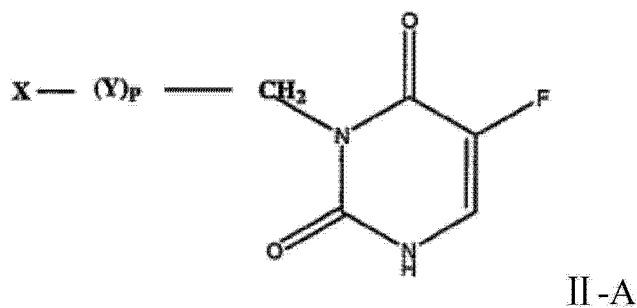


其中 X、Y 和 p 如权利要求 1-4 任一项所限定。

22. 根据权利要求 21 所述的试剂盒,其中所述缀合物在所述第一容器中以预定量存在。

23. 根据权利要求 22 所述的试剂盒,其中所述试剂盒用于测定所述样品中 5-氟-尿嘧啶的量。

24. 根据权利要求 21 所述的试剂盒,其中所述抗体由免疫原性多胺多肽的免疫原产生,所述免疫原性多胺多肽连接到下式的化合物:



其中 p、X 和 Y 如权利要求 1-4 任一项所限定。

5- 氟 - 尿嘧啶免疫测定

技术领域

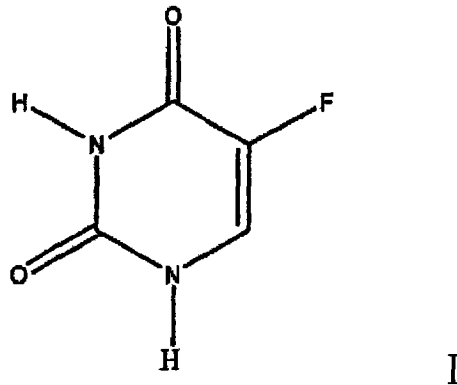
[0001] 本发明涉及用于确定在人的生物学样品中 5- 氟 - 尿嘧啶 (5-FU) 的存在和 / 或定量以便快速确定化学治疗中最佳的药物浓度的免疫学分析领域。

背景技术

[0002] 癌症是用于描述当身体的一部分细胞开始不受控制地生长时,所有具有共同发育特质的一组恶性肿瘤。大多数癌症形成为肿瘤,但也在血液中显现并在它们生长的其它组织循环。癌症恶性肿瘤最通常用外科手术、化疗和 / 或放疗的组合来治疗。用于治疗某种癌症的治疗类型取决于几个因素,包括癌症恶性肿瘤的类型和所诊断的阶段。

[0003] 5-FU 是一种最为常用的用于治疗乳腺癌和结肠直肠癌的细胞毒性剂。该化疗药物具有下式:

[0004]



[0005] 该化合物伴随着使人虚弱的副作用,例如骨髓密度降低、粘膜炎、恶心和呕吐。通过检测人体内 5-FU 的水平并调节剂量,可以更好地控制和限制患者的这些副作用。

[0006] 同时,在 5-FU 的剂量与影响治疗效果的得到的血清药物浓度之间通常有很高的可变关系。5-FU 的个体内和个体间的药代动力学差异性的程度可以为 10 倍 (Diasio 等人 J. Clin. Invest. 81 :pp 47-51,1988, Wei 等人 J. Clin. Invest. 98 :PP610-615,1996),而且受到许多因素的影响,包括:

[0007] ○ 器官功能

[0008] ○ 遗传调节

[0009] ○ 疾病状况

[0010] ○ 年龄

[0011] ○ 药物 - 药物相互作用

[0012] ○ 药物吸收的时间

[0013] ○ 药物给药的方式

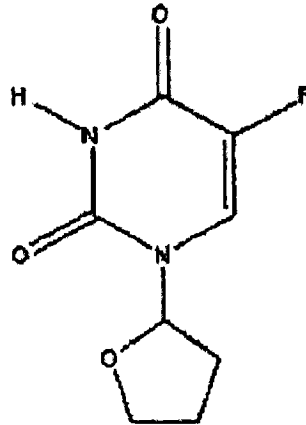
[0014] ○ 有关给药的技术

[0015] 这种差异性的结果是,不同个体中相同药物的相同剂量会产生显著不同的临床效果 (Hon 等人 Clinical Chemistry 44, pp 388-400,1998)。相同的 5-FU 剂量的效力基于

患者个体的药物清除率和最终的血清药物浓度有较大变化。在口服和静脉内给药中,治疗药物处理会给临床医生提供患者差异的判断。使用治疗药物处理,药物剂量可以对患者个别对待,并且有效治疗癌症而没有不需要的副作用的机会更高 (Nieto, Current Drug Metabolism 2 :pp 53-66,2001)。

[0016] 另外,5-FU 的治疗药物处理可以用作优良的工具以确保用准确处方剂量给予化疗的依从性和获得有效的血清浓度水平。已经发现血清浓度的差异性不仅是由于生理因素,而且还能由给药技术和身体吸收 5-FU 的能力的差异产生。作为化疗药物,可以 5-FU 的前体药物形式喃氟啶 (tegafur) 来给药,喃氟啶的结构式为:

[0017]



[0018] 在给患者用药时,患者通常以不同的速度吸收喃氟啶并代谢为 5-FU。因此,以免疫测定的方法监测患者体内 5-FU 的水平时,重要的是免疫测定法可以区分非活性物质喃氟啶和喃氟啶代谢为的活性物质 5-FU。5-FU 的抗体的问题是它们会与喃氟啶交叉反应使这些免疫测定没有用。

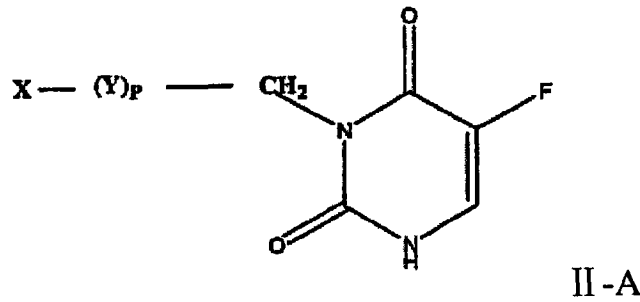
[0019] 5-FU 的日常治疗药物处理需要能适应通常的实验室设备的简单自动化试验的有效性。最好地适合这些标准的试验是免疫测定法。当前,没有可用于 5-FU 免疫测定法,并且监测这种药物的水平是通过如高压液相色谱 (HPLC) 的物理方法来进行的 (Escoriaza 等人 J. of Chromatography B :Biomedical Sciences and applications,736(1+2) :pp 97-102, 1999)。为了最有效地监测药物水平,抗体应该是对 5-FU 最特异的,并对相关的嘧啶碱特别是喃氟啶显示非常低的交叉反应性至无交叉反应性。

[0020] 发明简述

[0021] 根据本发明,产生了一种新类型的抗体,该抗体对 5-FU 基本上为选择反应性,以便与 5-FU 结合而与喃氟啶以及其它干扰的嘧啶碱、尿嘧啶和胞嘧啶没有任何实质上的交叉反应性。选择反应性是指该抗体与 5-FU 分子反应,并且基本上与其它干扰的嘧啶碱如 5-FU 的类似物最重要的阻断嘧啶碱喃氟啶不反应。通过提供与喃氟啶基本上不交叉反应的抗体,提供对 5-FU 的免疫测定,该免疫测定可以精确地监控用 5-FU 治疗的患者的治疗处理的 5-FU 的水平。

[0022] 已经发现通过使用为免疫原性多胺聚合物和下式的化合物的缀合物的免疫原来产生特异于 5-FU 并且与喃氟啶以及其它嘧啶碱如尿嘧啶和胞嘧啶基本上不反应或者不结合的抗体:

[0023]



[0024] 其中, Y 为有机间隔基团;

[0025] X 为能结合多胺聚合物的末端官能团; 并且

[0026] p 为 0-1 的整数。

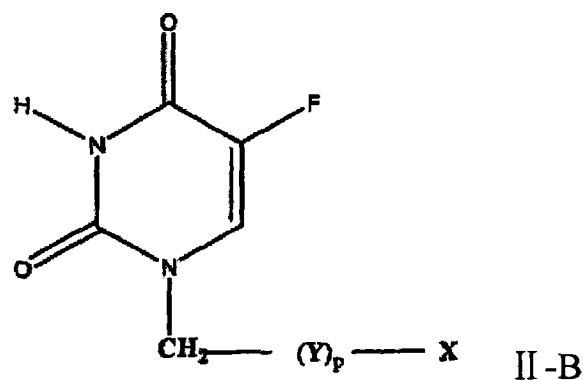
[0027] 提供这些基本上与 5-FU 选择性反应并且与喃氟啉不交叉反应的抗体可以进行能够特别检测并监控用 5-FU 治疗的患者液体样品中 5-FU 的免疫测定。本发明还包括用于所述免疫测定的试剂和试剂盒。喃氟啉的存在是假阳性读数的主要原因, 其使得对 5-FU 的免疫测定是不适合的。

[0028] 发明详述

[0029] 根据本发明, 提供了一种新类型的抗体, 该抗体基本上与 5-FU 选择性反应, 并且与喃氟啉以及其它干扰嘧啶碱如尿嘧啶和胞嘧啶基本上不反应或不交叉反应。已经发现, 通过使用式 II-A 的 3- 取代的 5-FU 衍生物作为免疫原, 提供了本发明的这种新类型的抗体。通过使用这些抗体, 已经开发了一种免疫测定, 其包括用于这种免疫测定用来检测和 / 或定量血液、血浆和其它体液样品中的 5-FU 的试剂和试剂盒。通过使用这种免疫测定, 可以检测和 / 或定量在体液样品中优选在血液或血浆样品中 5-FU 的存在以及含量。采用此方式, 用 5-FU 治疗的患者在治疗时可以被监控并根据所述监控来调节他的治疗。通过本发明的方式, 实现了在用 5-FU 作为化疗药物治疗的癌症患者中 5-FU 的治疗药物处理。

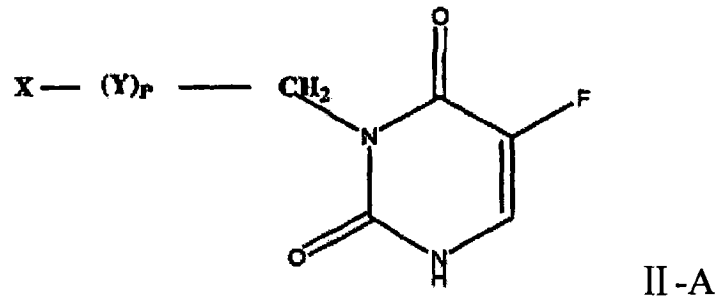
[0030] 用于本发明免疫测定的试剂是载体和具有式 II-B 的 1- 取代的 5-FU 化合物、式 II-A 化合物或它们的混合物的缀合物:

[0031]



[0032] 其中 p、X 和 Y 与上述相同;

[0033]



[0034] 其中, Y 为有机间隔基团;

[0035] X 为能结合多胺聚合物的末端官能团; 并且

[0036] p 为 0-1 的整数。

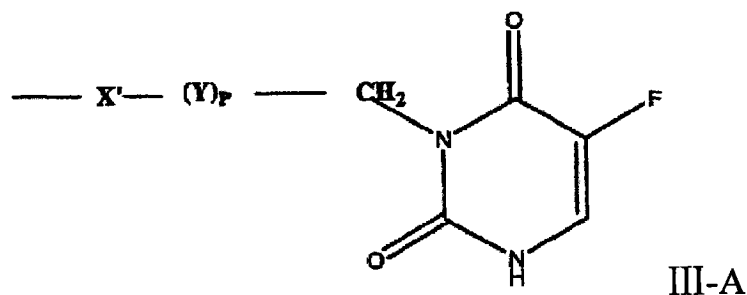
[0037] 在式 II-A 和 II-B 的试剂中, 载体可以为用于实施免疫测定的任何常规的试剂载体, 优选这些载体为检测标记的。在用于形成用于分析的试剂的式 II-A 的化合物中, X 可以为能结合载体的任何官能团。优选的载体含有具有反应性氨基的聚合的多胺聚合物, 且 X 为能结合多胺聚合物的末端官能团。

[0038] 在本发明的免疫测定中, 这些缀合物为结合本发明抗体的、样品中存在的 5-FU 的竞争结合配偶体。因此, 结合抗体的缀合物试剂的量将与样品中 5-FU 的量成反比。根据本发明, 该分析使用用于检测和测量结合或未结合抗体的所述缀合物的量的任何常规的测量手段。

[0039] 通过使用所述手段, 可以确定结合或未结合的缀合物的量。通常地, 通过将所测量的样品中 5-FU 产生的结合或未结合的缀合物的量与从含有已知量的 5-FU 标准或校准曲线样品确定的结合或未结合的缀合物的量进行关联来确定在样品中 5-FU 的量, 所述 5-FU 的已知量在被测样品所期望的范围内。使用相同的用于该样品的免疫测定过程来确定产生校准曲线的这些研究。

[0040] 缀合物是由式 II-A 和式 II-B 的化合物制备的, 而免疫原是由式 II-A 的化合物制备的。在进行本发明的免疫测定中, 由式 II-A 或式 II-B 的化合物形成的缀合物和由式 II-A 的化合物形成的免疫原是很重要的。在包括免疫原的缀合物中, 在具有下式 III-B 的式 II-B 的化合物的配体部分上, 多胺聚合物与具有下式 III-A 的配体部分缀合:

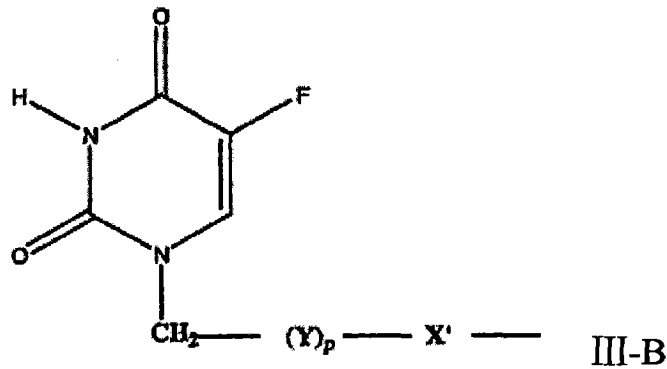
[0041]



[0042] 其中, Y 和 p 为如上所述; 且

[0043] x' 为 $-\text{CH}_2-$ 或者官能连接基团;

[0044]



[0045] 其中, x' 、Y 和 p 为如上所述。

[0046] 这些配体部分可以在缀合物的载体上的一个或多个活性部位。

[0047] 定义

[0048] 贯穿本说明书, 应理解下列定义:

[0049] 术语“免疫原”和“免疫原性”表示在生物体中能引发、产生和生成免疫反应的物质。

[0050] 术语“缀合物”表示由两部分结合在一起形成的任何物质。本发明有代表性的缀合物包括由小分子例如式 II-B 的化合物与大分子例如载体和多胺聚合物, 特别是蛋白质结合在一起形成的缀合物。在缀合物中, 小分子可以在大分子的一个或多个活性部位结合。

[0051] “半抗原”为部分或不完整抗原。它们是大部分为低分子量物质的无蛋白质的物质, 它们不能刺激抗体形成, 但它们与抗体反应。后者通过将半抗原偶联到高分子量免疫原性载体上, 然后将这种偶联的产物即免疫原注射入人体或动物而形成。本发明的半抗原是 5-FU。

[0052] 本文所使用的“间隔基团”或者“间隔区”表示通过 CH_2 或官能连接基团连接两种或更多种亚结构诸如半抗原、载体、免疫原、标记或示踪物的化学结构的一部分。这些间隔基团将在本说明书的下文中列举。间隔基团的原子和间隔基团中链的原子本身通过化学键连接。其中, 优选的间隔区为直链或支链、饱和或不饱和的碳链。这些碳链可以包括在链内或在链的末端的一个或多个杂原子。“杂原子”表示除了碳以外选自氧、氮和硫所组成的组的原子。间隔基团还可以包括环基团或芳香基团作为链的部分或作为在链中一个原子上的取代。

[0053] 通过计算氢以外的原子数来确定间隔基团中原子的数量。通过沿着被连接的亚结构之间的最短路线计算除了氢以外的原子数来确定间隔基团内链中的原子数。官能连接基团可以用于活化(例如, 提供可用的官能部位)半抗原或间隔基团, 以合成半抗原与标记或载体或多胺聚合物的缀合物。

[0054] 本文使用的“免疫原性载体”是在 5-FU 或所述式 II-A 的 5-FU 衍生物的情况下, 能与半抗原结合、由此能使这些半抗原衍生物诱导免疫反应并引发能与这些半抗原特异结合的抗体的产生的免疫物质, 其通常为蛋白质。免疫原性载体和连接基团将在本说明书的下文中列举。其中免疫原性载体物质包括被认定为是外源并由此引发宿主免疫应答的蛋白质、糖蛋白、复合多氨基多糖、粒子和核酸。多氨基多糖可以使用任何已知的常规制备手段由多糖来制备。而且, 各种蛋白类型都可以用作聚(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。用作说明的蛋白包括牛血清白蛋白(BSA)、匙孔血蓝蛋白

(KLH)、卵白蛋白、牛甲状腺球蛋白 (BTG) 等。可选择地,可以使用合成的聚(氨基)。

[0055] 免疫原性载体还可以包括聚氨基多糖,该聚氨基多糖是通过单糖的重复缩合而构建成的高分子量聚合物。多糖的例子为淀粉、糖原、纤维素、碳水化合物胶如阿拉伯胶、琼脂等。多糖还含有聚氨基酸残基和 / 或脂残基。

[0056] 免疫原性载体还可以为或者单独或者缀合到一个上述聚(氨基酸)或多糖的聚(核酸)。

[0057] 免疫原性载体还可以包括固体粒子。该粒子的直径一般至少约 0.02 微米 (μm) 且不超过约 100 μm , 通常直径约 0.05-10 μm 。该粒子可以为有机或无机的、可膨胀的或不可膨胀的、多孔或非多孔的,最佳为接近于水的密度,一般为约 0.7-1.5g/mL,且由可以是透明的、部分透明的或不透明的材料构成。该粒子可以为生物材料,例如细胞和微生物,包括非限制的例子如红细胞、白细胞、淋巴细胞、杂交瘤、链球菌、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌 (*E. coli*) 和病毒。该粒子也可以由有机和无机聚合物、脂质体、胶乳、磷脂小泡或脂蛋白组成。

[0058] “聚(氨基酸)”或“多肽”是由氨基酸形成的聚酰胺。聚(氨基酸)的分子量一般为约 2000,没有分子量的上限,正常的为小于 10,000,000,通常不大于约 600,000 道尔顿。取决于包括免疫原性载体还是酶,通常有不同的范围。

[0059] “肽”是由通过酰胺(肽)键链接两个或更多个氨基酸而形成的任何化合物,通常为 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)连接到直链中下一个残基的 α -羧基上。术语肽、多肽和聚(氨基酸)在本文中同义使用,表示这类化合物不受大小的限制。这个种类的最大成员是蛋白质。

[0060] “标记”、“检测器分子”或“示踪物”是产生或能诱导产生可检测信号的任何分子。标记可以缀合到分析物、免疫原、抗体或其它分子如受体或能结合受体的分子如配体特别是半抗原。标记的非限制的例子包括放射性同位素、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 (luminescer) 或敏化剂;非磁性或磁性粒子,固相支持体,脂质体、配体或受体。

[0061] 术语“抗体”表示抗原的特异性蛋白连接配偶体,且为对抗原具有而对其它物质没有特异结合亲和力的任何物质或物质的组。一般术语抗体包含多克隆抗体、单克隆抗体和抗体片段。

[0062] 术语“衍生物”表示通过一个或多个化学反应由母体化合物制成的化合物或分子。

[0063] 术语用于形成式 II-B 的缀合物的“载体”表示固体粒子和 / 或聚合的聚合物,例如如上述提到的免疫原性聚合物。当载体是固体粒子时,固体粒子可以是结合了、包被了或附着到多胺聚合物以提供用于结合式 II-B 的化合物中末端官能团 X 的一个或多个反应部位。

[0064] 术语“试剂盒”或“测试试剂盒”表示用于分析的材料组件。试剂可以提供于相同或分开的容器中的包装组合中,取决于它们的交叉反应性和稳定性以及液体还是冻干形式。可以选择提供在试剂盒中的试剂的量和比例以提供特殊应用的最佳结果。体现本发明特征的试剂盒包括特异于 5-FU 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。试剂可以以液体形式保持或者被冻干。

[0065] 短语“校准和对照材料”表示含有待测的已知量的药物的任何标准的或参考材料。

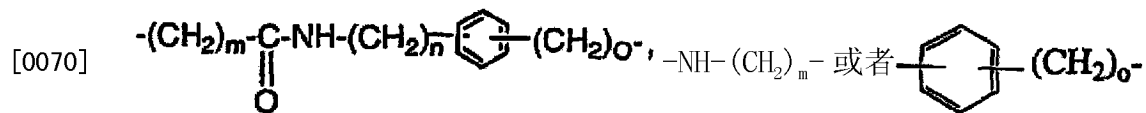
通过比较未知样品获得的结果与标准样品获得的结果来计算药物浓度。这通常通过建立校准曲线来进行。

[0066] 术语“生物学样品”包括但不限于任意量的来自生物或以前的生物的物质。这样的生物包括但不限于人、小鼠、猴子、大鼠、兔子、马和其它动物。这样的物质包括但不限于血液、血清、血浆、尿、细胞、器官、组织、骨骼、骨髓、淋巴、淋巴结、滑膜组织、软骨细胞、滑液巨噬细胞、内皮细胞和皮肤。

[0067] 试剂和免疫原

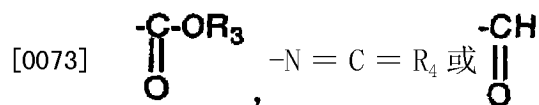
[0068] 在建立免疫测定时,将 5-FU 的缀合物构建为与样品中的 5-FU 竞争本发明抗体上的结合位点。在本发明的免疫测定中,产生本发明的抗体的免疫原是式 III-A 的化合物的 3-取代的 5-FU 衍生物,并且试剂是式 III-A 或 III-B 的 1-取代的 5-FU 衍生物。在式 III-A 和 III-B 的化合物中,接头间隔区构成了该分子的 $-\text{CH}_2-(\text{Y})_p-\text{X}'$ 部分。接头 X' 和间隔区 $-\text{CH}_2-(\text{Y})_p-$ 在制备缀合物和免疫原中是常规的。用于制备用于免疫测定的缀合物和免疫原的任何常规间隔区连接基团可以用于式 III-A 和 III-B 的化合物中。这样的常规接头和间隔区在美国专利 5,501,987 和 5,101,015 中有公开。

[0069] 其中,优选的间隔区基团包括在上文描述的间隔区基团。特别优选间隔基团为例如含有 1-10 碳原子的亚烷基,



[0071] 其中,n 和 o 为 0-6 的整数,m 为的 1-6 的整数,亚烷基为特别优选的间隔基团。关于由 Y 表示的上述结构,末端官能团 X 在它们的末端和结构的右侧,即由 $(\text{CH}_2)_o$ 或 $(\text{CH}_2)_m$ 所指定的末端连接到取代基。

[0072] 在式 III-A 和 III-B 的化合物中, X' 是 $-\text{CH}_2-$ 或连接到间隔区的官能团,优选在聚合物或载体上的胺基。基团 X' 是在式 II-A 和 II-B 的化合物中末端官能团 X 的结果,所述官能团 X 能结合用作载体或免疫原的聚酰胺聚合物中的氨基。任何能与胺反应的末端官能团都能用作式 II-A 和 II-B 化合物中的官能团 X。优选在 X 内包括的这些末端官能团为:



[0074] 其中 R_3 为氢或者与它的附着氧原子一起形成反应性酯, R_4 为氧或硫。基团 $-\text{N}=\text{C}=\text{R}_4$ 可以为异氰酸酯或异硫氰酸酯。由 OR_3 形成的活化酯包括亚氨酸酯,例如 N-羟基琥珀酰胺、1-羟基苯并三唑和对硝基苯酯。然后,可以使用能与胺基反应的任何活化酯。

[0075] 通过常规手段将羧基和活化酯偶联到载体或免疫原性聚合物上。多胺聚合物例如蛋白质上的胺基产生了将间隔区连接到聚合物、免疫原或载体和 / 或本发明的缀合物的酰胺基。

[0076] 在本发明的免疫原和缀合物中,在载体或免疫原上含羧基的 5-FU 半抗原与多胺聚合物上的氨基之间的化学键可以用本领域技术人员公知的各种方法来建立。经常优选形成酰胺键。通过羧基与离去基团试剂(例如,N-羟基琥珀酰亚胺、1-羟基苯并三唑、对硝基苯酚等)反应,通过首先活化式 II-A 和 II-B 化合物中 5-FU 半抗原的羧酸部分来形成酰胺

键。可以使用活化试剂如二环己基碳二亚胺、二异丙基碳二亚胺等。然后式 II-A 和 II-B 的 5-FU 半抗原中羧基的活化形式与含有蛋白质载体的缓冲溶液反应。

[0077] 在式 II-A 和 II-B 的 5-FU 衍生物含有伯氨基或仲氨基以及羧基的情况下,在活化和偶联反应过程中需要使用胺保护基团以防止缀合物的自身反应。通常,通过形成相应的 N-三氟乙酰胺、N-叔丁氧羰基氨基甲酸酯 (N-t-BOC 氨基甲酸酯)、N-苯甲氧甲酰基氨基甲酸酯或者类似结构来保护缀合物上的胺。一旦完成了上述与免疫原性聚合物或载体的偶联反应,就可以使用不另外改变免疫原或缀合物结构的试剂来除去胺保护基团。这样的试剂和方法是本领域技术人员已知的,并包括弱或强的含水或无水酸、弱或强的含水或无水碱、含氯化物的试剂如硼氢化钠或氰基硼氢化钠以及催化加氢作用。各种缀合半抗原和载体的方法也公开于美国专利 3,996,334 和 4,016,146 中,在本文中将它们引用作为参考。

[0078] 另一方面,当 X 为式 II-A 或 II-B 化合物中的末端异氰酸酯或硫异氰酸酯基团时,当与多胺聚合物的自由胺反应的这些基团产生了式 II-B 的缀合物或免疫原,其中 X' 为

$\text{NH} \begin{array}{c} \text{---} \text{C} \text{---} \\ \parallel \\ \text{R}_4 \end{array}$, 其中 R₄ 为如上所述,其与载体或免疫原性多肽的功能地连接。

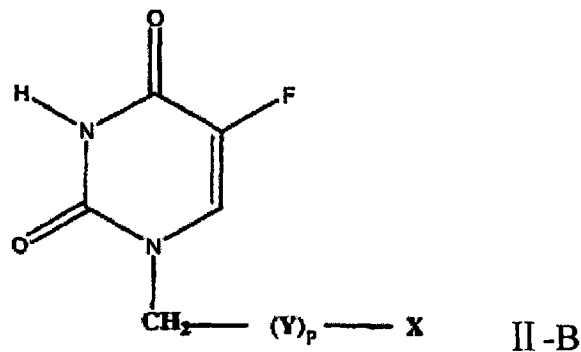
[0079] 在式 II-A 或 II-B 化合物中,X 是醛基时,这些化合物可以通过还原胺化作用通过胺连接连接到多胺多肽或载体的胺基。任何常规的用胺缩合醛的方法例如还原胺化作用可以用于形成这种连接。在这种情况下,式 III-A 和 III-B 的配体部分中的 X' 是 -CH₂-。

[0080] 通过 5-FU 与式 V-A 的卤化物反应可以连接式 I 化合物中的 1- 氮原子来形成式 II-B 的化合物以产生式 II-B 的化合物,

[0081] $\text{R}_1\text{-CH}_2\text{-(Y)}_p\text{-X}$ V-A

[0082] 其中, R₁ 是氯或溴, Y、p 和 X 为如上所述,

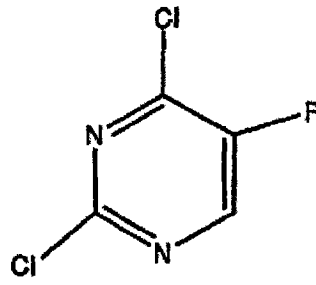
[0083]



[0084] 通过将卤化物与胺基缩合的任何常规方法,式 I 的化合物在它的 1- 环氮原子与式 V-A 的卤化物反应形成式 II-B 的化合物。这种缩合反应是在碱的存在下进行的。在这个反应中,在式 I 化合物的 1- 位的环氮原子比在 3- 位的环氮原子更有活性。因此,在 1- 位的环氮原子将优选与卤化物缩合。如果式 V-A 的化合物含有任何活性氨基或其它功能取代基,这些取代基可以先于 5-FU 与 V-A 化合物的反应之前与常规的保护基团反应。式 VI-A 的化合物产生后,这些保护基团可以通过本领域公知的除去这种保护基团的过程来除去,同时保留了式 II-B 的化合物中的胺。

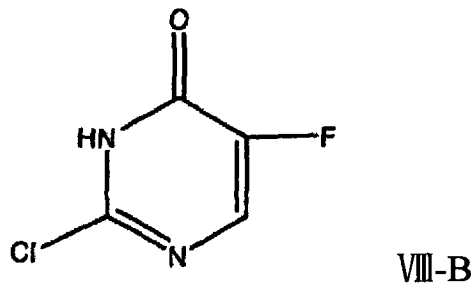
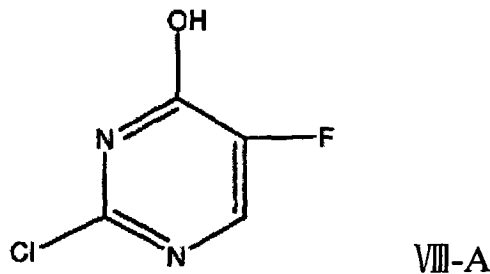
[0085] 式 II-A 的 3- 取代的 5-FU 可以通过首先将 5-FU 转化为下式的二氯化物而由 5-FU 来制备:

[0086]



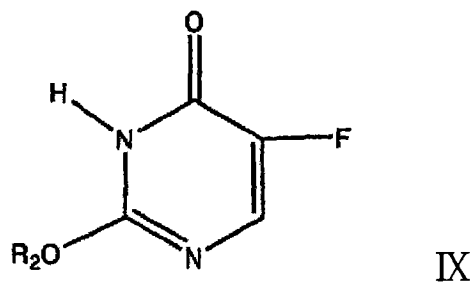
[0087] 这通过用氯化剂如氯氧化磷 (phosphorous oxychloride) 处理式 I 的化合物来完成。可以将任何使用这些氯化剂的常规条件用于实施该反应。在下一个步骤中,将式 VII 的化合物转化为式 VIII-A 的化合物,该式 VIII-A 的化合物烯醇化为式 VIII-B 的化合物,

[0088]



[0089] 这个转化通过在 35-50°C 的温度下在含水介质中用氢氧化钠处理式 VII 的化合物来实施。可以将式 VIII-B 的化合物转化为下式的化合物:

[0090]



[0091] 其中 R₂ 为苯甲基。

[0092] 在形成式 IX 的化合物中,式 VIII-B 的化合物在固体氢氧化钠的存在下在有机溶剂中与苯甲醇反应。在下一个步骤中,采用上文中描述的有关式 I 的化合物与式 V-A 的卤化物缩合的方式,通过式 IX 的化合物与式 V-A 的卤化物反应而将式 IX 的化合物转化为式 II-A 的化合物。

[0093] 式 II-A 或 II-B 的化合物可以通过这些化合物与多胺、多肽或载体反应转化为本发明的缀合物载体试剂。相同的多肽可以用作式 II-B 的化合物中的载体,并作为提供了多

胺或多肽为免疫活性的本发明式 II-A 免疫原中的免疫原性聚合物。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反应。根据本发明,在式 II-A 和 II-B 的化合物中,由 X 表示的多种官能团可以通过将官能团附着到含在聚合物内的胺基上而缀合到聚合材料上。根据优选的实施方式,在式 II-A 和 II-B 的化合物中,X 为羧酸基团或其活化酯。

[0094] 抗体

[0095] 本发明还涉及包括通过使用前述免疫原产生的 5-FU 的单克隆抗体的新型抗体。根据本发明,已经发现这些本发明产生的抗体与 5-FU 具有选择性的反应性,并且与喃氟啉或其它含有干扰 5-FU 免疫测定的化合物的嘧啶不反应。

[0096] 本发明涉及新型抗体和 5-FU 的单克隆抗体。本发明的抗血清可以通过使用本发明的免疫原免疫宿主动物而常规产生。合适的宿主动物包括啮齿类,例如小鼠、大鼠、兔子、豚鼠等,或者较高等的哺乳动物,例如山羊、绵羊、马等。根据用于引发动物的免疫反应的接受的规程,给以初始剂量、出血和加强注射,例如,在优选实施方式中,小鼠接受 100 μ g 免疫原 / 小鼠初始剂量, i. p. 和随后两次或多次 100 μ g 免疫原 / 小鼠加强注射进行六个月以上。通过周期性的出血,利用常规的免疫测定观察免疫小鼠的血液样品以发展对抗 5-FU 的免疫反应。这些方法提供了筛选产生了具有需要活性的抗血清的宿主的方便方法。

[0097] 根据上述计划接着给小鼠 i. p. 或 i. v. 注射 100 μ g 免疫原连续三天,在细胞融合三天前开始,通过免疫 Balb/c 小鼠方便地产生单克隆抗体。当然也可以利用抗体领域中公知的其它方法。本文中详细的完全免疫方法提供了用于 5-FU 抗体的血清抗体反应的最佳方法。

[0098] 从宿主的脾脏、外周血液、淋巴结或其它组织获得的 B 淋巴细胞可以用作单克隆抗体产生细胞。最优选的是从脾脏得到的 B 淋巴细胞。通过将这种 B 淋巴细胞与无限增殖细胞系融合得到能产生本发明需要的单克隆抗体的杂交瘤,该无限增殖细胞系为在杂交细胞上给予长期组织培养稳定性的细胞系。在本发明优选的实施方式中,无限增殖细胞可以为类淋巴母细胞或者浆细胞瘤细胞如骨髓瘤细胞,其自身是抗体产生细胞而且是恶性的。产生 5-FU 单克隆抗体的鼠类杂交瘤是通过融合小鼠骨髓瘤细胞和来自免疫了抗 5-FU 蛋白质缀合物的小鼠的脾细胞而形成的。嵌合的和人源化的单克隆抗体可以通过克隆来自杂交瘤细胞的抗体表达基因并使用现在本领域公知的重组 DNA 方法将小鼠可变区连接到人恒定区或者将人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) 组合来产生。实施鼠类单克隆抗体人源化的改进方法在国际专利申请 W092/11018 中有阐述,其提供了增强亲和力的抗体。

[0099] 可以产生仅含有部分初级抗体结构的多肽片段,该片段拥有一种或多种免疫球蛋白活性。这些多肽片段可以使用本领域公知的方法通过完整抗体的蛋白酶裂解来生产,或者使用定向诱变在含有抗体基因的表达载体中需要的位置插入终止密码子来产生 Fab 片段或 (Fab')₂ 片段。单链抗体可以通过将 VL 和 VH 区域与 DNA 接头结合产生 (见 Huston 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 85 :5879-5883(1988) 和 Bird 等人, Science, 242 : 423-426(1988))。

[0100] 本发明的抗体对于 5-FU 是选择性的,并且与如尿嘧啶、胞嘧啶、喃氟啉等的嘧啶碱没有实质上的交叉反应性。没有实质上的交叉反应性意味着本发明的抗体相对于具有不超过 12% 优选不超过 5% 的这些代谢产物的 5-FU 具有交叉反应性。

[0101] 免疫测定

[0102] 根据本发明,由式 II-A 的这些化合物的免疫原产生的前述缀合物和抗体可以用作确定患者样品中 5-FU 的试剂。这种测定通过免疫测定进行。由式 II-B 的化合物形成的试剂缀合物与样品中的 5-FU 竞争本发明产生的抗体上的结合部位的任何免疫测定可以用于确定患者样品中 5-FU 的存在。在怀疑含有 5-FU 的样品中进行这种分析 5-FU 的方法包括组合 (a) 含水介质样品, (b) 本发明产生的 5-FU 抗体和 (c) 由式 II-A 和 II-B 的化合物形成的缀合物。样品中 5-FU 的量可以通过测量结合添加到样品和抗体的混合物中的已知量的缀合物的特异抗体的抑制来确定。将通过未知样品抑制已知量缀合物的这种结合的结果与通过利用已知 5-FU 标准溶液的相同分析所得到的结果比较。在确定未知样品中 5-FU 的量时,可以以任何顺序添加样品、由式 II-B 的化合物形成的缀合物以及抗体。

[0103] 可以采用各种方法来测量结合到抗体的、由式 II-A 和 II-B 的化合物形成的缀合物的量。一种方法是缀合物与抗体的结合引起了荧光基团缀合物旋转速率的降低。在液体混合物中荧光基团缀合物旋转速率的降低量可以通过荧光极化技术来检测,例如美国专利 No. 4, 269, 511 和 4, 420, 568 所公开。

[0104] 另一方面,抗体可以包被或吸收在纳米粒子上,使得这些粒子与由式 II-A 和 II-B 的化合物形成的 5-FU 缀合物反应时,这些纳米粒子形成聚集体。然而,当包被或吸收到纳米粒子的抗体与样品中的 5-FU 反应时,来自结合到这些纳米粒子的样品的 5-FU 不产生抗体纳米粒子的聚集。通过吸收率在分析混合物中可以测量聚集或凝聚的量。

[0105] 另一方面,可以通过将抗体或者 5-FU 缀合物附着到如微量滴定板的固相载体或者任何其它包括固体粒子的常规固相载体上来进行这些分析。将抗体和蛋白附着到这种固体粒子上是本领域公知的。可以利用任何常规方法来进行这种附着。在许多情况下,为了有助于测量,可以将标记放置在抗体、缀合物或者固体粒子上,所述标记例如放射性标记或酶标记,作为检测与抗体结合或未结合的由式 II-B 的化合物形成的缀合物的量的助剂。其它合适的标记包括发色团、荧光基团等。

[0106] 为方便起见,本发明的分析组分可以提供在试剂盒中,与预定量的用于分析 5-FU 的新试剂包装组合。这些试剂包括本发明的抗体,还有由式 II-A 和 II-B 的化合物形成的缀合物。

[0107] 除了这些必需的试剂,可以包括添加剂如辅助试剂,例如稳定剂、缓冲剂等。各种试剂的相对量可以广泛变化,以提供基本上使分析敏感性最佳化的试剂在溶液中的浓度。试剂可以在溶液中或者作为干粉,通常是冻干的,该试剂包括赋形剂,其在溶解时提供具有进行分析的合适浓度的试剂溶液。

[0108] 实施例

[0109] 在实施例中,指定使用下列缩写:

[0110] THF 四氢呋喃

[0111] EA 乙醇

[0112] DCM 二氯甲烷

[0113] DMAP 二甲氨基吡啶

[0114] NHS N-羟基-琥珀酰亚胺

[0115] EDC 盐酸 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺

[0116] TLC 薄层色谱

[0117] ANS 8- 苯胺基 -1- 萘磺酸

[0118] i. p. 腹膜内

[0119] HRP 辣根过氧化物酶

[0120] TMB 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺

[0121] TRIS 盐酸三(羟甲基)氨基甲烷

[0122] BSA 牛血清白蛋白

[0123] BTG 牛甲状腺球蛋白

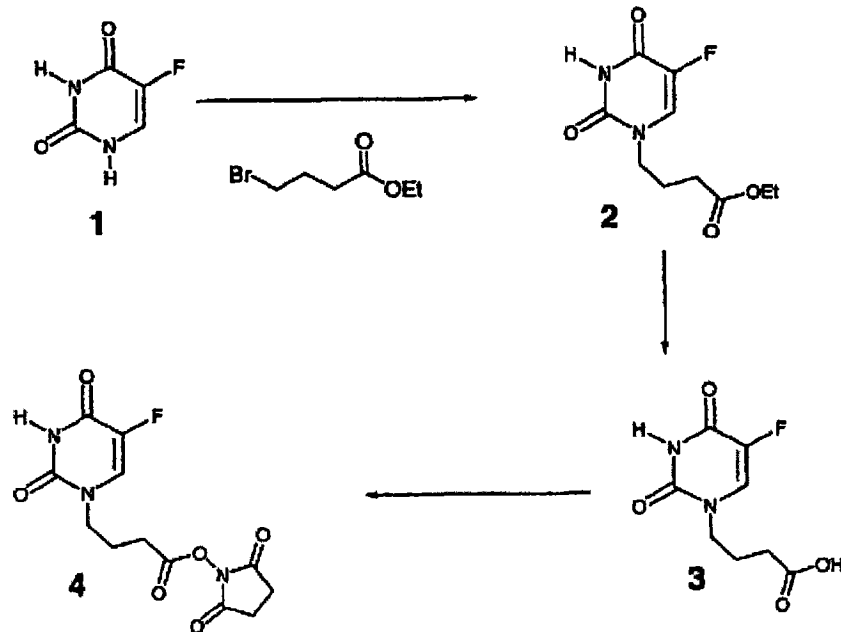
[0124] PBS 磷酸盐缓冲盐水

[0125] di 去离子水

[0126] 在实施例中, 方案 1, 方案 2, 方案 3a、3b 和方案 4, 下面阐述制备的特定化合物, 并通过实施例中的编号表示。方案如下:

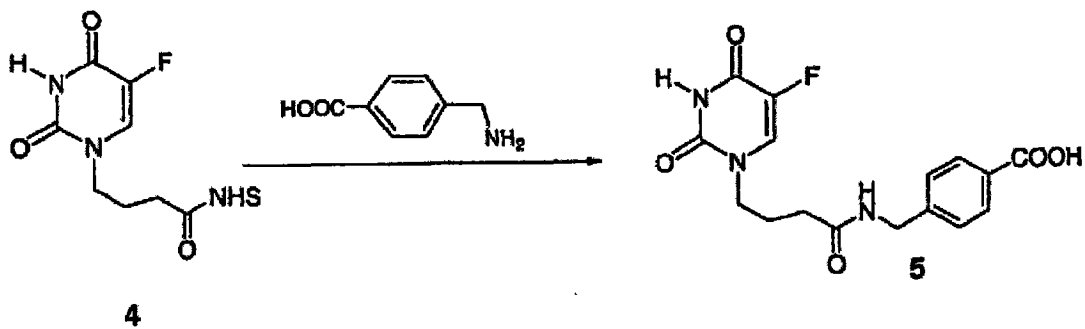
[0127] 方案 1

[0128]



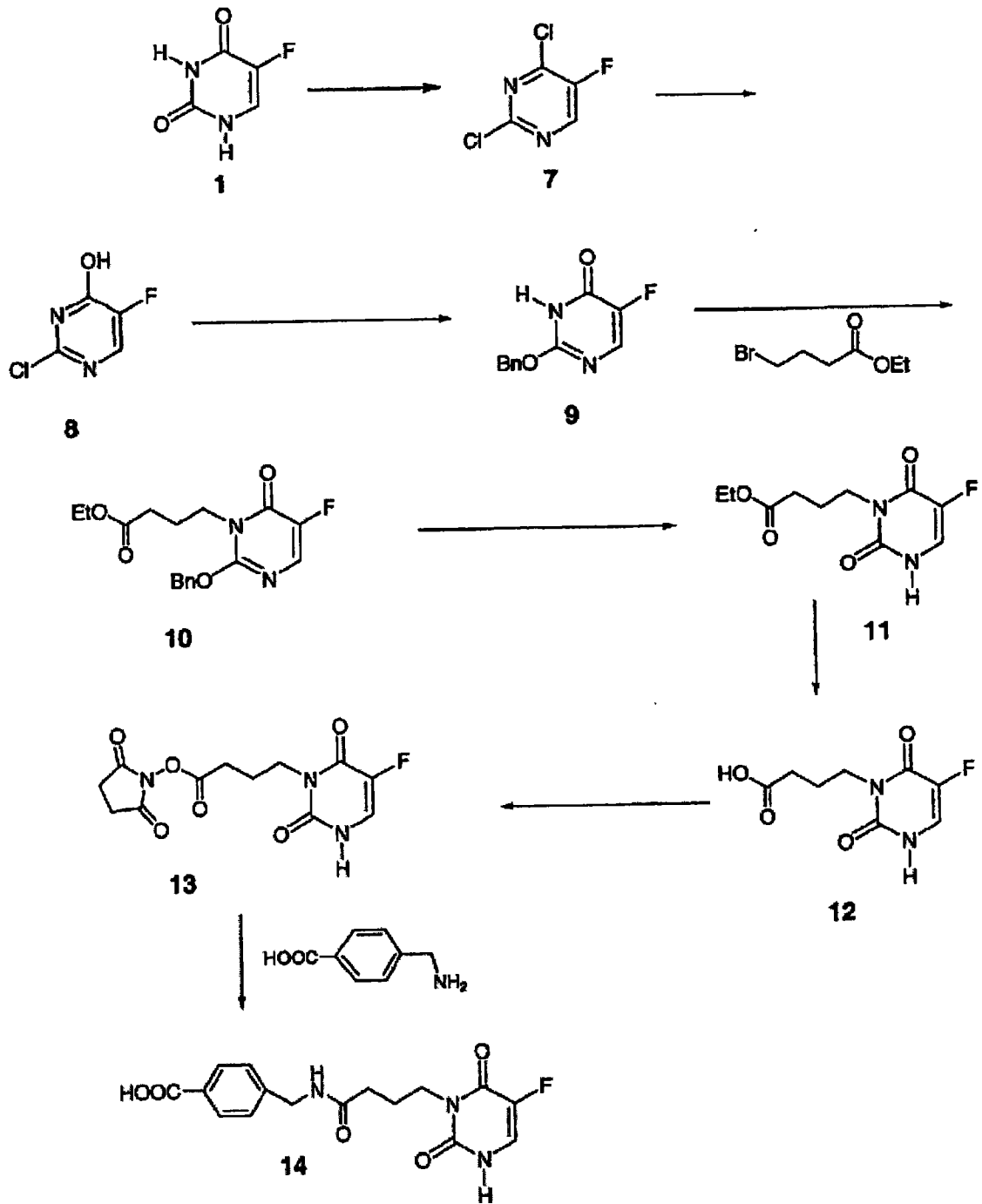
[0129] 方案 2

[0130]



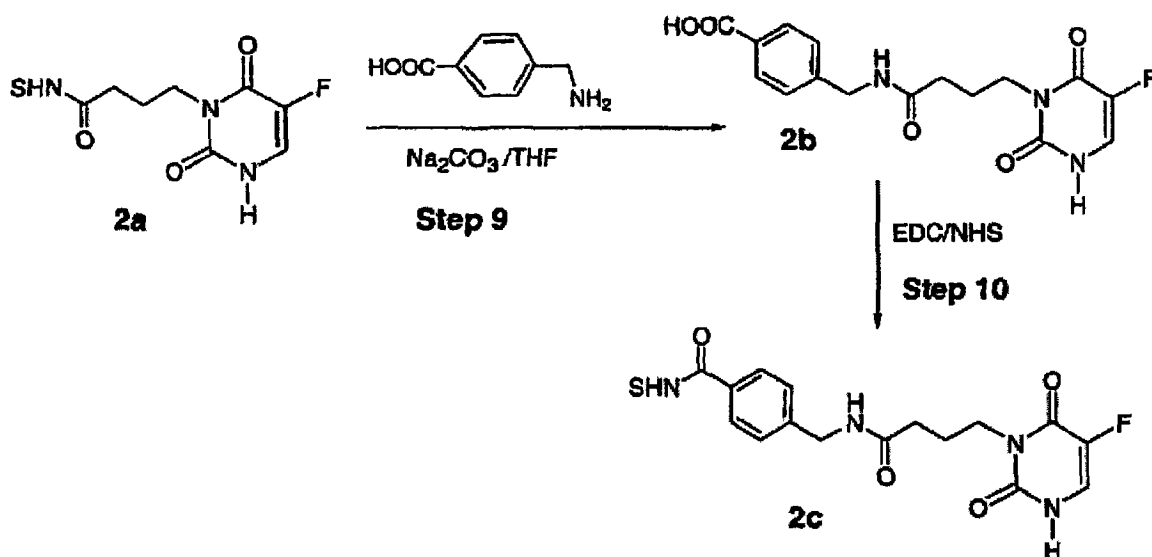
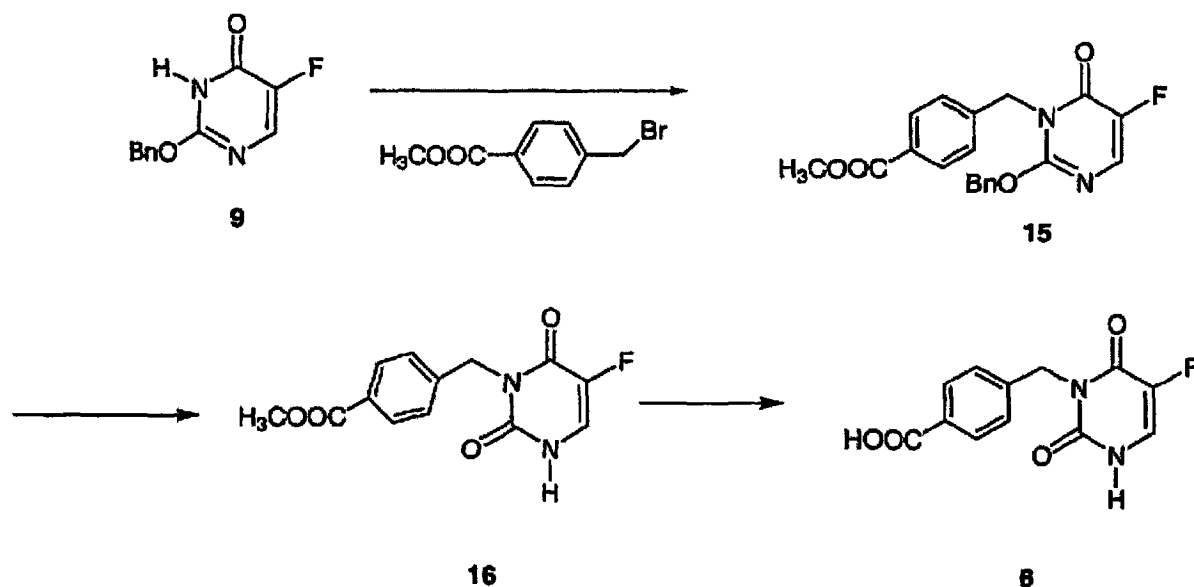
[0131] 方案 3a

[0132]



[0133] 方案 3b

[0134]



[0135] 实施例 1

[0136] 方案 1, 制备 1- 取代的 5-FU 活化酯 [4]

[0137] 在 30 °C 下搅拌中向 DMF (100 mL) 中的氟尿嘧啶 (50 g) [1] 溶液中加入三乙胺 (78 g)。然后滴加乙基 -4- 溴丁酸酯 (88.5 g)。滴加完成后, 将所得到的反应混合物在室温下搅拌 48 小时。过滤反应混合物, 并在减压下除去溶剂。将残留物在乙酸乙酯中结晶, 提供了 26 g (29%) 的化合物 [2]。

[0138] 向甲醇 (100 mL) 中 [2] 的溶液 (20 g) 中加入 20% 的氢氧化钾水溶液 (27 mL)。所得溶液在室温下搅拌 3 小时, 然后在减压下浓缩该混合物。将残留物溶解在丙酮 (50-100 mL) 中, 并用浓 HCl 调节到 pH 为 2-3。接着过滤, 用丙酮洗涤。通过加热将固体产物溶解在丙酮 (50 mL) 中。冷却至室温后, 通过添加乙酸乙酯 (100 mL) 将固体沉淀出来。通过过滤收集固体产物, 接着干燥得到约 10 g 的 [3]。用于酯的 TLC 条件是乙酸乙酯: 醚 (3 : 1)。用于酸的 TLC 条件是氯仿: 甲醇 (15 : 1), 2 滴乙酸。

[0139] 在 0 °C 下向 600 mL 的二氯甲烷中 6.3 g 的化合物 [3] 中加入 NHS。再向这种溶液中

滴加于二氯甲烷中的 DCC (4.8g)。在 0℃ 下搅拌 2 小时,将得到的反应混合物在室温下搅拌 15 小时。将反应混合物浓缩。在丙酮中结晶残留物得到粗产物。在二氧化硅凝胶柱(用乙酸乙酯:醚为 3:1 来洗脱)上提纯该粗产物,得到 4g 化合物 [4]。

[0140] 实施例 2

[0141] 方案 2,制备 1- 取代的 5-FU 酸 [5]

[0142] 向乙腈 (300mL) 中化合物 [4] (3.2g) 的溶液中添加水 (900mL),接着加入 1.2e. q. 的对甲氨基苯甲酸。将所得反应混合物在室温下搅拌 20 小时。在减压下浓缩该混合物,除去乙腈。形成沉淀并通过过滤收集。然后在丙酮中结晶得到 2.8g 粗产物。将该粗产物在二氧化硅凝胶柱(用氯仿:甲醇为 15:1 洗脱,1-2 滴乙酸)上提纯,得到 2g 化合物 [5]。

[0143] 实施例 3a

[0144] 方案 3a,制备 3- 取代的 5-FU 酸衍生物 [12], [14]

[0145] 在 40℃ 下在设有冷凝器、温度计和滴液漏斗的三颈烧瓶中搅拌 80mL 的 POCl₃ 中 15.6g 的 5-FU [1] 的混合物。在滴加了 25mL 的 N, N- 二甲基苯胺后,将所得混合物加热回流 3 小时。在减压下蒸发过量的 POCl₃。将混合物冷却至室温,并倒入 75g 的碎冰中。然后用氯仿 (50mL 三次) 萃取。用水洗涤组合的萃取物,用 MgSO₄ 干燥,并浓缩,得到约 50% 产率的浅黄色固体化合物 [7]。

[0146] 在 45℃ 下搅拌在 48mL 的 2N NaOH 溶液中 16g 的氯氧化物 [7] 的混合物 1 小时。反应混合物的 pH 降低到 7。再加入 48mL 2N NaOH 溶液,并持续搅拌至在反应混合物中不再观察到油性物质。将混合物冷却至室温后,用浓 HCl 调节 pH 至 pH 为 3。冷却,产物 [8] 沉淀出来。收集化合物氯氧化物 [8],用水洗涤,直到洗涤溶液变成中性。产率约 55%。

[0147] 向装有冷凝器、温度计和 dean stark 装置的三颈烧瓶中加入 20mL 甲苯、52mL 苯甲醇和 2.44g 固体 NaOH。将所得混合物回流至变干。然后,加入 3g 化合物 [8],并持续回流 3 小时。将反应混合物冷却至室温后,加入 50mL 水。用水洗涤有机相两次(每次 50mL)。将水相组合起来,在减压下除去甲苯和苯甲醇的残留物。用浓 HCl 调节溶液 pH 为 3,冷却下来,形成沉淀,收集该沉淀。在乙醇中再次结晶,得到约 60% 产率的化合物 [9]。

[0148] 将 20mL 苯、20mL 水和 0.5g 四丁基溴化铵的混合物加热至 55℃ 后,将溶液 A (在 20mL 1N NaOH 水溶液中 2g 的 [9]) 和溶液 B (在 20mL 苯中 1.9g 的乙基-4-溴丁酸酯) 以交替滴加方式加入该混合物中。反应混合物的 pH 控制在 8-10。滴加完之后,将反应混合物回流 2 个半小时。分离有机相,用 5% NaOH 和水洗涤,用 MgSO₄ 干燥。减压下除去有机溶剂。在硅胶凝胶柱(用醚和乙酸乙酯为 10:1 洗脱)上提纯残留物,得到约 40% 产率的油状产物的化合物 [10]。

[0149] 将 50mL 甲醇中 3g 化合物 [10], 0.3g 10% Pd/C 的混合物在氢气 (15psi) 下搅拌约 24 小时。通过过滤除去催化剂。向含有 [10] 的滤液中加入 2g NaOH 和 50mL 水。所得混合物在室温下搅拌 8 小时。在减压下除去甲醇。用浓 HCl 调节混合物的 pH 至 3。冷却后,形成沉淀,通过过滤收集。将该沉淀从乙醇中再结晶,得到约 50% 产率的 [12]。

[0150] 在室温下将 50mL 氯仿中的 1g 干燥的 [12]、0.74g NHS、1.47g DDC 的混合物搅拌过夜(约 24 小时)。在减压下除去溶剂,在硅胶凝胶柱(用乙酸乙酯和甲醇 10:1 来洗脱)上提纯残留物,得到约 40% 产率的化合物 [13]。

[0151] 在室温下将 30mL DMF 中 1g 化合物 [13], 0.5g 4-(氨基)-苯甲酸的混合物搅拌

8 小时。向反应混合物中加入 150mL 水。用 100mL 乙酸乙酯洗涤所得到的混合物。使水相在 4℃ 下静置, 通过过滤收集缓慢从溶液中沉淀出来的产物 [14], 在 P_2O_5 的存在下在室温真空下干燥, 得到产率约 65% 的 [14]。

[0152] 实施例 3b

[0153] 方案 3b, 制备 3- 取代的 5-FU 酸衍生物 [6]

[0154] 将 20mL 苯、20mL 水和 0.5g 四丁基溴化铵的混合物加热至 55℃ 后, 向该混合物中同时加入溶液 A (20mL 1N NaOH 水溶液中 2g [9]) 和溶液 B (20mL 苯中 2.05g 4- 溴丁酸乙酯)。将反应混合物的 pH 控制在 8-10。添加完之后, 将反应混合物回流两个半小时。分离有机相, 用 5% NaOH 和水洗涤, 并用 $MgSO_4$ 干燥。在减压下除去有机溶剂。在硅胶凝胶柱 (用醚和乙酸乙酯 10 : 1 洗脱) 上提纯残留物, 得到约 38% 产率的油状产物的化合物 [15]。

[0155] 将 60mL 甲醇中 2g 化合物 [15], 0.2g 10% Pd/C 的混合物在氢气 (15psi) 下搅拌约 24 小时。通过过滤除去催化剂。将含有化合物 [16] 的滤液浓缩至约 20mL, 然后加入 1g NaOH 和 20mL 水。所得混合物在室温下搅拌 8 小时。在减压下除去甲醇, 并用浓 HCl 调节混合物的 pH 为 3。冷却后, 形成沉淀, 通过过滤收集。将该沉淀从乙醇中再结晶, 得到约 60% 产率的 [6]。

[0156] 实施例 4

[0157] 从相应的酸 [3, 5, 12, 14, 6] 制备 NHS 活化酯的一般方法

[0158] 向搅拌的 20mL 干燥的 CH_2Cl_2 中 NHS (1.39mmol) 溶液中加入酸 (0.695mmol) [3, 5, 12, 14, 6] 和 EDC (2.085mmol)。在氮气气氛下在室温搅拌该溶液 18 小时。通过添加 3mL 盐酸 (0.3N) 将该反应终止, 再搅拌 5 分钟。分离有机层、干燥 (Na_2SO_4)、过滤并蒸发 (真空下), 产生白色固体。

[0159] 实施例 5

[0160] 制备 1- 取代的 5-FU KLH 免疫原

[0161] 向 50mM 磷酸盐缓冲液 (50mM, pH7.5) 中 5.86mL KLH (31.2mg/mL) 中滴加实施例 1 中制备的 0.692mL 化合物 [4] (在 DMSO 中 12.8mg/mL), 调节 pH 为 8.5。在室温下使混合物搅拌 18 小时。然后, 通过渗析提纯该免疫原性缀合物, 并根据以前所描述的过程表征 (Wu 等人, *Bioconj. Chem.*, 8 : pp385-390, 1997, Li 等人, *Bioconj. Chem.*, 8 : pp 896-905, 1997, Salamone 等人, *J. Forensic Sci.* pp 821-826, 1998)。

[0162] 实施例 6a

[0163] 制备 3- 取代的 5-FU BTG 免疫原

[0164] 向 50mM 磷酸盐缓冲液 (50mM, pH7.5) 中 11.4mL BTG (16.9mg/mL) 中滴加 1.2mL DMSO, 检验 pH 为 7.5。向其中滴加实施例 3a 制备的 0.227mL 化合物 [13] (在 DMSO 中 52.5mg/mL), 并再次检验 pH 为 7.5。在室温下使混合物搅拌 18 小时。然后, 通过渗析提纯该免疫原性缀合物, 并根据以前所描述的过程表征 (Wu 等人, *Bioconj. Chem.*, 8 : pp 385-390, 1997, Li 等人, *Bioconj. Chem.*, 8 : PP 896-905, 1997, Salamone 等人, *J. Forensic Sci.* pp 821-826, 1998)。

[0165] 实施例 6b

[0166] 制备 3- 取代的 5-FU KLH 免疫原

[0167] 向 50mM 磷酸盐缓冲液 (50mM, pH7.5) 中 8.3mL KLH (24.9mg/mL) 中滴加 0.922mL

DMSO, 检验 pH 为 7.5。向其中滴加实施例 3a 制备的 0.227mL 化合物 [13] (在 DMSO 中 52.6mg/mL), 并再次检验 pH 为 7.5。在室温下使混合物搅拌 18 小时。然后, 通过渗析提纯该免疫原性缀合物, 并根据以前所描述的过程表征 (Wu 等人, *Bioconj. Chem.*, 8 :pp 385-390, 1997, Li 等人, *Bioconj. Chem.*, 8 :PP 896-905, 1997, Salamone 等人, *J. Forensic Sci.* pp 821-826, 1998)。

[0168] 实施例 7a

[0169] 制备具有衍生物 12 的 3- 取代的 5-FU BSA 缀合物 (10 : 1 比例)

[0170] 向 50mM 磷酸盐缓冲液 (50mM, pH7.5) 中 BSA (50mg/mL) 的 1mL 溶液中滴加 0.111mL DMSO。滴加实施例 4 制备的化合物 [12] (在 DMSO 溶液中 0.045mL 52.5mg/mL) 的活化 N- 羟基琥珀酰亚胺酯。在室温下使混合物搅拌过夜, 产生 3- 取代的 5-FU 与 BSA 的缀合物。然后, 通过渗析提纯该缀合物, 并根据以前所描述的过程表征 (Wu 等人, *Bioconj. Chem.*, 8 :pp 385-390, 1997, Li 等人, *Bioconj. Chem.*, 8 :PP 896-905, 1997, Salamone 等人, *J. ForensicSci.* pp 821-826, 1998)。

[0171] 实施例 7b

[0172] 制备具有衍生物 6 的 3- 取代的 5-FU BSA 缀合物 (1 : 1 比例)

[0173] 向 50mM 磷酸盐缓冲液 (50mM, pH7.5) 中 20mL BSA (50.0mg/mL) 中滴加 2.222mL DMSO, 并检验 pH 为 7.5。向其中滴加 0.272mL 实施例 4 制备的化合物 [6] (在 DMSO 溶液中 20.0mg/mL) 的活化 N- 羟基琥珀酰亚胺酯, 再次检验 pH 为 7.5。在室温下使混合物搅拌 18 小时。然后, 通过渗析提纯该免疫原性缀合物, 并根据以前所描述的过程表征 (Wu 等人, *Bioconj. Chem.*, 8 :pp 385-390, 1997, Li 等人, *Bioconj. Chem.*, 8 :PP 896-905, 1997, Salamone 等人, *J. Forensic Sci.* pp 821-826, 1998)。

[0174] 实施例 8

[0175] 制备具有衍生物 5 的 1- 取代的 5-FU BSA 缀合物 (20 : 1 比例)

[0176] 向冰浴中的 50mM 磷酸盐缓冲液 (50mM, pH7.5) 中 BSA (50mg/mL) 的 14mL 溶液中滴加 14mL DMSO。滴加实施例 4 制备的化合物 [5] (在 DMSO 溶液中 1.65mL 57mg/mL) 的活化 N- 羟基琥珀酰亚胺酯。在室温下使混合物搅拌过夜, 产生 1- 取代的 5-FU 与 BSA 的缀合物。然后, 通过渗析提纯该缀合物, 并根据以前所描述的过程表征 (Wu 等人, *Bioconj. Chem.*, 8 :pp 385-390, 1997, Li 等人, *Bioconj. Chem.*, 8 :PP 896-905, 1997, Salamone 等人, *J. ForensicSci.* pp 821-826, 1998)。

[0177] 实施例 9

[0178] 制备 5-FU 抗体

[0179] 给 10 只雌性 BALB/c 系小鼠以 100 μ g/ 小鼠 i. p. 免疫在完全弗氏佐剂 (Complete Freund' s Adjuvant) 中乳化的实施例 5 制备的 5-FU-KLH 或实施例 6a 制备的 5-FU-BTG。在用 100 μ g/ 小鼠在不完全弗氏佐剂 (Incomplete Freund' s Adjuvant) 中乳化的相同免疫原初次注射后四星期, 给小鼠加强一次。加强试验后 10 天通过眼窝放血获得从每只小鼠放出的血。在实施例 12a、13 和 14 中评价来自这些含有 5-FU 抗体的试验放血的抗血清。对于单克隆抗体, 给 10 雌性 BALB/c 小鼠 i. p. 免疫在完全弗氏佐剂中乳化的实施例 6a 制备的 3- 取代的 5-FU-KLH 100 μ g/ 小鼠。在用 100 μ g/ 小鼠的在不完全弗氏佐剂中乳化的相同免疫原初次注射后四星期, 给小鼠加强一次。加强试验后 10 天通过眼窝放血获得从每

只小鼠放出的血并将这些在实施例 12a 和 15 中筛查。为了融合前(第 0 天)4 天开始制备单克隆抗体,给小鼠 i. p. 注射 400 μ g(第 3 天)、200 μ g(第 2 天)和 200 μ g(第 1 天)的 PBS 中的 3-取代的 5-FU-KLH 免疫原连续 3 天。从挑选的小鼠分离脾细胞,并根据 Coligan, J. E. 等人, eds., *Current Protocols in Immunology*, 2. 5. 1-2. 5. 8, (1992), Wiley & Sons, NY 的方法,用具有 50% 聚乙二醇 1500 的 2×10^7 SP2/0 细胞融合。将融合的细胞铺板在用 20% FetalClone I、2% L-谷氨酰胺(100mM)和 2% 50X HAT 补充的 DMEM/F12 中的 10 个 96 孔板上。两周后,通过 ELISA 分析杂交瘤上清抗 5-FU 的存在(实施例 12b)。阳性孔扩大,再次以相同的方法筛查。通过竞争 ELISA(实施例 12a 和 15)证实了 5-FU 结合的阳性克隆。根据 Coligan, J. E. 等人, eds., *Current Protocols in Immunology*, 2. 5. 8-2. 5. 17, (1992), Wiley & Sons, NY. 中公开的方法,通过有限稀释将由 ELISA 鉴定的阳性克隆亚克隆一次或两次。

[0180] 实施例 10

[0181] 用 5-FU 衍生物 5-BSA 缀合物的微量滴定板敏化过程

[0182] 在为蛋白质结合而优化的且每板含有 96 孔的聚苯乙烯微量滴定板(Nunc MaxiSorp C8 或 F8 Immunomodules)中进行测量 5-FU 浓度的 ELISA 方法。通过添加在 0.05M pH = 9.6 的碳酸氢钠中 10 μ g/mL 的 300 μ L 5-FU-BSA 缀合物并在室温下温育 3 小时,用 5-FU-BSA 缀合物(实施例 8 所制备)包被每个孔。用 0.05M pH = 9.6 的碳酸氢钠洗涤孔,接着在室温下用 400 μ L 5% 的蔗糖、0.2% 酪蛋白酸钠溶液阻断 30 分钟。除去包被后(post-coat)溶液后,在板在 37°C 下干燥过夜。

[0183] 实施例 11a

[0184] 用 5-FU 衍生物 12-BSA 缀合物的微量滴定板敏化过程

[0185] 在为蛋白质结合而优化的且每板含有 96 孔的聚苯乙烯微量滴定板(Nunc MaxiSorp C8 或 F8 Immunomodules)中进行测量 5-FU 浓度的 ELISA 方法。通过添加在 0.05M pH = 9.6 的碳酸氢钠中 10 μ g/mL 的 300 μ L 5-FU-BSA 缀合物并在室温下温育 3 小时,用 5-FU-BSA 缀合物(实施例 7a 所制备)包被每个孔。用 0.05M pH = 9.6 的碳酸氢钠洗涤孔,接着在室温下用 400 μ L 5% 的蔗糖、0.2% 酪蛋白酸钠溶液阻断 30 分钟。除去包被后溶液后,在板在 37°C 下干燥过夜。

[0186] 实施例 11b

[0187] 用 5-FU 衍生物 6-BSA 缀合物的微量滴定板敏化过程

[0188] 在为蛋白质结合而优化的且每板含有 96 孔的聚苯乙烯微量滴定板(Nunc MaxiSorp C8 或 F8 Immunomodules)中进行测量 5-FU 浓度的 ELISA 方法。通过添加在 0.05M pH = 9.6 的碳酸氢钠中 10 μ g/mL 的 300 μ L 5-FU-BSA 缀合物并在室温下温育 3 小时,用 5-FU-BSA 缀合物(实施例 7b 所制备)包被每个孔。用 0.05M pH = 9.6 的碳酸氢钠洗涤孔,接着在室温下用 375 μ L 5% 的蔗糖、0.2% 酪蛋白酸钠溶液阻断 30 分钟。除去包被后溶液后,在板在 37°C 下干燥过夜。

[0189] 实施例 12a

[0190] 抗体筛查过程 - 滴定

[0191] 使用由实施例 7a、7b 和 8 所描述的 5-FU-BSA 敏化的微量滴定板进行筛查 5-FU 抗体(在实施例 9 中制备)的 ELISA 方法。通过将含有 5-FU 抗体的抗血清在含有 0.1% BSA

和 0.01% 硫柳汞的磷酸盐缓冲盐水中稀释为 1 : 100、1 : 1000、1 : 10000 和 1 : 100000 进行抗体筛查实验。向每个 5-FU-BSA 敏化的孔（实施例 11a、11b 和 10 所制备）中添加 100 μ L 稀释的抗体，并在室温下摇动温育 10 分钟。在此温育过程中，抗体结合到孔中的 5-FU- 缀合物。用 0.02M TRIS、0.9% NaCl、0.5% Tween-80 和 0.001% 硫柳汞，pH7.8 洗涤板孔三次，除去任何未结合的抗体。为了检测孔中结合到 5-FU-BSA 缀合物的 5-FU 抗体的量，将用 0.1% BSA、0.05% ANS、0.01% 硫柳汞在 PBS 中稀释 1/2000 的、能特异结合鼠类免疫球蛋白并且当用底物温育时可以产生有色产物的 100 μ L 的山羊抗小鼠抗体 -HRP 酶缀合物 (Jackson Immunoresearch) 添加到各孔中。在室温下摇动温育 10 分钟后，在该期间山羊抗小鼠抗体 -HRP 酶缀合物在孔中结合 5-FU 抗体，再洗涤该板三次以除去未结合的山羊抗小鼠抗体 -HRP 酶缀合物。为了显出孔中的可测颜色，洗涤后接着添加 100 μ L 用于 HRP 的底物 TMB (TMB Liquid Substrate, Sigma 或 BioF_x)，以在室温下摇动温育 10 分钟显色。显色温育后，向各孔中添加 50 μ L 终止液（在去离子水中 1.5% 的氟化钠），以终止显色，摇动 10 秒后测定 650nm 时的吸光度 (Molecular Devices Plate Reader)。孔中抗体的量与所测的吸光度是成比例的，并表示为产生吸光度为 1.5 的稀释度（滴度）。通过画出所测抗体 (x 轴) 的对数抗体稀释度与 650nm 的吸光度 (y 轴) 的图，并推知吸光度为 1.5 时的滴度。该滴度确定了用于实施例 13、14 和 15 描述的间接竞争微量滴定板分析的抗体浓度（稀释度）。

[0192] 实施例 12b

[0193] 抗体筛查过程 - 单克隆筛查

[0194] 使用由实施例 7b 所描述的 5-FU-BSA 敏化的微量滴定板进行筛查 5-FU 单克隆抗体（在实施例 9 中制备）的 ELISA 方法。向每个 5-FU-BSA 敏化的孔（实施例 11b 所制备）中添加含有 0.1% BSA 和 0.01% 硫柳汞的磷酸盐缓冲盐水 50 μ L，并接着添加 50 μ L 单克隆培养物上清液，在室温下摇动温育 10 分钟。在此温育过程中，抗体结合孔中的 5-FU- 缀合物。用 0.02M TRIS、0.9% NaCl、0.5% Tween-80 和 0.001% 硫柳汞，pH7.8 洗涤板孔三次，除去任何未结合的抗体。为了检测孔中结合 5-FU-BSA 缀合物的 5-FU 抗体的量，将用 0.1% BSA、0.05% ANS、0.01% 硫柳汞在 PBS 中稀释为预定的比活性（约 1/2000）的、能特异结合鼠类免疫球蛋白并且当用底物温育时产生有色产物的 100 μ L 的山羊抗小鼠抗体 -HRP 酶缀合物 (Jackson Immunoresearch) 添加到各孔中。在室温下摇动温育 10 分钟后，在该期间山羊抗小鼠抗体 -HRP 酶缀合物在孔中结合 5-FU 抗体，再洗涤该板三次以除去未结合的山羊抗小鼠抗体 -HRP 酶缀合物。为了显出孔中的可测颜色，洗涤后接着添加 100 μ L 用于 HRP 的底物 TMB (TMB Liquid Substrate, Sigma 或 BioF_x)，以在室温下摇动温育 10 分钟时显色。显色温育后，向各孔中添加 50 μ L 终止液（在去离子水中 1.5% 的氟化钠），以终止显色，摇动 10 秒后测定 650nm (Molecular Devices Plate Reader) 时的吸光度。孔中抗体的量与所测的吸光度是成比例的。具有大于两倍背景的吸光度的样品指定为阳性。

[0195] 实施例 13

[0196] 测定 IC₅₀ 以及抗体与 5-FU 衍生物 4 缀合物的交叉反应性的间接竞争微量滴定板免疫测定过程

[0197] 使用由实施例 7a 描述的 5-FU-BSA 敏化的微量滴定板进行测量 5-FU 浓度的 ELISA 方法。将 5-FU、尿嘧啶、胸腺嘧啶、胞嘧啶和喃氟啶在 PBS 中稀释 10 倍浓度范围为

0.01-10000ng/mL。通过温育 50 μ L 的分析物进行分析,用稀释为实施例 12a 中测定的滴度的 50 μ L 抗体(用实施例 5 的免疫原在实施例 9 中制备)测量。在 10 分钟的温育过程中(室温下,摇动),存在抗体竞争结合孔中 5-FU 缀合物和溶液中的分析物。这种温育后,用 0.02M TRIS、0.9% NaCl、0.5% Tween-80 和 0.001% 硫柳汞, pH7.8 洗涤板孔三次,除去任何未结合的物质。为了检测孔中结合到 5-FU-BSA 缀合物的 5-FU 抗体的量,将用 0.1% BSA、0.05% ANS、0.01% 硫柳汞在 PBS 中稀释 1/2000、能特异结合鼠类免疫球蛋白并且当用底物温育时产生有色产物的 100 μ L 的山羊抗小鼠抗体-HRP 酶缀合物(Jackson Immunoresearch)添加到各孔中。在室温下摇动温育 10 分钟后,在该期间山羊抗小鼠抗体-HRP 酶缀合物在孔中结合 5-FU 抗体,再洗涤该板三次以除去未结合的第二缀合物。为了显出孔中的可测颜色,洗涤后接着添加 100 μ L 用于 HRP 的底物 TMB(TMB Liquid Substrate, Sigma 或 BioF_x),以在室温下摇动温育 10 分钟显色。显色温育后,向各孔中添加 50 μ L 终止液(在去离子水中 1.5% 的氟化钠),以终止显色,摇动 10 秒后测定 650nm(Molecular Devices Plate Reader) 时的吸光度。孔中抗体的量与所测的吸光度是成比例的,且与样品中 5-FU 的量成反比。将含有分析物的孔中颜色的吸光度与没有分析物的比较,产生标准曲线。给定分析物的 IC₅₀ 值定义为要求抑制不含有分析物的孔的 50% 的吸光度的分析物的浓度。将给定分析物的交叉反应性计算为表达成百分比的 5-FU 的 IC₅₀ 与尿嘧啶、胸腺嘧啶、胞嘧啶和喃氟啶的 IC₅₀ 的比例。当用实施例 5 的免疫原在实施例 9 中产生的抗体测量时,相对于 5-FU,尿嘧啶、胸腺嘧啶和胞嘧啶的百分比交叉反应性小于 7%,喃氟啶为 200%。结果列于表 I 中。

[0198] 实施例 14

[0199] 测定抗体与 5-FU 衍生物 13 缀合物的 IC₅₀ 和交叉反应性的间接竞争微量滴定板免疫测定过程

[0200] 使用由实施例 8 描述的 5-FU-BSA 敏化的微量滴定板进行测量 5-FU 浓度的 ELISA 方法。将 5-FU、尿嘧啶、胸腺嘧啶、胞嘧啶和喃氟啶在 PBS 中稀释 10 倍浓度范围为 0.01-10000ng/mL。通过温育 50 μ L 的分析物进行分析,用稀释为实施例 12a 中测定的滴度的 50 μ L 抗体(在实施例 9 中制备)测量。在 10 分钟的温育过程中(室温下,摇动),在孔中抗体竞争结合 5-FU 缀合物和溶液中的分析物。这种温育后,用 0.02M TRIS、0.9% NaCl、0.5% Tween-80 和 0.001% 硫柳汞, pH7.8 洗涤板孔三次,除去任何未结合的物质。为了检测孔中结合 5-FU-BSA 缀合物的 5-FU 抗体的量,将用 0.1% BSA、0.05% ANS、0.01% 硫柳汞在 PBS 中稀释 1/2000、能特异结合鼠类免疫球蛋白并且当用底物温育时产生有色产物的 100 μ L 的山羊抗小鼠抗体-HRP 酶缀合物(Jackson Immunoresearch)添加到各孔中。在室温下摇动温育 10 分钟后,在该期间山羊抗小鼠抗体-HRP 酶缀合物在孔中结合 5-FU 抗体,再洗涤该板三次以除去未结合的第二缀合物。为了显出孔中的可测颜色,接着添加 100 μ L 用于 HRP 的底物 TMB(TMB Liquid Substrate, Sigma 或 BioF_x),以在室温下摇动温育 10 分钟显色。显色温育后,向各孔中添加 50 μ L 终止液(在去离子水中 1.5% 的氟化钠),以终止显色,摇动 10 秒后测定 650nm(Molecular Devices Plate Reader) 时的吸光度。孔中抗体的量与所测的吸光度是成比例的,且与样品中 5-FU 的量成反比。将含有分析物的孔中颜色的吸光度与没有分析物的比较,产生标准曲线。给定分析物的 IC₅₀ 值定义为要求抑制不含有分析物的孔的 50% 的吸光度的分析物的浓度。将给定分析物的交叉反应性计算为表达成百分比的 5-FU 的 IC₅₀ 与尿嘧啶、胸腺嘧啶、胞嘧啶和喃氟啶的 IC₅₀ 比例。当用实施例

6a 的免疫原在实施例 9 中产生的抗体测量时,相对于 5-FU,尿嘧啶的百分比交叉反应性小于 8%,胞嘧啶的小于 0.03%,嘧啶的小于 1%且胸腺嘧啶约 12%。结果列于表 I 中。

[0201] 实施例 15

[0202] 测定抗体与 5-FU 衍生物 13 缀合物的 IC₅₀ 和交叉反应性的间接竞争微量滴定板免疫测定过程

[0203] 使用由实施例 7b 描述的 5-FU-BSA 敏化的微量滴定板进行测量 5-FU 浓度的 ELISA 方法。取决于样品,将 5-FU、尿嘧啶、胸腺嘧啶、胞嘧啶和嘧啶在 PBS 中稀释 10 倍浓度范围为 0.1-1000000ng/mL。通过温育 50 μL 的分析物进行分析,用稀释为实施例 12a 中测定的滴度的 50 μL 抗体(在实施例 9 中制备)测量。在 10 分钟的温育过程中(室温下,摇动),在孔中抗体竞争结合 5-FU 缀合物和溶液中的分析物。这种温育后,用 0.02M TRIS、0.9% NaCl、0.5% Tween-80 和 0.001% 硫柳汞, pH7.8 洗涤板孔三次,除去任何未结合的物质。为了检测孔中结合 5-FU-BSA 缀合物的 5-FU 抗体的量,将用 0.1% BSA、0.05% ANS、0.01% 硫柳汞在 PBS 中稀释为预定的比活性(约 1/2000)、能特异结合鼠类免疫球蛋白当且用底物温育时产生有色产物的 100 μL 的山羊抗小鼠抗体-HRP 酶缀合物(Jackson Immunoresearch)添加到各孔中。在室温下摇动温育 10 分钟后,在该期间山羊抗小鼠抗体-HRP 酶缀合物在孔中结合 5-FU 抗体,再洗涤该板三次以除去未结合的第二缀合物。为了显出孔中的可测颜色,洗涤后接着添加 100 μL 用于 HRP 的底物 TMB(TMB Liquid Substrate, Sigma 或 BioF_x),以在室温下摇动温育 10 分钟显色。显色温育后,向各孔中添加 50 μL 终止液(在去离子水中 1.5% 的氟化钠),以终止显色,摇动 10 秒后测定 650nm(Molecular Devices Plate Reader) 时的吸光度。孔中抗体的量与所测的吸光度是成比例的,且与样品中 5-FU 的量成反比。将含有分析物的孔中颜色的吸光度与没有分析物的作比较,产生标准曲线。给定分析物的 IC₅₀ 值定义为要求抑制不含有分析物的孔的 50% 的吸光度的分析物的浓度。将给定分析物的交叉反应性计算为表达成百分比的 5-FU 的 IC₅₀ 与尿嘧啶、胸腺嘧啶、胞嘧啶和嘧啶的 IC₅₀ 比例。当用实施例 6b 的免疫原在实施例 9 中产生的单克隆抗体测量时,相对于 5-FU,尿嘧啶的百分比交叉反应性小于 8%,胞嘧啶的小于 0.01%,嘧啶的约为 1% 且胸腺嘧啶小于 4%。结果列于表 II 中。

[0204] 表 1:使用多克隆抗体具有相关化合物的 5- 氟尿嘧啶免疫测定的交叉反应性

[0205]

免疫测定系统		交叉反应性				
免疫原	板包被缀合物	5-氟尿嘧啶	尿嘧啶	胸腺嘧啶	胞嘧啶	喃氟啶
1-取代的 KLH 免疫原 (方案 1, 化合物 4, 实施例 5) 化合物 II-B	3-取代的 BSA 缀合物 (10: 1 比例) (方案 3a, 化合物 12, 实施例 7a) 化合物 II-A	100.0%	4.0%	6.7%	<0.1%	200.0%
3-取代的 BTG 免疫原 (方案 3a, 化合物 12, 实施例 6a) 化合物 II-A	1-取代的 BSA 缀合物 (20: 1 比例) (方案 2, 化合物 5, 实施例 8) 化合物 II-B	100.0%	7.5%	12.0%	<0.3%	0.5%

[0206] 表 2: 用 3-取代的 -5-FU 化合物 -BSA 缀合物 (实施例 7b) 包被的平板使用 3-取代的 -KLH (实施例 6b) 的单克隆抗体的 5-氟尿嘧啶免疫测定的交叉反应性

[0207]

免疫测定系统		交叉反应性				
免疫原	板包被缀合物	5-氟尿嘧啶	尿嘧啶	胸腺嘧啶	胞嘧啶	喃氟啶
3-取代的 KLH 免疫原 (方案 3a, 化合物 12, 实施例 6b) 化合物 II-A	3-取代的 BSA 缀合物 (方案 3b, 化合物 6, 实施例 7b) 化合物 II-A	100.0%	7.3%	3.2%	<0.01%	1.0%

[0208] 这些表中的结果证明由式 II-A 的化合物形成免疫原以及由式 II-A 或 II-B 的化合物形成的试剂的重要性。从这些结果可以看出, 当免疫原是由式 II-A 而不是由 II-B 形成时, 产生不与喃氟啶交叉反应的抗体。是通过由式 II-A 化合物的免疫原提供的抗体以及由 II-A 或 II-B 的化合物提供的试剂载体产生了准确的 5-FU 免疫测定, 以监控用 5-FU 治疗的患者。

专利名称(译)	5-氟-尿嘧啶免疫测定		
公开(公告)号	CN101147063B	公开(公告)日	2014-02-12
申请号	CN200680009624.3	申请日	2006-02-02
[标]申请(专利权)人(译)	萨拉戴克斯生物医学公司		
申请(专利权)人(译)	萨拉戴克斯生物医学公司		
当前申请(专利权)人(译)	萨拉戴克斯生物医学公司		
[标]发明人	S萨拉莫内 JB考特尼 D斯托克		
发明人	S·萨拉莫内 J·B·考特尼 D·斯托克		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/551 G01N37/00 C07K16/00 C07K1/10 C07D291/06		
CPC分类号	Y10S435/81 Y10S435/975 G01N33/94 Y10S435/961 Y10S530/811 Y10S436/815 Y10T436/13		
代理人(译)	林晓红		
审查员(译)	陈宁		
优先权	11/053480 2005-02-08 US		
其他公开文献	CN101147063A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

新型5-氟-尿嘧啶的缀合物和新型5-氟-尿嘧啶免疫原以及由这些免疫原产生的单克隆抗体，这些免疫原用于定量和监控生物分泌物中5-氟-尿嘧啶的免疫测定。

...great activity of a substituted
...orouracil-1-acetamides.
...lection of czechoslovak chemical
...ications》.1982, 第47卷(第10
...2806 — 2813.

审查员 陈宁