

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580025440.1

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)  
G01N 33/531 (2006.01)  
C12P 17/02 (2006.01)  
A61K 31/337 (2006.01)  
C07K 16/44 (2006.01)  
C07K 17/06 (2006.01)

[43] 公开日 2007年8月15日

[11] 公开号 CN 101019024A

[22] 申请日 2005.7.28

[21] 申请号 200580025440.1

[30] 优先权

[32] 2004.7.29 [33] US [31] 60/592,017

[32] 2005.1.27 [33] US [31] 11/044,667

[86] 国际申请 PCT/US2005/026748 2005.7.28

[87] 国际公布 WO2006/015098 英 2006.2.9

[85] 进入国家阶段日期 2007.1.29

[71] 申请人 萨拉达克斯生物医疗公司

地址 美国宾夕法尼亚州

[72] 发明人 S·萨拉蒙 J·B·库尔特尼  
D·斯托克

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
代理人 程 淼 梁 谋

权利要求书 13 页 说明书 28 页

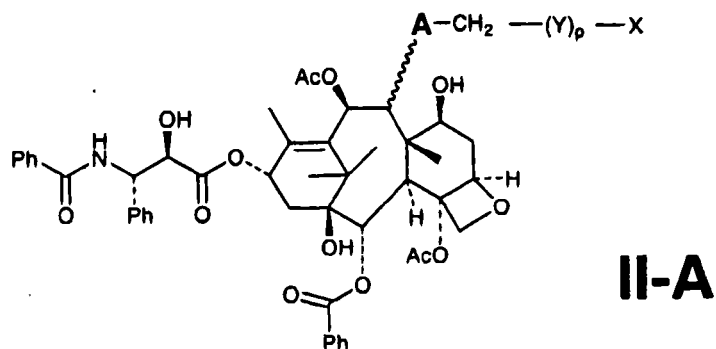
[54] 发明名称

紫杉醇免疫测定法

[57] 摘要

紫杉醇的新的缀合物和衍生自紫杉醇的 9 和 7 位的新的免疫原和通过这些连接紫杉醇的免疫原产生的单克隆抗体可用于免疫测定法,以对生物流体中的紫杉醇进行定量和监测。

1. 用于检测样品中紫杉醇的免疫测定法，所述测定法包括：提供样品的混合物，含有与紫杉醇选择性反应并且不与 6- $\alpha$ -羟基紫杉醇和 3'-对-羟基紫杉醇实质性交叉反应的抗体以及载体与下式化合物：



其中 A 是  $-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$  或  $=\text{N}-\text{O}-$ ;

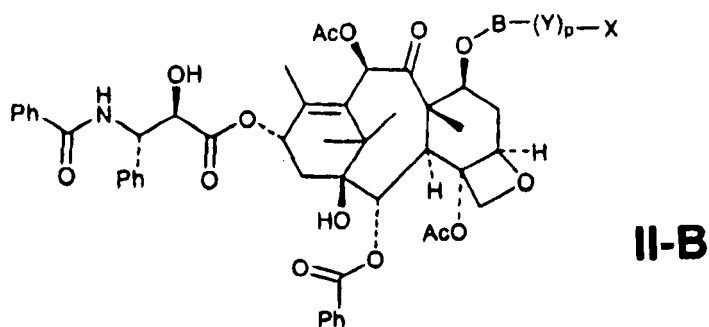
Y 是有机间隔基团；

X 是能够与多胺聚合物结合的末端官能团；

p 是从 0 到 1 的整数；

Ph 是苯基；

或者下式化合物：



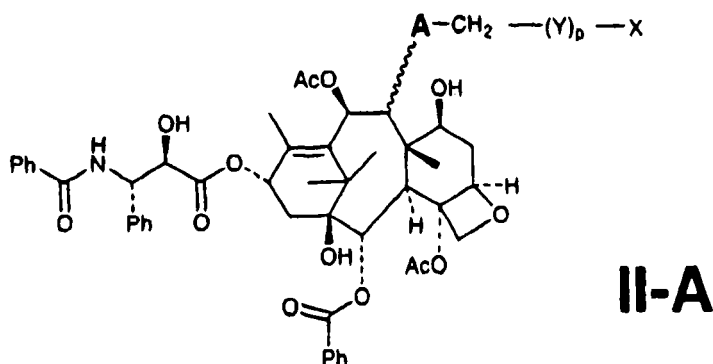
其中 X、Y 和 p 如上所述并且 B 是  $-\text{CH}_2-$  或者  $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{CH}_2-$

或者它们的混合物的缀合物，

导致样品中的紫杉醇和所述缀合物与所述抗体结合，之后测量所述混合物中结合或未结合所述抗体的所述缀合物的量，从而可以确定样品中紫杉醇的存在。

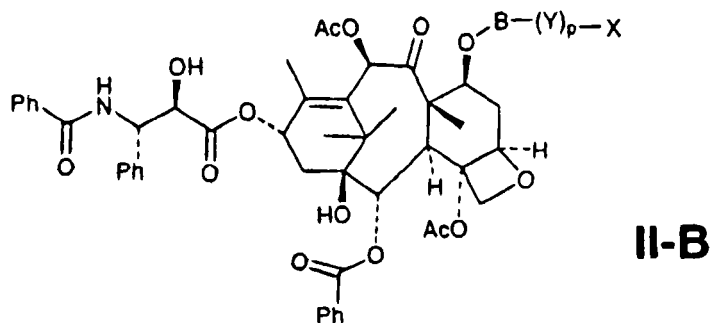
2. 权利要求 1 的方法，其中样品是人样品。

3. 权利要求 2 的免疫测定法，其中从下述免疫原产生所述抗体，所述免疫原包含连接到下式化合物：



其中 X、Y 和 A 如上面定义；

或者下式化合物：



其中 p、Y、X 和 B 如上面定义；

或者其混合物的免疫原性聚合物。

4. 权利要求 2 的免疫测定法，其中所述抗体附着到固体支持物。

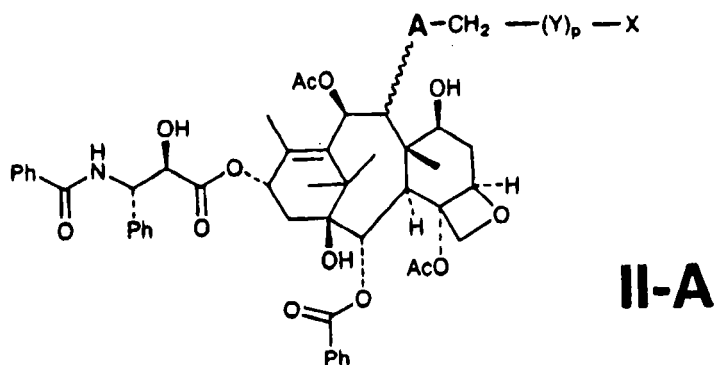
5. 权利要求 4 的免疫测定法，其中所述固体支持物是微滴定板。

6. 权利要求 4 的免疫测定法，其中所述固体支持物是纳米微粒。

7. 抗体，其选择性结合紫杉醇并且不与 6- $\alpha$ -羟基紫杉醇和 3'-对-

羟基紫杉醇实质性结合。

8. 权利要求 7 的抗体，其中所述抗体来自小鼠、兔或者大鼠。
9. 权利要求 7 的抗体，其中所述抗体是单克隆抗体。
10. 权利要求 8 的抗体，其中所述抗体是单克隆抗体。
11. 权利要求 11 的抗体，其中所述抗体从下述免疫原产生，所述免疫原为多胺聚合物与选自由下式化合物：



其中 A 是  $\text{-NH-C-}$  或  $\text{=N-O-}$ ;

$$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$$

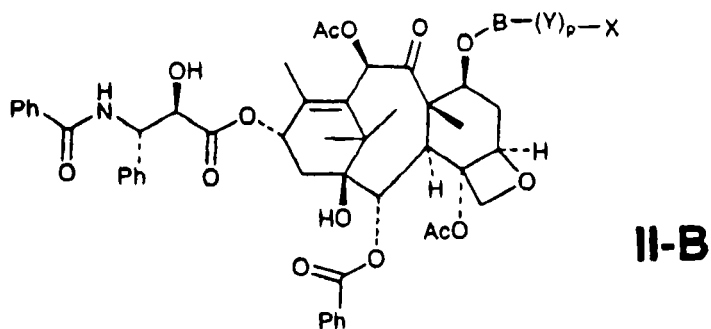
Y 是有机间隔基团；

X 是能够与多胺聚合物结合的末端官能团；

p 是从 0 到 1 的整数；

Ph 是苯基；

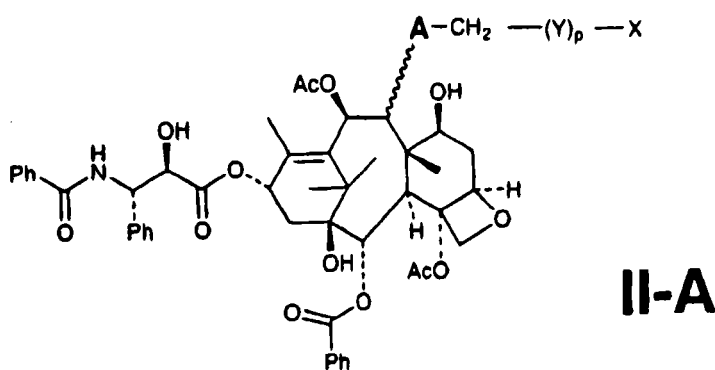
或者下式化合物：



其中 X、Y 和 p 如上所述并且 B 是  $-\text{CH}_2-$  或者  $\begin{array}{c} \cdot\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2\cdot \\ || \\ \text{O} \end{array}$

或者它们的混合物组成的组的化合物的缀合物。

12. 权利要求 11 的抗体，其中所述抗体来自小鼠、兔或大鼠。
13. 权利要求 11 的抗体，其中所述抗体是单克隆抗体。
14. 权利要求 12 的抗体，其中所述抗体是单克隆抗体。
15. 下式化合物：



其中 A 是  $-\text{NH}-\text{C}-$  或  $=\text{N}-\text{O}-$ ;  
 $\begin{array}{c} || \\ \text{O} \end{array}$

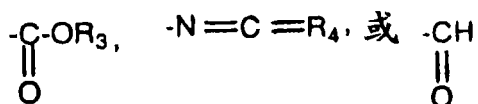
Y 是有机间隔基团；

X 是能够与多胺多肽结合的末端官能团；

p 是从 0 到 1 的整数。

16. 权利要求 15 的化合物，其中 p 是 0。

17. 权利要求 16 的化合物，其中 X 是



其中  $\text{R}_3$  是氢或者与它连接的氧原子一起形成具有反应活性的酯， $\text{R}_4$  是氧或者硫。

18. 权利要求 17 的化合物，其中 X 是  $-\text{C}-\text{OR}_3$  并且  $\text{R}_3$  是氢。  
 $\begin{array}{c} || \\ \text{O} \end{array}$

19. 权利要求 17 的化合物，其中 X 是  $-\text{C}-\text{OR}_3$  并且  $\text{R}_3$  形成具有反应  
 $\begin{array}{c} || \\ \text{O} \end{array}$

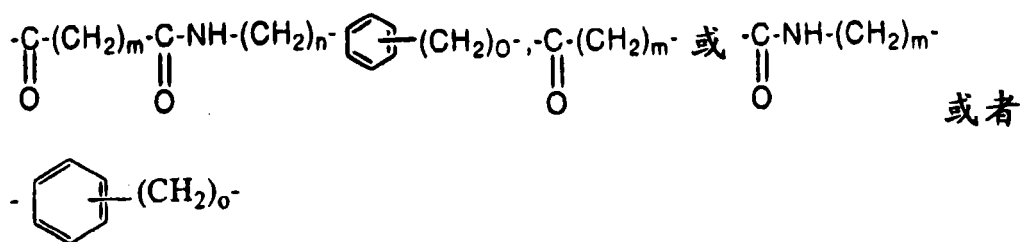
活性的酯。

20. 权利要求 19 的化合物，其中所形成的酯是低级烷基酯、亚氨

基酯或者氨基酯(amidoester)。

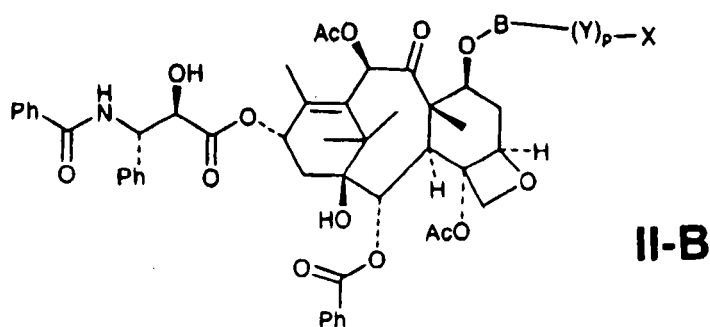
21. 权利要求 15 的化合物, 其中 p 是 1。

22. 权利要求 21 的化合物, 其中 Y 是含有 1 到 10 个碳原子的亚烷基、



其中 n 和 o 是从 0 到 6 的整数, m 是 1 到 6 的整数。

23. 下式化合物:



其中 Y 是有机间隔基团;

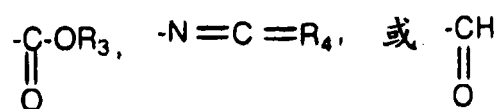
X 是能够与多胺多肽结合的末端官能团;

B 是  $\text{-CH}_2\text{-}$  或者  $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{-C-NH-CH}_2\text{-} \end{array}$

或者其混合物。

24. 权利要求 23 的化合物, 其中 p 是 0。

25. 权利要求 24 的化合物, 其中 X 是



其中  $\text{R}_3$  是氢或者与它连接的氧原子一起形成具有反应活性的酯,

$R_4$  是氧或者硫。

26. 权利要求 25 的化合物, 其中 X 是  $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OR}_3$  并且  $R_3$  是氢。

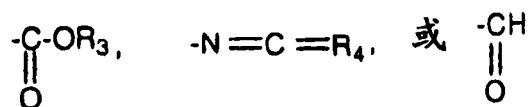
27. 权利要求 26 的化合物, 其中 X 是  $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OR}_3$  并且  $R_3$  形成具有反

应活性的酯。

28. 权利要求 27 的化合物, 其中所形成的酯是低级烷基酯、亚氨基酯或者氨基酯。

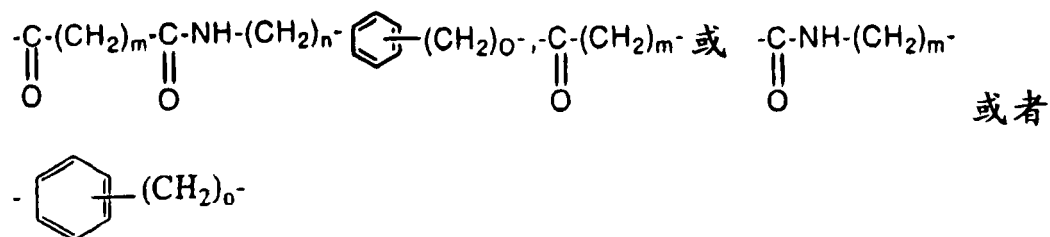
29. 权利要求 23 的化合物, 其中 p 是 1。

30. 权利要求 29 的化合物, 其中 X 是



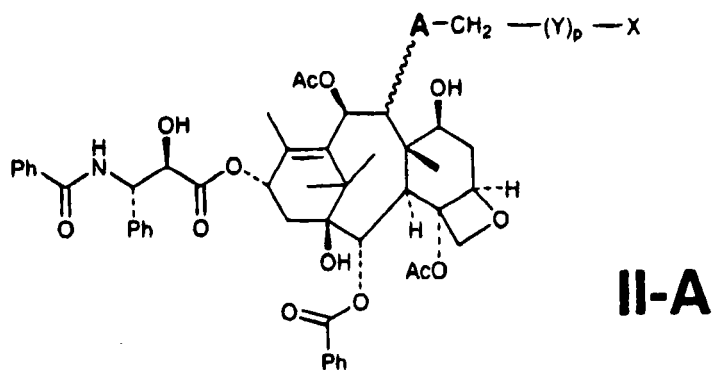
其中  $R_3$  是氢或者与它连接的氧原子一起形成具有反应活性的酯,  $R_4$  是氧或者硫。

31. 权利要求 30 的化合物, 其中 Y 是含有 1 到 10 个碳原子的亚烷基、



其中 n 和 o 是从 0 到 6 的整数, m 是 1 到 6 的整数。

32. 载体与下式化合物:



其中 A 是  $-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$  或  $=\text{N}-\text{O}-$ ;

Y 是有机间隔基团;

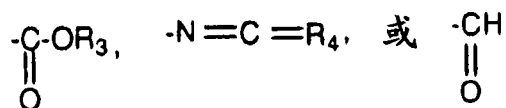
X 是能够与多胺多肽结合的末端官能团;

p 是从 0 到 1 的整数;

的缀合物。

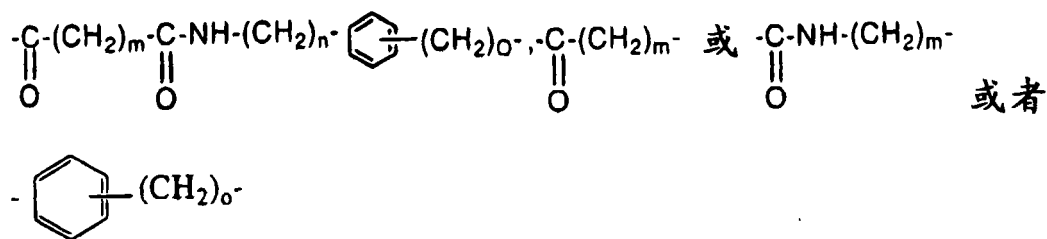
33. 权利要求 32 的缀合物, 其中 p 是 0。

34. 权利要求 33 的缀合物, 其中 X 是



其中  $\text{R}_3$  是氢或者与它连接的氧原子一起形成具有反应活性的酯,  
 $\text{R}_4$  是氧或者硫。

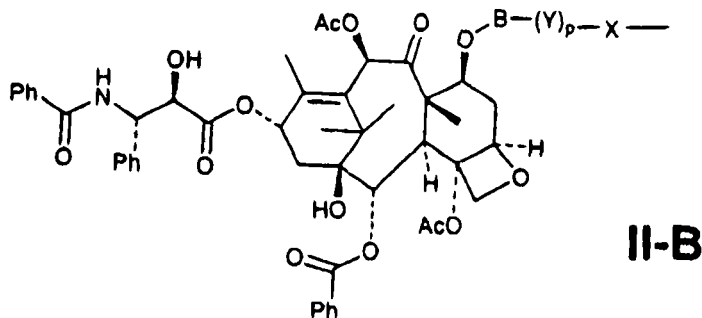
35. 权利要求 32 的缀合物, 其中 p 是 1 并且 Y 是含有 1 到 10 个  
 碳原子的亚烷基、



其中 n 和 o 是从 0 到 6 的整数, m 是 1 到 6 的整数。

36. 权利要求 35 的缓合物，其中所述载体含有通过  $\begin{matrix} \text{-C-} \\ || \\ \text{O} \end{matrix}$  或  $\begin{matrix} \text{-NH-C-} \\ || \\ \text{R}_4 \end{matrix}$  连接的一个或多个氨基基团，其中  $\text{R}_4$  是氧或者硫。

37. 下式化合物：

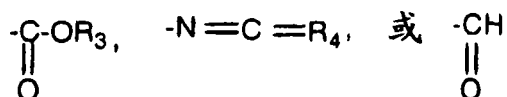


其中 X、Y 和 p 如上所述并且 B 是  $\begin{matrix} \text{-CH}_2\text{-} \\ || \\ \text{O} \end{matrix}$  或者  $\begin{matrix} \text{-C-NH-CH}_2\text{-} \\ || \\ \text{O} \end{matrix}$

或者它们的混合物。

38. 权利要求 37 的化合物，其中 p 是 0。

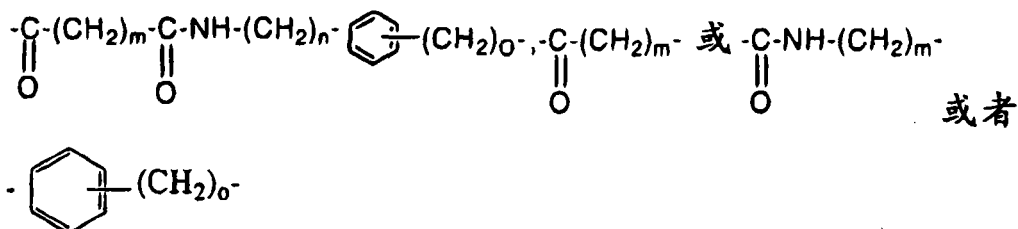
39. 权利要求 38 的化合物，其中 X 是



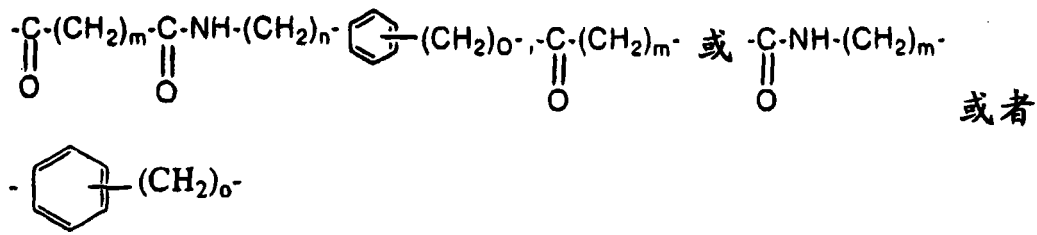
其中  $\text{R}_3$  是氢或者与它连接的氧原子一起形成具有反应活性的酯， $\text{R}_4$  是氧或者硫。

40. 权利要求 37 的化合物，其中 p 是 1。

41. 权利要求 40 的化合物，其中 Y 是含有 1 到 10 个碳原子的亚烷基、



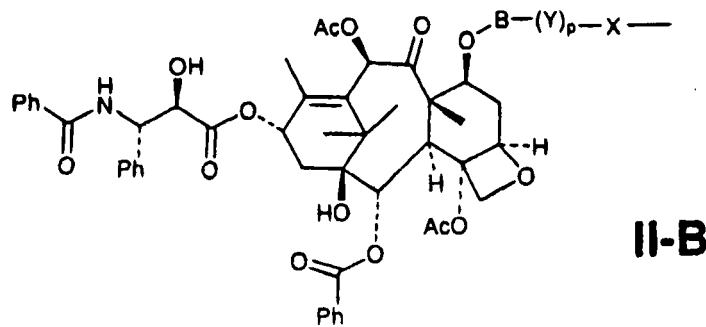




其中 n 和 o 是从 0 到 6 的整数, m 是 1 到 6 的整数。

47. 权利要求 46 的化合物, 其中所述免疫原性聚合物含有通过  
 $\begin{array}{c} \text{-C- 或 -NH-C-} \\ \parallel \qquad \qquad \parallel \\ \text{O} \qquad \qquad \text{R}_4 \end{array}$ 
 连接的一个或多个氨基基团, 其中 R<sub>4</sub> 是氧或者硫。

48. 免疫原, 其包含连接到下式化合物:



其中 A 是  $\begin{array}{c} \text{-NH-C- 或 =N-O-} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$ ;

Y 是有机间隔基团;

X 是能够与多胺多肽结合的末端官能团;

p 是从 0 到 1 的整数;

的免疫原性多胺聚合物。

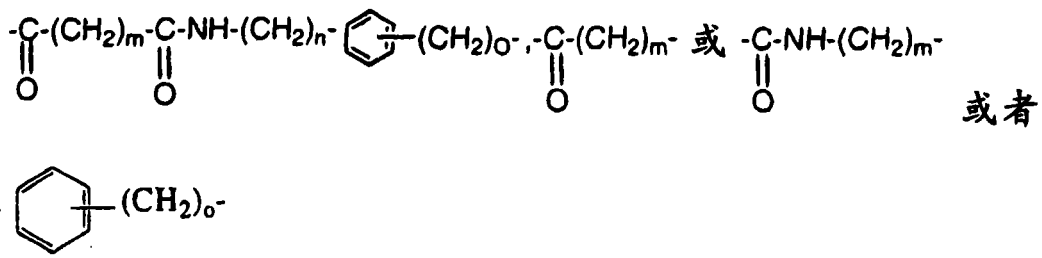
49. 权利要求 48 的化合物, 其中 p 是 0。

50. 权利要求 49 的化合物, 其中所述免疫原性聚合物含有通过  
 $\begin{array}{c} \text{-C- 或 -NH-C-} \\ \parallel \qquad \qquad \parallel \\ \text{O} \qquad \qquad \text{R}_4 \end{array}$ 
 连接的一个或多个氨基基团,

其中 R<sub>4</sub> 是氧或者硫。

51. 权利要求 48 的化合物, 其中 p 是 1。

52. 权利要求 51 的化合物, 其中 Y 是含有 1 到 10 个碳原子的亚烷基。

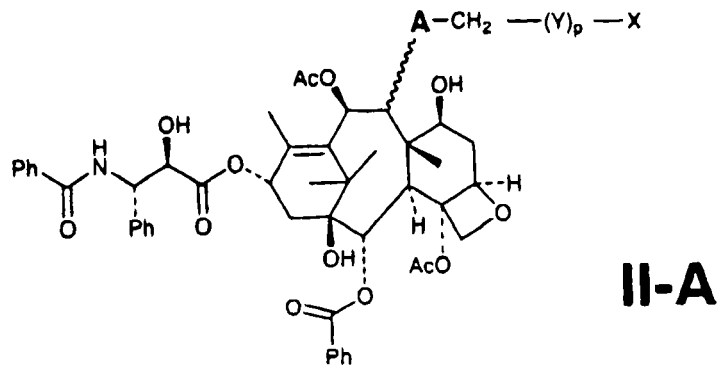


其中  $n$  和  $o$  是从 0 到 6 的整数,  $m$  是 1 到 6 的整数。

53. 权利要求 52 的化合物, 其中所述免疫原性聚合物含有通过  $\text{-C(=O)-}$  或  $\text{-NH-C(=O)-}$  连接的一个或多个氨基基团,

其中  $R_4$  是氧或者硫。

54. 试剂盒, 其用于测定患者样品中紫杉醇的存在, 该试剂盒包含分开的容器中的试剂, 一种试剂是载体与选自由下式化合物:



其中 A 是  $\text{-NH-C(=O)-}$  或  $\text{=N-O-}$ ;

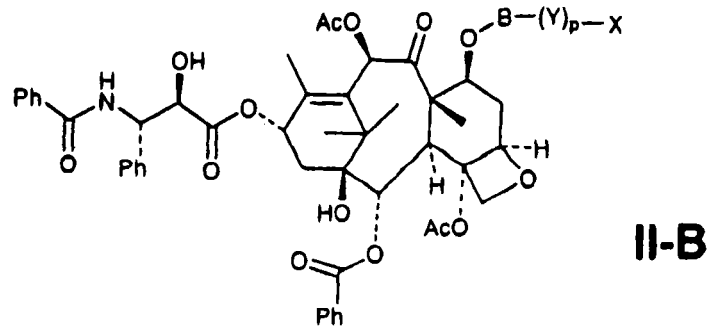
Y 是有机间隔基团;

X 是能够与多胺聚合物结合的末端官能团;

$p$  是从 0 到 1 的整数;

Ph 是苯基;

或者下式化合物:



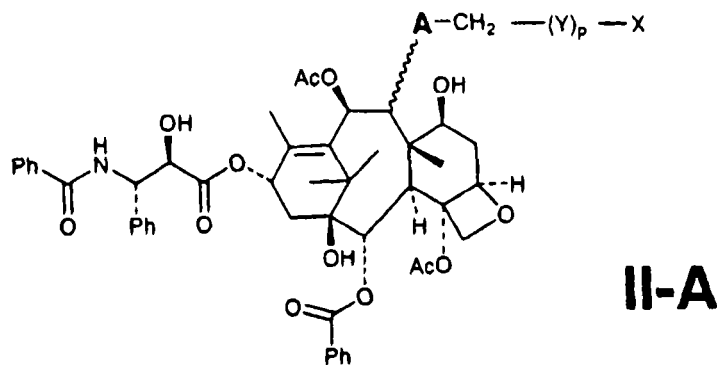
其中 X、Y 和 p 如上所述并且 B 是  $-\text{CH}_2-$  或者  $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-\text{CH}_2-$

或者它们的混合物组成的组的化合物的缀合物；第二个容器含有与紫杉醇高度选择性反应并且不与 6- $\alpha$ -羟基紫杉醇和 3'-对-羟基紫杉醇实质性交叉反应的抗体。

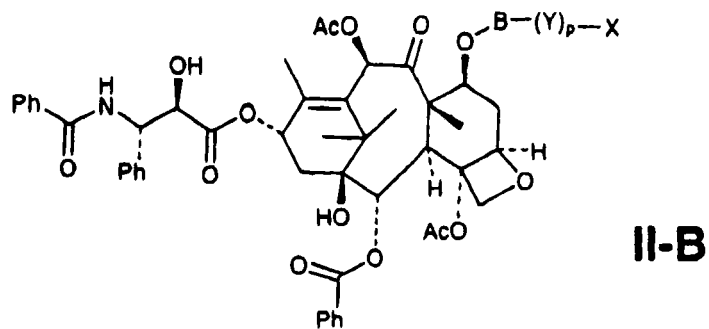
55. 权利要求 54 的试剂盒，其中所述缀合物以预定量存在于所述第一个容器中。

56. 权利要求 55 的试剂盒，所述试剂盒用于测定所述样品中紫杉醇的量。

57. 权利要求 54 的试剂盒，其中所述抗体从免疫原产生，该免疫原是连接到选自由下式化合物：



其中 A、Y、X 和 p 如上述；  
或下式化合物：



其中  $p$ 、 $Y$ 、 $X$  和  $B$  如上述；

或者其混合物组成的组的化合物的免疫原性多胺多肽。

## 紫杉醇免疫测定法

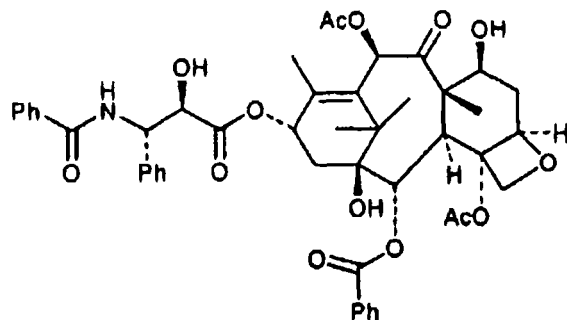
## 发明领域

本发明涉及免疫测定法领域，该测定法用于确定人类生物流体中紫杉醇的存在和/或对人类生物流体中的紫杉醇进行定量，以快速确定化学疗法期间最佳的药物浓度。

## 发明背景

癌症是用于描述一组恶性肿瘤的术语，所述恶性肿瘤都具有共同的发展性状，此时身体的部分中的细胞开始失去控制地生长。多数癌症形成肿瘤，但是还可以在血液中呈现和循环穿过它们生长处的其它组织。最通常用手术、化学疗法和/或放射疗法组合治疗癌症恶性肿瘤。用于治疗特定癌症的治疗的类型取决于几种因素，包括癌症恶性肿瘤的类型和它们被诊断时所处的阶段。

紫杉醇 (taxol) 也称作紫杉醇 (paclitaxel)，是用于治疗乳腺癌 (Holmes 等人 Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., 10, 60, 1991)、卵巢癌 (Einzig 等人 Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 31, 1114, 1990) 和非小细胞肺癌的最常用的细胞毒性剂之一。紫杉醇具有下面的结构式：



该化合物已与使人虚弱的副作用关联起来，所述副作用例如骨髓密度减小、过敏反应、嗜中性粒细胞减少、低血压、心动过缓 (bradycardia)、恶心和呕吐。通过监视身体中紫杉醇水平和调节剂量，可以更好地控制和限制患者中的这些副作用。

同时，在紫杉醇剂量和所产生的影响治疗效果的血清药物浓度之

间通常存在高度可变的关系。紫杉醇的个体内和个体间药物代谢动力学可变性程度可以高达5倍(Gurney 等人, *J. Clin. Oncol.* 14, pp 2590-2611, 1996)并且受到许多因素的影响, 这些因素包括:

- 器官功能
- 遗传调节
- 疾病状态
- 年龄
- 药物-药物相互作用
- 药物摄入时间
- 药物施用方式, 和
- 与技术相关的施用。

作为该可变性的结果, 不同个体中相等剂量的同一药物可以导致显著不同的临床结果(Hon 等人 *Clinical Chemistry* 44, pp 388-400, 1998)。相同紫杉醇剂量的有效性基于患者中的最终血清药物浓度和个体药物清除率而显著不同。治疗性药物处理将为临床医生提供在口服和静脉内药物施用中对患者差异的了解。使用治疗性药物管理, 药物剂量可以为患者个体化, 并且有效治疗癌症而没有不想要的副作用的机会将高得多。

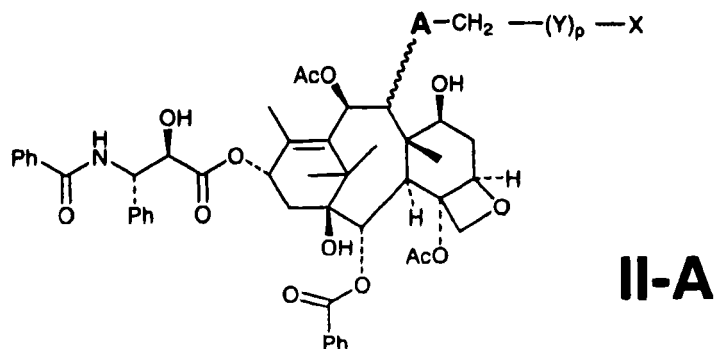
此外, 紫杉醇的治疗性药物管理将作为极好的工具来确保用实际处方剂量施用化学治疗中的依从性 (compliance) 和获得有效的血清浓度水平。已经发现血清浓度的可变性不仅是由于生理因素, 而且还可以由施用技术的变化导致。

紫杉醇的常规治疗性药物管理将需要: 能获得可改造为适于一般实验室设备的简单自动化测试。最好地满足这些标准的测试是免疫测定法。已经报道了针对紫杉醇的免疫测定法和酶联免疫吸附测定 (ELISA) 测定法(Erlanger 等人, 美国专利 5,756,301, 1998年5月26日)。然而, 用于该测定法的衍生物和免疫原会赋予相应抗体与紫杉醇和紫杉醇代谢物 (特别是 6- $\alpha$ -羟基紫杉醇) 的宽范围的交叉反应活性。为了最有效于检测药物水平, 抗体应该对活性化合物最特异并且对非活性代谢物显示出极低的交叉反应活性或者不显示交叉反应活性。

## 发明概述

根据本发明，已经产生了一类新的抗体，它们与紫杉醇高度选择性地反应，从而结合紫杉醇，而与紫杉醇代谢物，尤其是6- $\alpha$ -羟基紫杉醇和3'-对-羟基紫杉醇没有实质的交叉反应活性。选择性地反应是指该抗体仅与紫杉醇分子反应并且不与其它化合物实质性反应，所述其它化合物为诸如紫杉醇代谢物，最重要的阻断代谢物是6- $\alpha$ -羟基紫杉醇和3'-对-羟基紫杉醇。

已经发现通过使用下述免疫原，产生对紫杉醇特异并且不与其它化合物如紫杉醇的代谢物或者相关化合物(如浆果赤霉素 III、3'-对-羟基紫杉醇和6- $\alpha$ -羟基紫杉醇)实质性反应或者结合的抗体，所述免疫原是免疫原性多胺聚合物与下式化合物：



其中 A 是  $\text{-NH-C(=O)-}$  或  $\text{=N-O-}$ ;

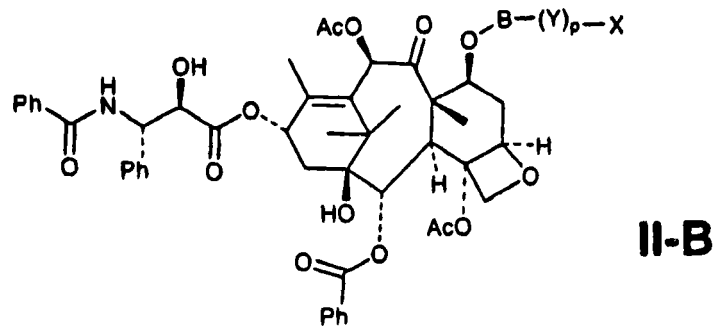
Y 是有机间隔基团;

X 是能够与多胺聚合物结合的末端官能团;

p 是从 0 到 1 的整数;

Ph 是苯基;

或者下式化合物:



其中 Ph、p、Y 和 X 如上并且 B 是  $-\text{CH}_2-$  或者  $\begin{array}{c} \cdot\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2 \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$

或者它们的混合物的缀合物 (conjugate)。这些与紫杉醇高度选择性反应并且不与 6- $\alpha$ -羟基紫杉醇和 3'-对-羟基紫杉醇交叉反应的抗体的提供, 使得可以产生下述免疫测定法, 该测定法能特异性检测和监测用紫杉醇治疗的患者的流体样品中的紫杉醇。本发明还包括用于所述免疫测定法的试剂和试剂盒。作为紫杉醇代谢物的 6- $\alpha$ -羟基紫杉醇和 3'-对-羟基紫杉醇的存在是过去紫杉醇免疫测定法中假阳性读数的主要原因。

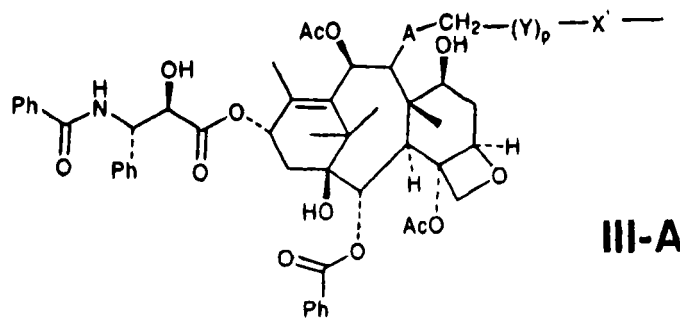
### 发明详述

根据本发明, 提供了一类新的抗体, 其与紫杉醇高度选择性反应并且不与上面提到的紫杉醇代谢物实质性反应或者交叉反应。已经发现通过使用式 II-A 的 9-羰基紫杉醇和式 II-B 的 7-羟基紫杉醇的这些衍生物或者它们的混合物作为免疫原, 提供了本发明的这类新的抗体。通过使用这些抗体, 已经开发了一种免疫测定法, 包括用于该免疫测定法的试剂和试剂盒, 所述免疫测定法用于检测和/或定量血液、血浆或者其它体液样品中的紫杉醇。通过使用该免疫测定法, 可以检测和/或定量体液样品 (优选血样或者血浆样品) 中紫杉醇的存在和量。以这种方式, 可以在治疗期间监测用紫杉醇治疗的患者并且根据所述监测调节对他的治疗。通过本发明, 在用紫杉醇作为化学治疗剂治疗的癌症患者中获得了紫杉醇的治疗性药物管理。

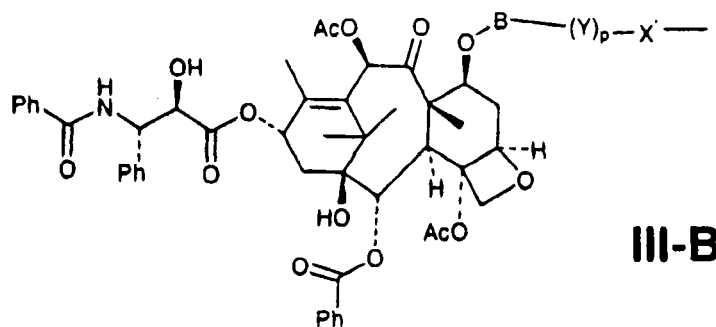
用于本发明的该测定法中的试剂是式 II-A 和 II-B 的化合物或者其混合物与聚合物载体的缀合物。这些缀合物是样品中存在的紫杉醇与本发明抗体结合的竞争性结合配偶体。因此, 与抗体结合的缀合物试

剂的量将与样品中紫杉醇的量成反比。根据本发明，该测定法利用任何传统测量手段检测和测量结合或未结合所述抗体的所述缀合物的量。通过使用所述手段，可以测定结合或未结合的缀合物的量。一般而言，通过将样品中紫杉醇产生的结合的或未结合的缀合物的量的测量值与从含有已知量的紫杉醇的样品得到的标准或者校准曲线确定的结合或未结合的缀合物的值相关联，来测定样品中紫杉醇的量，所述已知量在待测试的样品的预期范围内。使用与用于样品相同的免疫测定步骤确定用于产生校准曲线的这些研究。

从是 II-A 或者 II-B 的化合物或者其混合物制备缀合物以及免疫原。载体的缀合物或者免疫原连接到多胺聚合物配体部分，其具有下式：



其中 Y、A 和 p 如上所述；以及  
x' 是 -CH<sub>2</sub>- 或者官能连接基团；



其中 x'、A、B 和 p 如上所述。

这些配体部分可以连接免疫原的载体或者多胺聚合物上的一个或多个活性位点。

### 定义

在该说明书全文中，下述定义将被这样理解：本申请全文所用的术语“Ph”表示苯基。术语“亚烷基”表示含有1到10个碳原子的二价饱和的直链或者支链烃取代基。

术语“免疫原”和“免疫原性”指能够在生物中引起、产生和生成免疫应答的物质。

术语“缀合物”指从两个部分连接在一起形成的任何物质。根据本发明的代表性缀合物包括通过量小分子(如式 II-A 和 II-B 的化合物)与大分子(如载体或者多胺聚合物，尤其蛋白质)连接在一起形成的缀合物。在缀合物中，小分子可以结合在大分子的一个或多个活性位点。术语缀合物包括术语免疫原。

“半抗原(hapten)”是部分或者不完全的抗原。它们是无蛋白质的物质，多数是低分子量物质，它们不能刺激抗体形成，但是与抗体反应。通过将半抗原偶联到高分子量免疫原载体上然后向人或者动物受试者注射该偶联的产物，即免疫原，可以形成抗体。本发明的半抗原是紫杉醇。

本文所用的“间隔基团”或者“间隔臂(spacer)”指化学结构的一部分，其通过CH<sub>2</sub>或者官能连接基团连接两个或多个亚结构，如半抗原、载体、免疫原、标记或者示踪剂。这些间隔基团将在本申请的下文中列举。间隔基团的原子和间隔基团内链的原子本身通过化学键连接。优选的间隔臂是直链或支链、饱和或不饱和的碳链。这些碳链还可以在链内或者链的末端包括一个或多个杂原子。“杂原子”指不同于碳的原子，其选自氧、氮和硫构成的组。间隔基团还可以包括环状或者芳族基团作为链的一部分或者作为链中一个原子上的取代。

通过对不是氢的原子计数确定间隔基团中原子数。通过对沿着所连接的结构之间最短路径的不是氢的原子计数，确定链中间隔基团内的原子数。官能连接基团可以用于激活半抗原或者间隔基团，例如，在半抗原或者间隔基团上提供可利用的官能位点，用于合成半抗原与标记或者载体或者多胺聚合物的缀合物。

如本文所用的术语“免疫原性载体”是免疫原性物质，通常是蛋白质，所述免疫原性物质可以结合半抗原(在本发明的情况中为紫杉醇或者紫杉醇衍生物)，从而使得这些半抗原衍生物诱导免疫应答和引起可以特异结合这些半抗原的抗体的产生。免疫原性载体和连接基团将在本申请的下文中列举。在免疫原性载体物质中包括被识别为外来的从而引起宿主免疫应答的蛋白质、糖蛋白、复杂聚氨基-多糖、颗粒和核酸。可以使用已知用于该制备的任一传统方法从多糖制备聚氨基-多糖。

多种蛋白质类型也可以用作聚(氨基酸)免疫原性载体。这些类型包括白蛋白、血清蛋白、脂蛋白，等等。阐明性蛋白质包括牛血清白蛋白(BSA)、匙孔血蓝蛋白(KLH)、卵卵白蛋白、牛甲状腺球蛋白(BTG)等等。备选地，可以利用合成的聚(氨基酸)。

免疫原性载体还可以包括聚氨基-多糖，其是通过单糖的反复缩合制备的高分子量聚合物。多糖的实例是淀粉、糖原、纤维素、糖胶，如阿拉伯树胶、琼脂，等等。多糖还可以含有聚氨基酸残基和/或脂类残基。

免疫原性载体还可以是单独存在的聚(核酸)或者缀合到上述聚(氨基酸)或者多糖之一的聚(核酸)。

免疫原性载体还可以包括固体颗粒。颗粒直径通常为至少约 0.2 微米( $\mu\text{m}$ )并且不大于约 100  $\mu\text{m}$ ，通常约 0.05  $\mu\text{m}$  到 10  $\mu\text{m}$ 。颗粒可以是有机或无机的、可膨胀的或不可膨胀的、多孔或无孔的，最好具有接近水的密度，通常为约 0.7 到 1.5g/mL，并且由可以是透明的、部分透明的或者不透明的材料组成。颗粒可以是生物材料，如细胞和微生物，包括下述非限制性的例子，如红细胞、白细胞、淋巴细胞、杂交瘤、链霉菌(*Streptococcus*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*E. coli*)和病毒。颗粒还可以包含有机和无机聚合物、脂质体、乳胶、磷脂小泡或者脂蛋白。

“聚(氨基酸)”或者“多肽”是由氨基酸形成的聚酰胺。聚(氨基酸)将一般在从约 2,000 道尔顿的分子量至没有分子量上限的范围内，通常小于 10,000,000，并且通常不超过约 600,000 道尔顿。取决于免疫原性载体还是酶参与，通常具有不同的分子量范围。

“肽”是通过酰胺(肽)键连接两个或多个氨基酸形成的任何化合

物，通常是 $\alpha$ -氨基酸的聚合物，其中每个氨基酸残基(除了 $\text{NH}_2$ 末端)的 $\alpha$ -氨基连接到线性链的下一个残基的 $\alpha$ -羧基上。术语肽、多肽和聚(氨基酸)在本文中同义地使用，指这类化合物而大小没有限制。该类的最大的成员称作蛋白质。

“标记”、“检测分子”或者“示踪剂”是产生或者可以诱导而产生可检测的信号的任何分子。标记可以缀合到分析物、免疫原、抗体，或者另一分子，如受体或者可以结合受体的分子，如配体，尤其半抗原。标记的非限制性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、荧光剂，或者感光剂；非磁性或者磁性颗粒、固体支持物、脂质体、配体或者受体。

术语“抗体”指抗原的特异蛋白质结合配偶体，并且是对抗原而非其它物质具有特异结合亲和力的任何物质，或者一组物质。通用术语抗体包括多克隆抗体、单克隆抗体和抗体片段。

术语“衍生物”指通过一种或多种化学反应从亲本化合物制备的化合物或者分子。

术语“载体”指固体颗粒和/或聚合性聚合物，如免疫原性聚合物，如上面提到的免疫原性聚合物。当载体是固体颗粒时，固体颗粒可以结合或者附着到多胺聚合物上，或被多胺聚合物包被，以提供一个或多个反应活性位点用于结合式 II-A 和 II-B 的化合物中的末端官能团 X。

术语“试剂试剂盒”或者“测试试剂盒”指用于进行测定法的一组物质。试剂可以以处于相同或分开容器中的被包装组合的形式提供，这取决于它们的交叉法反应活性和稳定性，并且其可以为液体或者冻干的形式。可以选择试剂盒中提供的试剂的量和比例从而为特定应用提供最佳结果。体现本发明的特征的试剂试剂盒包含对紫杉醇特异的抗体。试剂盒可以还包含分析物的配体和校准和对照物质。试剂可以保持为液体形式或者可以是冻干的。

短语“校准和对照物质”指含有已知量的待测药物的标准或者参比物质。通过比较从未知样品得到的结果与从标准品得到的结果计算药物的浓度。这通常通过构建校准曲线来进行。

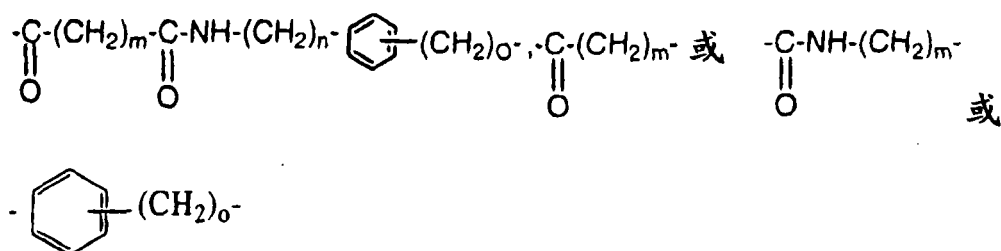
术语“生物样品”包括，但不限于，来自活体或者曾经是活体的

任意量的物质。此类活体包括但不限于，人、小鼠、猴、大鼠、兔、马和其它动物。此类物质包括但不限于，血液、血清、血浆、尿、细胞、器官、组织、骨、骨髓、淋巴、淋巴结、滑液组织、软骨细胞、滑液巨噬细胞、内皮细胞和皮肤。

### 试剂和免疫原

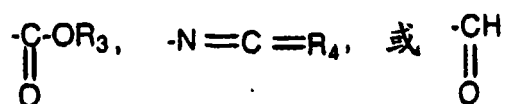
在免疫测定法的构建中，构建紫杉醇的缀合物与样品中的紫杉醇竞争抗体上的结合位点。在本发明的免疫测定法中，试剂是式 III-A 化合物的 9-取代的紫杉醇衍生物和式 III-B 的 7-紫杉醇衍生物。在式 III-A 和 III-B 的化合物中，接头间隔臂组成该分子的  $-\text{CH}_2-(\text{Y})_p-\text{X}'$ -或  $-\text{B}-(\text{Y})_p-\text{X}'$  部分。这些接头  $\text{X}'$  和间隔臂  $-\text{CH}_2-(\text{Y})_p-\text{X}'$ -或  $-\text{B}-(\text{Y})_p-\text{X}'$  是传统用于制备缀合物和免疫原的。用于制备用于免疫测定法的缀合物和免疫原的传统间隔臂连接基团之一可以用于式 III-A 和 III-B 的化合物中。此类传统接头和间隔臂公开于美国专利 5,501,987 和美国专利 5,101,015 中。

优选的间隔臂基团包括此前提及的间隔臂基团。尤其优选的间隔臂基团是诸如含有 1 到 10 个碳原子的亚烷基的基团，



其中  $n$  和  $o$  是 0 到 6 的整数， $m$  是 1 到 6 的整数，亚烷基是特别优选的间隔基团。

在式 III-A 和 III-B 的化合物中， $\text{X}'$  是  $-\text{CH}_2-$  或者官能团，其连接间隔臂，优选连接聚合物载体上的胺基团。基团  $\text{X}'$  是式 II-A 和 II-B 的化合物中末端官能团  $\text{X}$  的结果，其能够结合用作载体或者免疫原的多胺聚合物中的氨基。能够与胺反应的任何末端官能团可以用作式 II-A 和 II-B 的化合物中官能团  $\text{X}$ 。这些优选包括在  $\text{X}$  中的末端官能团是：



其中  $\text{R}_3$  是氢或者与它连接的氧原子一起形成反应活性酯,  $\text{R}_4$  是氧或者硫。基团  $\cdot\text{N}=\text{C}=\text{R}_4$  可以是异氰酸酯或者异硫氰酸酯。通过  $\text{OR}_3$  形成的活性酯包括亚氨基酯, 如 *N*-羟基琥珀酰亚胺、1-羟基苯并三唑和对-硝基苯基酯。然而, 可以使用可以与胺基团反应的任何活性酯。

通过传统方法将羧基和活性酯偶联到载体或免疫原性聚合物。多胺聚合物(如蛋白质)上的胺基团产生酰胺基团, 其将间隔臂连接到本发明的聚合物、免疫原或者载体和/或缀合物。

在本发明的免疫原和缀合物中, 可以使用本领域技术人员已知的多种方法建立含有羧基的紫杉醇半抗原和载体或者免疫原上多胺聚合物氨基之间的化学键。通常优选形成酰胺键。通过将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-硝基苯酚等等)反应, 首先活化式 II-A 或者 II-B 的化合物中紫杉醇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等。然后将式 II-A 或 II-B 的紫杉醇半抗原中的羧基的活化形式与含有蛋白质载体的缓冲液反应。

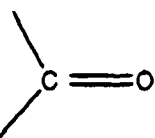
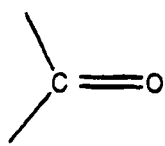
对于式 II-A 或 II-B 的紫杉醇衍生物含有伯氨基或者仲氨基以及羧基的情况, 必须在活化和偶联反应中使用胺保护基团以防止它们自身反应形成缀合物。典型地, 通过形成对应的 *N*-三氟乙酰胺、*N*-叔丁氧基羰基尿烷(*N*-t-BOC 尿烷)、*N*-碳苯氧基尿烷或者类似的结构来保护缀合物上的胺。一旦与免疫原性聚合物或者载体的偶联反应已经完成(如上所述), 就可以使用不改变免疫原或者缀合物的结构的试剂除去胺保护基团。此类试剂和方法是本领域技术人员已知的并且包括弱或者强的含水或者无水酸、弱或者强的含水或者无水碱、含有氯化物的试剂, 如硼氢化钠或者氰基硼氢化钠和催化加氢。缀合半抗原和载体的多种方法也公开在美国专利 3,996,344 和美国专利 4,016,146, 通过引用将它们并入本文。

另一方面, 当 X 是式 II-A 或者 II-B 的化合物中的末端异氰酸酯或者硫代异氰酸酯基时, 这些基团与多胺聚合物的游离胺反应时产生其

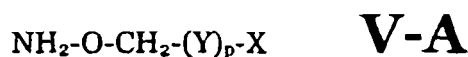
中 X' 是  $\text{NH}-\overset{\text{R}_4}{\underset{\parallel}{\text{C}}}$ ，其中 R<sub>4</sub> 如上述的 III-A 或者 III-B 的缀合物或者免疫

原，其功能性地连接多胺载体或者免疫原性多肽上的氨基，其中在式 II-A 和 II-B 的化合物中，X 是醛时，这些化合物可以通过还原胺化形成的酰胺联接 (linkage)，连接到多胺多肽或者载体的胺基。将醛与胺例如通过还原胺化缩合的任何传统方法可以用于形成该键。在该情况中，式 III-A 和 III-B 的配体部分中的 X' 是 -CH<sub>2</sub>-。

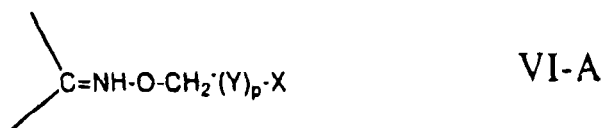
式 I 化合物的紫杉醇和其 9-酮基可以由下式表示：



其中  $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \end{array} = \text{O}$  代表具有其所示的 9-酮基的紫杉醇。9-酮基紫杉醇可以连接到其中 A 是 =N-O- 的式 II-A 的化合物，这可以通过下述方法来实现：将紫杉醇与下式的甲氧胺反应：



以产生下式化合物：



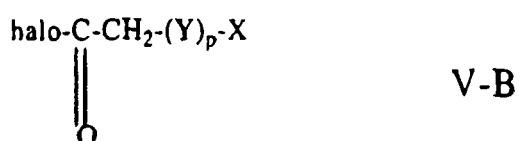
其中 p、Y 和 X 如上文所述。

通过将甲氧胺与羰基缩合形成式 VI-A 的氧基胺 (oxylamine) 的传统方法(如美国专利 4,039,385 中公开的)，将式 I 的化合物在其 9-氧代基团与式 V-A 的甲氧胺反应形成式 VI-A 的化合物。如果式 V-A 的化合物含有任何反应活性氨基或者其它官能取代基，那么紫杉醇与 V-A 的化合物反应之前，这些取代基可以与传统保护基团反应。产生了式

VI-A 的化合物后，通过本领域公知的用于除去此类保护基团的方法除去这些保护基团而保留式 VI-A 化合物中的氧基胺联接。

其中 A 是  $\begin{array}{c} \text{NH-C} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$  的式 II-A 的化合物可以这样制备：首先将紫杉醇

上的 9-氧代基团转化成 9-氨基，然后将该 9-氨基紫杉醇与下式的酰卤缩合：



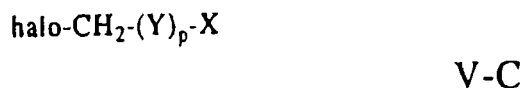
其中 Y、p 和 X 如上文所述。

利用氯化铵和还原剂（如氰基硼氢化钠）通过还原胺化可以将紫杉醇上的 9-氧代基团转化成 9-氨基。

可以用还原胺化中的任何传统条件将紫杉醇上的 9-氧代基团转化成胺基。9-氨基紫杉醇与酰卤通过缩合反应形成式 II-A 的酰胺，其中 A 是  $\begin{array}{c} \text{NH-C} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$ 。将酰卤与胺缩合形成酰胺的任何方法可以用于进行该缩

合。

按照下文所述形成其中 B 是  $-\text{CH}_2-$  的式 II-B 的 7-取代的化合物，：将紫杉醇的 7-羟基与下式的卤化物反应：



其中 Y、p 和 X 如上文所述。

在从紫杉醇形成式 II-B 化合物的过程中，用醇进行反应以形成醚的任何传统方法都可用于将式 V-C 的化合物与紫杉醇上的 7-羟基位缩合。式 V-C 化合物中卤化物的使用提供了通过与醇缩合形成这种醚的有效方法。另一方面，当式 V-C 的化合物含有官能团时（其可以干扰该反应形成式 II-B 的化合物），可以通过如上述的合适的保护基团保护这些官能团，在该反应后可以除去所述保护基团。

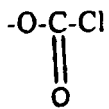
按照下述方法产生 7-取代的式 II-B 的化合物，其中 B 是  $\begin{array}{c} \text{-C-NH-CH}_2\text{-} \\ || \\ \text{O} \end{array}$  :

将紫杉醇上的 7-羟基与下式的氨基化合物反应:



其中 X、Y 和 p 如上文所述。

首先将紫杉醇上的 7-羟基转化成氯代甲酸基



后，

可以使用将羟基转化成氯代甲酸基的任何传统方法。形成氯代甲酸酯后，氯代甲酸酯上的卤基与式 VI 化合物中的胺基缩合。该反应前，按上文所述用传统的保护基团保护紫杉醇上和/或式 VI 的化合物上的反应活性基团。

在该卤化物缩合后，可以通过如前述的传统方法除去这些保护基团。

式 II-A 和 II-B 的化合物可以转化成本发明的免疫原和/或缀合试剂，这是通过将些化合物与多胺或者多肽反应来实现的。相同的多肽可以用作本发明免疫原中的载体以及用作免疫原性多肽，条件是多胺或多肽是免疫活性的。然而，为了形成缀合物，这些多肽不必像免疫原一样产生免疫应答。根据本发明，式 II-A 和 II-B 的化合物中 X 所代表的多种官能团可以缀合到聚合物物质，这可以通过将官能团连接到聚合物内所含的胺基的传统方法来实现。根据优选的实施方案，在式 II-A 和 II-B 的化合物中，X 是羧酸基团。

### 抗体

本发明还涉及利用前述免疫原产生的针对紫杉醇的新的抗体，包括单克隆抗体。根据本发明，已经发现根据本发明产生的这些抗体与紫杉醇选择性反应，并且与现有技术的抗体不同，它们不与将干扰紫杉醇的免疫测定的代谢物反应。这些紫杉醇代谢物的最有问题的是 6-

$\alpha$ -羟基紫杉醇和 3'-对-羟基紫杉醇。本发明的抗体不与这些 6- $\alpha$ -羟基紫杉醇和 3'-羟基紫杉醇代谢物反应的能力使得这些抗体在提供紫杉醇的测定法中尤其有价值。

本发明涉及针对紫杉醇的新的抗体和单克隆抗体。通过用本发明的免疫原免疫宿主动物可以方便地产生本发明的抗血清。合适的宿主动物包括啮齿动物，如小鼠、大鼠、兔、豚鼠等等，或者高等哺乳动物，如山羊、绵羊、马等等。根据用于在动物中引起免疫应答的公认方案，可以给予初始剂量、取血 (bleeding) 和强化注射，例如，在一种优选的实施方案中，小鼠接受腹膜内 100  $\mu$ g 免疫原/小鼠的初始剂量并在 6 个月期限内进行两次和多次 50 到 100  $\mu$ g 免疫原/小鼠的后续强化注射。通过周期性取血，利用传统免疫测定法观察到经免疫的小鼠的血样产生针对紫杉醇结合的免疫应答。这些方法提供了筛选产生具有所需活性的抗血清的宿主的方便方法。还针对紫杉醇的主要代谢物对抗体进行筛选，抗体显示出与这些化合物没有实质性结合。

通过根据上面的方案免疫 Balb/c 小鼠，然后从细胞融合前四天开始的三个连续日内用 100  $\mu$ g 免疫原腹膜内或者静脉内注射小鼠，方便地产生单克隆抗体。抗体领域中的其它公知方案当然也可以利用。本文详述的完整免疫方案提供了用于针对紫杉醇的抗体的血清抗体应答的最佳方案。

从宿主的脾、外周血、淋巴结或者其它组织得到的 B 淋巴细胞可以用作产生单克隆抗体的细胞。最优选的是从脾得到的 B 淋巴细胞。能够产生本发明的所希望的单克隆抗体的杂交瘤可按照如下所述来获得：将此类 B 淋巴细胞与永生细胞系融合，所述细胞系是对杂交 (hybrid) 细胞赋予长期组织培养稳定性的细胞系。在本发明的优选实施方案中，永生细胞可以是淋巴样干细胞或者浆细胞瘤细胞，如骨髓瘤细胞，其自身是产生抗体的细胞而且也是恶性的。通过将小鼠骨髓瘤细胞与来自对紫杉醇蛋白质缀合物免疫的小鼠的脾细胞融合，形成产生紫杉醇单克隆抗体的鼠杂交瘤。嵌合和人源化的单克隆抗体可以如下方法产生：克隆来自杂交瘤细胞的抗体表达基因，使用本领域现在公知的重组 DNA 方法将小鼠可变区的亚序列连接到人恒定区，或者将人构架 (framework) 区与来自供体小鼠或者大鼠免疫球蛋白的互补性决定区 (CDR) 组合。用于人源化鼠单克隆抗体的改进方法在国际专利

申请 WO 92/11018 中提出，所述方法提供了具有增强的亲和力的抗体。

可以产生包含一级抗体结构的仅一部分的多肽片段，所述片段具有一种或多种免疫球蛋白活性。这些多肽片段可以按照如下所述来产生：通过本领域公知的方法进行对完整抗体的蛋白酶剪切，或者使用定点诱变在含有抗体基因的表达载体中所希望的位置插入终止密码子以产生 Fab 片段或者 (Fab')<sub>2</sub> 片段。可以通过将 VL 和 VH 区用 DNA 接头 (linker) 连接来产生单链抗体(见 Huston 等人, Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A., 85:5879-5883 (1988) 和 Bird 等人, Science, 242:423-426 (1988))。

本发明的抗体选择性针对紫杉醇，而与紫杉醇的代谢物（如上文提到的代谢物）没有实质的交叉反应活性。没有实质的交叉反应活性是指本发明的抗体相对于紫杉醇而言与这些代谢物的交叉反应活性小于 10%。本发明的抗体可以与其它紫杉醇类似化合物如多西他赛 (docetaxel) 反应。

#### 免疫测定法

根据本发明，从式 II-A 和 II-B 的这些化合物或者其混合物的免疫原产生的缀合物和抗体可以用作为测定患者样品中紫杉醇的试剂。通过免疫测定法进行该测定。下述任何免疫测定法可用于确定患者样品中紫杉醇的存在，所述测定法中，从式 II-A 和 II-B 的的化合物形成的试剂缀合物与样品中的紫杉醇针对根据本发明产生的抗体上的结合位点发生竞争。对怀疑含有紫杉醇的样品进行针对紫杉醇的测定的方式包括组合下述物质：(a) 水性介质样品，(b) 根据本发明产生的针对紫杉醇的抗体和 (c) 从式 II-A 和 II-B 的化合物或者其混合物形成的缀合物。可以通过测量对加入到样品和抗体混合物中的已知量缀合物与特异抗体的结合的抑制，来测定样品中紫杉醇的量。未知样品对已知量缀合物的这种结合的抑制的结果与利用紫杉醇的已知标准溶液在相同测定中得到的结果进行比较。在测定未知样品中紫杉醇的量的过程中，样品、从式 II-A 和 II-B 的化合物形成的缀合物和抗体可以以任何顺序加入。

多种方法可以用于测量与抗体结合的从式 II-A 和 II-B 的化合物形成的缀合物的量。一种方法是其中缀合物与抗体的结合导致荧光缀合

物旋光度的降低。液体混合物中荧光团缀合物旋光度降低的量可以通过荧光偏振技术(如美国专利4,269,511 和美国专利4,420,568 中公开的)来检测。

另一方面, 抗体可以被包被或者吸收到纳米微粒上从而当这些微粒与从式 II-A 和 II-B 的化合物形成的紫杉醇缀合物反应时, 这些纳米微粒形成聚集体 (aggregate)。然而, 当包被或者吸收有抗体的纳米微粒与样品中的紫杉醇反应时, 结合这些纳米微粒的来自样品的紫杉醇不会导致抗体纳米微粒的聚集。可以通过吸光度测量来测定混合物中聚集或者凝集 (agglutination) 的量。

另一方面, 通过将抗体或者紫杉醇缀合物附着到固体支持物如微滴定板或者任何其它传统固体支持物 (包括固体颗粒), 可以进行这些测定法。将抗体和蛋白质附着到此类固体颗粒是本领域公知的。任何传统方法可以用于进行此类附着。在许多情况中, 为了帮助测量, 可以在抗体、缀合物和固体颗粒上放置标记, 如放射性标记和酶标记, 以帮助检测从式 II-A 和 II-B 的化合物形成的、与抗体结合或未结合的缀合物的量。其它合适的标记包括生色团、荧光团等等。

为方便起见, 本发明的测定组分可以在试剂盒中提供, 试剂盒是经包装的组合, 含有用于测定紫杉醇的预定量的新试剂。这些试剂包括本发明的抗体, 以及从式 II-A 和 II-B 的化合物或者其混合物形成的缀合物。如果利用了从式 II-A 的化合物形成的缀合物, 那么在给定的免疫测定中通常优选通过从式 II-A 的化合物形成的免疫原产生抗体。类似地, 如果利用了从式 II-B 的化合物形成的缀合物, 那么抗体是通过从式 II-B 的化合物形成的免疫原产生的。然而, 并不必须是这样的情况, 在给定测定法中, 抗体和缀合物可以来自这些缀合物和免疫原的任一种或者两种。

除这些必要的试剂之外, 还可以包括添加剂, 如辅助试剂, 如稳定剂、缓冲剂等等。多种试剂的相对量可以非常宽广地变化, 以提供能实质性优化测定法灵敏度的试剂溶液中浓度。试剂可以提供于溶液中或者作为干燥粉剂提供, 通常为冻干的, 包括赋形剂, 溶解时其将提供具有用于进行测定的合适浓度的试剂溶液。

## 实施例

在实施例中，Ph 代表苯基。在实施例中，下面的缩写用于表示下面的含义：

**THF** 四氢呋喃

**EA** 乙醇

**EtOAc** 乙酸乙酯

**DCM** 二氯甲烷

**DMAP** 二甲基氨基吡啶

**NHS** N-羟基琥珀酰亚胺

**EDC** 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐

**TLC** 薄层色谱

**ANS** 8-苯胺基-1-萘磺酸

**i.p.** 腹膜内

**HRP** 辣根过氧化物酶

**TMB** 3,3',5,5'-四甲基联苯胺

**TRIS** 三(羟基甲基)氨基甲烷盐酸盐

**BSA** 牛血清白蛋白

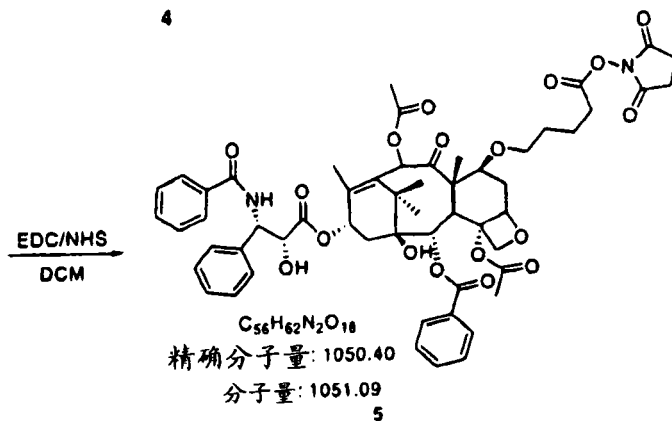
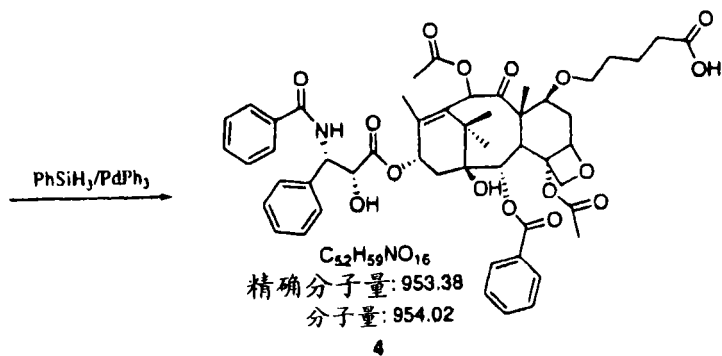
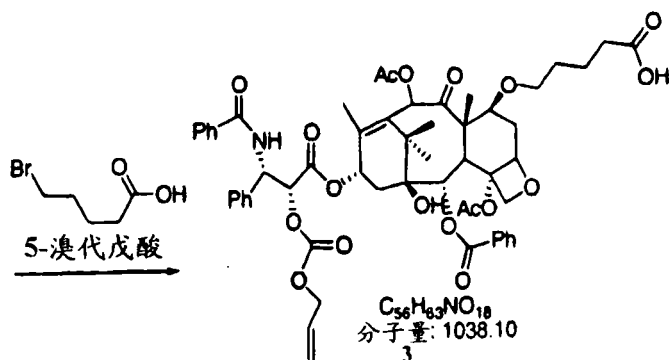
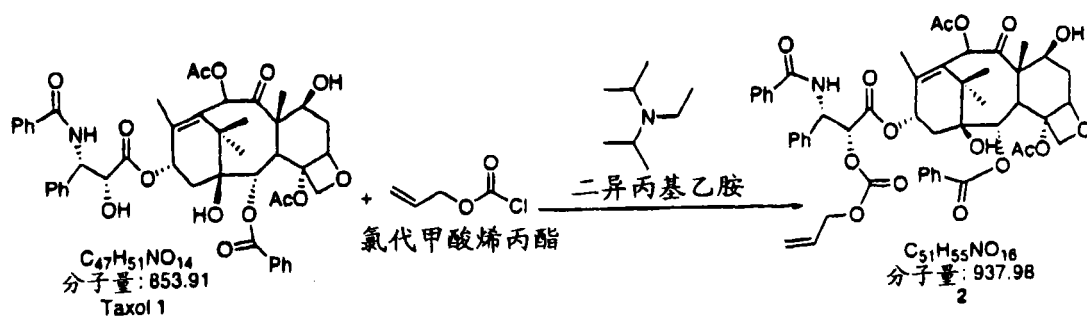
**BTG** 牛甲状腺球蛋白

**PBS** 磷酸缓冲盐水

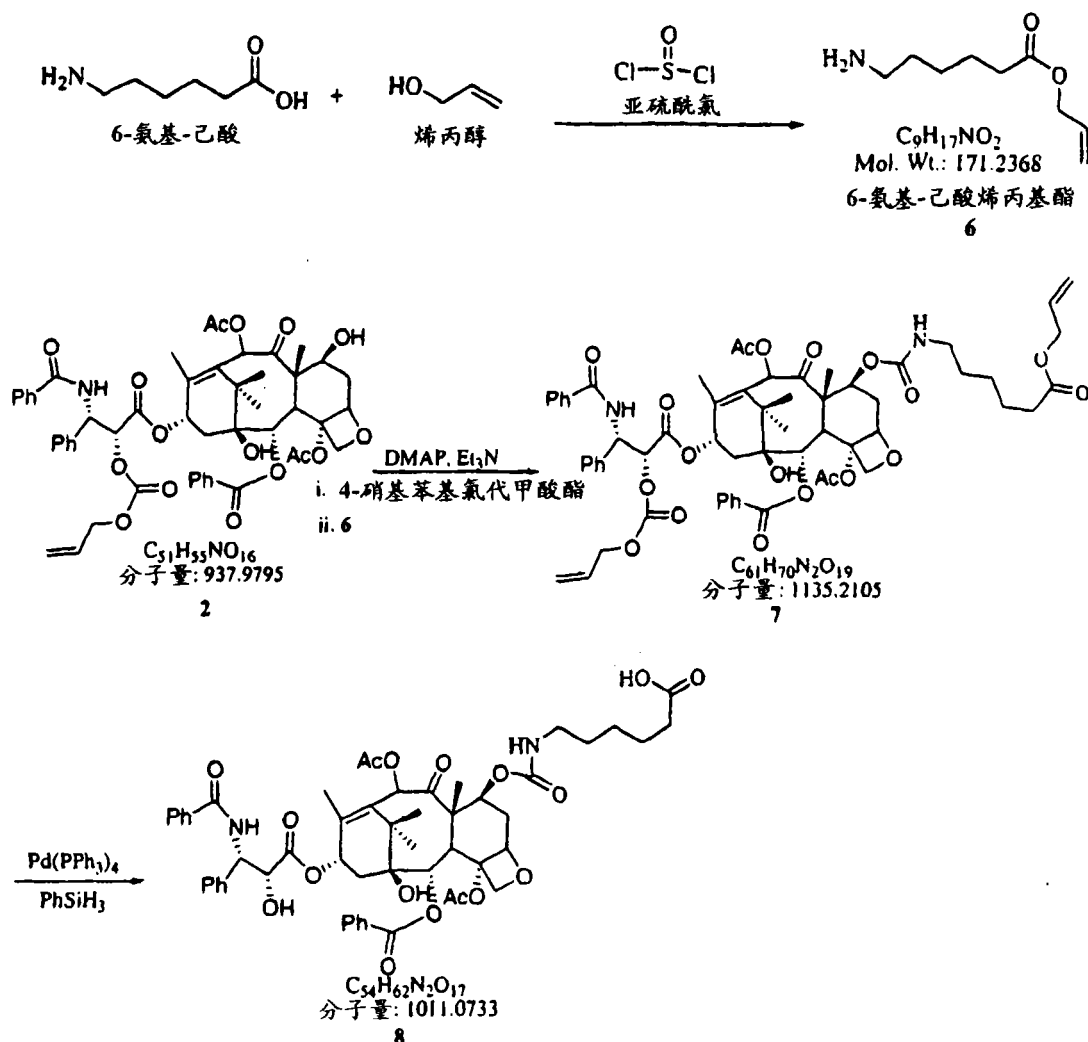
**di** 去离子水

在实施例中，下面的方案 1 和方案 2 给出了所制备的具体化合物，这些化合物在实施例中通过编号指出。这些方案如下：

## 方案 1



## 方案2



## 实施例1 紫杉醇衍生物[5]的制备(方案1)

在持续氩气流下, 将紫杉醇 1 (1.685 g) 置于三颈烧瓶中 26mL 新鲜蒸馏的二氯甲烷中。在该加入期间, 温度保持于 $-15^\circ\text{C}$ , 还加入二异丙胺(1 当量)和氯代甲酸烯丙酯(1.1 当量)。将反应混合物温度恢复到室温并搅拌 4 小时。该时间后, 加入 40mL 二氯甲烷并用 0.1N HCl (60 mL) 洗涤反应混合物, 用  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥并在旋转蒸发器上浓缩得到产物 2, 其中紫杉醇上的 2' 羟基受到保护。将该产物在干燥器上放置 2 天, 然后不进行进一步纯化直接用于下一步和实施例 2。

然后将产物 2 溶于氩气下 40mL THF 中, 温度保持于 $-15^\circ\text{C}$ 。然后向该溶液首先加入 NaH(2 当量), 10 分钟后加入 5-溴代戊酸(溶解在 3mL THF 中的 1.1 当量, 并缓慢加入)以产生产物 3 作为反应混合物中的产物。TLC 证实产物 3 后, 向该反应混合物逐滴加入 4.4mL 2N HCl。

将含有产物 3 的反应混合物用水洗涤，在  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  上干燥，在旋转蒸发器上浓缩然后纯化。将产物 3 在硅胶柱上纯化，用 15% EtOAc:DCM 到 20% EtOAc:DCM 洗脱，得到 1.1611g 纯产物 3。

将纯化的产物在氩气下溶于 40mL 二氯甲烷中，然后向该溶液加入  $\text{PhSiH}_3$  (6.25 当量)与  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (0.05 当量)。让所得反应混合物静置 1 小时。该时间后，向反应混合物加入 12mL MeOH 并将所得反应混合物搅拌 10 分钟。蒸发该反应混合物至干，以产生具有去保护的 2'羟基的产物 4。

使用 30% EtOAc:DCM 作为溶剂系统，在硅胶柱上从反应混合物纯化的产物 4，并分离为乳白色粉末(817mg, 从原料计算产率按重量计为 43.4%)。将纯化的产物 4(355 mg, 0.37 mmol)溶解在 15mL 二氯甲烷中。然后在氩气下加入 N-羧基琥珀酰亚胺(2 当量)和 EDC(2 当量)并过夜搅拌所得反应混合物。用 0.1N HCl 洗涤含有产物 5 的反应混合物，然后尽可能快地用  $\text{H}_2\text{O}$  洗涤。将含有产物 5 的反应混合物在  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  上干燥，在旋转蒸发器上高真空下浓缩得到 401 mg (99.9%纯度)产物 5。

## 实施例 2 紫杉醇衍生物[8]的制备(方案 2)

向烯丙醇(14mL, 过量)中 6-氨基己酸(3 g, 22.87 mmol)的悬浮液中缓慢加入亚硫酸氯。室温下过夜搅拌反应混合物产生 4-氨基己酸烯丙基酯 6。除去过量烯丙醇后，在高真空下干燥产物 4-氨基己酸烯丙基酯 (3.9g, 白色结晶固体)。

在氩气下向实施例 1 中产生的、烯丙基受保护的紫杉醇产物 2(400 mg, 0.43 mmol) 和 DMAP (191.5 mg, 1.57 mmol)在 DCM (10 mL)的溶液中加入三乙胺(1.57 mmol)，然后加入氯甲酸对-硝基苯酯(103 mg, 0.51 mmol)。然后在室温下搅拌反应混合物 5.5 小时，加入按照上文所述制备的作为白色结晶固体的胺 6(1.1 当量)溶于 DCM (2 mL)的溶液，以形成产物 7。让所得混合物在室温下过夜搅拌。在真空下从该所得反应混合物中除去 DCM，并用 15% EtOAc/DCM 作为溶剂系统在硅胶柱上纯化粗产物 7，得到纯化的产物 7(320 mg, 66.1%)，其为乳白色固体。将按照上文所述制备的纯化的产物 7 在氩气下溶解在 30mL 二氯甲烷中，然后加入  $\text{PhSiH}_3$  (6.25 当量)与  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (0.05 当量)。1.5 小时后，

加入 12mL MeOH 并额外搅拌 10 分钟。将反应混合物蒸发至干，得到衍生的 7-羟基紫杉醇产物 8。在硅胶柱(10% MeOH:EtOAc 作为溶剂系统)上纯化该产物 8，并将其分离为乳白色胶(236 mg, 82.8%)，从原料计算产率为 54-73%。

### 实施例 3 紫杉醇免疫原的制备

向溶于 50mM 磷酸盐缓冲液(50 mM, pH 7.5)中的 6.8 mL BTG (36.4 mg/mL)中逐滴加入二甲亚砜(DMSO) (13.8 mL)以形成溶液。向 16.6mL 该溶液中逐滴加入实施例 1 中制备的纯化的活化 N-羧基琥珀酰亚胺酯紫杉醇衍生物 5(1.26mL, DMSO 溶液中 50mg/mL)。让所得混合物在室温下过夜搅拌以将 BTG 缀合到纯化的紫杉醇衍生物 5。然后通过透析纯化该免疫原性缀合物，并根据以前描述的方法对其进行分析(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)。

### 实施例 4 紫杉醇抗体的制备

用在完全弗氏佐剂中乳化的紫杉醇-BTG(实施例 3 中制备)以 100  $\mu$ g/小鼠的剂量对雌性 BALB/c 小鼠进行腹膜内免疫。最初注射后 4 周，用在不完全弗氏佐剂中乳化的紫杉醇-BTG 以 100  $\mu$ g/小鼠的剂量对小鼠进行强化。强化后 10 天，通过眼窝放血从每只小鼠得到测试血。从这些测试血得到的抗血清含有在实施例 7、8a 和 9 中评估的紫杉醇抗体。对于单克隆抗体，从融合前四天开始，在连续三天内用溶于 PBS 的 100  $\mu$ g 紫杉醇-BTG 对小鼠进行腹膜内注射。从所选的小鼠分离脾细胞并根据 Coligan, J. E. 等人编著的 *Current Protocols in Immunology*, 2.5.1 - 2.5.8, (1992), Wiley & Sons, NY 的方法用 50% 聚乙二醇 1500 将脾细胞与  $2 \times 10^7$  个骨髓瘤细胞 SP2/0 融合。将融合的细胞涂布到 10 块 96 孔板上的 DMEM/F12 中，其中补充有 20% FetalClone I、2% L-谷氨酰胺(100 mM)和 2% 50X HAT。2 周后，通过 ELISA(实施例 8b)测定杂交瘤上清液中抗-紫杉醇-BTG 抗体的存在。将孔中得到阳性 ELISA 结果(实施例 8)的细胞扩大到 24 孔板。ELISA 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，通过有限稀释对阳性克隆进行一次或两次亚

克隆。通过竞争性 ELISA(实施例 8a 和 9), 针对紫杉醇的结合对含有来自所选亚克隆的单克隆抗体的杂交瘤培养上清液加以验证。按实施例 9 中所述, 通过间接竞争性微滴定板测定法, 针对与紫杉醇的结合和与紫杉醇代谢物的交叉反应性, 对这些单克隆抗体加以测试。

#### 实施例 5 用衍生物 5 制备紫杉醇-BSA 缀合物

向 20mL 磷酸盐缓冲液(50 mM, pH 7.5)中的 BSA (50 mg/mL) 溶液逐滴加入 20mL 二甲亚砜(DMSO)。向 18mL 该溶液中滴加按照实施例 1 制备的活化的 N-羧基琥珀酰亚胺酯紫杉醇衍生物 5(0.316mL, DMSO 溶液中 50 mg/mL)。将该混合物在室温下过夜搅拌, 产生活化酯 5 和 BSA 的缀合物。然后通过透析纯化该缀合物并根据以前描述的方法对其进行分析(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)。

#### 实施例 6 用衍生物 8 制备紫杉醇-BSA 缀合物

向二氯甲烷(3mL)中的 25mg 实施例 2 中制备的紫杉醇衍生物 8 中加入 EDC (28 mg) 和 NHS (16.8 mg)。将该溶液在氮气室温下搅拌 24 小时。向该混合物中加入 7ml 额外的二氯甲烷, 然后加入 2mL 盐酸 (0.3N)。搅拌反应混合物 15 分钟并将有机层分离、干燥和蒸发得到不定形白色残渣, 其是紫杉醇衍生物 8 的 NHS 活化酯。将残渣溶解在 2mL DMSO 中, 并将 1.25 mL 该溶液滴加到 40mL BSA 溶液(25 mg/mL, 20 mL DMSO/20 mL 50 mM 磷酸盐, pH 7.5)中。室温下搅拌溶液 60 小时, 产生 BSA 和紫杉醇衍生物 8 的缀合物。根据以前描述的方法(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)通过透析纯化该缀合物。

#### 实施例 7a 用紫杉醇衍生物 5 进行微滴定板敏化步骤

在针对蛋白质结合进行过优化、且每板含有 96 孔的聚苯乙烯微滴定板(Nunc MaxiSorp C8 或 F8 Immunomodules)中进行 ELISA 方法, 以测定紫杉醇浓度。按下文所述用紫杉醇-BSA 缀合物(实施例 5 中制备

的)包被每孔: 加入 300  $\mu$ L 以 10  $\mu$ g/ml 溶于 0.05M 碳酸氢钠(pH9.6)的紫杉醇-BSA 缀合物, 并在室温下温育 3 小时。用 0.05M 碳酸氢钠(pH9.6)洗涤孔, 然后用 400  $\mu$ L 5%蔗糖、0.2%酪蛋白酸钠溶液在室温下封闭 30 分钟。除去包被后溶液后, 在 37 $^{\circ}$ C 过夜干燥滴定板。

#### 实施例 7b 用紫杉醇衍生物 8 进行微滴定板敏化步骤

在针对蛋白质结合进行过优化、且每板含有 96 孔的聚苯乙烯微滴定板(Nunc MaxiSorp C8 或 F8 Immunomodules)中进行 ELISA 方法, 以测定紫杉醇浓度。按下文所述用紫杉醇-BSA 缀合物(如实施例 6 中制备的)包被每孔: 加入 300  $\mu$ L 以 10  $\mu$ g/ml 溶于 0.05M 碳酸氢钠(pH9.6)的紫杉醇-BSA 缀合物, 并在室温下温育 3 小时。用 0.05M 碳酸氢钠(pH9.6)洗涤孔, 然后用 400  $\mu$ L 5%蔗糖、0.2%酪蛋白酸钠溶液在室温下封闭 30 分钟。除去包被后溶液后, 在 37 $^{\circ}$ C 过夜干燥滴定板。

#### 实施例 8a 抗体筛选步骤-效价

用实施例 7 所述的经过紫杉醇-BSA 敏化的微滴定板, 进行用于筛选紫杉醇抗体(实施例 4 中产生的)的 ELISA 方法。通过用含有 0.1% BSA 和 0.01%硫柳汞的磷酸缓冲盐水将含有紫杉醇抗体的抗血清(实施例 4 的)稀释到 1:100、1:10000 和 1:100,000, 来进行抗体筛选测定法。为了评估单克隆抗体, 用含有 0.1% BSA 和 0.01%硫柳汞的磷酸缓冲盐水将实施例 4 的杂交瘤上清液(通过 8b 步骤发现其在抗体存在的方面是阳性的)稀释 1:2、1:4、1:8、1:16, 等等。向经紫杉醇-BSA 敏化的孔的每孔(实施例 7 中制备的)中加入 100  $\mu$ L 稀释的抗体并在摇动下在室温下温育 10 分钟。在该温育期间, 抗体结合孔中的紫杉醇-缀合物。以 0.02 M TRIS, 0.9% NaCl, 0.5% Tween-80 和 0.001% 硫柳汞 (pH 7.8) 对滴定板上的孔洗涤三次, 以除去任何未结合的抗体。为了检测孔中结合到紫杉醇-BSA 缀合物的紫杉醇抗体的量, 向每孔加入 100  $\mu$ L 用含有 0.1% BSA、0.05% ANS、0.01%硫柳汞的 PBS)稀释到预定比活(约 1/2000)的山羊抗-小鼠抗体-HRP 酶缀合物(Jackson Immunoresearch), 所述缀合物能够与鼠免疫球蛋白特异结合, 并且当与底物温育时产生有色产物。室温摇动下温育 10 分钟后(在该期间二级-HRP 缀合物结合孔中的紫杉醇抗体), 将滴定板再洗三次以除去未结合的二级缀合物。

为了在孔中显现可测量的颜色，洗涤后加入 100  $\mu$  L TMB(TMB Liquid Substrate, Sigma)(其是 HPR 的底物)以在摇动下室温温育 10 分钟内显色。该用于颜色显现的温育后，向每孔加入 50  $\mu$  L 终止溶液(diH<sub>2</sub>O 中的 1.5%氯化钠)以停止颜色显现，并且摇动 10 秒后，在 650nm 测量吸光度(Molecular Devices Plate Reader)。孔中抗体的量与所测得的吸光度成比例，其被表示为导致 1.5 的吸光度的稀释度(效价)。通过将所测量的抗体的抗体稀释度对数(x-轴)对 650nm 的吸光度(y 轴)作图，并外推在 1.5 吸光度时的效价来确定效价。该效价确定了用于实施例 9 所述间接竞争性微滴定板测定法中抗体的浓度(稀释度)。

#### 实施例 8b 抗体筛选步骤-单克隆筛选

将经实施例 6 所述的紫杉醇-BSA 敏化的微滴定板进行用于筛选紫杉醇单克隆抗体(实施例 4 中产生的)的 ELISA 方法。向经紫杉醇-BSA 敏化的孔(实施例 7b 中制备的)的每孔中，加入含有 0.1%BSA 和 0.01% 硫柳汞的 50  $\mu$  L 磷酸缓冲盐水，然后加入 50  $\mu$  L 单克隆培养上清液并在室温摇动下温育 10 分钟。在该温育期间，抗体结合孔中的紫杉醇缀合物。用 0.02 M TRIS, 0.9% NaCl, 0.5% Tween-80 和 0.001% 硫柳汞 (pH 7.8) 对滴定板的孔进行三次洗涤，以除去任何未结合的抗体。为了检测结合孔中的紫杉醇-BSA 缀合物的紫杉醇抗体的量，向每孔加入 100  $\mu$  L 用含有 0.1% BSA、0.05% ANS、0.01%硫柳汞的 PBS 稀释到预定比活(约 1/2000)的山羊抗-小鼠抗体-HRP 酶缀合物(Jackson Immunoresearch)，所述缀合物能够与鼠免疫球蛋白特异结合，并且当与底物温育时产生有色产物。室温摇动下温育 10 分钟后(在该期间山羊抗小鼠抗体-HRP 酶缀合物结合孔中的紫杉醇抗体)，对滴定板再洗涤三次，以除去未结合的山羊抗小鼠抗体-HRP 酶缀合物。为了在孔中显现可测量的颜色，洗涤后加入 100  $\mu$  L TMB(TMB Liquid Substrate, Sigma)(其是 HPR 的底物)以在摇动下室温温育 10 分钟内显色。该用于颜色显现的温育后，向每孔加入 50  $\mu$  L 终止溶液(diH<sub>2</sub>O 中的 1.5%氯化钠)以停止颜色显现，摇动 10 秒后，在 650nm 测量吸光度(Molecular Devices Plate Reader)。孔中抗体的量与所测得的吸光度成比例。吸光度高于两倍背景的背景样品被指定为阳性的。

## 实施例 9a 间接竞争性微滴定板免疫测定步骤

### 测定 IC<sub>50</sub> 和交叉反应活性

用实施例 7a 描述的经典紫杉醇-BSA 敏化的微滴定板进行用于测量紫杉醇浓度的 ELISA 方法。用 PBS 或者用含有 0.1% BSA 和 0.01% 硫柳汞的 PBS 将紫杉醇、紫果赤霉素 III、3'-对-羟基紫杉醇、6- $\alpha$ -羟基紫杉醇和多西紫杉醇在 0.01 到 10,000 ng/mL 的浓度范围上稀释 10 倍。通过将 50  $\mu$ L 待测量的分析物与稀释到实施例 8a 中确定的效价的 50  $\mu$ L 抗体(实施例 4 中产生的)一起温育来开展测定。在 10 分钟温育(室温, 摇动下)期间, 孔中的紫杉醇缀合物和溶液中的分析物竞争抗体结合。该温育后, 用 0.02 M TRIS, 0.9% NaCl, 0.5% Tween-80 和 0.001% 硫柳汞, pH 7.8 对滴定板中的孔洗涤三次, 以除去未结合的物质。为了检测与孔中紫杉醇-BSA 缀合物结合的紫杉醇抗体的量, 向每孔加入用含有 0.1% BSA、0.05% ANS、0.01% 硫柳汞的 PBS 稀释到预定比活(约 1/2000)的 100  $\mu$ L 二级缀合物(其是山羊抗-小鼠抗球蛋白抗体-HRP 酶缀合物(Jackson ImmunoResearch)), 所述缀合物能够与鼠免疫球蛋白特异结合, 并且当与底物温育时产生有色产物。室温摇动下温育 10 分钟后(在该期间二级 HRP 缀合物结合孔中的紫杉醇抗体), 将滴定板再次洗涤三次以除去未结合的二级缀合物。在室温摇动下温育 10 分钟后(在该期间二级-HRP 缀合物结合孔中的紫杉醇抗体), 对滴定板再洗涤三次以除去未结合的二级缀合物。

为了在孔中显现可测量的颜色, 洗涤后加入 100  $\mu$ L TMB(TMB Liquid Substrate, Sigma)(其是 HRP 的底物)以在摇动下室温温育 10 分钟内显色。该用于颜色显现的温育后, 向每孔加入 50  $\mu$ L 终止溶液(diH<sub>2</sub>O 中的 1.5% 氟化钠)以停止颜色显现, 摇动 10 秒后, 在 650nm 测量吸光度(Molecular Devices Plate Reader)。孔中抗体的量与所测得的吸光度成比例, 并且与样品中紫杉醇的量成反比。将含分析物的孔中颜色的吸光度与没有分析物的吸光度比较, 产生标准曲线。给定分析物的 IC<sub>50</sub> 值被定义为: 抑制不含分析物的孔的 50% 的吸光度所需的分析物的浓度。将给定分析物的交叉反应性计算为: 紫杉醇的 IC<sub>50</sub> 与紫果赤霉素 III、3'-对-羟基紫杉醇、6- $\alpha$ -羟基紫杉醇和多烯紫杉醇的 IC<sub>50</sub> 的比率, 其以百分比表示。为了评估紫果赤霉素 III、3'-对-羟基紫杉醇、6- $\alpha$ -羟基紫杉醇和多烯紫杉醇与实施例 4 中产生的紫杉醇多克隆抗体

的交叉反应活性，从眼眶取血制备抗血清库。该库组合了四只小鼠的抗体，这些小鼠对于紫杉醇各自具有 $< 20 \text{ ng/mL}$ 的 $\text{IC}_{50}$ 值。当用该抗体库进行测量时，浆果赤霉素 III、3'-对-羟基紫杉醇和 6- $\alpha$ -羟基紫杉醇相对于紫杉醇的交叉反应活性小于 10%。与 6- $\alpha$ -羟基紫杉醇的交叉反应活性小于 60%。结果在表 I 给出。为了评估浆果赤霉素 III、3'-对-羟基紫杉醇、6- $\alpha$ -羟基紫杉醇和多烯紫杉醇与实施例 4 中产生的紫杉醇单克隆抗体的交叉反应活性，使用来自所选的经亚克隆的单克隆的杂交瘤培养物上清液。当用这些单克隆抗体中的两种进行测量时，浆果赤霉素 III、3'-对-羟基紫杉醇和 6- $\alpha$ -羟基紫杉醇相对于紫杉醇的百分比交叉反应活性小于 6%。结果在表 II 中给出。

#### 实施例 9b 间接竞争性微滴定板免疫测定步骤 测定 $\text{IC}_{50}$ 和交叉反应性

用实施例 7b 中描述的用紫杉醇-BSA 敏化的微滴定板进行用于测量紫杉醇浓度的 ELISA 方法。用 PBS 或含有 0.1% BSA 和 0.01% 硫柳汞的 PBS 将紫杉醇、浆果赤霉素 III、3'-对-羟基紫杉醇、6- $\alpha$ -羟基紫杉醇和多西紫杉醇在 0.01 到 10,000 ng/mL 的浓度范围上稀释 10 倍。通过将 50  $\mu\text{L}$  待测量的分析物与稀释到实施例 8a 中确定的效价的 50  $\mu\text{L}$  抗体(实施例 4 中产生的)一起温育来进行测定。在 10 分钟温育(室温, 摇动下)期间, 孔中的紫杉醇缀合物和溶液中的分析物竞争抗体结合。该温育后, 用 0.02 M TRIS, 0.9% NaCl, 0.5% Tween-80 和 0.001% 硫柳汞, pH 7.8 对滴定板的孔洗涤三次, 以除去未结合的物质。为了检测与孔中的紫杉醇-BSA 缀合物结合的紫杉醇抗体的量, 向每孔加入用含有 0.1% BSA、0.05% ANS、0.01% 硫柳汞的 PBS 稀释到预定比活(约 1/2000)的 100  $\mu\text{L}$  二级抗体(其是山羊抗小鼠抗球蛋白抗体-HRP 酶缀合物(Jackson Immunoresearch))。该二级抗体能够与鼠免疫球蛋白特异结合, 并且当与底物温育时产生有色产物。室温摇动下温育 10 分钟后(在该期间二级 HPR 缀合物结合孔中的紫杉醇抗体), 对滴定板再洗涤三次, 以除去未结合的二级缀合物。

为了在孔中显现可测量的颜色, 洗涤后加入 100  $\mu\text{L}$  TMB(TMB Liquid Substrate, Sigma)(其是 HPR 的底物), 以在摇动下室温温育 10 分钟内显色。该用于颜色显现的温育后, 向每孔加入 50  $\mu\text{L}$  终止溶液

( $\text{diH}_2\text{O}$  中的 1.5% 氟化钠), 以停止颜色显现, 摇动 10 秒后, 在 650nm 测量吸光度(Molecular Devices Plate Reader)。孔中抗体的量与所测得的吸光度成比例, 并且与样品中紫杉醇的量成反比。将含分析物的孔中颜色的吸光度与没有分析物的吸光度比较, 产生标准曲线。给定分析物的  $\text{IC}_{50}$  值被定义为: 抑制不含有分析物的孔的 50% 的吸光度所需的分析物的浓度。将给定分析物的交叉反应性计算为紫杉醇的  $\text{IC}_{50}$  与浆果赤霉素 III、3'-对-羟基紫杉醇、6- $\alpha$ -羟基紫杉醇和多烯紫杉醇的  $\text{IC}_{50}$  的比率, 其以百分比表示。为了评估浆果赤霉素 III、3'-对-羟基紫杉醇、6- $\alpha$ -羟基紫杉醇和多烯紫杉醇与实施例 4 中产生的紫杉醇抗体的交叉反应活性, 使用实施例 9a 的库。当用该库的抗体进行测量时, 浆果赤霉素 III、3'-对-羟基紫杉醇、6- $\alpha$ -羟基紫杉醇和多烯紫杉醇(多西他赛)相对于紫杉醇的百分比交叉反应活性小于 2%。结果在表 1 中给出。当用所选的单克隆抗体进行测量(如实施例 9a)时, 浆果赤霉素 III、3'-对-羟基紫杉醇和 6- $\alpha$ -羟基紫杉醇相对于紫杉醇的百分比交叉反应活性小于 9%。结果在表 II 中给出。

表 I: 使用针对紫杉醇的多克隆抗体进行的竞争性免疫测定的交叉反应活性(实施例 4)

分析物	微滴定板敏化	
	紫杉醇衍生物 8	紫杉醇衍生物 5
紫杉醇(紫杉醇)	100%	100%
多西他赛	0.16%	$\leq 5\%$
3'-对-羟基紫杉醇	0.57%	$\leq 10\%$
6- $\alpha$ -羟基紫杉醇	1.60%	$< 58\%$
浆果赤霉素 III	0.10%	0.10%

表 II:使用针对紫杉醇的单克隆抗体进行的竞争性免疫测定的交叉反应性(实施例 4)

分析物	单克隆抗体 Ab #1		单克隆抗体 Ab #2	
	微滴定板敏化		微滴定板敏化	
	紫杉醇衍生物 8	紫杉醇衍生物 5	紫杉醇衍生物 8	紫杉醇衍生物 5
紫杉醇(紫杉醇)	100%	100%	100%	100%
多西他赛	77%	76%	85%	101%
3'-对-羟基紫杉醇	8.1%	5.9%	1.5%	≤2.3%
6- $\alpha$ -羟基紫杉醇	6.5%	5.1%	2.9%	≤4.6%
浆果赤霉素 III	0.17%	0.13%	0.13%	≤0.19%

从上表可以看到出，本发明的抗体不与紫杉醇的主要代谢物反应，但是与紫杉醇和类似紫杉醇的药物反应。当对被施用紫杉醇的患者不同时施用多西他赛时，这些抗体可以用于下述免疫测定，所述免疫测定可以特异性地检测和监测用紫杉醇治疗的患者的液体样品中的紫杉醇。

专利名称(译)	紫杉醇免疫测定法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101019024A</a>	公开(公告)日	2007-08-15
申请号	CN200580025440.1	申请日	2005-07-28
[标]申请(专利权)人(译)	萨拉戴克斯生物医学公司		
[标]发明人	S萨拉蒙 JB库尔特尼 D斯托克		
发明人	S· 萨拉蒙 J· B· 库尔特尼 D· 斯托克		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 C12P17/02 A61K31/337 C07K16/44 C07K17/06		
CPC分类号	G01N33/94 G01N2407/02		
代理人(译)	程淼 梁谋		
优先权	11/044667 2005-01-27 US 60/592017 2004-07-29 US		
其他公开文献	CN101019024B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

紫杉醇的新的缀合物和衍生自紫杉醇的9和7位的新的免疫原和通过这些连接紫杉醇的免疫原产生的单克隆抗体可用于免疫测定法，以对生物流体中的紫杉醇进行定量和监测。

