



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101052877 B

(45) 授权公告日 2012.08.15

(21) 申请号 200580025508.6

C07K 16/00 (2006.01)

(22) 申请日 2005.07.19

C07F 9/02 (2006.01)

C07K 1/06 (2006.01)

(30) 优先权数据

60/592,016 2004.07.29 US

11/072,910 2005.03.04 US

(56) 对比文件

US 6258360 B1, 2001.07.10, 说明书全文.

US 5187266 A, 1993.02.16, 说明书全文.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007.01.29

审查员 施捷

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2005/025483 2005.07.19

(87) PCT申请的公布数据

W02006/020263 EN 2006.02.23

(73) 专利权人 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 72001

代理人 王颖煜 刘玥

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 1/13 (2006.01)

权利要求书 8 页 说明书 20 页

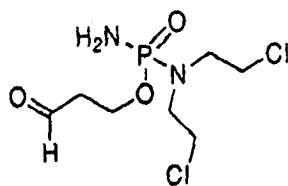
(54) 发明名称

环磷酸胺抗体和免疫测定

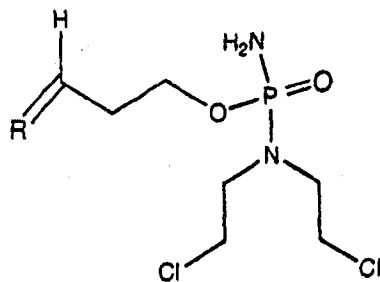
(57) 摘要

新的环磷酸胺的受保护醛基活性代谢产物的共轭物,包括试剂和其免疫原,和这些免疫原产生的单克隆抗体,所述试剂和免疫原在监测患者的环磷酸胺的活性代谢产物的免疫测定中是有用的,其中患者用环磷酸胺治疗。

1. 用于在样本中检测环磷酰胺的活性代谢产物存在的免疫测定, 该代谢产物可以以包含游离醛的下列通式的化合物的形式存在:

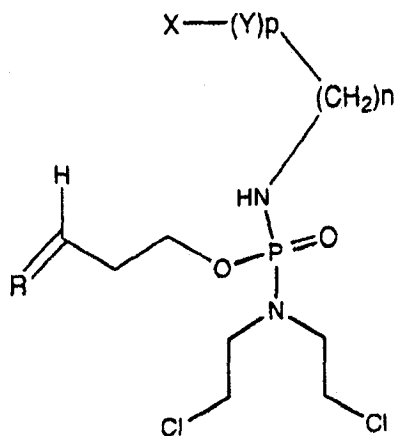


该测定包括处理所述样本, 以保护所述化合物中的游离醛为下列通式的受保护醛的形式:



其中 = R 形成醛保护基,

提供所述处理的样本、抗体以及下列通式的配体和载体的共轭物的混合物, 其中抗体基本上选择性地与所述受保护醛反应并且基本上不与环磷酰胺交叉反应, 所述基本上不与环磷酰胺交叉反应是指相对于所述受保护醛, 所述抗体与环磷酰胺或其他环磷酰胺类似物的交叉反应性不大于 10%, 所述通式是:



其中 R 同上;

Y 是有机间隔基团;

X 是能与所述载体结合的末端官能团;

n 是 1 到 6 的整数; 和

p 是 0 到 1 的整数,

其中所述载体是固体颗粒和 / 或聚合的聚合物,

导致在所述混合物中, 存在于所述处理的样本中的受保护的醛和所述共轭物与所述抗体结合, 然后测定所述混合物中所述共轭物的量, 其中所述共轭物结合到所述抗体上, 其中

可以确定在样本中活性环磷酰胺代谢产物的存在。

2. 权利要求 1 的免疫测定, 其中样本是人样本。

3. 权利要求 2 的免疫测定, 其中抗体是由免疫原产生的, 该免疫原包含与所述配体连接的免疫原聚合物, 其中在形成免疫原和共轭物的配体中和在受保护的醛中 R 是相同的。

4. 权利要求 3 的免疫测定, 其中该抗体附着到固体载体上。

5. 权利要求 4 的免疫测定, 其中固体载体是微量滴定板。

6. 权利要求 4 的免疫测定, 其中固体载体是纳米颗粒。

7. 权利要求 3 的免疫测定, 其中保护基是脞, 由此 = R 形成下列通式的基团:



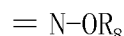
其中 R_7 是低级烷基、苯基或取代的苯基; 和

R_9 是低级烷基或氢,

其中所述低级烷基是包含 1 到 7 个碳原子的单价烷基, 所述取代的苯基是 1-2 个位置被硝基或卤素取代的苯基部分。

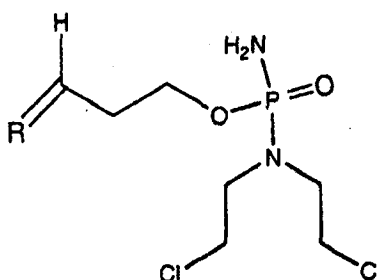
8. 权利要求 7 的免疫测定, 其中 R_7 是 2,4-二硝基苯基。

9. 权利要求 3 的免疫测定, 其中保护基是脞, 以使得 = R 形成下列通式的基团:



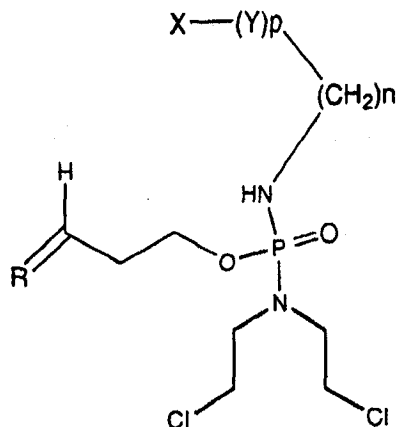
其中 R_8 是低级烷基, 其中所述低级烷基是包含 1 到 7 个碳原子的单价烷基。

10. 一种免疫测定, 用于在样本中检测下列通式的受保护的环磷酰胺代谢产物的存在:



其中 = R 形成受保护的醛基,

包括提供所述样本、抗体以及下列通式的配体和载体的共轭物的混合物, 其中抗体基本上选择性地与所述受保护环磷酰胺代谢产物反应并且基本上不与环磷酰胺交叉反应, 所述基本上不与环磷酰胺交叉反应是指相对于所述受保护环磷酰胺代谢产物, 所述抗体与环磷酰胺或其他环磷酰胺类似物的交叉反应性不大于 10%, 所述通式是:



其中 R 同上；

Y 是有机间隔基团；

X 是能与所述载体结合的末端官能团；

n 是 1 到 6 的整数；和

p 是 0 到 1 的整数，

其中所述载体是固体颗粒和 / 或聚合的聚合物，

导致在所述混合物中，在所述样本中的受保护的环磷酰胺代谢产物和所述共轭物与所述抗体结合，此后测定在所述混合物中结合到所述抗体的所述共轭物的量，由此确定受保护的环磷酰胺代谢产物的存在。

11. 权利要求 10 的免疫测定，其中样本取自人。

12. 权利要求 11 的免疫测定，其中抗体是由免疫原产生的，该免疫原包含与所述配体连接的免疫原聚合物，其中在形成免疫原和共轭物的配体中和在受保护的醛中 R 是相同的。

13. 权利要求 12 的免疫测定，其中该抗体附着到固体载体上。

14. 权利要求 13 的免疫测定，其中固体载体是微量滴定板。

15. 权利要求 13 的免疫测定，其中固体载体是纳米颗粒。

16. 权利要求 12 的免疫测定，其中保护基是脞，由此 = R 形成下列通式的基团：



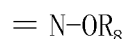
其中 R_7 是低级烷基、苯基或取代的苯基；和

R_9 是氢或低级烷基，

其中所述低级烷基是包含 1 到 7 个碳原子的单价烷基，所述取代的苯基是 1-2 个位置被硝基或卤素取代的苯基部分。

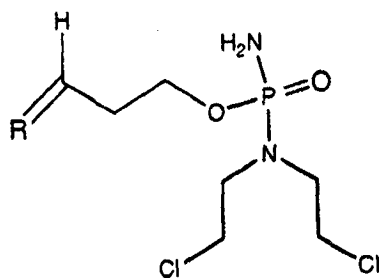
17. 权利要求 16 的免疫测定，其中 R_7 是 2,4-二硝基苯基。

18. 权利要求 12 的免疫测定，其中保护基是脞，以使得 = R 形成下列通式的基团：



其中 R_8 是低级烷基，其中所述低级烷基是包含 1 到 7 个碳原子的单价烷基。

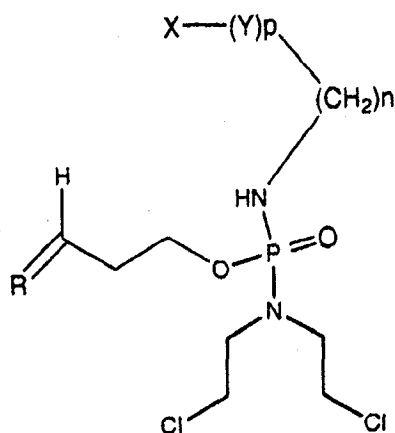
19. 一种抗体，其基本上选择性地结合到下列通式的受保护醛环磷酰胺代谢产物上：



其中 =R 形成醛保护基,

而基本上不与环磷酰胺交叉反应,所述基本上不与环磷酰胺交叉反应是指相对于所述受保护醛环磷酰胺代谢产物,所述抗体与环磷酰胺或其他环磷酰胺类似物的交叉反应性不大于 10%。

20. 权利要求 19 的抗体,其中所述抗体衍生自免疫原多胺聚合物和下列通式的配体的免疫原:



其中 R 同上;

Y 是有机间隔基团;

X 是能与多胺聚合物结合的末端官能团;

n 是 1 到 6 的整数;和

p 是 0 到 1 的整数。

21. 权利要求 20 的抗体,其中所述抗体是单克隆抗体。

22. 权利要求 21 的抗体,其中所述抗体来自小鼠、兔、山羊、绵羊或大鼠。

23. 权利要求 19 的抗体,其中所述保护基是脞,由此 =R 形成下列通式的基团:



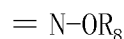
其中 R_7 是低级烷基、苯基或取代的苯基;和

R_9 是氢或低级烷基,

其中所述低级烷基是包含 1 到 7 个碳原子的单价烷基,所述取代的苯基是 1-2 个位置被硝基或卤素取代的苯基部分。

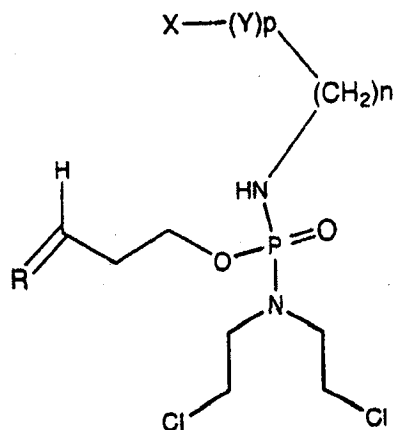
24. 权利要求 23 的抗体,其中 R_7 是 2,4-二硝基苯基。

25. 权利要求 19 的抗体,其中所述保护基是脞以使得 =R 形成下列通式的基团:



其中 R_8 是低级烷基,其中所述低级烷基是包含 1 到 7 个碳原子的单价烷基。

26. 下列通式的化合物：



其中 R 形成醛保护基；

Y 是有机间隔基团；

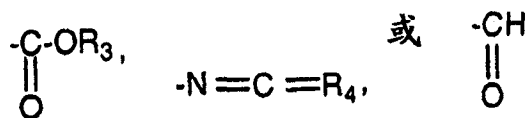
X 是能与载体结合的末端官能团，其中所述载体是固体颗粒和 / 或聚合的聚合物；

p 是 0 到 1 的整数；和

n 是 1 到 6 的整数。

27. 权利要求 26 的化合物，其中 p 是 0。

28. 权利要求 27 的化合物，其中 X 是



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

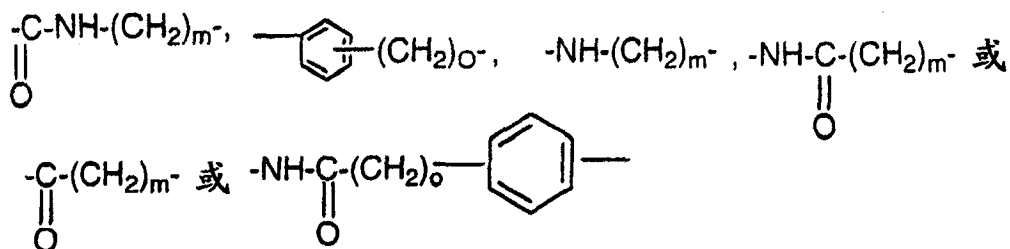
29. 权利要求 28 的化合物，其中 X 是 $\begin{array}{c} \text{-C-OR}_3 \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$ 并且 R_3 是氢。

30. 权利要求 28 的化合物，其中 X 是 $\begin{array}{c} \text{-C-OR}_3 \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$ 并且 R_3 形成反应性酯。

31. 权利要求 30 的化合物，其中所形成的酯是低级烷基酯、酰亚胺酯或酰胺酯，其中所述低级烷基是包含 1 到 7 个碳原子的单价烷基。

32. 权利要求 26 的化合物，其中 p 是 1。

33. 权利要求 32 的化合物，其中 Y 是包含 1 到 10 个碳原子的亚烷基



其中 o 是 0 到 6 的整数， m 是 1 到 6 的整数。

34. 权利要求 33 的化合物, 其中保护基是脞, 由此 = R 形成下列通式的基团:



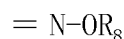
其中 R_7 是低级烷基、苯基或取代的苯基; 和

R_9 是氢或低级烷基,

其中所述低级烷基是包含 1 到 7 个碳原子的单价烷基, 所述取代的苯基是 1-2 个位置被硝基或卤素取代的苯基部分。

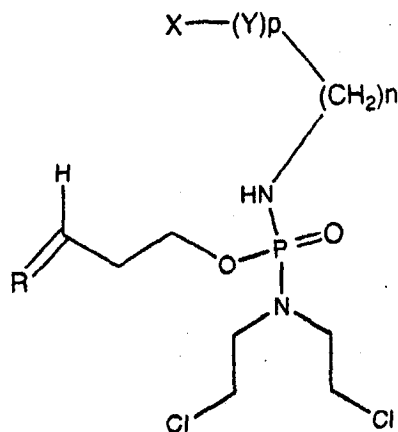
35. 权利要求 34 的化合物, 其中 R_7 是 2,4-二硝基苯基。

36. 权利要求 33 的化合物, 其中保护基是脞以使得 = R 形成下列通式的基团:



其中 R_8 是低级烷基, 其中所述低级烷基是包含 1 到 7 个碳原子的单价烷基。

37. 载体和下列通式化合物的共轭物, 其中通式是:



其中 = R 形成醛保护基;

Y 是有机间隔基团;

X 是能与所述载体结合的末端官能团;

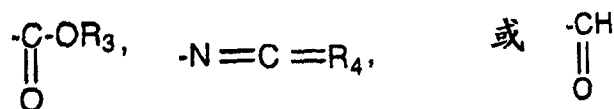
p 是 0 到 1 的整数; 和

n 是 1 到 6 的整数,

其中所述载体是固体颗粒和 / 或聚合的聚合物。

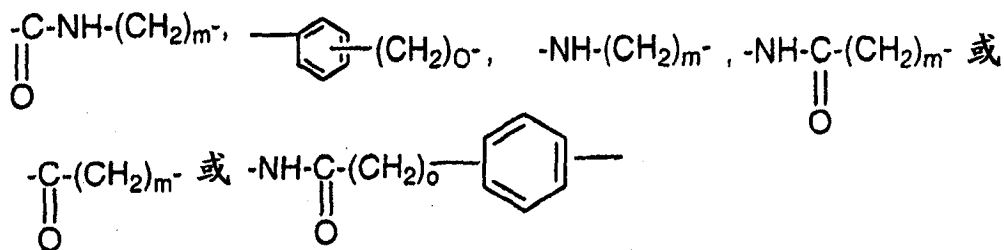
38. 权利要求 37 的共轭物, 其中 p 是 0。

39. 权利要求 38 的共轭物, 其中 X 是



其中 R_3 是氢或与其附着的氧原子一起形成反应性酯, 和 R_4 是氧或硫。

40. 权利要求 37 的共轭物, 其中 p 是 1 并且 Y 是包含 1 到 10 个碳原子的亚烷基



其中 o 是 0 到 6 的整数, m 是 1 到 6 的整数。

41. 权利要求 40 的共轭物, 其中该载体包含一个或多个通过 $\begin{array}{c} \text{—C—} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$ 或 $\begin{array}{c} \text{—NH—C—} \\ \parallel \\ \text{R}_4 \end{array}$ 连接的氨基, 其中 R_4 是氧或硫。

42. 权利要求 37 的共轭物, 其中保护基是脞, 由此 = R 形成下列通式的基团:



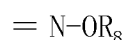
其中 R_7 是低级烷基、苯基或取代的苯基; 和

R_9 是氢或低级烷基,

其中所述低级烷基是包含 1 到 7 个碳原子的单价烷基, 所述取代的苯基是 1-2 个位置被硝基或卤素取代的苯基部分。

43. 权利要求 42 的共轭物, 其中 R_7 是 2,4-二硝基苯基。

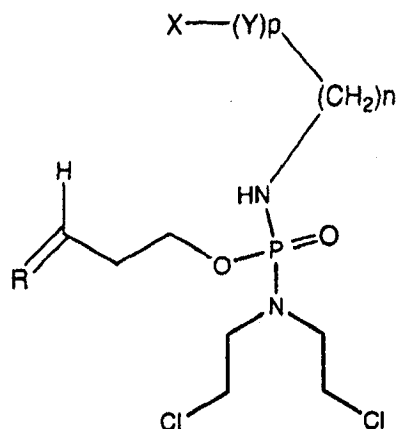
44. 权利要求 37 的共轭物, 其中保护基是脞并且 = R 形成下列通式的基团:



其中 R_8 是低级烷基, 其中所述低级烷基是包含 1 到 7 个碳原子的单价烷基。

45. 权利要求 37 的共轭物, 其中该载体是免疫原聚合物。

46. 一种用于在患者样本中确定活性环磷酰胺代谢产物存在的试剂盒, 其包含在单独容器中的试剂, 一种试剂是载体和下列通式的配体的共轭物:



其中 = R 形成醛保护基;

Y 是有机间隔基团;

X 是能与所述载体结合的末端官能团;

p 是 0 到 1 的整数; 和

n 是 1 到 6 的整数,

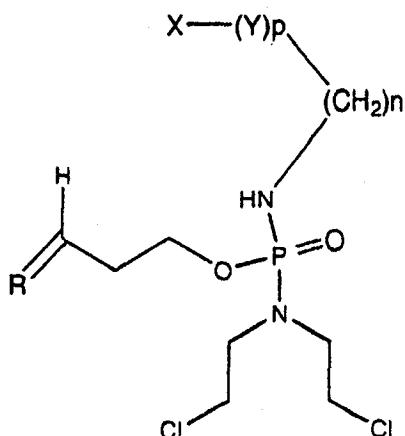
其中所述载体是固体颗粒和 / 或聚合的聚合物,

并且,第二容器包含抗体,该抗体基本上选择性地与所述配体反应并且基本上不与环磷酰胺交叉反应,所述基本上不与环磷酰胺交叉反应是指相对于所述配体,所述抗体与环磷酰胺或其他环磷酰胺类似物的交叉反应性不大于 10%。

47. 权利要求 46 的试剂盒,其中所述共轭物以预定量存在于所述第一容器中。

48. 权利要求 47 的试剂盒,其中所述试剂盒用于确定在所述样本中环磷酰胺的量。

49. 权利要求 46 的试剂盒,其中所述抗体是由与下列通式的化合物连接的免疫原多肽的免疫原产生的:



其中 R, n, p, X 和 Y 同权利要求 46 中所述,

在所述免疫原中使用的醛保护基 R 是在共轭物中使用的相同的醛保护基 R。

50. 权利要求 49 的试剂盒,其中所述试剂盒包括包含反应物的其他试剂,其中该反应物与游离醛反应形成醛保护基,该保护基与形成共轭物试剂的配体中的保护基 R 相同。

环磷酰胺抗体和免疫测定

[0001] 发明领域

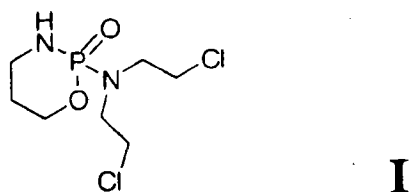
[0002] 本发明涉及免疫测定领域,用于确定人生物样本中活性环磷酰胺代谢产物的存在和 / 或对其定量,以在化学治疗期间快速确定药物的最佳浓度。

[0003] 发明背景

[0004] 癌症是一个术语,用于描述当在身体的一部分中细胞开始不受控制地生长时,所有具有发展的共有性质的一组恶性肿瘤。大多数的癌症形成肿瘤,但是也可以出现在血液中和循环通过其生长的其他组织。大多数情况下,恶性肿瘤最通常是用外科手术、化学疗法、和 / 或放射疗法联合治疗的。用于治疗特定癌症的治疗方法的类型取决于数种因素包括恶性肿瘤的类型和在诊断时其所处的阶段。

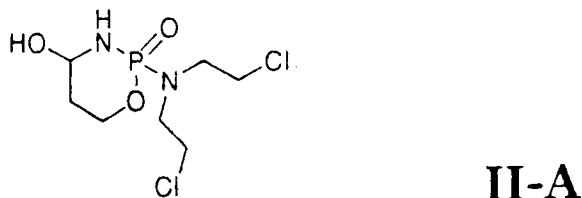
[0005] 环磷酰胺是通常使用的一种细胞毒素剂。该化学治疗剂的通用化学名称是环磷酰胺 (cyclophosphamide),具有如下通式:

[0006]



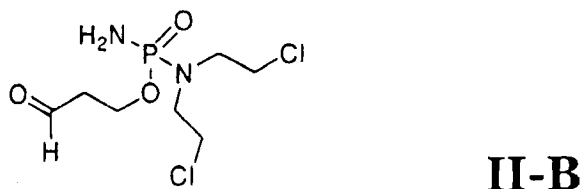
[0007] 环磷酰胺是施用的活性 4- 羟基环磷酰胺 (HCY) 的前药,HCY 具有如下通式:

[0008]



[0009] 当把环磷酰胺作为治疗剂施用于患者时,通式 I 的化合物环磷酰胺就在血液中代谢成为通式 II-A 的化合物。作为活性成分,通式 II-A 的化合物以其互变异构体形式醛化磷酰胺存在,醛化磷酰胺具有如下通式:

[0010]



[0011] 通式 II-A 的化合物和当作为活性成分时的其互变异构体通式 II-B 的化合物在血液外都是不稳定的化合物。因此,为了给患者施用通式 II-A 和 II-B 的化合物,都必须以环磷酰胺的形式施用这些化合物。

[0012] 由于通式 II-A 的化合物和其互变异构体通式 II-B 的化合物不稳定,因此检测其存在的免疫测定是不实际的。为了通过免疫测定来检测和 / 或定量在患者血液中通式 II-A 的化合物和其互变异构体通式 II-B 的化合物的存在,有必要俘获活性物质,即通式 II-A 和 II-B 的化合物。这可以通过在存在于通式 II-B 上的活性物质保护醛基来完成,而所述保护包括形成受保护的醛例如肟或腙。这些由醛磷酰胺的醛基而形成的保护基,可以通过形成受保护醛基的常规方法来完成,如 Ludeman 等人 . J. Pharma. Sci. , 84(4) :PP393-398, 1995, Zon 等人 . J. Pharma. Sci., 71(4) :pp443-446, 1982, 和 McDonald 等人 . Blood, 101(5) : pp2043-2048, 2003 所述,由该稳定俘获的衍生物来测定在血液中活性成分的存在。通过监测在身体中活性环磷酰胺类物质的水平和调整剂量,可以更好地控制和限制给患者施用环磷酰胺而导致的副作用。(Ren 等人 . Clin. Pharmacol. Ther. 64(3) :pp289-301, 1998 ; Petros 等人 ., Clin. Cancer Res. 8 :pp698-705, 2002 ;和 Chen 等人 . Cancer Research 55 : pp810-815, 1995)。

[0013] 监测的另一个原因是,施用的环磷酰胺的剂量和所产生的改变治疗效果的血清药物浓度之间通常存在高度可变的关系。环磷酰胺的个体内和个体之间药物代谢动力学差异程度可以高达 9 倍 (Chang 等人 . Pharmacogenetics 7 :211-221, 1997, Ren 等人 . Clin. Pharmacol. Ther. 64(3) :pp289-301, 1998), 并受到很多因素的影响,包括 :

- [0014] ▫器官功能
- [0015] ▫遗传调节
- [0016] ▫疾病情况
- [0017] ▫年龄
- [0018] ▫药物 - 药物之间的相互作用
- [0019] ▫药物摄取的时间
- [0020] ▫施用方式,和
- [0021] ▫相关技术的施用

[0022] 这些差异的结果是,在不同个体中,等剂量的相同药物可以导致显著不同的临床结果 (Hon 等人 . Clinical Chemistry 44, pp388-400, 1998)。根据在患者中个体的药物清除率和最终的血清药物浓度,相同环磷酰胺剂量的有效性显著不同。治疗性药物的管理使得临床医生可以洞察在口服和静脉施用患者时的差异。当进行治疗性药物的管理时,药物剂量对于患者可以是适应于个体需要的,有效治疗癌症而没有不想要的副作用的机会将会高得多 (Nieto, Current Drug Metabolism 2 :pp53-66, 2001)。另外,环磷酰胺的治疗性药物管理可以作为良好的工具来确保以实际的处方剂量执行化学疗法的顺应性和达到有效的血清浓度水平。已经发现,环磷酰胺的活性成分的血清浓度的差异不仅取决于生理因素,而且也是由施用技术的不同和身体吸收和代谢环磷酰胺的能力导致的。尤其在下列情况下,这是非常正确的:对于所给的环磷酰胺,当施用于患者时,患者通常通过不同途径吸收和代谢其活性成分。因此,通过免疫测定的方法来监测这些活性成分在患者中的水平时,重要的是,免疫测定能够从通式 I 的化合物即环磷酰胺中辨别出通式 II-A 和 II-B 的化合物的活性成分。有关这些活性成分的抗体的问题在于,它们与环磷酰胺交叉反应,使得这些免疫测定法都失去作用。

[0023] 环磷酰胺的常规治疗性药物管理需要简单的自动的试验以适应通常的实验室设

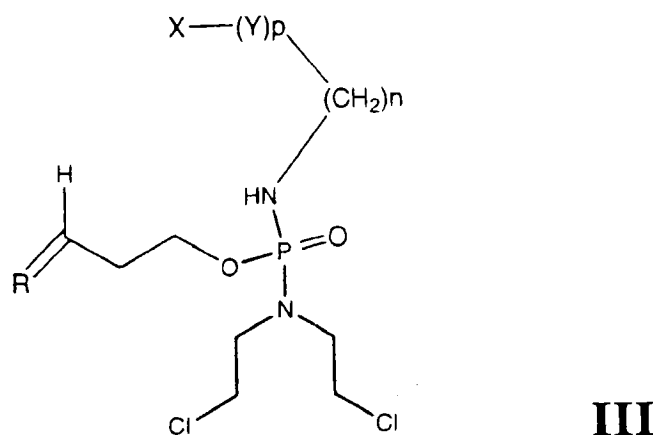
备的有效性。与这些标准最佳拟合的试验是免疫测定。目前,对于环磷酰胺施用没有有效的免疫测定法,监测环磷酰胺的活性代谢产物的水平是通过物理方法来完成的,例如高压液相色谱法 (HPLC) (Escoriaza 等人. J. of Chromatography B:Biomedical Sciences and applications, 736 (1+2) :pp97-102, 1999)。为了最有效地监测药物水平,该抗体对于稳定形式的环磷酰胺的代谢产物应当是特异性的,并显示非常低的交叉反应性,而不会与相关的化合物,特别是环磷酰胺交叉反应。

[0024] 发明简述

[0025] 根据本发明,制备了一组新的抗体,其基本上选择性地与通式 II-A 和 II-B 的活性环磷酰胺代谢产物的稳定形式反应,以结合到该稳定形式上而与环磷酰胺没有实质上的交叉反应性。选择性地反应,是指该抗体与通式 II-A 和 II-B 的活性环磷酰胺代谢产物的稳定形式反应,而基本上不与环磷酰胺、环磷酰胺的干扰性类似物反应,其中最重要的是环磷酰胺。通过提供基本上不与环磷酰胺交叉反应的抗体,允许人们进行活性环磷酰胺代谢产物的免疫测定,以精确地监测在用环磷酰胺治疗的患者的治疗性管理中活性环磷酰胺代谢产物存在的水平。

[0026] 已经发现,通过使用免疫原,其中该免疫原是免疫原的多胺聚合物和下列通式的化合物的共轭物:

[0027]



[0028] 其中 = R 形成醛保护基;

[0029] Y 是有机间隔基;

[0030] X 是能结合到多胺聚合物上的末端官能团;

[0031] P 是 0 到 1 的整数,和

[0032] N 是 1 到 6 的整数,

[0033] 产生了抗体,该抗体对于通式 II-A 和 II-B 的活性代谢产物是特异性的,基本上不与环磷酰胺本身以及其它环磷酰胺的干扰性类似物反应。基本上选择性地与通式 II-A 和 II-B 的活性代谢产物反应,并不与环磷酰胺交叉反应的抗体的提供,允许人们进行免疫测定,其特别是探测和监测用环磷酰胺治疗的患者的液体样本中的活性代谢产物。本发明也包括用于所述免疫测定的试剂和试剂盒。环磷酰胺的存在是假阳性读数的主要原因,假阳性读数使得环磷酰胺的活性形式的免疫测定变得不适当。

[0034] 发明详述

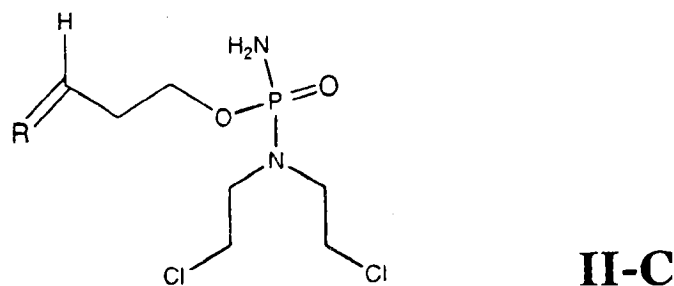
[0035] 根据本发明,制备了一组新的抗体,其基本上选择性地与通式 II-A 和 II-B 的活性

环磷酰胺代谢产物反应,基本上不与环磷酰胺本身、环磷酰胺的干扰性类似物反应或交叉反应。已经发现,通过使用由通式 III 的化合物制备的免疫原,提供了本发明的新的一组抗体。通过使用该抗体,发展出了免疫测定法,包括用于在血液、血浆或其他体液样本中检测和 / 或定量环磷酰胺代谢产物的免疫测定的试剂和试剂盒。通过使用该免疫测定,可以检测和 / 或定量在体液样本,优选血液或血浆样本中活性环磷酰胺代谢产物的存在和量。在该方法中,可以在治疗期间监测用环磷酰胺治疗的患者,并根据所述的监测来调整其治疗。通过本发明的方法,人们可以实现对施用环磷酰胺作为化学治疗剂的癌症患者进行治疗性药物管理。

[0036] 在本发明的免疫测定中利用的试剂是通式 III 的化合物和载体的共轭物。为完成该免疫测定,共轭试剂应当包含与在免疫原中存在的保护基 R 相同的保护基 R,其中该免疫原用于在该免疫测定中形成抗体。

[0037] 在本发明的免疫测定法中,这些共轭物是存在于样本中的通式 II-A 和 II-B 的活性环磷酰胺的代谢产物的竞争性结合配偶体,用于和本发明的抗体结合。但是,由于这些活性环磷酰胺代谢产物的不稳定性,在进行该免疫测定前,通过将醛基转换成受保护的醛基来俘获样本中的这些代谢产物。实现该目的,包括在试剂收集后处理该样本,其中该试剂通过将其转换成下列通式的醛保护基而保护醛基:

[0038]

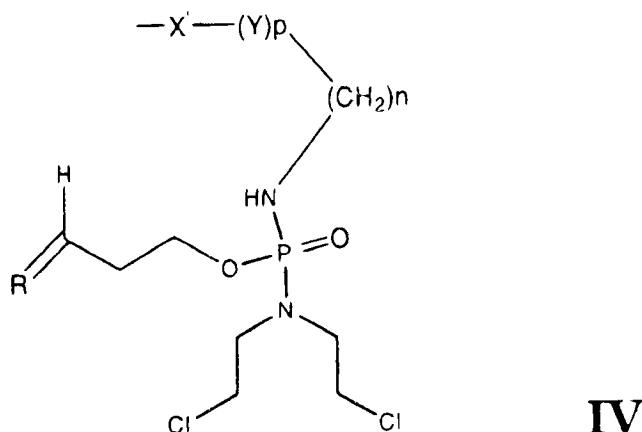


[0039] 通式 II-C 的化合物是通式 II-A 和通式 II-B 的化合物的稳定形式,该化合物可用于确定通式 II-A 和通式 II-B 的活性环磷酰胺代谢产物的测定中。在通过醛保护基 R 俘获通式 II-B 的化合物的醛基中,在载体的共轭物和免疫原中使用的相同醛保护基 R,应当用于在该免疫测定中俘获样本中即通式 II-C 的化合物的醛基。

[0040] 在该免疫测定中,结合到抗体上的共轭试剂的量将与在样本中存在的活性环磷酰胺代谢产物的量成反比例。根据本发明,该测定利用所有的常规测定方法来检测和测定结合或未结合到抗体上的所述共轭物的量。通过使用所述的方法,可以确定结合或未结合的共轭物的量。一般地,在样本中通式 II-A 和 II-B 的活性环磷酰胺代谢产物的量的确定,包括将由样本产生的结合或未结合的共轭物的测定量与标准或校正曲线样本确定的结合或未结合共轭物相联系,其中该标准和校正曲线样本包含已知量的通式 II-A 和 II-B 的活性环磷酰胺代谢产物,其中已知量在试验样本所期望的范围内。用与使用样本时相同的免疫测定方法来确定用于产生校正曲线的研究。

[0041] 共轭试剂和免疫原是由通式 III 的化合物制备的。在免疫原和载体中,多胺聚合物或载体与具有下列通式的配体部分连接:

[0042]



[0043] 其中 Y、R、p 和 n 如上所述；和

[0044] x' 是 -CH₂- 或官能连接基。

[0045] 定义

[0046] 通过本说明，将会理解下列的定义：

[0047] 术语“免疫原”和“免疫原的”涉及能在有机体中引导、制备或产生免疫应答的物质。

[0048] 术语“共轭物”涉及两部分结合到一起而形成任何物质。根据本发明代表性的共轭物包括由小分子例如通式 II-B 的化合物，与大分子例如载体或多胺聚合物，特别是蛋白质结合在一起形成的物质。在该共轭物中，小分子可以结合到大分子的一个或多个活性位点上。

[0049] “半抗原”是部分或不完整的抗原。它们是不含蛋白质的物质，大部分是低分子量物质，其不能调节抗体形成，但能与抗体反应。后者的形成包括半抗原结合到高分子量的免疫原载体上，然后将该结合产物即免疫原注射到人或动物患者中。本发明的半抗原是通式 II-C 的化合物。

[0050] 本文使用的“间隔基团”或“间隔基”涉及化学结构的一部分，该化学结构通过 -CH₂- 或官能连接基结合了两种或更多亚结构例如半抗原、载体、免疫原、指示物、或示踪物。这些间隔基团将会在本申请的下文中列举。间隔基团的原子和间隔基团内链上的原子本身通过化学键连接。优选的间隔基是直链或支链、饱和或不饱和的碳链。这些碳链也包括在链中或链的末端的一个或多个杂原子。“杂原子”是指碳以外的其它原子，选自氧、氮和硫。间隔基团也包括环或芳香基作为链的一部分或作为链中一个原子上的取代基。

[0051] 在间隔基团中原子数目通过计算除氢以外的原子来确定。在间隔基团内的链中的原子数目通过沿着连接亚结构之间最短的途径来计算除氢以外的原子数目来确定。官能连接基可以用于活化半抗原或间隔基团，例如在其上提供有效的官能化位点来合成半抗原和指示物或载体或多胺聚合物的共轭物。

[0052] 本文作为术语使用的“免疫原载体”是一种免疫原物质，通常是蛋白质，其可以与半抗原结合，所述半抗原在该情况下是通式 II-C 的化合物，因此能够使这些半抗原衍生物诱导免疫应答和引导能与这些半抗原特异性结合的抗体的产生。免疫原载体和连接基将在本申请的下文中列举。在这些免疫原载体中包括蛋白质、糖蛋白、络合的多胺-多糖、颗粒、和被识别为外源性的核酸，因此引导了宿主的免疫应答。多胺-多糖可以由多糖使用任何已知用于该制备的常规手段来制备。

[0053] 各种的蛋白质类型也可以作为多(氨基酸)免疫原载体使用。这些类型包括白蛋白、血清蛋白、脂蛋白等等。用作举例性的蛋白质包括牛血清白蛋白(BSA)、匙孔血蓝蛋白(KLH)、鸡蛋卵白蛋白、牛甲状腺球蛋白(BTG)等等。或者,可以使用合成的多(氨基酸)。

[0054] 免疫原载体也可以包括多胺-多糖,其是由单糖的重复缩合构建的高分子量聚合物。多糖的例子是淀粉、糖原、纤维素、碳水化合物胶例如阿拉伯胶、琼脂等等。多糖也包含聚氨基酸残基和/或脂残基。

[0055] 免疫原载体也可以是多(核苷酸),其单独或共轭到一种上述的多(氨基酸)或多糖上。

[0056] 免疫原载体也可以包括固体颗粒。该颗粒的直径通常至少约 0.02 微米(μm),并且不大于约 100 μm ,通常是约 0.05 μm 到 10 μm 。该颗粒可以有机的或无机的,可溶胀的或不可溶胀的,多孔的或非多孔的,密度最好接近于水,通常是约 0.7 到 1.5g/mL,包括透明的、部分透明的、或不透明的材料。该颗粒可以是生物学材料例如细胞和微生物,包括非限制性例子例如红血球、粒细胞、淋巴细胞、杂交瘤、链球菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、和病毒。该颗粒也可以由有机和无机聚合物、脂质体、胶乳、磷脂囊、或脂蛋白组成。

[0057] “多(氨基酸)”或“多肽”是由氨基酸形成的聚酰胺。多(氨基酸)通常的范围是从约 2,000 分子量,而没有分子量的上限,通常小于 10,000,000,一般不超过约 600,000 道尔顿。根据是否包含免疫原载体或酶,它们通常是不同的范围。

[0058] “肽”是两个或多个氨基酸通过酰胺(肽)键连接而形成的任意化合物,通常是 α -氨基酸的聚合物,其中每个氨基酸残基(除了 NH_2 末端)的 α -氨基以直链形式连接到下一个残基的 α -羧基上。术语肽、多肽和多(氨基酸)在本文中具有相同的含义,涉及该类的化合物而不限定其大小。该类的最大成员称作蛋白质。

[0059] “标记”、“检测分子”、或“示踪物”是产生或能够诱导产生可检测信号的任意分子。标记可以共轭到分析物、免疫原、抗体、或其它分子例如受体或可以与受体结合的分子例如配体,特别是半抗原上。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、化学发光团、发光团或致敏物;非磁性或磁性颗粒、固体载体、脂质体、配体、或受体。

[0060] 术语“抗体”涉及与抗体特异性蛋白结合的配偶体,是对于抗原具有特异性结合亲和力和力,而排除了其它物质的任何物质或物质组。统称的抗体包括多克隆抗体、单克隆抗体和抗体片段。

[0061] 术语“衍生物”指由母体化合物通过一个或多个化学反应制成的化合物或分子。

[0062] 对于与通式 III 的化合物形成共轭物的术语“载体”,指的是固体颗粒和/或聚合的聚合物例如免疫原聚合物例如上述的那些。当载体是固体颗粒时,该固体颗粒可以结合到多胺聚合物上、用多胺聚合物涂敷或附着到多胺聚合物上,以便为结合通式 III 的化合物中的末端官能团 X 提供一个或多个反应位点。

[0063] 术语“试剂盒(reagent kit)”,或“试剂盒(test kit)”指在进行测定时所使用的材料的集合。该试剂可以在相同或单独的容器中以包装组合的形式提供,这取决于它们的交叉反应性和稳定性,并且也可以是液体或冻干形式。可以选择在该试剂盒中提供的试剂的量和比例,以便为特定的应用提供最佳的结果。本发明的试剂盒的具体特征包括对通式 II-C 化合物特异性的抗体。该试剂盒也可以进一步包含分析物的配体、校准和对照物质。

该试剂可以保持液体形式或者可以是冻干的。

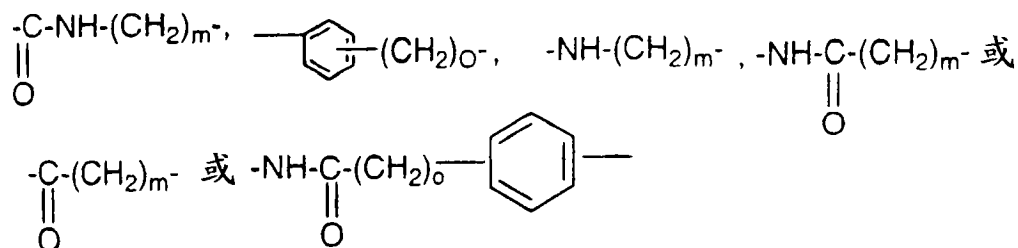
[0064] 短语“校准和对照物质”指包含已知量的要测定药物的任意标准或参照物质。计算药物的浓度,包括将未知样本获得的结果与标准品获得结果进行比较。这通常可以通过构建校准曲线来完成。

[0065] 术语“生物样本”包括但不限于,任意量的来自活物或先前是活物的物质。这些活物包括但不限于,人、小鼠、猴子、大鼠、兔、马和其他动物。这些物质包括但不限于,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。

[0066] 试剂和免疫原

[0067] 在构建该免疫测定时,构建由通式 III 的化合物形成的共轭试剂来与通式 II-C 的化合物竞争,通式 II-C 的化合物是由在样本中俘获处于其稳定形式的通式 II-A 和 II-B 的化合物形成的,用作本发明的抗体上的结合位点。在本发明的免疫测定中,用于制备本发明的抗体的免疫原是由通式 III 的化合物制备的免疫原,连接子间隔基构成该分子的 $-(CH_2)_n-(Y)_p-X-$ 部分。连接子 X 和间隔基 $-(CH_2)_n-(Y)_p-$ 在制备共轭物和免疫原中是常规性的。用于制备免疫测定的共轭物和免疫原的任何常规间隔基-连接基团在通式 III 的化合物中都是可以利用的。这些常规连接子和间隔基在美国专利 U. S. 5, 501, 987 和 U. S. 5, 101, 015 中公开。优选的间隔基团包括上文所提到的间隔基团,特别优选的间隔基团是例如包含 1 到 6 个碳原子的烯基,

[0068]



[0069] 特别优选的间隔基是其中 $\circ$ 是 0 到 6 的整数, m 是 1 到 6 的整数的烷撑。

[0070] 在与免疫原或载体连接的通式 IV 的配体部分中, X' 是与间隔基连接的 $-CH_2-$ 或官能团, 优选是聚合物或载体或免疫原上的胺基。基团 X' 是通式 III 的化合物的末端官能团 X 的结果, 其中通式 III 的化合物能与作为载体或免疫原使用的多胺聚合物的氨基结合。任意能与胺基反应的末端官能团都可以用作通式 III 的化合物的官能团 X。在 X 内优选包括的末端官能团是

[0071] $\begin{array}{c} \text{-C-OR}_3, \\ || \\ \text{O} \end{array}, \quad \text{-N}=\text{C}=\text{R}_4, \quad \text{或} \quad \begin{array}{c} \text{-CH} \\ || \\ \text{O} \end{array}$

[0072] 其中 R_3 是氢或与其附着的氧原子一起形成反应性酯, R_4 是氧或硫, 基团 $-N=C=R_4$ 可以是异氰酸盐或异硫氰酸盐。由 OR_3 形成的活性酯包括亚氨酸酯, 例如 N-羟基琥珀酰亚胺、1-羟基苯并三唑和对硝基苯基酯。但是也可以使用任意的能与胺基反应的活性酯。

[0073] 通过常规方法将羧基和活性酯结合到载体或免疫原聚合物上。多胺聚合物例如蛋白质上的胺基产生了酰胺基,其将间隔基结合到本发明的聚合物、免疫原或载体和 / 或共轭物上。

[0074] 在本发明的免疫原和共轭物中,通式 III 的化合物的包含羧基的半抗原和载体或

免疫原的多胺聚合物上的氨基之间的化学键可以通过各种本领域技术人员已知的方法来建立。通常优选形成酰胺键。酰胺键的形成,包括首先通过羧基和离去基团试剂(例如,N-羟基琥珀酰亚胺、1-羟基苯并三唑和对硝基苯酚等等)反应活化通式 III 的化合物中的半抗原的羧酸部分。可以使用活化试剂例如二环己基碳二亚胺、二异丙基碳二亚胺等等。然后,通式 III 的半抗原中羧基的活化形式与包含蛋白质载体的缓冲溶液反应。

[0075] 当通式 III 的半抗原衍生物包含伯氨基或仲氨基以及羧基时,在活化和偶合反应期间必须使用氨基保护基,以防止共轭物自身发生反应。典型地,共轭物上的氨基的保护,通过形成相应的 N-三氟乙酰胺、N-叔丁基氧羰基氨基甲酸酯(N-t-BOC 氨基甲酸酯)、N-碳苯甲氧基氨基甲酸酯或类似的结构来实现。当与免疫原聚合物或载体的结合反应已经完成时,如上所述,可以用不改变免疫原或共轭物结构的试剂来除去氨基保护基。这些试剂和方法是本领域技术人员已知的,包括弱或强的含水或无水酸、弱或强的含水或无水碱、包含氯化物的试剂例如硼氢化钠、或氰基硼氢化钠和催化氢化作用。共轭半抗原和载体的各种方法在美国专利 U. S. 3, 996, 344 和 U. S. 4, 016, 146 中公开,在此将其引入本文作为参考。

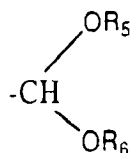
[0076] 另一方面,当在通式 III 的化合物中 X 是末端的异氰酸盐或硫异氰酸盐时,这些基团当与多胺聚合物的游离胺反应时产生了通式 IV 的共轭物或免疫原,其中 X' 是 $\begin{array}{c} \text{NH} \quad \text{-C-} \\ \parallel \\ \text{R}_4 \end{array}$ 其

中 R₄ 同上,其与多胺载体或免疫原多肽上的氨基官能性结合。

[0077] 当在通式 III 的化合物中 X 是醛基时,这些化合物可以通过还原氨基化作用通过胺键与多胺多肽或载体的胺基结合。可以使用任意的用胺基缩合醛基的常规方法例如通过还原氨基化作用来形成该连接。在该情况中,通式 IV 的配体部分的 X' 是 -CH₂-。

[0078] 根据本发明,可以使用形成醛保护基的任意常规方法来将通式 II-A 和 II-B 的化合物转换成通式 II-C 的化合物。根据本发明,R 可以形成常规的醛保护基。优选的醛保护基包括缩醛和环状缩醛,也即通式 II-B 的化合物中 -CH = R 是:

[0079]



[0080] 其中 R₅ 和 R₆ 是相同的低级烷基或一起形成包含 2 到 6 个碳原子的低级烯基桥。

[0081] 根据本发明可以由 R 形成的另一组优选的醛保护基是烷基脎和苯基脎例如 2, 4-二硝基苯基脎,脎和缩氨基脎。对于脎,通式 II-C 的化合物的 -CH = R 部分形成下列通式的基团:

[0082] -CH = N-NR₁₇R₁₈

[0083] 其中 R₁₇ 是苯基、取代的苯基、低级烷基或 $\begin{array}{c} \text{-C-NH}_2 \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$ 和

[0084] R₁₈ 是氢或低级烷基。

[0085] 当在通式 II-C 的化合物中醛保护基是脎时,通式 II-C 的化合物的 CH = R 部分形成下列通式的基团:

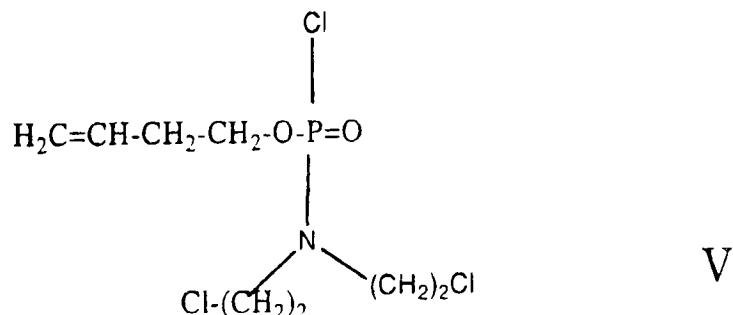
[0086] -CH = N-OR₈

[0087] 其中 R_8 是低级烷基。

[0088] 可以使用将醛基转换成其中一种保护基的任意常规方法, 来转换通式 II-B 中的醛基, 以俘获通式 II-A 和 II-B 的化合物而成为通式 II-C 的化合物。

[0089] 通式 III 的化合物可以由下列通式的化合物制备:

[0090]



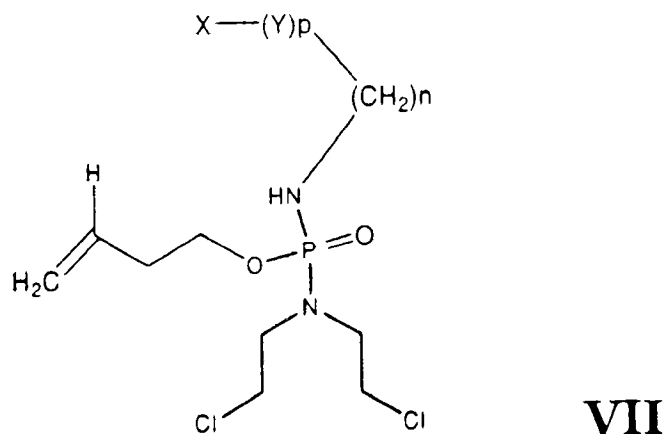
[0091] 在制备通式 III 的化合物时, 通式 V 的化合物首先与下列通式的化合物反应:

[0092] $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-(\text{Y})_p-\text{X}$ VI

[0093] 其中 n 、 X 、 Y 和 p 同上

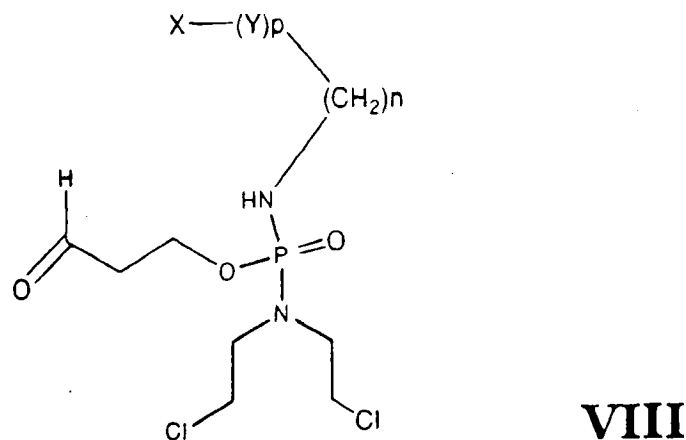
[0094] 来制备下列通式的化合物:

[0095]



[0096] 接着通式 VII 的化合物转化成下列通式的化合物:

[0097]



[0098] 其中 X 、 Y 、 p 和 n 同上。

[0099] 通式 V 的化合物与通式 VI 的化合物的反应可以使用氯缩合胺的任意常规方法来

完成。在该合成中,氯化磷比附着到氮原子上的氯化乙烯上的其他氯更具有反应性。因此,卤化磷与通式 IV 的化合物上的胺基快速反应。在进行该反应时,可以用各种保护基的方法来保护存在于取代基中用 X 和 Y 表示的反应性官能团,可以在该反应方案的后续步骤中除去该保护基。在该方法中,制备出了通式 VII 的化合物。通过将双键氧化成醛基取代基可以将通式 VII 的化合物转换成通式 VIII 的化合物。可以使用将双键转换成醛基的任意常规方法来完成该反应。氧化的优选方法是 ozonolysis。可以使用 ozonolysis 的任意常规方法。通过把醛基转换成醛保护基,通式 VIII 的化合物上的醛可以转化成通式 III 的化合物。在该过程中可以使用任意的常规醛保护基。在形成通式 III 的化合物时,在其稳定情况下,该化合物包含醛作为受保护的醛基。

[0100] 根据本发明,可以使用保护醛基的任意常规方法和常规的醛保护基来保护通式 VIII 的化合物中的游离醛,以制备通式 III 的化合物或通式 II-B 的化合物中的游离醛基。优选的方法是通过通式 VIII 的化合物或通式 II-B 的化合物与下列通式的化合物反应制备脞:



[0102] 其中 R_7 是低级烷基、苯基、取代的苯基;和

[0103] R_9 是氢或低级烷基。

[0104] 制备通式 III 和 II-C 的化合物,其中 $=\text{R}$ 形成脞通过将通式 VIII 和 II-B 的化合物与通式 X 的化合物反应而制备。在该转换中可以使用将醛基转换成脞的任意常规方法。在本文中,术语“低级烷基”是指包含 1 到 7 个碳原子的单价烷基例如甲基、乙基、丙基、异丁基、戊基等等。术语取代的苯基是指 1 到 3 个位置被取代的苯基部分,优选 1-2 个位置被硝基或卤素取代,特别优选 2,4-二硝基取代的苯基。

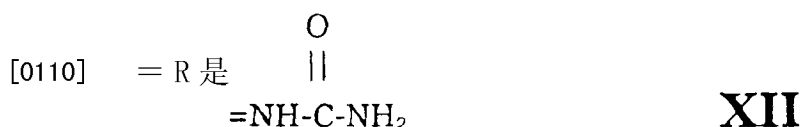
[0105] 另外优选的保护基是脞。它们通过将通式 II-B 和 VIII 的化合物中的游离醛基与下列通式的化合物反应而制得:



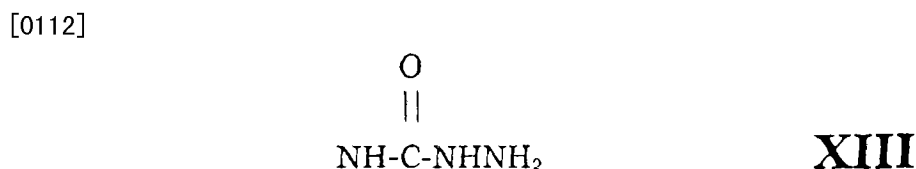
[0107] 其中 R_8 是低级烷基。

[0108] 这些脞通过使用将游离醛转换成脞的常规方法形成。

[0109] 另一方面,通式 VIII 和 II-B 的化合物中游离醛可以转换成缩氨基脒,即,其中



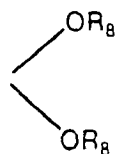
[0111] 通过与下列通式的化合物反应:



[0113] 利用将醛基转化成缩氨基脒的常规方法。

[0114] 另一个优选的保护基是缩醛基,即,其中 $=\text{R}$ 是

[0115]



XIV

[0116] 其中 R_8 和 R_8 同上 ;或

[0117] 其通过如下方法制备,将通式 II-B 或 VIII 的化合物与下列通式的醛反应 :

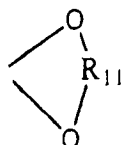
[0118] R_8OH XV

[0119] 其中 R_8 同上。

[0120] 利用将醛基转化成缩醛的常规方法。

[0121] 另一个优选的保护基是环状缩醛基,即,其中 $=R$ 是

[0122]



XVI

[0123] 其中 R_{11} 是低级烷撑

[0124] 其制备包括将通式 II-B 或 VIII 的化合物与下列通式的二醇反应 :

[0125] $HO-R_{11}-OH$ XVII

[0126] 其中 R_{11} 同上

[0127] 利用将游离醛基转化成环状缩醛的常规方法。

[0128] 术语“低级烷撑”是指具有 2 到 7 个碳原子的二价饱和烃,优选在两个不同的碳原子上具有二价结合,例如 1,2 亚乙基 ;1,3 亚丙基 ;1,4 亚丁基等等。

[0129] 可以将通式 III 的化合物转换成含本发明的共轭载体试剂的免疫原,包括将这些化合物与多胺、多肽或载体反应。如果多胺或多肽是免疫活性的,也可以使用相同的多肽作为免疫原中的载体。但是,为了形成共轭物,这些聚合物不需要产生免疫应答,而免疫原则需要。根据本发明,在通式 III 的化合物中 X 所代表的各种官能团可以共轭到聚合物材料上,包括使用将官能团附着到在聚合物中包含的胺基上的常规方法。根据一个优选的实施方案。在通式 III 的化合物中, X 是羧酸基或其活性酯。

[0130] 抗体

[0131] 本发明也涉及新的抗体,包括单克隆抗体到通式 II-C 的活性环磷酰胺代谢产物的稳定形式。这些抗体通过使用上述的免疫原而制备。根据本发明,我们发现,这些根据本发明制备的抗体与通式 II-A 和 II-B 的化合物的稳定形式选择性地反应,而不与干扰免疫测定的环磷酰胺或其他环磷酰胺类似物反应。

[0132] 本发明涉及新的抗体和单克隆抗体到通式 II-C 的活性环磷酰胺代谢产物的稳定形式。可以通过用本发明的免疫原使宿主动物免疫来方便地制备本发明的抗血清。适当的宿主动物包括啮齿类例如,小鼠、大鼠、兔、荷兰猪等等,或高级哺乳动物例如山羊、绵羊、马等等,特别优选小鼠、大鼠和兔。根据可接受的规程,给予初始剂量、出血和加强注射,以在动物中引导免疫应答,例如在一个优选的实施方案中,小鼠接受的初始剂量是 $100 \mu g$ 免疫原 / 小鼠 i. p., 在六个月的时间后给予一或多次后续的加强注射 $100 \mu g$ 免疫原 / 小鼠。通过周期性的出血,用常规的免疫测定观测免疫小鼠的血样,发现其对于与通式 II-C 的化合

物的结合产生了免疫应答。这些方法提供了一种方便的方法来筛选能产生具有需要活性的抗血清的宿主。

[0133] 根据上述的方案给 Balb/c 小鼠免疫,然后连续三天腹膜内 (i. p.) 或静脉内 (i. v.) 或给小鼠注射 100 μ g 免疫原,其在细胞融合前三天开始,可以方便地制备出单克隆抗体。抗体领域公知的其他规程当然也可以利用。本文详述的完整免疫规程为抗体对通式 II-C 的活性环磷酰胺代谢产物的稳定形式产生血清抗体应答提供了最适宜的规程。

[0134] 从宿主的脾、外周血、淋巴结或其他组织获得的淋巴细胞可以作为单克隆抗体产生细胞使用。最优选是从脾获得的 B 淋巴细胞。获得能产生本发明的所需的单克隆抗体的杂交瘤,包括将该 B 淋巴细胞和无限增殖细胞系融合,其中无限增殖细胞系是在杂交细胞上传递长期组织培养稳定性的细胞系。在本发明优选的实施方案中,无限增殖细胞可以是淋巴样干细胞或浆细胞瘤细胞例如骨髓瘤细胞,其自身是产生抗体的细胞但也是恶性的。产生本发明的单克隆抗体的鼠的杂交瘤的形成通过融合小鼠骨髓瘤细胞和脾细胞来完成,其中脾细胞来自对通式 III 的化合物的蛋白共轭物免疫的小鼠。嵌合的和人化的单克隆抗体的制备,可以包括从杂交瘤细胞中克隆抗体表达基因,使用现在本领域公知的重组 DNA 方法来把小鼠可变区的亚序列结合到人恒定区,或者将人框架区和来自供体小鼠或大鼠免疫球蛋白的互补决定区 (CDR' s) 组合。实现鼠单克隆抗体的人化的改进方法,所述单克隆抗体提供了亲合力增加的抗体,公开于国际专利申请 W092/11018 中。可以制备仅包含初级抗体结构的一部分的多肽片段,其中该片段具有一种或多种免疫球蛋白活性。制备这些多肽片段,包括用本领域公知的方法进行完整抗体的溶蛋白性裂解,或用定向诱变在包含抗体基因的表达载体中的所需区域插入终止密码子,以产生 Fab 片段或 (Fab')₂ 片段。单链抗体的制备,包括将 VL 和 VH 区与 DNA 连接子连接 (见 Huston 等人,Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 85:5879-5883 (1988) 和 Bird 等人, Science, 242:423-426 (1988))。

[0135] 本发明的抗体对于通式 II-C 的活性环磷酰胺代谢产物的稳定形式是选择性的,不会与环磷酰胺或其他环磷酰胺类似物有任何实质的交叉反应性。没有实质的交叉反应性,是指相对于通式 II-C 的活性环磷酰胺代谢产物的稳定形式,本发明的抗体与环磷酰胺或其他环磷酰胺类似物的交叉反应性不大于 10%,优选小于 5%。

[0136] 免疫测定

[0137] 根据本发明,可以利用通式 III 的化合物和载体的共轭物,和免疫原产生的抗体作为试剂来确定在患者样本中环磷酰胺的活性代谢产物的存在,其中该免疫原是由免疫原蛋白和通式 III 的化合物共轭形成的。在所形成的试剂中,在用于形成抗体的免疫原中存在的 R 基应当与在免疫测定中用作试剂的通式 III 的化合物和载体的共轭物中的 R 基是相同的。

[0138] 当首先进行免疫测定时,用某一方法来处理样本,该方法可以以通式 II-C 的化合物的形式保护在样本中存在的通式 II-B 的游离醛代谢产物中的游离醛。可以利用处理在通式 II-B 的环磷酰胺代谢产物中存在的游离醛的任意方法来完成该处理过程。优选的方法是现有技术的常规方法,例如如前所述。在该方法中,保护可能在样本中存在的活性代谢产物的游离醛,以使该代谢产物稳定。通过将通式 II-B 的游离代谢产物转换成通式 II-C 的受保护的代谢产物,通式 II-A 的互变异构体通过这两种互变异构体平衡存在的方法转换成了它另外的互变异构体,这样通过该处理,通式 II-A 的互变异构体经通式 II-B 的互变

异构体转换成了通式 II-C 的受保护的醛。

[0139] 当用上述方法处理了该样本后,将该处理过的样本用于免疫测定,以确定在样本中可能存在的环磷酰胺的活性代谢产物的存在和 / 或对其定量。在任意的常规免疫测定中,只要其中通式 III 的化合物和载体形成的试剂共轭物与样本中的通式 II-A 的稳定的活性环磷酰胺代谢产物竞争,以结合到根据本发明产生的抗体的结合位点上,都可以用来确定患者样本中环磷酰胺即通式 II-A 和 / 或 II-B 的存在和 / 或对其定量。构建该测定的方法,其中该测定用于在怀疑包含活性代谢产物的样本中测定活性环磷酰胺代谢产物,包括在含水培养基中合并:a) 样本,其已经过处理以保护在活性环磷酰胺代谢产物中存在的游离醛基;b) 根据本发明产生的通式 II-C 的化合物的抗体;和 c) 试剂,其是载体和通式 II 的化合物的共轭物。当进行该免疫测定时,重要的是在用于形成试剂和抗体的通式 III 的化合物中的醛保护基,与用于保护在样本中可能存在的游离醛活性环磷酰胺代谢产物的醛保护基是相同的。

[0140] 环磷酰胺的活性代谢产物的量可以通过在已处理的样本中使用通式 II-C 的化合物来确定,方法是测定抑制与已知量的共轭试剂结合的特异性抗体的量,加入样本和抗体的混合物。抑制未知样本的已知量的共轭试剂的结的结果与在相同测定中获得的结果相比较,其中该相同测定利用了包含已知量通式 II-C 的化合物形式的活性环磷酰胺代谢产物的已知标准溶液。当在未知样本中确定活性环磷酰胺代谢产物的量时,该样本经处理将通式 II-A 和 II-B 的化合物转换成了通式 II-C 的化合物,试剂是通式 III 的化合物形成的共轭物,其中样本、试剂和抗体可以任意顺序加入。

[0141] 可以利用各种方法来测定结合到抗体上的所加入的由通式 III 的化合物形成的试剂共轭物的量。一种方法是,加入的试剂共轭物与抗体的结合导致了荧光团共轭物的转速降低。在液体混合物中荧光团共轭物的转速降低的量可以通过例如美国专利 U. S. 4, 269, 511 和 U. S. 4, 420, 568 公开的荧光极化技术来检测。

[0142] 另一方面,抗体可以涂敷或吸收到纳米颗粒上以使得当这些颗粒与加入的由通式 III 的化合物形成的试剂共轭物反应时,这些纳米颗粒就形成了聚集物。但是当涂敷或吸附抗体的纳米颗粒与样本中的通式 II-C 的化合物反应时,与这些纳米颗粒结合的样本中的通式 II-C 不会导致抗体纳米颗粒的聚集。聚集或凝集的量可以根据吸光度在试验混合物中测定。

[0143] 另一方面,这些测定可以通过将抗体或试剂共轭物附着到固体载体例如微量滴定板上,或任意其他的常规固体载体包括固体颗粒上而进行。将抗体和蛋白质附着到固体颗粒上是本领域公知的技术。可以使用任意常规的方法来完成该附着。在许多情况中,为了有助于测定,标记例如放射性标记或酶标记必须置于抗体、共轭物或固体颗粒上,以测定结合或未结合到抗体上的通式 III 的化合物形成的试剂共轭物的量。其他适当的标记包括生色团、荧光团等等。

[0144] 为了方便,本发明的测定组件可以以试剂盒提供,其是包含预定量试剂的包装组合,该试剂用于测定通式 II-C 的化合物。这些试剂包括本发明的抗体,以及通式 III 的化合物形成的共轭物试剂。该试剂盒也可以包含其他的试剂、与游离醛基反应在通式 III 的配体中生成相同醛保护基 R 的反应物,其中通式 III 的化合物形成共轭物试剂和形成用于产生抗体试剂的免疫原。

[0145] 除了这些必需的试剂外,可以包括添加剂例如辅助试剂,例如稳定剂、缓冲剂等。各种试剂的相对量可以广泛地不同,从而提供可以基本上最优化测定灵敏度的试剂溶液的各种浓度。试剂可以在溶液中提供,或作为干粉末,通常是冻干的,包括赋形剂,当赋形剂溶解时将会为试剂溶液提供适当的浓度以进行测定。

[0146] 实施例

[0147] 在实施例中,下列的缩写是用于表示下列含义:

[0148]	HCY	4- 羟基环磷酰胺
[0149]	HCY 肼	醛磷酰胺的 0- 甲基肼
[0150]	DMF	二甲基酰胺
[0151]	EA	乙醇
[0152]	DCM	二氯甲烷
[0153]	DMAP	二甲基氨基吡啶
[0154]	DMSO	二甲基亚砷
[0155]	POCl ₃	磷酰氯
[0156]	NHS	N- 羟基琥珀酰亚胺
[0157]	EDC	盐酸 1-(3- 二甲基氨基丙基)-3- 乙基碳二亚胺
[0158]	DCC	二环己基碳二亚胺
[0159]	TLC	薄层色谱法
[0160]	ANS	8- 苯胺基 -1- 萘磺酸
[0161]	i. p.	腹膜内
[0162]	HRP	马辣根过氧化物酶
[0163]	TMB	3,3', 5,5' - 四甲基联苯胺
[0164]	TRIS	盐酸三羟甲氨基甲烷
[0165]	BSA	牛血清白蛋白
[0166]	KLH	匙孔血蓝蛋白
[0167]	BTG	牛甲状腺球蛋白
[0168]	PBS	磷酸盐缓冲盐水
[0169]	di	去离子水

[0170] 在实施例中,临时专利的方案 1 和方案 2 列出了所制备具体化合物,并按照实施例的序号引用。这些方案如下:

[0171] 方案 1

[0172]

[0176] HCY 胍活性酯 6 的制备 (方案 1)

[0177] 室温下,取 N-丁基锂 (8.8mL, 22.0mmol) 滴加到在 THF (100mL) 中的 3-丁基-1-醇 (1.44g, 20.0mmol) 中,将溶液搅拌 30 分钟,然后冷却至 0℃。快速加入亚磷酰胺氯 [1] (5.44g, 21.0mmol) 的 THF (50mL) 溶液,继续搅拌 1 小时。在 30 分钟内滴加 N-(2-氨基乙基)-2,2,2-三氟乙酰胺的 THF (80mL) 溶液。加热反应混合物至室温,继续搅拌过夜。通过 Celite 过滤除去沉淀的盐,浓缩滤液。用快速色谱法 (乙酸乙酯/己烷;50,60,和 65%) 纯化粗产品,得到呈无色油状的 [3] (3.35g, 40%)。

[0178] 将 [3] (3.35g, 8.08mmol) 的 CH_2Cl_2 (50mL) 溶液冷却至 -78℃ (干冰/丙酮浴),从溶液中冒出臭氧气泡,直至明显呈蓝色 (约 25 分钟)。用氮气从溶液中洗去过量的臭氧,通过加入二甲基硫 (713 μL , 9.70mmol) 还原臭氧化物。加热溶液至 -30℃,加入三乙胺 (1.64mL, 20.2mmol),然后加入盐酸甲氧基胺 (1.48g, 17.78mmol)。加热反应混合物至室温,继续搅拌 3 小时。过滤混合物,用快速色谱法 (乙酸乙酯/己烷,3:2) 纯化浓缩的滤液和所得到的油,得到呈粘稠无色的油状的 [5] 的 TFA 保护的前体 (1.86g, 52%)。在 NH_3 中,该产品 (603mg, 1.36mmol) 的 MeOH (30mL, ~10M) 和含水 NH_3 (30mL, 30%) 溶液搅拌过夜。浓缩该混合物。所得到胺 [5] 与甲苯共沸,以除去微量的水。获得黄色油状的粗制的 [5],不经纯化用于下一步骤。

[0179] 在 0℃下,将在 THF (10mL) 中的上面粗制的 [5] 和三乙胺 (0.378mL, 2.72mmol) 滴加到 [7] (0.494g, 1.77mmol) 的 THF (20mL) 溶液中。加热反应至室温,搅拌 2 小时。过滤混合物,用干醚洗涤,浓缩滤液。用乙酸乙酯通过硅胶的小塞过滤来进一步纯化粗产品,得到无色胶状的 [6] (0.528g, 69%)。

[0180] 实施例 2

[0181] HCY 胍异硫氰酸盐 8 的制备 (方案 2)

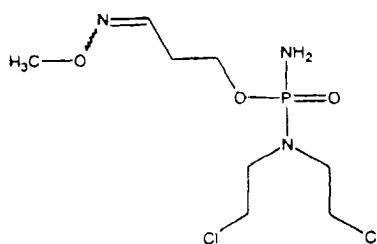
[0182] 在 0℃下,将在 THF (10mL) 中的粗制的 [5] (由 603mg (1.36mmol) 的 TFA 保护的前体制备) 和三乙胺 (0.378mL, 2.72mmol) 滴加到 4-异硫氰酸苯甲酰氯 (0.404g, 2.04mmol) 的 THF (20mL) 溶液中。加热反应至室温,搅拌 2 小时。过滤混合物,用干醚洗涤,浓缩滤液。用快速色谱法 (乙酸乙酯/己烷 9:1) 纯化粗产品,得到黄色胶状的 [8] (0.528g, 76%)。

[0183] 实施例 3

[0184] HCY 胍的制备

[0185] 根据文献方法 (Borch, R. F.; Valente, R. R. J. Med. Chem. 1991, 34(10), 3052-3058) 制备 HCY 胍。以 44% 的收率分离产品。

[0186]



[0187] 实施例 4a

[0188] 用活化的半抗原 6 制备 BTG 免疫原

[0189] 向 6.06mL BTG (32.9mg/mL) 的 50mM 磷酸盐缓冲液 (50mM, pH7.5) 中,滴加入 1.0mL

的实施例 1 制备的化合物 [6] (33mg/mL 在 DMSO 中), 再检验 pH 为 7.5。混合物在室温下搅拌 18 小时。然后通过透析 (10% DMSO- 磷酸缓冲液用作第一次透析, 纯净的缓冲液用于随后的变化) 纯化免疫原共轭物, 根据先前所述的方法 (Wu 等人., Bioconj. Chem., 8 : pp385-390, 1997, Li 等人, Bioconj. Chem., 8 : pp896-905, 1997, Salamone 等人, J. Forensic Sci. pp821-826, 1998) 表征其特征。

[0190] 实施例 4b

[0191] 用活化的半抗原 6 制备 KLH 免疫原

[0192] 向 6.5mL KLH(9mg/mL) 的 50mM 磷酸盐缓冲液 (50mM, pH7.5) 中, 滴加入 0.29mL 的实施例 1 制备的化合物 [6] (33mg/mL 在 DMSO 中), 再检验 pH 为 7.5。混合物在室温下搅拌 18 小时。然后通过透析 (10% DMSO- 磷酸缓冲液用作第一次透析, 纯净的缓冲液用于随后的变化) 纯化免疫原共轭物, 根据先前所述的方法 (Wu 等人., Bioconj. Chem., 8 : pp385-390, 1997, Li 等人, Bioconj. Chem., 8 : pp896-905, 1997, Salamone 等人, J. Forensic Sci. pp821-826, 1998) 表征其特征。

[0193] 实施例 5

[0194] 用活化的半抗原 8 制备 BSA 共轭物 (1 : 1 的比例)

[0195] 向 20mL BSA(50mg/mL) 的 50mM 磷酸盐缓冲液 (50mM, pH7.5) 中, 滴加入如实施例 2 制备的活化异硫氰酸盐 [8] (0.258mL 33mg/mL 的 DMSO 溶液)。混合物在室温下搅拌过夜 (18 小时) 以产生用于筛选目的的 1 : 1 的板共轭物。然后通过透析 (10% DMSO- 磷酸缓冲液用作第一次透析, 纯净的缓冲液用于随后的变化) 纯化该共轭物, 根据先前所述的方法 (Wu 等人., Bioconj. Chem., 8 : pp385-390, 1997, Li 等人, Bioconj. Chem., 8 : pp896-905, 1997, Salamone 等人, J. Forensic Sci. pp821-826, 1998) 表征其特征。

[0196] 实施例 6

[0197] HCY 肝抗体的制备

[0198] 用弗氏完全佐剂乳化的实施例 4a 和 4b 制备的 HCY 肝 -BTG 或 HCY 肝 -KLH 免疫原以 100 μ g/ 小鼠 i. p. 给 10 只雌性 BALB/c 小鼠免疫。在初始注射后 4 周, 给小鼠用弗氏完全佐剂乳化的相同免疫原以 100 μ g/ 小鼠追加注射一次。在追加后 10 天, 通过眶出血获得每只小鼠的试验出血。这些试验出血的抗血清包含实施例 8a 和 9 评价的 HCY 肝抗体。对于融合前 4 天开始的单克隆抗体, 用在 PBS 中的 100 μ g HCY 肝 -BTG 或 HCY 肝 -KLH (根据主要注射) 连续三天给小鼠 i. p. 注射。从所选的小鼠中分离脾细胞, 根据 Coligan, J. E. 等人, eds., Current Protocols in Immunology, 2.5.1-2.5.8, (1992), Wiley & Sons, NY 的方法与含 50% 聚乙二醇 1500 的 2×10^7 SP₂/0 细胞融合。融合后的细胞涂敷到 10 个 96 孔板上, 其中 96 孔板用 20% Fetal Clone I, 2% L- 谷氨酸 (100mM) 和 2% 50X HAT 补充。2 周后, 通过 ELISA (实施例 8b) 测定杂交瘤上清液中抗 -HCY 肝抗体的存在。展开阳性孔, 通过相同方法再筛选。通过竞争性 ELISA (实施例 8a 和 9) 验证阳性克隆体与 HCY 肝的结合。根据 Coligan, J. E. 等人, eds., Current Protocols in Immunology, 2.5.8-2.5.17, (1992), Wiley & Sons, NY 所述的方法通过有限稀释将 ELISA 阳性的克隆体亚克隆一次或两次。

[0199] 实施例 7

[0200] 用 HCY 肝衍生物 6-BSA 共轭物进行微量滴定板致敏法

[0201] 在针对蛋白质结合进行优化和每个板包含 96 孔的聚苯乙烯微量滴定板 (Nunc

MaxiSorp C8 或 F8 免疫模块) 中进行测定 HCY 肝浓度的 ELISA 法。用 HCY 肝-BSA 共轭物(如实施例 5 制备)涂敷每个孔,包括加入 300 μ L 1.25 μ g/mL(表 1)或 5 μ g/mL(表 2) HCY 肝-BSA 共轭物的 0.05M 碳酸氢钠液 pH = 9.6,在室温下培养 3 小时。用 0.05M 碳酸氢钠液 pH = 9.6 洗涤孔,然后在室温下用 400 μ L 5%蔗糖、0.2%酪蛋白酸钠溶液阻断 30 分钟。在除去涂层后的溶液后,板在 37°C 干燥过夜。

[0202] 实施例 8a

[0203] 抗体筛选法-滴定

[0204] 筛选 HCY 肝抗体(在实施例 6 中制备)的 ELISA 法是用微量滴定板进行的,该微量滴定板是用实施例 5 所述的 HCY 肝-BSA 致敏的。该抗体筛选测定通过如下方法进行:在包含 0.1% BSA 和 0.01% 硫柳汞的磷酸盐缓冲盐水中将包含 HCY 肝抗体的抗血清稀释成 1:100, 1:1,000, 1:10,000 和 1:100,000。为了评价单克隆抗体,将通过实施例 8b 的方法发现的对于存在的抗体呈阳性的实施例 6 的杂交瘤上清液,稀释成 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 等等。向 HCY 肝-BSA 致敏孔(在实施例 7 中制备)的每个孔中,加入 100 μ L 的稀释抗体,振荡下在室温下培养 10 分钟。在培养期间,抗体结合到了在孔中的 HCY 肝-共轭物上。用 0.02M TRIS, 0.9% NaCl, 0.5% 吐温-80 和 0.001% 硫柳汞, pH7.8 将该板的孔洗涤 3 次以除去任何未结合的抗体。为了检测在孔中结合到 HCY 肝-BSA 共轭物上的 HCY 肝抗体的量,在包含 0.1% BSA、0.05% ANS、0.01% 硫柳汞的 PBS 中将 100 μ L 山羊抗-小鼠抗体-HRP 酶共轭物(Jackson Immunoresearch)稀释成 1/2400,该共轭物能与鼠免疫球蛋白特异性结合,当与底物培养时会产生有色的产物,向每个孔中加入该共轭物。室温下振荡培养 10 分钟后,在此期间山羊抗-小鼠抗体-HRP 酶共轭物结合到孔中的 HCY 肝抗体上,将板再洗涤 3 次以除去未结合的山羊抗-小鼠抗体-HRP 酶共轭物。为了在孔中产生可测定的颜色,在洗涤后,加入 100 μ L TMB(TMB 液体底物, Sigma),以在室温下震荡培养的 10 分钟期间产生颜色,其中 TMB 是 HRP 的底物。在培养产生颜色后,向每个孔中加入 50 μ L 停止溶液(在去离子水中的 1.5% 氟化钠)以停止颜色的产生,振荡 10 秒后在 650nm 处(Molecular Devices Plate Reader)确定吸光度。在一个孔中抗体的量与所测定的吸光度是成比例的,可以用导致 1.5 的吸光度的稀释(滴定度)来表示。确定滴定度,包括用图表记录所测定抗体的抗体稀释(x-轴) vs. 650nm 的吸光度(y-轴)并推断吸光度 1.5 时的滴定度。滴定度确定了用于实施例 9 所述的不直接竞争性微量板测定的抗体的浓度(稀释)。

[0205] 实施例 8b

[0206] 抗体筛选法-单克隆筛选

[0207] 筛选 HCY 肝单克隆抗体(在实施例 6 中制备)的 ELISA 法是用微量滴定板进行的,该微量滴定板是用实施例 5 所述的 HCY 肝-BSA 致敏的。向 HCY 肝-BSA 致敏孔(在实施例 7 中制备)的每个孔中,加入包含 0.1% BSA 和 0.01% 硫柳汞的 50 μ L 磷酸盐缓冲盐水,然后加入 50 μ L 单克隆培养上清液,振荡下在室温下培养 10 分钟。在培养期间,抗体结合到了在孔中的 HCY 肝-共轭物上。用 0.02M TRIS, 0.9% NaCl, 0.5% 吐温-80 和 0.001% 硫柳汞, pH7.8 将该板的孔洗涤 3 次以除去未结合的抗体。为了检测在孔中结合到 HCY 肝-BSA 共轭物上的 HCY 肝抗体的量,在包含 0.1% BSA、0.05% ANS、0.01% 硫柳汞的 PBS 中将 100 μ L 山羊抗-小鼠抗体-HRP 酶共轭物(Jackson Immunoresearch)稀释成 1/2400,该共轭物能与鼠免疫球蛋白特异性结合,当与底物培养时会产生有色的产物,向每个孔中加入该共轭物。室

温下振荡培养 10 分钟后,在此期间山羊抗-小鼠抗体-HRP 酶共轭物结合到孔中的 HCY 脲抗体上,将板再洗涤 3 次以除去未结合的山羊抗-小鼠抗体-HRP 酶共轭物。为了在孔中产生可测定的颜色,在洗涤后,加入 100 μ L TMB(TMB 液体底物, Sigma),以在室温下震荡培养的 10 分钟期间产生颜色,其中 TMB 是 HRP 的底物。在产生颜色的培养后,向每个孔中加入 50 μ L 停止溶液(在去离子水中的 1.5%氟化钠)以停止颜色的产生,振荡 10 秒后在 650nm 处(Molecular Devices PlateReader)确定吸光度。在一个孔中抗体的量与所测定的吸光度是成比例的。指定吸光度大于 2 倍背景的背景样本为阳性。

[0208] 实施例 9

[0209] 确定 IC_{50} 和抗体与 HCY 脲衍生物 6 共轭物的

[0210] 交叉反应的间接竞争性微量滴定板免疫测定法

[0211] 测定 HCY 脲浓度的 ELISA 法是用微量滴定板进行的,该微量滴定板是用实施例 5 所述的 HCY 脲-BSA 致敏的。HCY 脲、环磷酰胺、苯丁酸氮芥、美法仑和氮芥在 PBS 中稀释 10 倍,浓度范围为 0.01 到 10,000ng/mL 或 100,000ng/mL。该测定通过如下方法进行:用 50 μ L 稀释至实施例 8a 中确定的滴定度的抗体(在实施例 6 中用实施例 4a 和 4b 的免疫原性)培养待测的 50 μ L 分析物。在 10 分钟的培养(R.T.,并振荡)期间,抗体竞争地与孔中的 HCY 脲共轭物和溶液中的分析物结合。培养后,用 0.02M TRIS,0.9% NaCl,0.5%吐温-80 和 0.001%硫柳汞,pH7.8 将该板的孔洗涤 3 次以除去未结合的所有物质。为了检测在孔中结合到 HCY 脲-BSA 共轭物上的 HCY 脲抗体的量,在包含 0.1% BSA、0.05% ANS、0.01%硫柳汞的 PBS 中将 100 μ L 山羊抗-小鼠抗体-HRP 酶共轭物(Jackson Immunoresearch)稀释成 1/2400,该共轭物能与鼠免疫球蛋白特异性结合,当与底物培养时会产生有色的产物,向每个孔中加入该共轭物。室温下振荡培养 10 分钟培养后,在此期间山羊抗-小鼠抗体-HRP 酶共轭物结合到孔中的 HCY 脲抗体上,将板再洗涤 3 次以除去未结合的次要共轭物。为了在孔中产生可测定的颜色,在洗涤后,加入 100 μ L TMB(TMB 液体底物, Sigma),以在室温下震荡培养的 10 分钟期间产生颜色,其中 TMB 是 HRP 的底物。在产生颜色的培养后,向每个孔中加入 50 μ L 停止溶液(在去离子水中的 1.5%氟化钠)以停止颜色的产生,振荡 10 秒后在 650nm 处(Molecular Devices Plate Reader)确定吸光度。在一个孔中抗体的量与所测定的吸光度是成比例的,而与样本中 HCY 脲的量成反比例。包含分析物的孔中颜色的吸光度与没有分析物的吸光度相比较,产生标准曲线。给定分析物的 IC_{50} 定义为抑制 50%不包含分析物的孔的吸光度所需的分析物的浓度。给定分析物的交叉反应性用 HCY 脲的 IC_{50} 与环磷酰胺、苯丁酸氮芥、美法仑和氮芥的 IC_{50} 的比例来评价,该比例用百分数来表达。当用实施例 6 中制备的抗体和实施例 4a 和 b 的免疫原测定时,环磷酰胺、苯丁酸氮芥、美法仑和氮芥相对于 HCY 脲的交叉反应百分数小于 1%。结果在下表 1 和 2 中。

[0212] 表 1:使用 HCY 脲-BTG(实施例 4a)的抗体和板涂敷 HCY 脲-BSA 共轭物(实施例 5)的竞争性免疫测定的交叉反应性

[0213]

分析物	IC ₅₀	%交叉反应性
HCY 脲	30ng/ml	100%
环磷酰胺 (前药)	>10,000ng/ml	<0.3%
苯丁酸氮芥	>10,000ng/ml	<0.3%
美法仑	>10,000ng/ml	<0.3%
氮芥	>10,000ng/ml	<0.3%

[0214] 表 2: 使用 HCY 脲-KLH (实施例 4b) 的单克隆抗体和板涂敷 HCY 脲-BSA 共轭物 (实施例 5) 的竞争性免疫测定的交叉反应性

[0215]

分析物	IC ₅₀	%交叉反应性
HCY 脲	100ng/ml	100%
环磷酰胺 (前药)	>100,000ng/ml	<0.1%
苯丁酸氮芥	>100,000ng/ml	<0.1%
美法仑	>100,000ng/ml	<0.1%
氮芥	>100,000ng/ml	<0.1%

[0216] 化合物苯丁酸氮芥、美法仑和氮芥, 与环磷酰胺类似, 都是化学治疗药物, 在它们的结构中包含芥基团, 即包含用氯乙基取代基二取代的胺的基团。从该表中可以看出, 本发明的抗体基本上选择性地与环磷酰胺的活性代谢产物的稳定形式反应, 基本上不与包含用氯乙基取代基二取代的胺的环磷酰胺和其他环磷酰胺类似物交叉反应。

专利名称(译)	环磷酰胺抗体和免疫测定		
公开(公告)号	CN101052877B	公开(公告)日	2012-08-15
申请号	CN200580025508.6	申请日	2005-07-19
[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 C07K1/13 C07K16/00 C07F9/02 C07K1/06		
CPC分类号	G01N33/94 C07K16/18		
代理人(译)	刘玥		
审查员(译)	施捷		
优先权	60/592016 2004-07-29 US 11/072910 2005-03-04 US		
其他公开文献	CN101052877A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

新的环磷酰胺的受保护醛基活性代谢产物的共轭物，包括试剂和其免疫原，和这些免疫原产生的单克隆抗体，所述试剂和免疫原在监测患者的环磷酰胺的活性代谢产物的免疫测定中是有用的，其中患者用环磷酰胺治疗。

