



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101945894 A

(43) 申请公布日 2011. 01. 12

(21) 申请号 200880126751. 0

申请人 第一三共株式会社

(22) 申请日 2008. 12. 15

(72) 发明人 宫崎修 田久保耕平 深町勇

(30) 优先权数据

日下绘里子 柏木美惠子

2007-321529 2007. 12. 13 JP

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

(85) PCT申请进入国家阶段日

代理人 吴小明

2010. 08. 13

(86) PCT申请的申请数据

(51) Int. Cl.

PCT/JP2008/072783 2008. 12. 15

C07K 16/44 (2006. 01)

(87) PCT申请的公布数据

C07K 14/76 (2006. 01)

W02009/075376 JA 2009. 06. 18

C07K 14/79 (2006. 01)

(83) 生物保藏信息

C12N 5/10 (2006. 01)

FERM BP-11010 2008. 09. 05

C12N 15/02 (2006. 01)

FERM BP-11011 2008. 09. 05

G01N 33/50 (2006. 01)

FERM BP-11013 2008. 09. 05

G01N 33/53 (2006. 01)

FERM BP-11014 2008. 09. 05

G01N 33/577 (2006. 01)

FERM BP-11015 2008. 09. 05

C12P 21/08 (2006. 01)

FERM BP-11016 2008. 09. 05

FERM BP-11012 2008. 09. 05

(71) 申请人 积水医疗株式会社

地址 日本国东京都

权利要求书 2 页 说明书 29 页 附图 17 页

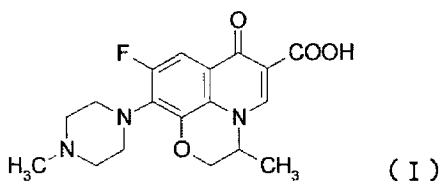
(54) 发明名称

抗氧氟沙星单克隆抗体和使用其的氧氟沙星
免疫测定

(57) 摘要

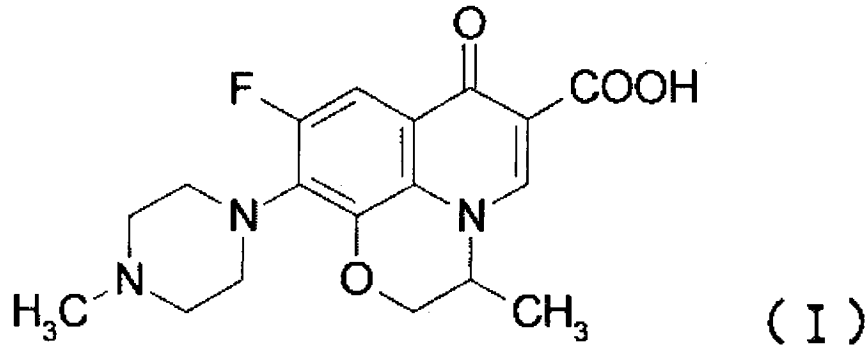
本发明公开了精确且方便地在人样品中检测
式(I)所示的化合物的方法。使用通过式(I)所示
的化合物经由6位羧基结合牛血清白蛋白而产生
的抗原,制备与式(I)所示的化合物反应、但不与
式(I)所示的化合物的N-氧化物代谢物和去甲基
左氧氟沙星代谢物交叉反应的任何抗体。使用上
述抗体实施测量未被代谢的式(I)所示的化合物

的免疫测定。



1. 与下列式 (I) 所示化合物反应、但不与其 N-氧化物代谢物和 / 或去甲基代谢物交叉反应的抗体,

[化学 1]



2. 根据权利要求 1 所述的抗体,其中所述抗体与式 (I) 所示化合物的 S- 异构体强烈反应。

3. 根据权利要求 1 所述的抗体,其中所述抗体与式 (I) 所示化合物的 R- 异构体强烈反应。

4. 根据权利要求 1 所述的抗体,其中所述抗体与式 (I) 所示化合物的外消旋体强烈反应。

5. 根据权利要求 1 所述的抗体,其中所述抗体不与选自由以下组成的组的一种或多种化合物交叉反应:双氯芬酸钠,萘丁美酮,氟比洛芬,酮洛芬,洛索洛芬钠,奥沙普秦,萘普生,布洛芬,羧甲司坦,水杨酰胺,对乙酰氨基酚,无水咖啡因,亚甲基双水杨酸,异丙嗪,和茶碱。

6. 根据权利要求 1 所述的抗体,其中所述抗体不与除式 (I) 所示的化合物之外的新喹诺酮抗生素交叉反应,或与之微弱反应。

7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的抗体,其中所述抗体与式 (I) 所示的化合物的反应性不因为存在来源于生物样品的成分而改变。

8. 根据权利要求 1-7 中任一项所述的抗体,其中所述来源于生物样品的成分是血清成分、血浆成分、或唾液成分。

9. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的抗体,其中所述抗体与式 (I) 所示的化合物的反应性不因为式 (I) 所示的化合物与血清成分的结合而改变。

10. 根据权利要求 1-9 中任一项所述的抗体,其中所述抗体是单克隆抗体。

11. 根据权利要求 10 所述的抗体,其中所述单克隆抗体对式 (I) 所示的化合物特异,并且满足这样的反应条件,即,在样品中存在式 (I) 所示的化合物和在样品中存在式 (I) 所示的化合物的 N-氧化物代谢物和 / 或去甲基代谢物的反应体系中,抑制固定在固相上的式 (I) 所示的化合物和所述抗体之间的免疫反应,样品中式 (I) 所示化合物的 50% 抑制浓度高于样品中式 (I) 所示化合物的 N-氧化物代谢物和 / 或去甲基代谢物的 50% 抑制浓度。

12. 产生根据权利要求 10 或 11 所述的单克隆抗体的杂交瘤。

13. 用于产生根据权利要求 1 所述的抗体的抗原,其中所述抗原通过式 (I) 所示的化合物经由 6 位羧基结合载体蛋白而产生。

14. 根据权利要求 13 所述的抗原,其中所述载体蛋白是 BSA 或运铁蛋白。
15. 根据权利要求 13 或权利要求 14 所述的抗原,其中 12 至 14 个分子的式 (I) 所示的化合物结合一个分子的载体蛋白。
16. 免疫方法,其包括用根据权利要求 13-15 中任一项所述的抗原免疫动物。
17. 抗体筛选方法,其包括:在期望对其测定交叉反应性的化合物的存在下,使抗体与固定在固相上的式 (I) 所示的化合物反应,其中所述抗体是通过用根据权利要求 13-15 中任一项所述的抗原免疫动物获得,并且;比较所得到的反应性和在不存在所述期望对其测定交叉反应性的化合物的情况下的反应性,以选择所需的抗体。
18. 抗体筛选方法,其包括:在存在来源于生物样品的成分的条件下,将使用根据权利要求 13-15 中任一项所述的抗原免疫动物而获得的抗体与固定在固相上的式 (I) 所示的化合物反应,并且;比较所得到的反应性和在不存在所述来源于生物样品的成分的情况下的反应性,以选择所需的抗体。
19. 检测样品中式 (I) 所示的化合物的免疫测定法,其包括使用根据权利要求 1-11 中任一项所述的抗体。
20. 检测样品中式 (I) 所示的化合物的免疫测定法,其包括使合成的多价抗原和样品中式 (I) 所示的化合物与固定在固相上的根据权利要求 1-11 中任一项所述的抗体竞争性反应。
21. 检测样品中式 (I) 所示的化合物的免疫测定法,其包括使固定的合成多价抗原和样品中式 (I) 所示的化合物与根据权利要求 1-11 中任一项所述的抗体竞争性反应。
22. 检测样品中式 (I) 所示的化合物的免疫测定法,其包括使固定的合成多价抗原和样品中式 (I) 所示的化合物与固定在固相上的根据权利要求 1-11 中任一项所述的抗体竞争性反应。
23. 根据权利要求 19-22 中任一项所述的免疫测定法,其中所述固相是胶乳颗粒。
24. 根据权利要求 19-23 中任一项所述的免疫测定法,其中所述竞争性反应通过凝集反应抑制法测量。
25. 根据权利要求 19-24 中任一项所述的免疫测定法,其中所述样品是血液、血清、血浆、尿、唾液、痰、泪液、耳漏、或前列腺液。
26. 根据权利要求 25 所述的免疫测定法,其中所述样品是收集自己已经施用式 (I) 所示的化合物的患者的样品。
27. 用于检测样品中式 (I) 所示的化合物的免疫测定法的试剂,所述试剂包括:
 - (a) 根据权利要求 1-11 中任一项所述的抗体,或者固定在固相上的根据权利要求 1-11 中任一项所述的抗体;和
 - (b) 合成的多价抗原或固定的合成多价抗原。

抗氧氟沙星单克隆抗体和使用其的氧氟沙星免疫测定

技术领域

[0001] 本发明涉及与氧氟沙星 (ofloxacin) (即抗生素化合物) 和形成氧氟沙星的各种光学异构体反应、但不与其主要代谢物反应的抗体。

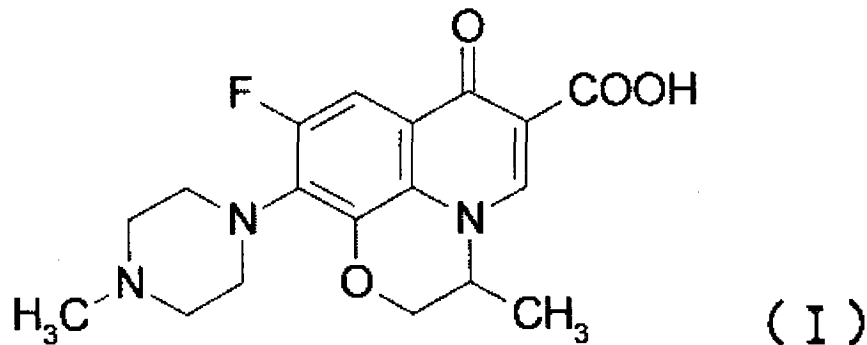
背景技术

[0002] 新喹诺酮 (quinolone) 抗生素是与吡啶酮羧酸 (pyridonecarboxylic acid) 抗生素 (例如, 依诺沙星 (enoxacin) 和诺氟沙星 (norfloxacin)) 相比表现出显著改善的抗生素谱和抗生素活性、并且通过抑制细菌 DNA 促旋酶而表现出高选择性毒性的药物。氧氟沙星、左氧氟沙星 (levofloxacin)、诺氟沙星、环丙沙星 (ciprofloxacin) 等已经在临床上用于治疗各种感染、化脓性疾病等, 并且获得了极佳的治疗效果。

[0003] 氧氟沙星由下述化学式 (I) 表示, 并且在化学结构中具有一个不对称的碳原子。氧氟沙星是包括组成比例为 1 : 1 的两种旋光物质 (即, S-(-)- 异构体和 R-(+)- 异构体) 的外消旋体。

[0004] [化学 1]

[0005]



[0006] 该外消旋体主要由于作为 S-(-)- 异构体的左氧氟沙星而表现出抗生素活性。左氧氟沙星的抗生素活性约为氧氟沙星抗生素活性的两倍。已知左氧氟沙星对于多种感染如呼吸道感染和尿道感染是高度有效的。

[0007] 在体内存在适量的活性成分以便抗生素有效表现出抗生素作用是很重要的。因此, 仅定量确定体内存在的表现出抗生素活性的化合物而不测量抗生素活性已经减弱或失去 (下文可以称为“失去抗生素活性的化合物”) 的化合物 (例如, 代谢物) 的测量系统对于最有效地开抗生素处方是不可缺少的。使用特异性识别目标抗生素的抗体的免疫测定, 通过 HPLC 基于分子量和目标抗生素极性分离和分析目标抗生素的方法, 通过与细菌培养直接测量抗生素活性的方法等已经广泛地用作仅测量表现出抗生素活性的化合物的方法。这些方法中, 免疫测定是有利的, 原因在于免疫测定不需要昂贵的设备, 允许短时测量, 具有极佳的灵敏性, 并且可以测量许多样品。

[0008] 已知许多药物在通过不同途径施用时可逆地结合生物成分如血清蛋白 (例如, 白蛋白)、糖蛋白、和脂蛋白 (下文可以笼统称为“血清蛋白”) 特别地, 药物在血液中的浓度

对应于与血清蛋白结合的结合药物浓度和与血清蛋白结合的游离（未结合）药物浓度的总和。为了通过使用抗体的免疫测定精确测量药物在血液中的浓度，需要所述抗体同等地与结合的药物和游离药物反应。然而，由于与药物结合的血清蛋白，抗体可能不结合药物的表位，因此，可能不能精确测量所述药物在血液中的浓度。

[0009] 已经公开了一种免疫测定法作为通过免疫测定法来检测新的喹诺酮抗生素的方法，所述免疫测定法使用识别双环新喹诺酮抗生素、但不识别三环新喹诺酮如氧氟沙星的单克隆抗体（专利文献 1）。然而，在专利文献 1 中公开的发明目的是检测用于预防家畜或养殖的鱼 / 贝类传染病的双环新喹诺酮的残余量，不能检测氧氟沙星。此外，在专利文献 1 中公开的发明目的是获得能够同时检测多种类型的新喹诺酮抗生素的抗体（即，与多种类型的新喹诺酮抗生素交叉反应的抗体）。

[0010] 专利文献 2 公开了作为式 (I) 所示化合物的 S- 异构体的左氧氟沙星的抗体，和免疫测定法。专利文献 2 中公开的抗体是一种多克隆抗体，其与已经失去抗生素活性的代谢物（左氧氟沙星-N-氧化物或去甲基左氧氟沙星）交叉反应。因此，不可能仅精确检测保留抗生素活性的左氧氟沙星。

[0011] 专利文献 1 :JP-A-2007-63180

[0012] 专利文献 2 :JP-A-7-267999

发明内容

[0013] 发明解决的问题

[0014] 新喹诺酮抗生素化合物（例如，氧氟沙星）表现出非常低的抗原性。因此，直接利用所述新喹诺酮抗生素化合物作为抗原（免疫用的抗原）进行免疫来产生抗体难以有效地产生识别新喹诺酮抗生素化合物的抗体。因此，为了产生识别新喹诺酮抗生素化合物的抗体，适当的是使用通过将作为载体的蛋白（载体蛋白）和所述新喹诺酮抗生素化合物结合而产生的抗原。认为需要将新喹诺酮抗生素化合物与蛋白结合而不损害影响抗原性的官能团（例如，喹诺酮骨架中 4 位处的酮（羰基）基团或 3 位处的羧基基团，或氟原子）。因此，专利文献 2 使通过将左氧氟沙星的 4- 甲基 - 哌嗪基基团（10 位处的取代基）转化为 4- 羧甲基哌嗪基基团获得的化合物与牛血清白蛋白（BSA）（即，载体）结合，并且将所得到的产物用作免疫用的抗原。

[0015] 然而，通过专利文献 2 中公开的方法获得的抗体与左氧氟沙星的代谢物（N-氧化物或去甲基代谢物）交叉反应。从未获得仅与左氧氟沙星反应的抗体。

[0016] 本发明的目的是提供识别式 (I) 所示的化合物、而不识别（交叉反应）其 N-氧化物和 / 或去甲基代谢物的抗体，和生产所述抗体的方法。本发明的另一个目的是提供使用上述抗体的免疫测定法（例如，放射性免疫测定法，酶免疫测定法，载体（颗粒）凝集抑制免疫测定法，和免疫色谱法）。本发明的另一个目的是提供有效用于产生上述抗体的免疫用抗原。

[0017] 解决问题的方式

[0018] 本发明的发明人通过将载体蛋白（例如，牛血清白蛋白）结合到左氧氟沙星 ((-)-(S)-9- 氟 -2,3- 二氢 -3- 甲基 -10-(4- 甲基 -1- 哌嗪基)-7- 氧代 -7H- 吡啶并 [1,2,3- 去] [1,4] 苯并噁嗪 -6- 羧酸) 的羧基（即，6 位处取代基）上而成功产生了可以实现

上述目的的极好的免疫用抗原。

[0019] 本发明人发现可以使用上述免疫用抗原来提供与式 (I) 所示的化合物反应、而不识别其 N-氧化物代谢物和去甲基代谢物的有用抗体。本发明人还发现可以使用上述免疫用抗原提供识别作为式 (I) 所示化合物的 S-异构体的左氧氟沙星、而不识别其代谢物 (即,左氧氟沙星-N-氧化物和去甲基左氧氟沙星) 的有用抗体。本发明人发现可以使用上述免疫用抗原提供识别式 (I) 所示化合物的 R-异构体、而不识别其 N-氧化物代谢物和去甲基代谢物的有用抗体。本发明人使用上述抗体完成了测量未被代谢 / 分解的式 (I) 所示化合物的免疫测定法。上述发现导致了本发明的完成。

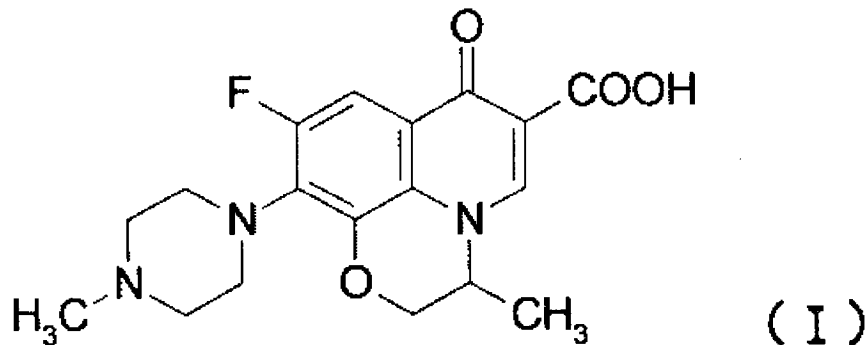
[0020] 因此,本发明提供与式 (I) 所示化合物反应、但不识别其 N-氧化物代谢物和去甲基代谢物的抗体。本发明的一个方面提供通过使载体蛋白结合到作为式 (I) 所示化合物的 S-异构体的左氧氟沙星上而获得的免疫用抗原。本发明的另一个方面提供通过使载体蛋白结合到左氧氟沙星的羧基 (即,6 位取代基) 上而获得的免疫用抗原。本发明的另一方面提供通过用上述抗原免疫动物而产生识别式 (I) 所示化合物的 S-异构体和 R-异构体、或仅识别作为式 (I) 所示化合物的 S-异构体的左氧氟沙星、或仅识别式 (I) 所示化合物的 R-异构体、但不识别其 N-氧化物代谢物和去甲基代谢物的抗体的方法,和通过上述方法产生的抗体。本发明的另一个方面提供通过使用上述所述抗体的免疫测定法测量式 (I) 所示化合物的浓度的方法。

[0021] 具体地,本发明提供以下各项:

[0022] (1) 与下式 (I) 所示化合物反应、但不与其 N-氧化物代谢物和 / 或去甲基代谢物交叉反应的抗体,

[0023] [化学 2]

[0024]



[0025] (2) 根据 (1) 所述的抗体,所述抗体与式 (I) 所示化合物的 S-异构体强烈反应。

[0026] (3) 根据 (1) 所述的抗体,所述抗体与式 (I) 所示化合物的 R-异构体强烈反应。

[0027] (4) 根据 (1) 所述的抗体,所述抗体与式 (I) 所示化合物的外消旋体强烈反应。

[0028] (5) 根据 (1) 所述的抗体,所述抗体不与选自由下列组成的组一种或多种化合物交叉反应:双氯芬酸钠 (diclofenac sodium), 萘丁美酮 (nabumetone), 氟比洛芬 (flurbiprofen), 酮洛芬 (ketoprofen), 洛索洛芬钠 (loxoprofen sodium), 奥沙普秦 (oxaprozin), 萘普生 (naproxen), 布洛芬 (ibuprofen), 羧甲司坦 (carbocisteine), 水杨酰胺 (salicylamide), 对乙酰氨基酚 (acetaminophen), 无水咖啡因, 亚甲基双水杨酸 (methylenedisalicylic acid), 异丙嗪 (promethazine), 和茶碱 (theophylline)。

[0029] (6) 根据 (1) 所述的抗体,所述抗体不与除式 (I) 所示的化合物之外的新喹诺酮抗

生素交叉反应,或与之微弱反应。

[0030] (7) 根据 (1)-(6) 中任一项所述的抗体,其中所述抗体与式 (I) 所示的化合物的反应性不因为存在来源于生物样品的成分而改变。

[0031] (8) 根据 (1)-(7) 中任一项所述的抗体,其中所述来源于生物样品的成分是血清成分、血浆成分、或唾液成分。

[0032] (9) 根据 (1)-(6) 中任一项所述的抗体,其中所述抗体与式 (I) 所示的化合物的反应性不因为式 (I) 所示的化合物与血清成分的结合而改变。

[0033] (10) 根据 (1)-(9) 中任一项所述的抗体,所述抗体是单克隆抗体。

[0034] (11) 根据 (10) 所述的单克隆抗体,所述单克隆抗体对式 (I) 所示的化合物特异,并且满足这样的反应条件,即,在样品中存在式 (I) 所示的化合物和在样品中存在式 (I) 所示的化合物的 N-氧化物代谢物和 / 或去甲基代谢物的反应体系中,抑制固定在固相上的式 (I) 所示的化合物和所述抗体之间的免疫反应,样品中式 (I) 所示化合物的 50% 抑制浓度高于样品中式 (I) 所示化合物的 N-氧化物代谢物和 / 或去甲基代谢物的 50% 抑制浓度。

[0035] (12) 产生根据 (10) 或 (11) 所述的单克隆抗体的杂交瘤。

[0036] (13) 用于产生根据 (1) 所述的抗体的抗原,所述抗原通过式 (I) 所示的化合物经由 6 位羧基结合载体蛋白而产生。

[0037] (14) 根据 (13) 所述的抗原,其中所述载体蛋白是 BSA 或运铁蛋白。

[0038] (15) 根据 (13) 或 (14) 所述的抗原,其中 12-14 个分子的式 (I) 所示的化合物结合一分子的载体蛋白。

[0039] (16) 免疫方法,其包括用根据 (13)-(15) 中任一项所述的抗原免疫动物。

[0040] (17) 选择所需抗体的抗体筛选方法,其包括:在存在期望对其测定交叉反应性的化合物的条件下,使抗体与式 (I) 所示的化合物反应,其中所述抗体通过用根据 (13)-(15) 中任一项所述的抗原免疫动物获得,其中将前一种化合物固定在固相上,并且,比较所得到的反应性和在不存在期望对其测定交叉反应性的后一种化合物的条件下的反应性。

[0041] (18) 选择所需抗体的抗体筛选方法,其包括:在存在来源于生物样品的成分的情况下,使用根据 (13)-(15) 中任一项所述的抗原免疫动物而获得的抗体与固定在固相上的式 (I) 所示的化合物反应,并且比较所得到的反应性和在不存在所述来源于生物样品的成分的情况下的反应性。

[0042] (19) 检测样品中式 (I) 所示的化合物的免疫测定法,其包括使用根据 (1)-(11) 中任一项所述的抗体。

[0043] (20) 检测样品中式 (I) 所示的化合物的免疫测定法,其包括使合成的多价抗原和样品中式 (I) 所示的化合物与固定在固相上的根据 (1)-(11) 中任一项所述的抗体竞争性反应。

[0044] (21) 检测样品中式 (I) 所示的化合物的免疫测定法,其包括使固定的合成多价抗原和样品中的式 (I) 所示的化合物与根据 (1)-(11) 中任一项所述的抗体竞争性反应。

[0045] (22) 检测样品中式 (I) 所示的化合物的免疫测定法,其包括使固定的合成多价抗原和样品中的式 (I) 所示的化合物与固定在固相上的根据 (1)-(11) 中任一项所述的抗体竞争性反应。

[0046] (23) 根据 (19)-(22) 中任一项所述的免疫测定法,其中所述固相是胶乳颗粒。

[0047] (24) 根据 (19)-(23) 中任一项所述的免疫测定法,其中所述竞争性反应通过凝集反应抑制法测量。

[0048] (25) 根据 (19)-(24) 中任一项所述的免疫测定法,其中所述样品是血液、血清、血浆、尿、唾液、痰、泪液、耳漏、或前列腺液。

[0049] (26) 根据 (25) 所述的免疫测定法,其中所述样品是收集自由已经施用式 (I) 所示的化合物的患者的样品。

[0050] (27) 用于检测样品中式 (I) 所示的化合物的免疫测定法的试剂,所述试剂包括:

[0051] (a) 根据 (1)-(11) 中任一项所述的抗体,或者固定在固相上的根据 (1)-(11) 中任一项所述的抗体;和

[0052] (b) 合成的多价抗原或固定的合成多价抗原。

[0053] 发明效果

[0054] 本发明所提供的抗体识别式 (I) 所示的化合物且是有用的。通过使用所述抗体的免疫测定法可以以高灵敏性测量式 (I) 所示的化合物在不同样品(例如,生物样品)中的浓度。

[0055] 实施发明的最佳方式

[0056] 本发明所述的抗体与式 (I) 所示的化合物反应,但不与其 N-氧化物-代谢物和/或去甲基-代谢物交叉反应。由于本发明所述的抗体与式 (I) 所示的化合物反应、而不与其代谢物反应,所以,通过使用本发明所述的抗体进行的免疫测定法,可以仅特异性测量有效存在于血液中作为抗生素的式 (I) 所示的化合物。

[0057] 本发明所述的抗体可以是与作为式 (I) 所示化合物的 S-异构体的左氧氟沙星强烈反应的抗体,与式 (I) 所示化合物的 R-异构体强烈反应的抗体,或与式 (I) 所示化合物的 R-异构体和 S-异构体反应的抗体。

[0058] 本发明所述的抗体可以是不与式 (I) 所示化合物的伴随药物或式 (I) 所示化合物的类似物反应或与其微弱反应的抗体。

[0059] 本发明所述的抗体可以由免疫动物的血清(抗血清)获得的多克隆抗体,或可以由使用免疫动物的产生抗体的细胞制备的杂交瘤产生的单克隆抗体。

[0060] 术语“交叉反应”、“强烈反应”、“不反应”和“微弱反应”的意思在下文中描述。

[0061] 用来产生本发明所述的识别式 (I) 所示化合物的 S-异构体和/或 R-异构体的抗体的抗原(免疫用抗原)可以是产生这样的抗体的任意抗原,所述抗体识别式 (I) 所示的化合物,但不识别其 N-氧化物代谢物和去甲基代谢物。适合使用通过将载体(例如,蛋白)结合到式 (I) 所示化合物的羧基(即,6-位处取代基)上而产生的抗原。

[0062] 用作用于免疫用抗原的载体的蛋白(“载体蛋白”)可以适当地选自通常认为有效用于产生针对低分子量抗原(半抗原)的抗体的多种蛋白。载体蛋白和抗原可以通过已知的方法结合。例如,可以使用牛血清白蛋白或运铁蛋白作为载体蛋白。载体蛋白和抗原可以通过使用二环己基碳二亚胺(dicyclohexylcarbodiimide)进行的缩合反应、或活性酯法结合。注意用作载体的蛋白类型和使载体蛋白与抗原结合的方法不限于此。

[0063] 与一分子载体蛋白结合的式 (I) 所示化合物的分子数(结合数目)没有特别限制,只要所得到的抗原在要被免疫的动物中作为抗原而被识别。例如,考虑抗体生产效率,理想地使用其中 12-14 个分子的式 (I) 所示化合物与一分子的载体蛋白结合的抗原。注意,

结合数目不限于此。制备免疫用抗原的方法的详情在下文中描述。通过相对于载体蛋白的量增加或减少用作反应原料的式 (I) 所示化合物的量, 可以结合需要的式 (I) 所示化合物的分子数目。具体地, 当增加作为原料添加的化合物的量时, 结合数目增加, 并且当减少作为原料添加的化合物的量时, 结合数目减少。注意术语“结合比例”或“结合含量”在本文中可以与术语“结合数目”相似的意思使用。

[0064] 通过上述方法产生的本发明所述的免疫用抗原也可以用于筛选杂交瘤或抗体的抗原、或用于下文所述的免疫测定法的抗原 (用于竞争反应的抗原)。当将本发明所述的免疫用抗原用于筛选的抗原或用于免疫测定法的抗原时, 可以将所述抗原固定在固体 (固相) 上, 如不溶性支持物上, 或可以用作用公知的标记进行标记的标记抗原 (下文描述)。这样的固定 (固相) 抗原和标记抗原也包括在本发明范围之内。例如, 可以通过使得所述抗原物理吸附在不溶支持物上或化学结合在不溶支持物上而生产固定 (固相) 抗原。抗原可以通过适当的间隔体化学结合在不溶支持物上。

[0065] 所述不溶支持物可以由聚合物材料 (例如, 聚苯乙烯树脂), 无机材料 (例如, 玻璃), 多糖物质 (例如, 纤维素或琼脂糖) 等形成。不溶支持物的形状没有特别限制。不溶支持物可以采用平板 (例如, 微量平板或膜)、珠或颗粒 (例如, 胶乳颗粒)、管 (例如, 检验管) 等形状。当固定作为用于筛选的抗原的抗原时, 固相的优选实例包括微量平板。当固定作为用于免疫测定法的抗原的抗原时, 固相的优选实例包括微量平板和胶乳颗粒。

[0066] 本发明所述的抗体可以通过将所述抗原溶解在溶剂如磷酸盐缓冲液 (PBS) 中并且将该溶液施用给动物实施免疫而容易地产生。任选地, 可以向该溶液中添加适当的佐剂, 并且动物可以用所得到的乳液进行免疫。可以使用油包水乳液、水包油包水 (water-in-oil-in-water) 乳液、水包油乳液、脂质体、氢氧化铝胶、来源于生物物质的蛋白或肽物质等作为佐剂。例如, 可以适当地使用弗氏不完全佐剂、弗氏完全佐剂等。佐剂的施用途径、剂量和给药时间没有特别限制, 但是需要适当选择, 以便可以增强用所述抗原免疫的动物中的需要的免疫反应。

[0067] 免疫的动物类型没有特别限制, 但是优选是哺乳动物。哺乳动物的实例包括小鼠、大鼠、牛、兔、山羊、绵羊等。这些之中, 优选使用小鼠。动物可以通过本领域可用的方法进行免疫。例如, 可以通过将抗原溶液 (优选与佐剂的混合物) 皮下、皮内、静脉内、或腹膜内注射至动物中来免疫动物。免疫反应通常取决于要被免疫的动物的类型和品系而不同。因此, 理想地依赖于所用的动物而适当设定免疫时间表。优选地在初始免疫后重复施用所述抗原数次。

[0068] 当获得本发明所述的多克隆抗体时, 所述抗体可以从免疫动物的血清 (抗血清) 获得。在该情形中, 可以使用本领域普通技术人员可以使用的任何方法。抗体可以通过适当组合 DEAE 阴离子交换层析、使用蛋白质 A 等的亲和层析、硫酸铵分级、PEG 分级、乙醇分级等进行纯化。可以通过公知的方法容易地确定所得到的抗体是否是本发明所述的抗体 (即, 所得到的抗体是否识别式 (I) 所示的化合物, 而与和左氧氟沙星同时使用的其它新喹诺酮抗生素或药物 (例如, 抗生素, 消炎止痛剂, 组合感冒药 (combination cold drug), 呼吸道粘膜调节/扶正药 (airway mucosa adjusting/normalizing agent), 和支气管扩张药) 微弱反应或基本上不识别其)。在下文所述的实施例中描述了与生产本发明所述的抗体的方法联合使用的动物免疫法、抗体纯化法、和抗体表征法。本领域普通技术人员参考上述概述

和实施例所述的具体方法将容易地生产本发明所述的抗体,同时需要在需要时适当地改进或改变这些方法。

[0069] 除式 (I) 所示化合物之外的新喹诺酮抗生素的实例包括式 (I) 所示化合物的类似物。除式 (I) 所示化合物之外的新喹诺酮抗生素的具体实例包括环丙沙星,托氟沙星 (tosufloxacin), 加替沙星 (gatifloxacin), 司帕沙星 (sparfloxacin), 氟罗沙星 (fleroxacin), 洛美沙星 (lomefloxacin), 依诺沙星 (enoxacin), 莫西沙星 (moxifloxacin), 帕珠沙星 (pazufloxacin) 等。

[0070] 与式 (I) 所示的化合物同时使用的药物的实例包括双氯芬酸钠, 萘丁美酮, 氟比洛芬, 酮洛芬, 洛索洛芬钠, 奥沙普秦, 萘普生, 布洛芬, 羧甲司坦, 水杨酰胺, 对乙酰氨基酚, 无水咖啡因, 亚甲基双水杨酸, 异丙嗪, 和茶碱。

[0071] 本发明所述的抗体可以是不与这些化合物中的任一种交叉反应或与其微弱交叉反应的抗体。当使用所述抗体测量式 (I) 所示的化合物时, 即使样品中存在上述化合物, 仍可以特异性测量所述化合物。

[0072] 当获得单克隆抗体时, 进行下述步骤。注意所述步骤不限于此。生产单克隆抗体的方法是本领域中公知的, 且被广泛使用。因此, 本领域的普通技术人员使用上述抗原将容易地生产本发明所述的抗体 (例如, 参考 *Antibodies, A Laboratory Manual* (抗体, 实验室手册) (冷泉港实验室出版社 (Cold Spring Harbor Laboratory Press), (1988), 第 6 章)。

[0073] 在最后免疫后, 从被免疫的动物取出脾细胞或淋巴结细胞 (即, 生产抗体的细胞), 并且与来源于骨髓瘤、具有高生长能力的细胞系融合, 以产生杂交瘤。优选使用具有高抗体生产性 (质量和数量) 的细胞进行细胞融合。优选地, 所述来源于骨髓瘤的细胞系与生产抗体的细胞所来源的动物是相容的。细胞可以通过已知的方法融合。例如, 可以使用聚乙二醇法, 使用仙台病毒 (Sendai virus) 的方法, 使用电流的方法等。所得到的杂交瘤可以通过本领域公用的方法培养。可以选择需要的杂交瘤, 同时检验所产生的抗体的特性。杂交瘤可以通过公知方法克隆, 如有限稀释法或软琼脂法。

[0074] 考虑将要产生的抗体用于实际测量的条件, 可以有效地选择杂交瘤。例如, 可以通过下述更有效地选择生产所需的抗体的杂交瘤: 在存在期望对其测定交叉反应性的化合物的条件下, 使所述抗体 (通过免疫动物获得) 与固定在固相上的式 (I) 所示的化合物反应, 并且比较所得到的反应性与在不存在期望对其测定交叉反应性的化合物的条件下的反应性。还可以通过下述更有效地选择生产所需的抗体的杂交瘤: 在存在来源于生物样品的成分的条件下, 使所述抗体 (通过免疫动物获得) 与固定在固相上的式 (I) 所示的化合物反应, 并且比较所得到的反应性与在不存在来源于生物样品的成分的条件下的反应性。

[0075] 克隆步骤后, 通过 ELISA、RIA、免疫荧光等测定用式 (I) 所示的化合物产生的抗体的结合特性, 以确定所选的杂交瘤是否产生具有所需特性的单克隆抗体。为了有效地获得识别式 (I) 所示的化合物而不识别其代谢物的抗体, 优选使用通过使式 (I) 所示的化合物与蛋白结合作为抗原来筛选杂交瘤而获得的抗体。更优选地使用与免疫用抗原所用的蛋白不同的蛋白。

[0076] 通过大量培养这样选择的杂交瘤, 可以生产具有所需特性的单克隆抗体。大量培养方法没有特别限制。例如, 可以在适当的培养基中培养杂交瘤, 以在所述培养基中产生单克隆抗体, 或可以将杂交瘤腹膜内注射到哺乳动物中, 并且培养以在腹水中产生所述抗体。

可以适当组合上文关于从抗血清中纯化抗体而提及的纯化法,如 DEAE 阴离子交换层析、亲和层析、硫酸铵分级、PEG 分级、和乙醇分级,而纯化单克隆抗体。

[0077] 具有抗原-抗体反应性的抗体片段也可以替代完整的抗体分子用作本发明所述的抗体。例如,可以使用通过免疫动物获得的片段,通过重组 DNA 技术获得的片段,或嵌合抗体。优选地,将功能片段用作抗体片段。功能片段的实例包括 $F(ab')_2$ 、 Fab' 等。这些片段可以通过用蛋白酶(例如,胃蛋白酶或木瓜蛋白酶)处理如上述获得的抗体而产生。

[0078] 本发明所述的单克隆抗体可以用作固定在不溶支持物上的固定(固相)抗体,或可以用作用公知的标记物进行标记的标记抗体(下文描述)。这样的固定(固相)抗体和标记抗体也包括在本发明范围之内。例如,可以通过使得单克隆抗体物理吸附在不溶支持物上或化学结合在不溶支持物上(需要时,通过适当的间隔体)而生产固定抗体。所述不溶支持物可以由聚合物材料(例如,聚苯乙烯树脂),无机材料(例如,玻璃),多糖物质(例如,纤维素或琼脂糖)等形成。不溶支持物的形状没有特别限制。不溶支持物可以采用平板(例如,微量平板或膜)、珠或颗粒(例如,胶乳颗粒)、管(例如,检验管)等形状。

[0079] 可以使用可以结合本发明所述的抗体的标记抗体(二级抗体)来测量与式(I)所示化合物结合的本发明所述的抗体的量。因此,可以检测样品中式(I)所示的化合物。用于产生标记抗体的标记物的实例包括酶、荧光物质、化学发光物质、生物素、抗生物素蛋白、放射性同位素、金胶体颗粒、有色胶乳等。标记物和抗体可以通过已知的方法结合,诸如戊二醛法、马来酰亚胺法、吡啶基二硫化物法、或高碘酸法。注意固定抗体和标记抗体的类型和生产方法不限于上述实例。例如,当使用酶(例如,辣根过氧化物酶(HRP)或碱性磷酸酶(ALP))作为标记时,可以使用该酶的特异性底物(例如,当所述酶为 HRP 时,0-苯二胺(OPD)或 3,3',5,5'-四甲联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)(TMB),当所述酶为 ALP 时,磷酸对-硝基苯酯(p-nitrophenyl phosphate))检测酶活性。当使用生物素作为标记时,通常至少抗生物素蛋白或酶联抗生物素蛋白反应。

[0080] 例如,样品中存在的式(I)所示化合物可以使用本发明所述的抗体进行检测。表述“式(I)所示的化合物”用在本文中是指式(I)所示化合物的 S-异构体,式(I)所示化合物的 R-异构体,和作为 S-异构体和 R-异构体的 1:1 混合物的式(I)所示化合物的外消旋体。因此,表述“与式(I)所示化合物反应的抗体”用在本文中指与式(I)所示化合物的 R-异构体反应的抗体、与式(I)所示化合物的 S-异构体反应的抗体、和与式(I)所示化合物的 S-异构体和 R-异构体反应的抗体。

[0081] 术语“外消旋体”与术语“氧氟沙星”同义使用,术语“式(I)所示化合物的 S-异构体”与术语“左氧氟沙星”同义使用。

[0082] 术语“不溶支持物”可以称为“固相”,并且使得抗原或抗体物理或化学支撑在所述不溶支持物上的方法,或将抗原或抗体物理或化学支撑在所述不溶支持物上的状态可以称为“固定”或“被固定的”。术语“检测”或“测量”应该以最宽泛的意义解释,其包括表明式(I)所示化合物的存在和/或定量确定,并且不应该以狭义解释。

[0083] 以使用本发明所述的抗体的测量方法检测目标样品的实例包括来源于活体(生命体)的体液。具体的检测目标样品的实例包括,但不限于,血液、血清、血浆、尿、唾液、痰、泪液、耳漏、和前列腺液。例如,从家畜或水生动物组织、用于喂养家畜或水生动物的饲料或水等提取的样品落入本发明所述的样品范围之内。这些之中,从与治疗的关系的观点等看

来,特别理想地使用已经施用了氧氟沙星的患者的体液。

[0084] 术语“来源于生物样品的成分”用作本文中指明形成样品的成分。例如,当生物样品为血清时,术语“来源于生物样品的成分”指血清蛋白(例如,白蛋白或球蛋白)、糖蛋白、脂蛋白等。当生物样品为血浆时,术语“来源于生物样品的成分”指血浆蛋白(包括血清中不包含的凝血因子)。当生物样品为唾液时,术语“来源于生物样品的成分”指酶(例如,溶菌酶)、糖胺聚糖(mucopolysaccharides)等。例如,上述成分可以与已经施用的氧氟沙星结合,并且可以防止该抗体识别抗原决定簇,如在本说明书中所述的。

[0085] 表述“已经失去抗菌活性”用在本文中是指这样的状态,其中抗生素化合物已经改变为代谢物、消化物等,以致未改变的化合物的部分抗生素谱或抗生素活性已经失去或者减弱。术语“结合的”用在本文中是指这样的状态,其中抗原与检测系统中来源于样品的蛋白可逆或不可逆地结合,或者人工结合到载体上。术语“游离”用在本文中是指其中抗原不与来源于样品的蛋白或载体结合的状态。

[0086] 术语“识别”抗原与术语与抗原“反应”、“交叉反应”或“结合”同义。注意,术语“识别”的意思不限于此。该术语应该以最宽泛意义解释。

[0087] 表述“本发明所述的抗体不与化合物交叉反应”意指本发明所述的抗体不与该化合物反应。表述“本发明所述的抗体不与化合物交叉反应”在数量上是指,依据实施例 1 中竞争性 ELISA 的反应标准,交叉反应性低于 1% 的情形。

[0088] 表述“本发明所述的抗体与化合物微弱交叉反应”意指本发明所述的抗体与该化合物反应,但是与该化合物的交叉反应性低于与其它化合物的交叉反应性(即,可以有效区分和识别其它化合物)。表述“本发明所述的抗体与化合物微弱交叉反应”在数量上是指,依据实施例 1 中竞争性 ELISA 的反应标准,交叉反应性为 1% 以上且低于 40% 的情形。

[0089] 表述“与 S- 异构体强烈反应”意指,当与式 (I) 所示化合物的 R- 异构体相比较时,抗体与式 (I) 所示化合物的 S- 异构体强烈反应。表述“与 S- 异构体强烈反应”在数量上是指,依据实施例 1 中竞争性 ELISA 的氧氟沙星-抗体交叉反应性标准,交叉反应性低于 100% 的情形。表述“与 R- 异构体强烈反应”意指依据实施例 1 中竞争性 ELISA 的氧氟沙星-抗体交叉反应性标准,交叉反应性大于 100% 的情形。

[0090] 表述“抗体与式 (I) 所示化合物的反应性不因为存在来源于生物样品的成分而改变”意指,当使本发明所述的抗体与式 (I) 所示的游离化合物反应时,没有观察到反应性的实质性改变。例如,当发生与药物的药物动力学结合时,或当粘性物质(例如,唾液中包含的糖胺聚糖)妨碍所述抗体与式 (I) 所示的化合物中包含的抗原决定簇结合时,与式 (I) 所示化合物的反应性可能改变。

[0091] 表述“抗体与式 (I) 所示化合物的反应性不因为式 (I) 所示化合物与血清成分之间的结合而改变”是指当使用本发明所述的抗体来测量血清样品中式 (I) 所示的化合物时所需要的特性。上述表述意指,即使血清成分(例如,血清白蛋白)与式 (I) 所示的化合物结合,抗体与式 (I) 所示化合物的反应性也不失去或减弱。上述表述在数量上是指这样的情形,其中在通过实施例 3 的竞争性 ELISA 确定用人血清温育式 (I) 所示的化合物的影响的检测中,在温育时间为 0 时的反应性和在温育时间为 15 分钟时的反应性之间的差别低于 5%。

[0092] 当在存在或不存在血清的条件下制备游离化合物的情形中,通过竞争性 ELISA 测

量的本发明所述的抗体与式 (I) 所示的游离化合物的反应性低于 5% 时, 也满足“抗体与式 (I) 所示化合物的反应性不因为式 (I) 所示化合物与血清成分之间的结合而改变”的条件。

[0093] 可以使用本发明所述的抗体通过已知的方法 (例如, Rinsho Byori, 增强版, No. 53, "Immunoassay for clinical examination-technology and application-(用于临床检验技术和应用的免疫测定法)", 日本实验医学学会 (Japanese Society of Laboratory Medicine), 1983, Eiji Ishikawa 等.(编辑), "Enzyme Immunoassay(酶免疫测定法)", 第 3 版, Igaku-Shoin, Ltd., 1987, 和 Tsunehiro Kitagawa 等.(编辑), Protein, Nucleic Acid and Enzyme(蛋白、核酸和酶), 分卷, No. 31, "Enzyme Immunoassay(酶免疫测定法)", Kyoritsu Shuppan, Co., Ltd., 1987) 来检测生物样品中的式 (I) 所示的化合物。注意, 使用本发明所述的抗体检测式 (I) 所示化合物的方法不限于上述方法。本领域的普通技术人员将依据目标适当选择方法。在本申请的实施例中描述了一种具体的测量方法。本领域的普通技术人员参考实施例所述的方法将容易地和可靠地检测生物样品中包含的式 (I) 所示的化合物, 同时在需要时适当地改进或改变所述方法。

[0094] 本发明所述的测定试剂 (试剂盒) 可以概括地分类为: (1) 在固定式 (I) 所示的化合物时使用的测定试剂, (2) 在固定识别式 (I) 所示化合物的抗体 (本发明所述的抗体) 时使用的测定试剂, 和 (3) 在固定式 (I) 所示的化合物和识别式 (I) 所示化合物的抗体时使用的测定试剂。下文以 ELISA (典型的标记的免疫测定法) 和胶乳凝集抑制免疫测定法 (典型的颗粒凝集抑制免疫测定法) 为例, 描述标记的免疫测定法和颗粒凝集抑制免疫测定法。下述标记的免疫测定法和颗粒凝集抑制免疫测定法利用与样品中的氧氟沙星的竞争性反应。

[0095] < 标记的免疫测定法 :ELISA >

[0096] (1) 当固定式 (I) 所示的化合物时, 可以使用至少下列产生测定试剂 (试剂盒): (a) 其上固定式 (I) 所示的化合物的不溶支持物, 和 (b) 识别式 (I) 所示的化合物的抗体。例如, (a) 其上固定式 (I) 所示的化合物的不溶支持物可以通过经由载体固定式 (I) 所示的化合物获得, 或将交互结合 (inter-binding) 的官能团引入到不溶支持物和式 (I) 所示的化合物中获得, 和允许不溶支持物与式 (I) 所示的化合物反应从而将式 (I) 所示的化合物固定在固体支持物上而获得。术语“载体”用作本文中是指介入将式 (I) 所示的化合物固定在不溶支持物上的载体, 并且可以是蛋白。注意, 用于将式 (I) 所示的化合物固定在不溶支持物上的载体不一定促进使用低分子量抗原 (半抗原) 进行的抗体生产, 其与免疫用抗原所用的载体是不同的。因此, 包括载体的式 (I) 所示的化合物可以用作免疫用抗原, 没有免疫原性的蛋白或合成聚合物可以用作载体。(b) 识别式 (I) 所示的化合物的抗体可以进行可检测地标记或可以不进行可检测地标记。当抗体不被可检测地标记时, 使用被可检测地标记的二级抗体等。当抗体被可检测地标记时, 可以使用适用于标记物的检测方法。当可检测的标记是酶时, 测定试剂 (试剂盒) 还可以包括酶反应底物。上文已经描述了酶及其底物的优选组合。

[0097] (2) 当固定识别式 (I) 所示的化合物的抗体时, 可以使用至少下列产生测定试剂 (试剂盒): (a) 其上固定识别式 (I) 所示化合物的抗体的不溶支持物, 和 (b) 标记的式 (I) 所示的化合物。(a) 其上固定识别式 (I) 所示化合物的抗体的不溶支持物可以通过物理或化学固定所述抗体而获得。(b) 标记的式 (I) 所示的化合物可以通过公知方法获得。当化

合物被可检测地标记时,可以使用适用于标记物的检测方法。当可检测的标记是酶时,测定试剂(试剂盒)还可以包括酶反应底物。这与情形(1)相同。

[0098] (3) 当固定式(I)所示的化合物和识别式(I)所示的化合物的抗体二者时,可以使用至少下列产生测定试剂(试剂盒):(a) 其上固定式(I)所示的化合物的不溶支持物,和(b) 其上固定识别式(I)所示化合物的抗体的不溶支持物。(1)中给出的描述适用于其上固定式(I)所示的化合物的不溶支持物(a), (2)中给出的描述适用于其上固定识别式(I)所示化合物的抗体的不溶支持物(b)。

[0099] < 颗粒凝集抑制免疫测定法:胶乳凝集抑制免疫测定法 >

[0100] 用于通过除标记的免疫测定法以外的方法检测样品中包含的式(I)所示的化合物的测定试剂(试剂盒)的实例包括:(1A) 包括至少下列的测定试剂(试剂盒):(a) 识别式(I)所示化合物的抗体,和(b) 固定的合成的多价抗原, (2A) 包括至少下列的测定试剂(试剂盒):(a) 其上固定识别式(I)所示化合物的抗体的胶乳颗粒,和(b) 合成的多价抗原,和(3A) 包括至少下列的测定试剂(试剂盒):(a) 其上固定识别式(I)所示化合物的抗体的胶乳颗粒,和(b) 固定的合成的多价抗原。术语“合成的多价抗原”和“固定的合成的多价抗原”的定义在下文中描述。

[0101] 这些测定试剂(试剂盒)可以适当地用于胶乳凝集抑制免疫测定法。可以适当地选择用于上述(a)或(b)的胶乳颗粒的颗粒直径和类型以获得需要的性能(例如,提高的灵敏性)。可以使用任何适于固定抗原或抗体的胶乳材料。胶乳材料的实例包括包含聚苯乙烯、苯乙烯-丁二烯共聚物、(甲基)丙烯酸酯聚合物等作为主要成分的胶乳。注意,可以使用由金属胶体、明胶、脂质体、微胶囊、硅石、矾土、炭黑、金属化合物、金属、陶瓷、磁性材料等形成的颗粒代替胶乳颗粒。

[0102] 用来基于免疫色谱测量原理检测样品中包含的式(I)所示化合物的另一种测定试剂(试剂盒)的实例包括:包括至少下列的测定试剂(试剂盒):(a) 其上固定识别式(I)所示的化合物的抗体的不溶支持物,和(b) 标记的式(I)所示的化合物,和包括至少下列的测定试剂(试剂盒):(b) 标记的识别式(I)所示的化合物的抗体,和(b) 式(I)所示的化合物或合成的多价抗原。

[0103] 术语“合成的多价抗原”指为了提高低分子量抗原(半抗原)免疫测定法(特别是颗粒凝集免疫测定法)中的凝集程度而通过聚合半抗原产生的多价抗原(凝集素)。合成的多价抗原与聚半抗原等相似。只要合成的多价抗原在聚合氧氟沙星后作为凝集素行使功能,合成的多价抗原的生产方法和构型没有特别限制。可以使用通过经由适当载体(例如,蛋白,聚氨基酸,肽,多糖(低分子量多糖或高分子量多糖),水溶性合成聚合物,或间隔体化合物)聚合氧氟沙星获得的产物。本发明所述的免疫用抗原和筛选用抗原也落入术语“合成的多价抗原”的范围内。与一分子载体结合的式(I)所示化合物的分子数(结合数)可以以与在生产免疫用抗原或筛选用抗原的方法中相同的方式进行调整。允许多价抗原被识别的结合比例可以是2以上。可以适当选择结合比例,以便获得理想的凝集素性能。例如,下文所述的实施例中的结合比例优选为8以上,更优选为15以上(使用包括下列的测定试剂(试剂盒)的胶乳凝集抑制免疫测定法:(a) 其上固定识别式(I)所示的化合物的抗体的胶乳颗粒,和(b) 合成的多价抗原(其使用牛血清白蛋白作为载体产生))。最佳结合比例随载体类型、测定试剂、测定设计而不同。本领域的普通技术人员将在选择需要的载

体且确定关于每种载体的最佳结合比例后生产所述测定试剂。

[0104] 所固定的合成的多价抗原的目的和功能与合成的多价抗原的目的和功能相同。所固定的合成的多价抗原可以通过将两分子以上氧氟沙星化学或物理结合到不溶支持物（例如，胶乳颗粒）上（任选地通过载体或间隔体）而获得的产物，或通过将上述合成的多价抗原化学或物理结合到不溶支持物（例如，胶乳颗粒）上而获得的产物。

实施例

[0105] 以下将通过实施例进一步描述本发明。注意，本发明不限于下述实施例。

[0106] 实施例 1：制备杂交瘤并且获得抗体

[0107] (I) 材料和方法

[0108] (1) 制备免疫用抗原和筛选用抗原

[0109] (i) 将 10mg 式 (I) 所示化合物的 S- 异构体（下文可以称为“左氧氟沙星”或“LVFX”）溶解在 2ml 溶液中（0.1mol/l 磷酸盐缓冲液：0.4ml，DMSO：0.2ml，纯水：1.4ml）以获得 LVFX 溶液。在本申请的实施例中，左氧氟沙星半水合物（(-)-(S)-9-氟-2,3-二氢-3-甲基-10-(4-甲基-1-哌嗪基)-7-氧代-7H-吡啶并[1,2,3-去][1,4]苯并噁嗪-6-羧酸半水合物）用作式 (I) 所示化合物的 S- 异构体。

[0110] (ii) 将 2mg BSA 粉末或 2mg 运铁蛋白粉末添加到 LVFX 溶液中，并且通过轻微搅动溶解在 LVFX 溶液中。允许得到的溶液在冰浴上静置 5 分钟，以获得两种 LVFX- 蛋白混合物。

[0111] (iii) 向每种 LVFX- 蛋白混合物中添加 160mg 水溶性碳二亚胺 (carbodiimide) (WSC) (交联剂)，并且溶解在其中。将得到的溶液通过避光条件下轻微搅动在 4°C 温育 70 小时。

[0112] (iv) 然后，将溶液在 PBS (pH:7.2) 中在 4°C 透析两天。

[0113] (v) 收集透析的液体。测量 330nm 处的吸光度来确定 LVFX 浓度，并且确定偶联率 (LVFX- 蛋白结合比例)。

[0114] (2) 免疫和血液收集

[0115] 将 LVFX-BSA 偶联产物 (LVFX-BSA) 溶解在 PBS 中，并且与佐剂以 1 : 1 的比例混合。使用注射器混合所述成分以制备用作免疫用抗原的乳状液。

[0116] 将免疫用抗原以 10 μg (ML-1)，20 μg (ML-2)，或 40 μg (ML-3) 的量皮下施用至三只雌性 BALB/c 小鼠 (ML-1 和 ML-2 : 均为 7 周龄，ML-3 : 11 周龄)。一周后，对每只小鼠以上述量再次皮下施用所述免疫用抗原。

[0117] 在免疫开始后经过 14 天时，由每只小鼠的眼底收集小鼠抗血清。通过下述固定抗原的 ELISA 确定抗血清中的抗体滴度。为了确定抗血清中抗体与游离氧氟沙星的反应性，通过下述竞争 ELISA 在反应体系中存在 2 μmol/l，10 μmol/l，或 50 μmol/l 游离左氧氟沙星的条件下确定每种抗血清的反应性。

[0118] 将从未免疫小鼠的眼底收集的正常血清用作对照。

[0119] (3) 细胞融合

[0120] 在收集血液后经过 5 天时，将 10 μg LVFX-BSA 静脉内注射至小鼠 ML-1 (最后一次免疫)。在最后一次免疫后经过 3 天时，取出脾脏，并且使用聚乙二醇通过常规方法进行细

胞融合。使用骨髓瘤 SP2/0 细胞。将得到的融合细胞混悬在包含次黄嘌呤 - 氨喋呤 - 胸苷 (HAT) 和 15% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中, 以致脾细胞浓度为 2.5×10^6 /ml。将细胞以 0.2ml/孔的体积分配在 96 孔培养平板中。将细胞在 5% CO₂ 培养箱中在 37°C 培养。

[0121] (4) 筛选

[0122] 在细胞融合后经过 11 天时, 使用培养物上清进行固定抗原的 ELISA (一级筛选), 并且选择表现出与 LVFX- 运铁蛋白偶联产物 (LVFX- 运铁蛋白) 的高反应性的孔作为一级阳性孔。将一级阳性孔中的细胞在 48 孔平板中传代培养。

[0123] 在传代培养后经过 2 天时, 使用培养物上清进行竞争性 ELISA (二级筛选), 并且选择表现出与游离左氧氟沙星的高反应性的孔作为二级阳性孔。

[0124] 使用共用的药物、左氧氟沙星的类似物和代谢物, 将通过二级筛选所选择的细胞系进行竞争性 ELISA (三级筛选)。使用通过三级筛选所选择的细胞系的培养物上清, 确定当竞争性 ELISA 的反应体系中存在人血清, 并且预先温育左氧氟沙星和血清时, 抗体与左氧氟沙星的反应性是否受到血清的影响。

[0125] (5) 克隆和免疫球蛋白 (抗体) 收集

[0126] 通过有限稀释方法克隆通过三级筛选所选择的 10 个杂交瘤细胞系。为了取样由每种杂交瘤产生的免疫球蛋白 (抗体), 向在两周前腹膜内注射了 0.5ml 姥鲛烷 (pristane) 的 12 周龄雌 BALB/c 小鼠腹膜内施用所述杂交瘤 (0.5×10^6 个细胞)。14 天后取样腹水, 并且离心。将上清与等体积的吸附缓冲液 (3mol/l NaCl, 1.5mol/l 甘氨酸 -NaOH 缓冲液, pH:8.5) 混合。然后过滤混合物。将滤液通过使用所述吸附缓冲液平衡的蛋白质 A 柱, 以便滤液中包含的抗体吸附在柱上, 然后用 0.1mol/l 柠檬酸缓冲液 (pH:3.0) 洗脱。洗脱物用 1mol/l Tris-HCl 缓冲液 (pH:8.0) 中和, 在 PBS 中透析以收集抗体。

[0127] (6) 亚组确定

[0128] 使用亚型分型试剂盒 (由 ZYMED 供应), 将这样收集的 10 种类型的免疫球蛋白 (抗体) 进行亚组确定。

[0129] (7) 制备 ELISA 平板

[0130] 将 LVFX- 运铁蛋白以 $1 \mu\text{g/ml}$ 的浓度溶解在 PBS 中, 并且用作筛选用抗原。将所述抗原以 $50 \mu\text{l}$ /孔的体积固定在 96 孔平板中, 然后允许在 4°C 静置过夜。在用 PBST (0.05% 吐温 20-PBS) 洗涤 96 孔平板三次后 ($400 \mu\text{l}$ /孔), 将封闭试剂 (3% 脱脂奶粉 -PBST) 以 $100 \mu\text{l}$ /孔的体积分配在 96 孔平板中。允许 96 孔平板在室温下静置 1 小时, 以制备 ELISA 平板。在用 PBST 洗涤三次后, 向该 ELISA 平板中加入每种试剂。然后, 将该 ELISA 平板用于实施例中所所述的每种 ELISA 检测。

[0131] (8) 抗原固定的 ELISA

[0132] (i) 将每种小鼠抗血清或融合细胞的培养物上清以 $50 \mu\text{l}$ /孔的体积分配在 ELISA 平板中, 所述每种小鼠抗血清用 1% BSA-PBST 从 100 倍开始以 5 的倍数逐步稀释。然后允许 ELISA 平板在室温下静置 1 小时。

[0133] (ii) 用 PBST 洗涤三次后, 将通过用 1% BSA-PBST 以 5000 的倍数稀释 HRP-GtF(ab')₂-抗-小鼠 Ig' s (Biosource, AMI4404) 制备的溶液以 $50 \mu\text{l}$ /孔的体积分配在 ELISA 平板中。然后允许 ELISA 平板在室温下静置 1 小时。

[0134] (iii) 用 PBST 洗涤三次后, 将 OPD 显色剂 (通过将 OPD (2mg/ml) 和过氧化氢 (浓

度:0.02%)溶解在柠檬酸盐缓冲液(pH:5.0)中而制备)以50 μ l/孔的体积分配在ELISA平板中。然后允许ELISA平板在室温下静置10分钟。

[0135] (iv) 加入0.75mol/l硫酸盐(50 μ l/孔)终止反应。然后使用平板读数仪测量492nm处的吸光度。

[0136] (9) 制备用于竞争性ELISA的化合物溶液

[0137] 选自左氧氟沙星,左氧氟沙星的共用药物,作为左氧氟沙星的类似物的新喹诺酮抗生素,左氧氟沙星的代谢物,和氧氟沙星(外消旋体)作为用于竞争性ELISA的化合物。从纯水,PBST,DMSO,甲醇,0.1mol/lHCl,和0.1mol/l NaOH中选择容易溶解每种化合物的溶剂。当选择0.1mol/l HCl或0.1mol/l NaOH作为溶剂时,将通过溶解所述化合物获得的溶液立即用1%BSA-PBST以50的倍数稀释,并且使用pH试纸确定溶液的pH是否约为中性。用1%BSA-PBST逐步稀释溶液,以便化合物浓度为0.01 μ mol/l,0.1 μ mol/l,1 μ mol/l,10 μ mol/l,或100 μ mol/l,并且用于竞争性ELISA。例如,将左氧氟沙星以1mmol/l的浓度溶解在纯水中,用1%BSA-PBST逐步稀释,并且用于竞争性ELISA。

[0138] <进行交叉反应性检测的左氧氟沙星共用药物>

[0139] 双氯芬酸钠,萘丁美酮,氟比洛芬,酮洛芬,洛索洛芬钠,奥沙普秦,萘普生,布洛芬,羧甲司坦,水杨酰胺,对乙酰氨基酚,无水咖啡因,亚甲基双水杨酸,异丙嗪,和茶碱

[0140] <进行交叉反应性检测的左氧氟沙星类似物>

[0141] 环丙沙星,托氟沙星,加替沙星,司帕沙星,氟罗沙星,洛美沙星,诺氟沙星,依诺沙星,莫西沙星,和帕珠沙星

[0142] <进行交叉反应性检测的左氧氟沙星代谢物>

[0143] N-氧化物代谢物和去甲基代谢物

[0144] <氧氟沙星>

[0145] 式(I)所示化合物的S-异构体和R-异构体(组成比例:1:1)的混合物

[0146] (10) 竞争性ELISA

[0147] (i) 将在题目为“(9)制备用于竞争性ELISA的化合物溶液”部分制备的每种化合物溶液以25 μ l/孔的体积分配在ELISA平板中。

[0148] (ii) 将用1%BSA-PBST以1000的倍数稀释的每种小鼠抗血清、或融合细胞的培养物上清以25 μ l/孔的体积分配在ELISA平板中。然后允许该ELISA平板在室温下静置1小时。

[0149] 以与在题目为“(8)抗原固定的ELISA”部分中所述的步骤(ii)-(iv)相同的方式进行下述步骤。

[0150] (11) 使用本发明所述抗体评估血清对竞争性ELISA的影响

[0151] (i) 用1%BSA-PBST稀释人血清以制备5%的人血清。每个实施例中所用的人血清和血浆来自在知情情况下收集的志愿者血液。

[0152] (ii) 使用5%的人血清制备2.0 μ mol/l,0.2 μ mol/l,或0.02 μ mol/l的左氧氟沙星(“人血清试剂a”)。作为对照试剂,使用1%BSA-PBST制备2.0 μ mol/l,0.2 μ mol/l,或0.02 μ mol/l的左氧氟沙星。

[0153] (iii) 将人血清试剂或对照试剂以25 μ l/孔的体积分配在ELISA平板中。

[0154] (iv) 将融合细胞的培养物上清以25 μ l/孔的体积分配在ELISA平板中。允许

ELISA 平板在室温下静置 1 小时。

[0155] 以与在题目为“ (8) 抗原固定的 ELISA”部分中所述的步骤 (ii)-(iv) 相同的方式进行随后的步骤。

[0156] (12) 使用温育游离的左氧氟沙星和人血清制备的样品来评估血清对竞争性 ELISA 的影响

[0157] (i) 将通过在纯水中溶解左氧氟沙星制备的溶液用人血清稀释 100 倍,以制备 $30 \mu\text{mol}/\text{l}$ 的左氧氟沙星溶液。将左氧氟沙星溶液在 37°C 温育 0, 15, 或 60 分钟。

[0158] (ii) 温育后,用 1% BSA-PBST 以 15, 150, 或 1500 倍稀释 $30 \mu\text{mol}/\text{l}$ 左氧氟沙星溶液,以制备人血清试剂 b。

[0159] (iii) 将人血清试剂 b 以 $25 \mu\text{l}$ /孔的体积分配在 ELISA 平板中。

[0160] (iv) 将融合细胞的培养物上清以 $25 \mu\text{l}$ /孔的体积分配在 ELISA 平板中。允许 ELISA 平板在室温下静置 1 小时。

[0161] 以与在题目为“ (8) 抗原固定的 ELISA”部分中所述的步骤 (ii)-(iv) 相同的方式进行随后的步骤。

[0162] (13) 反应的量化

[0163] (i) 通过下式 (12) 利用测量的吸光度计算每种化合物在每种浓度的反应性 (%)。

[0164] 反应性 (%) = $[\text{Abs. (x)}]/[\text{Abs. (0)}] \times 100$

[0165] (1)

[0166] Abs. (x) :

[0167] (化合物浓度为 $x \mu\text{mol}/\text{l}$ 的吸光度)-(抗体浓度为 $0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的吸光度)

[0168] Abs. (0) :

[0169] (化合物浓度为 $0 \mu\text{mol}/\text{l}$ 的吸光度)-(抗体浓度为 $0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的吸光度)

[0170] (ii) 在图上绘制每种化合物的浓度和反应性之间的关系,并且确定反应性为 50%的每种化合物的浓度。将该浓度确定为半最大 (50%) 抑制浓度 (IC_{50})。

[0171] (iii) 通过下式利用浓度 IC_{50} 计算每种抗体与每种化合物的交叉反应率 (%)。基于这样计算的交叉反应性设定关于每种抗体与每种化合物的交叉反应性标准。

[0172] 交叉反应率 (%) = $[\text{左氧氟沙星的 } \text{IC}_{50}]/[\text{每种化合物的 } \text{IC}_{50}] \times 100$

[0173] (2)

[0174] 高 :80-100%

[0175] 中 :40%以上且小于 80%

[0176] 低 :1%以上且小于 40%

[0177] 无 :0%以上且小于 1%

[0178] 设定每种抗体与氧氟沙星的交叉反应性标准如下。

[0179] 与 S- 异构体强烈反应 :< 100%

[0180] 与 S- 异构体和 R- 异构体同等地反应 :100%

[0181] 与 R- 异构体强烈反应 :> 100%

[0182] (II) 结果

[0183] (1) 制备免疫用抗原和筛选用抗原

[0184] 关于免疫用抗原和筛选用抗原的 LVFX- 蛋白结合比例很高 (LVFX-BSA :12.0,

LVFX- 运铁蛋白 :13.9)。通过用透析前 BSA 或运铁蛋白的浓度除透析后 LVFX 的浓度而计算结合比例,并且表示与一分子 BSA 或运铁蛋白结合的 LVFX 分子数。

[0185] (2) 抗原固定的 ELISA 检测的结果 (血液收集)

[0186] 作为血液收集和通过抗原固定的 ELISA 确定每种小鼠抗血清中的抗体滴度的结果,在所有三种小鼠抗血清中获得高抗体滴度 (图 1)。由于与固定在 ELISA 平板上的筛选用抗原偶联的蛋白不同于与免疫用抗原偶联的蛋白,不存在每种抗体与固定的筛选用抗原的蛋白位点 (载体) 非特异性反应的可能。因此,认为在该实施例中获得的每种小鼠抗血清包括特异性识别左氧氟沙星的抗体,所述左氧氟沙星对于免疫用抗原和筛选用抗原是共同的。

[0187] (3) 竞争性 ELISA 检测的结果 (血液收集)

[0188] 在竞争性 ELISA 反应体系中允许存在不与蛋白结合的游离的左氧氟沙星 (与固定的抗原竞争),并且确定筛选用抗原和每种小鼠抗血清中的抗体之间的反应的变化。结果,当使用每种小鼠抗血清时,筛选用抗原和所述抗体之间的反应取决于添加至反应体系中的左氧氟沙星的量而减少 (图 2)。因此,认为在该实施例中获得的每种小鼠抗血清包括识别游离的左氧氟沙星的抗体。

[0189] (4) 筛选

[0190] 作为一级筛选的结果,选择 63 个表现出与固定的 LVFX- 运铁蛋白的高反应性的细胞系作为一级阳性细胞系。作为二级筛选的结果,选择 32 个表现出与游离的左氧氟沙星的高反应性的细胞系作为二级阳性细胞系。作为三级筛选的结果,选择 10 个不与左氧氟沙星的共用药物、类似物、和代谢物交叉反应或微弱交叉反应的细胞系,并且检测来源于这 10 个细胞系的抗体。

[0191] 允许在竞争性 ELISA 反应体系中存在人血清,并且确定血清成分对通过三级筛选选择的 10 种抗体的每一种的影响。在该情形中,由于添加了血清,游离的左氧氟沙星可以结合血清蛋白,以形成结合的左氧氟沙星,从而可能影响抗体的反应。然而,对于每种抗体,对照 (不添加血清) 和添加血清的情形之间的反应性差别小于 5%。

[0192] 将通过三级筛选选择的 10 种抗体中的每一种使用人血清试剂 b 进行竞争性 ELISA,所述人血清试剂 b 通过温育游离的氧氟沙星和血清以致游离的氧氟沙星转化为与血清蛋白结合的结合氧氟沙星而制备。通过竞争性 ELISA 确定抗体的反应性。结果,在温育时间为 0 分钟时的反应性和在温育时间为 15 或 60 分钟时的反应性之间的差别小于 5%。

[0193] 从上述关于血清影响的两个检测结果看出,通过三级筛选选择的 10 种抗体的每一种表现出的与结合至血清蛋白上的结合左氧氟沙星的反应性是与未结合至血清蛋白上的游离左氧氟沙星的反应性相同的。因此,估计可以同时检测样品中的游离左氧氟沙星和结合左氧氟沙星。

[0194] (5) 克隆,免疫球蛋白 (抗体),和亚类确定

[0195] 确定通过三级筛选选择的每种抗体的亚类。所述 10 种抗体中有 8 种抗体的亚类为 IgG,其余 2 种抗体的亚类为 IgA 或 IgM。随后仅评估了 8 种单克隆抗体 77201-77207 和 77209 (亚类: IgG)。

[0196] 将生产 8 种单克隆抗体中除单克隆抗体 77203 外的 7 种单克隆抗体的杂交瘤保藏在国家高等工业科学技术研究所 (National Institute of Advanced Industrial Science

and Technology) (AIST 筑波中心 6,1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 日本), 所述单克隆抗体 77203 在实施例 2 中表现出某种程度的与去甲左氧氟沙星的反应性。保藏号如下:

[0197] 抗体号:保藏号

[0198] 77201 :FERM BP-11010

[0199] 77202 :FERM BP-11011

[0200] 77204 :FERM BP-11012

[0201] 77205 :FERM BP-11013

[0202] 77206 :FERM BP-11014

[0203] 77207 :FERM BP-11015

[0204] 77209 :FERM BP-11016

[0205] 实施例 2

[0206] 评估由每种杂交瘤产生的单克隆抗体的交叉反应性

[0207] (I) 材料和方法

[0208] (1) 试剂制备

[0209] 以与实施例 1 (I) (9) 相同的方式制备用于竞争性 ELISA 的每种化合物。

[0210] (2) 评估交叉反应性 (竞争性 ELISA)

[0211] 以与实施例 1 (I) (10) 相同的方式进行竞争性 ELISA。使用实施例 1 (II) (5) 中所选择的 7 种单克隆抗体 (纯化的 IgG :0.2 μ g/ml)。以与实施例 1 (I) (13) 相同的方式量化每种抗体的反应性和交叉反应性。

[0212] (II) 结果

[0213] (1) 每种单克隆抗体与游离左氧氟沙星的反应性

[0214] 如在图 3 中所示, 每种抗体表现出与游离左氧氟沙星的反应性。

[0215] (2) 与式 (I) 所示化合物的类似物、代谢物、S- 异构体 (左氧氟沙星)、R- 异构体、和外消旋体 (氧氟沙星) (S- 异构体和 R- 异构体的 1 : 1 混合物) 的交叉反应性

[0216] 表 1 显示每种抗体与所述类似物、左氧氟沙星代谢物、和氧氟沙星的交叉反应率。

[0217] 单克隆抗体 77201, 77202, 和 77204 表现出与莫西沙星的交叉反应性。单克隆抗体 77205, 77207, 和 77209 表现出与氟罗沙星的一些交叉反应性, 但是没有表现出与其它类似物的交叉反应性或仅有微弱的交叉反应性。

[0218] 单克隆抗体 77201, 77202, 77204, 77205, 和 77207 表现出与 S- 异构体和氧氟沙星的同等的交叉反应性。单克隆抗体 77206 表现出 50% 的与氧氟沙星的交叉反应性。因此, 发现单克隆抗体 77206 是与 S- 异构体强烈反应的抗体。单克隆抗体 77209 表现出 250% 的与氧氟沙星的交叉反应性 (即, 与左氧氟沙星相比较, 表现出与氧氟沙星的高交叉反应性)。因此, 发现单克隆抗体 77209 是与 R- 异构体强烈反应的抗体。

[0219] 每种抗体与左氧氟沙星代谢物和氧氟沙星的交叉反应性总结如下:

[0220] 77201, 77202, 77204, 77205, 和 77207 : 抗体 77201, 77202, 77204, 77205, 和 77207 与氧氟沙星反应, 但不与其 N- 氧化物代谢物和去甲基代谢物反应。抗体 77201, 77202, 77204, 77205, 和 77207 与式 (I) 所示化合物的 S- 异构体 (左氧氟沙星) 和 R- 异构体反应。

[0221] 77206 : 抗体 77206 与氧氟沙星反应, 但不与其 N- 氧化物代谢物和去甲基代谢物反

应。抗体 77206 与左氧氟沙星强烈反应。

[0222] 77209 :抗体 77209 与氧氟沙星反应,但不与其 N-氧化物代谢物和去甲基代谢物反应。抗体 77209 与氧氟沙星的 R- 异构体强烈反应。

[0223] [表 1]

[0224]

抗体号	类似物											代谢物		外消旋体
	左氧氟沙星	环丙沙星	托氟沙星	加替沙星	司帕沙星	氟罗沙星	洛美沙星	诺氟沙星	依诺沙星	莫西沙星	帕珠沙星	去甲基代谢物	N-氧化物代谢物	
77201	100	±	±			30	±	±	±	60		±		100
77202	100	±		±		25	±	±	±	71				100
77204	100	±				35	±	±	±	70				100
77205	100					33		1.1	1.3					100
77206	100					5						±		50
77207	100	±				20		±		5.7				100
77209	100	±				33		±	1	±				250

[0225] 空白列表示交叉反应率小于 0.1%,符号“±”表示交叉反应率为 0.1%以上且小于 1%。

[0226] 与典型的左氧氟沙星共用药物的交叉反应性小于 0.1%。因此,确定每种抗体不与典型的左氧氟沙星共用药物反应。

[0227] 实施例 3

[0228] 评估血清的影响 (竞争性 ELISA)

[0229] (I) 材料和方法

[0230] (1) 添加血清的影响

[0231] 进行与实施例 1(I) 中” (11) 使用本发明所述抗体评估血清对竞争性 ELISA 的影响”中所述的步骤相同的步骤,不同的是将步骤 (iv) 中的融合细胞培养物上清改变为单克隆抗体 (纯化的 IgG, 0.2 μg/mg)。以与实施例 1(I) (13) 中相同的方式量化每种抗体的反应性和交叉反应性。

[0232] (2) 当预先温育游离的左氧氟沙星和人血清时,血清的影响

[0233] 进行与实施例 1(I) 中” (12) 使用温育游离的左氧氟沙星和人血清制备的样品来评估血清对竞争性 ELISA 的影响”中所述的步骤相同的步骤,不同的是将融合细胞培养物上清改变为单克隆抗体 (纯化的 IgG, 0.2 μg/mg)。以与实施例 1(I) (13) 中相同的方式量化每种抗体的反应性和交叉反应性。

[0234] (II) 结果

[0235] (1) 添加血清的影响

[0236] 允许在竞争性 ELISA 反应体系中存在人血清,并且确定血清成分对抗体反应性的影响。由于添加了血清,游离的左氧氟沙星可以与血清中的蛋白结合,而形成结合的左氧氟沙星,从而可能影响抗体反应。然而,对于每种抗体,对照(没有添加血清)和添加血清的情形之间的反应性的差别小于 5%。

[0237] (2) 添加预先温育的游离的左氧氟沙星和人血清的影响

[0238] 将人血清试剂 b 用作竞争性 ELISA 的样品,所述人血清试剂 b 通过温育游离的氧氟沙星和血清以致游离的氧氟沙星转化为与血清蛋白结合的结合氧氟沙星而制备的。通过竞争性 ELISA 测定抗体的反应性。结果,在温育时间为 0 分钟时的反应性和温育时间为 15 或 60 分钟时的反应性之间的差别小于 5%。

[0239] 如由 (1) 和 (2) 的结果所清楚的,发现本发明所述的抗体在抗原-抗体反应过程中不受血清蛋白的影响。因此,本发明所述的抗体可以用来测量血液中的药物浓度。

[0240] 实施例 4

[0241] 使用本发明所述的抗体进行的样品中左氧氟沙星的免疫测定法

[0242] (I) 材料和方法

[0243] (1) 试剂制备

[0244] 将左氧氟沙星粉末溶解在纯水中(1mmol/l)以制备标准的左氧氟沙星溶液(标准溶液)。将该标准溶液分配在低温小瓶中,并且保存在 -80°C (冷冻)。

[0245] (2) 校正曲线

[0246] (i) 用 1% BSA-PBST 以 6 个步骤稀释所述标准溶液(0.0625-2 $\mu\text{mol/l}$)来制备标准样品。

[0247] (ii) 将标准样品以 25 μl /孔的体积分配在 ELISA 平板中。然后,将抗体 77206(纯化的 IgG,0.1 $\mu\text{g/ml}$,1% BSA-PBST)以 25 μl /孔的体积分配在 ELISA 平板中。允许该 ELISA 平板在室温下静置 1 小时。

[0248] 以在实施例 1(I) 中题目为“(8) 抗原固定的 ELISA”部分所述的步骤(ii)-(iv)相同的方式进行随后的步骤。

[0249] (3) 稀释线性检测

[0250] (i) 用人血清以适当的浓度稀释所述标准溶液,以制备 3 种类型的包含左氧氟沙星的人血清。

[0251] (ii) 用 1% BSA-PBST 以 11 的倍数稀释每种包含左氧氟沙星的人血清,然后以 2 倍稀释直至 704 倍来制备稀释线性检测样品。

[0252] (iii) 将所述稀释线性检测样品以 25 μl /孔的体积分配在 ELISA 平板中。然后,将抗体 77206(纯化的 IgG,0.1 $\mu\text{g/ml}$,1% BSA-PBST)以 25 μl /孔的体积分配在 ELISA 平板中。允许该 ELISA 平板在室温下静置 1 小时。

[0253] 以在实施例 1(I) 中题目为“(8) 抗原固定的 ELISA”部分所述的步骤(ii)-(iv)相同的方式进行随后的步骤。利用校正曲线将测量的吸光度转化为浓度,并且将血清稀释比例(x-轴)(例如,10 倍稀释表示为“10/100”)和浓度转换值(y-轴)绘制在图上。还计算浓度转换值和血清稀释比例之间的校正系数。

[0254] (4) 重复性检测

[0255] (i) 将所述标准溶液用 1% BSA-PBST 稀释至浓度为 30 $\mu\text{mol/l}$,10 $\mu\text{mol/l}$,或

6 $\mu\text{mol}/\text{l}$, 用血清以 11 的倍数稀释, 并且用 1% BSA-PBST 以 2 的倍数稀释, 来制备重复性检测样品 (样品 A, B, 和 C)。

[0256] (ii) 将重复性检测样品以 25 μl /孔的体积分配在 ELISA 平板中。然后, 将抗体 77206 (纯化的 IgG, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1% BSA-PBST) 以 25 μl /孔的体积分配在 ELISA 平板中。允许该 ELISA 平板在室温下静置 1 小时。

[0257] 以在实施例 1(I) 中题目为“(8) 抗原固定的 ELISA”部分所述的步骤 (ii)-(iv) 相同的方式进行随后的步骤。利用校正曲线将测量的吸光度转化为浓度。每份重复性检测样品测量 8 次, 并且计算平均值、标准偏差、和测量值的变化系数。

[0258] (5) 回收试验

[0259] (i) 将所述标准溶液用 1% BSA-PBST 以适当的浓度稀释, 用血清以 11 的倍数稀释, 并且用 1% BSA-PBST 以 2 的倍数进一步稀释, 以制备回收检测样品。

[0260] (ii) 将还原检测样品以 25 μl /孔的体积分配在 ELISA 平板中。然后, 将抗体 77206 (纯化的 IgG, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1% BSA-PBST) 以 25 μl /孔的体积分配在 ELISA 平板中。允许该 ELISA 平板在室温下静置 1 小时。

[0261] 以与在实施例 1(I) 中题目为“(8) 抗原固定的 ELISA”部分中所述的步骤 (ii)-(iv) 相同的方式进行随后的步骤。利用校正曲线将测量的吸光度转化为浓度, 并且将理论值 (x-轴) 和浓度转换值 (y-轴) 绘制在图中。还计算浓度转换值和理论值的回归直线和校正系数。

[0262] (II) 结果

[0263] (1) 校正曲线

[0264] 使用在 0.0625-2 $\mu\text{mol}/\text{l}$ 范围内的标准样品绘制校正曲线。校正曲线显示在上述范围之内极好的线性。因此证实本发明所述的测量方法可以用来定量确定样品中式 (I) 所示的化合物 (图 4)。

[0265] (2) 稀释减小检测

[0266] 三种稀释线性检测样品每一种的浓度转换值和血清稀释比例的校正系数为 0.99 以上。特别地, 获得极好的稀释线性 (图 5)。因此发现可以使用本发明所述的抗体获得不受来源于样品的血清成分影响的测量系统。

[0267] (3) 重复性检测

[0268] 三种重复性检测样品的每一种同时测量 8 次。每种样品的变化系数 (CV%) 小于 10%。特别地, 获得高重复性 (表 2)。

[0269] [表 2]

	LVFX(μ mol/L)		
	样品 A	样品 B	样品 C
1	1.36	0.52	0.29
2	1.58	0.49	0.33
3	1.40	0.53	0.31
4	1.54	0.50	0.32
[0270] 5	1.53	0.51	0.31
6	1.48	0.47	0.30
7	1.47	0.42	0.29
8	1.60	0.40	0.23
平均值	1.50	0.48	0.30
SD	0.08	0.05	0.03
CV(%)	5.5	9.6	9.8

[0271] (4) 测量具有已知浓度的样品

[0272] 回收检测样品的理论值和浓度转换值的回归直线为 $y = 1.078x + 0.021$ 。校正系数为 0.993(图 6)。因此证实使用本发明所述的抗体的测量方法可以精确测量生物样品中式(I)所示化合物的浓度。

[0273] 实施例 5

[0274] 当生物样品为唾液时，

[0275] (I) 材料和方法

[0276] (1) 制剂制备

[0277] 使用实施例 4(I)(1) 在制备的标准溶液。

[0278] (2) 竞争性 ELISA

[0279] (i) 使用 1% BSA-PBST 制备 10%，5%，或 2% 稀释的人唾液溶液。

[0280] (ii) 将所述标准溶液用每种稀释的人唾液溶液稀释至 $0.2 \mu\text{mol/l}$ 的浓度，以制备人唾液样品。不包含人唾液的样品(0%)用作对照。

[0281] (iii) 将人唾液样品以 $25 \mu\text{l}$ /孔的体积分配在 ELISA 平板中。

[0282] (iv) 将抗体 77201(纯化的 IgG, $0.2 \mu\text{g/ml}$, 1% BSA-PBST) 以 $25 \mu\text{l}$ /孔的体积分配在 ELISA 平板中。允许该 ELISA 平板在室温下静置 1 小时。

[0283] 以在实施例 1(I) 中题目为“(8) 抗原固定的 ELISA”部分所述的步骤(ii)-(iv)相同的方式进行随后的步骤。

[0284] (II) 结果

[0285] (1) 当生物样品为唾液时，

[0286] 样品中唾液浓度为 0% 时的反应性与样品中唾液浓度为 10%, 5%, 或 2% 时的反应性之间的差别小于 5%。特别地, 该测量不受唾液成分的影响 (图 7)。在唾液中包含抑制免疫反应体系的成分 (例如, 溶菌酶和糖胺聚糖), 并且游离抗原中的表位可能被所述唾液成分覆盖。然而, 证实使用本发明所述的抗体的测定法可以精确测量生物样品中式 (I) 所示化合物的浓度, 而不受唾液成分的影响。

[0287] 实施例 6

[0288] 评估血浆的影响 (竞争性 ELISA)

[0289] 检验与血清相比包含多种类型和大量的蛋白的血浆的影响。

[0290] (I) 材料和方法

[0291] (1) 制剂制备

[0292] 以与实施例 1(I) (9) 中相同的方式制备用于竞争性 ELISA 的每种化合物。

[0293] (2) 评估血浆对竞争性 ELISA 的影响

[0294] (i) 使用 1% BSA-PBST 制备 10% 的人血浆。

[0295] (ii) 使用 10% 的人血浆制备 0.4 $\mu\text{mol/l}$, 0.2 $\mu\text{mol/l}$, 或 0.01 $\mu\text{mol/l}$ 的左氧氟沙星 (“人血浆试剂 a”)。使用 1% BSA-PBST 制备 0.4 $\mu\text{mol/l}$, 0.2 $\mu\text{mol/l}$, 或 0.01 $\mu\text{mol/l}$ 的左氧氟沙星作为对照试剂。

[0296] (iii) 将所述人血浆试剂 a 或对照试剂以 25 μl /孔的体积分配在 ELISA 平板中。

[0297] (iv) 将抗体 77206 (纯化的 IgG, 0.2 $\mu\text{g/ml}$, 1% BSA-PBST) 分配在 ELISA 平板中。允许该 ELISA 平板在室温下静置 1 小时。

[0298] 以在实施例 1(I) 中题目为“(8) 抗原固定的 ELISA”部分所述的步骤 (ii)-(iv) 相同的方式进行随后的步骤。

[0299] (II) 结果

[0300] (1) 添加血浆的影响

[0301] 估计由于添加血浆, 游离的抗原结合血浆蛋白而形成结合的抗原, 以致抑制竞争性反应。然而, 对于每种抗体, 在对照 (不添加血浆) 和添加血浆的情形之间的反应性的差别小于 5% (图 8)。因此, 本发明所述的抗体可以用来测量血液中的药物浓度, 而在抗原-抗体反应过程中不受血浆蛋白的影响。

[0302] 比较实施例

[0303] (1) 制备常规抗体 (血浆成分的影响)

[0304] (I) 材料和方法

[0305] 部分修改了专利文献 2 中公开的方法。

[0306] (i) 将使用 0.1mol/l 碳酸盐缓冲液 (pH:9.5) 制备的浓度为 20 $\mu\text{g/ml}$ 的山羊抗-兔 IgG 以 100 μl /孔的体积分配在 96-孔平板中, 并且在室温下温育 2 小时以固定一级抗体。用洗涤剂 (0.05% 吐温 20, 50mmol/l Tris-HCl, pH:7.4) 洗涤平板三次。

[0307] (ii) 将包含 1% BSA 的 50mmol/l Tris-HCl 缓冲液 (pH:7.4) 以 300 μl /孔的体积添加在平板中, 然后在室温下温育 2 小时。然后, 用洗涤剂洗涤平板三次。

[0308] (iii) 然后, 将用包含 0.5% BSA 的 50mmol/l Tris-HCl 缓冲液 (EIA 缓冲液) 稀释至适当浓度的抗-左氧氟沙星兔抗血清添加至平板中, 然后在室温下温育 2 小时, 以使一级抗体捕获抗-左氧氟沙星兔抗血清中的抗-左氧氟沙星抗体。然后, 用洗涤剂洗涤平板

三次。

[0309] (iv) 向每孔添加 50 μ l 用 EIA 缓冲液以 50 的倍数稀释的碱性磷酸酶 - 标记的抗原, 和 50 μ l 用包含 10% 的人血浆的 EIA 缓冲液稀释的或用不包含人血浆的 EIA 缓冲液稀释的 10 μ g/ml 左氧氟沙星溶液, 然后在室温下温育 2 小时。

[0310] (v) 在用洗涤剂洗涤平板三次后, 加入 100 μ l 磷酸对 - 硝基苯酯溶液, 然后在室温下温育 30 分钟。通过加入 25 μ l 1.6mol/l 氢氧化钠溶液而终止反应。然后测量 405nm 处的吸光度。

[0311] (II) 结果

[0312] 其中加入血浆的样品的反应性约为其中不添加血浆的样品的反应性的两倍 (图 9)。认为这是由于游离的左氧氟沙星与血浆蛋白结合形成了结合的左氧氟沙星, 以使抗体不能识别左氧氟沙星中的表位 (即, 抑制了竞争性反应)。由于与抗原结合的标记的酶抑制了血浆蛋白和左氧氟沙星之间的结合, 所以抗原 - 抗体反应不受反应溶液中酶 - 标记的抗原的影响。

[0313] 实施例 7

[0314] 另一种竞争性 ELISA (一步竞争性 ELISA)

[0315] 在实施例 1(I) 中题目为“(8) 抗原固定的 ELISA”部分所述的竞争性 ELISA 可以通过下述方法进行, 其通过预先用 HRP 标记所述抗体而实现一步检测。

[0316] (I) 材料和方法

[0317] (1) 制备 HRP- 标记的抗体

[0318] (i) 将单克隆抗体 77201, 77202, 77204, 77205, 77206, 77207, 和 77209 在 4 $^{\circ}$ C 在 0.1mol/l 碳酸氢钠缓冲液 (pH:9.3) 中透析两天。在回收透析的溶液后, 测量 280nm 处的吸光度以验证抗体浓度。

[0319] (ii) 将 50mg HRP (“PEO-301”, 由 Toyobo 有限公司 (Toyobo Co., Ltd.) 供应) 溶解在 5ml 5mmol/l 乙酸盐缓冲液 (pH:4.5) 中。加入 21.5 μ l 高碘酸钠水溶液 (100mg/ml) 后, 允许该混合物在室温和避光条件下静置 30 分钟。

[0320] (iii) 使用 PD-10 柱 (安玛西亚生物科学 (Amersham Biosciences), 17-0851-01) (洗脱剂: 5mM 乙酸盐缓冲液 (pH:4.5)) 纯化该混合物以回收墨绿色的溶液级分。通过测量 280nm 处的吸光度确定溶液中包含的活化的 HRP 浓度。

[0321] (iv) 将在 (i) 中制备的抗体和在 (ii) 中制备的活化的 HRP 用 0.1mol/l 碳酸氢钠缓冲液 (pH:9.3) 稀释至浓度为 1mg/ml。混合 250 μ l 的每种溶液, 并且允许在室温和避光条件下静置 1 小时。

[0322] (v) 加入 10 μ l 硼氢化钠水溶液 (2mg/ml) 后, 允许该混合物在室温和避光条件下静置 15 分钟。

[0323] (vi) 加入 510 μ l 饱和的硫酸铵水溶液后, 允许该混合物在冰上和避光条件下静置 1 小时。

[0324] (vii) 将得到的溶液在 4 $^{\circ}$ C 以 10,000rpm 离心 10 分钟以获得抗体沉淀。

[0325] (viii) 将抗体沉淀溶解在 500 μ l PBS (pH:7.2) 中, 并且在 4 $^{\circ}$ C 在 PBS (pH:7.2) 中透析两天。

[0326] (ix) 回收透析的溶液后, 测量 280nm 处的吸光度, 以验证 HRP- 标记的抗体浓度。

[0327] (2) 一步竞争性 ELISA

[0328] (i) 以与实施例 1(I) 中题目为“(9) 制备用于竞争性 ELISA 的化合物溶液”部分相同的方式制备的每种左氧氟沙星溶液以 $25 \mu\text{l}$ /孔的体积分配在 ELISA 平板中。

[0329] (ii) 将通过用 1% BSA-PBST 以 70-3500 的倍数稀释在题目为“(1) 制备 HRP- 标记的抗体”部分中制备的 HRP- 标记的抗体而制备的抗体溶液以 $25 \mu\text{l}$ /孔的体积分配在 ELISA 平板中。允许该 ELISA 平板在室温下静置 1 小时。

[0330] 以与在实施例 1(I) 中题目为“(8) 抗原固定的 ELISA”部分中所述的步骤 (ii)-(iv) 相同的方式进行随后的步骤。

[0331] (II) 结果

[0332] 在一步竞争性 ELISA 反应体系中允许存在不与蛋白结合的游离的左氧氟沙星(与固定的抗原竞争)。结果,当使用每种 HRP- 标记的抗体时,HRP- 标记的抗体与固定抗原的反应性根据添加至反应体系中的左氧氟沙星的量而减少(图 10)。因此,认为本实施例中所所述的一步竞争性 ELISA 有效用作检测样品中式 (I) 所示化合物的免疫测定法。

[0333] 实施例 8

[0334] 胶乳凝集抑制免疫测定法(抗体-固定的胶乳)

[0335] 该实施例对应于“(20) 检测样品中式 (I) 所示的化合物的免疫测定法,其包括合成的多价抗原和样品中式 (I) 所示的化合物与固定在固相上的根据 (1)-(11) 中任一项所述的抗体竞争性反应”,和检测的胶乳凝集抑制免疫测定法(抗体-固定的胶乳)(即,颗粒凝集抑制免疫测定法)。

[0336] (I) 材料和方法

[0337] (1) 试剂制备

[0338] (i) 将通过以在实施例 1(I) 中题目为“(1) 制备免疫用抗原和筛选用抗原”部分所述的方法制备的 LVFX-BSA(结合比例:18)用 20mmol/l Tris 缓冲液(pH:7.0, 500mmol/l 氯化钠,1% BSA)稀释至浓度为 $1.0 \mu\text{g/ml}$ 以获得第一试剂。所述第一试剂包括(20)中所述的“固定在固相上的根据 (1)-(11) 中任一项所述的抗体”

[0339] (ii) 将 1.5ml 1%胶乳(由 Sekisui 化学有限公司(Sekisui Chemical Co.,Ltd.)供应,平均颗粒直径:200nm)混悬液添加至 1.5ml 20mmol/l 包含 0.8mg/ml 单克隆抗体 77209 的 Tris 缓冲液(pH:8.5)中,并将该混合物在 4°C 搅拌 2 小时。加入 3.0ml 20mmol/l 包含 0.1% BSA 的 Tris 缓冲液(pH:8.5)后,将该混合物在 4°C 搅拌 1 小时。将该混合物在 4°C 以 $13,000\text{rpm}$ 离心 35 分钟后,去除上清,并悬浮在等体积的 5mmol/l MOPS 缓冲液(pH:7.0,0.1% BSA)中。超声波分散(Nissei 超声发生器(Nissei Ultrasonic Generator))后,将得到的溶液在 50°C 加热 1 小时。冷却该溶液后,将该溶液用 5mmol/l MOPS 缓冲液(pH:7.0)稀释,以使 600nm 处的吸光度为 3Abs,从而获得第二试剂。

[0340] (iii) 以与在实施例 1(I) 中题目为“(9) 制备用于竞争性 ELISA 的化合物溶液”部分中相同的方式制备浓度为 $0.0 \mu\text{g/ml}$, $1.0 \mu\text{g/ml}$, $2.5 \mu\text{g/ml}$, $5.0 \mu\text{g/ml}$, $10 \mu\text{g/ml}$, 或 $20 \mu\text{g/ml}$ 的左氧氟沙星溶液。以与在实施例 1(I) 中题目为“(9) 制备用于竞争性 ELISA 的化合物溶液”部分中相同的方式制备浓度为 $0.0 \mu\text{g/ml}$, $10 \mu\text{g/ml}$, $25 \mu\text{g/ml}$, $50 \mu\text{g/ml}$, $100 \mu\text{g/ml}$, $150 \mu\text{g/ml}$, 或 $200 \mu\text{g/ml}$ 的浓缩左氧氟沙星标准溶液。将所述浓缩左氧氟沙星标准溶液用人血清、人血浆、或人唾液以 10 倍稀释来制备左氧氟沙星浓度为 $0.0 \mu\text{g/ml}$,

1.0 $\mu\text{g/ml}$, 2.5 $\mu\text{g/ml}$, 5.0 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 15 $\mu\text{g/ml}$, 或 20 $\mu\text{g/ml}$ 的包含左氧氟沙星的人血清、人血浆、或人唾液。

[0341] (2) 测量步骤

[0342] 使用 7170S 自动分析仪 (由日立有限公司 (Hitachi, Ltd.) 制备) 使每种左氧氟沙星溶液进行测量。具体地, 将 150 μl 第一试剂加入至 2.5 μl 的每种样品溶液中。将混合物在 37°C 加热 5 分钟。在加入 150 μl 第二试剂后, 在 37°C 测量在 19-34 个光度测定点的吸光度 (600nm) 改变。

[0343] (II) 结果

[0344] 使左氧氟沙星水溶液进行测量, 并且以对应于每种左氧氟沙星浓度的吸光度变化绘图 (图 11)。吸光度的降低取决于添加至反应体系中的左氧氟沙星的量。使用样条函数 (spline function) 绘制校正曲线。使每种浓度的包含左氧氟沙星的人血清或人血浆进行测量, 并且由校正曲线计算测量值。左氧氟沙星溶液浓度的理论值和测量值显示在测量范围内的良好的相关性 (图 12 和 13)。使包含左氧氟沙星的唾液进行测量, 且以对应于每种左氧氟沙星浓度的吸光度变化绘图。吸光度的减小取决于添加至反应体系中的左氧氟沙星的量 (图 14)。

[0345] 因此, 证实本实施例所述使用抗体 - 固定的胶乳的胶乳凝集抑制免疫测定法可以用来定量测定血清、血浆、或唾液样品中的式 (I) 所示的化合物。

[0346] 实施例 9

[0347] 胶乳凝集抑制免疫测定法 (抗原 - 固定的胶乳)

[0348] 本实施例对应于“ (21) 检测样品中式 (I) 所示的化合物的免疫测定法, 其包括使固定的合成多价抗原和样品中式 (I) 所示的化合物与根据 (1)-(11) 中任一项所述的抗体竞争性反应”, 和检测的胶乳凝集抑制免疫测定法 (抗原固定的胶乳) (即, 颗粒凝集抑制免疫测定法)。

[0349] (I) 材料和方法

[0350] (1) 试剂制备

[0351] (i) 将单克隆抗体 77206 用 5mmol/l MOPS 缓冲液 (pH:7.0) 稀释至浓度为 5.2mg/ml 以获得第一试剂。

[0352] (ii) 3.0ml 1% 胶乳 (由 Sekisui 化学有限公司 (Sekisui Chemical Co., Ltd.) 供应, 平均颗粒直径: 210nm) 混悬液添加至 3.0ml 10mmol/l 包含 20 $\mu\text{g/ml}$ 的 LVFX-BSA (结合比例: 3) 的柠檬酸盐 - 磷酸氢二钠缓冲液 (pH: 5.5, 0.8% BSA) 中, 所述 20 $\mu\text{g/ml}$ 的 LVFX-BSA 通过在实施例 1(I) 中题目为“ (1) 制备免疫用抗原和筛选用抗原”部分所述的方法制备。将混合物在 4°C 搅动 2 小时。将混合物在 4°C 以 13,000rpm 离心 30 分钟后, 去除上清, 并且混悬在等体积的 5mmol/l MOPS 缓冲液 (pH: 7.0, 0.1% BSA) 中。在超声分散后, 用 5mmol/l MOPS 缓冲液 (pH: 7.0) 稀释所得到的溶液, 以使在 280nm 处的吸光度为 1.1Abs 来获得第二试剂。所述第二试剂包括 (21) 中所述的“ (b) 通过将包含式 (I) 所示化合物的两分子以上的抗原 - 支持物合成物固定在固相上而获得合成的多价抗原”。

[0353] (iii) 以与在实施例 1(I) 中题目为“ (9) 制备用于竞争性 ELISA 的化合物溶液”部分中相同的方式制备浓度为 0.0 $\mu\text{g/ml}$, 5.0 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 或 20 $\mu\text{g/ml}$ 的左氧氟沙星溶液。

[0354] (2) 测量步骤

[0355] 使用 7170S 自动分析仪 (由日立有限公司 (Hitachi, Ltd.) 制备) 使每种左氧氟沙星溶液进行测量。具体地, 将 4 μ l 不同浓度的左氧氟沙星水溶液添加至 20 μ l 的每种第一试剂中。将混合物在 37°C 加热 5 分钟。在加入 180 μ l 第二试剂后, 在 37°C 测量在 19-34 个光度测定点的吸光度 (700nm) 改变。

[0356] (II) 结果

[0357] 使左氧氟沙星水溶液进行测量, 并且以对应于每种左氧氟沙星浓度的吸光度变化绘图。图的近似表达式在测量范围内具有极佳的线性。因此证实了本发明所述的测量方法可以用于定量确定样品中的式 (I) 所示的化合物 (图 15)。

[0358] 实施例 10

[0359] 胶乳凝集抑制免疫测定法中的合成的多价抗原 (抗体-固定的胶乳) (结合比例)

[0360] 本实施例讨论“(20) 检测样品中式 (I) 所示的化合物的免疫测定法, 其包括使合成的多价抗原和样品中式 (I) 所示的化合物与固定在固相上的根据 (I)-(11) 中任一项所述的抗体竞争性反应”中的“合成的多价抗原”的氧氟沙星结合比例。

[0361] (I) 材料和方法

[0362] (1) 试剂制备

[0363] 使用浓度为 2.2, 5.4, 8.7, 11.9, 15.2, 18.4, 或 21.7mg/2ml 的溶液作为在实施例 1(I) 中题目为“(1) 制备免疫用抗原和筛选用抗原”部分所述的方法中的左氧氟沙星溶液, 进行与 BSA 的偶联反应。通过实施例 1(I) (1) (v) 的吸光度测量确定得到的偶联产物的 LVFX-BSA 结合比例。

[0364] (2) 测量步骤

[0365] 将每种 LVFX-BSA 用作合成的多价抗原。以与在实施例 1(I) 中题目为“(9) 制备用于竞争性 ELISA 的化合物溶液”部分相同的方式制备的浓度为 0.0 μ g/ml 或 16.0 μ g/ml 的左氧氟沙星水溶液, 按照实施例 8 中“(I) 胶乳凝集抑制免疫测定法 (抗体-固定的胶乳)”所述的方法进行测量。计算在左氧氟沙星浓度为 0.0 μ g/ml 和 16.0 μ g/ml 情形之间的吸光度差别。在图上绘制左氧氟沙星浓度和结合比例。

[0366] (II) 结果

[0367] 所得到的偶联产物的结合比例以 2.2 \rightarrow 3.9, 5.4 \rightarrow 5.0, 8.7 \rightarrow 6.2, 11.9 \rightarrow 8.1, 15.2 \rightarrow 10.2, 18.4 \rightarrow 13.0, 和 21.7 \rightarrow 16.7 (左氧氟沙星溶液浓度 (mg/ml) \rightarrow 结合比例) 表示。因此, 证实了 LVFX-BSA 结合比例根据与一分子 BSA 载体反应的 LVFX 的量而增加 (图 16)。

[0368] 计算在左氧氟沙星浓度为 0.0 μ g/ml 和 16.0 μ g/ml 情形之间的吸光度差别。在图上绘制吸光度差别和结合比例。吸光度差别随 LVFX-BSA 结合比例增加而增加。当使用胶乳凝集抑制免疫测定法时, 样品中的抗原可以随着样品中不存在所述抗原 (浓度:0) 时的吸光度和样品中存在所述抗原时的吸光度之间的差别增加而以更高灵敏度检测。在该实施例所用的条件下, 在结合比例为 8-15 时, 获得良好的灵敏性, 并且当结合比例为 15 以上时, 获得极好的灵敏性 (图 17)。

[0369] 工业适用性

[0370] 本发明涉及针对氧氟沙星的抗体, 和生产其的方法。本发明还涉及使用所述抗体

的免疫测定法（例如，放射免疫测定法，酶免疫测定法，或颗粒凝集抑制免疫测定法）。按照本发明，可以在临床地点快速而精确地测量体内存在的氧氟沙星（即，强抗生素）的量。

[0371] <对保藏的生物材料的说明>

[0372] (1) 抗体号 :77201

[0373] (a) 进行所述保藏的保藏机构的名称和地址

[0374] 国际专利生物体保藏单位, 国家高等工业科学技术研究所 (The International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

[0375] AIST 筑波中心 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 日本 (邮编 : 305-8566)

[0376] (b) (a) 中指定的机构的生物材料保藏日期

[0377] 2007 年 9 月 11 日 (最初保藏日期)

[0378] 2008 年 9 月 5 日 (国际保藏机构收到转送的样品的日期)

[0379] (c) (a) 中指定的机构对保藏物提供的登记号

[0380] FERM BP-11010

[0381] (2) 抗体号 :77202

[0382] (a) 进行所述保藏的保藏机构的名称和地址

[0383] 国际专利生物体保藏单位, 国家高等工业科学技术研究所 (The International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

[0384] AIST 筑波中心 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 日本 (邮编 : 305-8566)

[0385] (b) (a) 中指定的机构的生物材料保藏日期

[0386] 2007 年 9 月 11 日 (最初保藏日期)

[0387] 2008 年 9 月 5 日 (国际保藏机构收到转送的样品的日期)

[0388] (c) (a) 中指定的机构对保藏物提供的登记号

[0389] FERM BP-11011

[0390] (3) 抗体号 :77204

[0391] (a) 进行所述保藏的保藏机构的名称和地址

[0392] 国际专利生物体保藏单位, 国家高等工业科学技术研究所 (The International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

[0393] AIST 筑波中心 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 日本 (邮编 : 305-8566)

[0394] (b) (a) 中指定的机构的生物材料保藏日期

[0395] 2007 年 9 月 11 日 (最初保藏日期)

[0396] 2008 年 9 月 5 日 (国际保藏机构收到转送的样品的日期)

[0397] (c) (a) 中指定的机构对保藏物提供的登记号

[0398] FERM BP-11012

- [0399] (4) 抗体号 :77205
- [0400] (a) 进行所述保藏的保藏机构的名称和地址
- [0401] 国际专利生物体保藏单位, 国家高等工业科学技术研究所 (The International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)
- [0402] AIST 筑波中心 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 日本 (邮编 : 305-8566)
- [0403] (b) (a) 中指定的机构的生物材料保藏日期
- [0404] 2007 年 9 月 11 日 (最初保藏日期)
- [0405] 2008 年 9 月 5 日 (国际保藏机构收到转送的样品的日期)
- [0406] (c) (a) 中指定的机构对保藏物提供的登记号
- [0407] FERM BP-11013
- [0408] (5) 抗体号 :77206
- [0409] (a) 进行所述保藏的保藏机构的名称和地址
- [0410] 国际专利生物体保藏单位, 国家高等工业科学技术研究所 (The International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)
- [0411] AIST 筑波中心 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 日本 (邮编 : 305-8566)
- [0412] (b) (a) 中指定的机构的生物材料保藏日期
- [0413] 2007 年 9 月 11 日 (最初保藏日期)
- [0414] 2008 年 9 月 5 日 (国际保藏机构收到转送的样品的日期)
- [0415] (c) (a) 中指定的机构对保藏物提供的登记号
- [0416] FERM BP-11014
- [0417] (6) 抗体号 :77207
- [0418] (a) 进行所述保藏的保藏机构的名称和地址
- [0419] 国际专利生物体保藏单位, 国家高等工业科学技术研究所 (The International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)
- [0420] AIST 筑波中心 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 日本 (邮编 : 305-8566)
- [0421] (b) (a) 中指定的机构的生物材料保藏日期
- [0422] 2007 年 9 月 11 日 (最初保藏日期)
- [0423] 2008 年 9 月 5 日 (国际保藏机构收到转送的样品的日期)
- [0424] (c) (a) 中指定的机构对保藏物提供的登记号
- [0425] FERM BP-11015
- [0426] (7) 抗体号 :77209
- [0427] (a) 进行所述保藏的保藏机构的名称和地址
- [0428] 国际专利生物体保藏单位, 国家高等工业科学技术研究所 (The International

Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

[0429] AIST 筑波中心 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 日本 (邮编: 305-8566)

[0430] (b) (a) 中指定的机构的生物材料保藏日期

[0431] 2007 年 9 月 11 日 (最初保藏日期)

[0432] 2008 年 9 月 5 日 (国际保藏机构收到转送的样品的日期)

[0433] (c) (a) 中指定的机构对保藏物提供的登记号

[0434] FERM BP-11016

[0435] 附图简述

[0436] 图 1 显示通过抗原 - 固定的 ELISA 确定的小鼠抗血清中抗体滴度的测量结果。

[0437] 图 2 显示通过使用固定的抗原的竞争性 ELISA, 在小鼠抗血清中确定在游离左氧氟沙星的量和抗体反应性 (Abs.) 之间的关系的测量结果。

[0438] 图 3 显示通过使用固定的抗原的竞争性 ELISA 确定的在游离的左氧氟沙星和每种单克隆抗体的反应性 (交叉反应性) 之间的关系的测量结果。

[0439] 图 4 显示使用标准溶液通过竞争性 ELISA 确定的校正曲线。

[0440] 图 5 显示在每种血清浓度下的稀释线性的结果。

[0441] 图 6 显示使用具有已知浓度的样品通过竞争性 ELISA 确定的测量值和理论值之间的相关性。

[0442] 图 7 显示添加唾液对竞争性 ELISA 测量系统的影响。

[0443] 图 8 显示添加血浆对竞争性 ELISA 测量系统的影响。

[0444] 图 9 显示添加血浆对使用常规抗体的竞争性 ELISA 测量系统的影响。

[0445] 图 10 显示使用标准溶液通过一步竞争性 ELISA 确定的校正曲线。

[0446] 图 11 显示使用标准溶液通过胶乳凝集抑制免疫测定法 (抗体 - 固定的胶乳) 确定的校正曲线。

[0447] 图 12 显示使用具有已知浓度的包含左氧氟沙星的人血清通过胶乳凝集抑制免疫测定法 (抗体 - 固定的胶乳) 确定的测量值和理论值之间的相关性。

[0448] 图 13 显示使用具有已知浓度的包含左氧氟沙星的人血浆通过胶乳凝集抑制免疫测定法 (抗体 - 固定的胶乳) 确定的测量值和理论值之间的相关性。

[0449] 图 14 显示在具有已知浓度的包含左氧氟沙星的唾液中的左氧氟沙星浓度和通过胶乳凝集抑制免疫测定法 (抗体 - 固定的胶乳) 确定的吸光度变化之间的相关性。

[0450] 图 15 显示使用标准溶液通过胶乳凝集抑制免疫测定法 (抗原 - 固定的胶乳) 确定的校正曲线。

[0451] 图 16 显示在使用 BSA 作为载体制备合成的多价抗原时在作为原材料的左氧氟沙星的量和 BSA 结合比例之间的相关性。

[0452] 图 17 显示通过胶乳凝集抑制免疫测定法 (抗体 - 固定的胶乳) 确定的在左氧氟沙星 - BSA 结合比例和当样品中左氧氟沙星浓度为 $0.0 \mu\text{g/ml}$ 和 $16 \mu\text{g/ml}$ 时的吸光度差异之间的相关性。

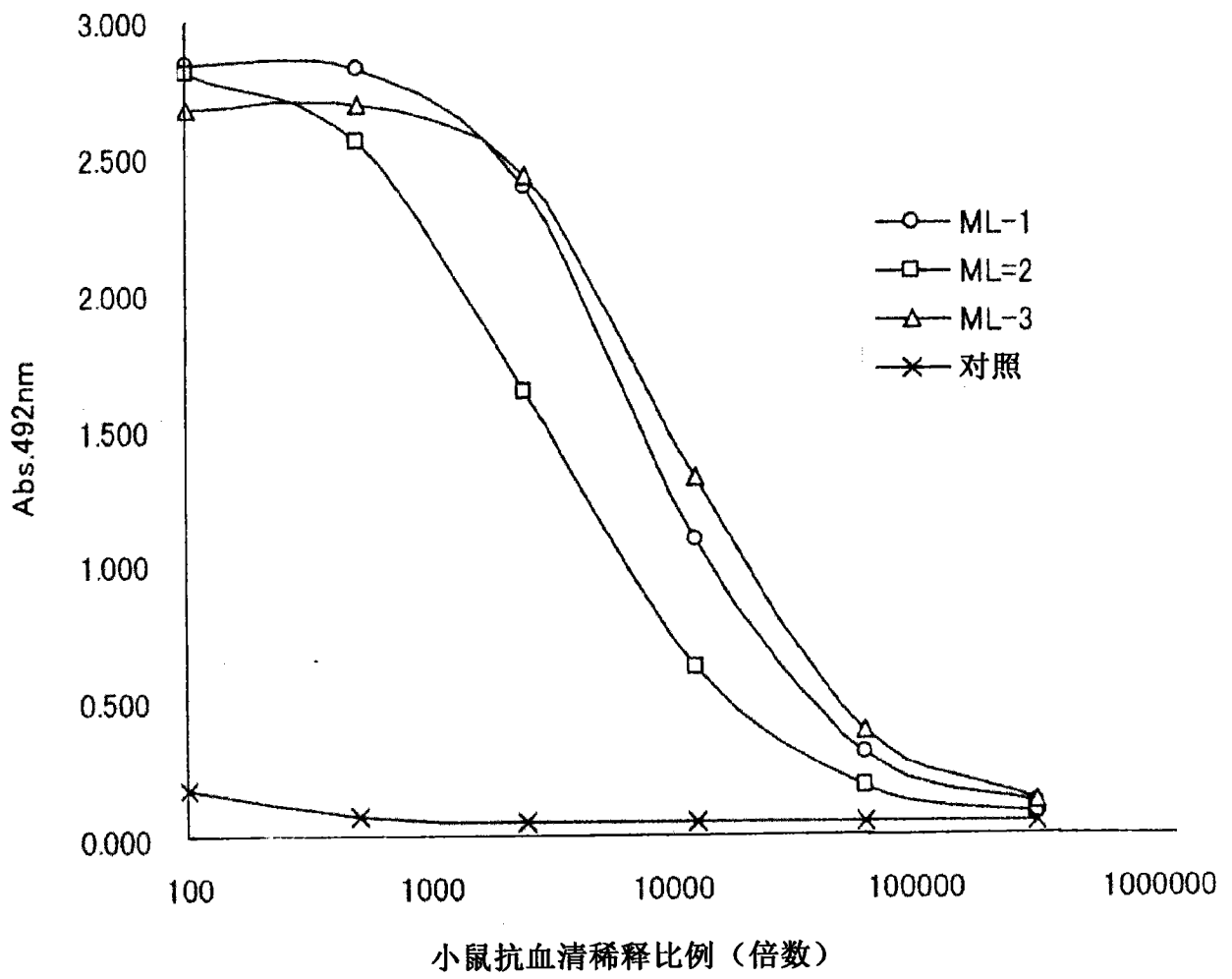


图 1

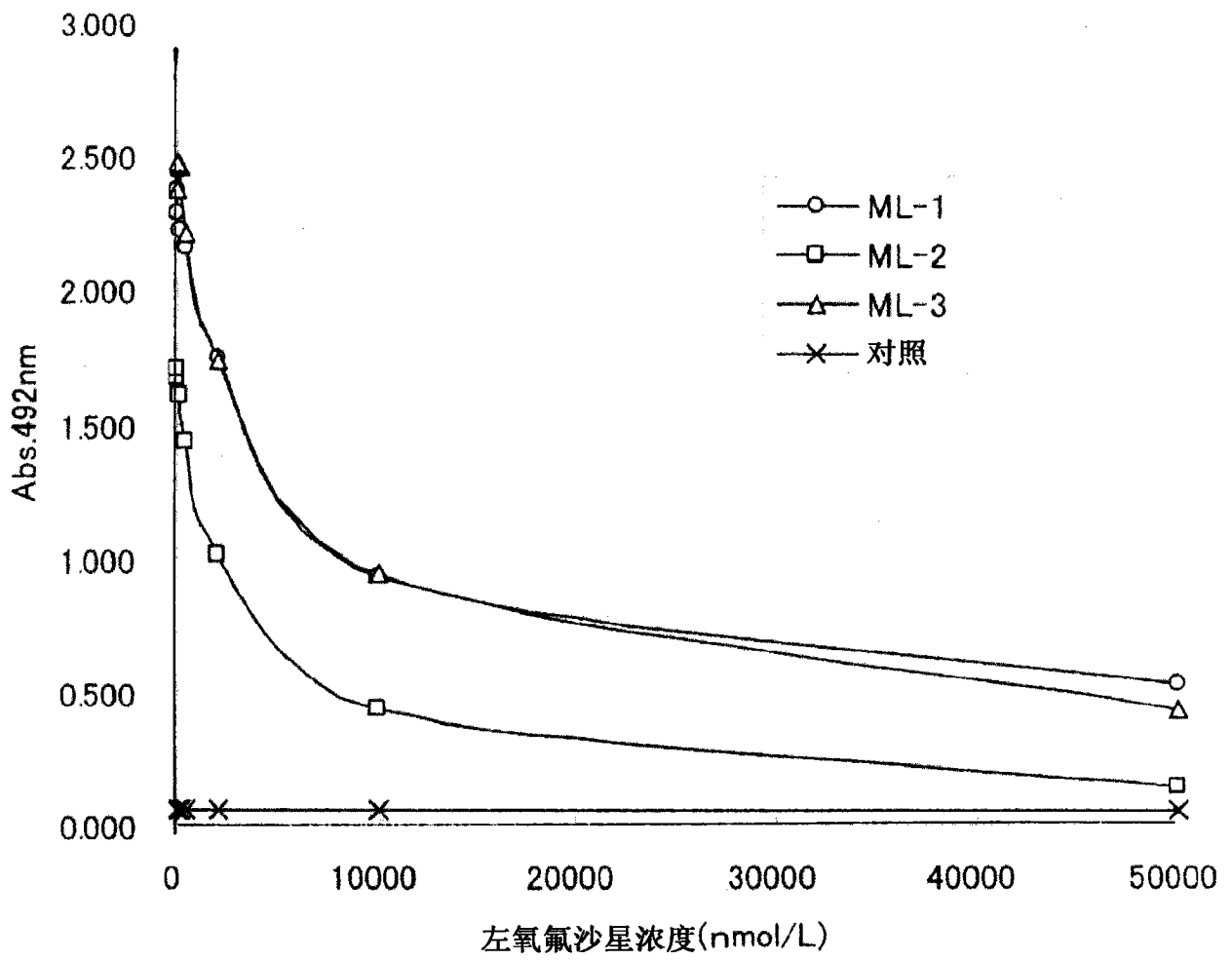


图 2

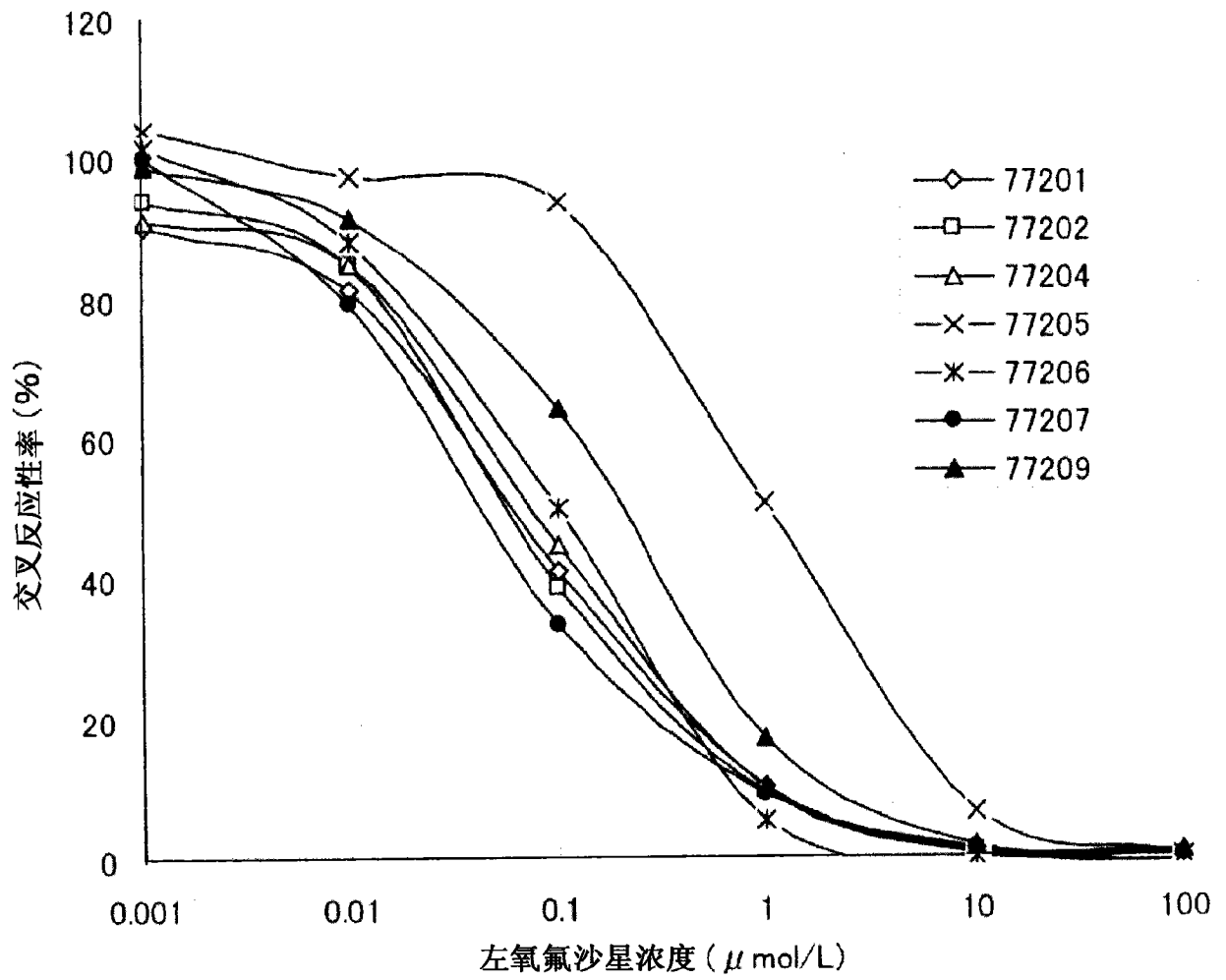


图 3

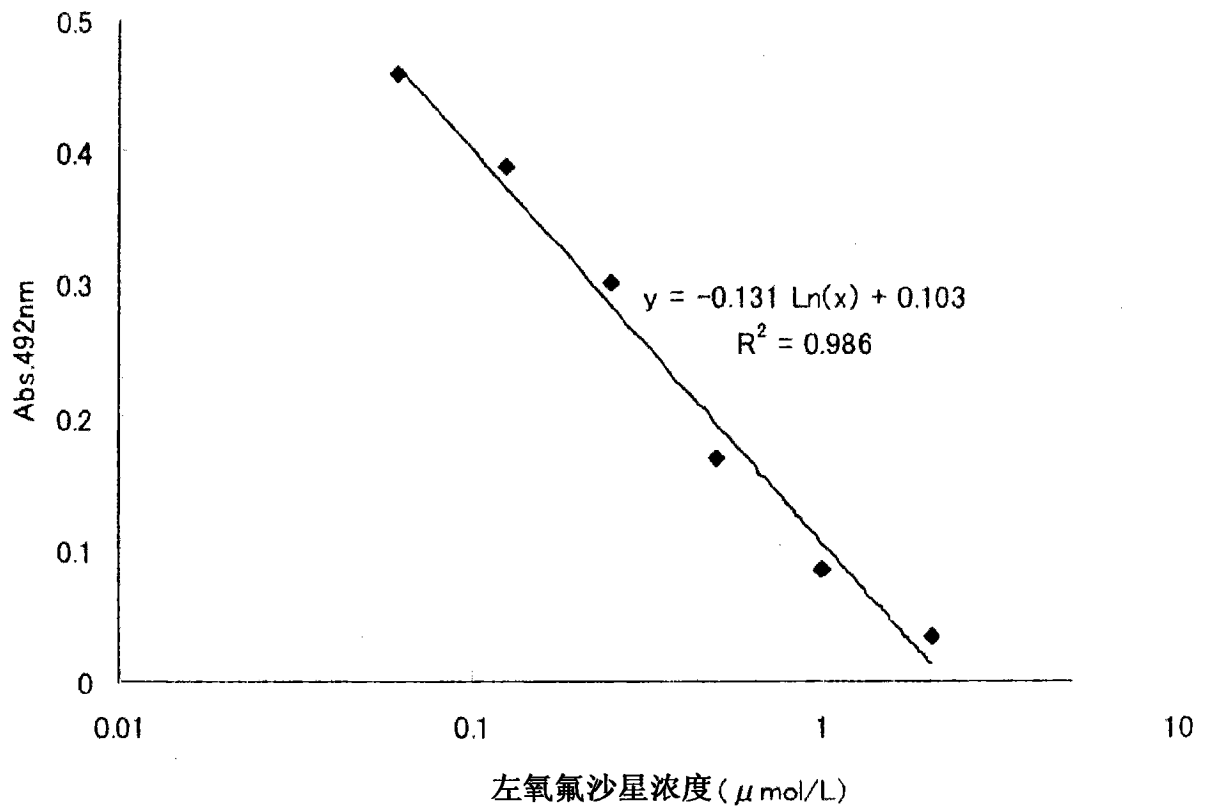


图 4

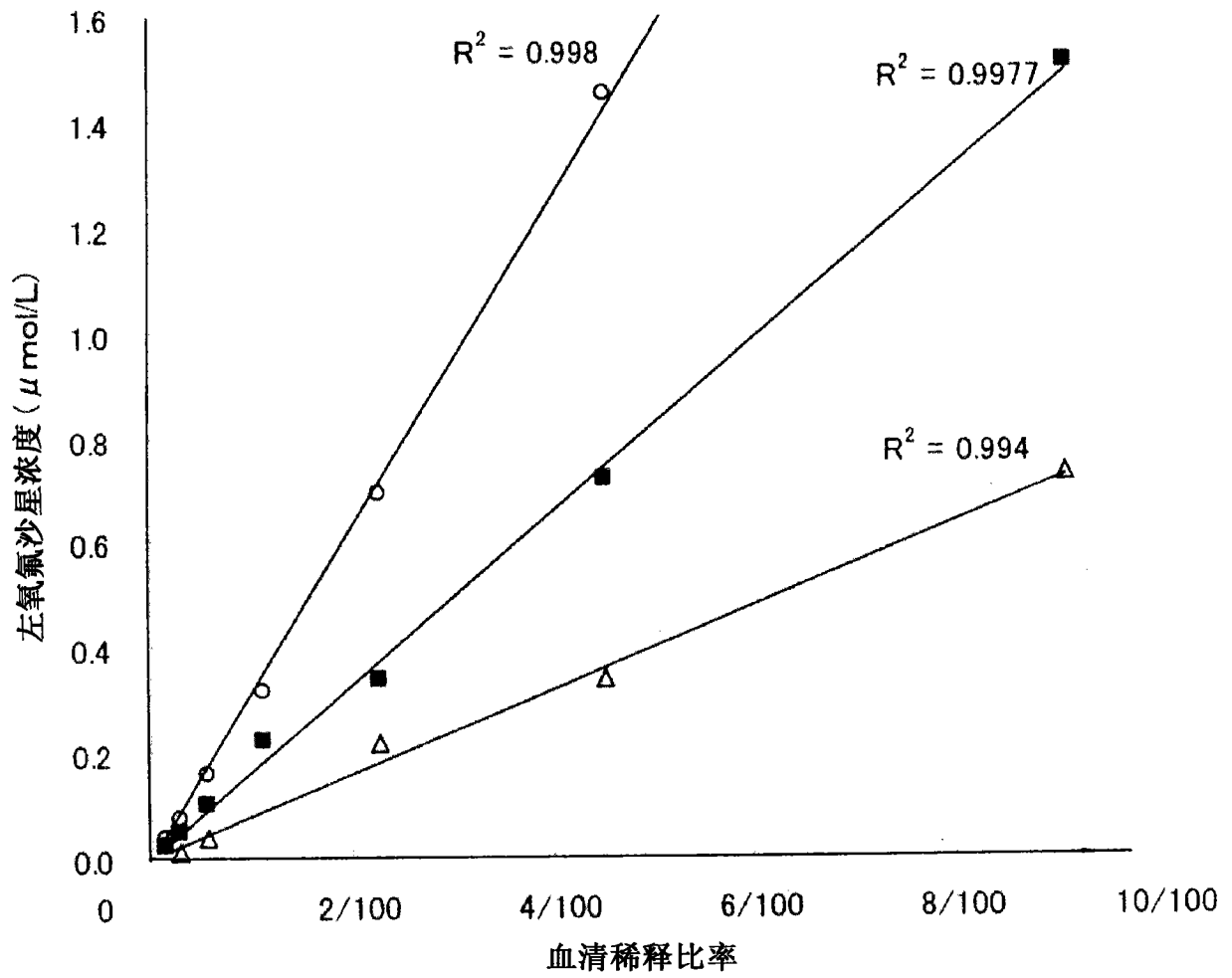


图 5

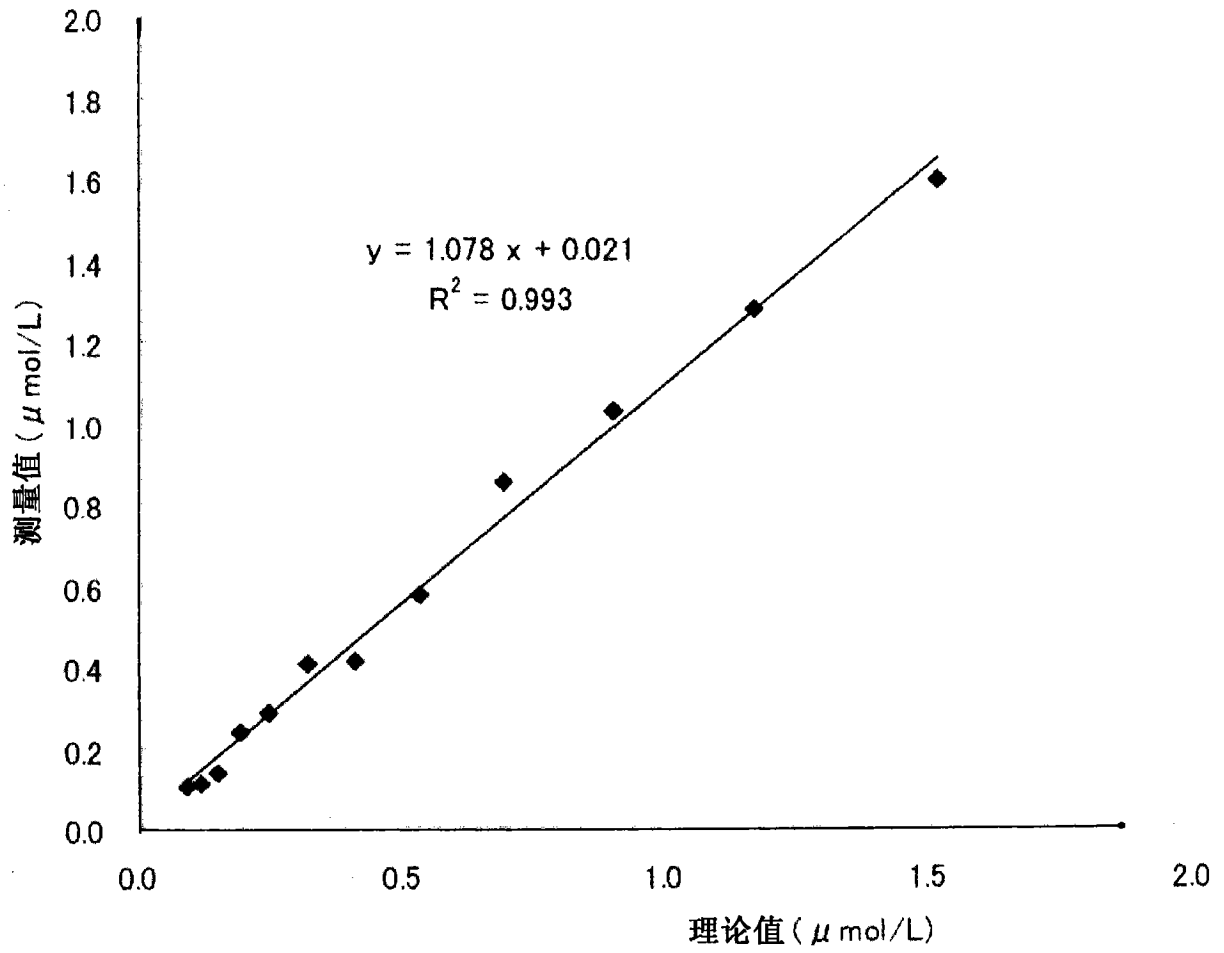


图 6

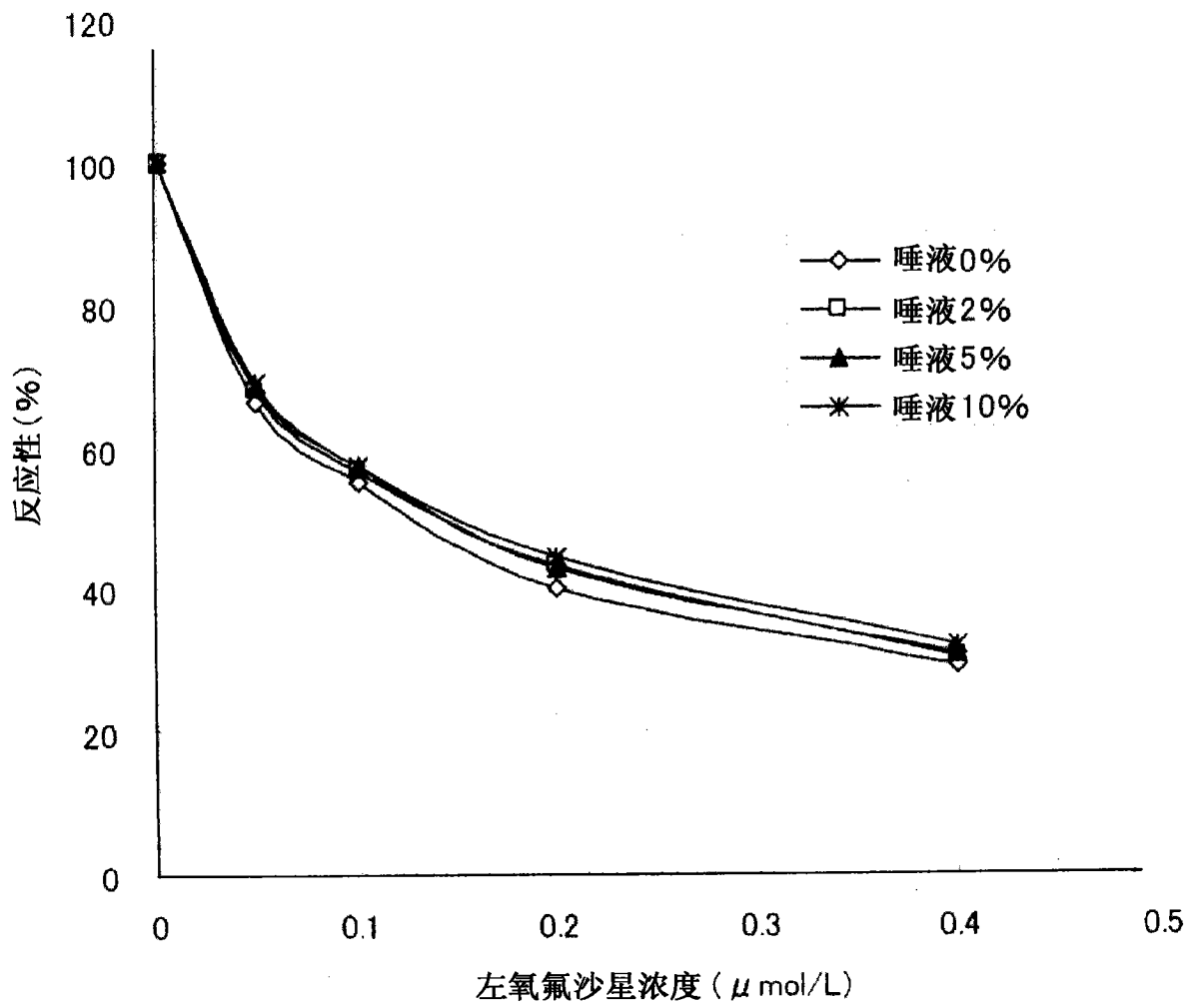


图 7

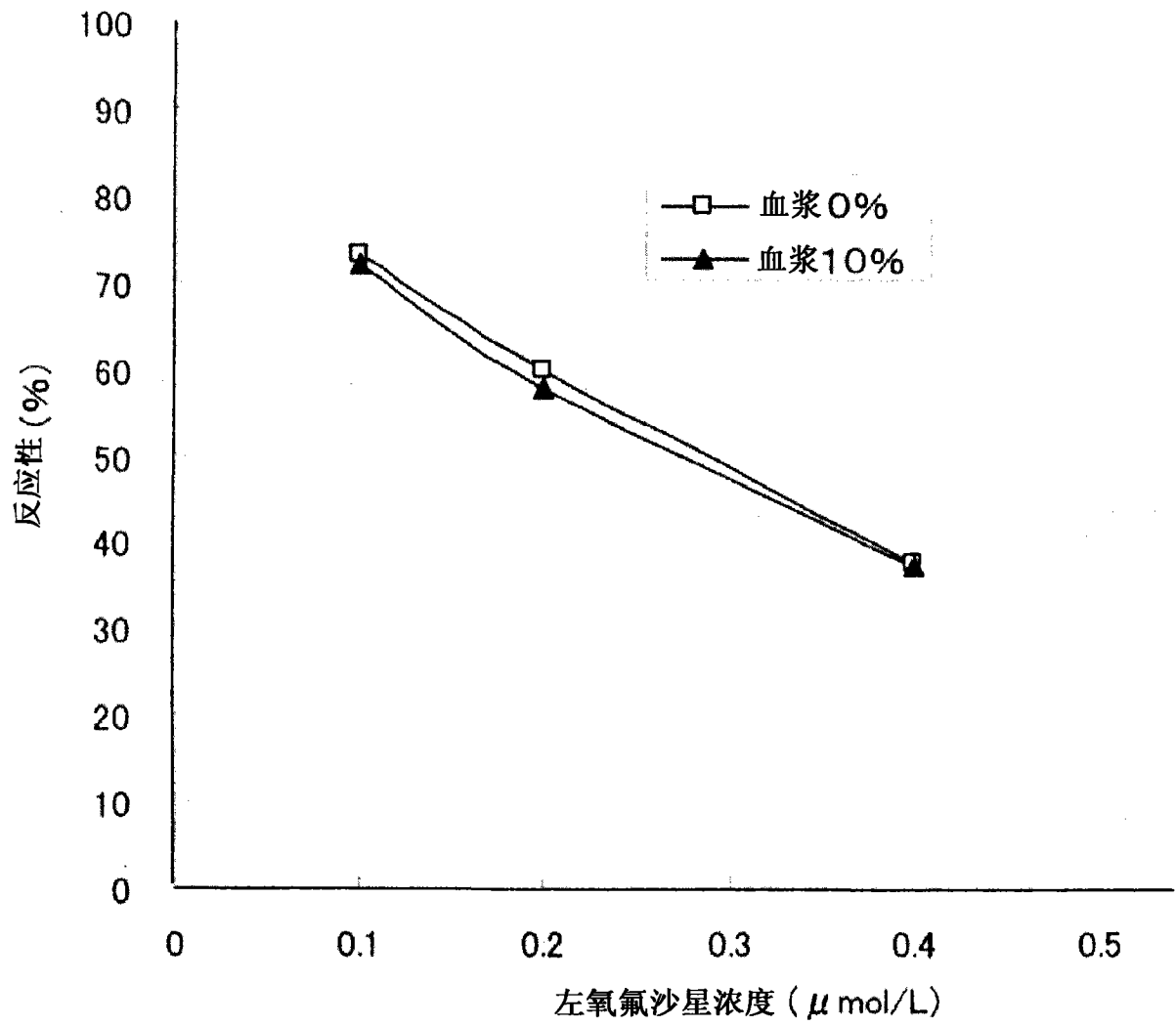


图 8

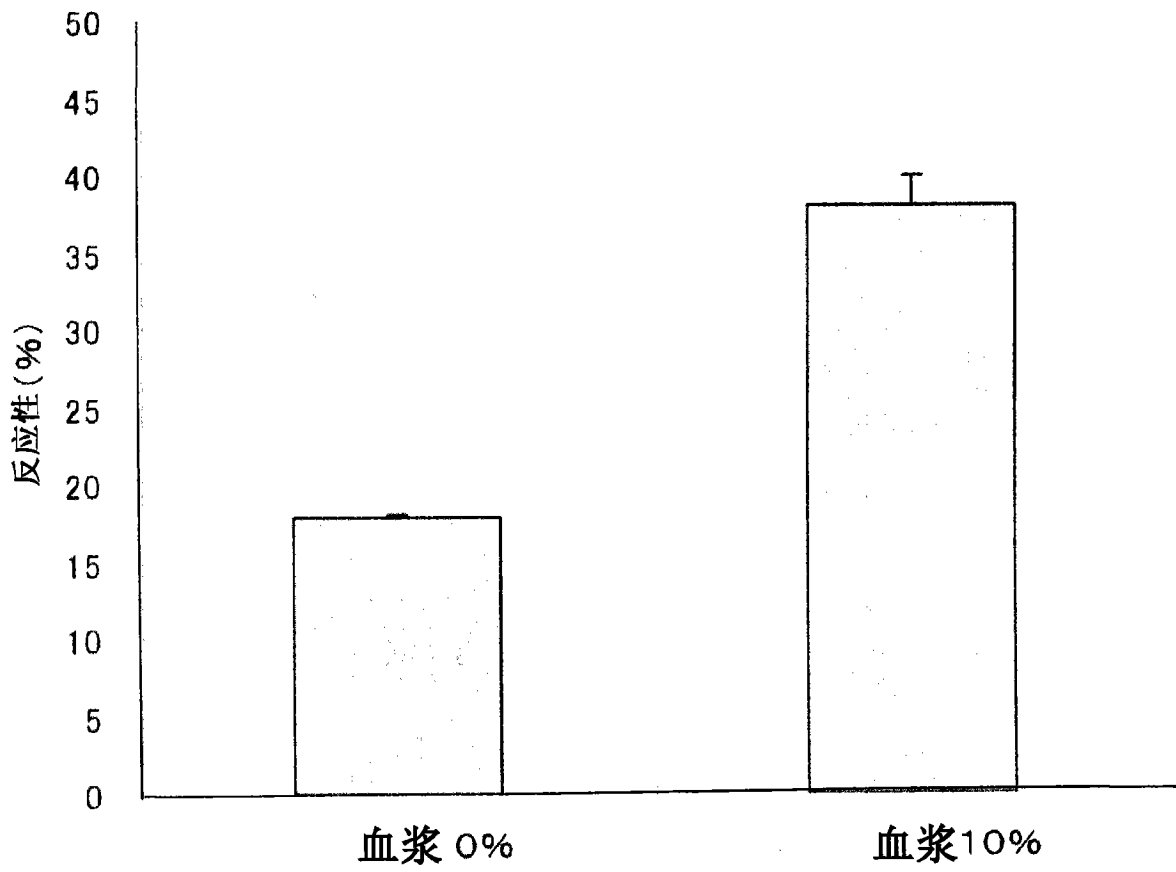


图 9

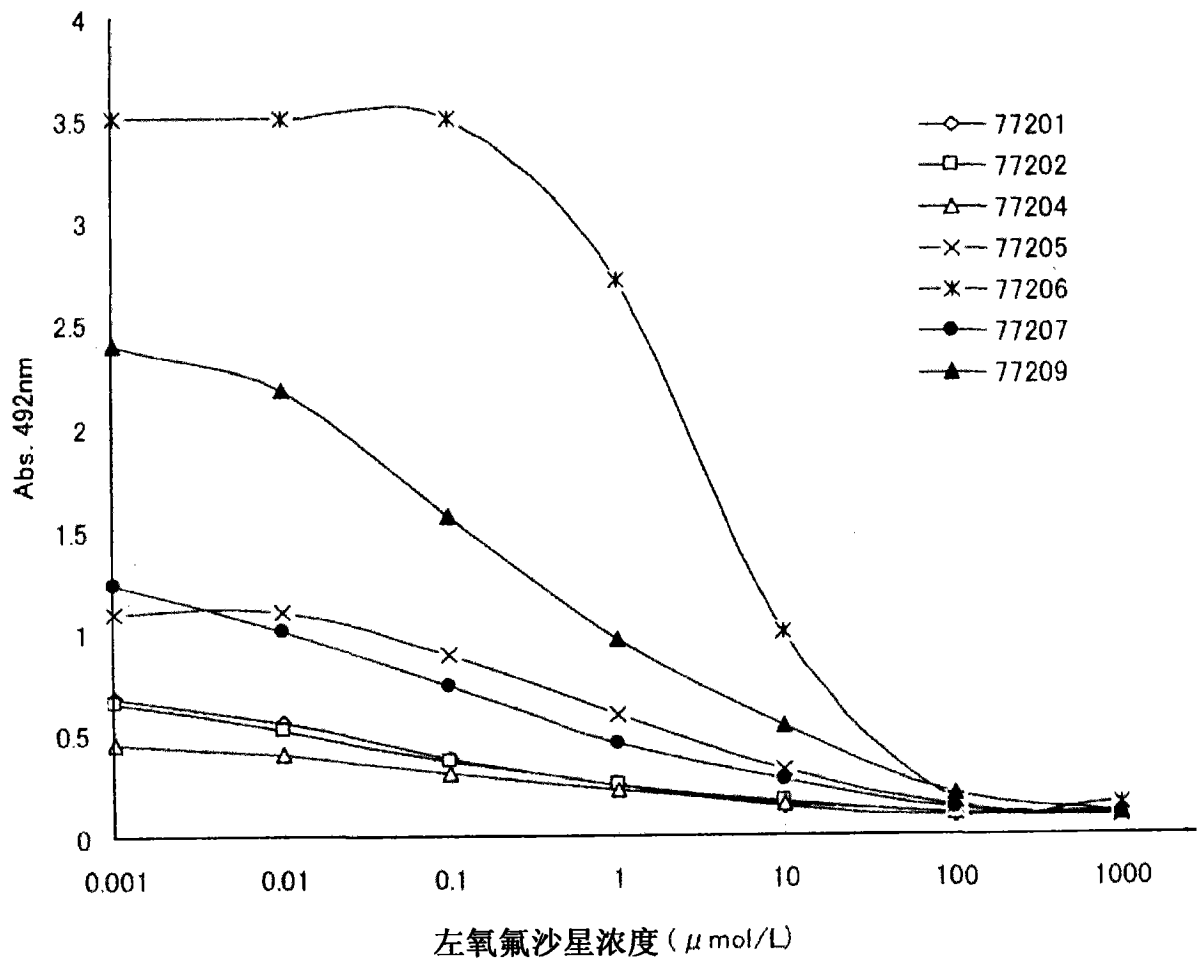


图 10

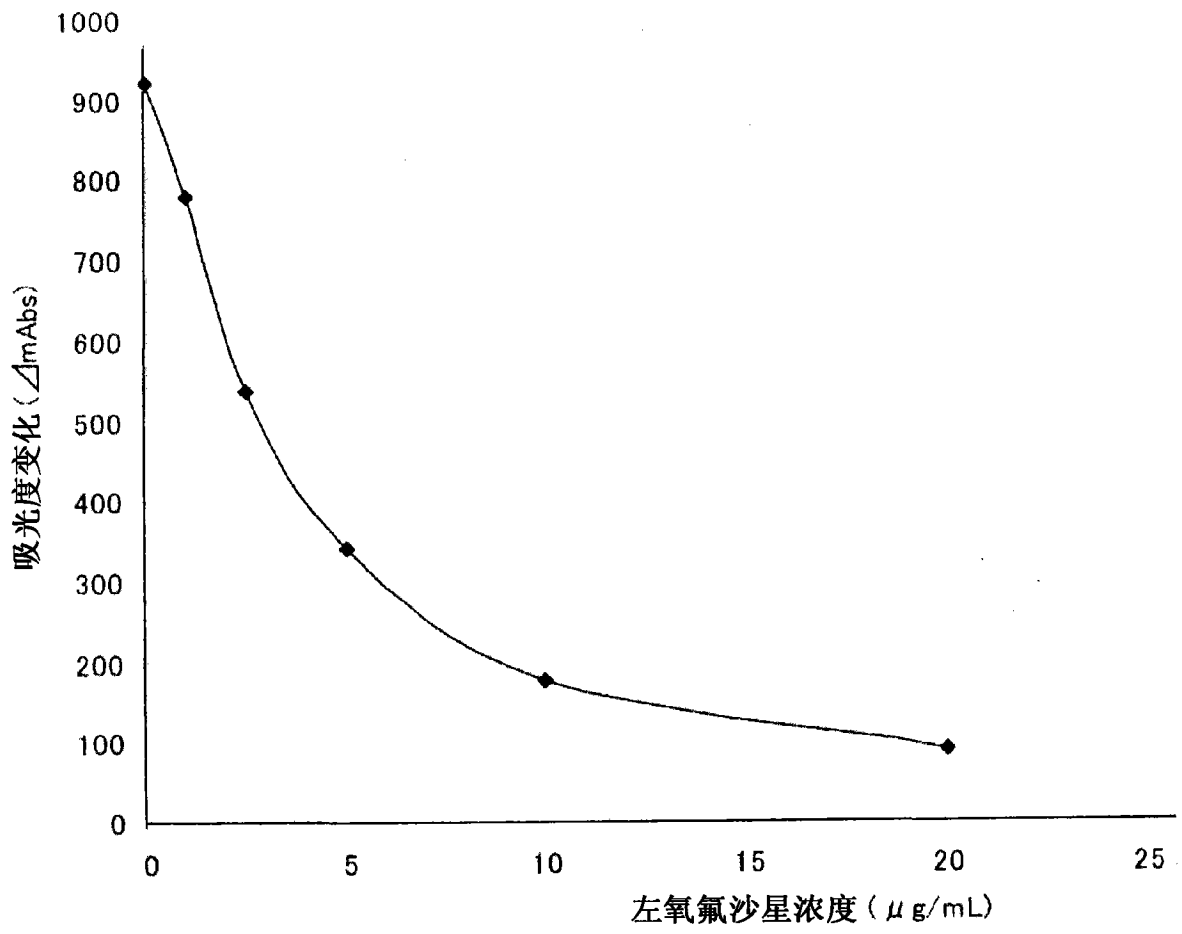


图 11

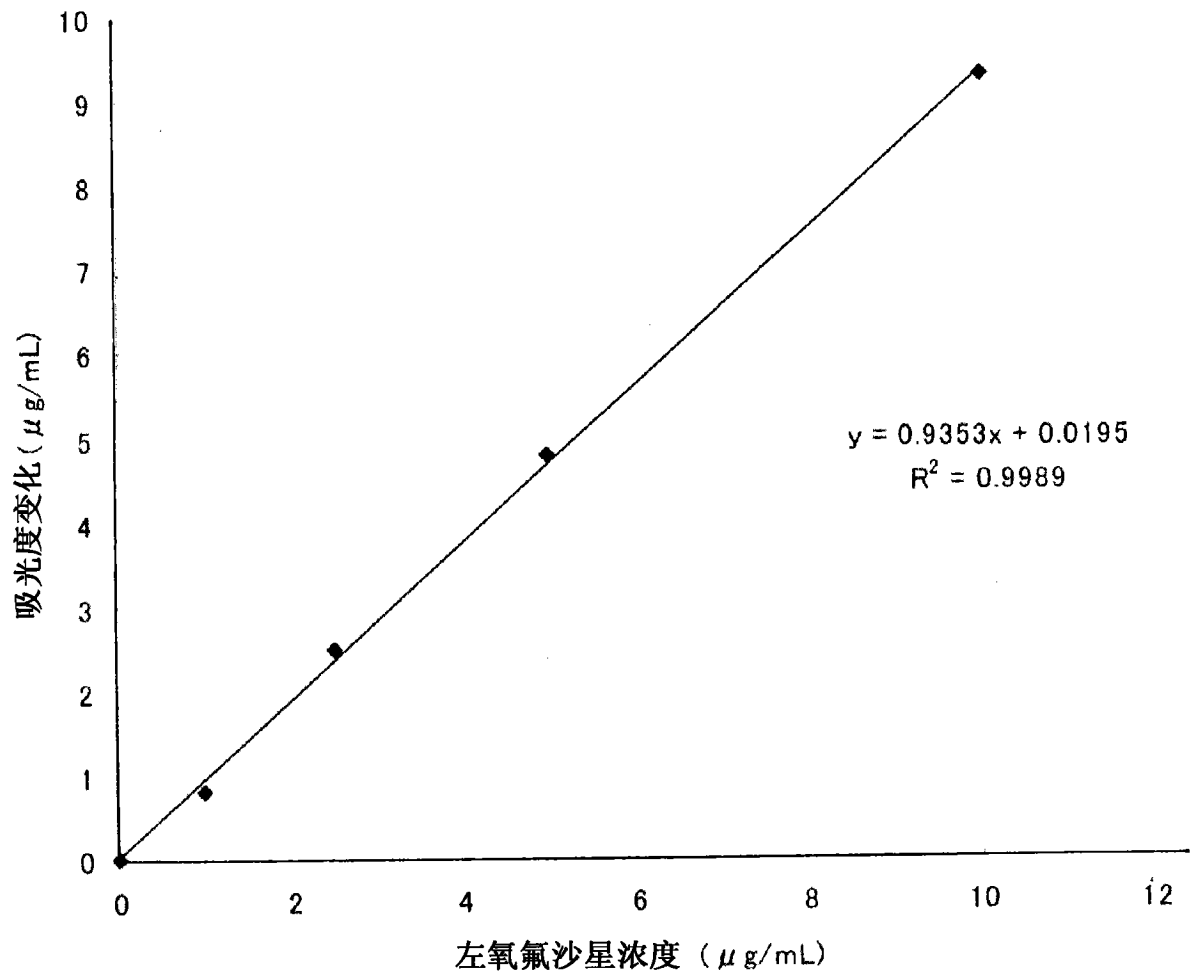


图 12

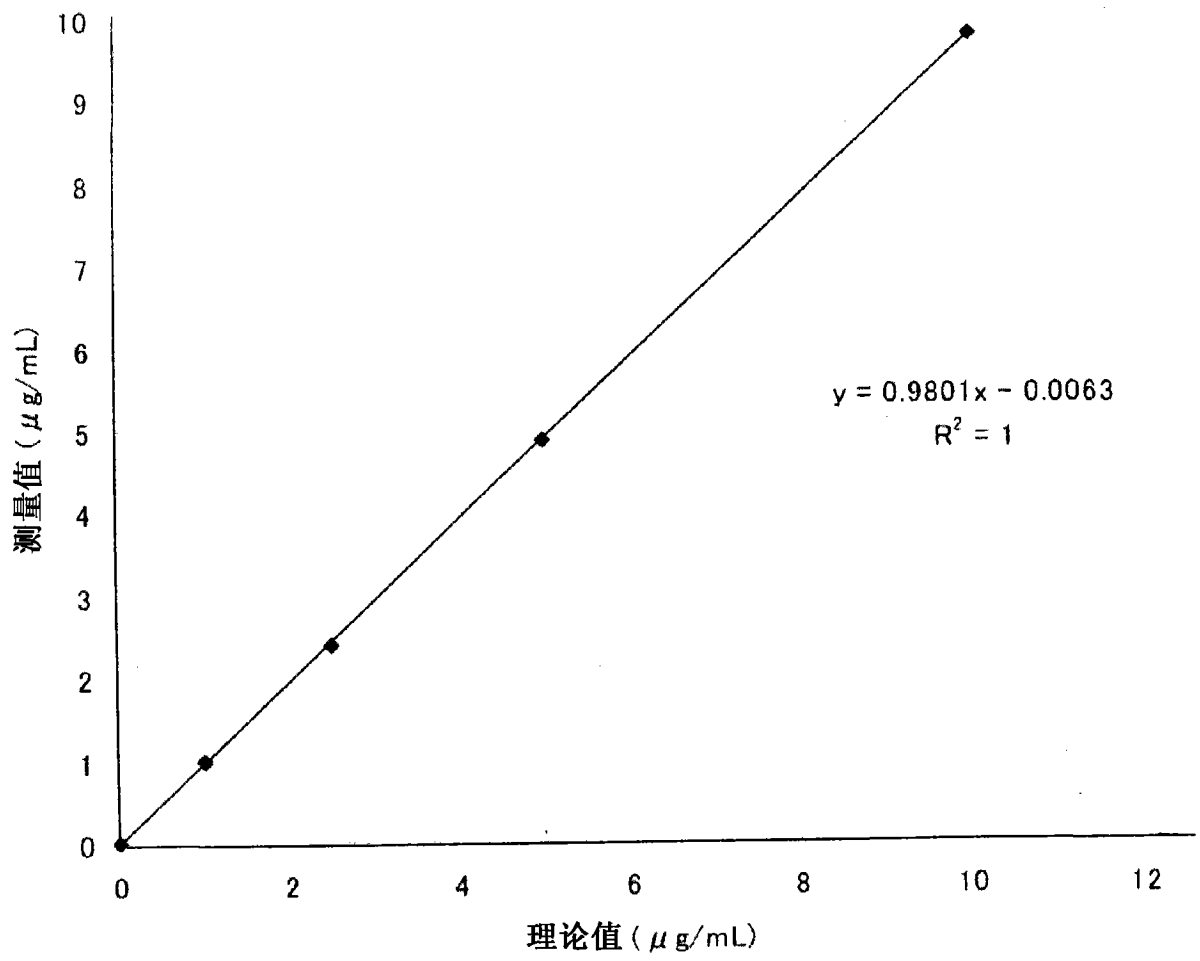


图 13

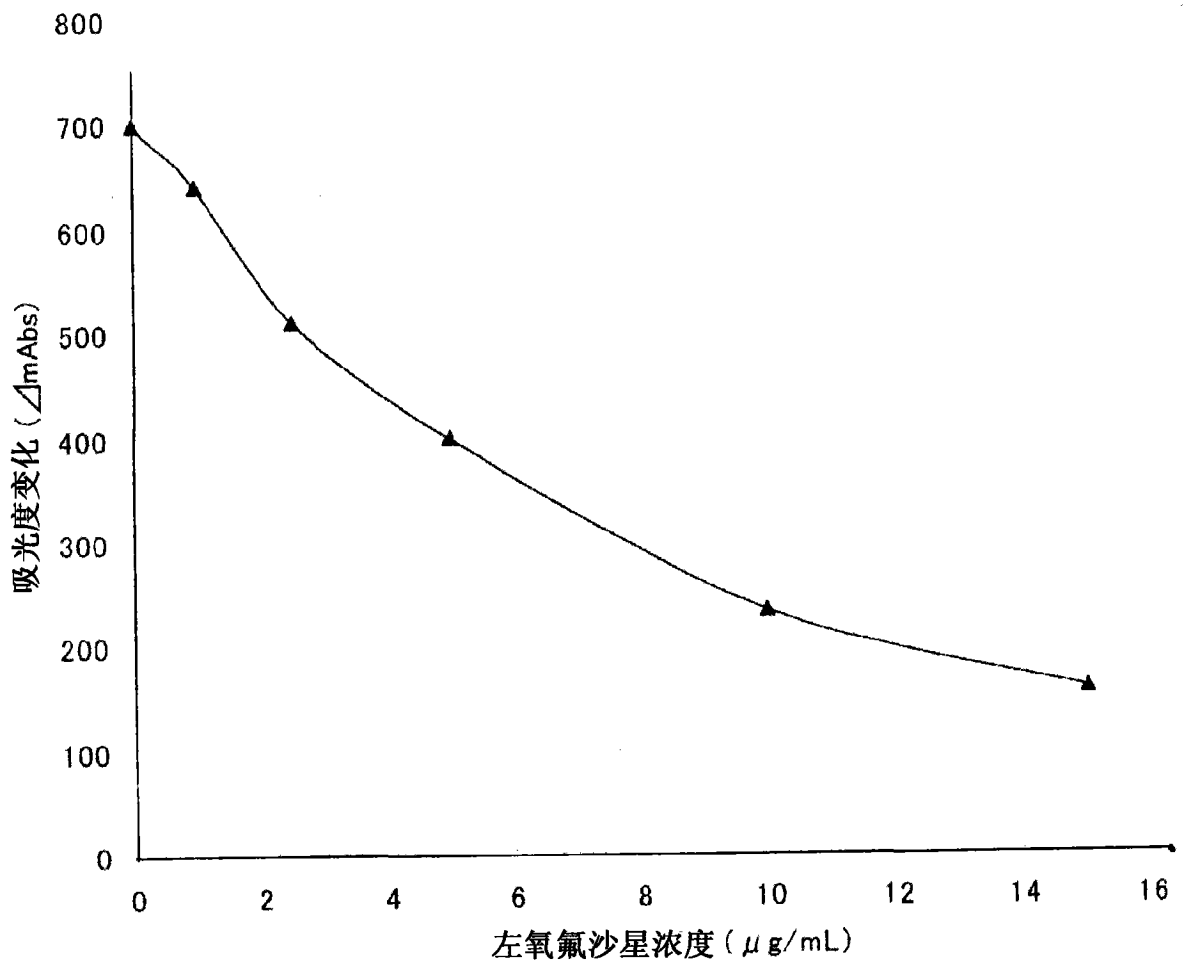


图 14

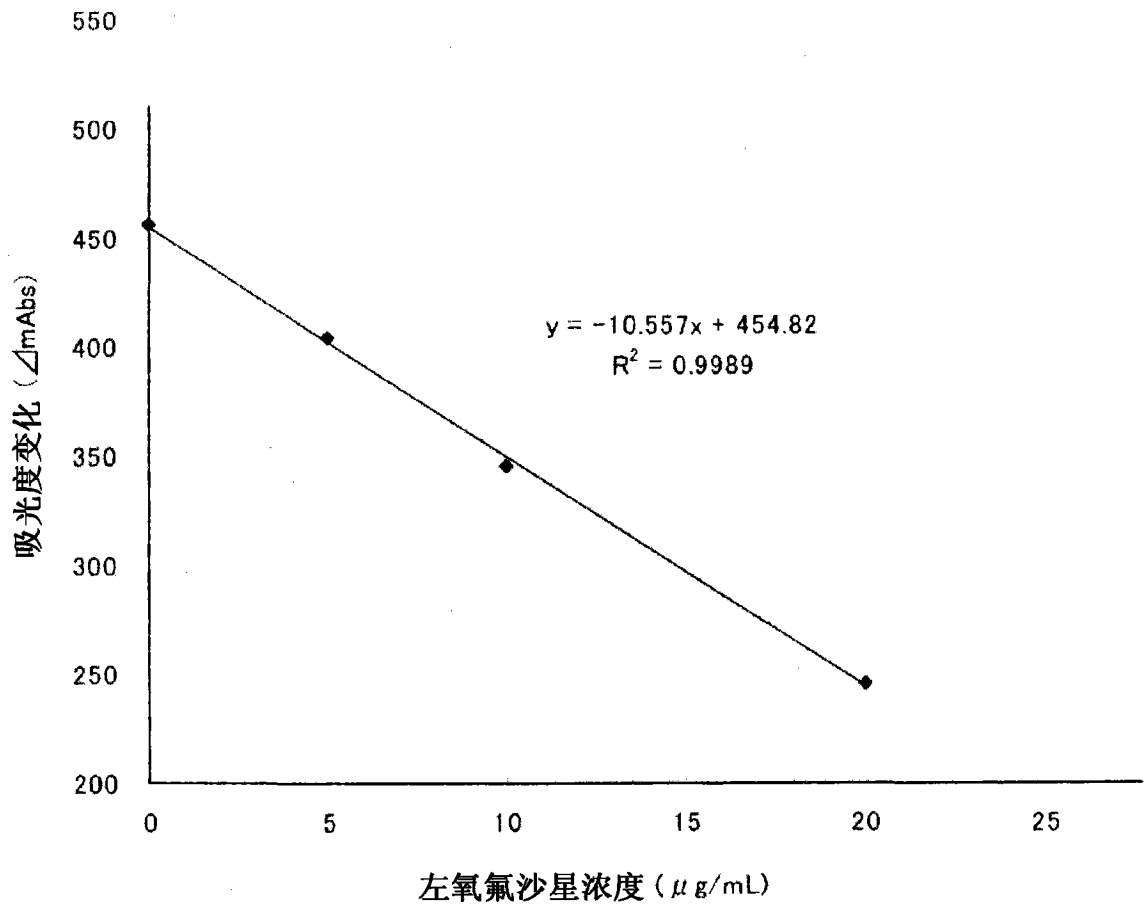


图 15

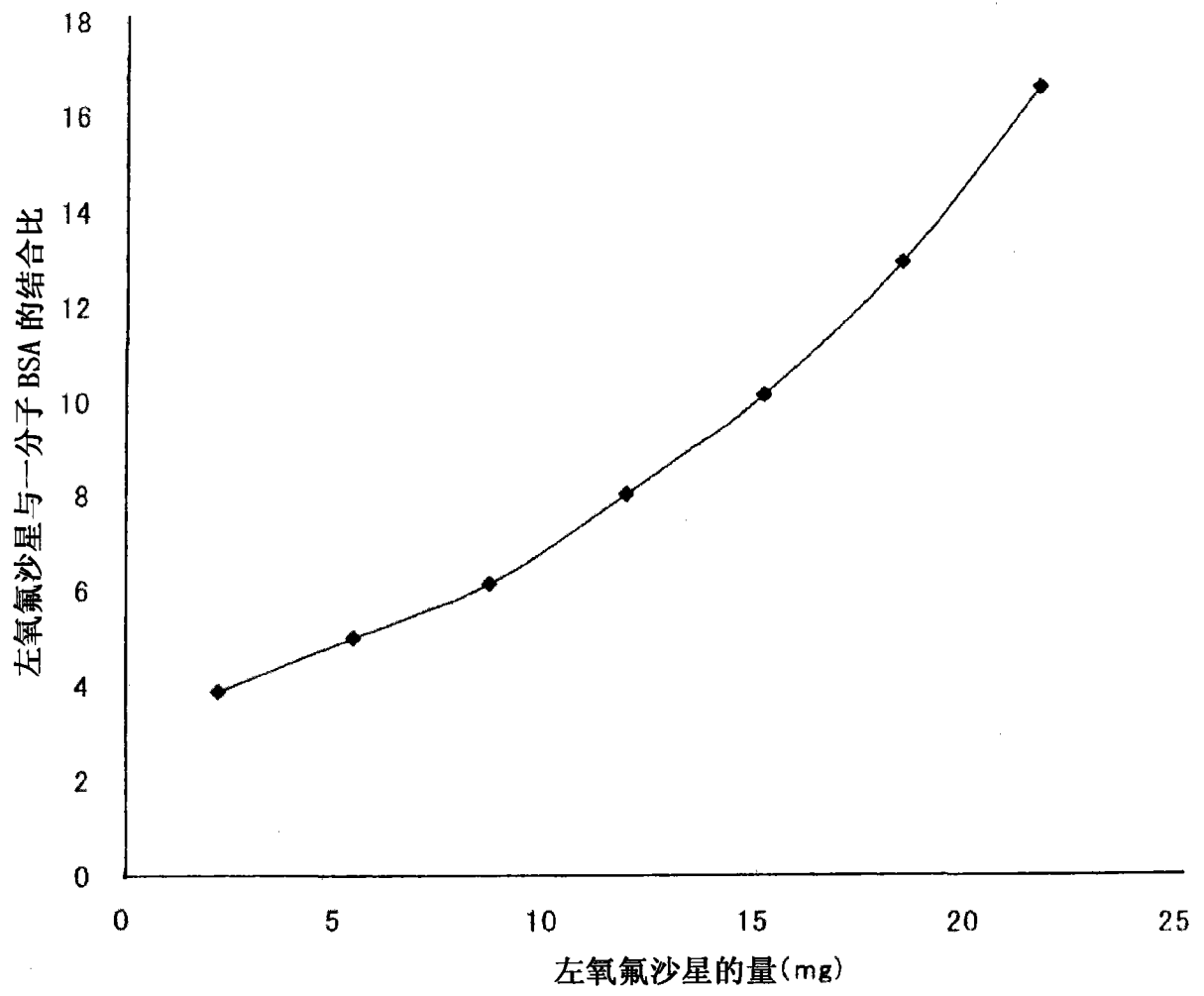


图 16

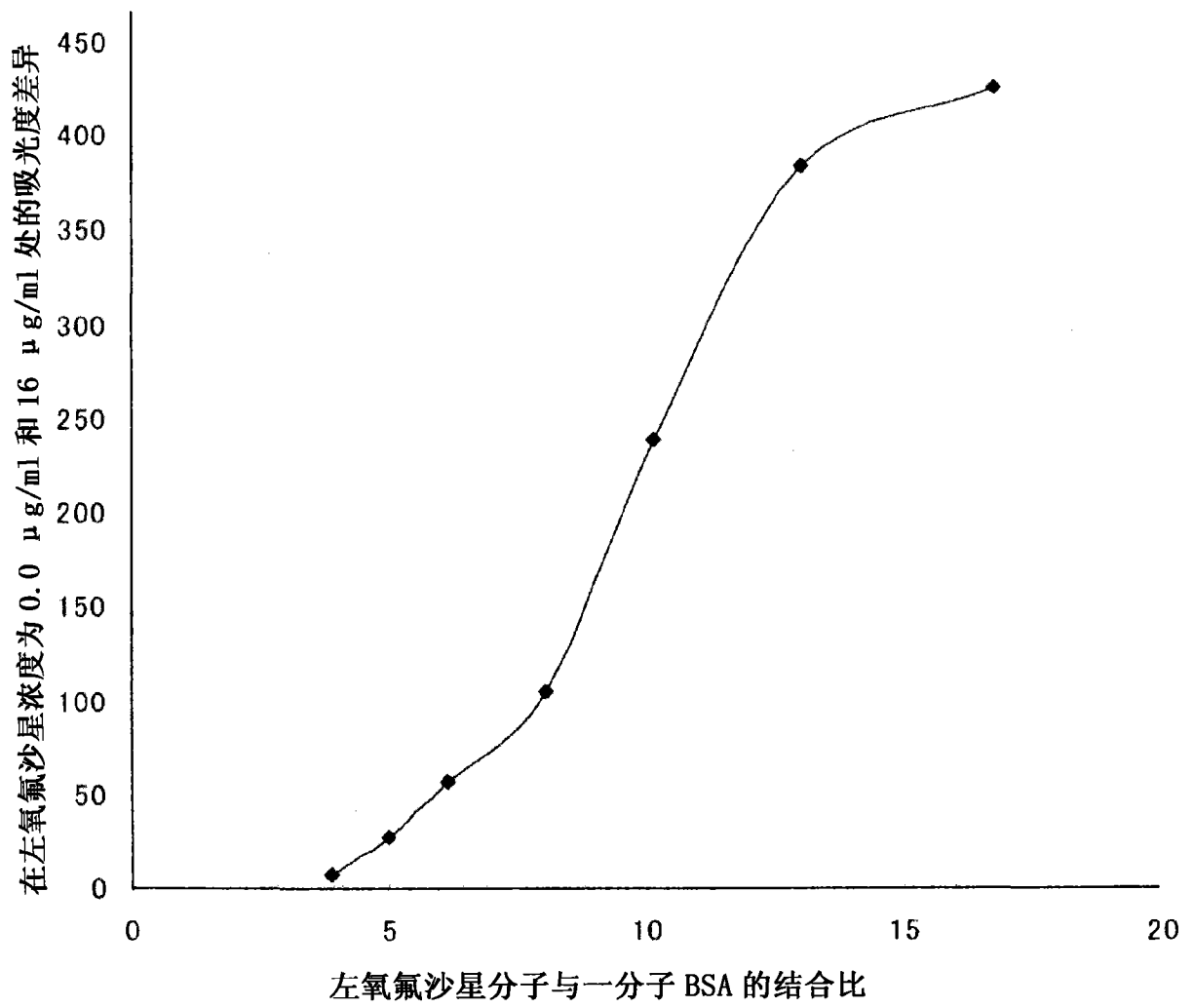


图 17

专利名称(译)	抗氧氟沙星单克隆抗体和使用其的氧氟沙星免疫测定		
公开(公告)号	CN101945894A	公开(公告)日	2011-01-12
申请号	CN200880126751.0	申请日	2008-12-15
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社 第一三共株式会社		
申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社 第一三共株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社 第一三共株式会社		
[标]发明人	宫崎修 田久保耕平 深町勇 日下绘里子 柏木美惠子		
发明人	宫崎修 田久保耕平 深町勇 日下绘里子 柏木美惠子		
IPC分类号	C07K16/44 C07K14/76 C07K14/79 C12N5/10 C12N15/02 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/577 C12P21/08		
CPC分类号	C07K2317/33 G01N33/9446 C07K16/44		
代理人(译)	吴小明		
优先权	2007321529 2007-12-13 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了精确且方便地在人样品中检测式(I)所示的化合物的方法。使用通过式(I)所示的化合物经由6位羧基结合牛血清白蛋白而产生的抗原，制备与式(I)所示的化合物反应、但不与式(I)所示的化合物的N-氧化物代谢物和去甲基左氧氟沙星代谢物交叉反应的任何抗体。使用上述抗体实施测量未被代谢的式(I)所示的化合物的免疫测定。