

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-518234

(P2008-518234A)

(43) 公表日 平成20年5月29日(2008.5.29)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 S	2 G O 5 4
GO 1 N 33/577 (2006.01)	GO 1 N 33/577 B	
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531 A	
GO 1 N 33/542 (2006.01)	GO 1 N 33/542 A	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/542 B	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 69 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-539029 (P2007-539029)
 (86) (22) 出願日 平成17年10月21日 (2005.10.21)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年6月13日 (2007.6.13)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/038258
 (87) 国際公開番号 W02006/047451
 (87) 国際公開日 平成18年5月4日 (2006.5.4)
 (31) 優先権主張番号 60/621,764
 (32) 優先日 平成16年10月25日 (2004.10.25)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 11/254,637
 (32) 優先日 平成17年10月20日 (2005.10.20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507137014
 セラダイン, インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国インディアナ州46268
 , インディアナポリス, ジョージタウン・
 ロード 7998, 스위트 1000
 (74) 代理人 100089705
 弁理士 社本 一夫
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100080137
 弁理士 千葉 昭男
 (74) 代理人 100096013
 弁理士 富田 博行

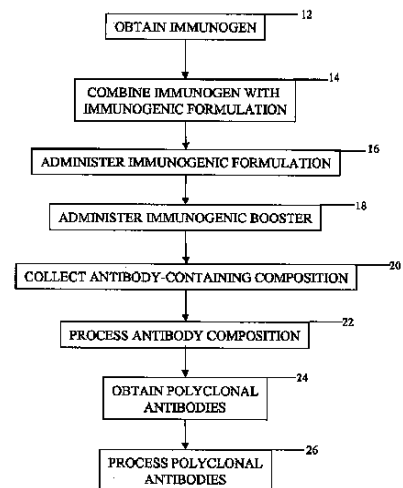
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ラモトリジンの免疫アッセイ

(57) 【要約】

一般的に、本発明は、トリアジン 3 位に並びにベンゼン 4 位及び 5 位上に置換基があるラモトリジン類似体に関する。ラモトリジン類似体は、抗ラモトリジン抗体を調製するのに用いる免疫原性部分、又はラモトリジンの免疫診断アッセイに用いる抗原性部分を含んでもよい。また、ラモトリジン類似体は、免疫診断アッセイ中に、類似体の存在又は量を検出するトレーサー部分を含んでもよい。さらに、ラモトリジン類似体を免疫診断アッセイで用いて、抗ラモトリジン抗体との結合を、ラモトリジンと競合させることもできる。

10 →



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

試料中のラモトリジンの存在を検出する免疫診断系で用いる抗体組成物であって：
ラモトリジンに結合でき、ラモトリジン類似体に結合できる、少なくとも約 1 : 5 , 0
0 0 の力価で存在する、少なくとも 1 の結合性ドメインを有する抗ラモトリジン抗体
を含む、前記抗体組成物。

【請求項 2】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 記載の抗体組成物。

【請求項 3】

抗体がポリクローナル抗体である、請求項 1 記載の抗体組成物。

10

【請求項 4】

ラモトリジンと比較した、ラモトリジン類似体に対する、抗体の親和性、特異性、又は
結合活性の少なくとも 1 つが、均一系 (h o m o g e n e o u s) 又は不均一系 (h e t
e r o g e n e o u s) 免疫診断アッセイに用いるのに十分な、請求項 1 記載の抗体組成
物。

【請求項 5】

抗体及びラモトリジン類似体間の相互作用が、ラモトリジンに対する抗体の親和性、
特異性、又は結合活性の少なくとも 1 つの少なくとも 5 0 % である、請求項 4 記載の抗体
組成物。

【請求項 6】

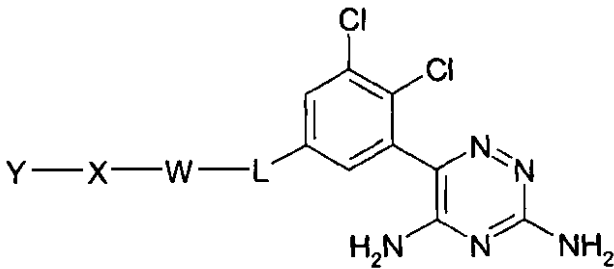
抗体及びラモトリジン類似体間の相互作用が、ラモトリジンに対する抗体の親和性、
特異性、又は結合活性の少なくとも 1 つの少なくとも 7 0 % である、請求項 4 記載の抗体
組成物。

20

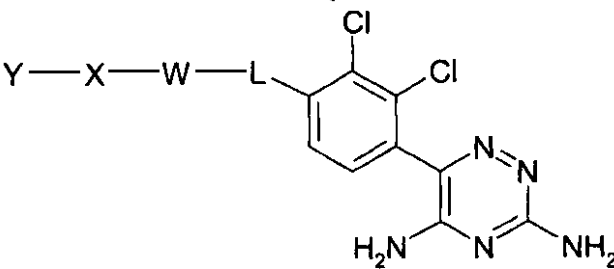
【請求項 7】

請求項 4 記載の抗体であって、前記抗体が、ラモトリジン類似体を含む免疫原性組成物
により産生され、前記ラモトリジン類似体が、式 1、式 2、又は式 3；

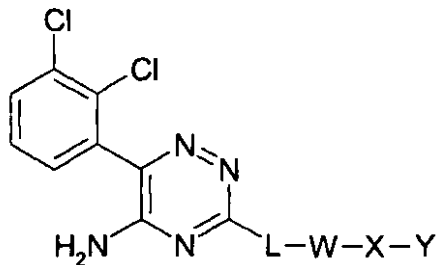
【化 1】



式 1



式 2



式 3

式中、Lは、NH、NHCO、O、SO₂基、又は脂肪族基の少なくとも1つであり；
Wは、1～10の炭素及び/又はヘテロ鎖原子を有する、飽和又は不飽和、置換又は非置換、及び直鎖又は分枝鎖であり；

Xは、W及びY間の結合、1～2の環を有する置換又は非置換の芳香族又は脂肪族基、あるいは1～10の炭素及び/又はヘテロ鎖原子を有する、飽和又は不飽和、置換又は非置換、及び直鎖又は分枝鎖の少なくとも1つであり；

Yは、脂肪族、アルコール、アミン、アミド、カルボン酸、アルデヒド、エステル、活性化エステル、脂肪族エステル、イミドエステル、イソシアネート、イソチオシアネート、無水物、チオール、チオラクトン、ジアゾニウム、マレイミド、及び作用基とカップリングした、これらに由来するリンカーからなる群から選択され；そして

式1のY-X-W-Lは5-スクシニルアミノ部分ではない；

の1の化学構造を有する、前記抗体。

【請求項 8】

少なくとも1：100，000の力価で存在する、請求項1記載の抗体。

【請求項 9】

試料中のラモトリジンの存在を検出するための免疫診断系において用いる系であって：
ラモトリジン類似体；及び

ラモトリジンに結合できる部分及びラモトリジン類似体に結合できる部分を有し、少なくとも約1：5，000の力価で存在する、少なくとも1の結合性ドメインを有する抗ラモトリジン抗体；

を含む、前記系。

【請求項 10】

請求項9記載の系であって、ラモトリジン類似体が、式1、式2、又は式3；

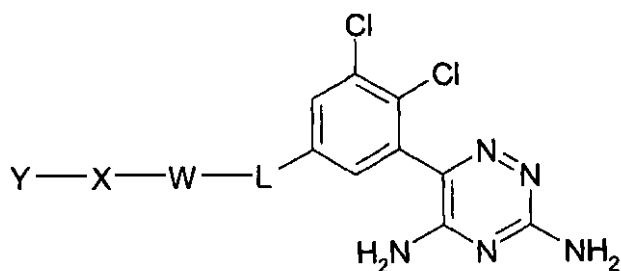
10

20

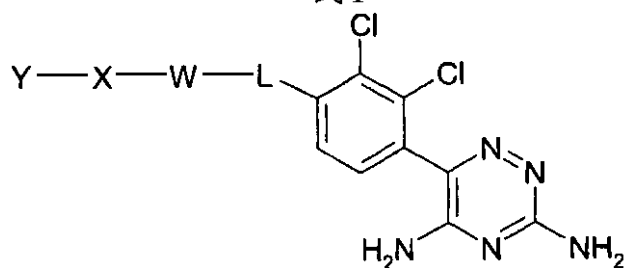
30

40

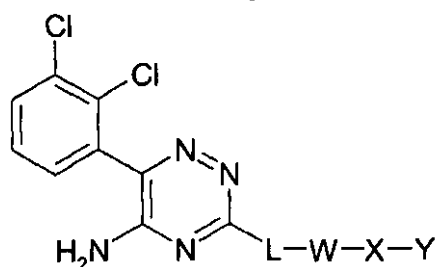
【化 2】



式 1



式 2



式 3

式中、Lは、NH、NHCO、O、SO₂基、又は脂肪族基の少なくとも1つであり；

Wは、脂肪族基であり；

Xは、W及びY間の結合、芳香族基、又は脂肪族基の少なくとも1つであり；

Yは、脂肪族、アルコール、アミン、アミド、カルボン酸、アルデヒド、エステル、活性化エステル、脂肪族エステル、イミドエステル、イソシアネート、イソチオシアネート、無水物、チオール、チオラクトン、ジアゾニウム、NHS、O-NHS、マレイミド、及び作用基とカップリングした、これら由来するリンカーからなる群から選択され；そして

式1のY-X-W-Lは5-スクシニルアミノ部分ではない；

の1の化学構造を有する、前記系。

【請求項11】

請求項10記載の系であって、類似体が、以下の少なくとも1つ；

Lは、NH、NHCO、又はO基の少なくとも1つであり；

Wは、1~10の炭素及び/又はヘテロ鎖原子を有する、飽和又は不飽和、置換又は非置換、及び直鎖又は分枝鎖であり；

Xは、W及びY間の結合、1~2の環を有する置換又は非置換の芳香族又は脂肪族基、あるいは1~10の炭素及び/又はヘテロ鎖原子を有する、飽和又は不飽和、置換又は非置換、及び直鎖又は分枝鎖の少なくとも1つであり；又は

作用基は、タンパク質、リポタンパク質、糖タンパク質、ポリペプチド、多糖、核酸、ポリヌクレオチド、テイコ酸、放射性同位体、酵素、酵素断片、酵素供与体断片、酵素受容体断片、酵素基質、酵素阻害剤、補酵素、蛍光部分、リン光部分、抗ストークス(anti-stokes)上方制御部分、化学発光部分、発光部分、色素、増感剤、粒子、微粒子、磁気粒子、固体支持体、リポソーム、リガンド、受容体、ハプテン放射性同位体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される；

10

20

30

40

50

により特徴付けられる、前記系。

【請求項 1 2】

抗体が、少なくとも 1 : 1 0 0 , 0 0 0 の力価で存在する、請求項 9 記載の系。

【請求項 1 3】

ラモトリジン類似体又は抗ラモトリジン抗体の一方が、粒子、磁気粒子、微粒子、微小球体、支持体、酵素供与体、又は酵素受容体の 1 つとカップリングしている、請求項 9 記載の系。

【請求項 1 4】

以下の少なくとも 1 つ：

ラモトリジンのストック組成物；

濃度勾配を形成する、異なる濃度でラモトリジンを含む一連の組成物；

トレーサー共役体 (conjugate) を有するラモトリジン類似体；

微粒子にカップリングしたラモトリジン類似体；

微粒子にカップリングした抗体；

酵素供与体を有するラモトリジン類似体、及び対応する酵素受容体；

酵素受容体を有するラモトリジン類似体、及び対応する酵素供与体；又は

ろ過又は沈降による分離に適した粒子上に装填された抗体；

をさらに含む、前記系。

10

【請求項 1 5】

以前ラモトリジンを投与された被験体から得た試料中のラモトリジンの存在を検出する免疫診断アッセイを行う方法であって：

20

少なくとも 1 : 5 , 0 0 0 の力価の抗ラモトリジン抗体及びラモトリジン類似体を試料と合わせて第一の組成物を形成する工程、ここで、前記抗体はラモトリジン及びラモトリジン類似体に結合することができる；

試料由来のいかなる遊離 (free) ラモトリジン及びラモトリジン類似体をも、抗体との結合に競合できるようにする工程；そして

ラモトリジン類似体及び抗体間の結合を検出する工程；

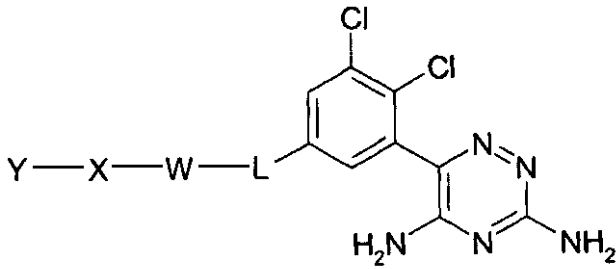
を含む、前記方法。

【請求項 1 6】

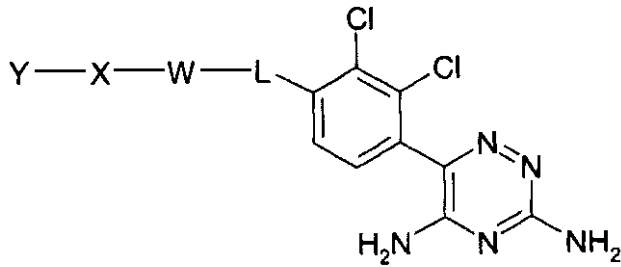
請求項 1 5 記載の方法であって、ラモトリジン類似体が、式 1、式 2、又は式 3；

30

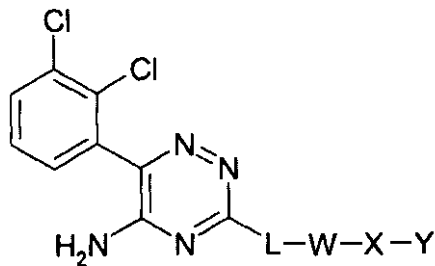
【化 3】



式 1



式 2



式 3

式中、Lは、NH、NHCO、O、SO₂基、又は脂肪族基の少なくとも1つであり；

Wは、脂肪族基であり；

Xは、W及びY間の結合、芳香族基、又は脂肪族基の少なくとも1つであり；

Yは、脂肪族、アルコール、アミン、アミド、カルボン酸、アルデヒド、エステル、活性化エステル、脂肪族エステル、イミドエステル、イソシアネート、イソチオシアネート、無水物、チオール、チオラクトン、ジアゾニウム、NHS、O-NHS、マレイミド、及び作用基とカップリングした、これらに由来するリンカーからなる群から選択され；そして

式1のY-X-W-Lは5-スクシニルアミノ部分ではないの1の化学構造を有する、前記方法。

【請求項17】

請求項16記載の方法であって、類似体が、以下の少なくとも1つ；

Lは、NH、NHCO、又はO基の少なくとも1つであり；

Wは、1~10の炭素及び/又はヘテロ鎖原子を有する、飽和又は不飽和、置換又は非置換、及び直鎖又は分枝鎖であり；

Xは、W及びY間の結合、1~2の環を有する置換又は非置換の芳香族又は脂肪族基、あるいは1~10の炭素及び/又はヘテロ鎖原子を有する、飽和又は不飽和、置換又は非置換、及び直鎖又は分枝鎖の少なくとも1つであり；又は

作用基は、タンパク質、リポタンパク質、糖タンパク質、ポリペプチド、多糖、核酸、ポリヌクレオチド、テイコ酸、放射性同位体、酵素、酵素断片、酵素供与体断片、酵素受容体断片、酵素基質、酵素阻害剤、補酵素、蛍光部分、リン光部分、抗ストークス上方制御部分、化学発光部分、発光部分、色素、増感剤、粒子、微粒子、磁気粒子、固体支持体、リポソーム、リガンド、受容体、ハプテン放射性同位体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される；

10

20

30

40

50

により特徴付けられる、前記方法。

【請求項 18】

抗体が、少なくとも 1 : 100 , 000 の力価で存在する、請求項 15 記載の方法。

【請求項 19】

請求項 15 記載の方法であって、

蛍光部分を含むラモトリジン類似体を得る工程；

第一の偏光量を有する偏光で蛍光共役体を励起する工程；そして

第二の偏光量を有する蛍光共役体から放出される偏光を検出する工程；

をさらに含む、前記方法。

【請求項 20】

請求項 19 記載の方法であって、

第一の偏光量と第二の偏光量を比較する工程；そして

試料中にラモトリジンが存在するか否か決定する工程、ここで第二の偏光量が、第一の偏光量と異なる場合に、試料中にラモトリジンが存在する指標となる；

をさらに含む、前記方法。

【請求項 21】

請求項 20 記載の方法であって、

既知量のラモトリジンと、ラモトリジン類似体及び抗体を合わせて、対照結合組成物を形成する工程；

第三の偏光量を有する対照結合組成物中の蛍光共役体から放出される偏光を検出する工程；

第三の偏光量と第二の偏光量を比較する工程；そして

試料中に存在するラモトリジン量を決定する工程；

をさらに含む、前記方法。

【請求項 22】

請求項 15 記載の方法であって、

ラモトリジン類似体及び抗体を得る工程、ここでラモトリジン類似体及び抗体の一方は微粒子にカップリングしている；

第一の組成物に入射光線を照射する工程；そして

第一の組成物由来の透過光の第一の強度を検出する工程；

をさらに含む、前記方法。

【請求項 23】

請求項 22 記載の方法であって、

ラモトリジン類似体及び抗体は有するが遊離ラモトリジンは有しない、対照結合組成物由来の透過光の最低強度を同定する工程；

透過光の第一の強度と透過光の最低強度を比較する工程；そして

ラモトリジンが試料中に存在するか否かを決定する工程、ここで最低強度が第一の強度と異なる場合は、試料中にラモトリジンが存在する指標となる；

をさらに含む、前記方法。

【請求項 24】

請求項 22 記載の方法であって、

既知量のラモトリジンと、ラモトリジン類似体及び抗体を合わせて、対照結合組成物を形成する工程；

対照結合組成物に入射光線を照射する工程；

対照結合組成物由来の透過光の第二の強度を検出する工程；そして

試料中に存在するラモトリジン量を決定する工程、ここで第一の強度及び第二の強度の比較は、試料中に存在するラモトリジン量の指標となる；

をさらに含む、前記方法。

【請求項 25】

請求項 15 記載の方法であって、

10

20

30

40

50

酵素供与体を含むラモトリジン類似体を得る工程；
 第一の組成物と酵素受容体を合わせる工程；
 第一の組成物と基質を合わせる工程、ここで基質は、酵素供与体及び酵素受容体との相互作用により切断できる；そして
 酵素活性を検出する工程；
 をさらに含む、前記方法。

【請求項 26】

請求項 25 記載の方法であって、
 既知量のラモトリジンと、ラモトリジン類似体及び抗体を合わせて、対照結合組成物を形成する工程；
 酵素受容体と対照結合組成物を合わせる工程；
 対照結合組成物と基質を合わせる工程、ここで基質は、酵素供与体及び酵素受容体との相互作用により切断できる；
 対照酵素活性を検出する工程；そして
 試料中に存在するラモトリジン量を決定する工程、ここで酵素活性と対照酵素活性の比較は、試料中に存在するラモトリジン量の指標となる；
 をさらに含む、前記方法。

10

【請求項 27】

請求項 15 記載の方法であって、
 トレーサー部分を含むラモトリジン類似体を得る工程；
 競合的結合組成物から抗体を分離する工程；
 抗体から未結合のラモトリジン類似体を分離する工程；そして
 抗体と結合している類似体のトレーサー部分を検出する工程
 をさらに含む、前記方法。

20

【請求項 28】

請求項 27 記載の方法であって、
 既知量のラモトリジンと、ラモトリジン類似体及び抗体を合わせて、対照結合組成物を形成する工程；
 対照結合組成物から抗体を分離する工程；
 競合的結合組成物から、抗体と結合しているトレーサー共役体の第一の量を検出する工程；
 対照結合組成物から、抗体と結合しているトレーサー共役体の第二の量を検出する工程；そして
 試料中に存在するラモトリジン量を決定する工程、ここでトレーサー共役体の第一の量とトレーサー共役体の第二の量との比較は、試料中に存在するラモトリジン量の指標となる；
 をさらに含む、前記方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[001] 本米国特許出願は、Anlong Ouyang博士らを発明者とする、2004年10月25日に出願された、米国仮出願第60/621,764号の「ラモトリジンの免疫アッセイ」；及び2005年10月20日に出願された、米国一般特許出願で番号不明の「ラモトリジンの免疫アッセイ」に優先権を請求し、どちらの出願も本明細書に援用される。

40

【0002】

[002] 本発明は、ラモトリジン免疫診断試薬及びプロトコルに関する。より詳細には、本発明は、ラモトリジン、ラモトリジン類似体、ラモトリジン類似体から調製される免疫原及び抗原、ラモトリジンに基づく免疫原から調製される抗体、並びにこれらを作製し、用いる方法に関する。

50

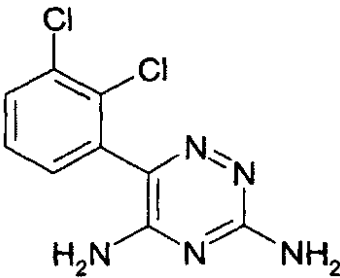
【背景技術】

【0003】

【0003】ラモトリジンは、化学的には3,5-ジアミノ-6-(2,3-ジクロロフェニル)-1,2,4-トリアジンと表される、以下に示すフェニルトリアジン類の抗癲癇薬(「AED」)であり、そして現存するAEDとは化学的に無関係である。ラモトリジンは、抗癲癇治療及び双極性疾患等の精神障害の治療に用いる、FDAで認可された薬剤、LAMICTAL(登録商標)(Glaxo Wellcome)中の活性成分である。

【0004】

【化1】



ラモトリジン

【0005】

【0004】癲癇は、反復発作に起因する脳機能障害である。ラモトリジンは、広い範囲で臨床的効能を有することが示され、Lennox-Gastaut症候群に関連する、部分発作、原発性及び続発性全身発作、欠神発作、並びに転倒発作を治療及び/又は予防するのに有効である。

【0006】

【0005】AED等の様々な薬剤は、異なる患者集団では、異なる薬物動態及び/又は薬力学的プロファイルを有する可能性があり、この結果、AEDの治療薬剤モニタリング(「TDM」)が致命的に重要であることが周知である。TDMプログラムの目的の1つは、様々な時点での薬剤濃度を決定して投薬計画を管理及び/又は最適化して、患者の臨床的結果を最適化することである。したがって、TDMに基づき、単一の患者又は患者集団に対して、薬剤用量及び投薬計画を調節することができる。

【0007】

【0006】いくつかのラモトリジンの特質により、TDMを用いる場合は、臨床的に患者の療法を個別化する必要があることが示唆される。患者の血清濃度に対する用量は、個体間変動が大きいことが示唆されており、最適血清濃度を達成するのに必要なラモトリジン投薬量の必要条件には、薬物動態学的変動が主な役割を果たす。

【0008】

【0007】不応性癲癇患者におけるラモトリジンの最適血清濃度の適切な範囲は、12~55 $\mu\text{mol/l}$ であることが示唆されている。Morris RGら, Br J Clin Pharmacol;46:547-51(1998)を参照されたい。ラモトリジン濃度の中央値は、副作用が生じる患者では62 $\mu\text{mol/l}$ (範囲、31~60 $\mu\text{mol/l}$)であったのに比較して、応答する患者(>50%発作減少)では31 $\mu\text{mol/l}$ (範囲、8~60 $\mu\text{mol/l}$)であった。そこで、現在、ラモトリジンについて10~60 $\mu\text{mol/l}$ (2.54~15.24 $\mu\text{g/ml}$)の標的範囲が示唆されている。したがって、有効TDMを用いて治療指数内の適切なラモトリジン濃度を獲得できる投薬措置を予測することができる。

【0009】

【0008】ラモトリジンを分析するための多くの方法が報告されている。まず、その方法は、紫外線(「UV」)検出を伴うHPLCを含む。Fraserら, Ther Drug Monitoring, 17:174-178, 1995; Lensmeyerら, Ther Drug Monitoring, 19:292-300, 1997; Crociら, Ther Drug Monitoring 23:665-668, 2001を参照されたい。さらに、血清中のラモトリジ

10

20

30

40

50

ンの測定のため、競合的結合酵素免疫アッセイ (E L I S A) が報告されている。Sailstadら, Ther Drug Monitoring, 13:433-442, 1991を参照されたい。しかし、当該方法は、例えば、試料調製時間が長く、アッセイ時間が長く、コストが高く、そして多大な労働力を伴う方法であるため商業的使用には非実用的である。したがって、有効なTDMのためには、ラモトリジン血漿レベルを測定するための単純でそして迅速な分析法が必要であり、免疫アッセイ技術は、本分析適用に非常に適する。

【 0 0 1 0 】

[0 0 9] 免疫アッセイ技術は、生物学的試料中の様々な薬剤を検出するために開発され、商業的分析適用に非常に適する。したがって、免疫アッセイを用いて患者の血中の薬剤及び/又は薬剤代謝産物の量を迅速に評価することもできる。免疫アッセイの例としては、均一系 (h o m o g e n e o u s) 微粒子免疫アッセイ (例えば免疫比濁法) 又は定量的微小球体系 (「 Q M S (登録商標) 」)、蛍光偏光免疫アッセイ (「 F P I A 」)、クローニング酵素供与体免疫アッセイ (「 C E D I A 」)、化学発光微粒子免疫アッセイ (「 C M I A 」) 等があげられるが、これらに限定されるわけではない。

10

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 1 】

[0 1 0] したがって、患者の血液、血清、血漿、及び/又は他の生物学的液体又は試料中のラモトリジンを検出するために設定された免疫アッセイがあれば好適であろう。さらに、本免疫アッセイで用いるラモトリジン類似体、及び/又は抗ラモトリジン抗体を産生する際に用いるラモトリジン類似体に基づく免疫原があれば好適であろう。

20

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 2 】

発明の簡単な概要

[0 1 1] 一般的に、本発明は、ラモトリジン類似体、及びラモトリジンに関する免疫診断アッセイに関する。ラモトリジン類似体は、抗ラモトリジン抗体を調製するために使用できる免疫原性部分；ラモトリジンの免疫診断アッセイで使用できる抗原性部分；又は免疫診断アッセイで使用できるトレーサー部分等の作用基を含むことができる。さらに、ラモトリジン類似体を免疫診断アッセイに用いて、抗ラモトリジン抗体に関してラモトリジンと競合させてもよい。

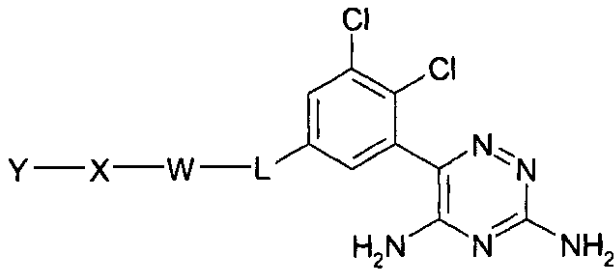
30

【 0 0 1 3 】

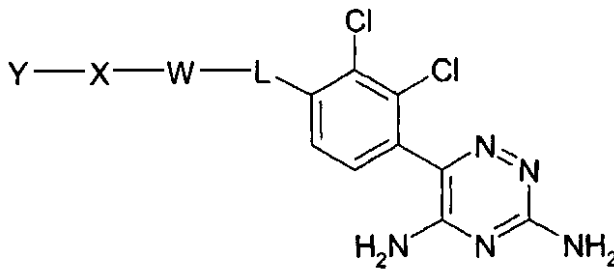
[0 1 2] 本発明の 1 の態様では、ラモトリジン類似体には、式 1 A、式 2 A、又は式 3 A の少なくとも 1 の化学構造が含むことができる。

【 0 0 1 4 】

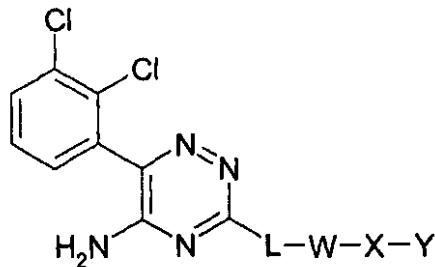
【化2】



式1A



式2A



式3A

【0015】

[013] さらに、式1A、式2A、及び/又は式3Aの上記化学構造は共役化された様々な部分を含みうる骨格である。つまり、本骨格はさらに、以下のように定義することができる：(a) Lは、NH、NHCO、又はO基の1つであってもよく；(b) Wは、1~10の炭素又はヘテロ鎖原子の、飽和又は不飽和、置換又は非置換、及び直鎖又は分枝鎖であってもよく；(c) Xは、W及びY間の結合、1~2の環を有する置換又は非置換の芳香族又は脂肪族基、及び/又は1~10の炭素又はヘテロ鎖原子を有する、飽和もしくは不飽和、置換もしくは非置換、又は直鎖もしくは分枝鎖の少なくとも1つであってもよく；(d) Yは、脂肪族、アルコール、アミン、アミド、カルボン酸、アルデヒド、エステル、活性化エステル、脂肪族エステル、イミドエステル、イソシアネート、イソチオシアネート、無水物、チオール、アルコール、チオラクトン、ジアゾニウム、及びマレイミド基からなる群から選択され；そして(e)式1のY-X-W-Lは5-スクシニルアミノ部分ではない。さらに、Yは、作用基にカップリングしたリンカー基でもよい。

【0016】

[014] 1の態様では、ラモトリジンに関する免疫診断アッセイで用いるのに十分な力価の抗体を生成する免疫原を形成するため、式1A、2A、及び/又は3Aに示す骨格いずれかのラモトリジン類似体を、適切な化学反応を介して免疫原性部分にカップリングして特定することもできる。また、ラモトリジン類似体が免疫原性部分にカップリングして免疫原を形成することもできるが、本免疫原は、抗原及びラモトリジンと相互作用し、ラモトリジン及び類似体に対する親和性、特異性、及び/又は結合活性が実質的に類似する抗体を生成し、競合的結合研究に用いることができる。さらに、ラモトリジン類似体は、トレーサー部分にカップリングすることができ、免疫診断アッセイで用いるのに十分な溶解度でありうる。また、本類似体は抗原部分にカップリングすることができ、免疫診断アッセイで用いるのに十分な溶解度でありうる。さらに、ラモトリジン類似体は、粒子又

10

20

30

40

50

は微粒子上に安定して装填できる。さらに、ラモトリジン類似体は、酵素、酵素供与体、又は酵素受容体にカップリングすることができる。

【0017】

[015] 本発明の1の態様としては、試料中のラモトリジンの存在を検出する免疫診断系で用いる抗体組成物があげられる。抗体組成物には、少なくとも1の結合ドメインを有する抗ラモトリジン抗体であって、ラモトリジンに結合でき、ラモトリジン類似体に結合できる、前記抗体が含まれてもよい。また、抗体は、少なくとも約1:5,000、より好ましくは少なくとも約1:10,000、さらにより好ましくは少なくとも約1:50,000、さらにより好ましくは少なくとも約1:100,000、そして最も好ましくは少なくとも約1:300,000の力価で存在してもよい。場合によっては、好ましくは、最低1:5,000又は最高1:300,000の抗体力価を有しうる。

10

【0018】

[016] さらに、抗体は、モノクローナル抗体及び/又はポリクローナル抗体である。抗体は、ラモトリジンに比較してラモトリジン類似体に対して、均一系又は不均一系(heterogeneous)免疫診断アッセイに用いるのに十分な、親和性、特異性、又は結合活性の少なくとも1つを有してもよい。そのようなものとして、抗体及びラモトリジン類似体間の相互作用は、ラモトリジンに対する抗体の親和性、特異性、又は結合活性の少なくとも1つの少なくとも50%であり、さらにより好ましくは、ラモトリジンに対する抗体の親和性、特異性、又は結合活性の少なくとも1つの少なくとも70%であり、最も好ましくは、ラモトリジンに対する抗体の親和性、特異性、又は結合活性の少なくとも1つの少なくとも90%でもよい。場合により、ラモトリジン類似体に対する抗体の親和性、特異性、又は結合活性の少なくとも1つは、ラモトリジンに対するものと実質的に同一である。

20

【0019】

[017] 1の態様では、本発明としては、試料中のラモトリジンの存在を検出するための免疫診断系で用いる系があげられる。当該系には、ラモトリジン類似体及び抗ラモトリジン抗体が含まれうる。1の側面において、ラモトリジン類似体には、飽和又は不飽和脂肪族、アルコール、アミン、アミド、カルボン酸、アルデヒド、エステル、活性化エステル、脂肪族エステル、イミドエステル、イソシアネート、イソチオシアネート、無水物、チオール、アルコール、チオラクトン、ジアゾニウム基、及びマレイミド基からなる群から選択される、末端基にカップリングしたリンカー置換基が含まれる。本系では、リンカー置換基は、以下の少なくとも1つにより特徴付けられうる：(a) 少なくとも5つの炭素又はヘテロ原子脂肪族鎖を有する5位置換基；(b) 少なくとも4つの炭素又はヘテロ原子脂肪族鎖を有する4位置換基；又は(c) 少なくとも4つの炭素又はヘテロ原子脂肪族鎖を有する3位置換基。さらに、ラモトリジン類似体又は抗ラモトリジン抗体の一方が、粒子、磁気粒子、微粒子、微小球体、支持体、酵素供与体、又は酵素受容体の1つとカップリングしてもよい。

30

【0020】

[018] 1の態様では、本系には、以下の少なくとも1つが含まれてもよい：(a) ラモトリジンのストック組成物；(b) 濃度勾配を形成する、異なる濃度のラモトリジンを含む一連の組成物；(c) トレーサー部分を有するラモトリジン類似体；(d) 微粒子にカップリングしたラモトリジン類似体；(e) 微粒子にカップリングした抗体；(f) 酵素供与体を有するラモトリジン類似体、及び対応する酵素受容体；(g) 酵素受容体を有するラモトリジン類似体、及び対応する酵素供与体；又は(h) ろ過又は沈降による分離に適した微粒子上に装填された抗体。

40

【0021】

[019] 本発明としては、試料中のラモトリジンの存在を検出するための免疫診断アッセイを行う方法もあげられる。本方法には、少なくとも1:5,000の力価の抗ラモトリジン抗体及びラモトリジン類似体を、以前ラモトリジンを投与した被験体から得た試料と合わせて、第一の組成物を形成する工程が含まれてもよい。その後、試料由来のいか

50

なる遊離 (f r e e) ラモトリジン及びラモトリジン類似体も、抗体との結合に関して競合できるようにする。競合的結合後、ラモトリジン類似体及び抗体間の結合を検出する。

【 0 0 2 2 】

[0 2 0] 1 の態様では、免疫診断アッセイは、上記のように、蛍光部分を含むラモトリジン類似体を利用し、当該類似体と抗体及び試料を合わせる。第一の偏光量を有する偏光で蛍光部分を励起することもでき、第二の偏光量を有する蛍光部分から放出される偏光を検出する。場合により、第一の偏光量と第二の偏光量を比較して試料にラモトリジンが存在するか否かを決定するが、ここで第二の偏光量が第一の偏光量と異なる場合、試料中にラモトリジンが存在する指標とする。さらに、免疫診断アッセイには、既知量のラモトリジンと、ラモトリジン類似体及び抗体とを合わせて、対照結合組成物を形成することによる対照が含まれる。第三の偏光量を有する対照結合組成物中で、蛍光共役体から放出される偏光を検出して第二の偏光量と比較する。その後、試料中に存在するラモトリジン量を決定する。

10

【 0 0 2 3 】

[0 2 1] 1 の態様では、免疫診断アッセイは、微粒子上に装填されたラモトリジン類似体又は抗体を用いる。類似体、抗体及び試料を合わせて第一の組成物とし、いかなる遊離ラモトリジンも、抗体との結合に関して類似体と競合する。その後、第一の組成物に入射光線を照射して第一の組成物由来の透過光の第一の強度を検出する。ラモトリジン類似体及び抗体を有するが遊離ラモトリジンを有しない、対照結合組成物由来の透過光の最低強度を同定して透過光の第一の強度と比較する。ラモトリジンが試料中存在するか否かを決定し、ここで最低強度が第一の強度と異なるならば、試料中にラモトリジンが存在する指標となる。さらに、免疫診断アッセイには、既知量のラモトリジンと、ラモトリジン類似体及び抗体を合わせて、対照結合組成物を形成することによる、対照が含まれていてもよい。その後、対照結合組成物に入射光線を照射して対照結合組成物由来の透過光の第二の強度を検出する。その後、試料中に存在するラモトリジン量を決定してもよく、第一の強度と第二の強度の比較は、試料中に存在するラモトリジン量の指標となる。

20

【 0 0 2 4 】

[0 2 2] 1 の態様では、免疫診断アッセイは、酵素供与体を有するラモトリジン類似体を用いる。類似体、抗体及び試料を合わせて第一の組成物とし、いかなる遊離ラモトリジンも抗体との結合に関して類似体と競合する。その後、第一の組成物と酵素受容体及び基質を合わせるが、基質は、酵素供与体と酵素受容体との相互作用により切断できる。その後酵素活性を検出する。さらに、免疫診断アッセイには、既知量のラモトリジンと、ラモトリジン類似体及び抗体を合わせて対照結合組成物を形成することによる、対照が含まれてもよく、その後、酵素受容体及び基質をこれと合わせる。試料中に存在するラモトリジン量の指標を提供する、酵素活性と対照酵素活性の比較により、試料中に存在するラモトリジン量を決定する。

30

【 0 0 2 5 】

[0 2 3] 1 の態様では、免疫診断アッセイは、トレーサー共役体を含むラモトリジン類似体を用いる。類似体、抗体及び試料を合わせて第一の組成物とし、いかなる遊離ラモトリジンも、抗体との結合に関して類似体と競合する。その後、第一の組成物から抗体を分離して未結合のラモトリジン類似体を抗体から分離する。その後、競合的結合組成物から、抗体と結合するトレーサー共役体を検出する。さらに、免疫診断アッセイには、既知量のラモトリジンとラモトリジン類似体及び抗体を合わせて、対照結合組成物を形成することによる、対照が含まれていてもよい。このように、試料中に存在するラモトリジン量の指標を提供できるため、第一の組成物中のトレーサー共役体量と対照結合組成物中のトレーサー共役体量を比較して試料中に存在するラモトリジン量を決定できる。

40

【 0 0 2 6 】

[0 2 4] 本発明のこれら及び他の態様及び特徴は、以下の説明及び付随する請求項からより完全に明らかになるであろうし、又は以下に示す本発明の実施により確認できる。

[0 2 5] 本発明の上記及び他の利点及び特徴をより明確にするため、添付の図面に例

50

示する、本発明の特定の態様を参照して、本発明のより詳細な説明を提供する。本図面は本発明の典型的な態様のみを示すため、その範囲を限定すると見なしてはならないことは認識されよう。添付の図面を用いて、本発明をより具体的かつ詳細に記載し、説明する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0027】

[046] 一般的に、本発明は、ラモトリジン類似体及びラモトリジンの免疫診断アッセイに関する。ラモトリジン類似体は、抗ラモトリジン抗体を調製するために用いる免疫原性部分、又はラモトリジンの免疫診断アッセイで用いる抗原性部分若しくはトレーサー部分が含まれていてもよい。さらに、ラモトリジン類似体を免疫診断アッセイに用いて、抗ラモトリジン抗体に関してラモトリジンと競合させることもできる。このように、以下の専門用語は、本発明の態様を説明することを意味するが、限定することを意図したものではない。

10

【0028】

[047] 本明細書中、用語「ハプテン」は、部分的又は不完全な抗体を意味し、小分子又は薬剤でもよい。さらにハプテンは、タンパク質不含又はポリペプチド不含物質である低分子量分子でもよい。通常ハプテンは、単独で抗体形成を刺激できないが抗体と相互作用できる。そこで本発明のラモトリジン及びラモトリジン類似体はハプテンでもよい。

【0029】

[048] 本明細書中、用語「類似体」又は「誘導体」は、1以上の化学反応により、親化合物又は分子から作製される化学的化合物又は分子を意味する。そこで、類似体は、ラモトリジンの構造に類似であるか又はラモトリジン骨格に基づくが、特定の構成要素又は構造的性質はラモトリジンと異なる構造の化合物でもよく、代謝的に類似の作用又は反対の作用でありうる。本発明のラモトリジンの類似体又は誘導体を用いて類似体及びラモトリジンを共に認識する抗体との結合に関して競合させることもできる。また、類似体には、リンカー基を介したラモトリジンにカップリングした作用基が含まれうる。

20

【0030】

[049] 本明細書中、用語「免疫原」及び「免疫原性」は、生物中で免疫応答を産生又は生成できる物質を意味する。免疫原はまた抗原でもよい。通常、免疫原は、非常に分子量が高く（例えば10,000より大きい）、したがって、本発明の免疫原を形成するために、タンパク質、リポタンパク質、多糖、核酸及び特定のテイコ酸等の様々な巨大分子をハプテンにカップリングしてもよい。

30

【0031】

[050] 本明細書中、用語「免疫原性」は、分子が免疫応答を誘導する能力を意味し、これは、注入される分子の固有の化学構造及び宿主動物が化合物を認識できるか否かで決定する。抗原の構造中の僅かな変化により化合物の免疫原性が大きく改変することもあり、当該変化は、抗体、特に、極めて高く保存されている抗原に対する抗体を得る機会を高める一般的な手段として広く用いられてきた。例えば、これらの修飾技術は、免疫原の領域を改変して、T細胞結合により優れた部位を提供するか、又はB細胞結合のための新規のエピトープを暴露するかである。

【0032】

40

[051] 本明細書中、用語「担体」、「免疫原性部分」、又は「免疫原性担体」は、ハプテンにカップリングすることができる免疫原性物質、一般的にはタンパク質である作用基を意味する。ハプテンにカップリングした免疫原性部分は、免疫応答を誘導することができ、ハプテンと特異的に結合できる抗体の産生を誘発できる。免疫原性部分は、異質（foreign）と認識されて宿主から免疫学的応答を誘発する、タンパク質、ポリペプチド、糖タンパク質、複合多糖、粒子、核酸、ポリヌクレオチド等を含む作用基である。さらに、リンカーには、修飾又は非修飾のヌクレオチド、ヌクレオシド、ポリマー、糖及び他の炭水化物、例えばポリエチレングリコール等のポリエーテル、ポリアルコール、ポリプロピレン、プロピレングリコール、エチレン及びプロピレングリコールの混合物、ポリアルキルアミン、スベルミジン等のポリアミン、ポリ(アクリル酸エチル)等のポリエステ

50

ル、ポリホスホジエステル、及びアルキレン含まれる。作用基及びそのリンカーの例としてはコレステロール - T E G - ホスホロアミダイトがあり、ここでコレステロールは作用基であり、そしてテトラエチレングリコール及びホスフェートがリンカーとして機能する。

【 0 0 3 3 】

[0 5 2] 一例として、作用基は免疫原性を刺激し、ハプテンに対する抗体形成を刺激するためにハプテンにカップリングさせることができる、免疫原性担体である。通常、免疫原性担体は、免疫原性が高くハプテンに対して免疫原性を供与できる、巨大分子である。例えば、異質のタンパク質は当該免疫学的応答を誘発できるため、タンパク質を免疫原性担体として用いる。タンパク質担体は可溶性が高くてもよく、ハプテン分子との共役化を容易に促進できる官能基を含んでいてもよい。現在用いられている最も一般的な担体タンパク質のいくつかは、キーホールリンペット (keyhole limpet) ・ヘモシアニン (K L H ; M W 4 5 0 , 0 0 0 ~ 1 3 , 0 0 0 , 0 0 0) 及びウシ血清アルブミン (B S A , M W 6 7 , 0 0 0) である。キーホールリンペット・ヘモシアニンは、海生キーホールリンペットの酸素運搬タンパク質であり、非常に巨大で、解離させてサブユニットにすると免疫原性が高まるが、これはおそらく他のエピトープ部位が免疫系に曝露されるためである。B S A は共役化に適した多くの官能基を含有する可溶性の高いタンパク質である。

10

【 0 0 3 4 】

[0 5 3] 本明細書中、用語「抗体」は、体内の異質な分子の存在に应答して産生されるタンパク質を意味する。これらは、抗原及び免疫系の特異的な細胞又はタンパク質の両方に結合する能力で特徴付けできる。抗体は、5つのクラス、I g G、I g M、I g A、I g E、及びI g Dに分けられる、形質細胞により産生される免疫グロブリンである。

20

【 0 0 3 5 】

[0 5 4] 本明細書中、用語「エピトープ」は、抗体と相互作用する抗原の領域を定義するよう意味する。したがって、抗原である分子又は他の物質としては、抗体活性がある少なくとも1のエピトープがあげられる。これにより、抗原が、同一抗体又は異なる抗体により認識される様々なエピトープがありうる。また、エピトープは任意の特定構造の固有の特性ではなく、抗体と相互作用する結合部位と定義できる。

【 0 0 3 6 】

[0 5 5] 本明細書中、用語「親和性」は、エピトープ及び抗体間の結合強度の測定値を意味する。したがって、単一の抗体は、様々なエピトープに対する親和性が異なってもよい。これにより、単一の抗体は1のエピトープに強く結合し、他のエピトープにより弱く結合することが可能となる。つまり、抗体は、ラモトリジン等の薬剤に対して第一の親和性があり、ラモトリジン類似体に対して第二の親和性があってもよい。しかし、抗体は、ラモトリジン及びラモトリジン類似体の両方に対する親和性が実質的に同等又は類似であってもよく、これにより、類似体を用いてラモトリジンに対する抗体を生成して、競合的結合研究に用いることが可能となる。したがって、本発明のラモトリジン類似体を用いて、ラモトリジンに親和性がある抗体を生成することができる。

30

【 0 0 3 7 】

[0 5 6] 本明細書中、用語「結合活性」は、抗体及び抗原の複合体の全体的な安定性の測定値を意味する。抗体 - 抗原相互作用の全体的な安定性は、以下の3つの主要因に制御される：(a) エピトープに対する抗体固有の親和性；(b) 抗体及び抗原の価数；及び(c) 相互作用構成要素の幾何学的配置。つまり、上記パラメーター及び他のパラメーターを変化させて、抗体 - 抗原複合体の結合活性を調節することができる。

40

【 0 0 3 8 】

[0 5 7] 本明細書中、用語「特異性」は、他の利用可能なエピトープと比較した、エピトープと抗体の優先的な結合を意味する。すなわち、抗体の特異性は、ラモトリジン代謝産物ではなく、ラモトリジン及び / 又は類似体に優先的に結合できる。これを用いて、不都合な抗体 - 代謝産物結合が混入しないようにして、ラモトリジンの真の濃度を評価で

50

きるように、代謝産物よりもラモトリジンと優先的に結合する、抗ラモトリジン抗体を生成することができる。また、ラモトリジンとの結合に関する抗体の特異性を用いて、ラモトリジンの特異性が類似又は実質的に同一な類似体を調製することもできる。

【0039】

【058】本明細書中、用語「ポリクローナル抗体」は、所定の抗原又はエピトープに対する特異性及び親和性の範囲が広い抗体の異種混合物を意味する。したがって、ポリクローナル抗体としては、各々他と区別でき、抗原と結合するか又は他の態様で相互作用する、複数の抗体があげられる。エピトープのある免疫原を動物内に注射して適切な時間の経過後、目的の抗体を含有する血液分画を収集して、場合により精製することにより、ポリクローナル抗体を含む、異なる抗体を産生するか又は生成することができる。抗体を産生する場合、ポリクローナル抗体の最終的な使用について、いくつかのパラメーターを考慮してもよい。これらのパラメーターとしては以下があげられる：(1)抗体の特異性(すなわち抗原を区別する能力)；(2)抗体の結合活性(すなわちエピトープに結合する強度)；及び(3)アッセイ系での抗体の最適な希釈を決定する、抗体力価。

10

【0040】

【059】本明細書中、用語「モノクローナル抗体」は、正常な抗体産生細胞及び1の前駆細胞の培養物から単離された抗体を意味する。モノクローナル抗体の結合定数は、均一であってもよく、当該技術分野で周知である。

【0041】

【060】本明細書中、「抗体力価」は、血清希釈の逆数を意味する。より好適に記載及び形式化するため、本態様で力価を記載する。1/50000の力価は、抗原を1:50000で希釈した場合に、抗体が、共に結合させた抗原のエピトープを有効に検出することを意味する。力価は、最大O.D.の約10%である終点力価により計算される。

20

【0042】

【061】本明細書中、用語「免疫アッセイ」又は「免疫診断」は、生物学的試料中の特定の抗原又は特定の抗体の少なくとも1つを同定及び/又は定量化するため、抗原及び抗体間の結合を利用する実験技術の意味する。現在、以下に記載するような3種の免疫アッセイがある：(1)抗体捕捉アッセイ；(2)抗原捕捉アッセイ；及び(3)2抗体サンドイッチアッセイ。さらに、新規免疫アッセイが開発され、本発明の類似体及び抗体を使用しうるであろうことが意図される。

30

【0043】

【062】本明細書中、用語「競合的免疫アッセイ」は、既知量の同定可能な抗原が、抗体との結合に関して他の抗原と競合する、実験プロトコルを意味する。すなわち、既知の抗体と結合する既知の抗原を、その既知の抗体と結合する他の抗原を含有すると推測される試料と合わせる。これにより、該抗体上の結合部位で、既知の抗原及び他の抗原が共に競合することができる。例えば、抗ラモトリジン抗体と結合するラモトリジン類似体を、ラモトリジン含有すると推測される試料と合わせることもでき、当該類似体及びラモトリジンが、抗ラモトリジン抗体との結合に関して競合する。その後、抗体との結合に関する競合を用いて、試料中にラモトリジンが存在するか否かを決定することもでき、試料中のラモトリジン量を定量化することもできる。

40

【0044】

【063】本明細書中、用語「比濁検出」は、凝集粒子により散乱される光による、入射光線の透過における強度の減少又は吸光度の増加の測定値を意味する。透過光の強度の減少は、透過光のより高い出発バックグラウンド強度に対して測定される。通常、読取りは、光供給源と一列になった検出装置で行われ、粒子の凝集が光の透過を阻害する。したがって、ラモトリジン等の標的分析物の存在を評価するための手段として、凝集の阻害又は促進を用いる。比濁アッセイは、様々な臨床分析装置に容易に適応できる。

【0045】

【064】本明細書中、用語「微粒子凝集アッセイ」は、標的分析物による微粒子の凝集を阻害する原理を用いる免疫アッセイを意味する。すなわち、標的分析物が存在すると

50

凝集が減少する。例えば、標的薬剤の誘導体が微粒子表面に共有結合し、及び/又は増感粒子はモノクローナル抗体により凝集する。試料が遊離薬剤を含有する場合、凝集は薬剤濃度に比例して阻害され、吸光度と関連した薬剤濃度の古典的な阻害曲線が導かれる。

【0046】

[065] 本明細書中、用語「作用基」は、リンカー基を介してラモトリジンにカップリングした分子又は巨大分子を意味する。作用基としては、免疫原性部分、抗原部分、トレーサー部分等があげられる。さらに、本明細書記載の化学的骨格のZ基が作用基である。つまり、作用基をYリンカー基にカップリングさせ、類似体に他の機能を提供しうる。

【0047】

[066] 本明細書中、用語「活性エステル」又は「活性化エステル」は、例えばペプチド及びタンパク質等の化合物の遊離アミノ基と反応できるエステル基を意味する。活性エステルとしては、活性脱離基に連結されたカルボキシル基があげられる。しばしば、活性脱離基には、エステル酸素が含まれ、活性脱離基はエステル酸素を除去する。例えば活性エステルは、一級アミンによる置換に感受性であり、これにより、エステル酸素が除去され、アミド基が形成される。活性エステルを形成する活性脱離基の例としては、N-ヒドロキシスクシンイミド(「NHS」)、p-ニトロフェニル、ペンタフルオロフェニル、N-ヒドロキシベンゾトリアゾリル等があげられる。よって、用語「NHS」を用いる場合は、N-ヒドロキシスクシンイミドとして定義されることを意味する。

10

【0048】

[067] 本明細書中、用語「標識」、「検出剤分子」又は「トレーサー」は、検出可能シグナルを生じるか又は生じるように誘導できる、いかなる作用基をも意味する。標識をラモトリジン、ラモトリジン類似体、ハプテン、分析物、免疫原、抗体、又は受容体又は受容体に結合できる分子等の他の分子に共役化できる。トレーサーの例としては、放射性同位体、酵素、酵素断片、酵素基質、酵素阻害剤、補酵素、触媒、フルオロフォア、色素、化学発光剤、発光剤、増感剤、非磁気又は磁気粒子、固体支持体、リポソーム、リガンド、受容体、ハプテン放射性同位体等があげられるがこれらに限定されない。本明細書中、類似体は、当該技術分野で周知の方法で様々な標識にカップリングして、様々な免疫アッセイ系で有用な様々な試薬を提供することもできる。免疫アッセイの結果を検出するため、フルオロフォア、例えばフルオレセイン、放射標識、又は化学発光基等の検出剤分子を類似体にカップリングして、トレーサーを産生することができる。

20

30

【0049】

[068] 本明細書中、用語「連結基」又は「リンカー」は、例えばラモトリジン、ラモトリジン類似体、ハプテン、及び例えば免疫原性部分、担体、免疫原、標識、トレーサー等の作用基の、2以上の基礎構造(substructure)を連結する化学構造部分を意味する。連結基は、基礎構造間に伸長する、水素(又は他の一価の原子)以外の原子の少なくとも1の中断されていない鎖があってもよい。通常、連結基としては、置換されていても又は置換されていなくてもよい炭素原子又はヘテロ原子の鎖があげられる。連結基の原子及び連結基内の鎖の原子は、化学的結合で相互連結できる。例えば、リンカーは、直鎖又は分枝鎖、置換又は非置換、飽和又は不飽和鎖でもよく、鎖の原子としては、炭素及び/又はヘテロ原子があげられる。これには、鎖内又は鎖末端の1以上のヘテロ原子も含まれうる。さらに、連結基にはまた、鎖の一部として、又は鎖中の1の原子上の置換として、環状基及び/又は芳香族基もあげられる。連結されている基礎構造間の最短経路である鎖の主鎖の水素以外の原子の数を計測することにより、連結基又はリンカー中の原子の数を決定する。ハプテンをトレーサー、標識、担体、免疫原性部分等と共役化するため、連結基を用いて、利用できる部位をハプテン上に提供することができる。

40

【0050】

[069] 本明細書中、用語「ヘテロ原子」は、酸素、窒素、硫黄、リン等の炭素原子以外の原子を意味する。通常、連結基又は他の部分で用いられる、少なくとも2つの共有結合を形成できるように、ヘテロ原子は多価である。

【0051】

50

[0 7 0] 本明細書中、用語「生物学的試料」は、生命体から得られる固体又は液体試料を意味する。つまり、生物学的試料としては、ヒト及び他の動物等の、生物又は以前生存していたものに由来する、いかなる量の物質もあげられるが、これらに限定されない。本物質としては、血液、血清、血漿、尿、涙、細胞、臓器、組織、骨、骨髄、リンパ、リンパ節、滑膜組織、軟骨細胞、滑膜マクロファージ、内皮細胞、皮膚等があげられるが、これらに限定されない。

【 0 0 5 2 】

[0 7 1] 本明細書中、用語「患者」は、ヒト及び他の動物被験体を意味する。より詳細には、患者は、ラモトリジン等の抗癲癇薬剤が必要なヒト又は他の動物被験体である。

[0 7 2] ラモトリジン類似体には、リンカー部分にカップリングしたラモトリジン分子が含まれてもよく、場合により作用基が含まれる。リンカー部分及び作用基は、ラモトリジンの物理化学的特性を修飾できる化学的化合物の範囲は広くてもよい。したがって、リンカー部分は、アルキル、脂肪族、直鎖脂肪族、分枝鎖脂肪族、置換脂肪族、環状脂肪族、複素環脂肪族、芳香族、複素環芳香族、多環芳香族等が含まれる。

【 0 0 5 3 】

[0 7 3] 本明細書中、用語「脂肪族」は、直鎖又は分枝鎖、飽和又は不飽和、及び/又は置換又は非置換であってもよく、主鎖中に 20 以下の炭素又はヘテロ原子を有する、アルキル基等のヒドロカルビル部分を意味する。さらに、脂肪族には、主鎖中に 10 以下の炭素又はヘテロ原子が含まれうる。脂肪族基は、直鎖、分枝鎖、環状及び/又は複素環である部分を含んでもよく、エーテル、ケトン、アルデヒド、カルボキシレート等の官能基を含有してもよい。典型的な脂肪族基としては、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、トリデシル、テトラデシル、ペンタデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシル、ノナデシル、エイコシル、より多数の炭素のアルキル基等、並びに 2 - メチルプロピル、2 - メチル - 4 - エチルブチル、2 , 4 - ジエチルプロピル、3 - プロピルブチル、2 , 8 - ジブチルデシル、6 , 6 - ジメチルオクチル、6 - プロピル - 6 - ブチルオクチル、2 - メチルブチル、2 - メチルペンチル、3 - メチルペンチル、2 - エチルヘキシル等の置換及び/又は非置換基が含まれるが、これらに限定されない。用語、脂肪族又はアルキルはまた、ビニル等のアルケニル基、アリル、アラルキル及びアルキニル基も含む。

【 0 0 5 4 】

[0 7 4] 脂肪族基内の置換には、脂肪族部分で許容されうるいかなる原子又は基も含まれてよく、ハロゲン、硫黄、チオール、チオエステル、アミン（一級、二級、又は三級）、アミド、エーテル、エステル、アルコール、酸素等が含まれるが、これらに限定されない。脂肪族基としてはまた、例えば、アゾ基、ケト基、アルデヒド基、カルボニル基、カルボキシ基、ニトロ、ニトロソ又はニトリル基、イミダゾール等の複素環、ヒドラジノ又はヒドロキシルアミノ基、イソシアネート又はシアネート基、並びにスルホキシド、スルホン、スルフィド、及びジスルフィド等の硫黄含有基等の修飾も含んでよい。さらに、置換は、適切か又は可能な場合、単結合、二重結合、又は三重結合を介してもよい。

【 0 0 5 5 】

[0 7 5] さらに、脂肪族基はまた、例えば窒素、酸素、リン、又は硫黄等のヘテロ原子により炭素原子が置換されたヘテロ置換も含有しうる。つまり、置換脂肪族で構成されるリンカーは、炭素、窒素、酸素、硫黄、リン及び/又は同様のもので構成される主鎖を有しうる。複素環置換は、ヘテロ原子が 1 以上あるアルキル環をいう。複素環部分の例には、モルホリノ、イミダゾール、及びピロリジノが含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 5 6 】

[0 7 6] 本明細書中、用語「芳香族」は、電子が原子の円形又は環状配置周囲を自由に循環し、互いに交互に単結合及び二重結合する分子をいう。より適切には、これらの結合が単結合及び二重結合のハイブリッドであり、環中の各結合が他のすべてと同一であるとみなすこともできる。ラモトリジン類似体中に存在しうる芳香族化合物の例としては、ベンゼン、ベンジル、トルエン、キシレン等があげられる。芳香族化合物には、ピリジン

、フラン、テトラヒドロフラン等のヘテロ芳香族となるようなヘテロ原子を含んでいてもよい。また、芳香族は、ナフタレン、アントラセン、フェナントレン、多環芳香族炭化水素、インドール、キノリン、イソキノリン等の多環芳香族でもよい。

【0057】

[077]本明細書中、用語「アミン」は、1、2、又は3の水素原子を、例えばアルキル基等の他の基で置換して、アンモニアに直接又は間接的に由来しうる部分を意味する。一級アミンの一般構造は RNH_2 であり、そして二級アミンの一般構造は R_2NH である。用語、アミンには、メチルアミン、エチルアミン、プロピルアミン、イソプロピルアミン、アニリン、シクロヘキシルアミン、ベンジルアミン、多環アミン、アリール及びアルキルアミンで置換されたヘテロ原子、ジメチルアミン、ジエチルアミン、ジイソプロピルアミン、ジブチルアミン、メチルプロピルアミン、メチルヘキシルアミン、メチルシクロプロピルアミン、エチルシクロヘキシルアミン、メチルベンジルアミン、メチルシクロヘキシルメチルアミン、ブチルシクロヘキシルアミン、モルホリン、チオモルホリン、ピロリジン、ペペリジン、2,6-ジメチルペペリジン、ペペラジン、及びアルキル又はアリール二級アミンで置換されたヘテロ原子が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0058】

[078]本明細書中、用語「ポリ(アミノ酸)」又は「ポリペプチド」は、アミノ酸から形成されるポリアミドである。ポリ(アミノ酸)は、一般的に、分子量約200~2,000又は分子量の範囲が約2,000を超えるか又は、分子量上限がなく、通常、分子量が10,000,000未満であり、最高でも約600,000ダルトンであろう。通常、免疫原性担体又は酵素が関与するか否かに応じて範囲が異なるであろう。

20

【0059】

[079]本明細書中、用語「ペプチド」は、アミド(ペプチド)結合により2以上のアミノ酸の連結により形成されるいかなる化合物をも意味し、通常、直鎖中の各アミノ酸残基の - アミノ基(NH_2 末端を除く)が、次の残基の - カルボキシル基に連結されている - アミノ酸のポリマーである。用語「ペプチド」、「ポリペプチド」、及び「ポリ(アミノ酸)」は、本明細書中、大きさの制限なくこの種の化合物を指すべく、同義的に用いられる。この種の最大のメンバーは、明確なポリペプチド配列があるタンパク質をいう。

【0060】

[080]さらに、本発明を記載するために本明細書で用いる用語は、上記定義及び/又は当該技術分野で周知の定義を用いて解釈できる。つまり、上記命名法は、本発明を説明するよう意味し、そして限定することを意図したものではない。

30

【0061】

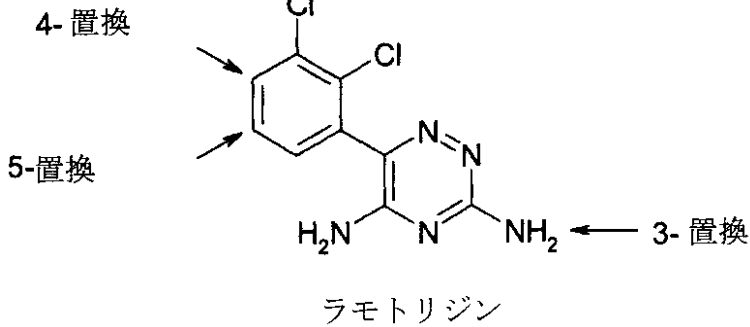
I. ラモトリジン類似体

[081]1の態様では、本発明は、ラモトリジン類似体に基づくトレーサー、免疫原及び/又は類似体を調製するために用いられるラモトリジン類似体に関する。以下に示すように、ベンゼン環上の4原子及び5原子での4位又は5位置換等のベンゼン環の誘導体、並びに/あるいはトリアジン環上の3原子での3位置換等のトリアジン環の誘導体としてラモトリジン類似体を調製できる。モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を調製する際に用いるラモトリジン類似体に基づく免疫原を産生するため、ラモトリジン類似体が免疫原性部分にカップリングしていてもよい。したがって、固有のラモトリジン免疫原を用いて生成される抗体は、ラモトリジン及び類似体と相互作用及び/又は結合しうる。抗体、免疫原、抗原及び類似体は、生物学的液体中のラモトリジン検出のための免疫アッセイを行うために調製するのに有用でありうる。

40

【0062】

【化 3】



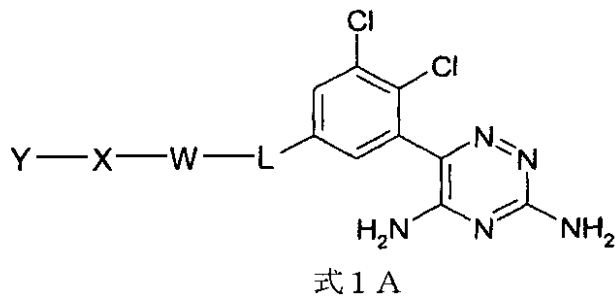
10

【0063】

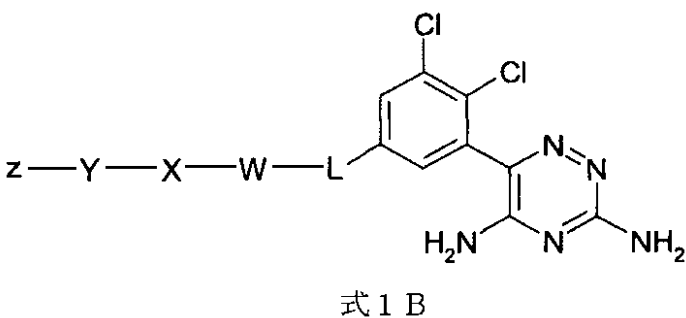
[082] 1の態様では、本発明は、ベンゼン環上の5原子に5-置換があるラモトリジンの新規類似体を記載する。すなわち、類似体を形成するため、ベンゼン環は、連結部分及び/又は類似体部分に5原子で共役化する。類似体部分を、類似体を形成するため、ラモトリジン骨格とカップリングしている置換基と見なしてもよい。類似体部分は、以下により詳細に記載する、様々な化学物質でもよい。したがって、ラモトリジンの5-置換類似体には式1A及び/又は式1Bの一般的な構造を有する：

【0064】

【化 4】



20



30

【0065】

[083] 式1A及び/又は式1Bに示すラモトリジン骨格は、広範囲にわたる化学物質で置換できる。しかし、5-置換スクシニルアミノには不都合な性質があることが見出されている。化学薬品74W86として知られる、ラモトリジンの5-スクシニルアミノ類似体(例えばスクシニアミド酸)は担体に直接カップリングできるが、該物質は極性が高く、多くの一般的な溶媒への溶解度が低い。さらに、in situで生成できる活性化エステル又は活性化種は非常に不安定である。74W86と担体タンパク質とのカップリングは全く十分ではなく、免疫アッセイで用いるのに十分な抗ラモトリジン抗体を産生せず、通常は力価が低い。したがって、類似体部分の以下の記載は5-スクシニルアミノ類似体を除くと解釈することもできる。しかし、本発明によればラモトリジン類似体を産生するために物理化学的特性が改善できるように、74W86をさらに修飾することができる。

40

【0066】

50

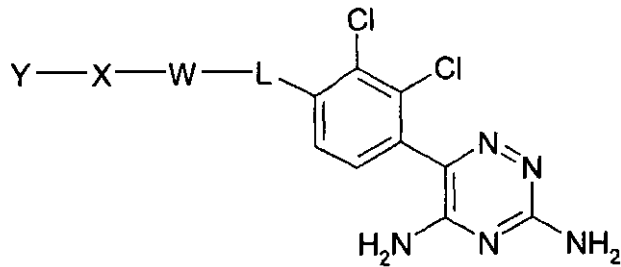
[0 8 4] さらに、式 1 A 及び 1 B に関して、L 及び W が共にラモトリジン骨格にカップリングしたアミド結合を形成する場合、W、X、及び Y が共に $\text{H O O C (C H }_2\text{) }_2\text{ C = O}$ を形成できない。つまり、L - W - X - Y は 5 - スクシニルアミド基を形成しない。

【 0 0 6 7 】

[0 8 5] 他の態様において、ラモトリジン骨格には、5 - 置換に類似の 4 - 置換が含まれる。したがって、ラモトリジンの 4 - 置換類似体には、式 2 A 及び / 又は式 2 B の一般構造を有してもよい：

【 0 0 6 8 】

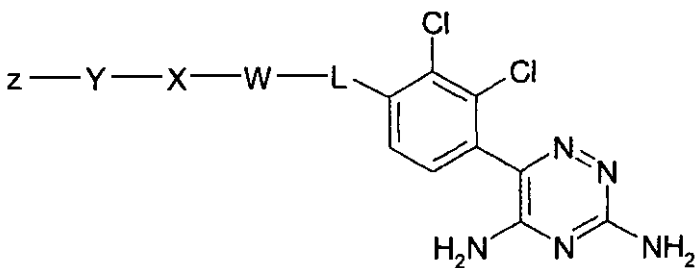
【 化 5 】



式 2 A

10

20



式 2 B

30

【 0 0 6 9 】

[0 8 6] 式 2 A 及び 2 B に関して、Z が存在せず、L 及び W が共にラモトリジン骨格にカップリングしたアミド結合を形成する場合、W、X、及び Y は共に $\text{H O O C (C H }_2\text{) }_2\text{ C = O}$ を形成することができる。つまり、類似体部分は、4 - スクシニルアミド置換体からなってもよい。

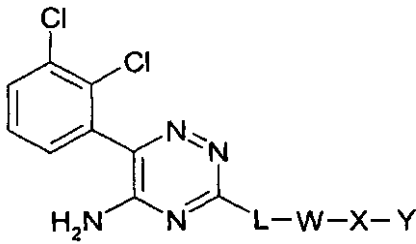
【 0 0 7 0 】

[0 8 7] 他の態様において、ラモトリジン骨格はトリアジン環中の 3 - 置換を含んでもよい。したがって、ラモトリジンの 3 - 置換類似体は、式 3 A 及び / 又は式 3 B の一般構造を有してもよい：

【 0 0 7 1 】

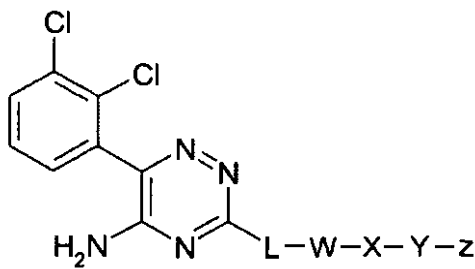
40

【化6】



式3A

10



式3B

20

【0072】

【088】式3A及び3Bに関して、Zが存在せず、L及びWが共にラモトリジン骨格にカップリングしたアミド結合を形成する場合、W、X、及びYは共に $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2\text{C}=\text{O}$ 形成することができる。つまり、類似体部分は、4-スクシニルアミド置換からなっているもよい。

【0073】

【089】式1A、1B、2A、2B、3A、及び3Bに示すラモトリジン骨格中のLの化学物質の範囲は広くてもよい。したがって、L基は、NH(アミノ)、NHCO(アミド)、 SO_2 、O基、及び脂肪族基から選択できる。つまり、L基を連結基として用いて、類似体部分及び/又は免疫原性部分をラモトリジン骨格に共役化することができる。

30

【0074】

【090】さらに、W基は脂肪族基でもよく、1~10の炭素又はヘテロ原子を有する、飽和又は不飽和、置換又は非置換、及び直鎖又は分枝鎖として例示できる。X基は、脂肪族、W及びY間の結合、1~2の環を有する置換又は非置換の芳香族又は脂肪族基、並びに/あるいは炭素又はヘテロ鎖原子が1~10である、飽和もしくは不飽和、置換もしくは非置換、又は直鎖もしくは分枝鎖の少なくとも1つでもよい。脂肪族リンカー基上の置換の例としては、一級及び二級アミン、カルボニル基、ハロゲン等があげられる。

【0075】

【091】Y基は、末端基又はカップリング基でもよく、担体、標識、免疫原性部分等の作用基とリンカー基とのカップリングに用いることができる。また、Y基は、Z基へ連結基をカップリングするのに用いる反応基でもよい。つまり、Yは、脂肪族、アミン、アミド、カルボン酸、アルデヒド、エステル、活性化エステル、脂肪族エステル、イミドエステル、イソシアネート、イソチオシアネート、無水物、チオール、アルコール、チオラクトン、ジアゾニウム、マレイミド基等の様々な基でありうる。また、Yは、 Y_1-Z でもよく、 Y_1 は、Y末端基に由来する連結基、又はZ基にカップリングしているカップリング基でもよい。

40

【0076】

【092】さらに、作用基Zは、存在しないくてもよく、又はリンカー部分にカップリングすることもできるいかなる部分でもよい。つまり、L-W-X-Y基は、リンカー部

50

分と見なすこともできるし、Z基は作用基でもよい。つまり、リンカー部分は、ラモトリジン骨格及び作用基間のリンカー又は連結基として機能的に作用しうる。例えば、作用基は、担体、標識、トレーサー、タンパク質、酵素、蛍光化合物、リン光生成化合物、温度発色性(thermochromic)化合物、光発色性化合物、抗ストークス(anti-stokes)上方制御化合物、化学発光物質、電気化学仲介剤、粒子、レポーター基、酵素阻害剤、核酸、ポリペプチド等でもよい。

【0077】

[093] 例えば、W基は原子の鎖を1以上含んでもよく、存在する場合は少なくとも1の原子が炭素である。具体例として、Wは以下の：CH₂；(CH₂)₂；(CH₂)₃；(CH₂)₄；(CH₂)₅；(CH₂)₆；CH₂CO；(CH₂)₂CO；(CH₂)₃CO；(CH₂)₄CO；(CH₂)₅CO；(CH₂)₆CO；CH₂COO；(CH₂)₂COO；(CH₂)₃COO；(CH₂)₄COO；(CH₂)₅COO；(CH₂)₆COO；CO；COO；COCH₂；CO(CH₂)₂；CO(CH₂)₃；CO(CH₂)₄；CO(CH₂)₅；CO(CH₂)₆；COCH₂CO；CO(CH₂)₂CO；CO(CH₂)₃CO；CO(CH₂)₄CO；CO(CH₂)₅CO；CO(CH₂)₆CO；COCH₂COO；CO(CH₂)₂COO；CO(CH₂)₃COO；CO(CH₂)₄COO；CO(CH₂)₅COO；CO(CH₂)₆COO；CO(CH₂)₂CONHCH₂；CO(CH₂)₂CONH(CH₂)₂；CONH(CH₂)₃；CONH(CH₂)₃CO；CONH(CH₂)₃COO；NHCH₂；NH(CH₂)₂；NH(CH₂)₃；NH(CH₂)₄；NH(CH₂)₅；NH(CH₂)₆；NHCH₂CO；NH(CH₂)₂CO；NH(CH₂)₃CO；NH(CH₂)₄CO；NH(CH₂)₅CO；NH(CH₂)₆CO；NHCH₂COO；NH(CH₂)₂COO；NH(CH₂)₃COO；NH(CH₂)₄COO；NH(CH₂)₅COO；NH(CH₂)₆COO；NHCO(CH₂)₂；NHCO(CH₂)₆；NHCO(CH₂)₂CO；HCO(CH₂)₆CO；NHCO(CH₂)₂COO；又はNHCO(CH₂)₆COO、その組み合わせ等のいずれの基でもよい。より好ましくはWは、CH₂、(CH₂)₂、(CH₂)₃、CH₂COO、(CH₂)₂CO、(CH₂)₂COO、(CH₂)₃CO、(CH₂)₃COO、CO(CH₂)₆、CO(CH₂)₆CO、CO(CH₂)₆COO、CO、COO、CONH(CH₂)₃、CONH(CH₂)₃CO、CONH(CH₂)₃COO、CO(CH₂)₂、COCH₂、CO(CH₂)₂CONHCH₂、CO(CH₂)₂CONH(CH₂)₂、その組み合わせ等からなる群から選択される。最も好ましくはWは、CO(CH₂)₂、COCH₂、CO(CH₂)₂CONHCH₂及びCO(CH₂)₂CONH(CH₂)₂からなる群から選択される。1の態様ではWは炭素及び/又はヘテロ鎖原子が5~10の脂肪族でもよい。

【0078】

[094] 例えば、X基は、結合するか又は存在する場合、少なくとも1の原子が炭素であり、原子の鎖が0以上でもよい。つまり、XはLとYの共有結合でもよい。具体例として、Xは以下のいずれの群：CH₂；(CH₂)₂；(CH₂)₃；(CH₂)₄；(CH₂)₅；(CH₂)₆；CH₂CO；(CH₂)₂CO；(CH₂)₃CO；(CH₂)₄CO；(CH₂)₅CO；(CH₂)₆CO；CH₂COO；(CH₂)₂COO；(CH₂)₃COO；(CH₂)₄COO；(CH₂)₅COO；(CH₂)₆COO；CO；COO；COCH₂；CO(CH₂)₂；CO(CH₂)₃；CO(CH₂)₄；CO(CH₂)₅；CO(CH₂)₆；COCH₂CO；CO(CH₂)₂CO；CO(CH₂)₃CO；CO(CH₂)₄CO；CO(CH₂)₅CO；CO(CH₂)₆CO；COCH₂COO；CO(CH₂)₂COO；CO(CH₂)₃COO；CO(CH₂)₄COO；CO(CH₂)₅COO；CO(CH₂)₆COO；CO(CH₂)₂CONHCH₂；CO(CH₂)₂CONH(CH₂)₂；Ph；CONHCH₂Ph；CONH(CH₂)₃；CONH(CH₂)₃CO；CONH(CH₂)₃COO；NHCH₂；NH(CH₂)₂；NH(CH₂)₃；NH(CH₂)₄；NH(CH₂)₅；N

H(CH₂)₆; NHCH₂CO; NH(CH₂)₂CO; NH(CH₂)₃CO; NH(CH₂)₄CO; NH(CH₂)₅CO; NH(CH₂)₆CO; NHCH₂COO; NH(CH₂)₂COO; NH(CH₂)₃COO; NH(CH₂)₄COO; NH(CH₂)₅COO; NH(CH₂)₆COO; NHCO(CH₂)₂; NHCO(CH₂)₆; NHCO(CH₂)₂CO; HCO(CH₂)₆CO; NHCO(CH₂)₂COO; 又はNHCO(CH₂)₆COO; その組み合わせ等でもよい。より好ましくは、Xは、CH₂、(CH₂)₂、(CH₂)₃、CH₂COO、(CH₂)₂CO、(CH₂)₂COO、(CH₂)₃CO、(CH₂)₃COO、CO(CH₂)₆、CO(CH₂)₆CO、CO(CH₂)₆COO、CO、COO、Ph、CONH(CH₂)₃、CONH(CH₂)₃CO、CONH(CH₂)₃COO、その組み合わせ等からなる群から選択される。最も好ましくは、Xは、CH₂、CONHCH₂Ph、CONH(CH₂)₂、Ph、NHCO(CH₂)₆及びNHCO(CH₂)₂からなる群から選択される。

10

【0079】

[095]例えば、式1及び2の各々において、Y基は末端基又は末端基由来のリンカーを含んでいてもよく、常に存在する。具体例として、Yは、以下の末端基又はそれ由来するリンカー基：COOH(カルボン酸); COO; COO-NHS(NHS活性エステル); NHS; COO-tertブチル; tertブチル(t-ブチル); OH; O-NHS(NHS活性エステルリンカー); COOCH₂CH₃; COOCH₃; OCH₂CH₃; OCH₃; NH; NH₂; NHCO(アミド); その組み合わせ等のいずれでもよい。より好ましくは、Yが末端基である場合、Yは、NHS、COOH、COO-NHS、COO-tertブチル、tertブチル、OH、O-NHS、COOCH₂CH₃、COOCH₃、OCH₂CH₃、OCH₃、又はNH₂からなる群から選択される。一方、Yがリンカーである場合、Yは、Y₁-Zであり、式中、Y₁は、COO、CO、O、CONH、又はNHの少なくとも1つからなる群から選択され、そしてZは巨大分子である。

20

【0080】

[096]したがって、共役体Z又は巨大分子は、担体、トレーサー、又は標識、例えばタンパク質、酵素、蛍光化合物、化学発光物質、電気化学仲介剤、粒子、レポーター基、酵素阻害剤、及び/又は核酸でもよい。具体例として、Zは、以下の共役基：(a) BSA; (b) KLH; (c) 蛍光トレーサー; 及び(d) これらと同等のいずれでもよい。

30

【0081】

[097]1の態様では、ラモトリジン類似体は、

NHCO(CH₂)₂CONH(CH₂)₂NHCOOH、
 NHCO(CH₂)₂CONH(CH₂)₂NHCOONHS、
 NHCO(CH₂)₂CONH(CH₂)₂NHCOOCH₂CH₃、
 NHCO(CH₂)₂CONH(CH₂)₂NHCO(CH₂)₂COOH、
 NHCO(CH₂)₂CONH(CH₂)₂NHCO(CH₂)₂COONHS、
 NHCO(CH₂)₂CONH(CH₂)₂NHCO(CH₂)₂COOCH₂CH₃、
 NHCO(CH₂)₂CONH(CH₂)₂NHCO(CH₂)₃COOH、
 NHCO(CH₂)₂CONH(CH₂)₂NHCO(CH₂)₃COONHS、
 NHCO(CH₂)₂CONH(CH₂)₂NHCO(CH₂)₃COOCH₂CH₃、
 NHCO(CH₂)₂CONH(CH₂)₂NHCO(CH₂)₆COOH、
 NHCO(CH₂)₂CONH(CH₂)₂NHCO(CH₂)₆COONHS、
 NHCO(CH₂)₂CONH(CH₂)₂NHCO(CH₂)₆COOCH₂CH₃、
 NHCO(CH₂)₂CONH(CH₂)₂NHCH₂PhCOOH、
 NHCO(CH₂)₂CONH(CH₂)₂NHCH₂PhCOONHS、
 NHCO(CH₂)₂CONH(CH₂)₂NHCH₂PhCOOCH₂CH₃、
 NHCO(CH₂)₂CONH(CH₂)₂NHCONH(CH₂)₃COOH、
 NHCO(CH₂)₂CONH(CH₂)₂NHCONH(CH₂)₃COONHS、

40

50

$\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{NHCONH}(\text{CH}_2)_3\text{COOCH}_3$ 、
 $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{CONHCH}_2\text{PhCOOH}$ 、
 $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{CONHCH}_2\text{PhCOOCH}_2\text{CH}_3$ 、
 $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$ 、 $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{COONHS}$ 、
 $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ 、
 $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$ 、 $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_3\text{COONHS}$ 、
 $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ 、
 $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NHCO}(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$ 、
 $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NHCO}(\text{CH}_2)_6\text{COONHS}$ 、
 $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NHCO}(\text{CH}_2)_6\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ 、
 $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$ 、
 $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$ 、
 $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{COONHS}$ 、 $\text{NHCH}_2\text{PhCOOH}$ 、
 $\text{NHCH}_2\text{PhCOONHS}$ 、 NHCOPhCOOH 、 NHCOPhCOONHS 、
 $\text{OOCNH}(\text{CH}_2)_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ 、 $\text{OOCNH}(\text{CH}_2)_3\text{COOCH}_3$ 、
 $\text{OOCNH}(\text{CH}_2)_3\text{COONHS}$ 、 $\text{OOCNH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$ 、
 $\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$ 、 $\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{COONHS}$ 等からなる群から選択される
 L-W-X-Y を有してもよい。

10

【0082】

[098] 1の態様では、ラモトリジン類似体は、

20

$\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{NHCOO-BSA}$ 、
 $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{COO-BSA}$ 、
 $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{NHCO}(\text{CH}_2)_3\text{COO-BSA}$ 、
 $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{NHCO}(\text{CH}_2)_6\text{COO-BSA}$ 、
 $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{NHCH}_2\text{PhCOO-BSA}$ 、
 $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{NHCONH}(\text{CH}_2)_3\text{COO-BSA}$ 、
 $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{CONHCH}_2\text{PhCOO-BSA}$ 、
 $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{COO-BSA}$ 、 $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_3\text{COO-BSA}$ 、
 $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NHCO}(\text{CH}_2)_6\text{COO-BSA}$ 、
 $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{COO-BSA}$ 、 $\text{NHCH}_2\text{PhCOO-BSA}$ 、
 NHCOPhCOO-BSA 、 $\text{OOCNH}(\text{CH}_2)_3\text{COO-BSA}$ 、
 $\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{COO-BSA}$ 等からなる群から選択される L-W-X-Y-Z を有し
 てもよい。

30

【0083】

[099] 1の態様では、式1A、2A、及び3Aのラモトリジン類似体は治療剤として用いることができる。つまり、ラモトリジン同様、ラモトリジン類似体を抗癲癇薬剤として用いることができる。しかし、ラモトリジン類似体を治療剤として用いる場合、Zは、好ましくは、免疫原を形成しないように存在しない。したがって、ヒトを含む動物の抗癲癇治療で、ラモトリジンの非免疫原性類似体を用いることができる。

40

【0084】

II. ラモトリジン免疫原

[0100] ラモトリジン等の小分子の検出のために免疫アッセイを実行するのは、困難な場合もある。これは、当該小分子に抗原性がない場合があるためであり、そのため、ラモトリジンに対する抗体を生成することが困難になり、そして免疫原性がないラモトリジンでは特に問題があるためである。免疫原性を高めるため、ウシ血清アルブミン、オボアルブミン、キーホールリンペット・ヘモシアニン等を含むが、これらに限定されない、より大きい抗原性化合物を薬剤にカップリングしてもよい。さらに、免疫アッセイで薬剤を検出する場合は、一般的に、抗体、ラモトリジン、又はラモトリジン類似体に共役化された検出可能標識を用いることが必要となる。

【0085】

50

[0 1 0 1] ラモトリジン類似体の 1 のリンカーを介して、ラモトリジンを抗原性担体タンパク質にカップリングして、免疫原を作製することもできる。つまり、ラモトリジンに基づく免疫原もまたラモトリジン類似体と見なされる。具体例として、ベンゼン環上の 5 - アミノ置換がタンパク質と連結することが示され、これは、本明細書に援用される Saalstadら, *The Drug Monitoring* 13:433-442(1991)に記載されている。しかし、Salistadらが報告した免疫原から生成される抗体は、いかなる免疫アッセイ、特に自動免疫アッセイにおいて、十分でなかった。免疫原性が弱いのは、力価が低く、感度が低く、BSAの免疫原性がKLHと同程度ではなく、5位のリンカーが短いことが原因でありうる。

【 0 0 8 6 】

[0 1 0 2] 担体タンパク質にカップリングする効率を改善する試みとして、図 1 0 に示すように、7 4 W 8 5 を N H S で修飾して、単離活性化エステル誘導体 5 - N H S - 7 4 W 8 6 (5) (例 えば L が N H ; W が C = O ; X が C H ₂ C H ₂ ; Y が N H S 活性化エステルである) にした。5 - N H S 活性エステル (5) は、タンパク質内のリジン又は他のアミンと直接反応するため、担体タンパク質と効率的にカップリングできる。当該カップリングの例は、図 1 3 E の免疫原 5 - K L H - 7 4 W 8 6 (2 0) に見られうる。しかし、(2 0) のリンカーは、以下により詳細に記載する 2 つの免疫プログラムでは、抗体相互作用に用いるエピトープを提供するには短すぎることを示された。

【 0 0 8 7 】

[0 1 0 3] 免疫プログラムが成功しないため、5位に共役化されるより長いリンカー、並びに4位及び3位に共役化される様々な長さのリンカーを含む、ラモトリジンに関する新規八プテンを徹底的に調べた。ここで、図 1 3 A ~ 1 3 D は、本発明により調製される免疫原を例示し、それは以下のとおりである：(a) 3 - ラモトリジン免疫原 (1 8) ; (b) 5 - 長鎖リンカーラモトリジン免疫原 (1 6) ; (c) 5 - 長鎖リンカーラモトリジン免疫原 (1 9) ; 及び (d) 4 - ラモトリジン免疫原 (1 7) 。具体的には、5 - 長鎖リンカーラモトリジン免疫原 (1 6) 及び (1 9) のリンカーは極めて長く、より利用可能なエピトープを提供する。つまり、ラモトリジン部分は、抗体相互作用に極めて利用しやすく、免疫原性が高い。

【 0 0 8 8 】

[0 1 0 4] 1 の態様では、本発明は、上記ラモトリジン類似体骨格から調製される免疫原に関する。すなわち、式 2 B、3 B、及び 4 B の類似体には、上記リンカー部分が含まれてもよく、Z は免疫原性部分等の作用基でもよい。つまり、Z は、免疫学的応答を誘発でき、ラモトリジン類似体の少なくとも一部を標的とする抗体の産生を提供できる、いかなる免疫原性部分であってもよい。

【 0 0 8 9 】

[0 1 0 5] 免疫原性部分には、免疫原性担体として機能できる、様々なタンパク質又はポリペプチドが含まれうる。これらの種類のポリペプチドとしては、アルブミン、血清タンパク質、グロブリン、眼球レンズのタンパク質、リポタンパク質、及びその一部があげられる。具体例となるタンパク質としては、ウシ血清アルブミン (「 B S A 」) 、キーホールリンペット・ヘモシアニン (「 K L H 」) 、卵オボアルブミン、ウシ・ガンマ・グロブリン (「 B G G 」) 等があげられる。あるいは、合成ポリペプチドを利用してもよい。さらに、免疫原性部分はまた、高分子量ポリマーである多糖でもよい。多糖の例は、デンプン、グリコーゲン、セルロース、アラビアゴム等の炭水化物ゴム、寒天等である。また、免疫原性部分は、DNA 又は RNA 等のポリヌクレオチドでもよい。ポリヌクレオチドは修飾されても又は修飾されなくてもよく、担体及び / 又は免疫原性機能を提供する限り、いかなる数の核酸で構成されてもよい。多糖はまた、ポリペプチド残基、ポリヌクレオチド残基、及び / 又は脂質残基を含有又はこれらに連結できる。さらに、免疫原性部分はまた、単独の、又は上記ポリペプチド又は多糖の 1 つへの共役体のポリヌクレオチドでもよい。

【 0 0 9 0 】

[0 1 0 6] 免疫原性部分又は担体はまた粒子又は微粒子でもよい。免疫原性粒子は、

10

20

30

40

50

一般的に、少なくとも直径約0.02ミクロン(μm)で、約100μm以下であり、通常、直径約0.05μm~10μmである。粒子は、有機又は無機、膨潤性又は非膨潤性、及び/又は多孔又は無孔でもよい。場合により、免疫原性粒子は、水に近い密度、一般的に約0.5~1.5g/mlであり、透明、部分的透明、又は不透明であってもよい物質で構成される。免疫原性粒子は、赤血球、白血球、リンパ球、連鎖球菌属(Streptococcus)、黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus)、大腸菌(E. coli)及びウイルス等を含むがこれらに限定されない、細胞及び微生物等の生物学的物質でもよい。粒子はまた、有機及び無機ポリマー、リポソーム、ラテックス、リン脂質小胞、リポソーム、陽イオン性リポソーム、陰イオン性リポソーム、リポタンパク質、リポポリマー等で構成される。

10

【0091】

[0107] 1の態様では、ラモトリジン類似体は、

NHCO(CH₂)₂CONH(CH₂)₂NHCOO-KLH、
 NHCO(CH₂)₂CONH(CH₂)₂NHCO(CH₂)₂COO-KLH、
 NHCO(CH₂)₂CONH(CH₂)₂NHCO(CH₂)₃COO-KLH、
 NHCO(CH₂)₂CONH(CH₂)₂NHCO(CH₂)₆COO-KLH、
 NHCO(CH₂)₂CONH(CH₂)₂NHCH₂PhCOO-KLH、
 NHCO(CH₂)₂CONH(CH₂)₂NHCONH(CH₂)₃COO-KLH、
 NHCO(CH₂)₂CONHCH₂PhCOO-KLH、
 NHCO(CH₂)₂COO-KLH、NHCO(CH₂)₃COO-KLH、
 NH(CH₂)₂NHCO(CH₂)₆COO-KLH、
 NH(CH₂)₂NH(CH₂)₃COO-KLH、NHCH₂PhCOO-KLH、
 NHCOPhCOO-KLH、OOCNH(CH₂)₃COO-KLH、
 NH(CH₂)₃COO-KLH等からなる群から選択される、L-W-X-Y-Zを有することができる。

20

【0092】

[0108] したがって、本発明により調製された免疫原を用いて、ラモトリジン並びにラモトリジン類似体に対する親和性がある抗体を生成することができる。

【0093】

III. ラモトリジン及びラモトリジン類似体に対する抗体

30

[0109] 1の態様では、本発明のラモトリジン類似体に基づく免疫原を、モノクローナル抗体及び/又はポリクローナル抗体を産生するための方法の態様において用いることができる。つまり、ラモトリジンに基づく免疫原から、ラモトリジンと相互作用及び/又は結合する抗体を産生できる。これにより、本発明の類似体が、ラモトリジンの存在を同定するの免疫アッセイで用いるの抗体を調製する場合に有用となることができる。また、免疫原を用いて抗体を産生する方法が当該技術分野に周知である。これにより、ラモトリジンと相互作用及び/又は結合するモノクローナル抗体及び/又はポリクローナル抗体をスクリーニングする場合に、本免疫原を用いることができる。

【0094】

[0110] さらに、抗体を回収する周知の技術により、血清を獲得し、プロセッシング及び/又は精製することができる。つまり、ラモトリジン及びラモトリジン類似体と相互作用及び/又は結合するモノクローナル抗体及び/又はポリクローナル抗体を得ることもできる。これにより、ラモトリジンを認識し、そして免疫診断アッセイに用いる抗体を調製する場合に、ラモトリジン免疫原を用いることができる。

40

【0095】

[0111] 図1は、抗ラモトリジン抗体を得る方法の1の態様10を例示する流れ図であり、ラモトリジン類似体に基づく免疫原を得ることができる(ブロック12)。その後、免疫原を免疫原性配合物と合わせてもよい(ブロック14)。簡潔には、約0.5の免疫原組成物を約0.5mlのフロイント完全アジュバントと混合する; が、他の量の免疫原及び/又はアジュバントを用いてもよい。その後、抗体を産生する被験体に免疫原性

50

配合物を投与してもよく（ブロック16）、被験体は、ラット、マウス、ブタ、ウサギ、鳥類及び／又は他の動物でもよいが、好ましくは哺乳動物である。投与は、尾静脈注射、皮下注射、静脈内注射、又は他の周知の注射部位を介してよい。続いて、最初の投与を受けた動物に、免疫原性追加免疫を投与してもよく（ブロック18）、追加免疫は、最初の配合物と実質的に同一成分を含んでもよく、所定の間隔で投与できる。例えば、最初の投与後、週1回、あるいは他のそれより長い又は短い間隔で、その後追加免疫を行うことができる。少なくとも最初の投与後、そして場合によりその後の追加免疫後、動物により産生される抗ラモトリジン抗体を回収することができる（ブロック20）。以前免疫原を投与された動物由来の血液、血清、血漿、又は他の生物学的試料を得て、抗体を回収できる。場合により、その後、当該技術分野に周知であるように、抗体含有組成物をプロセッシングしてもよく（ブロック22）、当該プロセッシングには、抗体を、免疫診断アッセイを行うのに適した形式にする技術も含まれうる。あるいは、プロセッシングには、周知の技術及び確立された技術による、ELISAを用いた抗体のスクリーニングが含まれうる。つまり、プロセッシングを用いて、ポリクローナル抗体を得ることができ（ブロック24）、これによりポリクローナル抗体を精製することができる（ブロック26）。あるいは、当該技術分野に周知の技術を用いて、モノクローナル抗体を得ることもでき、これによりモノクローナル抗体を精製することもできる。

【0096】

IV. 免疫診断アッセイ

【0112】血液、血漿、血清、組織等の試料中のラモトリジンの存在を同定するため、モノクローナルか又はポリクローナルの抗ラモトリジン抗体を、免疫アッセイで用いることができる。これは、患者又は患者集団におけるラモトリジンの薬物動態学的及び／又は薬力学的パラメーターを同定又はアクセスするのに有益でありうる。したがって、ラモトリジンの存在を同定し、そして場合によりラモトリジン量を定量化するためのアッセイを構成できるように、免疫診断アッセイにおいて、他の抗体の代わりに、抗ラモトリジン抗体を用いてもよい。さらに、免疫診断アッセイは、本発明のラモトリジン類似体又は他のラモトリジン類似体を用いてもよい。

【0097】

A. ラモトリジンに関する蛍光偏光免疫アッセイ

【0113】蛍光偏光免疫アッセイ（FPFA）技術は、試料中の抗原／薬剤と既知の濃度の標識抗原／薬剤との競合的結合に基づく。FPFA技術は、本明細書に援用される米国特許第4,593,089号、第4,492,762号、第4,668,640号、及び第4,751,190号に記載がある。したがって、援用される参考文献に記載されるFPFA試薬、系、及び装置を、抗ラモトリジン類似体抗体でもある抗ラモトリジン抗体とともに用いることができる。

【0098】

【0114】ラモトリジンの存在を同定するため、及び試料中のラモトリジン量を定量化するアッセイで、FPFA技術を用いることができる。部分的に、溶液中の分子の回転特性により、偏光の程度が分子の大きさに正比例させることができるようになる。したがって、偏光は、分子の大きさが大きくなるにつれて高まる。すなわち、溶液中で迅速に回転する小さい蛍光標識又は他の発光標識ラモトリジン又はその類似体を、直線偏光を用いて励起すると、放出される光の偏光は有意に解消される。蛍光標識ラモトリジン又は類似体が、抗体と相互作用するか又は抗体に結合すると、回転が遅くなり、放出される光の偏光が高まる。これは、抗体が有意に測定できる程度に複合体を大きくするためである。また、試料中の非標識ラモトリジン量を増やすと、その結果、抗ラモトリジン抗体による蛍光標識ラモトリジン又は類似体の結合が低下して、試料から放出される光の偏光が低下する。既知の濃度のラモトリジンを用いて、校正の偏光値を測定することにより、偏光と試料中の非標識ラモトリジンの濃度との定量的関係を確立することができる。したがって、FPFAを用いて、試料中のラモトリジンの存在及び濃度を同定することができる。

【0099】

10

20

30

40

50

【0115】本発明の1の態様はFPIAアッセイ系である。FPIA系の構成要素の例としては、以下があげられる：i) ラモトリジン及びラモトリジン類似体へ結合できるモノクローナル又はポリクローナルな抗ラモトリジン抗体；ii) ラモトリジンを含有すると推測される試料；及びiii) フルオレセイン等の蛍光部分で標識されたラモトリジン類似体である。あるいは、試料を除いたキットとして系を提供することができる。さらに、系は、様々な緩衝剤組成物、ラモトリジン濃度勾配組成物又はラモトリジンのストック組成物等を含んでもよい。

【0100】

【0116】図2は、FPIAアッセイを行う方法の1の態様110を例示する流れ図である。つまり、発光標識ラモトリジン又は類似体共役体を得ることができ（ブロック112）、抗ラモトリジン抗体を得ることもできる（ブロック114）。さらに、ラモトリジンを投与された患者由来の、ラモトリジンを含有すると推測される生物学的試料等の試料を得ることもできる（ブロック116）。競合的結合アッセイに用いるため、既知量又は濃度の発光標識ラモトリジン共役体及び抗ラモトリジン抗体を得て、そして標準的緩衝剤系中等で、別の組成物中に配合することもできる（ブロック118）。その後、反応溶液中で、抗ラモトリジン抗体及び発光標識ラモトリジン共役体を生物学的試料と合わせる（ブロック120）。発光標識ラモトリジン共役体と生物学的試料中の未知の量のラモトリジンとの間で、反応溶液中の抗ラモトリジン抗体との競合反応が生じる（ブロック122）。適切な期間及び/又は競合後、発光共役体に照射するが（ブロック124）、これは光照射、化学薬品照射、温度照射等によってもよい。その後、照射により放出される光の偏光を測定し（ブロック126）、そして既知量のラモトリジン及び/又は発光共役体の偏光値と比較し（ブロック128）、これを用いて、試料中にラモトリジンが存在するか否かを決定することができる（ブロック130）。さらに、既知の濃度の標準から得た標準化測定値と生物学的試料から得た測定値の比較を用いて、試料中のラモトリジン量を定量化することができ（ブロック132）、それにより、患者におけるラモトリジン量を同定することができる（ブロック134）。

【0101】

B. ラモトリジンに関する均一系微粒子免疫アッセイ

【0117】免疫比濁アッセイという、均一系微粒子免疫アッセイ（「HMI」）技術は、溶液中の粒子及び化合物の凝集に基づく。粒子及び/又は化学的化合物が凝集すると、粒子の大きさが増して溶液の濁度が高まる。したがって、試料中のラモトリジンの存在、及び場合により量を評価するため、微粒子及びラモトリジン類似体と共に抗ラモトリジン抗体を用いることができる。免疫アッセイは血液、溶血溶液、血清、血漿、組織、及び/又は他の試料で行うことができるため、HMI技術は好適でありうる。微粒子上に装填されたラモトリジン及び/又は類似体を用いるか、あるいは微粒子上に装填された抗ラモトリジン抗体を用いて行うように、HMIアッセイを設定することもできる。微粒子に効率的に装填できるため、微粒子上に装填された類似体を用いることが特に好適でありうる。いずれにしても、HMI又は免疫比濁アッセイは試料中の物質の凝集を測定するものとして、当該技術分野に周知である。

【0102】

【0118】免疫比濁アッセイ技術は、参照により本明細書に含まれる、米国特許第5,571,728号、第4,847,209号、第6,514,770号、第6,248,597号に記載される。簡潔には、均一系アッセイ法では、主に光減衰、ネフェロメトリー法、又は比濁法を用いる。試料内に導かれた入射光線の分散又は吸収で生じる変化により、ラモトリジン（A）及び抗ラモトリジン抗体微粒子結合パートナー（B）からの凝集化合物ABの形成を測定することができる。あるいは、抗ラモトリジン抗体（A）を、微粒子上に装填されたラモトリジン又は類似体と結合させることもできる。結合パートナーが固定された懸濁可能な粒子を用いると、効果が増進され、これによりかなり低濃度でもラモトリジン濃度を測定することができる。これらの均一系法は、迅速かつ簡易に実行でき、そして特に、以下により詳細に記載するような試料分析自動化が可能になる。

【 0 1 0 3 】

[0 1 1 9] 例えば、大量スクリーニング用途では、分析法は完全に自動化されていることが望ましい。つまり、分析物との特異的反応の結果、増感されたラテックス粒子等の粒子による光散乱の変化を検出する装置を設計することができる。当該装置を利用するアッセイは、ラテックス粒子懸濁物の表面積が広く及び光散乱の物理的原理のため、高感度になりうる。検出の主な原理としては、2以上の粒子が凝集中に緊密に接触するようになる際の光散乱変化があげられる。光線が非凝集粒子を含有する反応セルを通過する際、粒子による屈折、反射、吸収、及び回折のため、ある程度の光散乱がありうる。したがって、この原理は、ラモトリジン等の標的分析物の粒子凝集の阻害能を測定するために有益でありうる。抗体/抗原結合の初期段階中、複合体が形成され始める際に、これらの複合体は、より大きい粒子のように作用するため、散乱光強度の角度分布を実質的に変更することができる。以下により詳細に記載するような比濁検出及び他の方法により、凝集により、より大きい粒子が生成した結果の光散乱変化を測定することができる。Seradynのラモトリジン Q M S (登録商標) 試薬は、完全な自動化を可能にし、多くの臨床的化学反应分析装置に適用できる。

10

【 0 1 0 4 】

[0 1 2 0] 図3は、ラモトリジン等の遊離薬剤を有する生物学的試料、及びラモトリジン類似体でもよいハプテンをコーティングした粒子試薬と、抗体緩衝液を合わせる競合アッセイの図解である。生物学的試料がほとんど又は全くラモトリジンを含有しない場合、凝集は阻害されない。試料中のラモトリジン量が増加しても、部分的な凝集しかおこらず、部分的にしか阻害されない。さらに、試料中に多量のラモトリジンがあれば、凝集の完全阻害が起こりうる。したがって、凝集の分析を用いて、ラモトリジンの存在を同定することができる。また、図4に示すようなラモトリジン濃度の標準化曲線を用いて、凝集からの吸光度変化に基づき、試料中のラモトリジン量を同定することができる。

20

【 0 1 0 5 】

i . ラモトリジンが装填された微粒子

[0 1 2 1] 図5は、H M I アッセイを行う方法の1の態様210を例示する流れ図である。これによれば、ラモトリジン類似体を得て(ブロック212)、微粒子上に装填してもよく(ブロック214)、微粒子は例えば、Seradyn, Inc. (インディアナ州インディアナポリス)により製造及び/又は販売されるもので、ポリスチレン、カルボキシレートで修飾されたポリスチレン、ストレプトアビジンをコーティングした磁気粒子等が含まれてもよい。ラモトリジンを投与された患者由来で、ラモトリジンを含有すると推測される生物学的試料等の試料を得ることもできる(ブロック216)。本発明により、ラモトリジン及びラモトリジン類似体に特異的に結合できるモノクローナル又はポリクローナル等の抗ラモトリジン抗体を得た(ブロック218)後、場合により、標準的緩衝剤系に配合する(ブロック220)。その後、抗体組成物をラモトリジン微粒子及び生物学的試料と合わせ(ブロック222)るが、抗体及び微粒子に結合したラモトリジン類似体の量は既知である。微粒子上に固定されたラモトリジン類似体と生物学的試料中のラモトリジンとの間で、反応溶液中の限定量の抗ラモトリジン抗体への結合に関して、競合反応が起こる(ブロック224)。ラモトリジンが装填された微粒子の抗体での凝集は、生物学的試料中のラモトリジンの存在により阻害されるが、凝集阻害は生物学的試料中のラモトリジン濃度に正比例する。これにより、周知の比濁アッセイで、試料中のラモトリジンの存在を測定できるようになる(ブロック226)。さらに、既知の濃度の標準から得た標準化測定値と生物学的試料から得た測定値との比較を用いて、試料中のラモトリジン量を定量化して(ブロック228)、患者のラモトリジン量を同定することもできる(ブロック230)。

30

40

【 0 1 0 6 】

[0 1 2 2] 本発明の1の態様はラモトリジンが装填された微粒子のH M I アッセイ系である。H M I 系の構成要素の例としては以下があげられる：i) ラモトリジン及びラモトリジン類似体に結合できるモノクローナル又はポリクローナル抗ラモトリジン抗体；i

50

i) ラモトリジン含有すると推測される試料；及び i i i) ポリスチレン微粒子等の微粒子にカップリングしたラモトリジン類似体。あるいは、試料を含まないキットとして系を提供することもできる。さらに、系には、様々な緩衝剤組成物、ラモトリジン濃度勾配組成物又はラモトリジンのストック組成物等を含んでもよい。

【0107】

i i . 抗ラモトリジン装填微粒子

[0123] ラモトリジンが装填された微粒子に関して、上記と類似の他の態様では、ラモトリジン及びラモトリジン類似体に結合できる抗ラモトリジン抗体を微粒子上に装填する。ラモトリジン類似体には、選択した作用基、例えばウシ血清アルブミン、オボアルブミン、デキストラン等を含んでもよい。ラモトリジン類似体と患者試料中のラモトリジンとの間で、微粒子上に固定された抗ラモトリジン抗体への結合に関して競合反応が起こる。ここでも、患者試料中に薬剤があると粒子の凝集は阻害される。

10

【0108】

[0124] 図6は、HMIアッセイを行う方法の他の態様310を例示する流れ図である。これにより、ラモトリジン及びラモトリジン類似体に特異的に結合できる抗ラモトリジン抗体を得て(ブロック312)、微粒子上に装填することができる(ブロック314)。ラモトリジンを投与された患者由来で、ラモトリジン含有すると推測される生物学的試料等の試料を得ることもできる(ブロック316)。適切な作用基を含むラモトリジン類似体を得ることができる(ブロック318)。競合的結合アッセイで用いるために、既知量又は濃度のラモトリジン類似体及び抗ラモトリジン抗体が装填された微粒子を標準的緩衝剤系等の他の組成物中に配合する(ブロック320)。その後、抗体-微粒子組成物を、ラモトリジン類似体組成物及び生物学的試料と合わせる(ブロック322)。反応溶液中、ラモトリジン類似体と生物学的試料中のラモトリジンとの間で、微粒子上に固定された抗ラモトリジン抗体との競合反応が起こる(ブロック324)。生物学的試料中のラモトリジンが存在すると、抗ラモトリジン抗体が装填された微粒子のラモトリジン類似体の凝集は阻害され、この凝集阻害は、生物学的試料中のラモトリジン濃度に正比例する。これにより、周知の比濁アッセイで試料中のラモトリジンの存在を測定できるようになる(ブロック326)。さらに、既知の濃度の標準から得た標準化測定値と生物学的試料から得た測定値との比較を用いて、試料中のラモトリジン量を定量化することにより(ブロック328)、患者のラモトリジン量を同定することもできる(ブロック330)。

20

30

【0109】

[0125] 本発明の1の態様は、抗ラモトリジン抗体が装填された微粒子のHMIアッセイ系である。HMI系の構成要素の例としては、以下があげられる：i) ラモトリジン及びラモトリジン類似体に結合できるモノクローナル又はポリクローナル抗ラモトリジン抗体が装填された微粒子；i i) ラモトリジン含有すると推測される試料；及び i i i) 場合により巨大分子又は他の担体を含みうるラモトリジン類似体。あるいは、試料を除いたアッセイ系を提供することもでき、試料を後で、又は他の供給源から提供することもできる。さらに、アッセイ系には、様々な緩衝剤組成物、ラモトリジン濃度勾配組成物、あるいはラモトリジン又は類似体のストック組成物等が含まれてもよい。

40

【0110】

C . ラモトリジンのクローニング酵素供与体免疫アッセイ

[0126] クローニング酵素供与体免疫アッセイ(「CEDIA(登録商標)」、Roche Diagnosticsの商標)は、治療薬の存在を同定し、定量的測定を行うための非常に正確でそして有効な方法であることが立証されている。CEDIA(登録商標)技術は、以下の特許に詳細に記載されている：(a)競合的均一系アッセイ法を開示する米国特許第4,708,929号；(b)酵素供与体断片をコードする組換えDNA配列及び当該ベクターの宿主を開示する米国特許第5,120,653号；(c)酵素供与体断片のアミノ酸配列を開示する米国特許第5,604,091号；及び(d)CEDIAアッセイ用のキットを解説する米国特許第5,643,734号、ここで上記特許はすべて本明細書に援用される。簡潔には、CEDIA(登録商標)技術は、ラモトリジンに特異的に結合

50

できる抗体への結合に関する、大腸菌由来の - D - ガラクトシド・ガラクトヒドロラーゼ又は - ガラクトシダーゼ (「gal」) 由来等の、遺伝子操作された不活性酵素 - 供与体 (「ED」) 断片に共役化された類似体と、生物学的試料中のラモトリジンの競合に基づく。ラモトリジンが試料中に存在する場合、ラモトリジンが抗体に結合して、ED - 類似体共役体の ED 部分が自由になり、酵素受容体 (「EA」) 断片と会合できるようになるため、反応混合物中で - D - ガラクトシド・ガラクトヒドロラーゼ又は gal の酵素活性が回復する。その後、適当な基質に曝露されると、活性酵素を定量化できる反応産物を生じることができるようになる。好ましい基質はクロロフェノールレッド - D - ガラクトピラノシド (「CPRG」) であり、ED 及び EA 断片を有する活性酵素に切断されて、ガラクトース及び CPR になることができ、約 570 nm の波長の吸光度で CPR を測定する。ラモトリジンが試料中に存在しない場合、抗体は、ED - 類似体共役体に結合して、ED 断片と EA 断片の会合を阻害して酵素活性の回復を阻害する。反応産物の量及び生じる吸光度変化は試料中のラモトリジン量に比例する。

10

20

30

40

50

【0111】

[0127] 図7は、CEDIA (登録商標) アッセイを行う方法の1の態様410を例示する流れ図である。これにより、ラモトリジン - ED 共役体を得ることができるが (ブロック412)、ラモトリジン類似体と ED を共役化しても得ることができる。また、ED と対応する EA を得ることができる (ブロック414)。さらに、ラモトリジンを投与した患者由来の、ラモトリジン含有すると推測される生物学的試料等の試料を得ることもできる (ブロック416)。本発明記載の方法により、ラモトリジン - ED 共役体とも相互作用できる抗ラモトリジン抗体を得ることができる (ブロック418)。競合的結合アッセイで用いるため、既知量又は濃度のラモトリジン - ED 共役体、EA 及び抗ラモトリジン抗体を得て、標準的緩衝剤系等の他の組成物中に配合する (ブロック420)。その後、反応溶液中で、ラモトリジン - ED 共役体及び抗体を生物学的試料と合わせる (ブロック422)。場合により、この時点又は抗体との競合的相互作用が起きるのに十分な時間の経過後、反応溶液中で EA もまた合わせる。ラモトリジン - ED 共役体と生物学的試料中のラモトリジンとの間で、反応溶液中の抗ラモトリジン抗体との競合反応が起こる (ブロック424)。競合反応後に EA を反応溶液中に導入した後、ED - EA 酵素を切断することのできる基質を反応溶液中に導入する (ブロック426)。ED - EA 酵素と酵素を切断することのできる基質との間の酵素活性を測定するが (ブロック428)、切断産物の吸光度を測定するか又は他の周知の測定技術で測定することもできる。酵素活性の測定を用いて、試料中にラモトリジンが存在するか否かを決定することもできる (ブロック430)。さらに、既知の濃度の標準から得た標準化測定値と生物学的試料から得た測定値の比較を用いて、試料中のラモトリジン量を定量化することもできる (ブロック432)、それにより、患者のラモトリジン量を同定することもできる (ブロック434)。

【0112】

[0128] 本発明の1の態様は CEDIA (登録商標) アッセイ系である。CEDIA (登録商標) 系の構成要素の例としては以下があげられる：i) ラモトリジン、ラモトリジン類似体及び / 又はラモトリジン - ED 又はラモトリジン - EA に結合できるモノクローナル又はポリクローナル抗ラモトリジン抗体；ii) ラモトリジン含有すると推測される試料；iii) ED 又は EA にカップリングしたラモトリジン類似体；並びにiv) ED 及び EA が系に存在するように、酵素活性を回復するためにラモトリジン - ED 又はラモトリジン - EA と会合するような、ED 又は EA の一方。また、試料を除いてキットとしてアッセイ系を提供することもできる。さらに、アッセイ系は、様々な緩衝剤組成物、ラモトリジン濃度勾配組成物又はラモトリジンのストック組成物等を含んでもよい。

【0113】

D. ラモトリジンの化学発光不均一系免疫アッセイ

[0129] また、化学発光微粒子免疫アッセイ (「CMIA」) 技術を用いた競合的アッセイを用いて試料中にラモトリジンが存在するか否かを評価することもできる。不均一

系免疫アッセイの技術分野で、試料中の化学物質の存在及び／又は量を決定するための様々な種類のC M I A技術が周知であり、C M I A技術のいくつかは、本明細書に援用される、米国特許第6,448,091号、第5,798,083号、及び第5,834,206号に例示される。当該C M I Aアッセイには、特定の磁気粒子、又はろ過、沈降、及び／又は他の手段による分離に適した粒子等の粒子にカップリングした、ラモトリジン及びその類似体に特異的に結合できる抗ラモトリジン抗体を用いることを含む。さらに、適当な化学発光部分、例えばアクリジニウムエステルに連結されたラモトリジン類似体を含んでもよいトレーサーを用いて、粒子上の限定される量の抗ラモトリジン抗体に関して、患者試料中の遊離ラモトリジンと競合させることもできる。試料、トレーサー、及び抗体粒子が相互作用し、ルーチンの洗浄工程により未結合トレーサーを除去した後、抗体粒子に結合したトレーサーの量を、相対光単位(R U L E)で表される化学発光で測定することもできる。化学発光の量は、患者試料中の遊離薬剤の量に反比例し、既知の値の薬剤を用いた標準曲線を構築して、濃度を決定する。

10

20

30

40

50

【0114】

[0130] 図8は、C M I Aアッセイを行う方法の1の態様510を例示する流れ図である。これによれば、抗ラモトリジン抗体-粒子共役体を得ることができ(ブロック512)、これは、磁気粒子等の粒子と抗体をカップリングすることにより実行される。また、化学発光部分を有するラモトリジン類似体を含むトレーサー化合物を得ることができる(ブロック514)。さらに、ラモトリジンを投与された患者由来で、ラモトリジン含有すると推測される生物学的試料等の試料を得ることができる(ブロック516)。競合的結合アッセイで用いるために、既知量又は濃度のトレーサー及び抗ラモトリジン抗体-粒子共役体を、標準的緩衝剤系等の他の組成物中に配合することもできる(ブロック518)。その後、反応溶液中で抗ラモトリジン抗体-粒子共役体及びトレーサーを生物学的試料と合わせる(ブロック520)。反応溶液中、トレーサーと生物学的試料中のラモトリジンとの間で、抗ラモトリジン抗体-粒子共役体との競合反応が起こる(ブロック522)。十分な期間及び／又は結合競合の後、抗体-粒子共役体を反応溶液から分離する(ブロック524)。場合により、洗浄又は他の分離技術により、抗体-粒子共役体から未結合ラモトリジン及び／又はトレーサーを除去することができる(ブロック526)。化学発光部分が、リン光、蛍光、又は測定できる他の発光による光を放出するようにトレーサーを励起して化学発光量を決定することができる(ブロック528)。しばしば、化学発光は、R L Uで測定される蛍光である。化学発光の測定を用いて、ラモトリジンが試料中に存在するか否かを決定することもできる(ブロック530)。さらに、既知の濃度の標準から得た標準化測定値と生物学的試料から得た測定値との比較を用いて、試料中のラモトリジン量を定量化し(ブロック532)、それから患者のラモトリジン量を同定することもできる(ブロック534)。

【0115】

[0131] 本発明の1の態様はC M I Aアッセイ系である。C M I A系の構成要素の例としては以下があげられる：i) ラモトリジン及びラモトリジン類似体に結合できるモノクロール又はポリクロール抗ラモトリジン抗体が装填された粒子又は微粒子；ii) ラモトリジン含有すると推測される試料；及びiii) 類似体トレーサー。または、試料を除いてキットとしてアッセイ系を提供することもできる。さらに、系には、様々な緩衝剤組成物、ラモトリジン濃度勾配組成物、あるいはラモトリジン又は類似体のストック組成物等が含まれてもよい。

【0116】

E. ラモトリジンの他の免疫アッセイ

[0132] 本明細書記載のラモトリジン類似体、共役体、抗体、免疫原及び／又は他の共役体はまた、酵素又は蛍光を含むがこれらに限定されないある範囲の検出系を用いた、いくつかの他の不均一系免疫アッセイ、及び／又は迅速側方流動アッセイを含むがこれらに限定されない均一系免疫アッセイ、及び抗体アレイ、並びに未だに開発されていない形式のいずれにも適している。

【 0 1 1 7 】

[0 1 3 3] ラモトリジン類似体、共役体、抗体、免疫原及び/又はトレーサーを利用する、様々な免疫診断アッセイを本明細書に記載しているが、当該技術分野で周知のように、当該アッセイを修飾することもできる。つまり、本発明の範囲内で当該免疫アッセイを行うための工程又は行為に様々な修飾を施すこともできる。

【 0 1 1 8 】

実施例

[0 1 3 4] 以下の実施例は、予防の態様を例示するために提供され、限定することを意図するものではない。したがって、ある例は実験を介して行われ、そしてあるものは当該技術分野に周知の技術、標準、及び結果に基づく予測である。また、本発明には、実施例に例示されない他の態様が含まれることが明らかであるべきである。さらに、本発明により調製されるラモトリジン類似体、抗原、免疫原、及び抗ラモトリジン抗体を用いて、当該技術分野で周知の実験プロトコルを用いて多くの例が実行されている。したがって、こうした例は、すべて本明細書に援用される、以下の参考文献により補完される：(a) Caryl Griffinら, *Microparticle Reagent Optimization: A Laboratory Reference Manual from the Authority on Microparticles*, Seradyn(1994) ; 及び (b) Boehringer Mannheim Corporation Technical Publications Department, *Hitachi Operation Manual: Version B*, Boehringer Mannheim Corporation Laboratory Diagnostic Division(1992) ; 及び (c) N C C L S 認可指針、2004年8月。

10

【 実施例 1 】

20

【 0 1 1 9 】

[0 1 3 5] 図9は、ラモトリジン(1)を5-中間体及び5-スクシニルアミノラモトリジン誘導体(「74W86」)(4)に変換する化学反応の模式図で、さらに本発明の様々なラモトリジン類似体に合成することができる。これによれば、ラモトリジン(1)を硝酸及び硫酸の混合物で処理し、5-ニトラモトリジン類似体(2)を形成する。その後、5-ニトラモトリジン類似体(2)を単離し、水素及びPd触媒で還元し、生じる5-アミノラモトリジン類似体(3)を形成し、これを無水コハク酸でアシル化して、ラモトリジンの5-スクシニルアミノ誘導体(「74W86」)(4)を形成する。その後、ラモトリジンの5-スクシニルアミノ誘導体(「74W86」)(4)を精製する。

30

【 実施例 2 】

【 0 1 2 0 】

[0 1 3 6] 図10は、担体タンパク質等にカップリングする効率を改善するため、74W86(4)をNHS-活性エステル型に変換する化学反応の模式図である。これによれば、実施例1記載の化学反応を介して得た74W86(4)をNHSで修飾して、5-NHS-74W86(5)であるラモトリジンの活性化エステル誘導体を得る。活性エステル5-NHS-74W86(5)は、タンパク質内のリジンのアミン、及び他のアミン基と直接反応するため、担体タンパク質又は他の部分に効率的にカップリングできる。また、5-NHS-74W86(5)を、担体タンパク質に既に共役化されている連結基にカップリングしてもよく、リンカーには、アミド連結基を形成するアミン基が含まれる。

40

【 0 1 2 1 】

[0 1 3 7] 具体的には、25mlの無水DMF中の745mgの74W86(4)の溶液を0に冷却し、0.7mlのN,N-ジイソプロピルエチルアミンを添加して反応混合物を形成する。785mgのO-(N-スクシンイミジル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレートを添加して反応混合物を反応させる。反応混合物を室温まで加温して一晩攪拌する。反応混合物を減圧下で濃縮し、溶出剤として酢酸エチル/メタノールを用いたフラッシュカラムクロマトグラフィーで残渣を精製して、およそ500mgの活性エステル誘導体5-NHS-74W86(5)を得る。

【 実施例 3 】

【 0 1 2 2 】

50

[0 1 3 8] 続いて図 1 0 を参照して、実施例 2 の化学反応を介して得られる 5 - N H S - 7 4 W 8 6 (5) ラモトリジン類似体を連結基と共役化する。より具体的には、5 - N H S - 7 4 W 8 6 (5) 類似体をエチレンジアミン等のアルキルジアミンと反応させて、ラモトリジン類似体 5 - エチレンジアミン 7 4 W 8 6 (6) を産生させる。3 m l の無水 D M F 中の 3 0 0 m g の 5 - N H S - 7 4 W 8 6 (5) の溶液に、0 . 5 m l のエチレンジアミンを添加して反応混合物を形成して反応を行う。反応混合物を室温で一晩攪拌して減圧下で乾燥するまで濃縮する。溶出剤としてメタノール/水酸化アンモニウムを用いたフラッシュカラムクロマトグラフィーで乾燥残渣を精製して、およそ 2 0 0 m g のラモトリジン類似体 5 - エチレンジアミン 7 4 W 8 6 (6) を得る。他の連結基との共役化のため、5 - エチレンジアミン 7 4 W 8 6 (6) を活性化するか、又は他の分子上のカルボキシル基と直接反応させることもできる。

10

【実施例 4】

【 0 1 2 3 】

[0 1 3 9] 続いて図 1 0 を参照して、実施例 3 の化学反応を介して得られる 5 - エチレンジアミン 7 4 W 8 6 (6) ラモトリジン類似体を連結基とさらに共役化する。より具体的には、無水コハク酸と反応させて、5 - エチレンジアミン 7 4 W 8 6 (6) をアシル化し、5 - ラモトリジン類似体 (7) を形成する。5 m l の無水 D M F 中の 7 5 m g のラモトリジン誘導体 (6) の懸濁物に、約 0 . 2 m l の N , N - ジイソプロピルエチルアミンを添加して反応混合物を形成して、反応を行う。反応混合物を 5 分間攪拌した後、8 3 m g の無水コハク酸を添加する。反応混合物を 2 時間攪拌して減圧下で乾燥するまで濃縮する。溶出剤としてメタノール/酢酸エチルを用いたフラッシュカラムクロマトグラフィーで乾燥残渣を精製して、およそ 2 0 0 m g の 5 - ラモトリジン類似体 (7) を得る。

20

【実施例 5】

【 0 1 2 4 】

[0 1 4 0] 続いて図 1 0 を参照して、実施例 3 の化学反応を介して得られる 5 - エチレンジアミン 7 4 W 8 6 (6) ラモトリジン類似体を連結基とさらに共役化する。より具体的には、スベリン酸ジスクシンイミジル (「 D S S 」) と反応させて 5 - エチレンジアミン 7 4 W 8 6 (6) をアシル化し、5 - ラモトリジン類似体 (8) を形成する。6 m l の D M F 中の 2 g の D S S の溶液に、約 0 . 2 m l の N , N - ジイソプロピルエチルアミンを添加して、氷槽中で冷却した後、1 5 m l の無水 D M F 中の 3 2 7 m g の 5 - エチレンジアミン 7 4 W 8 6 (6) の懸濁物を添加して反応混合物を形成して反応を行う。反応混合物を 4 時間攪拌して減圧下で乾燥するまで濃縮する。溶出剤としてメタノール/酢酸エチルを用いたフラッシュカラムクロマトグラフィーで残渣を精製して、およそ 3 5 0 m g の 5 - ラモトリジン類似体 (8) を得る。

30

【実施例 6】

【 0 1 2 5 】

[0 1 4 1] 続いて図 1 0 を参照して、5 - N H S - 7 4 W 8 6 (5) ラモトリジン類似体を連結基とさらに共役化する。これによれば、磁気スターラーを含む丸底フラスコ中で、約 5 9 m g の 5 - N H S - 7 4 W 8 6 (5) 及び 4 0 m g のメチル 4 - アミノメチルベンゾエート塩酸を合わせる。約 2 m l の無水 D M F 及び 0 . 1 m l の N , N - ジイソプロピルエチルアミンをフラスコに添加して 6 0 の油槽中、A r 下で攪拌する。2 4 時間後反応を停止する。減圧下で揮発物を蒸発させて溶出剤として酢酸エチル/メタノールを用いたフラッシュカラムクロマトグラフィーで残渣を精製して、2 0 m g のラモトリジン類似体 (9) を得る。

40

【実施例 7】

【 0 1 2 6 】

[0 1 4 2] (実施例 7)

[0 1 4 3] 図 1 1 は、ラモトリジンを 4 - 中間体及び 4 - スクシニルアミノラモトリジンに変換するための化学反応の模式図である。これによれば、ラモトリジンを硝酸及び硫酸の混合物で処理して 4 - ニトロラモトリジン (1 0) を形成する。4 - ニトロラモト

50

リジン(10)中間体を単離してPd触媒を介して水素で還元し、4-アミノラモトリジン(11)中間体を形成した後無水コハク酸でアシル化し、4-スクシニルアミノラモトリジン(12)類似体を形成する。4-スクシニルアミノラモトリジン(12)類似体を精製後、本発明の類似体及び共役体を形成するため、リンカー基又は担体部分とさらに反応させてもよい。

【実施例8】

【0127】

[0144] 続いて図11を参照して、4-スクシニルアミノラモトリジン(12)類似体をNHSと反応させて4-NHS-スクシニルアミノラモトリジン(13)類似体等の活性化エステルを形成する。これによれば、4-スクシニルアミノラモトリジン(12)類似体を、実施例2と実質的に類似の反応条件下でNHSと反応させる。その後、4-NHS-スクシニルアミノラモトリジン(13)類似体を精製する。

10

【実施例9】

【0128】

[0145] 図12は、ラモトリジンを3-中間体及び3-スクシニルラモトリジン(14)に変換する化学反応の模式図である。これによれば、約1.0mlのN,N-ジイソプロピルエチルアミンを、30mlの無水DMF中の2gのラモトリジンの溶液に添加する。混合物を5分間攪拌した後、600mgの無水コハク酸を添加して反応混合物を形成する。反応混合物を一晩攪拌して減圧下で乾燥するまで濃縮する。溶出剤としてメタノール/水酸化アンモニウムを用いたフラッシュカラムクロマトグラフィーで乾燥残渣を精製して、以下LがNHである式4Aで特定される、およそ1gの3-スクシニルラモトリジン(14)を得る。

20

【実施例10】

【0129】

[0146] 続いて図12を参照して、3-スクシニルラモトリジン(14)を活性エステルに修飾する。これによれば、20mlの無水DMF中の400mgの3-スクシニルラモトリジン(14)の溶液を0℃に冷却して、0.3mlのN,N-ジイソプロピルエチルアミンを添加して反応混合物を形成する。その後、約450mgのO-(N-スクシンイミジル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート反応混合物に添加する。反応混合物を室温に加温して4時間攪拌する。その後、反応混合物を濃縮し、減圧下で乾燥残渣を得て、溶出剤として酢酸エチル/メタノールを用いたフラッシュカラムクロマトグラフィーで乾燥残渣を精製し、およそ235mgの3-NHS-スクシニルラモトリジン(14)を得る。

30

【実施例11】

【0130】

[0147] 図13A~13Dは、ラモトリジン類似体をラモトリジン類似体共役体に変換する化学反応の模式図であり、本ラモトリジン類似体共役体を免疫原として用いて、本明細書に記載の様々な免疫診断アッセイで用いる抗ラモトリジン抗体や共役体を産生することができる。より詳細には、ラモトリジン類似体(7)、(13)、(15)及び(8)の活性エステルを、キーホールリンペット・ヘモシアニン(「KLH」)等の免疫原性担体タンパク質にカップリングすることができる。図13Aは、長いリンカーを有する5-KLH-ラモトリジン類似体共役体である免疫原(16)を形成するのに用いた典型的な合成法を例示する概略図である。氷槽中で、8mlのPBS(0.1Mリン酸ナトリウム、0.15M塩化ナトリウムpH7.2)中の80mgのKLHの溶液を冷却して反応を行う。次に、1mlのPBS緩衝液pH7.2中の18mgの5-ラモトリジン類似体(7)の溶液を、タンパク質溶液に滴下し、反応混合物を形成する。反応混合物を室温で10分間攪拌した後、0.5mlのDI水中の60mgのEDAC[1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸]を添加して30分間攪拌する。生じた共役体を透析チューブ(10,000MWカットオフ)に入れて、PBS、pH7.2中、4℃で透析後、pH7.2のPBSと5回交換する(各1リットル、少なくとも各

40

50

々6時間)。BCAアッセイを用いて生じた免疫原(16)のタンパク質濃度を決定する。

【実施例12】

【0131】

[0148] 図13Bは、他の免疫原(17)を提供する他の化学反応を例示する概略図である。6mlのPBS、pH7.2(0.1Mリン酸ナトリウム、0.15M塩化ナトリウム)中の60mgのKLHの溶液を氷槽中で冷却後、3.8mlのDMSOをKLH溶液に滴下して室温以下に維持する。1mlのDMSO中の17.4mgのラモトリジン類似体(13)の溶液をタンパク質溶液に滴下して反応混合物を形成する。反応混合物を室温で40時間攪拌する。生じた共役体、4-KLH免疫原(17)を透析チューブ(10,000MWカットオフ)に入れて、1lのpH7.2 PBS中の35%DMSO、1lのpH7.2 PBS中の10%DMSO、及び1lのPBS中の10%DMSOの連続透析槽中で室温で透析後、4でPBSと4回交換する(各1リットル、少なくとも各々6時間)。本明細書に記載し、当該技術分野に周知である方法で、ラモトリジン及びラモトリジン類似体と相互作用して結合できるモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を調製する際に免疫原(17)を用いる。

10

【実施例13】

【0132】

[0149] 図13Cは、他の免疫原(18)を提供する他の化学反応を例示する概略図である。つまり、6mlのPBS、pH7.2(0.1Mリン酸ナトリウム、0.15M塩化ナトリウム)中の60mgのKLHの溶液を氷槽中で冷却後、3.8mlのDMSOをKLH溶液に滴下して室温以下に維持する。1mlのDMSO中の12.7mgのラモトリジン類似体(15)の溶液をタンパク質溶液に滴下し、反応混合物を形成する。反応混合物を室温で40時間攪拌する。生じた共役体を透析チューブ(10,000MWカットオフ)に入れて、1lのPBS、pH7.2中の35%DMSO、1lのPBS、pH7.2中の10%DMSO、1lのPBS、pH7.2中の10%DMSO中、室温で連続透析後、4でPBS、pH7.2と4回交換する(各1リットル、少なくとも各々6時間)。BCAアッセイを用いて、免疫原(18)のタンパク質濃度を、およそ2.17mg/mlと決定する。生じた免疫原(18)、及び類似の化学反応を用いて調製される他の免疫原を用いて、本明細書に記載し、当該技術分野に周知である方法でモノクローナル及び/又はポリクローナル抗体を産生することができる。

20

30

【実施例14】

【0133】

[0150] 図13Dは、他の免疫原(19)を提供する他の化学反応を例示する概略図である。これによれば、出発材料であるラモトリジン類似体(8)と共に、実施例11~13に記載する反応と実質的に類似の反応スキームを用いることもできる。簡潔には、6mlのPBS、pH7.2(0.1Mリン酸ナトリウム、0.15M塩化ナトリウム)中の60mgのKLHの溶液を氷槽中で冷却して3.8mlのDMSOをKLH溶液に滴下し、室温以下に維持する。1mlのDMSO中の17.4mgのラモトリジン誘導體(8)の溶液をタンパク質溶液に滴下し、反応混合物を形成する。反応混合物を室温で40時間攪拌する。生じた共役体、5-KLH類似体(19)を透析チューブ(10,000MWカットオフ)に入れて、1lのPBS、pH7.2中の35%DMSO、1lのPBS、pH7.2中の10%DMSO、1lのPBS、pH7.2中の10%DMSO中、室温で透析後、4でPBS、pH7.2と4回交換する(各1リットル、少なくとも各々6時間)。生じた5-免疫原(19)、及び類似の化学反応を用いて調製される他の免疫原を用いて、本明細書に記載し、当該技術分野に周知である方法でモノクローナル及び/又はポリクローナル抗体を産生することができる。

40

【実施例15】

【0134】

[0151] さらに、図13Eは、実施例10~13と類似の反応スキームを例示する

50

概略図で、ラモトリジン類似体(5)を用いて対応する免疫原(20)を作製することができる。しかし、免疫原(19)の5位のリンカーが短いことが測定されており、74W86-免疫原の性質が極性であるため、劣ることを示すデータしか得られなかった。

【実施例16】

【0135】

[0152] 図14Aは、ラモトリジン類似体をラモトリジン類似体共役体に変換する化学反応の模式図であり、抗原、競合剤、及び本明細書に記載の様々な免疫診断アッセイで抗ラモトリジン抗体を産生するための免疫原として用いることができる。これによれば、出発材料であるラモトリジン類似体(8)を用いて、実施例11~14の反応と実質的に類似の反応スキームを用いることができる。簡潔には、6mlのPBS、pH7.2(0.1Mリン酸ナトリウム、0.15M塩化ナトリウム)中の60mgのBSAの溶液を氷槽中で冷却して3.8mlのDMSOをKLH溶液に滴下し、室温以下に維持する。1mlのDMSO中の18.2mgのラモトリジン誘導体(8)の溶液をタンパク質溶液に滴下し、反応混合物を形成する。反応混合物を室温で40時間攪拌する。生じた共役体、5-BSA類似体(19)を透析チューブ(10,000MWカットオフ)に入れ、1lのPBS、pH7.2中の35%DMSO、1lのPBS、pH7.2中の10%DMSO、1lのPBS、pH7.2中の10%DMSO中、室温で連続透析後、4でPBS、pH7.2と4回交換する(各1リットル、少なくとも各々6時間)。生じた5-BSA共役体(21)を、本明細書に記載する不均一系及び均一系免疫診断アッセイ、並びにELISAスクリーニング及び他の免疫アッセイで「競合剤」として用いることもできる。また、本発明の抗ラモトリジン抗体を調製するため、特に、BSA部分がKLH部分で置換された免疫原(21)を用いることもできる。

10

20

【実施例17】

【0136】

[0153] 図14Bは、4-NHS-スクシニルアミノラモトリジン類似体(13)を、抗ラモトリジン抗体と相互作用できる抗原に変換する化学反応の模式図である。これによれば、示すように、4-BSA共役体又は抗原(22)を形成するため、4-ラモトリジン類似体(13)を、BSA又はHSA等の担体タンパク質と反応させることができる。合成プロトコルは、実施例16に記載する反応と実質的に類似するものでもよい。

【実施例18】

【0137】

[0154] 図14Cは、示すように、3-NHS-スクシニルラモトリジン類似体(5)を3-BSA共役体又は抗原(23)に変換する化学反応の模式図である。合成プロトコルは、実施例16に記載する反応と実質的に類似するものでもよい。

【実施例19】

【0138】

[0155] 図14Dは、示すように、5-NHS-スクシニルラモトリジン類似体(14)を5-BSA共役体又は抗原(24)に変換する化学反応の模式図である。合成プロトコルは、実施例16、17、及び18に記載する反応と実質的に類似でもよい。しかし、抗原(24)の5位のリンカーが短いことが測定されており、74W86抗原の性質は極性であるため、結果は劣ることを示すデータしか得られなかった。

30

40

【実施例20】

【0139】

[0156] 図15Aは、ラモトリジン類似体をラモトリジン類似体抗原(25)に変換する化学反応の模式図である。アミド結合形成剤を用いて、又は反応性カルボニル中間体を通じて、タンパク質中のカルボキシレート基(アスパラギン酸、グルタミン酸)を誘導体とすることができる。したがって、以下により詳細に記載するように、活性化BSA又はHSAの活性中間体を形成するため、BSA又はHSA等の担体タンパク質を、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸(「EDAC」)で活性化することができる。その後、5-BSA共役体又は抗原(25)を形成するため、活

50

性中間体をラモトリジン類似体(6)にカップリングすることができる。4 mlのPBS、pH 7.2(0.1 Mリン酸ナトリウム、0.15 M塩化ナトリウム)中の51 mgのBSAの溶液を氷槽中で冷却して反応を行い、溶液を氷槽中で30分間攪拌させる。続いて、1 mlのDMSO及び0.4 mlのDMSO中の10 mgのラモトリジン類似体(6)をBSA溶液中に滴下する。該溶液を攪拌しながら室温まで温める。0.4 mlのDI水中の25 mgのEDACの溶液を上記BSAタンパク質溶液に添加する。該溶液を4時間攪拌する。生じた共役体を透析チューブ(10,000 MWカットオフ)に入れて、1 lのPBS、pH 7.2中の30% DMSO、1 lのPBS、pH 7.2中の10% DMSO中、室温で連続透析後、4 でPBS、pH 7.2と4回交換する(各1リットル、少なくとも各々6時間)。BCAアッセイを用いて、生じた免疫原(25)のタンパク質濃度はおよそ6.4 mg/mlと決定する。

10

【実施例 21】**【0140】**

[0157] 図15Bは、ラモトリジン類似体(7)をラモトリジン類似体抗原(26)に変換する化学反応の模式図である。これによれば、EDAC活性化を介して、ラモトリジン類似体(7)を*in situ*で担体タンパク質にカップリングすることができる。生じた免疫原又は共役体(26)を、本明細書に記載する不均一系及び均一系免疫診断アッセイ、並びにELISAスクリーニング及び他の免疫アッセイで、競合剤として用いることができる。また、本発明の抗ラモトリジン抗体を調製するため、特に、BSA部分がKLH部分で置換された免疫原(26)を用いてもよい。したがって、5-ラモトリジン類似体(7)の活性中間体を形成するため、以下に詳細に記載するように、5-ラモトリジン類似体(7)をEDACと反応させてもよい。その後、示すように、5-BSA共役体又は抗原(26)を形成するため、活性中間体をBSA又はHSA等の担体タンパク質とカップリングさせることができる。5 mlのPBS、pH 7.2(0.1 Mリン酸ナトリウム、0.15 M塩化ナトリウム)中の51 mgのBSAの溶液を氷槽中で冷却して反応を行い、溶液を室温に維持する。続いて、1 mlのPBS、pH 7.2緩衝液中の12 mgの5-ラモトリジン類似体(7)の溶液をタンパク質溶液中に滴下する。該溶液を10分間攪拌後、0.5 mlのDI水中の40 mgのEDACを添加する。反応混合物を室温で30分間攪拌させる。生じた共役体を透析チューブ(10,000 MWカットオフ)に入れて、1 l x 7の100% PBS、pH 7.2中で、4 で室温で透析後、PBS、pH 7.2と5回交換する(各1リットル、少なくとも各々6時間)。BCAアッセイを用いて、生じた共役体(26)のタンパク質濃度を、約6.9 mg/mlと決定する。

20

30

【実施例 22】**【0141】**

[0158] 図16Aは、FITC等の蛍光標識とラモトリジン類似体(2)をカップリングする化学反応を例示する概略図である。アルミニウムホイルを巻いた丸底フラスコ中、10 mgのFITC(フルオレセイン-5-イソチオシアネート)、0.1 mlのN,N-ジイソプロピルエチルアミン及び8 mgのラモトリジン類似体(2)の反応溶液を形成する。反応溶液を18時間攪拌して揮発物を減圧下で蒸発させる。残渣をメタノールに再溶解して溶媒、酢酸エチル/メタノールを用いて分離用TLCプレートから精製する。トレーサー(27)をメタノールに溶解してフリーザーに保存する。

40

【実施例 23】**【0142】**

[0159] 図16Bは、FAM等の蛍光標識とラモトリジン類似体(6)をカップリングする化学反応を例示する概略図である。アルミニウムホイルを巻いた丸底フラスコ中、10 mgのFAM(カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル)、0.1 mlのN,N-ジイソプロピルエチルアミン及び12 mgのラモトリジン類似体(6)の反応溶液を調製する。反応溶液を18時間攪拌して揮発物を減圧下で蒸発させる。残渣をメタノールに再溶解して溶媒、酢酸エチル/メタノールを用いて分離用TLCプレートから

50

精製する。トレーサー(28)をメタノールに溶解してフリーザーに保存する。

【実施例24】

【0143】

[0160] ポリクローナル抗血清を得て、ラモトリジン及びラモトリジン代謝産物とポリクローナル抗体の交差反応の量を決定するため、アッセイを行う。既知量のラモトリジンを用いて、本発明により調製した抗ラモトリジン抗体と反応させる。既知の濃度のラモトリジンを用いて、抗体調製物及び以下の代謝産物間の交差反応の量を計算する：N-メチル(29)；N-オキシド(30)；及びN-2グルクロニド(glucuronide)(31)。交差反応性比率は、 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のラモトリジンの観察される濃度を100倍した後、 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の添加した代謝産物の濃度で割ったものに等しい。当該代謝産物を含む標本では交差反応性は見られない。高濃度の当該化合物をヒト血清にスパイクして試料として試験する。代謝産物をアッセイして対照血清(ラモトリジンなし)と比較する。以下の等式を用いて交差反応性を計算する：

10

$$[0161] \quad \text{交差反応性}\% = \frac{\text{回収濃度}}{\text{交差反応物濃度}} \times 100\%$$

[0162] 結果から、 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度では、N-2メチル及びN-2グルクロニドは、交差反応性がないことが示される。また、 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ でのN-2オキシドの交差反応性は3%未満である。

【実施例25】

【0144】

[0163] 免疫原性共役体を有するラモトリジン類似体を用いてラモトリジンに結合するポリクローナル抗体を調製する。より詳細には、KLH免疫原性部分を有するラモトリジン免疫原(20)を用いて、当該技術分野で周知の抗ラモトリジンポリクローナル抗体を生成した。約0.5mlの免疫原(20)含有組成物と約0.5mlのフロイントアジュバントを混合して免疫原性組成物を調製する。その後、生じた1mlの免疫原性カクテルを各ウサギに注射する。続いて、ウサギに抗ラモトリジンポリクローナル抗体を産生させるため、4週毎にウサギに同一カクテルを有する免疫原性注射を施す。以下に記載するように、抗原を用いたELISAを介して番号1309及び1310の2頭のウサギ由来の血清をスクリーニングする。

20

【実施例26】

【0145】

[0164] 実施例25に記載するように調製したポリクローナル抗体を調べるため、ELISAアッセイで用いるELISAプレートを調製した。つまり、様々なラモトリジン抗原(21)、(23)及び(24)を、異なるELISAプレート上にコーティング後、抗ラモトリジンポリクローナル抗体に供して遊離ラモトリジンと競合させた。より詳細には、コーティング緩衝液中でラモトリジン抗原を希釈後、ELISAプレートのウェルに添加した。ELISAプレートを37で60分間インキュベート後、コーティング緩衝液中の溶媒をデカントしてブロッキング緩衝液をプレートに添加した。プレートを再び、37で60分間インキュベートしてブロッキング緩衝液中の溶媒をプレートからデカントした。その後、ウェル中にブロッキング剤を含むELISAプレートを2~8で最長1週間保存した。

30

40

【実施例27】

【0146】

[0165] 実施例26で調製したELISAプレートを用いて、実施例23により調製したポリクローナル抗体の抗体力価を決定した。つまり、連続希釈で各ウェルを同様に $100\mu\text{l}$ の体積とした。pH7.4、0.1%BSAを含有するPBS中、1:10~1:2000で抗体を希釈して調製した。試料を10倍希釈して希釈を1:100からプレートに10倍で連続希釈した。続いて、 $100\mu\text{l}$ の抗体試料をELISAプレート上の各ウェルに添加した。その後、プレートを37で60分間インキュベートして250 μl の0.05% tween含有PBS、pH7.4で3回洗浄した。次に、プレート上

50

で以前コーティングした抗原とは異なる、 $125\ \mu\text{l}$ の希釈した二次抗体共役体（PBS、 $\text{pH}7.4$ 中）を各ウェルに添加した。プレートを 37°C で60分間インキュベート後、 $250\ \mu\text{l}$ の 0.05% tween含有PBS、 $\text{pH}7.4$ で3回洗浄して力価を実験的に決定した。洗浄後、約 $125\ \mu\text{l}$ の $2,2'$ -アジノ-ビス（3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸（「ABTS」）基質をプレート中の各ウェルに添加してプレートを再び20分間インキュベートした。プレートを $405\ \text{nm}$ で読み取り、結果の力価を表1に提供する。

【0147】

表1

【0148】

【表1】

		ELISA力価		
ウサギ番号	免疫原	抗原24	抗原23	抗原21
1309	15	1:12000	1:19000	1:11000
1310	15	1:210	1:1200	1:900

【0149】

【0166】これらの結果は、力価が、微粒子凝集免疫アッセイには十分でなかったことを示す。これは、微粒子凝集免疫アッセイを、少なくとも $1:100,000$ の力価で行わなければならないためである。つまり、免疫原（20）は、商業的免疫診断アッセイプロトコルで用いるのに十分な抗体を生じなかった。

【実施例28】

【0150】

【0167】免疫原（20）を用いて調製した抗ラモトリジン抗体のラモトリジン類似体に対する結合活性を結合阻害研究で決定した。つまり、 $1\ \text{ml}$ の 0.1% BSA含有PBS、 $\text{pH}7.4$ 中で試料を調製した。 $30\% B_{\text{max}}$ 力価又は $50\% B_{\text{max}}$ 力価の組成物を用いて得た力価値をおよそ半分の力価値に割った。したがって、これは、抗ラモトリジン抗体を阻害性タンパク質と混合する場合に起こる $1:1$ 希釈に適応できる。 $30\% B_{\text{max}}$ を用いて試料調製段階中に $1:12000$ の抗体力価を $1:6000$ に希釈する。その後、異なる濃度又は標準物質値（ $0, 2.5, 5, 10, 20, 40\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ）の約 $50\ \mu\text{l}$ のラモトリジンを実施例25により調製したプレートに適用した。約 $50\ \mu\text{l}$ の希釈抗体をプレート内に分配してプレート中の組成物を水平プレート振盪装置上で1分間混合した。プレートはラモトリジンも抗ラモトリジン抗体も含有しない第1列により特定されて第1列を陰性対照として用いた。ラモトリジン含有しない第2列を陽性対照として用いた。プレートを60分間インキュベートして $250\ \mu\text{l}$ の 0.05% tween含有PBS、 $\text{pH}7.4$ で3回洗浄した。PBS、 $\text{pH}7.4$ 中の、免疫原15とは異なる、抗原（21）、（23）、又は（24）等の、約 $125\ \mu\text{l}$ の希釈二次抗体共役体をプレートの各ウェルに添加した。 37°C で60分間インキュベートして $250\ \mu\text{l}$ の 0.05% tween含有PBS、 $\text{pH}7.4$ で3回洗浄して力価を実験的に決定した。続いて、約 $125\ \mu\text{l}$ のABTS基質をプレートの各ウェルに添加してプレートを20分間インキュベートした。プレートを $405\ \text{nm}$ で読み取り、結果を表2及び3に提供する。

【0151】

表2

【0152】

10

20

30

40

50

【表 2】

ウサギ番号1309	抗原 2 4		抗原 2 3		抗原 2 1	
	A ₄₀₅	B/Bo	A ₄₀₅	B/Bo	A ₄₀₅	B/Bo
0	0.8	1.00	0.4	1.00	0.55	1.00
2.5	0.78	0.98	0.35	0.88	0.46	0.84
5	0.75	0.94	0.33	0.83	0.40	0.73
10	0.72	0.90	0.35	0.88	0.42	0.76
20	0.65	0.81	0.33	0.83	0.40	0.73
40	0.6	0.75	0.36	0.9	0.38	0.69

10

【 0 1 5 3 】

表 3

【 0 1 5 4 】

20

【表 3】

ウサギ番号1310	抗原 (2 4)		抗原 (2 3)		抗原 (2 1)	
	A ₄₀₅	B/Bo	A ₄₀₅	B/Bo	A ₄₀₅	B/Bo
0	1.35	1.00	0.60	1.00	0.7	1.00
2.5	1.30	0.96	0.20	0.33	0.3	0.43
5	1.20	0.89	0.21	0.35	0.3	0.43
10	1.15	0.85	0.25	0.42	0.3	0.43
20	1.00	0.74	0.23	0.38	0.28	0.4
40	0.99	0.73	0.23	0.38	0.27	0.39

30

【 0 1 5 5 】

【 0 1 6 8 】 B は試験試料に関する 405 nm での吸光度値であり、Bo は競合分析物が存在しない場合の 405 nm の吸光度値 (A₄₀₅ @ ゼロ標準物質) であり、ここで Bo はゼロ標準物質又は分析物がない場合の B である。B / Bo は、競合する分析物を添加した際の障害を示す (例えば ELISA 形式)。吸光度 (B) は、免疫反応及び反応条件 (緩衝剤、反応時間、パラメーター等) に依存する。吸光度は、より多くの試薬を添加するか、アッセイパラメーターの変化か、又は反応時間の変化か、又は反応温度の変化により、抗原が抗体に強く結合する際の強い免疫反応に起因して高まる可能性もある。

40

【 0 1 5 6 】

【 0 1 6 9 】 0 ~ 40 µg / ml の既知の濃度の標準物質である、既知量の分析物は、抗ラモトリジン抗体に関して、ELISA プレート上でラモトリジン類似体と競合する。所定の分析物濃度での吸光度 (B) は、B / Bo が 1 以下である場合、分析物を含まない場合の吸光度より低い場合がある。遊離薬剤又は分析物が抗体と強く結合する場合、利用

50

できる抗体に関して抗原と自由に競合しうる。その後、吸光度 B は、利用できる抗体が遊離薬剤とのみ結合すると、迅速に低下する場合もあり、これにより、 B/B_0 が迅速に減少する。遊離薬剤と抗体の結合が弱い場合、遊離薬剤は抗体から抗原を置換せず、吸光度 B はわずかに低下しうる。 B/B_0 は、標準物質範囲の間に 1.00 から減少し、標準物質範囲の間の B/B_0 の変化は、抗原、遊離薬剤、及び抗体間の免疫反応に依存する。様々な濃度での免疫反応の相違（例えば競合又は B/B_0 ）は、競合的免疫アッセイでは必須である。各標準物質濃度でのアッセイ範囲の間の B/B_0 の相違が大きい場合、測定はより正確になる。アッセイ較正範囲の間で B/B_0 は、抗原及び抗体の相互作用に依存する。吸光度が高く（例えば 0.5 ~ 1.5 の間の OD）、各レベルの既知の分析物濃度（標準物質）で B/B_0 が大きく相違することが、信頼性があり、再現性あり免疫アッセイに重要である。アッセイ範囲での B/B_0 の大きな動的範囲（例えば分析物濃度の増分変化での B/B_0 の大きな相違）及び強い吸光度（ B ）が、商業的免疫アッセイの精密度及び精度を得るために必要である。

10

【0157】

[0170] 表 2 及び 3（例えばウサギ 1309）で、抗原（24）の吸光度（ B 又は B_0 ）は最高であり、 B/B_0 は標準物質範囲の間で減少する。抗原（24）の構造は免疫原（20）と類似し、担体タンパク質のみが異なる。構造が類似するため、抗原上のエピトープは抗体応答を刺激したエピトープと同一であり、抗体はリンカー並びに薬剤も認識できる。したがって、抗原と、抗体に関して競合するため、遊離薬剤が多量に必要となるため、最高の吸光度が予測され、アッセイ範囲の間の B/B_0 の減少が小さくなる。

20

【0158】

[0171] 抗原（23）の構造は、免疫原と異なるため（例えば異なるリンカー、異なる誘導体化部位、及び異なる担体タンパク質）、吸光度（ B ）は最低となる。抗原（21）の構造は免疫原と異なる（例えば異なるリンカー、同一誘導体化部位、及び異なる担体タンパク質）。吸光度（ B ）は中程度で、免疫原の吸光度とは異なり、アッセイ範囲の間での B/B_0 の相違は最大となる。しかし、抗原（24）、（23）、（21）は、力価が低く、 B/B_0 プロフィールが劣るため、抗体に対して最適とはいえない。

【実施例 29】

【0159】

[0172] 実施例 25 に記載するものと類似のプロトコルを用いて、ラモトリジンと結合するポリクローナル抗体を調製した。より詳細には、KLH 免疫原性部分を有するラモトリジン免疫原（18）を用いて、抗ラモトリジンポリクローナル抗体を生成した。

30

【実施例 30】

【0160】

[0173] 実施例 27 で調製したポリクローナル抗体を調べるため、実質的に実施例 26 により ELISA アッセイで用いる ELISA プレートに調製した。より詳細には、抗原（24）、（23）、（21）、（25）、及び（26）を ELISA プレート上にコーティングした。

【実施例 31】

【0161】

[0174] 実施例 30 で調製した ELISA プレートを用いて、実施例 29 で調製したポリクローナル抗体に関する抗体力価を決定した。実施例 27 に記載の抗体力価を決定するプロトコルにしたがった。したがって、プレートを 405 nm で読み取り、力価の結果を表 4 に提供する。

40

【0162】

表 4

【0163】

【表 4】

		ELISA力価				
ウサギ番号	免疫原	抗原 24	抗原 23	抗原 21	抗原 25	抗原 26
2689	18	1:240	1:160000	1:800	1:400	1:400
2690	18	1:100	1:45000	1:200	1:400	1:300

10

【0164】

微粒子凝集免疫アッセイは、少なくとも1:100,000の力価で行わなければならないため、上記結果は、微粒子凝集免疫アッセイには力価が十分でなかったことを示す。しかし、抗原(23)の力価は、免疫原(20)で生成した抗体に比較して、有意に高かった。部分的に、抗原(23)の力価が高いのは、KLH共役体がBSAで置換されることのみ異なる免疫原(18)と比較して、抗原(23)の化学構造が類似であることに起因しうる。つまり、免疫原(18)で生成した抗ラモトリジン抗体は、競合剤として抗原(23)を用いた商業的免疫診断アッセイプロトコルで用いるのに適する可能性もある。

20

【実施例32】

【0165】

[0175] 実施例28と実質的に類似のプロトコルを用いて行う結合阻害研究で免疫原(18)で調製した抗ラモトリジン抗体の、ラモトリジン類似体に対する結合活性を決定した。より詳細には、抗原(23)及び(21)を用いた。プレートを405nmで読み取り、そして結果を表5及び6に提供する。

【0166】

表5

【0167】

【表5】

30

ウサギ番号2689 ラモトリジン (µg/ml)	抗原23		抗原21	
	A ₄₀₅	B/B ₀	A ₄₀₅	B/B ₀
0	0.50	1.00	0.80	1.00
2.5	0.30	0.60	0.45	0.56
5	0.01	0.02	0.35	0.44
10	0.01	0.02	0.30	0.38
20	0.01	0.02	0.20	0.25
40	0.01	0.02	0.15	0.19

40

【0168】

表6

【0169】

【表 6】

ウサギ番号 2 6 9 0	抗原 2 3		抗原 2 1	
ラモトリジン (μg/ml)	A ₄₀₅	B/B ₀	A ₄₀₅	B/B ₀
0	0.75	1.00	0.5	1.00
2.5	0.05	0.07	0.25	0.50

10

5	0.05	0.06	0.28	0.56
10	0.02	0.03	0.2	0.40
20	0.02	0.03	0.18	0.36
40	0.01	0.01	0.16	0.32

20

【 0 1 7 0 】

【 0 1 7 6 】免疫原 (2 0) のリンカーは短く、免疫原 (1 9) ほど免疫原性でない。免疫原 (2 0) から生じる抗体の力価は、最低 1 : 2 1 0 及び最高 1 : 1 1 0 0 0 であり、高すぎるか低すぎるアッセイ範囲の間で B / B₀ が変化する。免疫原 (1 8) のリンカーは短く、免疫原 (1 9) ほど免疫原性ではない。免疫原 (1 8) から生じる抗体の抗原 (2 3) に対する力価は優れる (例えばウサギ 2 6 9 0 の力価、1 : 4 5 , 0 0 0 ; ウサギ 2 6 8 9 の力価、1 : 1 6 0 , 0 0 0) が、他のすべての抗原に対する力価は低い。

【 0 1 7 1 】

【 0 1 7 7 】抗原 (2 3) の構造は免疫原 (1 8) と類似である (例えば担体タンパク質のみが異なる) 。構造が類似するため、抗原上のエピトープは、抗体応答を刺激したエピトープと実質的に同一である。つまり、抗体は、リンカー及び薬剤を認識でき、最高の吸光度が観察される。各々、最高 1 : 1 6 0 , 0 0 0 及び 1 : 4 5 , 0 0 0 である、抗体による抗原の認識が高まり、ウサギ 2 6 8 9 及び 2 6 9 0 由来の抗体の力価が改善される。

30

【 0 1 7 2 】

【 0 1 7 8 】アッセイ範囲の間での B / B₀ の漸進的変化は、有望な B / B₀ プロフィールを示す。B / B₀ のみを考慮すると、抗原 (2 1) は、抗体に関して、ラモトリジンに対する優れた競合剤である。この抗体は抗原 (2 1) に対する力価は低く (認識が劣る) 、これは、この抗原の構造が免疫原 (1 8) と異なる (例えば異なるリンカー、同一誘導体化部位、及び異なる担体タンパク質) ためである可能性もある。

40

【実施例 3 3】

【 0 1 7 3 】

【 0 1 7 9 】実施例 2 5 と類似のプロトコルを用いて、ラモトリジンに結合するポリクローナル抗体を調製した。より詳細には、K L H 免疫原性部分を有するラモトリジン免疫原 (1 9) を用いて、抗ラモトリジンポリクローナル抗体を生成した。

【実施例 3 4】

【 0 1 7 4 】

【 0 1 8 0 】実施例 3 3 に記載した調製したポリクローナル抗体を調べるため、実質的に実施例 2 6 により、E L I S A アッセイで用いる E L I S A プレートに調製した。より詳細には、抗原 (2 4) 、 (2 3) 、 (2 1) 、 (2 5) 、及び (2 6) を E L I S A プ

50

レート上にコーティングした。

【実施例 35】

【0175】

[0181] 実施例 34 で調製した ELISA プレートを用いて、実施例 33 で調製したポリクローナル抗体に関する抗体力価を決定した。実施例 27 に記載の抗体力価を決定するためのプロトコルにしたがった。したがって、プレートを 405 nm で読み取り、力価結果を表 7 に提供する。

【0176】

表 7

【0177】

【表 7】

10

		ELISA力価				
ウサギ 番号	免疫原	抗原 24	抗原 23	抗原 21	抗原 25	抗原 26
2693	19	1:300000	1:310000	1:700000	1:4400000	1:1900000
2694	19	1:200000	1:1700000	1:850000	1:4400000	1:1800000

20

【0178】

[0182] ラモトリジン骨格及び免疫原性部分の間に長いリンカーを含む、免疫原 19 で調製した抗ラモトリジンポリクローナル抗体は、微粒子凝集免疫アッセイに適した高力価を示す。つまり、長いリンカーは、ラモトリジン薬剤に基づく免疫原に有効な免疫原性を与えるのに有益でありうる。つまり、免疫原 19 のリンカー、あるいは類似の長さ又は他の特性があるものを、ラモトリジン類似体の 4 位及び 3 位に共役化してもよい。

【実施例 36】

【0179】

[0183] 実施例 26 と実質的に類似のプロトコルを用いて行った結合阻害研究により、免疫原 (19) で調製した抗ラモトリジン抗体の、ラモトリジン類似体に対する結合活性を決定した。より詳細には、抗原 (24)、(23)、(21)、(25)、及び (26) を用いた。プレートを 405 nm で読み取り、そして結果を表 8 及び 9 に提供する。

30

【0180】

表 8

【0181】

【表 8】

ウサギ番号 2693	抗原 2 4		抗原 2 3		抗原 2 1		抗原 2 5		抗原 2 6	
	A ₄₀₅	B/Bo	A ₄₀₅	B/Bo	A ₄₀₅	B/Bo	A ₄₀₅	B/Bo	A ₄₀₅	B/Bo
0	0.28	1.00	0.68	1.00	1.55	1.00	0.32	1.00	1.1	1.00
2.5	0.08	0.29	0.08	0.12	1.52	0.98	0.16	0.50	0.4	0.36
5	0.05	0.18	0.08	0.12	1.45	0.94	0.15	0.47	0.28	0.25
10	0.04	0.14	0.08	0.12	1.40	0.90	0.08	0.04	0.24	0.22
20	0.03	0.11	0.08	0.12	1.28	0.83	0.07	0.22	0.20	0.18
40	0.02	0.07	0.08	0.12	1.20	0.77	0.07	0.22	0.16	0.15

10

【 0 1 8 2 】

表 9

20

【 0 1 8 3 】

【表 9】

ウサギ番号 2693	抗原 2 4		抗原 2 3		抗原 2 1		抗原 2 5		抗原 2 6	
	A ₄₀₅	B/Bo	A ₄₀₅	B/Bo	A ₄₀₅	B/Bo	A ₄₀₅	B/Bo	A ₄₀₅	B/Bo
0	0.83	1.00	0.44	1.00	1	1.00	0.72	1.00	1.80	1.00
2.5	0.28	0.34	0.08	0.18	0.90	0.90	0.36	0.50	1.16	0.64
5	0.22	0.27	0.08	0.18	0.85	0.85	0.32	0.44	1.04	0.58
10	0.15	0.18	0.08	0.18	0.80	0.80	0.28	0.39	0.88	0.49
20	0.12	0.14	0.08	0.18	0.78	0.78	0.20	0.28	0.80	0.44
40	0.10	0.12	0.08	0.18	0.70	0.70	0.18	0.25	0.68	0.38

30

40

【 0 1 8 4 】

【 0 1 8 4 】免疫原 (1 9) のリンカーは長く、エピトープは抗体相互作用のため、よりアクセスしやすく、最も免疫原性であり、抗体の力価は、最大 1 : 4 , 4 0 0 , 0 0 0 と最高であった。すべての抗原 (例 えば 2 1 、 2 3 、 2 4 、 2 5 、 2 6) は、免疫原 (1 9) から産生されるポリクローナル抗体に関して、ラモトリジン遊離薬剤と、中程度から優れた程度の競合を示す。

【 0 1 8 5 】

【 0 1 8 5 】抗原 (2 4) のリンカーは短く、誘導体化部位は、免疫原 (1 9) と同一である。抗原 (2 4) による抗体の認識がより弱いため、力価が最大 1 : 3 0 0 , 0 0 0 と比較的低い。抗原 (2 4) 及び抗体の結合は、抗体相互作用に利用できる表面積が狭い

50

ため、比較的弱い。B / B₀は、極めて低濃度のラモトリジンでも急激に減少するが、ラモトリジン濃度が高ければB / B₀の斬新的変化は抗原(24)の実現可能性を示す。

【0186】

【0186】抗原(23)のリンカーは短く、誘導体化部位は免疫原(19)と異なる。抗原(23)による抗体の認識が比較的弱いため、力価が最大1:700,000と比較的低い。抗原(23)及び抗体の結合は、抗体相互作用に利用できる表面積が狭く、認識がより低いため、非常により弱い。B / B₀は、極めて低濃度のラモトリジンでも急激に減少するが、これは、ラモトリジン類似体でなくラモトリジンに対する優先性を示す。

【0187】

【0187】抗原(21)は担体タンパク質が異なることを除いて、免疫原(19)と構造が類似である。この抗体の力価は抗原(21)に対して中程度である。

【0188】抗原(25)のリンカーは免疫原(19)より短いが類似する。実際、抗原(25)の調製に用いる類似体(6)は、免疫原(19)の調製に用いる類似体(8)の前駆体である。構造が類似することに起因する認識の強さは、力価が最大1:4,400,000と非常に高い。抗原(25)は構造が異なるため、抗体に関し、遊離薬剤に対して自由に競合し、B / B₀が漸進的变化を示す。抗原(25)及び該ポリクローナル抗体は力価が高く、B / B₀プロフィールが優れるため、商業的免疫アッセイに用いることができる。

【0188】

【0189】抗原(26)のリンカーは非常に長く、抗原(21)の次に長い。抗原(25)と抗体との間の免疫反応が高まると、力価が最大1,900,000に高まる。抗原(26)の構造が異なるため、抗体に関し、遊離薬剤に対して自由に競合し、B / B₀に漸進的变化を示す。抗原(26)及び該ポリクローナル抗体は、力価が高く、B / B₀プロフィールが優れるため、現在、商業的免疫アッセイに用いられている。したがって、免疫原19で調製した抗ラモトリジンポリクローナル抗体の結合活性は好ましいことが示され、免疫診断アッセイに適した競合的結合プロフィールを示した。

【実施例37】

【0189】

【0190】実施例34と同様に調製したELISAプレートを用いて、実施例33により調製したポリクローナル抗体に関する抗体力価を決定したが、抗ウサギIgG及び抗ウサギIgMをELISAプレート上にコーティングした。抗原21を用いたことを除き、実施例27の抗体力価を決定するプロトコルにしたがった。したがって、プレートを405nmで読み取り、そして力価結果を表10に提供する。

【0190】

表10

【0191】

【表10】

サブクラスIgG/IgM ELISA試験	抗原20に対する力価	
ウサギ番号	抗ウサギIgG	抗ウサギIgM
2693	1:1700000	1:70
2694	1:3500000	1:100

【0192】

【0191】力価は、抗ウサギIgG及び抗ウサギIgM共に抗原に対して活性化され

10

20

30

40

50

たことを示す。抗体が、抗ウサギ I g G に対して著しく高い力価を示すため、ポリクローナル抗血清は、大部分 I g G 抗体である。

【実施例 38】

【0193】

[0192] 免疫診断アッセイで用いるため、ラモトリジン及び類似体と結合する抗ラモトリジン抗体を調製した。免疫原(19)を複数回注射して免疫した、16週齢以上の9匹の雌 B a l b / C マウスでモノクローナル抗体を調製した。各マウスに対する免疫原性注射溶液は、250 μ l のフロイント完全アジュバントと混合した、免疫原(19)を含む250 μ l の免疫原性溶液を含有した。免疫原性注射溶液を、37ゲージの皮下注射針を付けた適当な大きさのシリンジに装填して各マウスに注射した。14日後、フロイント不完全アジュバントを用いて追加免疫注射を反復した。第60日及び第80日に、追加免疫注射を再び反復した。さらに、第45日、尾の出血で血液を得て、抗ラモトリジン抗体に関してマウスを試験し、E L I S A で抗体を試験して力価及び結合活性を決定した。

10

【実施例 39】

【0194】

[0193] 実施例 38 で調製した抗体を調べるため、実質的に実施例 26 により、E L I S A アッセイで用いる E L I S A プレート を調製した。より詳細には、抗原(21)を E L I S A プレート上にコーティングした。簡潔には、抗原(21)をコーティング緩衝液中に希釈して E L I S A プレートのウェルに添加した。37 60 分間インキュベート後、緩衝液溶媒をデカントしてプレートにブロッキング緩衝液を添加した。プレートを再び37 60 分間インキュベートしてブロッキング溶媒をプレートからデカントした。その後、ウェル中のブロッキング剤と共に最長1週間、2~8 でプレートを保存した。

20

【実施例 40】

【0195】

[0194] 実施例 36 の尾の出血で得た血液を用いて抗ラモトリジン抗体力価を決定した。10倍希釈を用いて、出血した血液を1:100~1:10,000,000に連続希釈して力価決定プロトコルを開始した。pH7.4のPBSを含む微量遠心管で希釈を調製する。血液から得た試料約100 μ lを、E L I S A プレート上の各ウェルに添加した。その後、プレートを37 で60分間インキュベートして250 μ lの0.05% t w e e n 含有PBS、pH7.4で3回洗浄した。約125 μ lのPBS、pH7.4中の希釈二次抗体共役体をプレートの各ウェルに添加した。約125 μ lのA B T S 基質をプレートの各ウェルに添加して20分間インキュベート後、405nmで読み取り、この結果を表11に示す。

30

【0196】

表 1 1

【0197】

【表 1 1】

希釈	マウス番号 (抗原 2 1 に対する E L I S A 力価)								
	1	2	3	4	5	7	8	9	10
1:100	3.44	3.50	3.516	3.539	3.541	3.5845	3.3305	3.401	3.4495
1:1000	3.31	3.28	3.448	3.4095	3.455	3.5885	3.4135	3.211	3.183
1:10000	3.18	3.20	3.2285	3.2135	3.0945	3.2785	3.0835	2.907	2.9205
1:100000	2.21	1.24	2.873	2.585	2.5615	2.804	2.7455	2.1635	2.1495
1:1000000	0.62	0.22	1.178	0.7735	0.848	0.9655	1.0545	0.508	0.518
1:10000000	0.25	0.10	0.2475	0.1875	0.167	0.2315	0.21	0.1465	0.1255

10

【 0 1 9 8 】

【 0 1 9 5 】 最大 O D の約 1 0 % を有する終点力価により、力価を計算する。表 1 1 で、平均最大 O D は 3 . 5 であり、抗体力価は、最大 O . D . の 1 0 % の 0 . 3 5 である。マウス 3 は、1 : 1 , 0 0 0 , 0 0 0 希釈及び 1 : 1 0 0 0 0 0 0 0 0 希釈で吸光度が最高となる (O D) ため、最高の力価である。

20

【 実施例 4 1 】

【 0 1 9 9 】

【 0 1 9 6 】 実施例 2 8 と実質的に類似のプロトコルを用いて行った結合阻害研究により、モノクローナル抗体を生成する実施例 3 8 のプロトコルにより、免疫原 (1 9) を用いて調製した抗ラモトリジン抗体の結合活性を決定した。より詳細には、抗原 (2 1) を用いた。プレートを 4 0 5 n m で読み取り、そして結果を表 1 2 及び 1 3 に提供する。

【 0 2 0 0 】

表 1 2

30

【 0 2 0 1 】

【 表 1 2 】

ラモトリジン 濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	吸光度 (E L I S A 結合活性)								
	マウス番号								
	1	2	3	4	5	7	8	9	10
0	0.6995	0.9205	0.7555	0.8865	0.816	0.4645	0.6215	0.5515	0.5105
280	0.6965	0.8135	0.693	0.781	0.7055	0.356	0.4305	0.347	0.4475

40

【 0 2 0 2 】

表 1 3

【 0 2 0 3 】

【表 1 3】

	マウス番号								
	1	2	3	4	5	7	8	9	10
% 阻害	0.43	11.62	8.27	11.9	13.54	23.36	30.73	37.08	12.34
B/Bo x 100	99.57	88.38	91.73	88.1	86.46	76.64	69.27	62.92	87.66

10

【0204】

【0197】ポリクローナル抗血清の力価（例えば血中の抗体量）及び結合活性（例えばラモトリジンに対する特異性）に基づき、融合候補を選択した。B / B o は、競合する分析物の添加に際して阻害を示すが、B / B o = 100 - 阻害%である。表13は、1番、2番、3番、4番、及び10番のマウス由来のポリクローナル抗体がラモトリジン類似体に対して優先性を示すことを示す（ELISA）。8番及び9番のマウス由来のポリクローナル抗体は、アッセイ間で（0 ~ 200 µg / ml）、B / B o（又は阻害%）の相違が大きかった。

20

【実施例42】

【0205】

(実施例40)

【0198】ラモトリジン及び類似体と結合できるモノクローナル抗体を生成するため、融合候補を調製した。血液中の抗体の結合活性及び/又は力価又は量に基づき融合候補を選択した。感度（例えば低濃度の分析物を検出する）又は特異性（例えば分析物及び交差反応物質間を区別する）がモノクローナル抗体の望ましい品質である場合、9番のマウス及び8番のマウスが第一の候補である。力価値が最高とは、血中の抗体量が最高であることを示し、脾臓中の抗体濃度が最高の場合、成功率は最高である。したがって、1番のマウスが、融合に成功する可能性がある候補である。

30

【0206】

【0199】融合の3~5日前に、免疫したマウスに、最後の追加免疫注射を行い、融合候補を産生する方法を行った。以前の注射の4週間後に追加免疫注射を行うが、この間隔で、マウスによる血流からの循環抗体の大部分が一扫される。以下の2つの目的のため、最終追加免疫注射を行う：(1)優れた強い応答を誘導するため；及び(2)応答の成熟を同調させるため。これにより、適切なBリンパ球融合パートナーの相対濃度が高まりうる。脾臓が、リンパ球単離の最適な選択肢であるため、最終追加免疫は、脾臓を標的とした。無菌技術でマウスの脾臓を除去して滅菌ペトリ皿中の10mlの完全培地に入れた後、すりガラスの滅菌顕微鏡スライド2枚の間ですりつぶした。生じた単細胞懸濁物を除去して血球計算板を用いて計数した。1:5の割合で、骨髓腫細胞を脾臓細胞内に混合して約800 x Gで15分間遠心分離した。上清液を除去して廃棄し、15mlの血清を含まないIMDM培地を添加した。細胞を再懸濁して再び遠心分離した。ポリエチレングリコール/DMSOを用いて、生じた細胞ペレットを融合させた。

40

【0207】

【0200】融合後、10%ウシ胎児血清（Hyclone Labs）、10% condimed HI、50mM 2-メルカプトエタノール、20mMエタノールアミン、ヒポキサンチン-メトトレキセート-チミジン、4mMグルタミン、及びペニシリン/ストレプトマイシン抗生物質を添加したイスコーブのダルベッコの培地中に細胞を希釈した。この融合細胞混合物を、滅菌96ウェル微量培養プレートに200µl/ウェルで蒔いた。カバーをした

50

プレートを、5%CO₂中、37℃で6日間、インキュベーターに入れた。

【実施例43】

【0208】

【0201】実施例26と実質的に類似のプロトコルを用いて行った結合阻害研究でモノクローナル抗体を生成する実施例42のプロトコルにしたがって、免疫原(19)を用いて調製した抗ラモトリジン抗体の結合活性を決定した。より詳細には、抗原(21)を用いた。プレートを405nmで読み取り、結果を表14及び15に提供する。

【0209】

表14

【0210】

【表14】

ラモトリジン 濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	吸光度 (ELISA)						
	クローン (融合後)						
	1D11	3E8	4G6	5G11	8B10	4B11	7E10
0	1	0.1485	1.7225	1.333	1.2675	1.07	1.2665
280	0.9475	0.126	0.201	0.853	0.755	0.636	0.823

【0211】

表15

【0212】

【表15】

	クローン (融合スクリーニング後)						
	1D11	3E8	4G6	5G11	8B10	4B11	7E10
阻害%	5.25	15.15	88.33	36.01	40.43	40.56	35.02
B/Bo x 100	94.75	84.85	11.67	63.99	59.57	59.44	64.98

【0213】

【0202】表15の阻害プロフィールは、融合クローン4G6が遊離薬剤を優先し(例えば高い阻害%又は最小のB/Bo)、融合クローン3E8がラモトリジン類似体(21)を優先することを示す。

【実施例44】

【0214】

【0203】融合後、実施例43で1xクローンを調製した。これによれば、陽性組織培養上清を同定した後の工程は、抗体産生細胞をクローニングである。元来の陽性ウェルは、しばしば、ハイブリドーマ細胞の1より多いクローンを含有し、多くの融合細胞は染色体の組合せが不安定である。単細胞クローニングは、目的の抗体を産生する細胞が、真にモノクローナルであり、確実に安定である。限界希釈によりハイブリドーマ細胞をクローニングした。融合細胞を含有するウェルに増殖培地を添加した。クローンは迅速に増殖し、2週間後、1xクローンをスクリーニング(ELISA及びQMS)する準備が整った。実施例28と実質的に類似のプロトコルを用いて行った結合阻害研究で抗ラモトリジン抗体の結合活性を決定した。より詳細には、抗原(21)を用いた。プレートを405

10

20

30

40

50

nmで読み取り、結果を表16～21に提供する。

【0215】

表16

【0216】

【表16】

ラモトリジン 濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	吸光度 (ELISA)						
	1Xクローン						
	1D11-1	1D11-10	1D11-30	3E8-7	3E8-14	3E8- 25	4G6-5
0	2.123	2.33	2.05	2.13	2.21	2.27	1.87
200	0.475	1.12	0.38	0.67	0.455	0.814	0.39

10

【0217】

表17

【0218】

【表17】

20

阻害%	1Xクローン						
	1D11-1	1D11-10	1D11-30	3E8-7	3E8-14	3E8- 25	4G6-5
	77.6	51.9	81.5	68.4	79.4	64.2	78.7

30

【0219】

表18

【0220】

【表18】

ラモトリジン 濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	吸光度 (ELISA)						
	1Xクローン						
	4G6-21	4G6-28	5G11-7	5G11-18	5G11- 34	8B10- 9	8B10-14
0	2.05	2.08	2.24	2.15	2.38	1.98	1.68
200	0.34	0.31	1.17	0.7015	1.39	0.22	0.42

40

【0221】

表19

【0222】

【表 19】

阻害%	1Xクローン						
	4G6-21	4G6-28	5G11-	5G11-18	5G11-	8B10-	8B10-14
			7		34	9	
0	83.1	85	47	67	42	89	75

10

【0223】

表 20

【0224】

【表 20】

ラモトリジン濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	吸光度 (ELISA)						
	1Xクローン						
	8B10-23	4B11-	4B11-11	4B11-17	7E10-	7E10-	7E10-37
		3			8	26	
0	2.03	1.89	1.92	2.61	2.25	2.36	2.45
200	1.02	0.24	0.24	0.56	0.96	0.85	0.60

20

【0225】

表 21

【0226】

【表 21】

30

阻害%	1Xクローン						
	8B10-23	4B11-	4B11-11	4B11-17	7E10-8	7E10-	7E10-37
		3				26	
0	49.5	87.1	87.7	78.4	57.2	64	75.4

【0227】

40

【0204】阻害パーセントが高いのは、クローンがラモトリジン類似体(21)より遊離ラモトリジンを優先することを示す。

【0205】QMS(登録商標)アッセイを行い、実施例44で調製した1xクローンを試験した。QMS(登録商標)上のスクリーニングは最適化されない(アッセイパラメーター及び1xクローンの力価)。データを表22に示す。

【0228】

表 22

【0229】

【表 2 2】

ラモトリジン 濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	デルタ吸光度 (免疫比濁形式)		
	1Xクローン		
	4G6-21	4G6-28	5G11-34
0	1.1254	0.7830	0.2172

10

40	0.0024	0.0013	0.0000
阻害%	99.8	99.8	99.9

【0 2 3 0】

【0 2 0 6】表 2 2 から、1 x クローンがラモトリジン類似体 (2 1) を認識してラモトリジン遊離薬剤が免疫反応を阻害する能力により、結合が、タンパク質担体の非特異的結合とは対照的に、ラモトリジンに特異的であることが示される。したがって、該クローンを免疫アッセイに用いることができる。

【実施例 45】

20

【0 2 3 1】

【0 2 0 7】QMS (登録商標) ラモトリジンアッセイは、血清又は血漿中のラモトリジン分析に用いる自動化均一系粒子増進比濁免疫アッセイである。QMS (登録商標) アッセイを行い、実施例 3 4 で調製したポリクローナル抗体を試験した。約 0 . 0 5 % アジ化ナトリウム含有 bis - tris 緩衝液中、< 1 % 未満で、免疫原 (1 9) から調製したラモトリジンと結合するヒツジ・ポリクローナル抗体で構成される R 1 ; 及び 0 . 0 5 % のアジ化ナトリウムを含み、抗原 (2 6) を含むラモトリジンをコーティングした 0 . 5 % 未満の微粒子で構成される R 2 を含有する、使用準備済みの液体 2 試薬キットを用いてラモトリジンに関する QMS アッセイを行った。完全較正 (6 点) 法を用いて、QMS ラモトリジンアッセイを較正し、図 4 に類似の較正曲線を作成することもできるが、こ

30

【0 2 3 2】

表 2 3

【0 2 3 3】

【表 2 3】

ポリクローナル抗体R 1	速度 (デルタ吸光度)
ラモトリジン ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 試料	ラモトリジン抗原 (22) をコーティングしたラテックス
0	179
2.5	107
5	60
10	34
20	18
40	11

10

【0234】

【0208】ラモトリジンを含む試料を添加すると、凝集反応が部分的に阻害されるが、これは、吸光度変化速度が遅延することで観察される。つまり、濃度依存性の古典的凝集阻害曲線を得ることもでき、最低ラモトリジン濃度（例えばゼロ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）の場合は凝集速度が最大であり、最高ラモトリジン濃度（例えば40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）の場合は凝集速度が最低である。表23に示すアッセイ範囲の間の速度の漸進的变化により、抗体、抗原（競合剤）、及び遊離薬剤（ラモトリジン）相互作用が、自動化系で用いる商業的免疫アッセイに適していることが示される。

20

【実施例46】

【0235】

【0209】ラモトリジンを検出するHPLC法と、自動化均一系粒子増進比濁免疫アッセイを比較する実験を行った。方法比較アッセイは、同一分析物を測定する2つの方法のバイアスを評価するよう設計された実験である。実施例45のQMS（登録商標）アッセイを行い、実施例34で調製したポリクローナル抗体を試験した。つまり、ラモトリジン患者試料をアッセイして参照法であるHPLCと比較した。評価の目的は、2つの方法が、実験の統計的検出力内で同等の結果を生じるかを決定することである。血清又はナトリウム・ヘパリン処理血漿からなる25の患者試料を用いて比較実験を行った。比濁免疫アッセイの濃度は1.59~35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲であり、HPLCでの濃度は1.3~32.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲であった。自動化QMS（登録商標）ラモトリジンアッセイの結果をHPLCの結果と比較して表23及び24に示す。

30

【0236】

表23

【0237】

40

【表 2 3 - 1】

Seradyn ID #	HPLC 結果	Seradyn QMS (H717)		
		Rep 1	Rep 2	平均
0001	4.2	5.14	5.16	5.2
0002	1.3	1.6	1.57	1.6
0003	7.7	8.37	8.29	8.3
0004	9.6	8.92	8.87	8.9
0005	1.8	1.95	1.97	2.0
0006	10.3	12.63	13.33	13.0
0007	8.2	9.08	8.91	9.0
0008	9.1	10.22	10.11	10.2
0009	2.4	2.66	2.75	2.7
0010	15.6	16.93	16.38	16.7
0011	5.5	6.13	5.91	6.0
0012	19.8	21.56	21.45	21.5
0013	12.7	14.55	14.48	14.5

10

20

30

【 0 2 3 8 】

【表 2 3 - 2】

0014	12.3	13.73	13.99	13.9
0015	21.2	24.13	24.36	24.2
0016	16.7	18.68	18.9	18.8
0017	3.1	3.29	3.44	3.4
0018	3.6	4.33	4.27	4.3
0019	2.8	3.41	3.36	3.4
0020	6.7	7.98	7.72	7.9
0021	13.7	15.31	15.55	15.4
0022	11.1	12.93	13.24	13.1
0023	18.1	18.32	18.75	18.5
0024	18.8	25.35	22.45	23.9
0025	32.8	38.37	32.88	35.6

10

20

【 0 2 3 9 】

表 2 4

【 0 2 4 0 】

【表 2 4】

方法 HPLC	
n	25
Y-切片	0.0151
傾斜	1.107
相関係数	0.994

30

【 0 2 4 1 】

【 0 2 1 0 】 図 1 9 に示すように、自動化均一系粒子増進比濁免疫アッセイ及び H P L C 法の相違は約 1 0 % 未満であると決定された。図 2 0 のように、比濁免疫アッセイでの濃度は 1 . 5 9 ~ 3 5 μ g / m l の範囲であり、H P L C での濃度は 1 . 3 ~ 3 2 . 9 μ g / m l の範囲であった。比濁免疫アッセイ上の Q M S (登録商標) ラモトリジンアッセイの傾斜は 1 . 0 7、切片は 0 . 0 1 5 1 であり、これは、A R U P (ユタ州ソルトレークシティ) H P L C / U V で準備した H P L C 法に匹敵した。相関係数 (R) は 0 . 9 9 4 であった。バイアスプロットにより、H P L C と Q M S (登録商標) 値との間の 1 0 % のバイアスが示される。したがって、データは、Q M S (登録商標) アッセイが、H P L C 参照法に対する適切な代替法であることを示す。

40

【 0 2 4 2 】

【 0 2 1 1 】 本発明の精神又は本質的な特性から逸脱することなく、他の特定の形式で、本発明を具現しうる。記載する態様は、すべての観点で、単に例示的であり、そして限

50

定的ではないと見なされる。したがって、本発明の範囲は、上記説明によるのではなく、添付の請求項に示される。請求項の意味及び等価の範囲内に属するすべての変化が、その範囲内に含まれるものとする。

【図面の簡単な説明】

【0243】

【図1】 [026] 図1は、抗ラモトリジン抗体を調製する方法の態様を例示する流れ図である。

【図2】 [027] 図2は、ラモトリジンの免疫診断アッセイを行う方法の態様を例示する流れ図である。

【図3】 [028] 図3は、蛍光偏光に基づく競合的結合研究の態様を例示する概略図である。

【図4】 [029] 図4は、ラモトリジンの校正曲線の態様を例示するグラフである。

【図5】 [030] 図5は、凝集に基づく競合的結合研究の態様を例示する流れ図である。

【図6】 [031] 図6は、凝集に基づく競合的結合研究の態様を例示する流れ図である。

【図7】 [032] 図7は、酵素活性に基づく競合的結合研究の態様を例示する流れ図である。

【図8】 [033] 図8は、化学発光に基づく競合的結合研究の態様を例示する流れ図である。

【図9】 [034] 図9は、ラモトリジン類似体を合成するための合成プロトコルの態様を例示する概略図である。

【図10】 [035] 図10は、ラモトリジン類似体を合成するための合成プロトコルの態様を例示する概略図である。

【図11】 [036] 図11は、ラモトリジン類似体を合成するための合成プロトコルの態様を例示する概略図である。

【図12】 [037] 図12は、ラモトリジン類似体を合成するための合成プロトコルの態様を例示する概略図である。

【図13A】 [038] 図13Aは、ラモトリジンに基づく免疫原を合成するための合成プロトコルの態様を例示する概略図である。

【図13B】 [038] 図13Bは、ラモトリジンに基づく免疫原を合成するための合成プロトコルの態様を例示する概略図である。

【図13C】 [038] 図13Cは、ラモトリジンに基づく免疫原を合成するための合成プロトコルの態様を例示する概略図である。

【図13D】 [038] 図13Dは、ラモトリジンに基づく免疫原を合成するための合成プロトコルの態様を例示する概略図である。

【図13E】 [038] 図13Eは、ラモトリジンに基づく免疫原を合成するための合成プロトコルの態様を例示する概略図である。

【図14A】 [039] 図14Aは、ラモトリジンに基づく抗原を合成するための合成プロトコルの態様を例示する概略図である。

【図14B】 [039] 図14Bは、ラモトリジンに基づく抗原を合成するための合成プロトコルの態様を例示する概略図である。

【図14C】 [039] 図14Cは、ラモトリジンに基づく抗原を合成するための合成プロトコルの態様を例示する概略図である。

【図14D】 [039] 図14Dは、ラモトリジンに基づく抗原を合成するための合成プロトコルの態様を例示する概略図である。

【図15】 [040] 図15A～15Bは、ラモトリジンに基づく抗原を合成するための合成プロトコルの態様を例示する概略図である。

【図16】 [041] 図16A～16Eは、ラモトリジンに基づく蛍光トレーサーを合成するための合成プロトコルの態様を例示する概略図である。

10

20

30

40

50

【図17】[042] 図17は、ラモトリジン及びラモトリジン代謝産物の態様の概略図である。

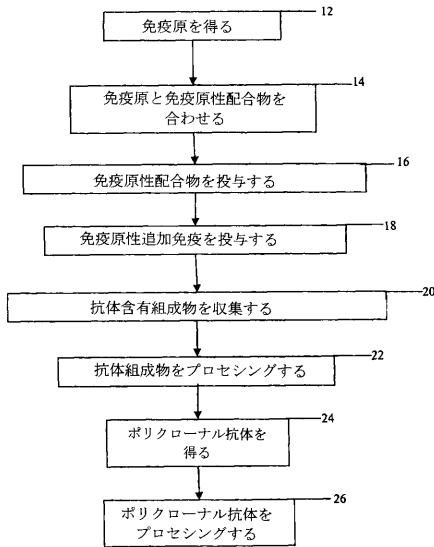
【図18】[043] 図18は、回復アッセイの態様のグラフである。

【図19】[044] 図19は、自動免疫アッセイとHPLC法の比較研究の態様のグラフである。

【図20】[045] 図20は、自動免疫アッセイとHPLC法の比較研究の態様のグラフである。

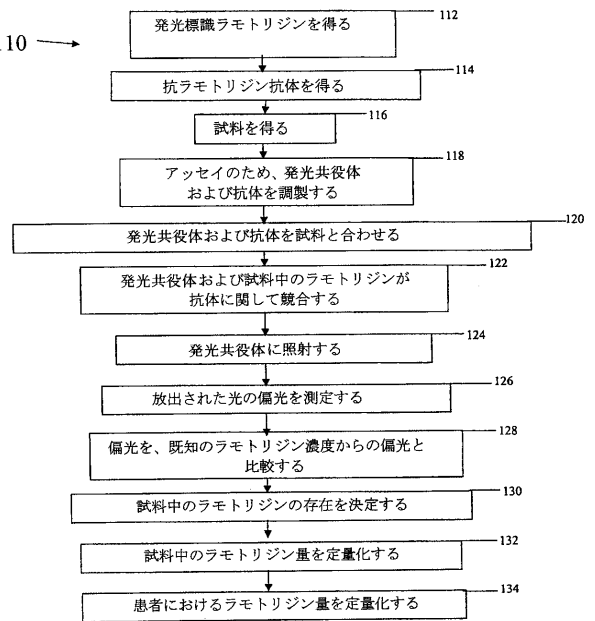
【図1】

10 →

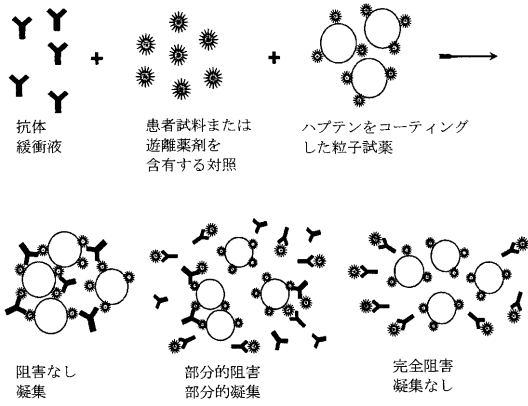


【図2】

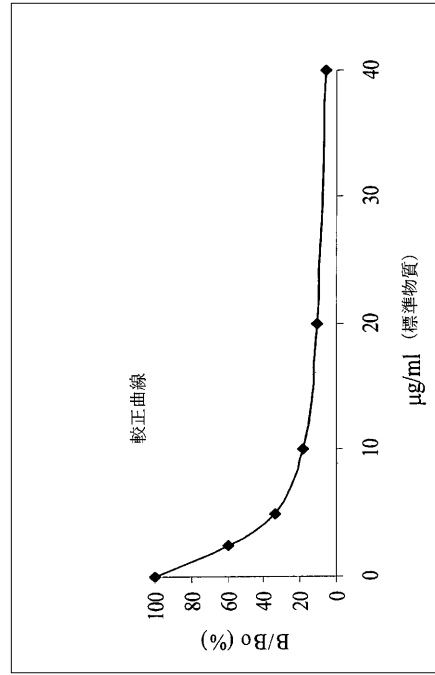
110 →



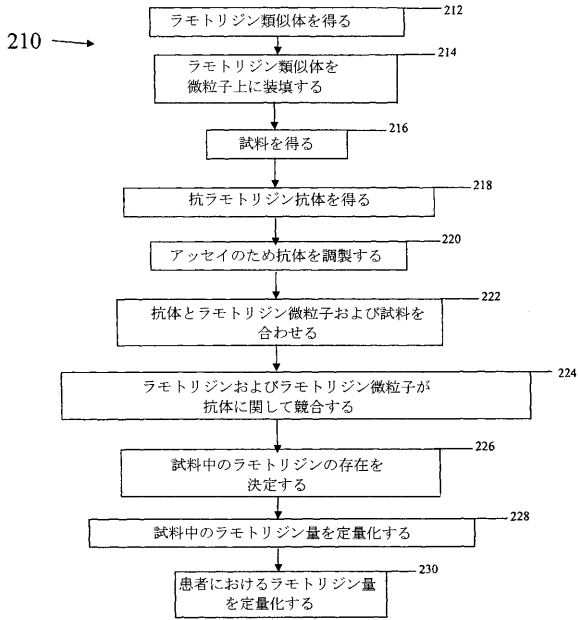
【図3】



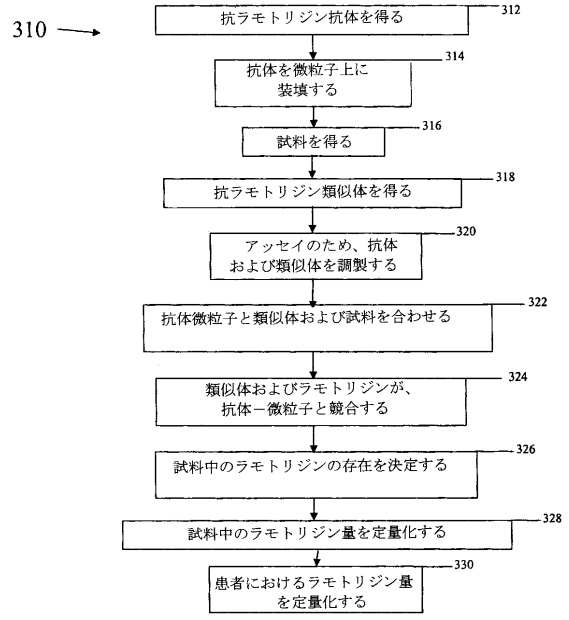
【図4】



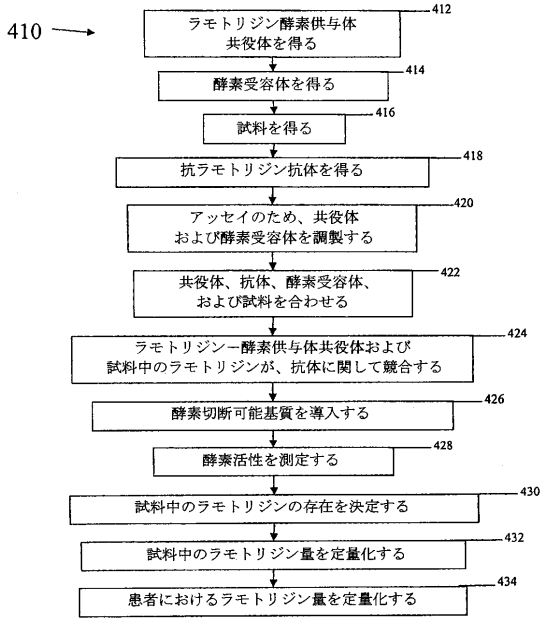
【図5】



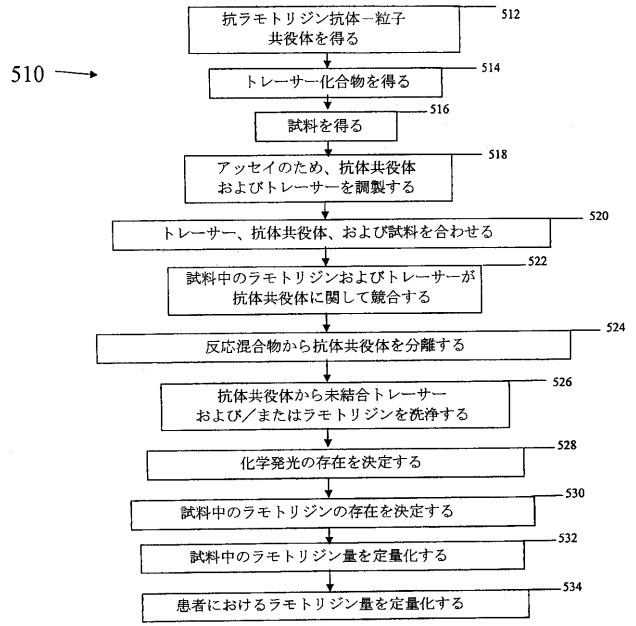
【図6】



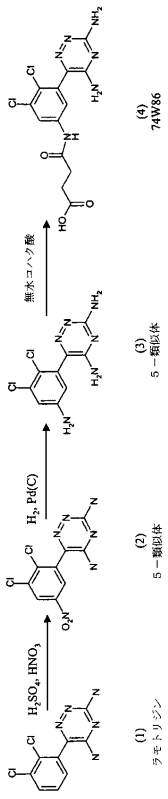
【 図 7 】



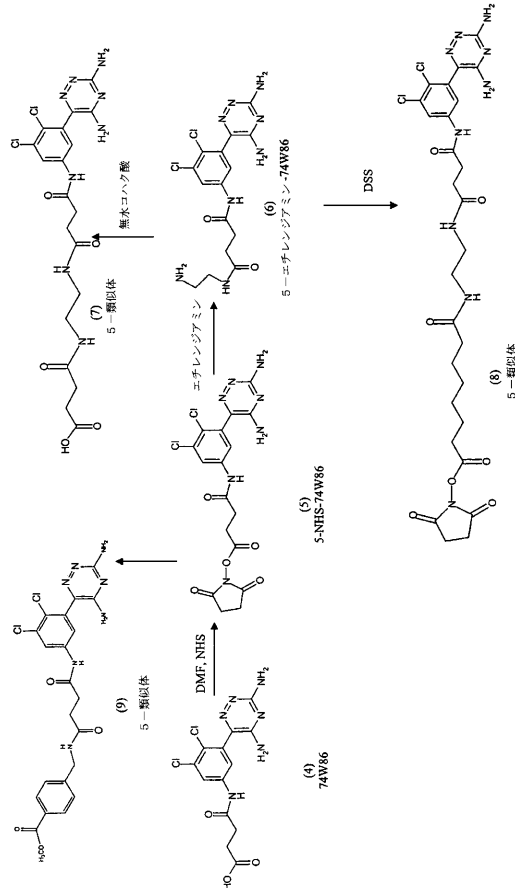
【 図 8 】



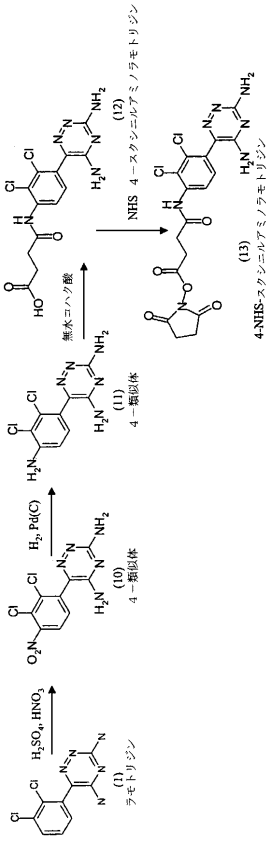
【 図 9 】



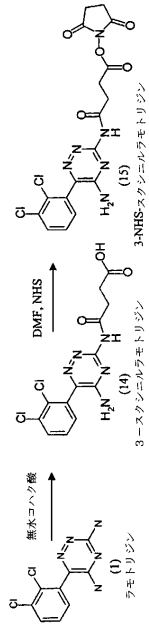
【 図 10 】



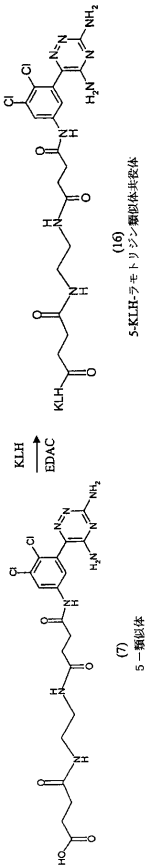
【 図 1 1 】



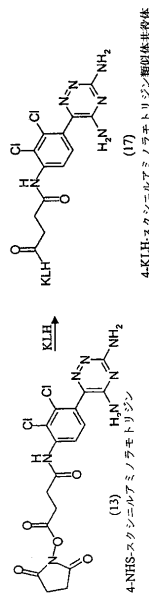
【 図 1 2 】



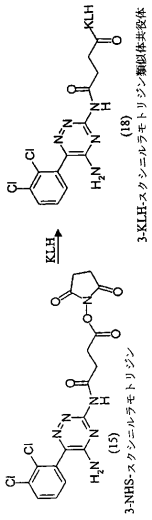
【 図 1 3 A 】



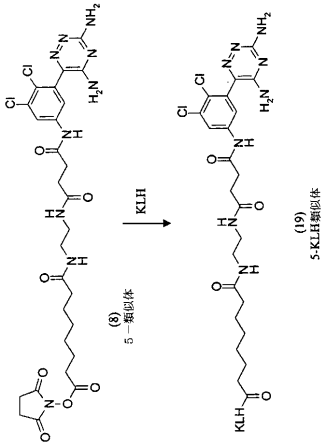
【 図 1 3 B 】



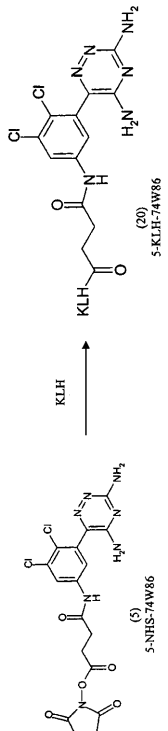
【 図 1 3 C 】



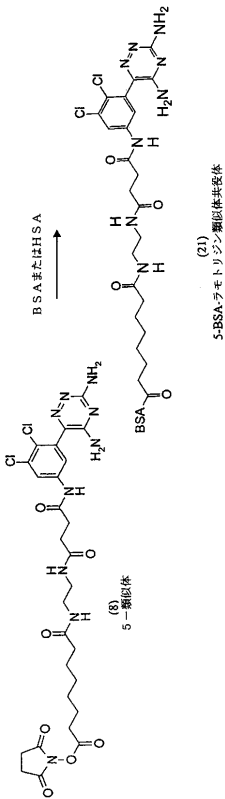
【 図 1 3 D 】



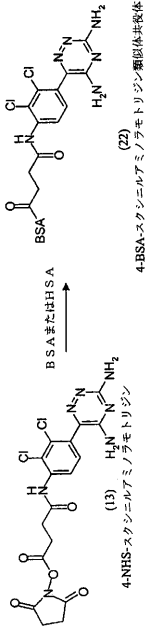
【 図 1 3 E 】



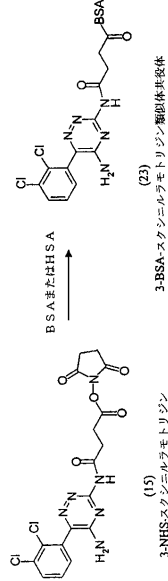
【 図 1 4 A 】



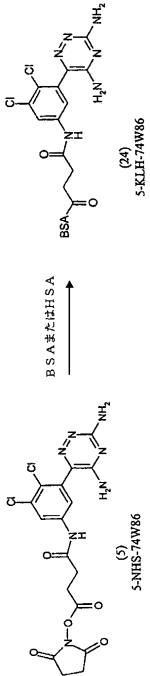
【 図 1 4 B 】



【 図 1 4 C 】



【 図 1 4 D 】



【 図 1 5 】

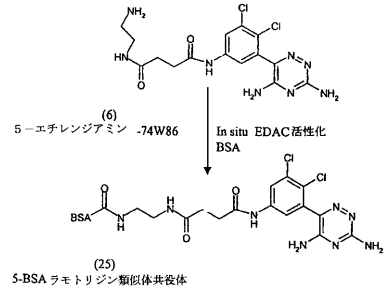


図 1 5 A

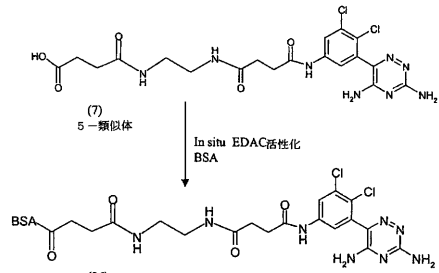


図 1 5 B

【 図 16 A 】

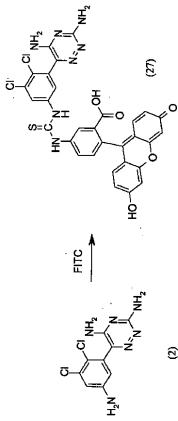


Fig. 16A

【 図 16 B 】

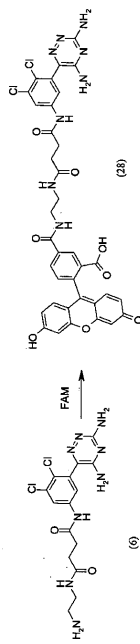
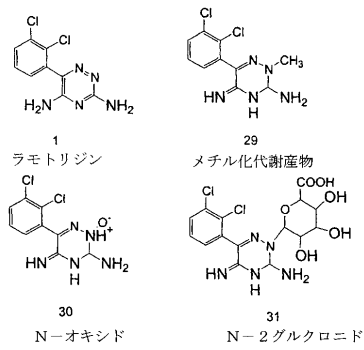


Fig. 16B

【 図 18 】



【 図 20 】

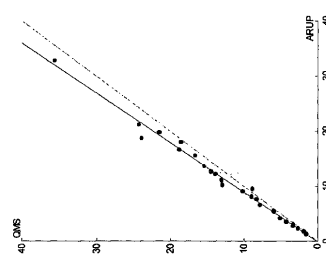
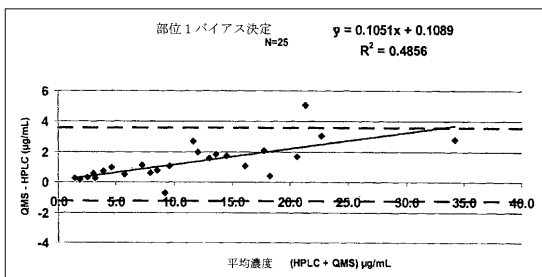


Fig. 20

【 図 19 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US05/38258	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER			
IPC: G01N 33/53(2007.01),37/00(2007.01);C07K 16/00(2007.01),1/10(2007.01)			
USPC: 435/7.1,7.92,7.93;436/56,815;530/388.9,389.8,402,807			
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC			
B. FIELDS SEARCHED			
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/7.1,7.92,7.93; 436/56,815; 530/388.9,389.8,402,807			
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched			
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
X	Sailstad et al. Immunofluorometric assay for lamotrigine (lammictal) in human plasma. Therapeutic Drug Monitoring 1991, vol. 13, pp 433-442., especially abstract, page 45 and fig.4.	1-28	
Y	US 6,333,198 B1 (Edmeades et al.) 25 December 2001 (25.12.2001), especially column 1-6.	10 and 16	
Y	US 2003/0099636 A1 (Epshtein et al.) 29 May 2003 (29.05.2003), especially paragraph [0083].	1-6	
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.			
* Special categories of cited documents:			
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"I"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 08 December 2006 (08.12.2006)		Date of mailing of the international search report 19 JAN 2007	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Shafiqul Haq <i>Maria J. Watson</i> Telephone No. 571-272-1600	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/38258

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

APS, CAPLUS

Search terms: lamotrigine, lamictal, lamiktal, crisomet, antibody, anti-lamotrigine, detect?, assays, immunoassays, immunodiagnos?, analogs, tracer.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
G 0 1 N 21/78 (2006.01) G 0 1 N 33/543 5 8 1 A
 G 0 1 N 21/78 C

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100091638

弁理士 江尻 ひろ子

(72)発明者 オウヤン, アンロン

アメリカ合衆国インディアナ州46268, インディアナポリス, ウォータールー・サークル 3
211

(72)発明者 アラバシャヒ, リリ

アメリカ合衆国インディアナ州46032, カーマル, ペピン・プレイス 14147

(72)発明者 ロパーツ, マーク

アメリカ合衆国インディアナ州46033, カーマル, プランテーション・ウッド・レーン 14
069

(72)発明者 ウォール, メリッサ

アメリカ合衆国インディアナ州46123, エーボン, ノーザン・ドライブ 8296

Fターム(参考) 2G054 AA06 AB04 CA30 CE02 EA03 GA04 GB02

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2008518234A5	公开(公告)日	2008-07-10
申请号	JP2007539029	申请日	2005-10-21
申请(专利权)人(译)	Seradain公司		
[标]发明人	オウヤンアンロン アラバシャヒリリ ロパーツマーク ウォールメリッサ		
发明人	オウヤン,アンロン アラバシャヒ,リリ ロパーツ,マーク ウォール,メリッサ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/577 G01N33/531 G01N33/542 G01N33/543 G01N21/78		
CPC分类号	A61P37/04 A61P43/00 C07D253/075 C07K16/44 G01N33/6854 G01N33/94 G01N33/9473 Y10S436/815 Y10T436/13		
FI分类号	G01N33/53.S G01N33/577.B G01N33/531.A G01N33/542.A G01N33/542.B G01N33/543.581.A G01N21/78.C		
F-TERM分类号	2G054/AA06 2G054/AB04 2G054/CA30 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/GA04 2G054/GB02		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
优先权	60/621764 2004-10-25 US 11/254637 2005-10-20 US		
其他公开文献	JP2008518234A JP4902544B2		

摘要(译)

通常，本发明涉及在三嗪3-位和苯4-位和5-位具有取代基的拉莫三嗪类似物。拉莫三嗪类似物可包括可用于制备抗拉莫三嗪抗体的免疫原性部分，或可用于拉莫三嗪的免疫诊断测定的抗原部分。此外，拉莫三嗪类似物可包括示踪剂部分，用于在免疫诊断测定期间检测类似物的存在或量。另外，拉莫三嗪类似物可用于免疫诊断测定，以与拉莫三嗪竞争与抗拉莫三嗪抗体结合。