

(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2008-537110

(P2008-537110A)

(43) 公表日 平成20年9月11日(2008.9.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 S	4 B 0 6 4
<b>GO 1 N 33/547 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/547	4 C 0 5 7
<b>GO 1 N 33/577 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/577 B	4 H 0 4 5
<b>CO 7 H 15/252 (2006.01)</b>	CO 7 H 15/252 C S P	
<b>CO 7 K 16/44 (2006.01)</b>	CO 7 K 16/44	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 56 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-504212 (P2008-504212)  
 (86) (22) 出願日 平成18年3月27日 (2006. 3. 27)  
 (85) 翻訳文提出日 平成19年11月26日 (2007. 11. 26)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/011022  
 (87) 国際公開番号 W02006/104970  
 (87) 国際公開日 平成18年10月5日 (2006. 10. 5)  
 (31) 優先権主張番号 60/666, 288  
 (32) 優先日 平成17年3月30日 (2005. 3. 30)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507266325  
 サラダックス バイオメディカル インク  
 .  
 アメリカ合衆国、ペンシルヴァニア州 1  
 8 0 1 5 ベツレヘム、ジョーダン ホー  
 ル、リサーチ ドライヴ 1 1 5  
 (74) 代理人 100104215  
 弁理士 大森 純一  
 (74) 代理人 100117330  
 弁理士 折居 章  
 (72) 発明者 サラモネ サルヴァトーレ  
 アメリカ合衆国 ニュージャージー州 O  
 8 5 5 9 ストックトン ヤード ロード  
 6 5

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ドキソルピシン免疫測定法

(57) 【要約】

【課題】

存在を決定しおよび/または化学療法中に急速に最適な薬物濃度を決定するために人間の生体液中のドキソルピシン及び薬学的な活性代謝産物の存在を検出し量を定量化する免疫測定法の提供。

【解決手段】

ドキソルピシンの1 3及び1 4位から誘導される新規のドキソルピシンの共役と新規のドキソルピシン免疫原及び生体液中のドキソルピシンの定量化及びモニタリングのための免疫測定法に有用な免疫原に連結されたこれらのドキソルピシンによって生成された抗体。

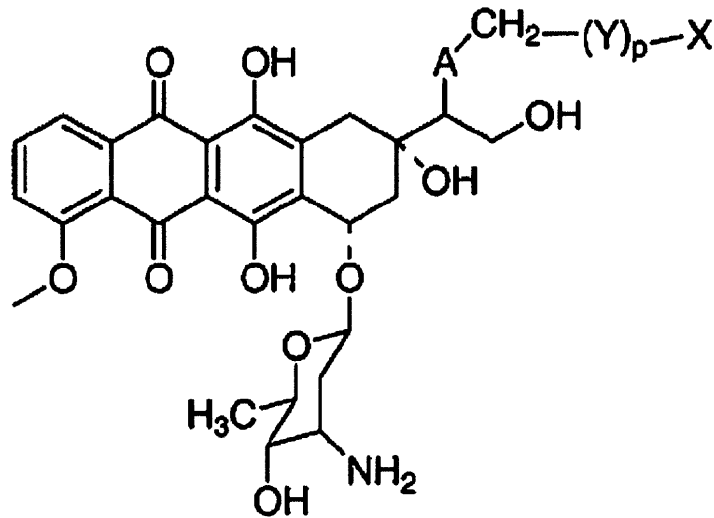
【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- a) 試料と、  
 b) ドキソルピシンに実質的に反応し、ドキソルピシンアグリコンに実質的に交差反応しない抗体と、  
 c) 一般式

【化 1】



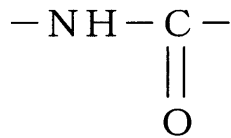
10

20

**II-A**

(式中、Aは

【化 2】

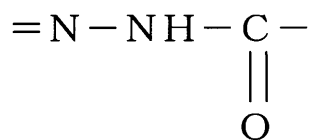


30

= N - O -

又は

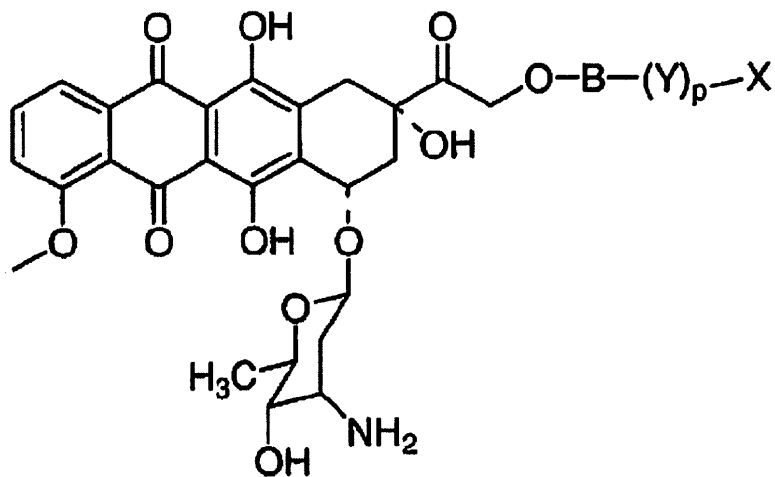
【化 3】



40

であって、Yは有機スペーシング基、Xはアミノ又はチオール基を介して担体に結合可能な官能基、pは0から1の整数である)の化合物、  
 一般式

【化 4】

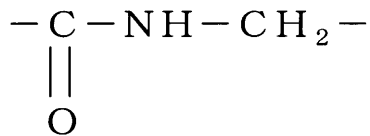


10

**II-B**

(式中、X, Y及びpは上述のとおりであり、Bは -CH<sub>2</sub>- 又は  
【化 5】

20



である)

の化合物、又はその混合物を伴う、反応性前記チオール基又はアミノ基のどちらかを有する前記担体の共役と

の混合物を準備することを含む前記試料中のドキソルピシン検出のための免疫測定法であって、

30

試料中のドキソルピシン及び前記混合物中の前記共役を前記混合物中で前記抗体と結合させ、その後、前記抗体に結合又は未結合の前記混合物中の前記共役量を測定し、それによって試料中のドキソルピシンの存在を測定することができることを特徴とする免疫測定法。

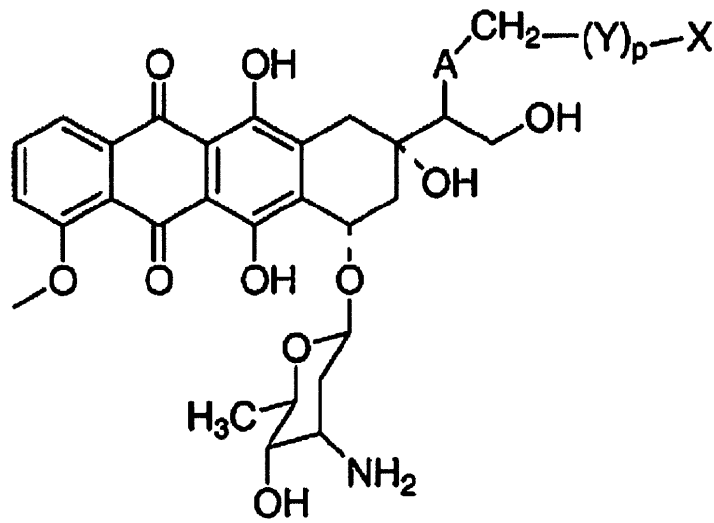
【請求項 2】

請求項 1 記載の方法であって、試料はヒトの試料であることを特徴とする免疫測定法。

【請求項 3】

請求項 2 記載の免疫測定法であって、前記抗体は、一般式

【化 6】



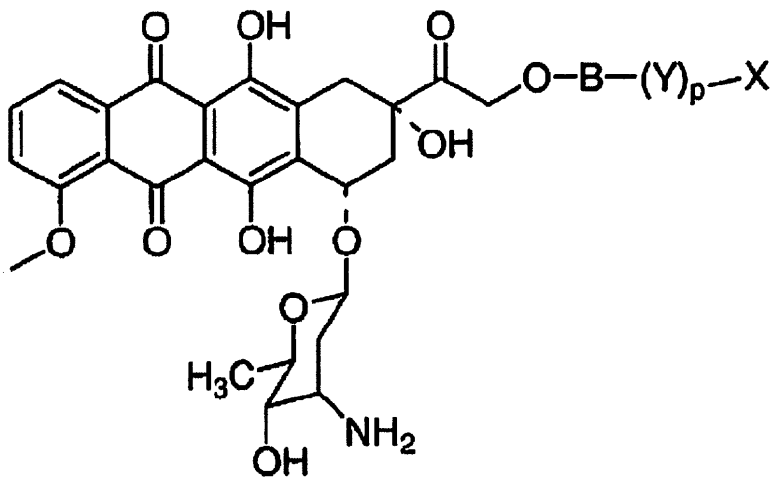
10

**II-A**

(式中、 $p$ 、 $X$ 、 $Y$ 及び $A$ は上述のとおり)  
 の化合物、又は  
 一般式

20

【化 7】



30

**II-B**

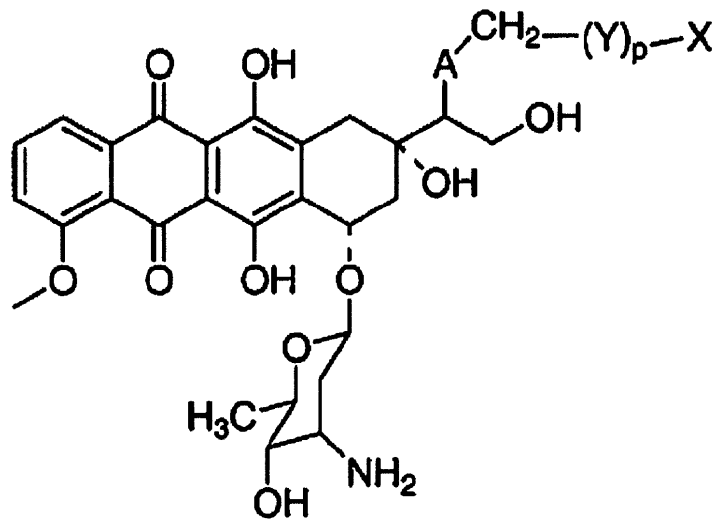
(式中、 $p$ 、 $Y$ 、 $X$ 及び $B$ は上述のとおり)  
 の化合物、又はその混合物に共役された反応性チオール又はアミノ基を有する免疫原担体  
 を含む免疫原から生成されることを特徴とする免疫測定方法。

40

【請求項 4】

請求項 3 記載の免疫測定法であって、抗体を生成するための前記免疫原担体に共役する  
 化合物は、一般式

【化 8】



10

**II-A**

(式中、 $p$ 、 $X$ 、 $Y$ 及び $A$ は上述のとおり)を有することを特徴とする免疫測定法。

【請求項 5】

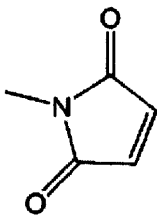
20

請求項 4 記載の免疫測定法であって、担体はチオール基を含み、 $X$ は免疫原ポリマーに連結する化合物であり、前記チオールに反応可能な官能基であることを特徴とする免疫測定法。

【請求項 6】

請求項 5 記載の免疫測定法であって、 $X$ は

【化 9】



30

であることを特徴とする免疫測定法。

【請求項 7】

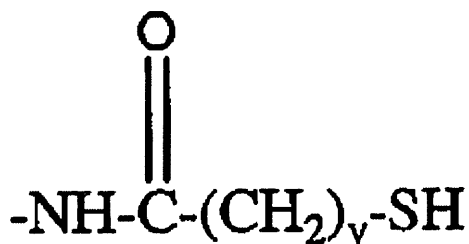
請求項 6 記載の免疫測定法であって、 $Y$ は低級アルキルであることを特徴とする免疫測定法。

【請求項 8】

請求項 7 記載の免疫測定法であって、免疫原担体は官能基

40

【化 10】



( $v$ は 1 から 6 の整数である)

50

を含むことを特徴とする免疫測定法。

【請求項 9】

請求項 2 記載の免疫測定法であって、前記抗体は固形支持体に付着していることを特徴とする免疫測定法。

【請求項 10】

請求項 9 記載の免疫測定法であって、前記固形支持体はマイクロタイタープレートであることを特徴とする免疫測定法。

【請求項 11】

請求項 9 記載の免疫測定法であって、前記固形支持体は微粒子であることを特徴とする免疫測定法。

10

【請求項 12】

ドキソルピシンに選択的に結合し、ドキソルピシンアグリコンに実質的に結合しないことを特徴とする抗体。

【請求項 13】

請求項 12 記載の抗体であって、前記抗体はマウス、羊、ウサギ又はラットから誘導されることを特徴とする抗体。

【請求項 14】

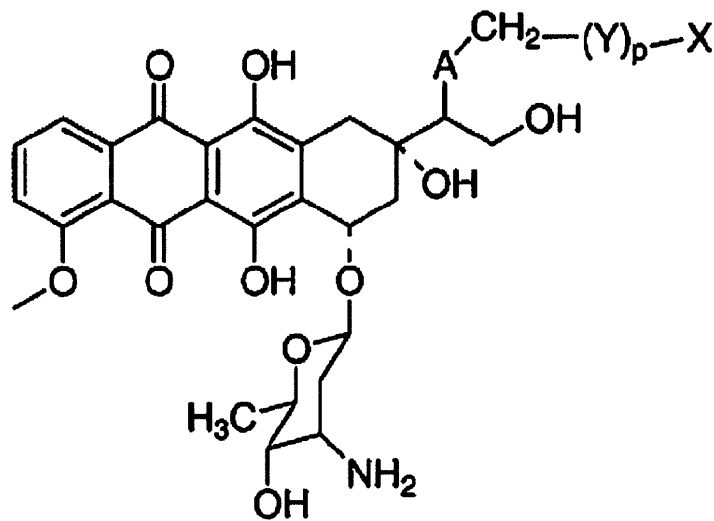
請求項 12 記載の抗体であって、前記抗体はモノクローナル抗体であることを特徴とする抗体。

【請求項 15】

請求項 12 記載の抗体であって、前記抗体は、一般式

20

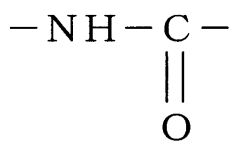
【化 1 1】



30

(式中、Aは

【化 1 2】

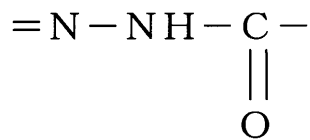


= N - O -

又は

40

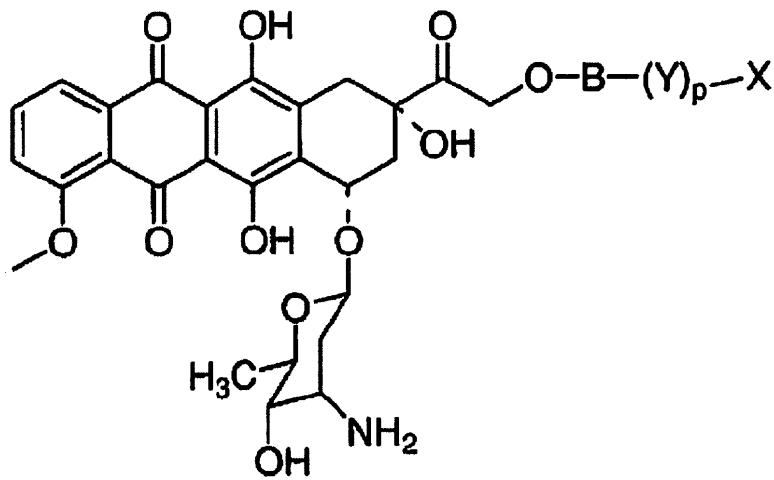
【化 1 3】



であり、Yは有機スペーシング基であり、Xはアミノ又はチオール基を通して担体に結合することが可能な官能基であり、pは0から1の整数である）  
の化合物、又は一般式

10

【化 1 4】



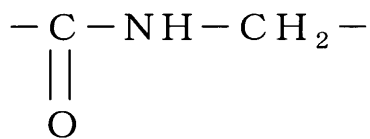
20

**II-B**

(式中、X, Y, 及び p は上記のとおりであり、Bは -CH<sub>2</sub>- または

【化 1 5】

30



である)

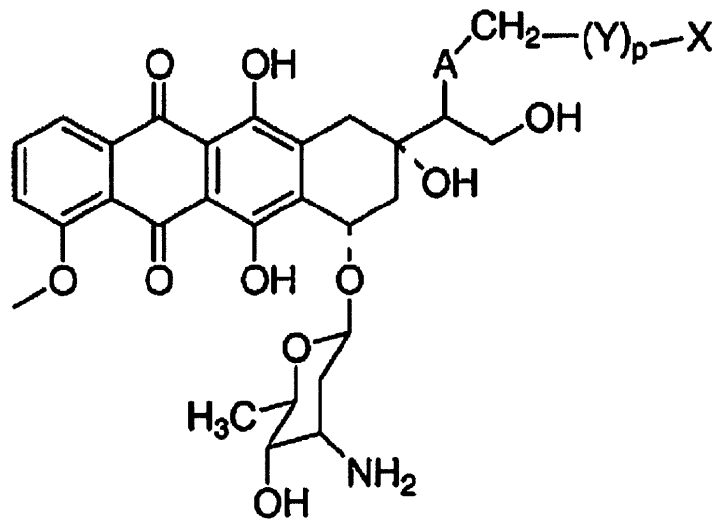
の化合物又はその混合物からなるグループから選択された化合物に共役された反応性アミノ又はチオール基ポリマーを有する免疫原担体から誘導されることを特徴とする抗体。

【請求項 1 6】

40

請求項 1 5 記載の抗体であって、前記抗体を生成するために免疫原担体に共役する化合物は、一般式

【化 1 6】



10

**II-A**

(式中、 $p$ 、 $X$ 、 $Y$ 及び $A$ は上記のとおり)  
を有することを特徴とする抗体。

20

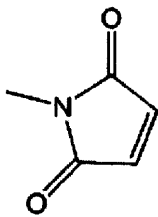
【請求項 1 7】

請求項 1 6 記載の抗体であって、担体はチオール基を含み、 $X$ は免疫原ポリマーに連結する化合物であり、前記チオールに反応可能な官能基であることを特徴とする抗体。

【請求項 1 8】

請求項 1 7 記載の抗体であって、前記化合物における $X$ は、

【化 1 7】



30

であることを特徴とする抗体。

【請求項 1 9】

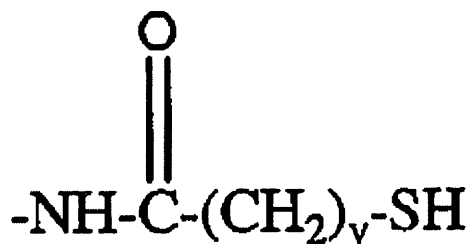
請求項 1 8 記載の抗体であって、前記化合物における $Y$ は低級アルキルであることを特徴とする抗体。

【請求項 2 0】

請求項 1 9 記載の抗体であって、免疫原担体は、官能基として

40

【化 1 8】



(式中、 $v$ は1から6の整数である)

50

を含むことを特徴とする抗体。

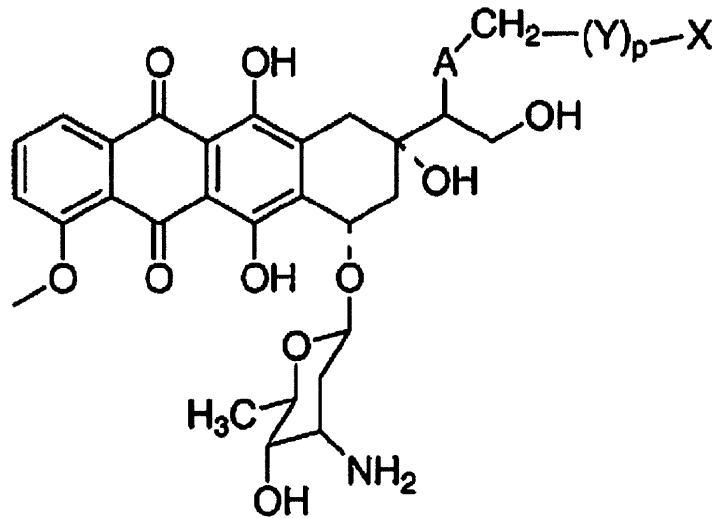
【請求項 2 1】

請求項 2 0 記載の抗体であって、前記抗体は、マウス、羊、ウサギ又はラットから誘導されることを特徴とする抗体。

【請求項 2 2】

一般式が

【化 1 9】



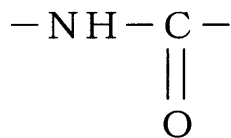
10

20

**II-A**

(式中、Aは

【化 2 0】

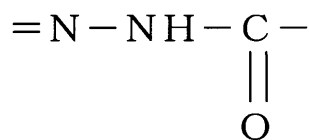


30

= N - O -

又は

【化 2 1】



40

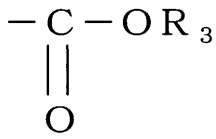
であり、Yは有機スペーシング基であり、Xはチオール又はアミノ基に結合可能な官能基であり、pは0から1の整数である)

であることを特徴とする化合物。

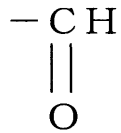
【請求項 2 3】

請求項 2 2 記載の化合物であって、Xは

【化 2 2】

- N = C = R<sub>4</sub>、

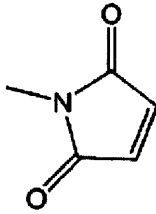
【化 2 3】



10

又は

【化 2 4】



20

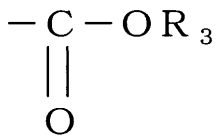
(式中、R<sub>3</sub> は水素又はそれに結びつく酸素原子と一緒に得られる反応性エステルであり、R<sub>4</sub> は酸素又は硫黄である) であることを特徴とする化合物。

【請求項 2 4】

請求項 2 3 記載の化合物であって、X は、

30

【化 2 5】

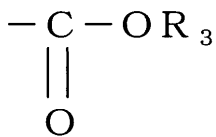
であり、R<sub>3</sub> は水素であることを特徴とする化合物。

【請求項 2 5】

請求項 2 3 記載の化合物であって、X は、

40

【化 2 6】

であり、R<sub>3</sub> は反応性エステルを形成することを特徴とする化合物。

【請求項 2 6】

請求項 2 5 記載の化合物であって、形成されたエステルは低級アルキルエステル、イミ

50

ドエステル又はアミドエステルであることを特徴とする化合物。

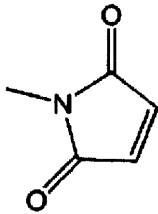
【請求項 27】

請求項 22 記載の化合物であって、X はチオール基に結合可能な官能基であることを特徴とする化合物。

【請求項 28】

請求項 27 記載の化合物であって、X は

【化 27】



10

であることを特徴とする化合物。

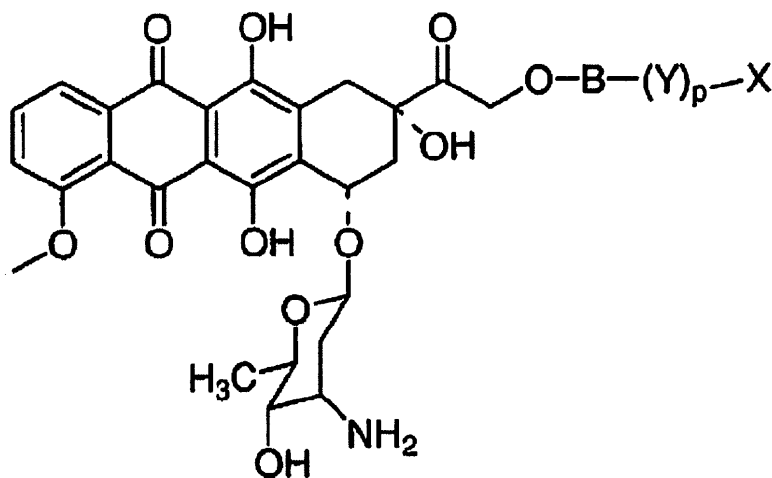
【請求項 29】

請求項 28 記載の化合物であって、Y は 1 から 10 の炭素原子を含むアルキレンであることを特徴とする化合物。

【請求項 30】

一般式が

【化 28】



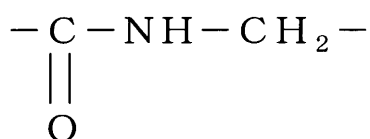
30

## II-B

(式中、Y は有機スペーシング基、X はチオール又はアミノ基に結合可能な官能基であり、B は -CH<sub>2</sub>- 又は

40

【化 29】



である)

であることを特徴とする化合物又はその混合物。

50

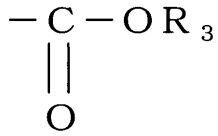
## 【請求項 3 1】

請求項 3 0 記載の化合物であって、p は 0 であることを特徴とする化合物。

## 【請求項 3 2】

請求項 3 1 記載の化合物であって、X は、

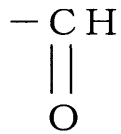
## 【化 3 0】



10

- N = C = R<sub>4</sub>、

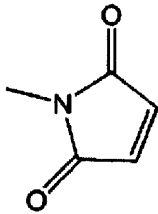
## 【化 3 1】



又は

20

## 【化 3 2】



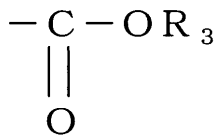
(式中 R<sub>3</sub> は水素又はそれに結びつく酸素原子と一緒に得られる反応エステルであり、R<sub>4</sub> は酸素又は硫黄である)

であることを特徴とする化合物。

## 【請求項 3 3】

請求項 3 2 記載の化合物であって、X は、

## 【化 3 3】



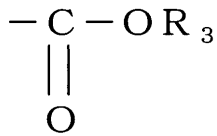
40

であり、R<sub>3</sub> は水素であることを特徴とする化合物。

## 【請求項 3 4】

請求項 3 3 記載の化合物であって、X は、

【化 3 4】



であり、 $\text{R}_3$  は反応性エステルを形成することを特徴とする化合物。

【請求項 3 5】

請求項 3 4 記載の化合物であって、形成されたエステルは低級アルキルエステル、イミドエステルまたはアミドエステルであることを特徴とする化合物。 10

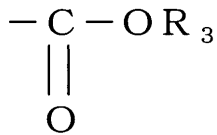
【請求項 3 6】

請求項 3 0 記載の化合物であって、 $p$  は 1 であることを特徴とする化合物。

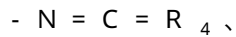
【請求項 3 7】

請求項 3 6 記載の化合物であって、 $X$  は

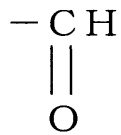
【化 3 5】



20



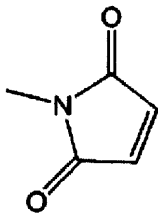
【化 3 6】



30

又は

【化 3 7】



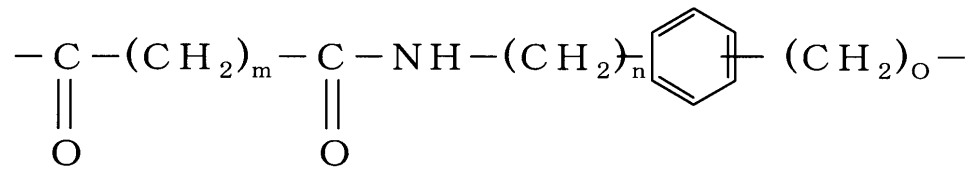
40

(式中  $\text{R}_3$  は水素又はそれに結びつく酸素原子と一緒に得られる反応性エステルであり、 $\text{R}_4$  は酸素又は硫黄である) であることを特徴とする化合物。

【請求項 3 8】

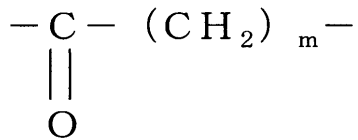
請求項 3 7 記載の化合物であって、 $Y$  は 1 から 10 の炭素原子を含むアルキレン、

【化 3 8】



【化 3 9】

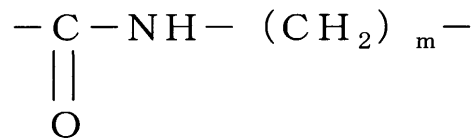
10



又は

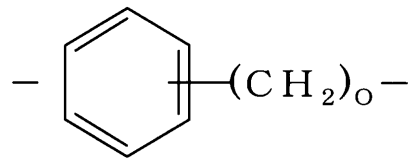
【化 4 0】

20



又は

【化 4 1】



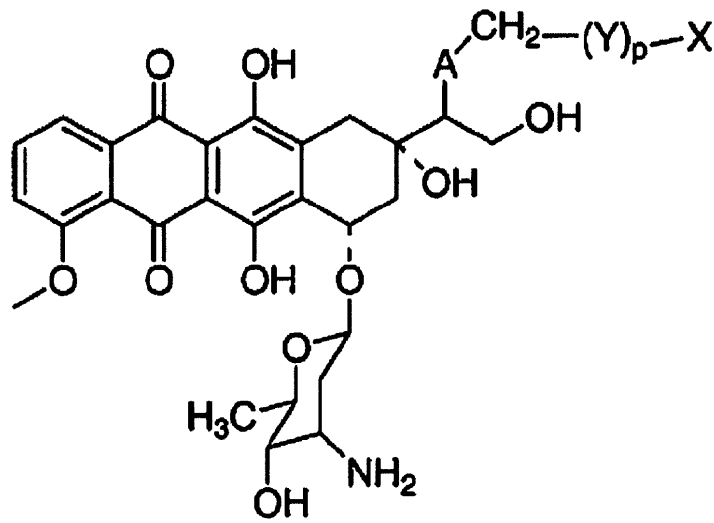
30

(式中  $n$  及び  $o$  は 0 から 6 の整数であり、 $m$  は 1 から 6 の整数である)  
 であることを特徴とする化合物。

【請求項 3 9】

一般式

【化 4 2】

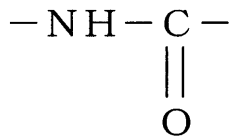


10

**II-A**

(式中、Aは  
【化 4 3】

20

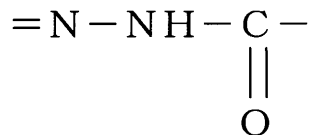


= N - O -

又は

【化 4 4】

30



であって、Yは有機スペーシング基、Xはチオール又はアミノ基に結合可能な官能基、pは0から1の整数である)

の化合物を伴う官能前記チオール又はアミノ基を含むことを特徴とする担体の共役。

【請求項 4 0】

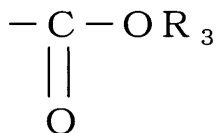
請求項 3 9 記載の共役であって、pは0であることを特徴とする共役。

40

【請求項 4 1】

請求項 4 0 記載の共役であって、Xは

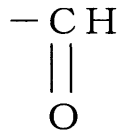
【化 4 5】



- N = C = R 4、

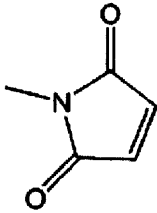
50

【化 4 6】



又は

【化 4 7】



10

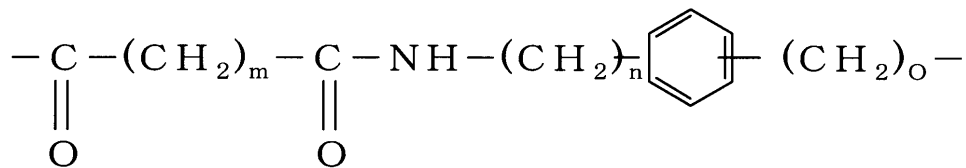
(式中  $R_3$  は水素又はそれに結びつく酸素原子と一緒に得られる反応性エステルであり、 $R_4$  は酸素又は硫黄である)  
であることを特徴とする化合物。

20

【請求項 4 2】

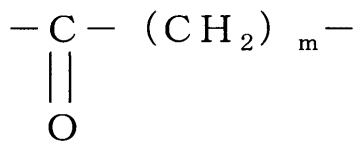
請求項 3 9 記載の共役であって、 $p$  は 1 であり、 $Y$  は 1 から 10 の炭素原子を含むアルキレン、

【化 4 8】



30

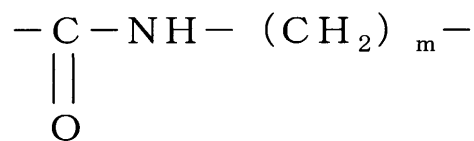
【化 4 9】



40

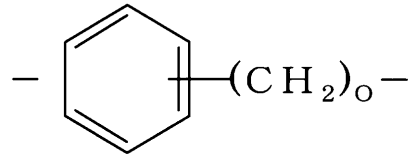
又は

【化 5 0】



又は

【化 5 1】



であり、n 及び o は、0 から 6 の整数であり、m は 1 から 6 の整数であることを特徴とする共役。

10

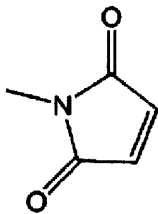
【請求項 4 3】

請求項 4 2 記載の共役であって、前記担体は反応性官能チオール基を有し、X は前記チオール基と結合可能な官能基であることを特徴とする共役。

【請求項 4 4】

請求項 4 3 記載の共役であって、X は

【化 5 2】



20

であることを特徴とする共役。

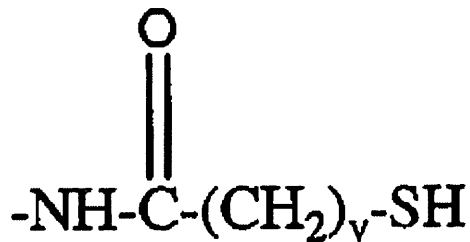
【請求項 4 5】

請求項 4 4 記載の共役であって、Y は低級アルキレンであることを特徴とする共役。

【請求項 4 6】

請求項 4 5 記載の共役であって、前記担体は一般式

【化 5 3】



30

(式中、v は 1 から 6 の整数である)

の官能基を含む重合体ポリアミンを含むことを特徴とする共役。

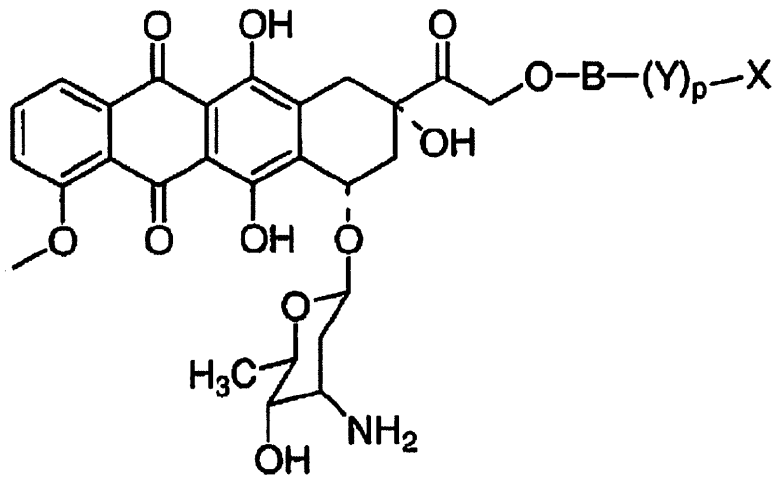
40

【請求項 4 7】

次の一般式の化合物を伴うチオール又はアミン基を有することを特徴とする担体の共役

。

【化 5 4】

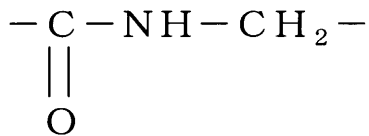


10

**II-B**

(式中、Bは -CH<sub>2</sub>- 又は  
【化 5 5】

20



であり、Yは有機スペーシング基であり、Xは前記担体における前記チオール又はアミノ基に結合可能な官能基であり、pは0から1の整数である)。

【請求項 4 8】

請求項 4 7 記載の共役であって、pは0であることを特徴とする共役。

30

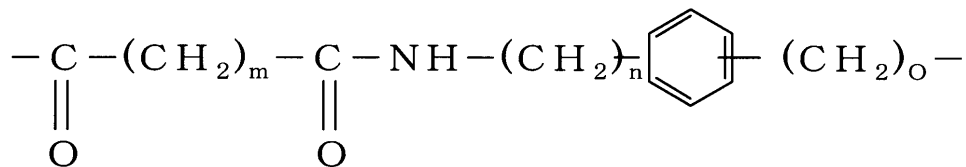
【請求項 4 9】

請求項 4 7 記載の共役であって、pは1であることを特徴とする共役。

【請求項 5 0】

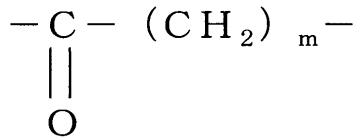
請求項 4 9 記載の共役であって、Yは1から10の炭素原子を含むアルキレン、

【化 5 6】



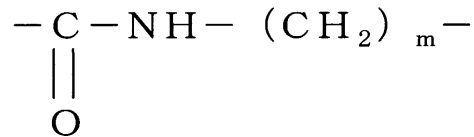
40

【化 5 7】



又は

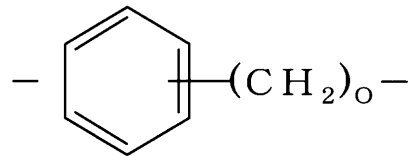
【化 5 8】



10

又は

【化 5 9】



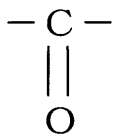
20

(式中 n 及び o は 0 から 6 の整数であり、m は 1 から 6 の整数である)  
であることを特徴とする化合物。

【請求項 5 1】

請求項 5 0 記載の共役であって、担体は

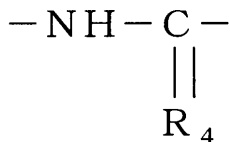
【化 6 0】



30

又は

【化 6 1】



40

(R<sub>4</sub> は酸素又は硫黄である)

によって連結された更に多くのアミノ基を含む免疫原重合体ポリマーを含むことを特徴とする共役。

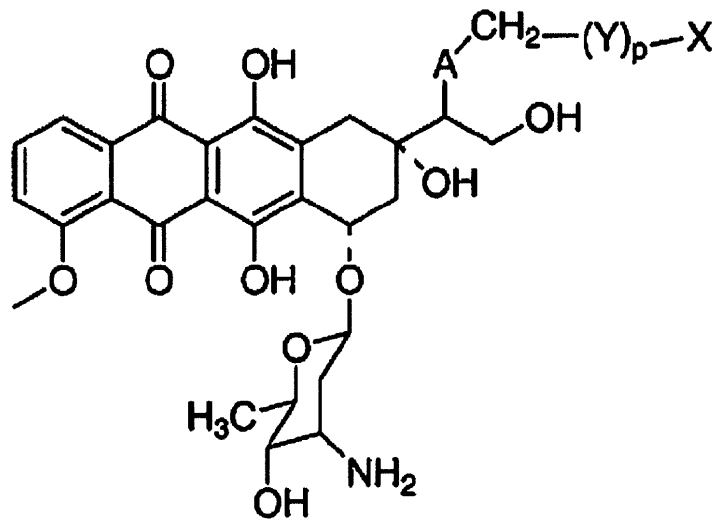
【請求項 5 2】

分離した容器に詰められた試薬を含む患者試料中のドキソルピシンの存在を検出するキットであって、

試薬の 1 つは一般式

50

【化 6 2】

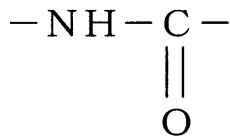


10

**II-A**

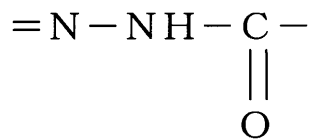
(式中、Aは  
【化 6 3】

20



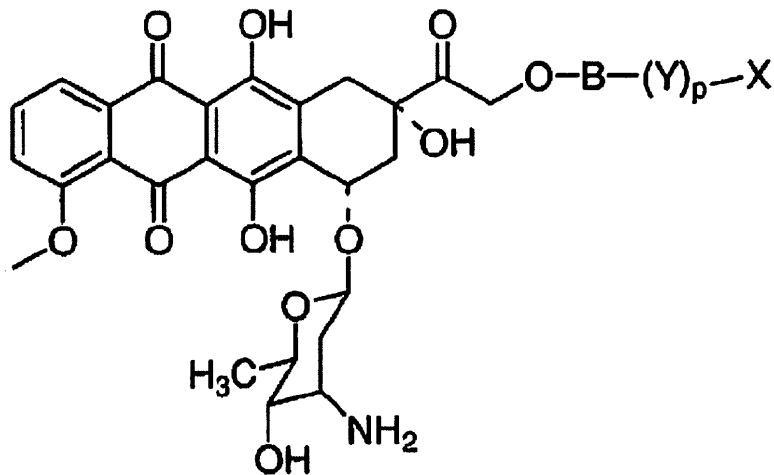
= N - O -  
又は  
【化 6 4】

30



であり、Yは有機スペーシング基、Xは担体におけるアミノ又はチオール基に結合可能な官能基であり、pは0から1の整数である)の化合物又は

【化 6 5】

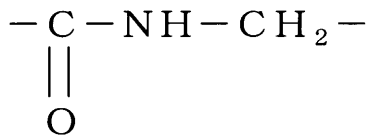


10

**II-B**

(式中、X, Y及びpは上記のとおりであり、Bは -CH<sub>2</sub>- 又は  
【化 6 6】

20



である)

の14-置換ドキソルピシン又はその混合物を含むグループから選択された化合物を伴う官能アミノ又はチオール基を含む前記担体の共役からなり、

2つめの容器にはドキソルピシンに実質的に選択的に反応し、ドキソルピシンアグリコンに実質的に交差反応しない抗体を含むことを特徴とするキット。

30

【請求項53】

請求項52記載のキットであって、前記共役は前記1つめの容器に予め決められた量で存在することを特徴とするキット。

【請求項54】

請求項53記載のキットであって、前記キットは前記試料中のドキソルピシン量を測定するのに使われることを特徴とするキット。

【請求項55】

請求項52記載のキットであって、前記抗体は、前記13-置換又は14-置換ドキソルピシンに連結された末端官能アミノ又はチオール基を有する免疫原担体の共役から生成されることを特徴とするキット。

40

【請求項56】

請求項55記載のキットであって、前記共役は13-置換ドキソルピシンであることを特徴とするキット。

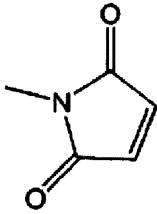
【請求項57】

請求項56記載のキットであって、前記担体は反応性末端官能チオール基を有し、Xは前記チオール基と結合可能な末端官能基であることを特徴とするキット。

【請求項58】

請求項57記載のキットであって、Xは

【化67】



であることを特徴とするキット。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、化学療法中に急速に最適な薬物濃度を決定するために人間の生体液中のドキソルビシン及び薬学的な活性代謝産物の存在を検出し及び/又は量を定量化する免疫学的分析の技術分野に関する。

【背景技術】

【0002】

癌は、身体の一部の細胞がコントロールできずに成長し始める場合に発展するという共通の特性をすべて共有する一群の悪性腫瘍について記述するために使用される用語である。ほとんどの癌は腫物として生ずるが、血液にも同様に現れ、それらが成長する他の組織を通して循環することもある。癌悪性腫瘍には、外科、化学療法、放射線治療、及びこれらの組み合わせが最も一般に扱われる。特定の癌を治療するために使用される治療のタイプは、癌悪性のタイプ、およびそれが診断された段階を含むいくつかの要因に依存する。

20

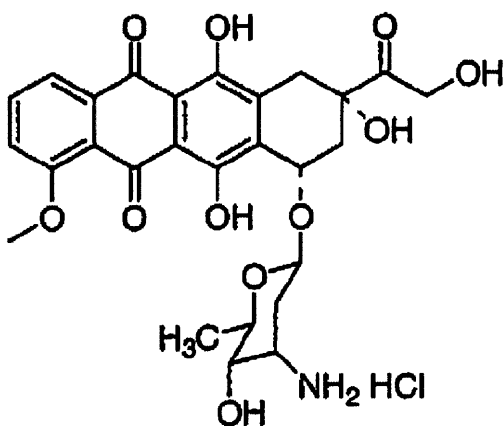
【0003】

ドキソルビシン（アドリアマイシンとしても知られている）は、乳癌の治療に使用される一般的な細胞毒性薬である。ドキソルビシンの量産品の塩酸塩であるアドリアマイシンは次の一般式を有する。

【0004】

【化68】

30



I

40

【0005】

この化合物は、心臓毒性、骨髄抑制、知覚過敏症、吐き気及び嘔吐といった衰弱させる副作用に関係している。身体中のドキソルビシンのレベルのモニターおよび服用量の調整によって、これらの副作用を、患者において一層よくコントロールし制限することができる。

50

## 【0006】

同時に、多くの場合ドキソルビシンの服用量と、治療効果に影響する血清薬物濃度の結果との間に非常に可変関係がある。個人間でのドキソルビシンの薬物動態学の可変性の程度は5倍にもなることがあり、次のものを含む多くの要因によって強い影響が生じる。

- ・ 器官機能
- ・ 遺伝子調節
- ・ 病状
- ・ 年齢
- ・ 薬物間相互作用
- ・ 薬物接摂取時間
- ・ 投薬の方法
- ・ 投薬に関するテクニック

10

この可変性の結果、異なる個人が同じ薬を等しい量で服用して、結果的に劇的に異なる臨床結果をもたらされることもある（非特許文献1参照）。同じドキソルビン投薬の有効性は、個々の薬物クリアランスおよび患者の中の最終の血清薬物濃度に基づいて著しく変わる。治療薬管理によって、臨床医は静脈注射用薬の投与で患者の個々の変化を洞察することができるだろう。治療薬管理によって、患者への投薬を個別に取り扱うことができるかもしれない。また、望まない副作用なしで癌を有効に治療する見込みは、はるかに高くなるだろう。

20

## 【0007】

さらに、ドキソルビシンの治療薬管理は、実際に処方された投薬及び効果的な血清濃度レベルの達成を備えた投薬化学療法を施す際にコンプライアンスを保証する優れたツールとして役立つだろう。血清濃度における変動性は、生理的な要素だけでなく投薬テクニックにおける変化からの結果もまたある。ドキソルビシンの治療薬管理のルーチンは、通常の実験室の装置に適応できる簡単な自動的なテストの有用性を必要とするだろう。これらの基準に適切なテストは、放射標識免疫測定法及び酵素免疫測定法などの免疫測定法である。

【非特許文献1】Hon et. al. Clinical Chemistry 44, pp 388 - 400, 1998

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

30

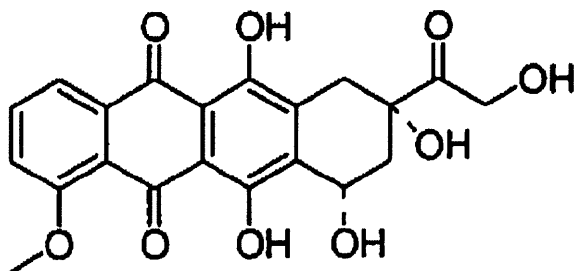
## 【0008】

しかし、これらの免疫測定法に用いられる対応する抗体は、非薬学的に活性なドキソルビン代謝産物に実質的に活性でなく、ドキソルビンに広い交差反応性を明らかにしなければならない。ドキソルビシンの薬物濃度をモニタリングするのに効果的であるために、抗体は、活性化合物であるドキソルビンに最も特異的でなければならず、次の一般式を有するドキソルビシンの非薬学的活性代謝産物、特にドキソルビンアグリコンへの交差反応性に対してとても低い交差反応性を示さなければならない。

## 【0009】

## 【化69】

40



I-A

50

【課題を解決するための手段】

【0010】

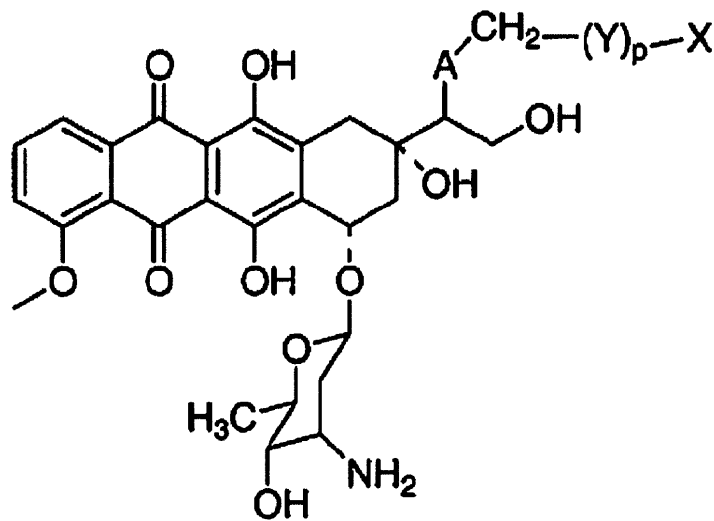
本発明によれば、非薬学的活性ドキソルピシン代謝産物、特にドキソルピシンアグリコンに実質的に交差反応することなくドキソルピシンに結合するために、ドキソルピシンに実質的に選択的に反応する新しい抗体クラスが生産される。選択的反応によって、本抗体が薬学的に活性ドキソルピシン分子と反応だけし、非薬学的活性ドキソルピシン代謝産物である最も重要な阻害代謝産物であるドキソルピシンアグリコンと、実質的に反応しないことを意味する。

【0011】

一般式

【0012】

【化70】

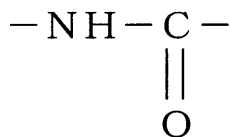


**II-A**

(式中、Aは、

【0013】

【化71】

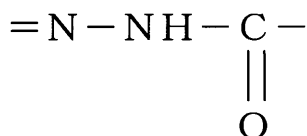


= N - O -

又は、

【0014】

【化72】



であり、

Yは有機スペーシング(spacing)基、Xはアミノ又はチオール基を通して担体に結合可

10

20

30

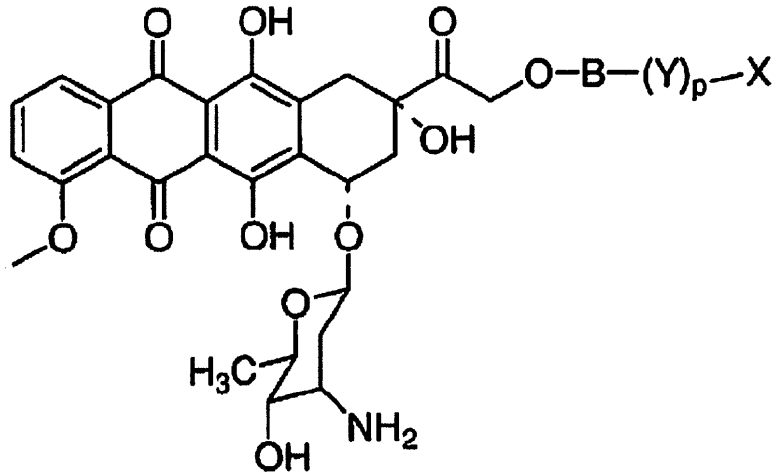
40

50

能な官能基であり、 $p$  は 0 から 1 の整数である)、  
の 1,3 置換化合物、又は

一般式

【0015】  
【化73】



10

**II-B**

20

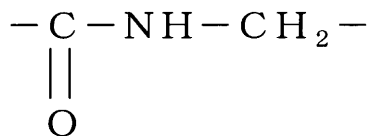
の化合物

(式中、 $p$ 、 $Y$ 及び $X$ は上記のとおりであり、 $B$ は

-CH<sub>2</sub>-

又は

【0016】  
【化74】



30

である。)

またはその混合物に伴う反応性の前記チオール又はアミノ官能基を有する免疫原担体の共役である免疫原の使用によって、ドキソルビシンに特異的で、非薬学的活性代謝産物、特にドキソルビシンアグリコンに実質的に反応しない、又は結合しない抗体を生成することがわかった。実質的に選択的にドキソルビシンに反応し、非薬学的不活性代謝産物、特にドキソルビシンアグリコンに交差反応しないこれらの抗体を準備することにより、ドキソルビシンで治療されている患者の体液試料中のドキソルビシンを特に検出しモニターすることができる免疫測定法を生ずることを可能とする。さらに、前記免疫測定法のための試薬およびキットが本発明内に含まれている。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

本発明によれば、実質的に選択的にドキソルビシンに反応し、上述した薬学的不活性ドキソルビシン代謝産物に実質的に反応しない又は交差反応しない新しいクラスの抗体が供給される。免疫原として一般式 II-A の 1,3-オキソ置換ドキソルビシン及び/又は一般式 II-B の 1,4-ヒドロキシ置換ドキソルビシン又はその混合物のこれらの誘導体の使用を通して、本発明の抗体のこの新しいクラスが準備されることがわかった。これらの

50

抗体の使用を通して、血液、血漿または他の体液料中のドキソルビシンの検出及び/または定量のためのそのような免疫測定のための試薬およびキットを含む免疫測定法が開発された。この免疫測定法の使用によって、体液試料中、好ましくは血液又は血漿試料中のドキソルビシンの存在及び量を検出及び/又は定量することができる。この方法で、ドキソルビシンで治療されている患者を、前記モニタリングに従って調整された治療及び処置の間にモニターすることができる。本発明によって、化学療法薬としてドキソルビシンで治療されている癌患者においてドキソルビシンの治療の薬管理が達成される。

【0018】

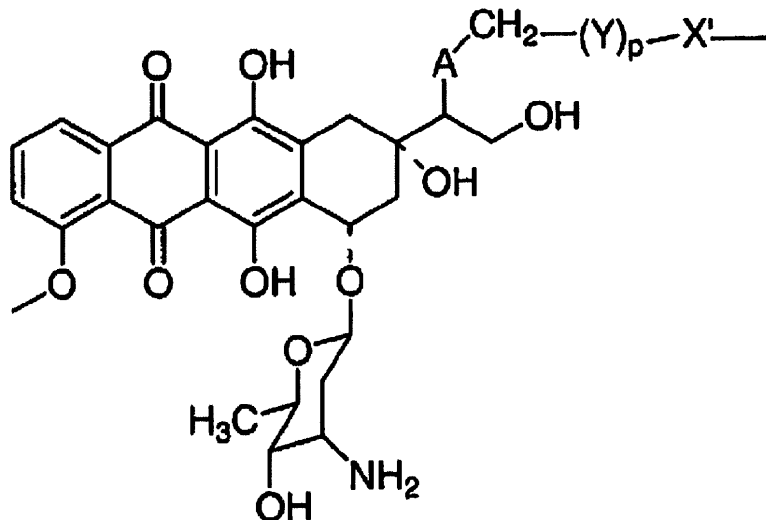
本発明の測定方法において使用される試薬は、一般式 I I - A 及び I I - B またはその混合物を伴う、反応性チオール又はアミノ基を含む担体の共役である。好ましくは、担体は反応性チオール又はアミノ基を含むポリアミンポリマーを含む。免疫原において、担体は、好ましくは反応性チオール又はアミノ基を含むポリアミンポリマーを含む。これらの共役は、本発明の抗体との結合のための試料中にあるドキソルビシンと結合する競合的結合パートナーである。したがって、抗体に結合する共役試薬の量は試料中のドキソルビシンの量に反比例するだろう。本発明によれば、測定方法は、抗体に結合又は未結合の前記共役の検出及びその量の測定に対してどんな従来の測定手段も利用する。前記手段の使用を通じて、結合又は未結合共役の量を測定することができる。一般に、試料中のドキソルビシンの量は、試料中のドキソルビシンによって生成された結合又は未結合共役の測定量と、既知量（既知量は、テストされる試料に予想される範囲内にある）のドキソルビシンを含んでいる標準または校正曲線の試料から測定された結合又は未結合共役の値とを、相互に関連付けることにより決定される。校正曲線を作るためのこれらの研究は試料に使用されるのと同じ免疫測定法手順を使用して決定される。

【0019】

免疫原を含む共役は、一般式 I I - A 又は I I - B 又はその混合物から生成される。反応性末端アミノ又はチオール基を有する免疫原を含む担体は、一般式

【0020】

【化75】



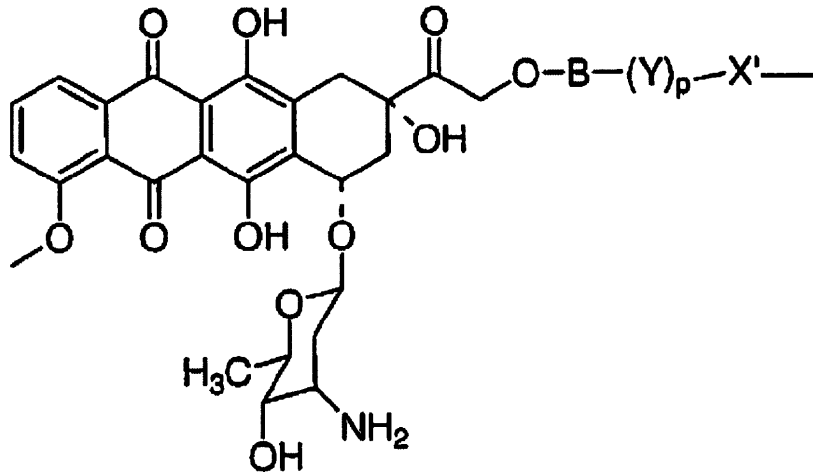
III-A

(式中、Y、A及びpは上述のとおりであり、X'は-CH<sub>2</sub>-または官能結鎖基である)、

一般式

【0021】

【化 7 6】



III-B

10

(式中、X'、Y、B及びpは上述のとおりである)  
の化合物を有する配位子部分に連結する。

【0022】

これらの配位子部分は、ポリアミンポリマーを含む担体上の1つ以上の反応性チオール又はアミノ部位に連結されていてもよい。好ましくはこれらの担体は、ポリマー、最も好ましくは反応性のチオール又はアミノ基を有するポリアミンポリマーを含んでいる。

20

【0023】

(定義)

この記述の全体にわたって、次の定義の意に解釈される。

【0024】

「ドキソルピシン」という用語は、ドキソルピシン及び薬学的に許容のドキソルピシンの塩を含む。

【0025】

「免疫原」、「免疫原の」という用語は、有機体中の免疫反応を誘発する、作り出す、又は生じさせることが可能な物質を指す。

30

【0026】

「共役」という用語は、2つの部分をともに結合することから形成された物質を指す。本発明に従う代表的な共役は、一般式II-A及びII-Bの化合物のような小さな分子と、担体又はポリアミンポリマー(特にタンパク質)のような大きな分子とがともに結合することによって作られたものを含む。共役では、小さな分子は大きな分子の1つ以上の活性部位と結合されていてもよい。共役という用語は免疫原という用語を含む。

【0027】

「ハプテン」は部分的または不完全な抗原である。それらは、抗体形成を刺激することができないが、抗体と反応する、担体なしの物質(ほとんど低い分子量物質)である。後者は、高い分子量の免疫原担体にハプテンが結合し、その後この結合物、例えば免疫原、を人間または動物の被験者に注射することによって形成される。本発明のハプテンは、ドキソルピシンである。

40

【0028】

ここで使用されるように、「スペーシング基」あるいは「スペーサ」は、CH<sub>2</sub>あるいは官能結鎖基により、ハプテン、担体、免疫原、標識あるいはトレーサのような2つ以上の基礎構造を接続する化学構造の一部を指す。これらのスペーサ基は、本出願で後述で列挙する。スペーシング基の原子及びスペーシング基内の鎖の原子は、化学結合によってそれら自身接続される。好ましいスペーサは、直鎖か分岐鎖か、飽和か不飽和の炭素鎖である。これらの炭素鎖は、さらに鎖内で、あるいは鎖の末端で、1つ以上のヘテロ原子を含んでいてもよい。「ヘテロ原子」は、酸素、窒素および硫黄からなる基から選ばれる、炭

50

素以外の原子を意味する。スペーシング基は、さらに鎖の一部として又は鎖内の原子のうちの1つと置換して、環式又は芳香族基を含んでいてもよい。

【0029】

スペーシング基中の原子の数は水素以外の原子を数えることにより決定される。スペーシング基内の鎖中の原子の数は、接続している基礎構造間の最短のルートに沿った水素以外の原子の数を数えることにより決定される。官能結鎖基は、ハプテンと標識又は担体又はポリアミンポリマーとの共役を合成するためのハプテン又はスペーシング基を活性化する、例えば、利用可能な官能部をオンする、ために使用されてもよい。

【0030】

ここで使用される「免疫原担体」という用語は、免疫原物質（一般にタンパク質又は反応性チオール又はアミノ基を運ぶために変化させられたタンパク質）であり、それはハプテン、本ケースではドキシソルピシン、と結合することができ、それによってこれらのハプテン誘導体が免疫反応を引き起こすことができるようにし、これらのハプテンと特異的に結合することができる抗体の生成を誘発する。免疫原担体及び結鎖基は、本明細書で後述して列挙されるだろう。免疫原担体物質中で、宿主から異物として認識され、それによって免疫原反応を誘発する、タンパク質、糖タンパク質、複合ポリアミノ-多糖類、粒子、及び核酸が含まれる。ポリアミノ-多糖類は、この生成で知られている従来的手段を使用して、多糖から生成されてもよい。

10

【0031】

さらに様々なタンパク質タイプが、ポリ（アミノ酸）免疫原担体として使用されてもよい。これらのタイプは、アルブミン、血清蛋白質、リポタンパク質などを含んでいる。実例となるタンパク質はウシ血清アルブミン（BSA）、キーホールリンペットヘモシニアン（KLH）、卵オボアルブミン、牛のチログロブリン（BTG）などを含んでいる。あるいは、合成ポリ（アミノ酸）を利用してもよい。あるいは、これらのタンパク質を反応性チオール基を含むように変更させてもよい。

20

【0032】

免疫原担体はさらにポリアミノ多糖類を含んでもよい。それは、単糖の繰り返しの縮合によって作られた高分子量ポリマーである。多糖類の例は、デンプン、グリコーゲン、セルロース、アラビアゴムのような炭水化物ガム、寒天などである。多糖類はさらにポリアミノ酸残基および/または脂肪酸残基を含んでいる。

30

【0033】

免疫原の担体は、さらに単独または上述のポリ（アミノ酸）又は多糖類の内の1つに共役するポリ（核酸）であってもよい。

【0034】

免疫原担体はさらに固形粒子を含んでいてもよい。粒子は、大体少なくとも約0.02ミクロン（ $\mu\text{m}$ ）で約100 $\mu\text{m}$ 以下であり、そして通常およそ0.05~10 $\mu\text{m}$ の直径である。粒子は有機又は無機であってもよく、膨張可能又は膨張不可能であってもよく、多孔性又は非多孔性であってもよく、最適にはおおよそ水の密度である通常約0.7~1.5g/mLであり、透明な、又は部分的に透明な、又は不透明な物質から構成されている。粒子は、赤血球、白血球、リンパ細胞、ハイブリドーマ、連鎖球菌、黄色ブドウ球菌、大腸菌およびウィルスのような例に制限されない細胞及び微生物のような生体物質であってもよい。粒子は、更に有機および無機ポリマー、リポソーム、ラテックス、リン脂質小胞あるいはリポタンパク質で構成されていてもよい。

40

【0035】

「ポリ（アミノ酸）」あるいは「ポリペプチド」は、アミノ酸から形成されたポリアミドである。ポリ（アミノ酸）は、約2,000分子量から、分子量の上限はなく、通常10,000,000未満、通常多くても約600,000ダルトンの範囲にある。免疫原担体あるいは酵素が含まれているかどうかは依存して、通常範囲が異なるだろう。

【0036】

「ペプチド」は、アミド（ペプチド）結合による2つ以上のアミノ酸の連結によって形

50

成された化合物であり、通常 アミノ酸のポリマーであり、各アミノ酸残基（ $\text{NH}_2$  末端を除く）の アミノ基が線鎖中の隣の残基の カルボキシ基に連結している。ここでは、ペプチド、ポリペプチドおよびポリ（アミノ酸）という用語を、サイズに関する制限なく、この種の化合物を現すために同じ意味で使用する。この種の最大の部分はタンパク質と言う。これらのポリマーペプチドは、反応性  $\text{NH}_2$  末端基を末端  $\text{SH}$  基に変えるために、通常的手段によって変化させることができる。

【0037】

「標識」、「検出分子」あるいは「トレーサ」は、検出信号を作る、あるいは作ることを引き起こすことができるあらゆる分子である。標識は、分析物、免疫源、抗体、又は、配位子（特にハプテン）のような受容体に結合し得る受容体や分子のような他の分子に、共役することができる。標識の制限されない例は、放射性同位体および酵素、酵素破片、酵素基質、酵素阻害物、補酵素、触媒、蛍光物質、染料、化学ルミネセンス、ルミネセンス、又は感光剤を含み、磁性がない又は磁性のある粒子、固形支持体、リボソーム、配位子あるいは受容体を含む。

10

【0038】

用語「抗体」は、抗原の結合パートナーである特異タンパク質を指し、他の物質を除外して抗原に対して特異結合親和力を持つ物質又は物質のグループである。一般的な用語の抗体は、ポリクロナール抗体、モノクロナール抗体および抗体断片を包含する。

【0039】

用語「誘導体」は、1つ以上の化学反応によって母化合物から作られた化合物か分子を指す。

20

【0040】

用語「担体」は、上述したような免疫原ポリマーのような固形粒子及び/又は重合体ポリマーを指す。担体が固形粒子である場合、固形粒子は、一般式  $\text{II} - \text{A}$  及び  $\text{II} - \text{B}$  の化合物中の官能基  $\text{X}$  に結合するための1つ以上の反応部位を提供するためにポリアミンポリマーに結合される、覆われる、あるいは付着されていてもよい。

【0041】

用語「試薬キット」又は「テストキット」は、測定を行うのに使われる用具一式を指す。試薬は、それらの交差反応性および安定性、液中かあるいは凍結乾燥状態下であるかによって、同じ又は個別の容器の中に化合物がパッケージされた状態で提供することができる。キット中に供給される試薬の量および割合は、個々の用途に最適の結果が得るように選択することができる。本発明の特徴を具体化する試薬キットは、ドキシソルピシンに特異な抗体を含んでいる。キットは、さらに分析物の配位子及び較正制御物質を含んでもよい。試薬は液体の形態にしてもよいし、凍結乾燥されていてもよい。

30

【0042】

「較正制御物質」という表現は、測定される薬の既知量を含んでいる任意の標準あるいは参照物質を指す。薬の濃度は、標準に対して得られた結果と未知の資料に対して得られた結果との比較により計算される。これは、較正曲線を描くことにより一般に行われる。

【0043】

用語「生体試料」は、生き物あるいは以前は生きていたものからの物質の任意の量を含むが、これに限定されるものではない。そのような生き物は、人間、マウス、猿、ラット、ウサギ、馬、及び他の動物を含むが、これらに限定されるものではない。そのような物質は、血液、血清、血漿、尿、細胞、臓器、組織、骨、骨髄、リンパ液、リンパ節、滑膜組織、軟骨細胞、骨膜マクロファージ、内皮細胞、及び皮膚を含むが、これらに限定されるものではない。

40

【0044】

（試薬と免疫原）

免疫測定法を構築する際、ドキシソルピシンの共役は、抗体上の結合部位に対して試料中のドキシソルピシンと競合するように構築される。本発明の免疫測定法では、試薬は、一般式  $\text{III} - \text{A}$  の化合物の 13 - 置換ドキシソルピシン誘導体及び一般式  $\text{III} - \text{B}$  の 14 -

50

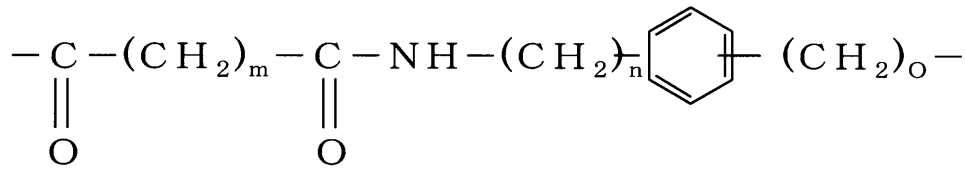
置換ドキソルピシン誘導体である。一般式 I I I - A 及び I I I - B の化合物では、リンカー-スペーサは、この分子の  $-CH_2-(Y)_p-X'$  - または  $-B-(Y)_p-X'$  部分を構成する。これらのリンカー  $X'$  及びスペーサ  $-CH_2-(Y)_p-$  または  $-B-(Y)_p-X'$  は、共役及び免疫原の生成において一般的である。免疫測定法のために共役と免疫原を生成するために利用される、従来のスペーサ-結鎖基 (spacer-linking group) のうちのどれでも、一般式 I I I - A 及び I I I - B の化合物において使用することができる。そのような従来のリンカーおよびスペーサは米国特許 5,501,987 及び米国特許 5,101,015 に開示されている。

【0045】

好ましいスペーサ基中に、前述したスペーサ基が含まれている。特に好ましいスペーシング基は、1 から 10 の炭素原子を含むアルキレンのような基、

【0046】

【化77】

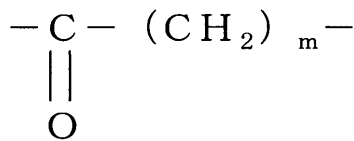


10

20

【0047】

【化78】

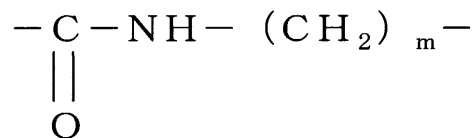


30

又は

【0048】

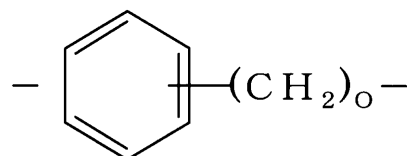
【化79】



又は

【0049】

【化80】



40

である。式中、n 及び o は 0 から 6 の整数であり、m は特に好ましいスペーシング基であるアルキレンを伴う 1 から 6 の整数である。Y によって示されるスペーシング基の上述の

50

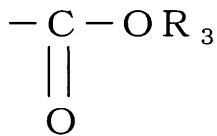
構造においては、官能基 X は構造の右側の末端位置、例えば (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub> 及び (CH<sub>2</sub>)<sub>o</sub> が位置する位置、に接続する。

【0050】

一般式 I I I - A 及び I I I - B の化合物では、X' は、-CH<sub>2</sub>- 又は重合体担体上のアミン又はチオール基にスペーサを連結する官能基である。基 X' は、担体又は免疫原として使用されるポリアミンポリマーにおけるアミノ又はチオール基に結合可能な一般式 I I - A 及び I I - B の化合物における末端官能基 X の結果である。アミン又はチオール基に反応可能な末端官能基は、一般式 I I - A 及び I I - B の化合物中の官能基 X として利用することができる。これらの末端官能基は、好ましくは X が、

【0051】

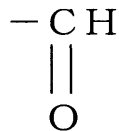
【化81】



-N=C=R<sub>4</sub>、

【0052】

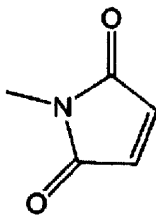
【化82】



又は

【0053】

【化83】



であるものを含む。式中、R<sub>3</sub> は水素又はそれに結びつく酸素原子と一緒に得られる反応性エステルであり、R<sub>4</sub> は酸素又は硫黄である。ラジカル -N=C=R<sub>4</sub> はイソシアン酸塩またはイソチオシアン酸塩になりえる。OR<sub>3</sub> によって形成された活性エステルは、N-ヒドロキシスクシンアミド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール及び p-ニトロフェニルエステルのようなイミドエステルを含む。しかしながら、アミン又はチオール基と反応することができるどんな反応性エステルも使用することができる。カルボキシル基及び反応性エステルは、従来手段によって担体又は免疫原のポリマーに結合する。タンパク質のようなポリアミンポリマー上のアミン基は、本発明の共役を形成するために、重合体免疫原又は担体にスペーサを接続するアミド基を生成する。

【0054】

一般式 I I - A 又は I I - B の化合物中の X が

【0055】

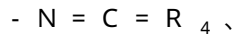
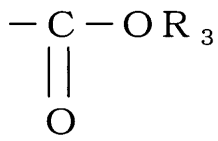
10

20

30

40

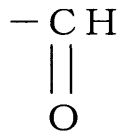
【化 8 4】



又は

【0056】

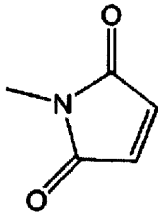
【化 8 5】



であるとき、これらの化合物は、好ましくは重合体または免疫原の担体の自由なアミノ基と反応する。他方、一般式 I I - A 又は I I - B の化合物中の X が

【0057】

【化 8 6】



のマレイミド ラジカルであるとき、この化合物は、

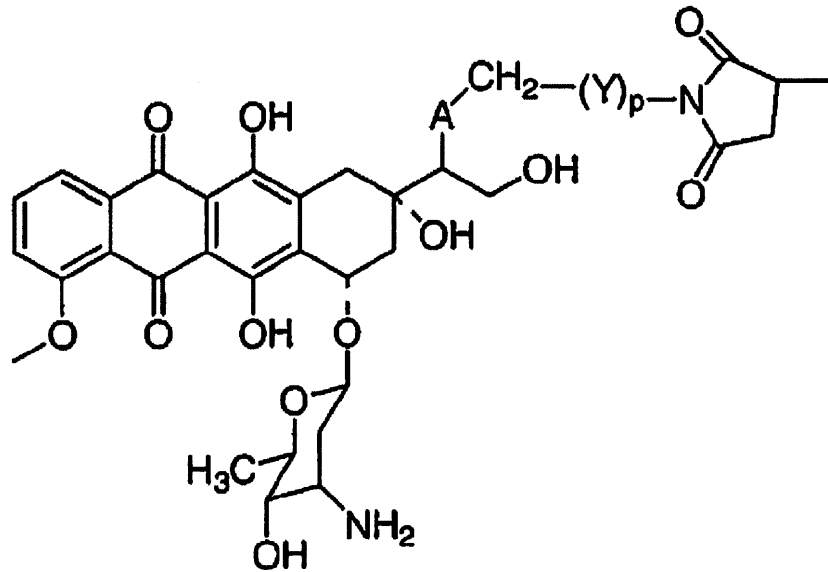
【0058】

10

20

30

【化 8 7】



III-A1

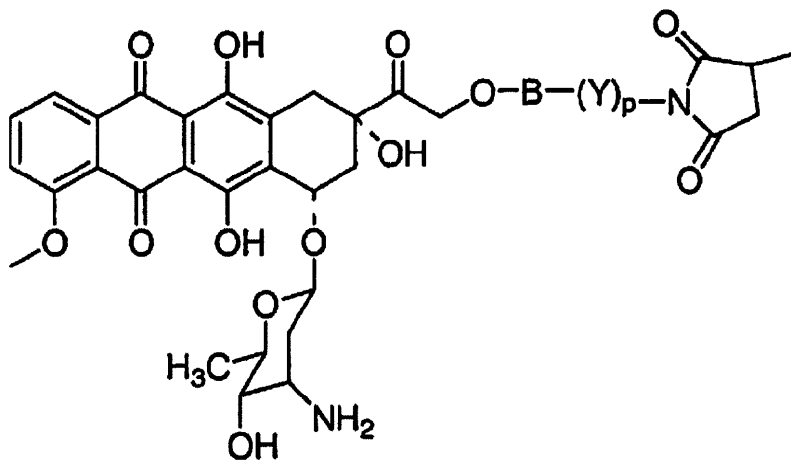
10

20

及び

【 0 0 5 9】

【化 8 8】



III-B1

30

を有する一般式 III - A 及び III - B の化合物中の X' を生成するために、免疫原を含む重合体またはタンパク質担体に存在してもよいチオール（又は S H）基と好ましくは反応する。

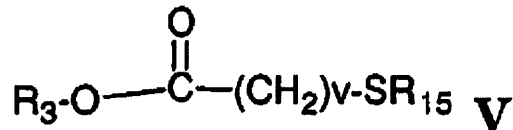
【 0 0 6 0】

好ましい実施形態によれば、これらの一般式 III - A 1 及び III - B 1 の化合物は、アミノ基をチオール基に変えるために変えられた重合体タンパク質に結合される。これは、一般式

【 0 0 6 1】

40

【化 8 9】



(式中、 $R_{15}$  はチオール保護基、 $R_3$  は上述のとおり、 $v$  は 1 ~ 14 の整数である) の化合物と重合体タンパク質の自由なアミノ基とを反応させることによって行われる。

【0062】

このように、チオール基、SH - は担体の残りに結合する担体の官能基になる。

【0063】

この反応は、担体を含むタンパク質と一般式 V の化合物を水性の媒体中で混合することによって水性の媒体中で行われる。この反応において、温度及び圧力は決定的ではなく、反応は室温で大気圧で行うことができる。10 から 25 までの温度が一般に選ばれる。次の工程では、その時までにはチオール変性担体が一般式 II - A 及び II - B の化合物と反応し、後に担体のチオール保護基は、結果として生じる担体を伴う一般式 V の化合物の反応生成物から従来の方法によって取り除かれる。チオール保護基を取り除くための従来のどんな方法もこの反応の実行に用いることができる。しかし、チオール保護基を取り除くための手段を利用する際、反応物が水性の媒体に溶解でき、担体で含まれるポリアミンポリマーを決して破壊又は傷つけないように注意しなければならない。この保護基の除去に好ましい手段は、結果として生じる凝縮生成物を還元するための薬品としてジチオスレイトールを使用することである。この還元は高い圧力又は温度を利用することなしに、単純に還元剤を反応媒体に加えることによって行なわれる。この還元は、室温及び大気圧で行われる。どんな従来のチオール保護材も、一般式 V の化合物でこれを行うのに用いることができる。チオール保護基は、好ましい保護基となる 2 - ビリジルジチオを伴う分野で知られている。

【0064】

上述の方法が、チオール基に対する担体を含むポリアミン重合体における反応性末端アミノ基を転化させるためのある方法を表わすのと同時に、この転化を行うための従来のどんな方法も使用することができる。担体を含むポリアミン重合体上の末端アミノ基を転化する方法は当業者に知られており、本発明に従って使用される。本発明の好ましい形態によれば、担体を含む免疫原重合体ポリアミンによって運ばれたチオール基に結合する X ' を有する一般式 III - A 及び III - B の化合物は、ドキシソルピシンに顕著な特異性を示す抗体を生成する。従って、X が担体を含む免疫原重合体ポリアミン重合体の末端チオール基に結合する一般式 II - A 及び II - B の化合物の使用は、本発明の免疫原の好ましい形態を構成する。

【0065】

X が担体によって運ばれた末端チオール基に結合可能な官能基である一般式 II - A 又は II - B の化合物を伴う末端反応性チオール基を有する担体を含む重合体ポリアミンの反応は、従来の方法によって行うことができる。好ましい形態では、一般式 III - A 1 及び III - B 1 のマレイミドは、ポリアミン重合体担体によって運ばれるチオール基と反応する。マレイミド二重結合を横切ってチオールを添加する既知の方法を、チオールブリッジによって共役する一般式 II - A 及び II - B の共役を生成するのに用いることができる。

【0066】

共役が本発明の免疫原を含むアミド結合を通して結合された共役において、担体又は免疫原上のドキシソルピシンハプテンを含むカルボキシル基とアミノ基との化学結合は、当業者によって知られているさまざまな方法を用いて入手することができる。カルボキシル基と脱離基試薬 (例えば N - ヒドロキシスクシンイミド、1 - ヒドロキシベンゾトリアゾー

10

20

30

40

50

ル、p-ニトロフェノールなど)とを反応させることにより、一般式II-A及びII-Bの化合物中のドキソルピシンハプテンのカルボン酸半分を最初に活性化することによりアミド結合を形成することがしばしば好ましい。ジシクロヘキシルカルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミドなどのような活性化試薬を使用することができる。その後、タンパク質担体を含む緩衝液と、一般式II-A及びII-Bのドキソルピシンハプテン中のカルボキシル基の活性化形態とを反応させる。

【0067】

アミノ結合い要訳を生成する際、一般式II-A又はII-Bのドキソルピシン誘導体が、カルボキシル基と同様に第1又は第2アミノ基を含む場合は、共役がそれら自身で反応するのを防ぐために、活性化及びカップリング反応中にアミン保護基を使用することが必要である。典型的には、一般式II-A又はII-Bのドキソルピシン誘導体上のアミンは、対応するN-トリフルオロアセトアミド、N-第三ブチルオキシカルボニルウレタン(N-t-BOCウレタン)、N-カルボベンジルオキシウレタンまたは同様の構造を形成することによって保護される。上述されるように、一旦、免疫原のポリマー又は担体へのカップリング反応が行われたならば、アミン保護基は、免疫原か共役の構造を他の状態に変えない試薬を使用して除去することができる。そのような試薬および方法は、当業者に知られており、弱い又は強い水又は無水の酸、弱い又は強い水又は無水の塩基、水素化ホウ素ナトリウムやシアノ水素化ホウ素ナトリウムのような水素化物を含む試薬及び接触的水素添加を含んでいる。ハプテン及び担体を共役させる様々な方法も、米国特許3,996,344及び米国特許4,016,146に開示され、ここでは参照によって組込まれる。

10

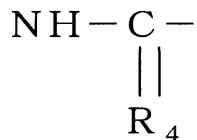
20

【0068】

他方、アミノ共役を生成する際、一般式II-A又はII-Bの化合物においてXが末端イソシアヌ酸塩又はイソチオシアヌ酸塩ラジカルである場合、ポリアミンポリマーの自由なアミンと反応させられた時、これらのラジカルは、ポリアミン担体又は免疫原ポリペプチド上のアミノ基に機能的に結合するX'が

【0069】

【化90】



30

(式中、R<sub>4</sub>は上述のとおり)

である一般式III-A又はIII-Bの化合物の担体又は免疫原を生成する。

【0070】

一般式II-A及びII-Bの化合物(式中、Xはアルデヒド基)のアミノ共役の生成において、これらの化合物は還元アミノ化によってアミン連結を通してポリアミンポリペプチドや担体のアミン基に結合してもよい。還元アミノ化によってのようなアミンとアルデヒドを縮合する従来の方法をこの連結形成に用いることができる。この場合、一般式III-A及びIII-Bの化合物の配位子部分中のX'は、-CH<sub>2</sub>-である。

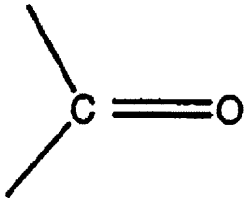
40

【0071】

一般式Iの化合物のドキソルピシン及びその1,3-ケト基は、一般式

【0072】

【化 9 1】

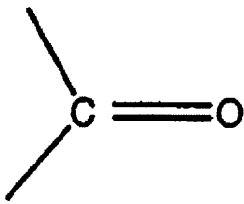


によって置き換えられることができ、

式中

【0073】

【化 9 2】



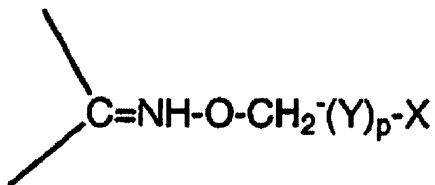
10

20

は、ドキシソルピシンを示されたその 13 - ケト基に置き換える。13 - ケトドキシソルピシンは、一般式

【0074】

【化 9 3】

**VI-B**

30

( 式中、p、Y 及び X は上記のとおり )

の化合物を生成するために、

【0075】

【化 9 4】

**VI-A**

40

のメトキシアミンとドキシソルピシンを反応させることによって A が = N - O - である一般式 VI - A の化合物に転化させることができる。

【0076】

US 特許 4,039,385 に開示されているような一般式 VI - B のオキシルアミンを形成するためにカルボニル基とメトキシアミンを縮合する従来の方法によって一般式 VI - B の化合物を形成するために、一般式 I の化合物はその 13 - オキシ基で一般式 VI - A のメトキシアミンと反応する。もし、一般式 VI - A の化合物が任意の官能置換基を

50

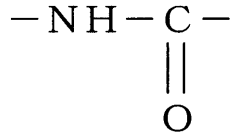
含んでいたら、これらの置換基は、VI - Aの化合物を伴うドキソルピシンの反応に先立って通常の保護基と反応することができる。共役が一般式VI - Bの化合物から生成されたのち、これらの保護基は、一般式VI - Bの化合物のオキシルアミン連結を保ちながらそのような保護基を除去する当業者に知られている手順によって除去することができる。

【0077】

Aが

【0078】

【化95】

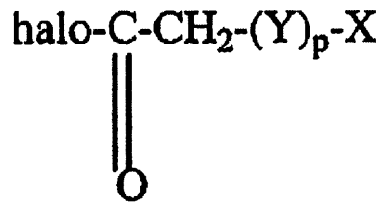


10

の一般式II - Aの化合物は、最初にドキソルピシン上の13 - オキシ基を13 - アミノ基に転化し、その後一般式

【0079】

【化96】



20

VIII-A

(式中、Y、P及びXは上述のとおり)

の酸ハロゲン化物とこの13 - アミノドキソルピシンを縮合することによって生成することができる。

30

【0080】

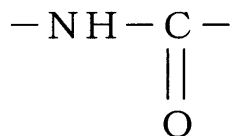
ドキソルピシン上の13 - オキシ基は、塩化アンモニウム及びシアノ水素化ホウ素ナトリウムのような還元剤を使用する還元アミノ化によって、13 - アミノ基に転化されるることができる。

【0081】

還元アミノ化において従来のどんな状態でもドキソルピシン上の13 - オキシ基をアミノ基に転化するのに使用することができる。Aが

【0082】

【化97】



40

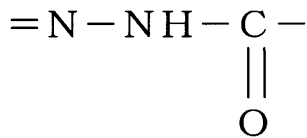
の一般式II - Aのアミドを形成するために、13 - アミノドキソルピシンは、縮合によって酸ハロゲン化物と反応する。

【0083】

アミドを形成するためにアミンと酸ハロゲン化物を縮合するどんな方法もその縮合を行うために用いることができる。

50

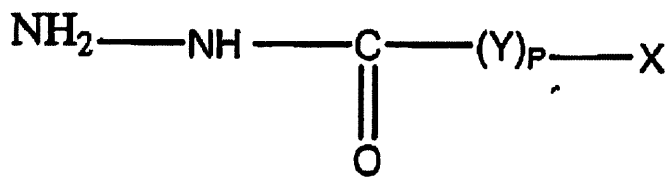
【 0 0 8 4 】  
 A が一般式  
 【 0 0 8 5 】  
 【 化 9 8 】



10

のヒドラゾンである一般式 I I - A の化合物は、一般式

【 0 0 8 6 】  
 【 化 9 9 】



**IX-B**

20

(式中、p、Y及びXは上述のとおり)

のヒドラジドと一般式 I のドキソルピシンの 1 3 - オキソとを反応させることによって生成することができる。

【 0 0 8 7 】

ヒドラゾンを生成するためにケトンとヒドラジドとを反応するどんな方法も、この転化を行うために用いることができる。通常、この反応は、通常好ましい酸 pH である pH 3 から 6 の低アルカノールのような不活性の有機溶媒媒質中で、一般式 I の化合物上の 1 3 - オキソ基と IX - B の化合物のアンモニウム塩とを反応することによって行うことができる。この反応を行う際、温度及び圧力は重大でなく、この反応は室温及び大気圧下で行うことができる。

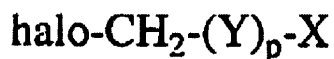
30

【 0 0 8 8 】

B が - CH<sub>2</sub> - である一般式 I I - B の 1 4 - 置換化合物は、ドキソルピシンの 1 4 - ヒドロキシ基と一般式

【 0 0 8 9 】

【 化 1 0 0 】



**VIII-B**

40

(式中、p、Y及びXは上述のとおり)

のハロゲン化物とを反応することによって形成される。

【 0 0 9 0 】

ドキソルピシンから一般式 I I - B の化合物を形成する際、エーテルを形成するためにアルコールを反応させる通常のどんな手段も、ドキソルピシン上の 1 4 - ヒドロキシ位置と一般式 V I I I - B の化合物を縮合するために使用することができる。他方、一般式 V I I I - B の化合物中の Y が官能基 (一般式 I I - B の化合物を形成するためにこの反応を妨げてよい) を含む場合、これらの官能基は上述したこの反応後に除去することができる適当な保護基の手段によって保護される。

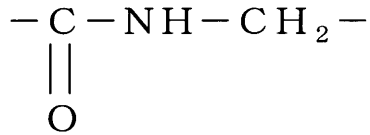
50

【 0 0 9 1 】

B が

【 0 0 9 2 】

【 化 1 0 1 】

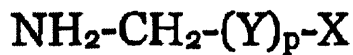


10

である一般式 I I - B の 1 4 - 置換化合物は、ドキソルピシン上の 1 4 - ヒドロキシ基と一般式

【 0 0 9 3 】

【 化 1 0 2 】

**IX**

(式中、X, Y 及び p は上述のとおり)

20

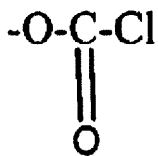
のアミノ化合物とを反応させることによって生成される。

【 0 0 9 4 】

ドキソルピシン上の 1 4 - ヒドロキシ基をクロロホルマティック基 (chloroformatic group)

【 0 0 9 5 】

【 化 1 0 3 】



30

に転化する最初の転化後。

【 0 0 9 6 】

ヒドロキシ基をクロロホルマティック基に転化する従来のどんな方法も使用することができる。

【 0 0 9 7 】

クロロホルメート調合後、クロロホルメートのハロ基は、一般式 I X の化合物中のアミン基と縮合される。この反応に先立って、ドキソルピシン及び / または一般式 I X の化合物における反応性の基は、上述したように従来の保護基によって保護される。これらの保護基は、上述したような従来の方法によってこのハロゲン化縮合後に取り除かれる。

40

【 0 0 9 8 】

一般式 I I - A 及び I I - B の化合物は、末端アミノ基を含むポリアミン又はポリペプチド担体とこれらの化合物を反応させることにより本発明の免疫原及び / または共役試薬に転化することができる。同じポリペプチドを、抗原を形成するのに用いられるポリアミド又はポリペプチド担体を免疫学的に活性であるようにさせる本発明の免疫原において担体として及び免疫原ポリマー担体として使うことができる。しかし、共役を形成するために、これらのポリマーは免疫原に対して必要とされるような免疫学的な応答を必要としない。本発明によれば、一般式 I I - A 及び I I - B の化合物において X によって表わされる様々な官能基は、重合体担体中に含まれるアミンまたはチオール基に官能基を結合する

50

従来の方法によって重合体物質に共役することができる。

【0099】

(抗体)

本発明は、さらに前述の免疫原を用いて生成されたドキシソルピシンに対するモノクロナール抗体を含む新規の抗体に関する。本発明によれば、本発明に従って生成されたこれらの抗体は、ドキシソルピシンに選択的に反応的で、従来抗体と違ってドキシソルピシン免疫測定法を邪魔する非薬学的活性代謝産物に反応しない。これらのドキシソルピシン代謝産物のうち最も問題のあるものは、ドキシソルピシンアグリコンである。これらの不活性な代謝産物に反応しない本発明の抗体能力は、ドキシソルピシン免疫測定法を行うにあたって、これらの抗体をとりわけ有益にさせる。

10

【0100】

本発明は新規抗体及びドキシソルピシンのモノクロナール抗体に係る。発明の抗血清は、発明の免疫原を宿主動物に免疫することにより好都合に生成することができる。適切な宿主動物は、例えばネズミ、ラット、ウサギ、モルモットおよびその他同種のもののようなげっ歯動物、またはヤギ、羊、馬およびその他同種のもののような高等哺乳動物を含んでいる。初回量、出血および追加免疫注射は、動物(例えば、好ましい形態においては、腹腔内投与(i.p.))で初回量100 $\mu$ gの免疫を受け、6か月を超えて50から100 $\mu$ gの1以上の連続追加免疫注射を受けたネズミ)中の免疫反応を誘発するために認められた試験計画書(protocols)に従って与えることができる。周期的な出血を通して、免疫されたネズミの血液試料は、従来免疫測定法を利用するドキシソルピシンに対して抗体を作ることが観察された。これらの方法は、好ましい活性を有する抗血清を生成している宿主を選別するための便利な方法を提供する。抗体は、またドキシソルピシンの主な代謝産物に対して選別され、これらの化合物に実質の結合がないことを示した。

20

【0101】

モノクロナール抗体は、細胞融合に先立って4日のスタートを切る連続3日に腹腔内投与(i.p.)又は静脈内投与(i.v.)で100 $\mu$ gの免疫原をマウスに注射することによる上述のスケジュールに従って、Balb/cマウスを免疫することにより好都合に生成される。抗体技術において周知の他の試験計画書をももちろん同様に利用してもよい。ここに詳述された完全な免疫処置試験計画書は、ドキシソルピシンの抗体用の血清抗体反応に最適な試験計画書を提供した。

30

【0102】

脾臓、末梢血、リンパ節または宿主の他の組織から得られたBリンパ球は、細胞を生成するモノクロナール抗体として使用されてもよい。最も好まれるものは、脾臓から得られるBリンパ球である。発明の望むモノクロナール抗体を生成することができるハイブリドーマは、そのようなBリンパ球と無限増殖できる細胞系(それはハイブリッド細胞上の長期的な組織培養安定性を与える細胞系である)を融合させることにより得られる。発明の好ましい実施形態では、無限増殖できる細胞は、骨髄腫細胞のようなリンパ芽球状細胞あるいはプラズマ細胞腫細胞でもよい。ドキシソルピシンモノクロナール抗体を生成するマウスのハイブリドーマは、ドキシソルピシン-タンパク質共役に対して免疫されたマウスからのマウス骨髄腫細胞および脾臓細胞の融合によって生成される。キメラ的及びヒトモノクロナール抗体は、ハイブリドーマ細胞から遺伝子を発現させる抗体をクローン化し、ヒトの定常部領域にマウス可変領域の続きを結合するか、あるいは、ドナーマウスかラットの免疫グロブリンから相補性決定領域(CDRの)とヒトのフレームワーク領域を組み合わせる現在当業者によって知られている組み換えDNA方法を使用することによって生成することができる。親和力が高められた抗体を提供するマウスのモノクロナール抗体をヒトに適用するための改良方法は、国際特許出願WO92/11018に述べられる。

40

【0103】

一次抗体構造の一部だけを含むポリペプチド断片を生成してもよく、その断片は1つ以上の免疫グロブリン活性を有している。これらのポリペプチド断片は、当業者によって知られている方法によって手をつけていない抗体のタンパク質分解開裂によって、又は、F

50

a b断片又は(F a b')<sub>2</sub>断片を生成するために部位特異的突然変異誘発を用いる抗体遺伝子を含んでいる発現ベクターに望ましい位置に終止コドンを挿入することによって、生成してもよい。単鎖抗体は、DNAリンカーにV LとV Hの部位を結合することによって生成してもよい(ヒューストンら、Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 85: 5879-5883(1988)及びバードら、Science, 242: 423-426(1988)参照)。

#### 【0104】

本発明の抗体は、上述した代謝産物のようなドキソルピシンの非薬学的活性代謝産物と実質的に交差反応性を持たないドキソルピシンに選択的である。実質的な交差反応性を持たないことによって、本発明の抗体が、20%以下のこれらの代謝産物を伴うドキソルピシンに関する交差反応性を持つことを意味している。15%以下の交差反応性を示すそれらの抗体が好ましい。本発明の抗体は、ドキソルピシノールのような化合物のような他の薬学的に活性なドキソルピシンと反応してもよい。

10

#### 【0105】

(免疫測定法)

本発明によれば、一般式II-A及びII-Bの化合物又はその混合物の免疫原から生じた共役および抗体は、患者試料中のドキソルピシンの測定試薬として利用することができる。この測定は免疫測定法によって行なわれる。一般式II-A及びII-Bの化合物から形成された試薬共役が、本発明に従って生成された抗体中の結合部位に対して試料中のドキソルピシンと競合するどんな免疫測定法も、患者試料中のドキソルピシンの存在を決定するために使用することができる。ドキソルピシンを含んでいるという疑いをかけられた試料中のドキソルピシンの測定を行うための方法は、(a)水性媒質試料、(b)本発明に従って生成されたドキソルピシンの抗体、(c)一般式II-A又はII-Bの化合物又はその混合物から形成された共役を、混合することを含む。試料中のドキソルピシン量は、試料と抗体との混合物に既知量で加えられた共役の特異抗体への結合の阻害を測定することにより決定することができる。未知の試料による既知量の共役のそのような結合の阻害の結果は、ドキソルピシンの既知の標準溶液を使用して同じ測定で得られた結果と比較される。

20

#### 【0106】

抗体に結合した一般式II-A及びII-Bの化合物から形成された共役の量を測定するために、様々な手段を使用することができる。1つの方法は、抗体への共役の結合が蛍光団共役の回転率の減少を引き起こす点である。液体混合物中の蛍光団共役の回転率の減少量は、米国特許4,269,511及び米国特許4,420,568に開示されているような蛍光性の極性化技術によって検出することができる。

30

#### 【0107】

他方で、粒子が一般式II-A及びII-Bの化合物から形成されたドキソルピシン共役と反応する時、これらの微粒子が集合体を形成するように、抗体は微粒子に覆われているか吸収されていてもよい。しかしながら、微粒子に覆われた或いは吸収された抗体が試料中のドキソルピシンと反応するとき、これらの微粒子に結合する試料からのドキソルピシンは、抗体微粒子の集合を生じさせない。集合または凝集の量は、吸光度による混合測定で測定することができる。

40

#### 【0108】

他方、これらの測定は、マイクロタイタープレートのような固形支持体あるいは固形微粒子を含む他の従来の固形支持体に、抗体あるいはドキソルピシン共役のいずれかを付着することにより実行することができる。そのような固形微粒子に抗体とタンパク質を付着することは当業者によって知られている。どんな従来方法もそのような付着を行うために使用することができる。多くの場合では、測定を促進するために、放射性標識や酵素標識のような標識を、抗体と結合または結合していない一般式II-A及びII-Bの化合物から形成された共役量の検出を助けるものとして、抗体、共役あるいは固形微粒子に配置してもよい。他の適切な標識としては、発色団、蛍光団などがある。

50

## 【0109】

便宜の問題として、本発明の測定コンポーネントは、ドキシソルピシンを測定するのに使用される所定量の新しい試薬を備えた化合物がパッケージされた状態でキットとして提供することができる。これらの試薬は、本発明の抗体を含んでいることに加え、一般式 I I - A 及び I I - B の化合物又はその混合物から生成された共役も含んでいる。行われる免疫測定法において、もし一般式 I I - A の化合物から形成された共役が利用されるならば、一般式 I I - A の化合物から形成された免疫原によって生じた抗体であることが通常好ましい。同様の方法で、もし一般式 I I - B の化合物から形成された共役が利用されるならば、一般式 I I - B の化合物から形成された免疫原によって生じる抗体であることが好ましい。しかし、これは、事例にならないことを要し、行われる測定法での抗体及び共役は、これらの共役及び免疫原の任意の1つから誘導されることができる。

10

## 【0110】

これらの必要な試薬に加えて、補助試薬のような添加物には、例えば安定剤、緩衝材などが含まれていてもよい。様々な試薬の相対量は、実質的に測定の感度を最適化するような試薬の溶液濃度を提供するために、広く変わってもよい。試薬は、溶液又は乾燥パウダー（通常は凍結乾燥されたもの）として供給され、溶解して測定を行うのに適した濃度の試薬溶液を提供する補形薬を含む。

## 【0111】

(例)

例において、次の略語は、下記に指し示すように使用される。

20

CHCl <sub>3</sub>	クロロホルム
BMPH	N - [ - マレイミドプロピオン酸 ] ヒドラジド , トリフルオロ酢酸塩
MeOH	メタノール
DMF	ジメチルホルムアミド
TFA	トリフルオロ酢酸
DMSO	ジメチルスルホキシド
CAPS	3 - (シクロヘキシルアミノ) - 1 - プロパンスルホン酸
NHS	N - ヒドロキシスクシンイミド
EDC	1 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 3 - エチルカルボジイミド塩酸塩
KPi	リン酸カリウム緩衝剤 pH 7 . 5
SPDP	3 - (2 - ピリジルチオ)プロピオン酸 N - ヒドロキシスクシンイミドエステル
MES	2 - (N - モノホリノ)エタンスルホン酸緩衝剤 pH 6
ANS	8 - アニリノ - 1 - ナフタリンスルホン酸
i . p .	腹腔内の
HRP	西洋わさびペルオキシダーゼ
TFA	トリフルオロ酸の
TMB	3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンチジン
TRIS	トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン塩酸塩
BSA	ウシ血清アルブミン
KLH	キーホールリンペット・ヘモシアニン
BTG	ウシチログロブリン
PBS	リン酸塩緩衝生理的食塩水
di	脱イオン水

30

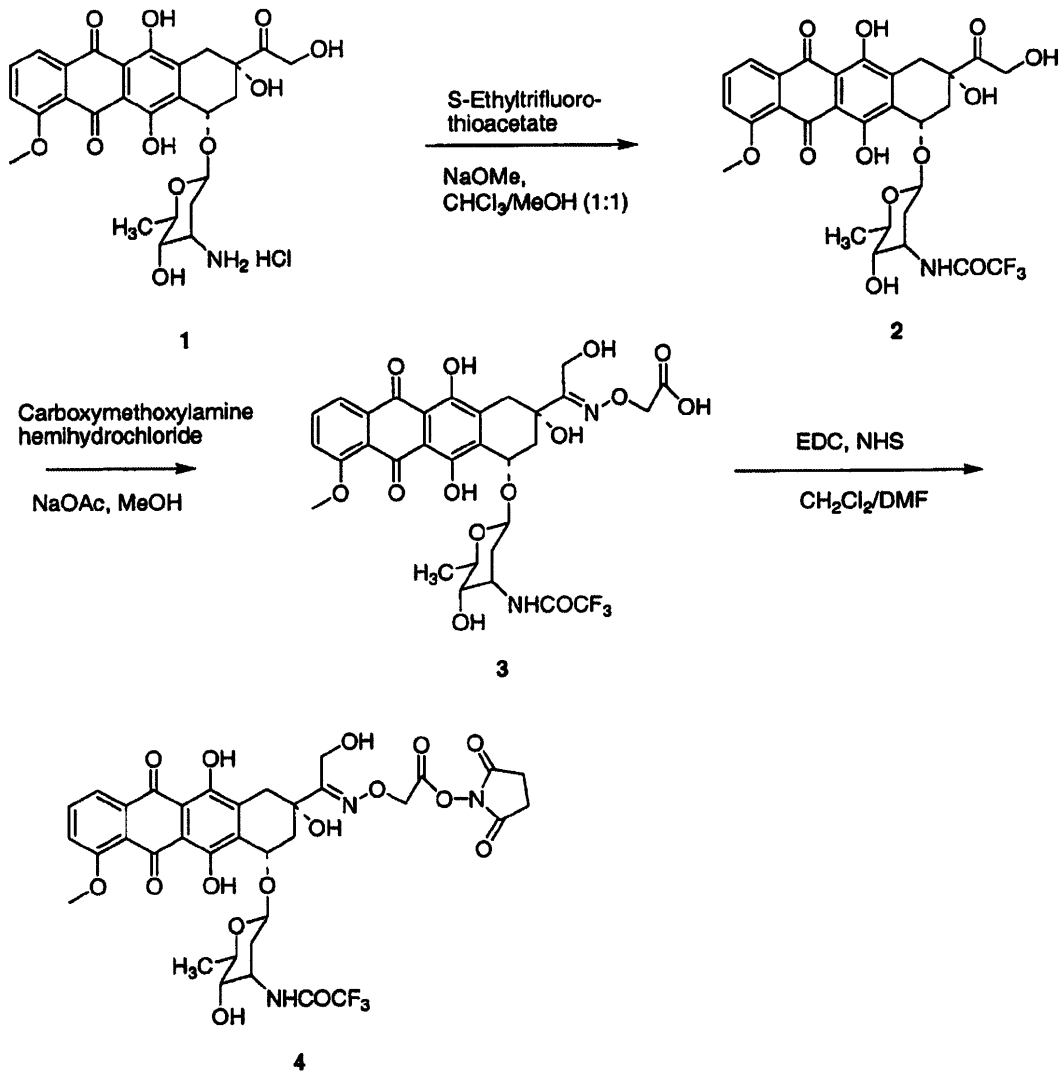
40

例において、図式 1 及び図式 2 は、例の番号に従って生成され言及された特異化合物を下記に示す。図式は以下の通りである。

## 【0112】

【化 1 0 4】

図式 1



10

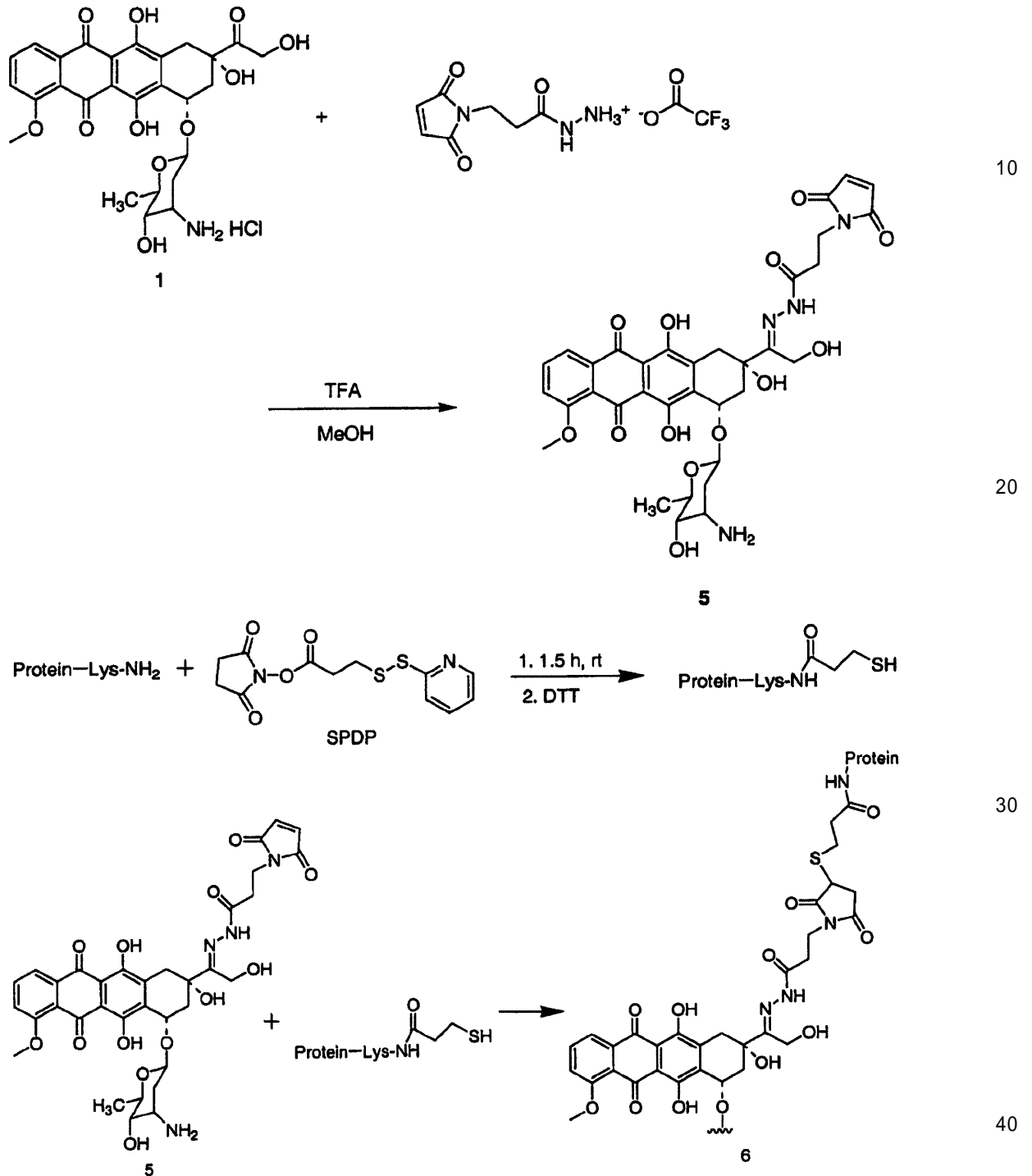
20

30

【 0 1 1 3】

【化 1 0 5】

図式 2



【 0 1 1 4】

(例 1)

ドキソルピシン トリフルオロアセトアミド活性エステル 4 の生成 (図式 1)

0 のドキソルピシン (1) (0.8 g、1.38 mmol) の  $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH}$  (1:1) (15 mL) 攪拌懸濁液を、窒素雰囲気下で滴下で加えられた S - エチルトリフルオロアセトアセテート (0.89 mL、7.02 mmol) が添加された 0.5 M メタ

50

ノリック (methanolic) ナトリウムメトキシド 2.76 mL で処理した。室温で 16 時間暗中で攪拌した後、反応は真空内で濃縮された。残留物を  $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH}$  (1 : 1) 10 mL、4 mL のトルエンに溶解し、濃縮した。再び、残留物を  $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH}$  (9 : 1) 50 mL に溶解し、0.1 M ぐえん酸 10 mL、塩水 (2 × 10 mL) で洗浄した。これを硫酸マグネシウム及び溶媒蒸発で乾燥し、塩化メチレン/エーテル/ヘキサン中の粉碎によって赤色固形物として 2 (0.814, 92%) を得た。

【0115】

化合物 2 (0.49 g, 0.766 mmol)、カルボキシメトキシルアミン半塩酸塩 (0.30 g, 1.38 mmol)、及び酢酸ナトリウム (0.38 g, 4.60 mmol) の混合物の  $\text{MeOH}$  (15 mL) 液を室温で暗中で一晩攪拌した。溶媒を減圧下で除去し、残留物を水 (25 mL) 及び  $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH}$  (9 : 1) (3 × 25 mL) に溶解した。3 (0.45 g, 82%) を得るために、すべての混合有機相を硫酸マグネシウムで乾燥し、蒸発させ、塩化メチレン/エーテル/ヘキサンで粉碎した。

10

【0116】

0 の塩化メチレン/DMF (1 : 5) (12 mL) 中に化合物 3 (0.45 g, 0.63 mmol) を溶解した溶液に、EDC (0.11 g, 0.95 mmol) 及び NHS (0.18 g, 0.95 mmol) を窒素雰囲気下で加えた。室温で 18 時間攪拌した後、反応混合物を塩化メチレン (50 mL) で希釈し、水 (2 × 15 mL) で洗浄した。硫酸マグネシウムでの乾燥、溶媒の蒸発により赤色固形物の化合物 4 (0.445 g, 86%) を得た。この物質は直接次の工程で用いられる (例 3a 及び 3b)

20

(例 2)

ドキソルピシンの (3-マレイミドプロピル) ヒドラゾンの生成 (図式 2)

チオ-エーテル結合を通して結果として起こるタンパク質への共役のためのマレイミド基を挿入するために、ドキソルピシン [1] を N-[ -マレイミドプロピオン酸 ] ヒドラジドで誘導する。無水  $\text{MeOH}$  10 mL 中にドキソルピシン塩酸塩 (29 mg, 0.05 × 10<sup>-3</sup> mmol)、BMPH (50 mg, 3.4 当量) を溶解した溶液に、3 μL の TFA を加えた。反応混合物を光から保護しながら室温で 24 時間攪拌した。メタノリック (methanolic) 溶液を 2 mL 量に濃縮し、攪拌しながらアセトニトリル (30 mL) に滴下で加えた。ドキソルピシン C13 ヒドラゾンマレイミド誘導體 [5] の結晶化のために、得られる懸濁液を一晩 4 の状態にした。この生成物を遠心分離によって分離し、新鮮なメタノール-アセチニトリル (1 : 10) で洗浄し、減圧下で乾燥し、ドキソルピシンの (6-マレイミドカプロイル) ヒドラゾン (5) を得た。構造を NMR で確認した。

30

【0117】

(例 3a)

活性化ハプテン 4 を伴う BTG 免疫原の生成

1 : 1 のリン酸緩衝剤 (50 mM、pH 7.5) : DMSO 中に BTG (7.1 mg/mL) を溶解した 18.8 mL の溶液に、1.3 mL の例 1 (DMSO 中に 20 mg/mL) からの化合物 4 を、氷上でタンパク質溶液を攪拌しながら加えた。添加後、pH を再び 8 にチェックした。混合物を室温で 18 時間攪拌した。アミノ糖上のトリフルオロアセトアミド保護基は pH 11 の CAPS 緩衝剤での透析によって取り除いた。最初の透析は室温で 50% 50 mM CAPS 及び 50% DMSO で行った。その後、DMSO 比率を段階的に 40%、30%、20%、10% 及び 0% と減らしていった。最後の CAPS 透析では、緩衝剤濃度を 25 mM まで減らし、透析は 4 で行った。その後、リン酸緩衝剤 (50 mM、pH 7.5) に対して免疫原共役を透析によって精製した。共役は UV/VIS 分光検査法によって特性を調べた。

40

【0118】

(例 3b)

活性化ハプテン 4 を伴う K L H 免疫原の生成

1 : 1 のリン酸緩衝剤 (50 mM、pH 7.5) : DMSO 中に K L H (7.35 mg

50

/mL)を溶解した18.0mLの溶液に、1.3mLの例1(DMSO中に20mg/mL)からの化合物4を、氷上でタンパク質溶液を攪拌しながら加えた。添加後、pHを再び8にチェックした。混合物を室温で18時間攪拌した。アミノ糖上のトリフルオロアセトアミド保護基はpH11のCAPS緩衝剤での透析によって取り除いた。最初の透析は室温で50%50mM CAPS及び50%DMSOで行った。その後、DMSO比率を段階的に40%、30%、20%、10%及び0%と減らしていった。最後のCAPS透析では、緩衝剤濃度を25mMまで減らし、透析は4で行った。その後、リン酸緩衝剤(50mM、pH7.5)に対して免疫原共役を透析によって精製した。共役はUV/VIS分光検査法によって特性を調べた。

【0119】

(例4a)

活性化ハプテン5を伴うBTG免疫原の生成

タンパク質に対するドキソルピシンC13ヒドラゾンマレイミド誘導体を共役するために、タンパク質のリジン残基を、スルフヒドリル基を導入するために変更した。ウシのチオグロブリン(BTG)のpH7.5のリン酸カリウム緩衝剤(14.9mg/mL、3mL)溶液中に、プロピオン酸ピリジルジチオ)基でリジンを誘導するために、4mgの3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(SPDP)(20当量)の50μLのDMSO溶液を加えた。室温で1.5時間攪拌したのち、ジチオピリジル半分の還元によってスルフヒドリルを形成するために100μLのKpiに溶解した40mgのジチオトレイトールを混合物に加えた。スルフヒドリル基を放すためのタンパク質上でのピリジジチオ誘導体の還元を、窒素下で室温で30分間攪拌しながら行った。その後、チオール化(thiolated)BTGをゲルろ過クロマトグラフィによって精製した。ゲルろ過カラムとして、15gのSephadex G-25を室温で1時間50mM KPi緩衝剤中で膨潤させ、減圧下でガス除去し、カラム(1.5cm×50cm)内に充填したものを準備した。充填されたカラムを1時間、緩衝剤で平衡化した。反応混合物をカラムの中へ充填し、KPi緩衝剤で抽出した。エルマン試薬をタンパク質溶出をモニターするために用いた。タンパク質を含む画分を集め、ためた。チオール基のモル濃度をエルマン手順によって測定した(Riddles,P.W.et al., 分析生化学、エルマン試薬:5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)-A reexamination, 94, 75-81(1979))。

【0120】

氷水浴中の精製されたチオール化-BTGタンパク質(Kpi中5mg/mL、44.7mg)へ滴下で、例2で生成された3mLのドキソルピシンヒドラゾン誘導体5(2.33mg/mL)を加え、反応混合物を4で16時間攪拌し、光から保護した。免疫共役を上述のようにゲルろ過クロマトグラフィによって精製した。免疫原共役はUV/VIS分光検査法によって特性を調べた。

【0121】

(例4b)

活性化ハプテン5を伴うKLH免疫原の生成

pH7.5のリン酸カリウム緩衝剤(5.58mg/mL、4mL)中にKLHを溶解した溶液に、50μLのDMSO中に3mgのSPDPを加えたものを加えた。室温で1.5時間攪拌した後、50μLのKpi中に25mgのジチオトレイトールを溶解したものを混合物に加えた。還元を室温で30分間攪拌しながら窒素下で行った。その後、チオール化KLHを、例4aで記述したようなゲルろ過クロマトグラフィによって精製した。

【0122】

氷水浴中の精製されたチオール化KLHタンパク質(Kpi中に4mg/mL、5mL)に、滴下で例2(1.41mg/mL)で精製したドキソルピシンヒドラゾン誘導体5を2.124mL加え、反応混合物を4で16時間攪拌し、光から保護した。免疫原共役を例4aで記述したゲルろ過によって精製した。免疫原共役UV/VIS分光検査法によって特性を調べた。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 2 3 】

(例 5)

活性化ハプテン 4 を伴う B S A 共役 ( 1 : 1 比率 ) の生成

氷上でタンパク質溶液を攪拌しながら 1 : 1 のリン酸塩緩衝剤 ( 5 0 m M 、 p H 7 . 5 ) : D M S O 中に B S A ( 2 5 m g / m L ) を加えたもの 4 0 m L に、例 1 からの化合物 4 ( D M S O 中に 2 0 m g / m L ) を 0 . 6 2 m L 加えた。添加後、p H を再び 8 にチェックした。混合物を室温で 1 8 時間攪拌した。アミノ糖上のトリフロオロアセトアミド保護基を p H 1 1 の C A P S 緩衝剤での透析によって取り除いた。はじめの透析は室温で 5 0 % 5 0 m M C A P S と 5 0 % D M S O で行った。その後、D M S O 比率を段階的に 4 0 % 、 3 0 % 、 2 0 % 、 1 0 % 及び 0 % と減らしていった。最後の C A P S 透析では、緩衝剤濃度を 2 5 m M まで減らし、透析は 4 で行った。その後、リン酸緩衝剤 ( 5 0 m M 、 p H 7 . 5 ) に対して免疫原共役を透析によって精製した。共役は U V / V I S 分光検査法によって特性を調べた。

10

## 【 0 1 2 4 】

(例 6 a)

活性化ハプテン 5 との反応のためのチオール化 B S A の生成

p H 7 . 5 のリン酸カリウム緩衝剤 ( 5 0 m g / m L 、 6 m L ) 中に B S A を溶解した溶液に、D M S O 8 4  $\mu$  L 中に S P D P ( 3 当量 ) 4 . 2 m g を加えたものを加えた。室温で 1 . 5 時間攪拌した後、0 . 1 3 5 m L の K P i 中に溶解したジチオトレイトール 2 7 m g を混合物に加えた。還元を窒素下で、室温で 3 0 分間攪拌しながら行った。その後、チオール化 B S A をゲルろ過クロマトグラフィによって精製した。

20

## 【 0 1 2 5 】

ゲルろ過カラムは、1 2 g の S e p h a d e x G - 2 5 を室温で 1 時間 1 0 m M M E S 緩衝剤 ( p H 6 ) 中で膨潤させ、減圧下でガス除去し、カラム ( 1 . 5 c m  $\times$  5 0 c m ) 内に充填して準備した。充填されたカラムを 1 時間、緩衝剤で平衡化した。反応混合物をカラムの中へ充填し、M E S 緩衝剤で抽出した。エルマン試薬を、タンパク質溶出をモニターするために用いた。タンパク質を含む画分を集め、ためた。チオール基のモル濃度をエルマン手順によって測定した。

## 【 0 1 2 6 】

(例 6 b)

活性化ハプテン 5 を伴う B S A 共役 ( 3 : 1 比率 ) の生成

氷水浴中の例 6 a で生成された精製チオール化 - B S A タンパク質 ( M E S 中に 5 m g / m L 、 3 5 m g ) に、例 2 で精製されたドキソルピシンヒドラゾン誘導体 5 ( 8 m g / m L ) を滴下で 0 . 1 3 5 m L 加えた。反応混合物を 4 で 1 6 時間攪拌し、光から保護した。免疫原共役を例 6 a で記載したようなゲルろ過によって精製した。免疫原共役は U V / V I S 分光検査法によって特性を調べた。

30

## 【 0 1 2 7 】

(例 6 c)

活性化ハプテン 5 を伴う B S A 共役 ( 1 : 1 比率 ) の生成

氷水浴中の例 6 a で生成した精製チオール化 - B S A タンパク質 ( M E S 中に 5 m g / m L 、 8 0 m g ) へ例 2 で生成したドキソルピシンヒドラゾン誘導体 5 ( 8 m g / m L ) を 0 . 1 0 7 m L 滴下で加えた。反応混合物を 1 6 時間 4 で攪拌し、光から保護した。免疫原共役 ( 6 m L ) を例 6 a で記載したようなゲルろ過によって精製した。精製免疫原共役は U V / V I S 分光検査法によって特性を調べた。免疫原共役反応混合物の残りを更に精製することなくキャッピング反応のために用いた。

40

## 【 0 1 2 8 】

(例 6 d)

ドキソルピシンヒドラゾン 5 - B S A 共役 ( 1 : 1 比率 ) のキャッピング

例 6 c で精製した 1 : 1 ドキソルピシン [ 5 ] - B S A 共役 ( M E S 緩衝剤中に 5 m g / m L ) 5 m L に、ドキソルピシンによって変化しないチオール基をキャップするために

50

、0.047 mLのN-エチルマレイミド(2当量、MES緩衝剤中2 mg/mL)を加えた。反応物を室温で3時間攪拌し、その後例6aのように精製した。

【0129】

(例7)

ドキシソルピシン[4]抗体の生成

2グループの10匹の雌のBALB/cのマウスを、完全フロイントアジュバントで乳化された、1グループは例3aで生成したドキシソルピシン[4]-BTG免疫原を1匹につき100 µgで、他のグループは例3bで生成したドキシソルピシン[4]-KLHを1匹につき100 µgで、腹腔内投与(i.p.)で免疫した。マウスに、不完全フロイントアジュバントで乳化された同じ免疫原を一匹につき100 µgで最初の注射の4週間後に追加免疫した。追加免疫テストの10日後、各マウスからの出血を、眼窩出血によって得た。融合前の4日のスタートを切るマウスの免疫原、年齢及び安静期間に依存するモノクロナール抗体のために、マウスに、連続3日間、PBSに例3aで生成したドキシソルピシン[4]-BTG免疫原を加えたものを400 µg(融合前3日)、200 µg(融合前2日)、200 µg(融合前1日)で、または、PBSに例3bで生成したドキシソルピシン[4]-KLH免疫原を加えたものを各日100 µg腹腔内投与(i.p.)で注射した。コリガン(Coligan)などの試験計画書に従って、脾臓細胞を選択されたマウスから分離し、50%ポリエチレングリコール1500を用いる骨髓腫融合パートナー細胞系(SP2/O)の $2 \times 10^7$ 細胞と融合した[Coligan, J.E. et al., eds., Current Protocols in Immunology, 2.5.1-2.5.8, (1992), Wiley&Sons, NY.]。融合細胞をコリガンなどの方法に従ってコロニーを作る抗体に育てるために、20%ウシ胎児血清代替物が追加され、2%L-グルタミン(100 mM)、2%50X HATを含むDMEM/F12(1:1のL-グルタミンとHEPESを伴うダルベッコの変性したイーグル培養液)のような通常のHAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジン)選択発育培地に、融合細胞を、10個の96ウェル形式プレートで培養した。2週間後、ハイブリドーマ上澄みを例10bに記載するようなELISAによって抗-ドキシソルピシン抗体の存在を測定した。陽性ウェルを拡大し、再び同じ方法によって選別した。陽性クローンは、例11に記載されるような競合的ELISAによって結合するドキシソルピシンとして確認される、または直接サブクローン化される。ELISAによる陽性クローンは、Coligan, J.E. et al., Current Protocols in Immunology, 2.5.8-2.5.17, (1992), Wiley & Sons, NYで開示されている方法による限界希釈によって、一、二度サブクローン化される。ドキシソルピシンに選択的で、15%以下のドキシソルピシンのアグリコンを伴うドキシソルピシンに関連した交差反応性を有するモノクロナール抗体だけが、測定によるこれらの選別手順により選択された。

10

20

30

40

50

【0130】

(例8)

ドキシソルピシン[5]抗体の生成

2グループの10匹の雌のBALB/cのマウスを、完全フロイントアジュバントで乳化された、1グループは例4aで生成したドキシソルピシン[5]-BTG免疫原を1匹につき100 µgで、他のグループは例4bで生成したドキシソルピシン[5]-KLH免疫原を1匹につき100 µgで、腹腔内投与(i.p.)で免疫した。マウスに、不完全フロイントアジュバントで乳化された同じ免疫原を一匹につき100 µgで最初の注射の4週間後に1回追加免疫した。追加テストの10及び28日後、各マウスからの出血を、眼窩出血によって得た。28日テスト出血からの抗血清は例10a及び11で評価されたドキシソルピシン抗体を含んでいた。ドキシソルピシンに選択的で、15%以下のドキシソルピシンのアグリコンを伴うドキシソルピシンに関連した交差反応性を有する抗体を有する抗血清だけが、測定によるこれらの選別手順により選択された。

【0131】

(例9a)

ドキシソルピシン[4]-BSA 1:1共役を用いたマイクロタイタープレート感作手順

酵素免疫測定法 (ELISA) によって抗体を選別し、ドキシソルピシン濃度を測定する目的のために、タンパク質結合に最適化されたプレートにつき96ウェルを含むポリスチレンマイクロタイタープレート (Nunc MaxiSorp F8 Immunomodules) を用いた。pH 6の0.01 M MES中に10 µg/mLでドキシソルピシン [4] - BSA 共役を加えたもの300 mLを加え、室温で3時間培養することによって、各ウェルをドキシソルピシン [4] - BSA 1:1 共役 (例5でのように生成) でコーティングした。ウェルをpH 6の0.005 M MESで洗浄し、その後5%スクロース、0.2%カゼインナトリウム溶液375 µLで室温で30分間ブロックした。ポストコート溶液を除去したのち、プレートを37°Cで夜通し乾燥した。

## 【0132】

10

(例9b)

ドキシソルピシン [5] - BSA 3:1 共役を用いたマイクロタイタープレート感作手順  
酵素免疫測定法 (ELISA) によって抗体を選別しドキシソルピシン濃度を測定する目的のために、タンパク質結合に最適化されたプレートにつき96ウェルを含むポリスチレンマイクロタイタープレート (Nunc MaxiSorp F8 Immunomodules) を用いた。pH 6の0.01 M MES中に10 µg/mLでドキシソルピシン [5] - BSA 共役を加えたもの300 mLを加え、室温で3時間培養することによって、各ウェルをドキシソルピシン [5] - BSA 3:1 共役 (例6bでのように生成) でコーティングした。ウェルをpH 6の0.005 M MESで洗浄し、その後5%スクロース、0.2%カゼインナトリウム溶液375 µLで室温で30分間ブロックした。ポストコート溶液を除去したのち、プレートを37°Cで夜通し乾燥した。

20

## 【0133】

(例9c)

ドキシソルピシン [5] - BSA 1:1 共役を用いたマイクロタイタープレート感作手順  
酵素免疫測定法 (ELISA) によって抗体を選別しドキシソルピシン濃度を測定する目的のために、タンパク質結合に最適化されたプレートにつき96ウェルを含むポリスチレンマイクロタイタープレート (Nunc MaxiSorp F8 Immunomodules) を用いた。pH 6の0.01 M MES中に10 µg/mLでドキシソルピシン [5] - BSA 共役を加えたもの300 mLを加え、室温で3時間培養することによって、各ウェルをドキシソルピシン [5] - BSA 1:1 共役 (例6cでのように生成) でコーティングした。ウェルをpH 6の0.005 M MESで洗浄し、その後5%スクロース、0.2%カゼインナトリウム溶液375 µLで室温で30分間ブロックした。ポストコート溶液を除去したのち、プレートを37°Cで夜通し乾燥した。

30

## 【0134】

(例9d)

ドキシソルピシン [5] - BSA 3:1 共役 (キャップされたチオール) を用いたマイクロタイタープレート感作手順

酵素免疫測定法 (ELISA) によって抗体を選別しドキシソルピシン濃度を測定する目的のために、タンパク質結合に最適化されたプレートにつき96ウェルを含むポリスチレンマイクロタイタープレート (Nunc MaxiSorp F8 Immunomodules) を用いた。pH 6の0.01 M MES中に10 µg/mLでドキシソルピシン [5] - BSA 共役を加えたもの300 mLを加え、室温で3時間培養することによって、各ウェルをドキシソルピシン [5] - BSA 1:1 キャップ共役 (例6dでのように生成) でコーティングした。ウェルをpH 6の0.005 M MESで洗浄し、その後5%スクロース、0.2%カゼインナトリウム溶液375 µLで室温で30分間ブロックした。ポストコート溶液を除去したのち、プレートを37°Cで夜通し乾燥した。

40

## 【0135】

(例10a)

抗体選別手順 - 滴定量

抗体を酵素免疫測定法 (ELISA) によって選別した。ドキシソルピシン抗体 (例7及

50

び 8 で生成) を選別するこの方法は、例 9 b、c、d で生成されたドキシソルピシン [ 5 ] - B S A で感作されたマイクロタイタープレートで行なった。抗体選別検査を、ドキシソルピシン抗体を含む抗血清を、0 . 1 % B S A 及び 0 . 0 1 % チメロサルを含むリン酸緩衝生理食塩水で 1 : 1 0 0、1 : 1 0 0 0、1 : 1 0、0 0 0 及び 1 : 1 0 0、0 0 0 に希釈することによって行った。モノクロナール抗体の評価のために、例 1 0 b の手順によって抗体の存在に対して陽性であることが見出された例 7 のハイブリドーマ上澄み液を、1 : 2、1 : 4、1 : 8、1 : 1 6 等に希釈した。ドキシソルピシン [ 5 ] - B S A 感作ウェル (例 9 b、c、d で生成) の各ウェルに、1 0 0  $\mu$  L の希釈抗体を加え、振動させながら室温で 1 0 分間培養した。この培養の間、抗体はドキシソルピシン [ 5 ] - 共役にウェル内で結合する。未結合抗体を除去するために、プレートのウェルを、3 回、0 . 0 2 M のトリス、0 . 9 % 塩化ナトリウム、0 . 5 % T w e e n - 8 0 及び 0 . 0 0 1 % チメロサル、p H 7 . 8 で、洗浄した。ウェル内でドキシソルピシン [ 5 ] - B S A 共役に結合するドキシソルピシン抗体の量を検出するために、培養基で培養する時、特にマウス科の免疫グロブリンに結合可能で有色の生成物を生成することが可能な、0 . 1 % B S A、0 . 0 5 % A N S、0 . 0 1 % チメロサルを伴う P B S に比活性に希釈 (約 1 / 2 8 0 0) されたヤギ抗マウス抗体 H R P 酵素共役 (ジャクソン イムノリサーチ) 1 0 0  $\mu$  L を、各ウェルに加えた。振動させながら室温で 1 0 分間培養した後、ヤギ抗マウス抗体 H R P 酵素共役がウェル内でドキシソルピシン抗体に結合する間、未結合ヤギ抗マウス抗体 H R P 酵素共役を除去するために、プレートを再び 3 回洗浄した。ウェル内に適度な色をつけるために、洗浄後 T M B ( T M B L i q u i d S u b s t r a t e、H R P 用培養基) 1 0 0  $\mu$  L を加え、室温で振動させながら 1 0 分培養する間に適度な色をつけた。着色のための培養に続いて、停止液 ( 1 . 5 % フッ化ナトリウムの脱イオン水) 5 0  $\mu$  L を着色を停止するために各ウェルに加え、1 0 秒間の振動後、6 5 0 n m の吸光度を 9 6 ウェルプレートリーダーで測定した。ウェル内の抗体量は、測定される吸光度に比例し、1 . 5 の吸光度となる希釈 (滴定量) として表わされる。滴定量は、測定された抗体の抗体希釈 ( x 軸) 対 6 5 0 n m での吸光度 ( y 軸) をログで図示し、1 . 5 の吸光度での滴定量を推定することによって測定される。滴定量は、例 1 1 に記載された間接競合マイクロタイタープレート測定で使用された抗体の濃度 (希釈) を決定した。

【 0 1 3 6 】

(例 1 0 b)

抗体選別手順 モノクロナール選別

抗体を酵素免疫測定法 ( E L I S A ) によって選別した。ドキシソルピシンモノクロナール抗体 (例 7 で生成される) を選別するこの方法は、例 9 b で記載されるようなドキシソルピシン [ 5 ] - B S A で感作されたマイクロタイタープレートで行なった。ドキシソルピシン [ 5 ] - B S A 感作ウェル (例 9 b で生成) の各ウェルに、0 . 1 % B S A 及び 0 . 0 1 % チメロサルを含む 5 0  $\mu$  L リン酸緩衝生理食塩水と、そして次にモノクロナール培養上澄み 5 0  $\mu$  L を加え、1 0 分間室温で振動させながら培養した。この培養の間、抗体はウェル内でドキシソルピシン [ 5 ] - 共役に結合する。未結合抗体を除去するために、プレートのウェルを 3 回、0 . 0 2 M トリス、0 . 9 % 塩化ナトリウム、0 . 5 % T w e e n - 8 0 及び 0 . 0 0 1 % チメロサル、p H 7 . 8 で、洗浄した。ウェル内でドキシソルピシン [ 5 ] - B S A 共役に結合するドキシソルピシン抗体の量を検出するために、培養基で培養する時、特にマウス科の免疫グロブリンに結合可能で有色の生成物を生成することが可能な、0 . 1 % B S A、0 . 0 5 % A N S、0 . 0 1 % チメロサルを伴う P B S 中に予め決められた比活性に希釈 (約 1 / 2 8 0 0) されたヤギ抗マウス抗体 H R P 酵素共役 (ジャクソン イムノリサーチ) 1 0 0  $\mu$  L を各ウェルに加えた。振動させながら室温で 1 0 分間培養した後、ヤギ抗マウス抗体 H R P 酵素共役がウェル内でドキシソルピシン抗体に結合する間、未結合ヤギ抗マウス抗体 H R P 酵素共役を除去するためにプレートを再び 3 回洗浄した。ウェル内に適度な色をつけるために、洗浄後 T M B ( T M B L i q u i d S u b s t r a t e、H R P 用培養基) 1 0 0  $\mu$  L を加え、室温で振動させながら 1 0 分培養する間に着色した。着色のための培養に続いて、停止液 ( 1 . 5 % フッ化ナトリウムの

脱イオン水) 50  $\mu$ L を着色を停止するために各ウェルに加え、10秒間の振動後、96ウェルプレートリーダーで650nmの吸光度を測定した。ウェル内の抗体量は、測定される吸光度に比例した。バックグラウンドの3倍以上の大きい吸光度を有する試料を陽性とした。

【0137】

(例11)

ドキシソルピシンの抗体における $IC_{50}$ 及び交差反応性を測定する間接競合マイクロタイタープレート免疫測定手順

ドキシソルピシン濃度を間接競合酵素免疫測定法(ELISA)によって測定した。ドキシソルピシン濃度を測定する方法は、例9b、c、dに記載するドキシソルピシン[5]-BSAで感作したマイクロタイタープレートで行った。ドキシソルピシン及びドキシソルピシンアグリコンは、0.01~10,000ng/mLの濃度範囲の間で、0.1%BSA及び0.01%チメロサルを伴うPBS中に10倍希釈された。測定は、例10aで測定された滴定量に希釈された50 $\mu$ Lの抗体(例3a、3b、4a及び4bの免疫原を用いて例7及び8で生成)で測定するために、50 $\mu$ Lの分析物を培養することによって行った。10分間の培養(振動を伴うローテーター(R.T.))の間、ウェル内のドキシソルピシン共役及び溶液中の分析物に結合する抗体の競合が生じる。この培養に続いて、結合しないあらゆる物質を除去するために、プレートのウェルを、0.02Mトリス、0.9%塩化ナトリウム、0.5%Tween-80及び0.001%チメロサル、pH7.8で、3回洗浄した。ウェル内のドキシソルピシン[5]-BSA共役に結合したドキシソルピシン抗体の量を検出するために、培養基で培養するとき、特にマウス科の免疫グロブリンに結合可能で有色の生成物を生成することが可能な、0.1%BSA、0.05%ANS、0.01%チメロサルを伴うPBS中に予め決められた比活性に希釈(約1/2800)されたヤギ抗マウス抗体-HRP酵素共役(ジャクソン イムノリサーチ)100 $\mu$ Lを、各ウェルに加えた。振動させながら室温で10分間培養した後、ヤギ抗マウス抗体-HRP酵素共役がウェル内のドキシソルピシン抗体に結合する間、結合していない第二の共役を除去するために、プレートを再び3回洗浄した。ウェル内で測定可能な色をつけるために、洗浄後、TMB(TMB Liquid Substrate、HRP用培養基)を100 $\mu$ L加え、室温で振動させながら10分培養して着色した。着色のための培養に続いて、停止液(1.5%フッ化ナトリウムの脱イオン水)50 $\mu$ Lを、着色を停止するために各ウェルに加え、10秒間の振動後、96ウェルプレートリーダーで650nmの吸光度を測定した。ウェル内の抗体量は、測定される吸光度に比例し、試料中のドキシソルピシン量に反比例した。分析物を含むウェル内の色の吸光度を、分析物のないものと比較し、標準曲線を形成した。与えられた分析物に対する $IC_{50}$ 値は、分析物を含んでいないウェルにおける吸光度の50%を阻害するために欠かせない分析物の濃度と定義した。与えられた分析物の交差反応性は、ドキシソルピシンに対する $IC_{50}$ とドキシソルピシンアグリコンに対する $IC_{50}$ との比率で、パーセント表示で計算した。例3a、3b、4a及びbの免疫原で例7及び8で生成した抗体で測定するとき、ドキシソルピシンアグリコンに対するドキシソルピシンに関連するパーセント表示で表わした交差反応性は10%以下であった。結果は下の表1及び2にある。

【0138】

表1: ドキシソルピシン[5]-BSA共役(例9b、9c、9d)をコーティングしたプレートでドキシソルピシン[5]-BTG及びKLH(例8)に対する抗体を用いた競合免疫測定法の交差反応性。

【0139】

10

20

30

40

【表 1】

	免疫原 例 4 a		免疫原 例 4 b	
	%交差反応性		%交差反応性	
例のように感作されたプレート	ドキソルビシン	ドキソルビシン-アグリコン	ドキソルビシン	ドキソルビシン-アグリコン
9 b	100%	5.7%	100%	8.6%
9 c	100%	10.0%	100%	未測定
9 d	100%	8.8%	100%	未測定

10

## 【0140】

表 2 : ドキソルビシン [ 5 ] - B S A 共役 ( 例 9 b、9 c、9 d ) をコーティングしたプレートでドキソルビシン [ 4 ] - B T G 及び - K L H ( 例 7 ) に対するモノクローナル抗体を用いた競合免疫測定法の交差反応性。

## 【0141】

【表 2】

	免疫原 例 3 a		免疫原 例 3 b	
	%交差反応性		%交差反応性	
例のように感作されたプレート	ドキソルビシン	ドキソルビシン-アグリコン	ドキソルビシン	ドキソルビシン-アグリコン
9 b	100%	10.6%	100%	1.5%
9 c	100%	12.9%	100%	3.9%
9 d	テストせず		100%	3.0%

20

## 【0142】

これらの表からわかるように、本発明の抗体はドキソルビシンの活性な親形態に実質的に反応性であり、ドキソルビシンの不活性なアグリコン代謝産物に実質的に交差反応性がない。

30

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US06/11022
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC: G01N 33/53( 2006.01),33/50( 2006.01),33/54G( 2006.01),33/551( 2006.01),33/532( 2006.01);C07K 16/00( 2006.01),16/44( 2006.01),1/13( 2006.01);C07C 50/18( 2006.01)  USPC: 435/7.1,7.93,975;436/524,534,544,548;530/388.9,389.8,403,807;552/208 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/7.1,7.93,975; 436/524,534,544,548; 530/388.9,389.8,403,807; 552/208  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		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	King et al. Monoclonal antibody conjugates of doxorubicin prepared with branched peptide linkers: inhibition of aggregation by methoxytriethyleneglycol chains. J. Med. Chem. 2002, Vol. 45, pp 4336-4343, especially scheme I of page 4337.	22-29, 39-46 and 52
X	King et al. Monoclonal antibody conjugates of doxorubicin prepared with branched linkers: a novel method for increasing the potency of doxorubicin immunoconjugates. Bioconjugate Chem. 1999, Vol 10, pp 279-288, especially scheme I of page 280.	22-29, 39-46 and 52
X	US 5,824,805 A (KING et al.) 20 October 1998 (20.10.1998), especially columns 3-10 and examples 1-70.	22-29, 39-46 and 52
X	US 5,122,368 A (GREENFIELD et al.) 16 June 1992 (16.06.1992), especially Fig. 17.	22-29, 39-46 and 52
X	US 6,146,658 A (BOSSLET et al.) 14 November 2000 (14.11.2000), especially example 8 of column 12.	30-38 and 47-52
<input checked="" 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	"T" 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 30 June 2006 (30.06.2006)		Date of mailing of the international search report 21 AUG 2006
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>Shafiqul Haq</i> Telephone No. 571-272-1600 <i>je-7</i>

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US06/11022
---

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0,316,776 (ISTITUTO NAZIONALE PER LO STUDIO E LA CURA DEI TUMORI) 24 May 1989 (24.05.1989), whole document.	12-14
X	US 5,177,016 A (BALSARI et al) 05 January 1993 (05.01.1993), whole document.	12-14

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/US06/11022

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

APS, CAPLUS

Search terms: doxorubicin, adriamycin, adriablastin, adriblastina, doxil, daunomycin, anthracycline, anthracycline, immunoassay, immunogen, immunconjugate, conjugate, hapten, tracer, label, antibod?

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
 C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 1 2 P 21/08

(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, KN, 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

(72)発明者 コートニー ジョディ ブレーク  
 アメリカ合衆国 ペンシルヴァニア州 1 8 9 0 1 ドイルスタウン ヒッコリー ホーロー レ  
 ーン 5 8 5 9

(72)発明者 ヘ シュウ  
 アメリカ合衆国 ペンシルヴァニア州 1 8 1 0 3 アレントアウン ピナックル ドライヴ 8 1  
 7

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA20 CC24 DA01  
 4C057 BB02 CC04 DD01 JJ50  
 4H045 AA11 AA30 CA40 DA75 DA76 EA50 FA74

专利名称(译)	阿霉素免疫测定		
公开(公告)号	<a href="#">JP2008537110A</a>	公开(公告)日	2008-09-11
申请号	JP2008504212	申请日	2006-03-27
[标]申请(专利权)人(译)	萨拉戴克斯生物医学公司		
申请(专利权)人(译)	莎拉·达克斯生物油墨.		
[标]发明人	サラモネサルヴァトーレ コートニージョディブレーク ヘシュウ		
发明人	サラモネ サルヴァトーレ コートニー ジョディ ブレーク ヘ シュウ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/547 G01N33/577 C07H15/252 C07K16/44 C12P21/08		
CPC分类号	G01N33/9446 A61K47/646 C07K16/44 G01N33/94 Y10S530/807		
FI分类号	G01N33/53.S G01N33/547 G01N33/577.B C07H15/252.CSP C07K16/44 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4C057/BB02 4C057/CC04 4C057/DD01 4C057/JJ50 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	大森纯一		
优先权	60/666288 2005-03-30 US		
其他公开文献	JP2008537110A5 JP4896959B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及13-氧代 - 取代的和14-羟基 - 取代的阿霉素衍生物和衍生自这些化合物的偶联物，其可用于免疫测定，用于定量和监测生物流体中的多柔比星。

