

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4896959号  
(P4896959)

(45) 発行日 平成24年3月14日(2012.3.14)

(24) 登録日 平成24年1月6日(2012.1.6)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	S
GO 1 N 33/547	(2006.01)	GO 1 N 33/547	
GO 1 N 33/577	(2006.01)	GO 1 N 33/577	B
CO 7 H 15/252	(2006.01)	CO 7 H 15/252	C S P
CO 7 K 16/44	(2006.01)	CO 7 K 16/44	

請求項の数 29 (全 41 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)
(65) 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)
(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)
審査請求日	平成21年3月27日(2009.3.27)
(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)

(73) 特許権者	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 8015 ベツレヘム、ジョーダン ホー ル、リサーチ ドライヴ 115
(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 8559 ストックトン ヤード ロード 65

最終頁に続く

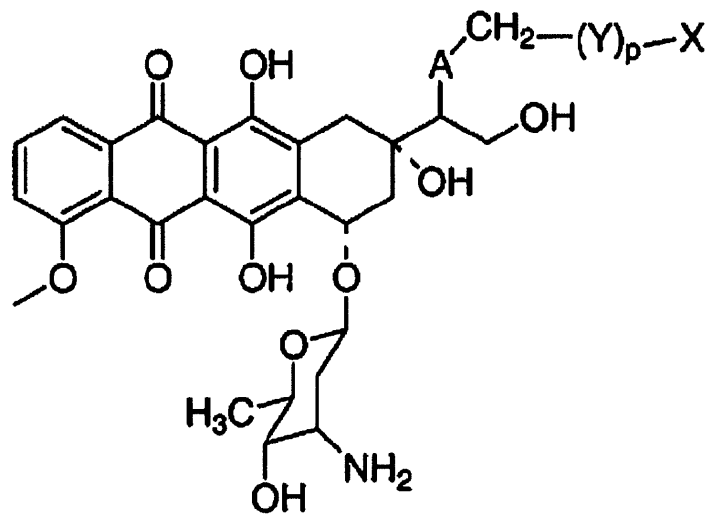
(54) 【発明の名称】 ドキソルピシン免疫測定法

(57) 【特許請求の範囲】

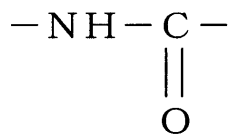
【請求項1】

- a) 試料と、  
 b) ドキソルピシンに選択的に反応し、ドキソルピシンアグリコンに対するドキソルピシンと比較した交差反応性が20%以下である抗体と、  
 c) 一般式

【化 1】

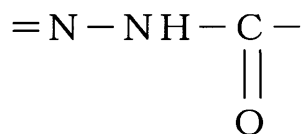
**II-A**

(式中、Aは  
【化 2】



= N - O -  
又は

【化 3】

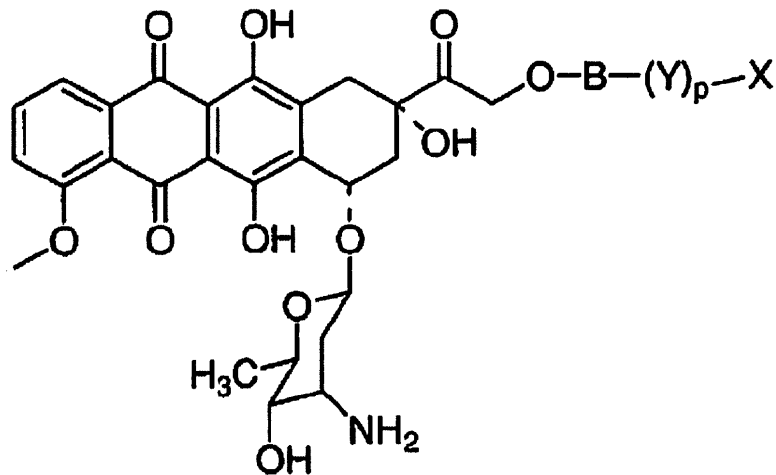


であって、Yは有機スペーシング基、Xはアミノ又はチオール基を介して担体に結合可能な官能基、pは0から1の整数である)の化合物、  
一般式

20

30

【化4】

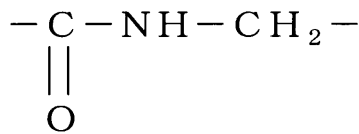


10

**II-B**

(式中、X、Y及びpは上述のとおりであり、Bは $-CH_2-$ 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記載の免疫測定法であって、一般式IIAの化合物及び/又は一般式IIBの化合物においてpは0であることを特徴とする免疫測定法。

【請求項3】

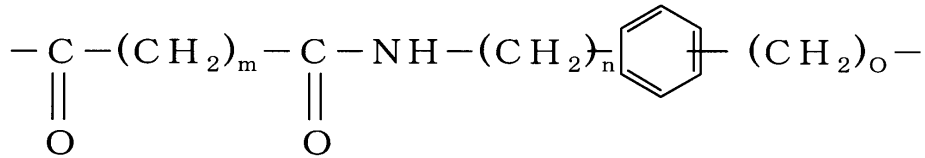
請求項1記載の免疫測定法であって、一般式IIAの化合物及び/又は一般式IIBの化合物においてpは1であることを特徴とする免疫測定法。

40

【請求項4】

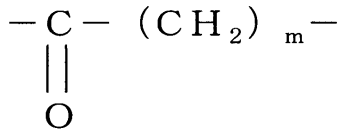
請求項3記載の免疫測定法であって、一般式IIAの化合物及び/又は一般式IIBの化合物において、Yは1から10の炭素原子を含むアルキレン、

【化 6】



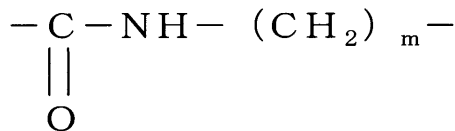
10

【化 7】



又は

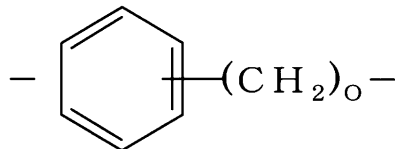
【化 8】



20

又は

【化 9】



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免疫測定法。

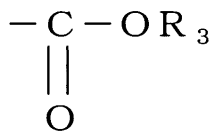
【請求項 5】

請求項 3 又は 4 記載の免疫測定法であって、一般式 I I A の化合物及び / 又は一般式 I I B の化合物において、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免疫測定法。

【請求項 6】

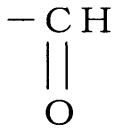
請求項 1 ~ 5 いずれか一項に記載の免疫測定法であって、一般式 I I A の化合物及び / 又は一般式 I I B の化合物において、X は

【化 10】



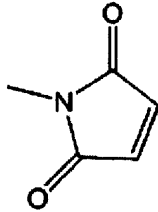
50

- N = C = R<sub>4</sub>、  
【化 1 1】



又は

【化 1 2】



10

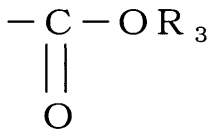
(式中、R<sub>3</sub> は水素又はそれに結びつく酸素原子と一緒に得られる反応性エステルであり、R<sub>4</sub> は酸素又は硫黄である)  
であることを特徴とする免疫測定法。

20

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 いずれか一項に記載の免疫測定法であって、一般式 I I A の化合物及び / 又は一般式 I I B の化合物において、X は

【化 1 3】



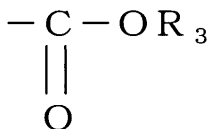
30

であり、R<sub>3</sub> は水素であることを特徴とする免疫測定法。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 6 いずれか一項に記載の免疫測定法であって、一般式 I I A の化合物及び / 又は一般式 I I B の化合物において、X は

【化 1 4】



40

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免疫測定法。

【請求項 9】

請求項 8 記載の免疫測定法であって、一般式 I I A の化合物及び / 又は一般式 I I B の化合物において、形成されたエステルは、低級アルキルエステル、イミドエステル又はアミドエステルであることを特徴とする免疫測定法。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 6 いずれか一項に記載の免疫測定法であって、一般式 I I A の化合物及び / 又は一般式 I I B の化合物において、X はチオール基に結合可能な官能基であることを特

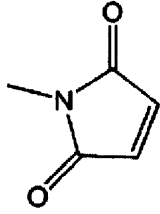
50

徴とする免疫測定法。

【請求項 1 1】

請求項 1 0 記載の免疫測定法であって、一般式 I I A の化合物及び / 又は一般式 I I B の化合物において、X は

【化 1 5】



10

であることを特徴とする免疫測定法。

【請求項 1 2】

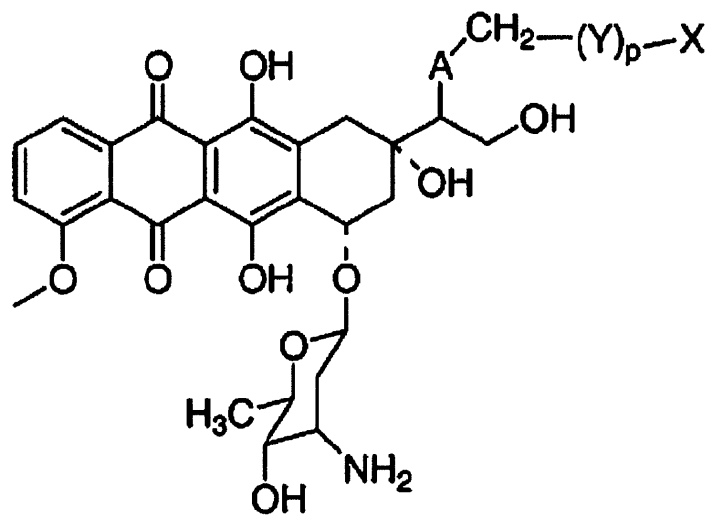
請求項 1 ~ 1 1 いずれか一項に記載の免疫測定法であって、試料はヒトの試料であることを特徴とする免疫測定法。

【請求項 1 3】

請求項 1 ~ 1 2 いずれか一項に記載の免疫測定法であって、前記抗体は、一般式

【化 1 6】

20



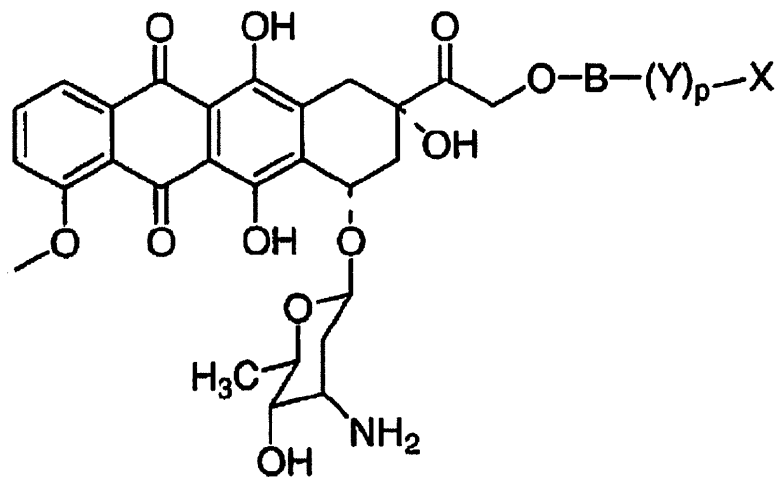
30

**II-A**

( 式中、p , X , Y 及び A は請求項 1 ~ 1 0 のいずれかで規定されるとおりである )  
の化合物、又は  
一般式

40

【化 1 7】



10

**II-B**

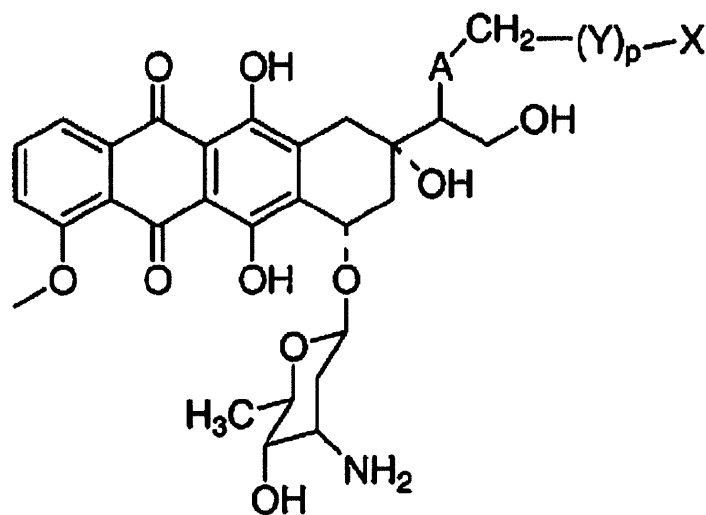
(式中、 $p$ 、 $Y$ 、 $X$ 及び $B$ は請求項1～10のいずれかで規定されるとおりである)の化合物、又はその混合物に共役された反応性チオール又はアミノ基を有する免疫原担体を含む免疫原から生成されることを特徴とする免疫測定方法。

20

【請求項14】

請求項13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 1 8】



30

**II-A**

40

(式中、 $p$ 、 $X$ 、 $Y$ 及び $A$ は請求項1～11のいずれかで規定されるとおりである)を有することを特徴とする免疫測定法。

【請求項15】

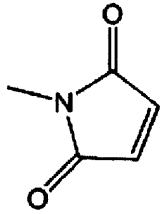
請求項13又は14記載の免疫測定法であって、担体はチオール基を含み、免疫原ポリマーに連結する化合物における $X$ は前記チオールに反応可能な官能基であることを特徴とする免疫測定法。

【請求項16】

請求項15記載の免疫測定法であって、 $X$ は

50

## 【化 19】



であることを特徴とする免疫測定法。

10

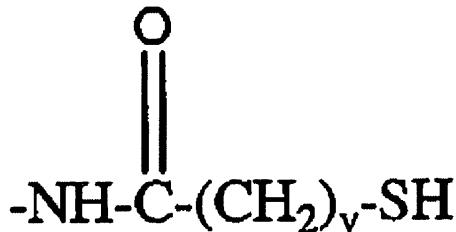
## 【請求項 17】

請求項 15 又は 16 記載の免疫測定法であって、Y は低級アルキレンであることを特徴とする免疫測定法。

## 【請求項 18】

請求項 15 ~ 17 いずれか一項に記載の免疫測定法であって、免疫原担体は官能基

## 【化 20】



20

(v は 1 から 6 の整数である)  
を含むことを特徴とする免疫測定法。

## 【請求項 19】

請求項 1 ~ 18 いずれか一項に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 20】

請求項 19 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。

30

## 【請求項 21】

請求項 19 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。

## 【請求項 22】

ドキシソルピシンに選択的に結合し、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と比較した交差反応性が 20% 以下の抗体。

## 【請求項 23】

請求項 22 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。

40

## 【請求項 24】

請求項 22 又は 23 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 25】

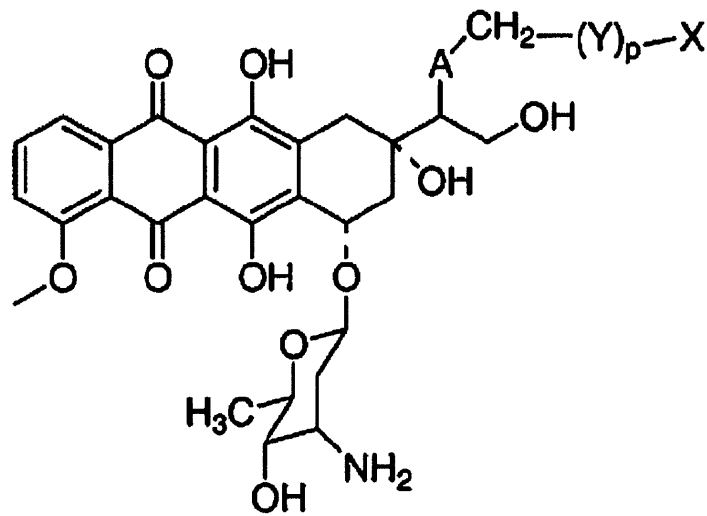
請求項 22 ~ 24 いずれか一項に記載の抗体であって、前記抗体は、請求項 13 ~ 18 いずれかで規定されることを特徴とする抗体。

## 【請求項 26】

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シソルピシンの存在を検出するキットであって、

50

試薬の1つは、一般式  
【化21】

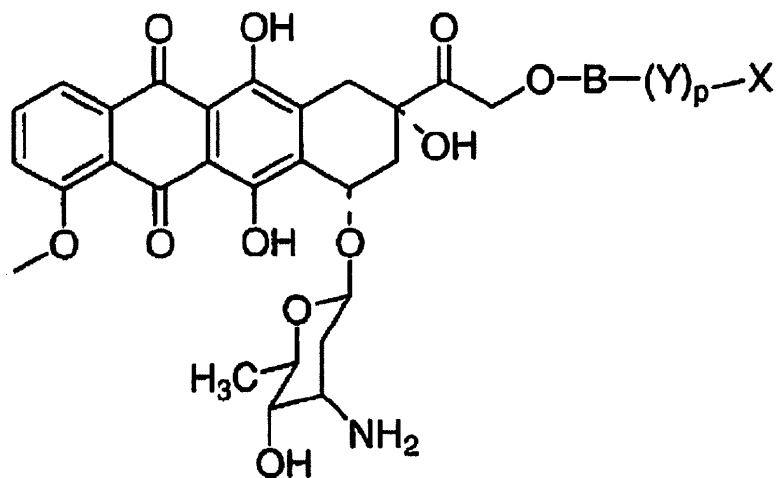


10

(式中、p、X、Y及びAは、請求項1～11いずれかで規定されるとおりである)  
の化合物、又は

20

【化22】



30

(式中、p、X、Y及びBは、請求項1～11いずれかで規定されるとおりである)  
の化合物、又はその混合物を伴う官能アミノ又はチオール基を含む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選択的に反応し、ドキソルピシンアグリコンに対するドキソルピシンと比較した交差反応性が20%以下の抗体を含むことを特徴とするキット。

40

【請求項27】

請求項26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28】

請求項26又は27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。

50

## 【請求項 29】

請求項 26 ~ 28 いずれか一項に記載のキットであって、前記抗体は、請求項 22 ~ 25 いずれかで規定されることを特徴とするキット。

## 【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】

10

## 【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。

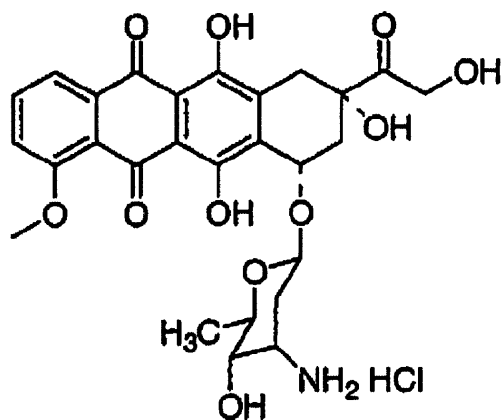
## 【0003】

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。

20

## 【0004】

## 【化 68】



30

## I

## 【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。

40

## 【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

50

- ・ 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

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）。同じドキソルピシン投薬の有効性は、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적으로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。

10

【0007】

さらに、ドキソルピ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。ドキソルピ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應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。これらの基準に適當なテストは、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。

20

【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】

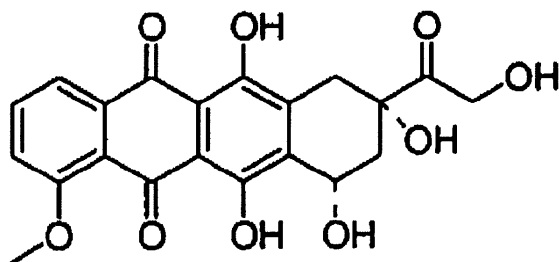
【0008】

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ピシン代謝産物に実質的に活性でなく、ドキソルピシンに広い交差反応性を明らかにしなければならない。ドキソルピ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、活性化化合物であるドキソルピシンに最も特異的でなければならない、次の一般式を有するドキソルピシンの非薬学的活性代謝産物、特にドキソルピシ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。

30

【0009】

【化69】



I-A

40

【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。選択的反應によって、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。

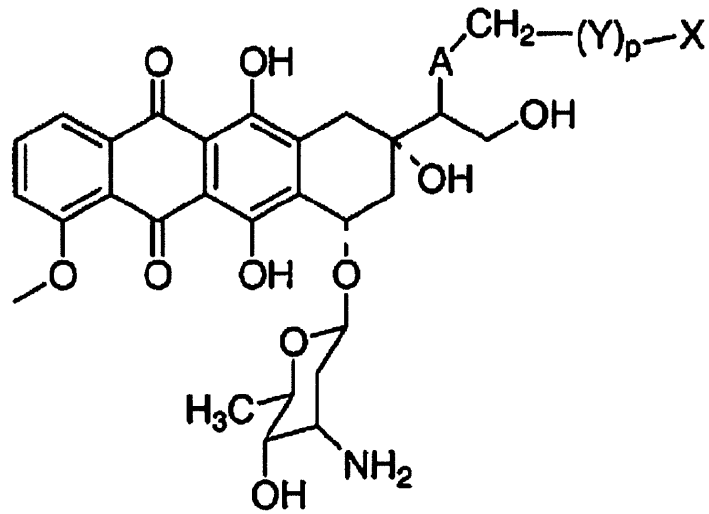
50

【 0 0 1 1 】

一般式

【 0 0 1 2 】

【 化 7 0 】



10

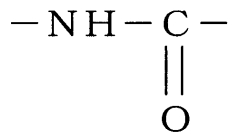
**II-A**

20

(式中、Aは、

【 0 0 1 3 】

【 化 7 1 】



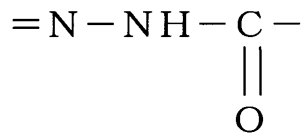
30

= N - O -

又は、

【 0 0 1 4 】

【 化 7 2 】



40

であり、

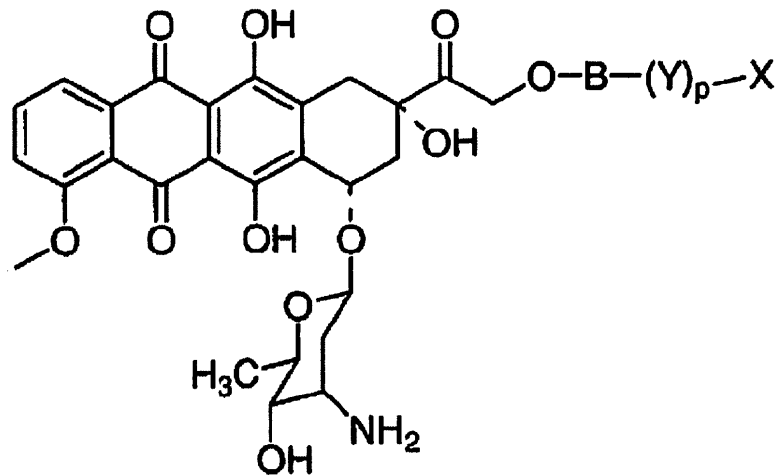
Yは有機スペーシング(spacing)基、Xはアミノ又はチオール基を通して担体に結合可能な官能基であり、pは0から1の整数である)、

の13置換化合物、又は

一般式

【 0 0 1 5 】

【化73】



10

**II-B**

の化合物

(式中、p、Y及びXは上記のとおりであり、Bは

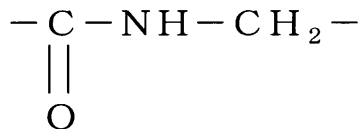
-CH<sub>2</sub>-

又は

【0016】

【化74】

20



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、ドキシソルピシンに特異的で、非薬学的活性代謝産物、特にドキシソルピ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シソルピシンに反応し、非薬学的不活性代謝産物、特にドキシソルピ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、ドキシソルピシンで治療されている患者の体液試料中のドキシソルピ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。

【発明を実施するための最良の形態】

40

【0017】

本発明によれば、実質的に選択的にドキシソルピシンに反応し、上述した薬学的不活性ドキシソルピ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13-オキソ置換ドキシソルピシン及び/又は一般式II-Bの14-ヒドロキシ置換ドキシソルピ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シソルピシンの検出及び/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シソルピ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、ドキシ

50

ルピ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ピシンで治療されている癌患者においてドキソルピシンの治療の薬管理が達成される。

【 0 0 1 8 】

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ピ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ピ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、試料中のドキソルピシンの量は、試料中のドキソルピ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）のドキソルピ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。

10

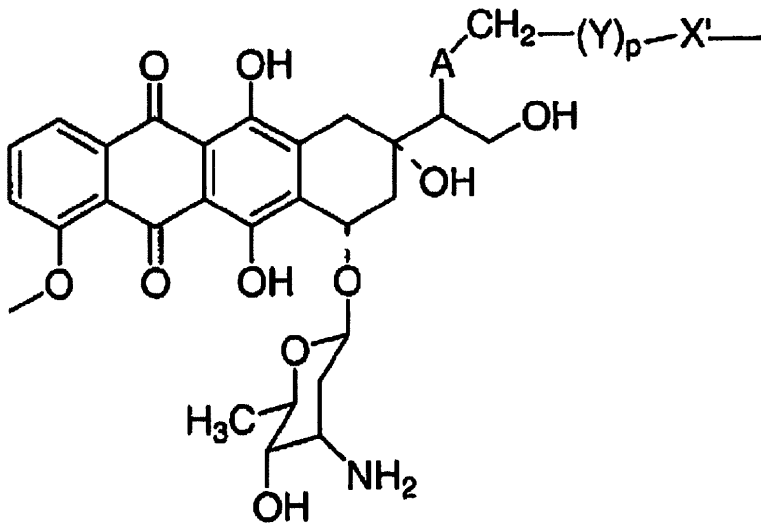
【 0 0 1 9 】

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

20

【 0 0 2 0 】

【 化 7 5 】



III-A

30

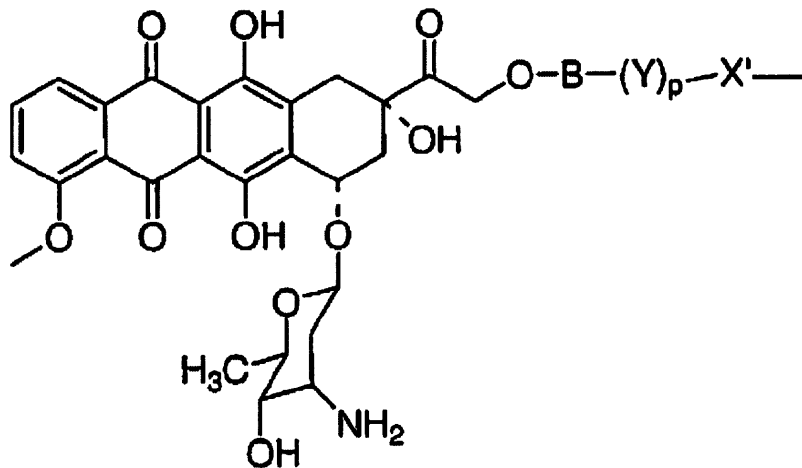
(式中、Y、A及びpは上述のとおりであり、X'は-CH<sub>2</sub>-または官能結鎖基である)

40

一般式

【 0 0 2 1 】

【化76】



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】

「ドキシソルピシン」という用語は、ドキシソルピシン及び薬学的に許容のドキシ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、ドキシソルピシンである。

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一つと置換して、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）又は多糖類の内の一つに共役するポリ（核酸）であっててもよい。

【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てもよく、膨張可能又は膨張不可能であっててもよく、多孔性又は非多孔性であっててもよく、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、大腸菌およびウイ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、リポソーム、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

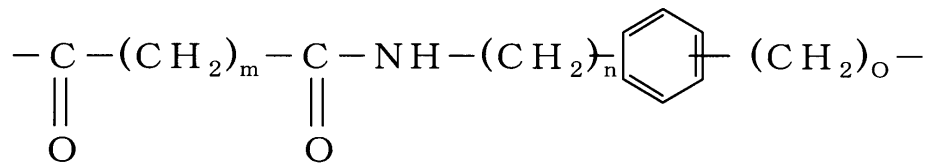
置換ドキソルピシン誘導体である。一般式 I I I - A 及び I I I - B の化合物では、リンカー Spacer は、この分子の  $-CH_2-(Y)_p-X'$  - または  $-B-(Y)_p-X'$  部分を構成する。これらのリンカー  $X'$  及び Spacer  $-CH_2-(Y)_p-$  または  $-B-(Y)_p-X'$  は、共役及び免疫原の生成において一般的である。免疫測定法のために共役と免疫原を生成するために利用される、従来の Spacer-結鎖基 (spacer-linking group) のうちのどれでも、一般式 I I I - A 及び I I 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 Spacer 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 Spacer 基中に、前述した Spacer 基が含まれている。特に好ましい Spacing 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】

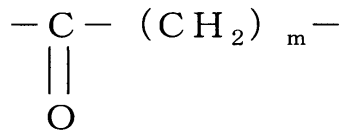


10

20

【0047】

【化78】

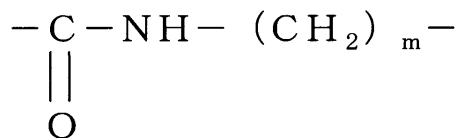


30

又は

【0048】

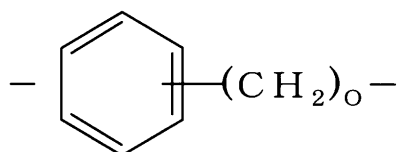
【化79】



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 Spacing 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 Spacing 基の上述の構造においては、官能基  $X$  は構造の右側の末端位置、例えば  $(CH_2)_m$  及び  $(CH_2)$

50

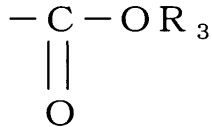
o が位置する位置、に接続する。

【 0 0 5 0 】

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、

【 0 0 5 1 】

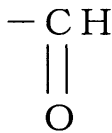
【 化 8 1 】



-N=C=R<sub>4</sub>、

【 0 0 5 2 】

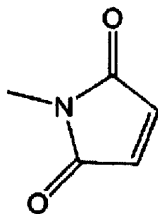
【 化 8 2 】



又は

【 0 0 5 3 】

【 化 8 3 】



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。

【 0 0 5 4 】

一般式 I I - A 又は I I - B の化合物中の X が

【 0 0 5 5 】

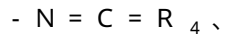
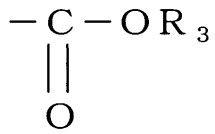
10

20

30

40

【化 8 4】

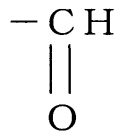


又は

【 0 0 5 6 】

【化 8 5】

10

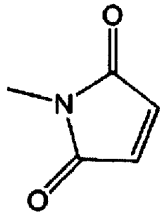


であるとき、これらの化合物は、好ましくは重合体または免疫原の担体の自由なアミノ基と反応する。他方、一般式 I I - A 又は I I - B の化合物中の X が

【 0 0 5 7 】

【化 8 6】

20

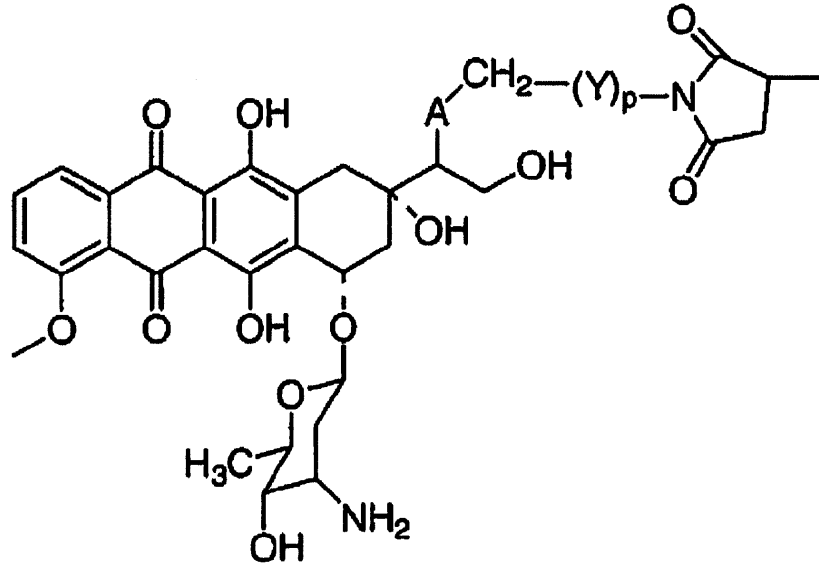


のマレイミド ラジカルであるとき、この化合物は、

【 0 0 5 8 】

30

【化 8 7】

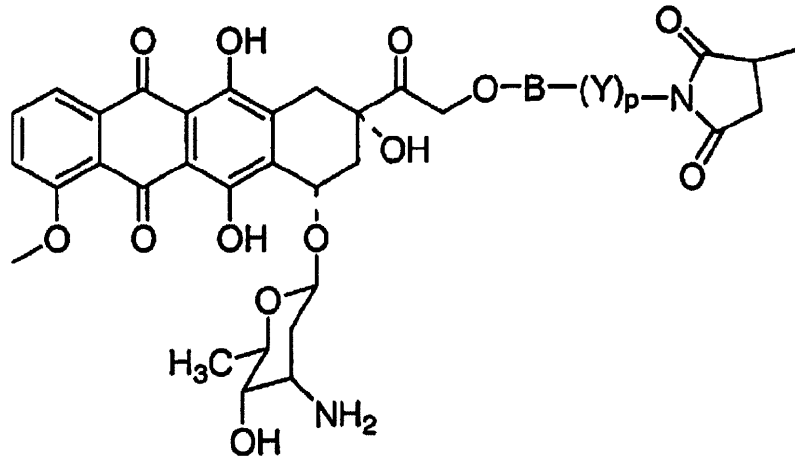
**III-A1**

10

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。

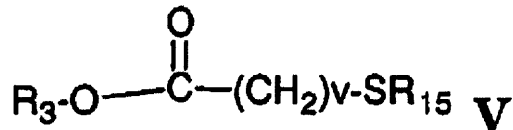
40

【 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】

【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 - ピ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ブ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】

アミノ結合い要訣を生成する際、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、免疫原が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

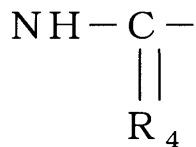
20

【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が末端イソシアン酸塩又はイソチオシアン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。

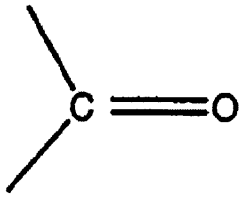
40

【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】

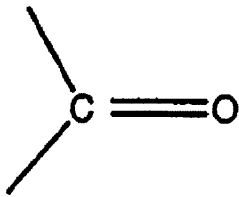
【化 9 1】



によって置き換えられることができ、  
式中

【 0 0 7 3】

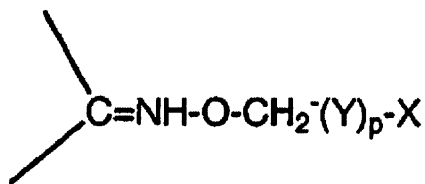
【化 9 2】



は、ドキシソルピシンを示されたその 1 3 - ケト基に置き換える。1 3 - ケトドキシソルピシ  
ンは、一般式

【 0 0 7 4】

【化 9 3】

**VI-B**

( 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、

【 0 0 7 5】

【化 9 4】

**VI-A**

のメトキシ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 I I - A の化合物に転化させることができる。

【 0 0 7 6】

US 特許 4, 039, 385 に開示されているような一般式 V I - 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 V  
I - B の化合物を形成するために、一般式 I の化合物はその 1 3 - オキシ基で一般式 V I  
- A のメトキシアミンと反応する。もし、一般式 V I - A の化合物が任意の官能置換基を  
含んでいたら、これらの置換基は、V I - A の化合物を伴うドキシ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 V I - B の化合物から生成され

10

20

30

40

50

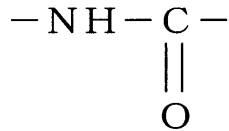
たのち、これらの保護基は、一般式 V I - B の化合物のオキシルアミン連結を保ちながらそのような保護基を除去する当業者に知られている手順によって除去することができる。

【 0 0 7 7 】

A が

【 0 0 7 8 】

【 化 9 5 】

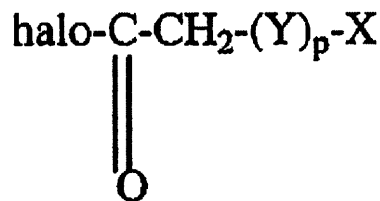


10

の一般式 I I - A の化合物は、最初にドキシソルピシン上の 1 3 - オキシ基を 1 3 - アミノ基に転化し、その後一般式

【 0 0 7 9 】

【 化 9 6 】



VIII-A

20

( 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 1 3 - アミノドキシ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。

【 0 0 8 0 】

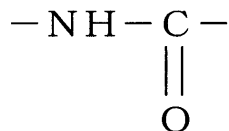
ドキシソルピシン上の 1 3 - オキシ基は、塩化アンモニウム及びシアノ水素化ホウ素ナトリウムのような還元剤を使用する還元アミノ化によって、 1 3 - アミノ基に転化されることができる。

【 0 0 8 1 】

還元アミノ化において従来のどんな状態でもドキシソルピシン上の 1 3 - 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

【 0 0 8 2 】

【 化 9 7 】



40

の一般式 I I - A のアミドを形成するために、 1 3 - アミノドキシソルピシンは、縮合によって酸ハロゲン化物と反応する。

【 0 0 8 3 】

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に行うために用いることができる。

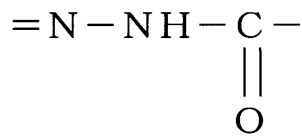
【 0 0 8 4 】

A が一般式

50

【 0 0 8 5 】

【 化 9 8 】

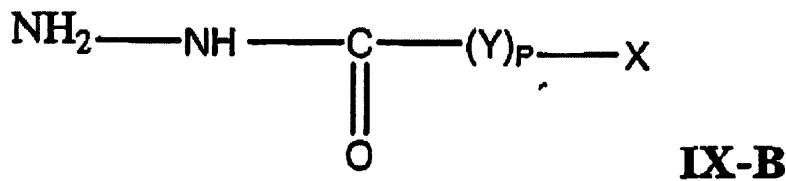


のヒドラゾンである一般式 I I - A の化合物は、一般式

【 0 0 8 6 】

10

【 化 9 9 】



(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 - オキシとを反応させることによって生成することができる。

20

【 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 - オキシ基と 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。

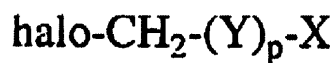
【 0 0 8 8 】

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

30

【 0 0 8 9 】

【 化 1 0 0 】



## VIII-B

(式中、p、Y及びXは上述のとおり)

40

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。

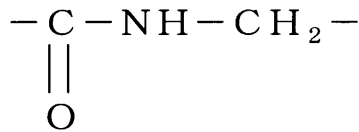
【 0 0 9 1 】

B が

50

【 0 0 9 2 】

【 化 1 0 1 】

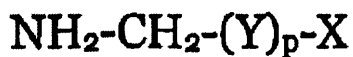


である一般式 I I - B の 1 4 - 置換化合物は、ドキソルピシン上の 1 4 - ヒドロキシ基と一般式

10

【 0 0 9 3 】

【 化 1 0 2 】



IX

( 式中、X , Y 及び p は上述のとおり )

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。

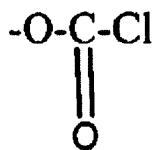
【 0 0 9 4 】

20

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。

【 0 0 9 8 】

40

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。

【 0 0 9 9 】

50

## (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、従来の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。

## 【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、  
10  
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、従来の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  
20  
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。

## 【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。

## 【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  
30  
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  
40  
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。

## 【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、Fab断片又は（Fab'）<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、  
50

生成してもよい。単鎖抗体は、DNAリンカーにVLとVH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シ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シ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シ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これらの抗体が好ましい。本発明の抗体は、ドキシ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シ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、患者試料中のドキシ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シソルピシンと競合するどんな免疫測定法も、患者試料中のドキシ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。ドキシ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シ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シソルピシンの抗体、(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。試料中のドキシソルピシン量は、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、ドキシ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シ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シ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シソルピシンは、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。

#### 【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、抗体あるいはドキシ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。

40

#### 【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

50

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。

## 【 0 1 1 0 】

10

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。

## 【 0 1 1 1 】

(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。

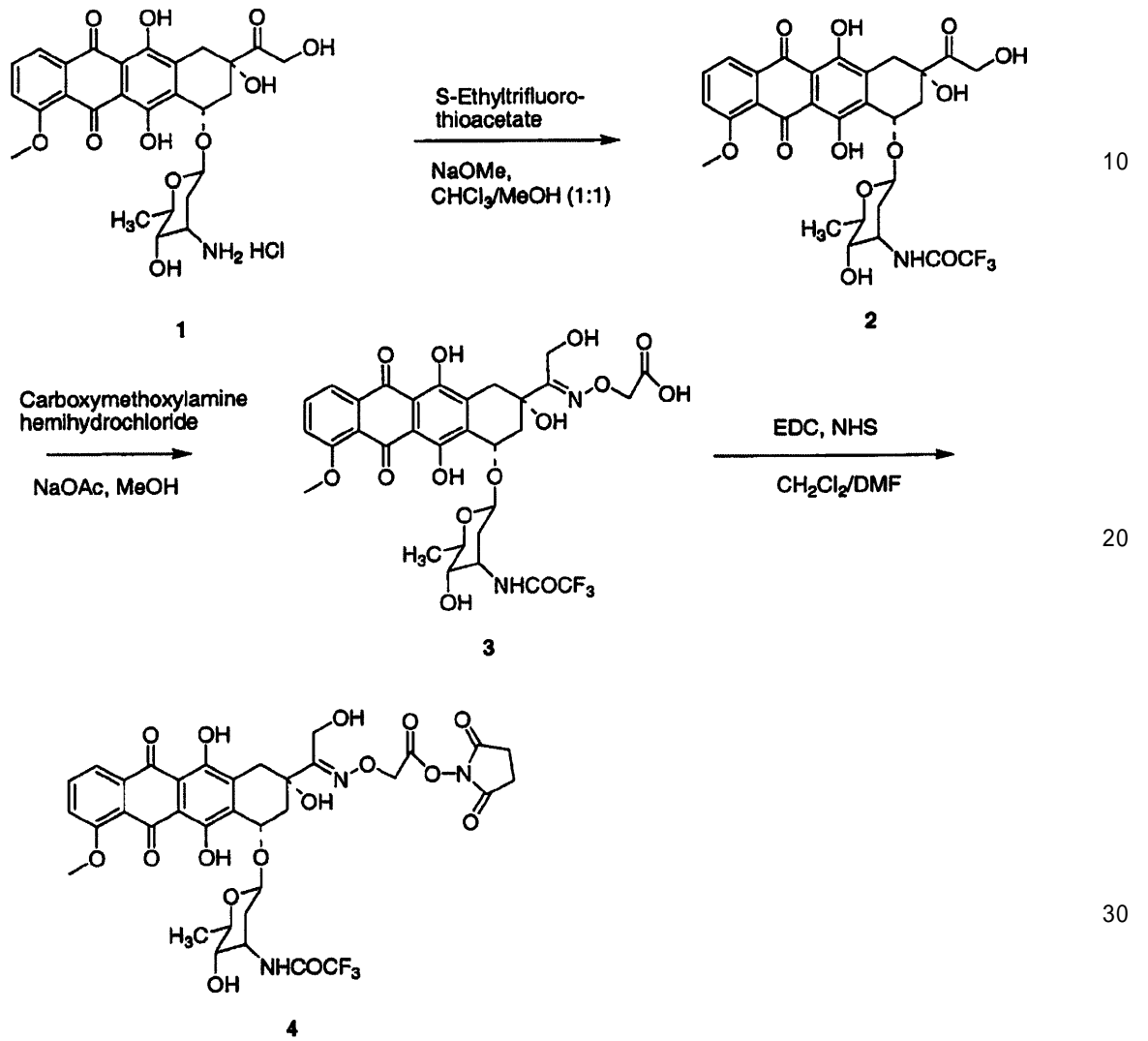
CHCl <sub>3</sub>	クロロホルム	
BMPH	N - [ - マレイミドプロピオン酸 ] ヒドラジド , トリフルオロ酢酸塩	20
MeOH	メタノール	
DMF	ジメチルホルムアミド	
TFA	トリフルオロ酢酸	
DMSO	ジメチルスルホキシド	
CAPS	3 - ( シクロヘキシルアミノ ) - 1 - プロパンスルホン酸	
NHS	N - ヒドロキシスクシンイミド	
EDC	1 - ( 3 - ジメチルアミノプロピル ) - 3 - エチルカルボジイミド塩酸塩	
KPi	リン酸カリウム緩衝剤 pH 7 . 5	
SPDP	3 - ( 2 - ピリジルチオ ) プロピオン酸 N - ヒドロキシスクシンイミドエ	
ステル		30
MES	2 - ( N - モノホリノ ) エタンズルホン酸緩衝剤 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	
B TG	ウシチログロブリン	40
PBS	リン酸塩緩衝生理的食塩水	
di	脱イオン水	

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。

## 【 0 1 1 2 】

【化 1 0 4】

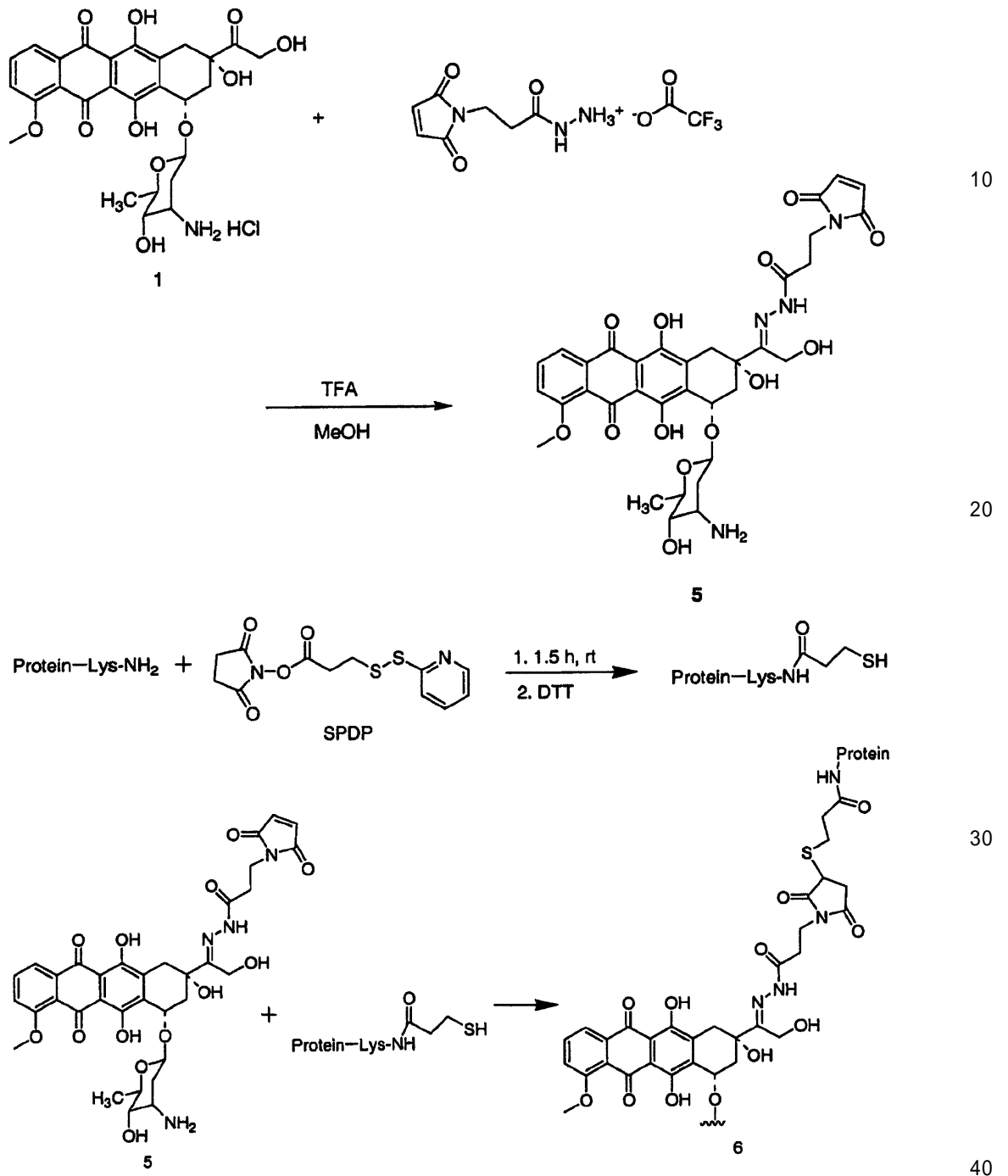
図式 1



【 0 1 1 3】

【化105】

図式2



【0114】

(例1)

ドキシソルピシン 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 のドキシソルピシン(1)(0.8g、1.38mmol)の $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1)(15mL)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(0.89mL、7.02mmol)が添加された0.5Mメタノリック(methanolic)ナトリウムメトキシド2.76mLで処理した。室温で16時間

50

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クエン酸10 mL、塩水(2 x 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 x 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 /  $\text{DMF}$  (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)を窒素雰囲気下に加えた。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 x 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)

(例2)

20

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,  $0.05 \times 10^{-3}$  mmol)、BMPH(50 mg, 3.4当量)を溶解した溶液に、3  $\mu\text{L}$ 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) :  $\text{DMSO}$ 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( $\text{DMSO}$ 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%  $\text{DMSO}$ で行った。その後、 $\text{DMSO}$ 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KLH免疫原の生成

1 : 1のリン酸緩衝剤(50 mM, pH 7.5) :  $\text{DMSO}$ 中にKLH(7.35 mg/mL)を溶解した18.0 mLの溶液に、1.3 mLの例1( $\text{DMSO}$ 中に20 mg /

50

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イ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。

#### 【0123】

10

20

30

40

50

## (例5)

活性化ハプテン4を伴うBSA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(50mM、pH7.5):DMSO中にBSA(25mg/mL)を加えたもの40mLに、例1からの化合物4(DMSO中に20mg/mL)を0.62mL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ロロアセトアミド保護基をpH11のCAPS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50%50mM CAPSと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。

10

## 【0124】

## (例6a)

活性化ハプテン5との反応のためのチオール化BSAの生成

pH7.5のリン酸カリウム緩衝剤(50mg/mL、6mL)中にBSAを溶解した溶液に、DMSO84μL中にSPDP(3当量)4.2mgを加えたものを加えた。室温で1.5時間攪拌した後、0.135mLのKPi中に溶解したジチオトレイトール27mgを混合物に加えた。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BSAをゲルろ過クロマトグラフィによって精製した。

20

## 【0125】

ゲルろ過カラムは、12gのSephadex G-25を室温で1時間10mM MES緩衝剤(pH6)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、MES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。

## 【0126】

## (例6b)

活性化ハプテン5を伴うBSA共役(3:1比率)の生成

氷水浴中の例6aで生成された精製チオール化-BSAタンパク質(MES中に5mg/mL、35mg)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(8mg/mL)を滴下で0.135mL加えた。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6aに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UV/VIS分光検査法によって特性を調べた。

30

## 【0127】

## (例6c)

活性化ハプテン5を伴うBSA共役(1:1比率)の生成

氷水浴中の例6aで生成した精製チオール化-BSAタンパク質(MES中に5mg/mL、80mg)へ例2で生成したドキソルピシンヒドラゾン誘導体5(8mg/mL)を0.107mL滴下で加えた。反応混合物を16時間4で攪拌し、光から保護した。免疫原共役(6mL)を例6aに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UV/VIS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

## 【0128】

## (例6d)

ドキソルピシンヒドラゾン5-BSA共役(1:1比率)のキャッピング

例6cで精製した1:1ドキソルピシン[5]-BSA共役(MES緩衝剤中に5mg/mL)5mL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、0.047mLのN-エチルマレイミド(2当量、MES緩衝剤中2mg/mL)を加

50

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 $\mu$ g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 $\mu$ g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 $\mu$ g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 $\mu$ g(融合前3日)、200 $\mu$ g(融合前2日)、200 $\mu$ g(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 $\mu$ g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(100mM)、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。

【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 $\mu$ g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 $\mu$ g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 $\mu$ g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]-BSA1:1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。pH6の0.01M MES中に10µg/mLでドキシソルピシン[4]-BSA共役を加えたもの300mL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]-BSA1:1共役(例5でのように生成)でコーティングした。ウェルをpH6の0.005M 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375µL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】**

(例9b)

ドキシソルピシン[5]-BSA3:1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。pH6の0.01M MES中に10µg/mLでドキシソルピシン[5]-BSA共役を加えたもの300mL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]-BSA3:1共役(例6bでのように生成)でコーティングした。ウェルをpH6の0.005M 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375µL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。

10

20

**【0133】**

(例9c)

ドキシソルピシン[5]-BSA1:1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。pH6の0.01M MES中に10µg/mLでドキシソルピシン[5]-BSA共役を加えたもの300mL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]-BSA1:1共役(例6cでのように生成)でコーティングした。ウェルをpH6の0.005M 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375µL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]-BSA3:1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。pH6の0.01M MES中に10µg/mLでドキシソルピシン[5]-BSA共役を加えたもの300mL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]-BSA1:1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pH6の0.005M 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375µL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及び8で生成)を選別する方法は、例9b、c、dで生成されたドキシソルピシン[5]

50

- 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0.01% チメロサルを含むリン酸緩衝生理食塩水で1:100、1:1000、1:10,000及び1:100,000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10b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のハイブドーマ上澄み液を、1:2、1:4、1:8、1:16等に希釈した。ドキシソルピシン[5]-B S A感作ウェル(例9b、c、dで生成)の各ウェルに、100 $\mu$ Lの希釈抗体を加え、振動させながら室温で10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、0.02Mのトリス、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、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、0.05% A N S、0.01% チメロサルを伴うP B Sに比活性に希釈(約1/2800)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)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 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 Liquid Substrate、H R P用培養基)100 $\mu$ Lを加え、室温で振動させながら10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)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、650nmの吸光度を96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650nm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11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。

#### 【0136】

(例10b)

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)を選別する方法は、例9bに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9bで生成)の各ウェルに、0.1% B S A及び0.01% チメロサルを含む50 $\mu$ 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50 $\mu$ Lを加え、10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、0.02M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、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、0.05% A N S、0.01% 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1/2800)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)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 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 Liquid Substrate、H R P用培養基)100 $\mu$ Lを加え、室温で振動させながら10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

10

20

30

40

50

ウェルプレートリーダー - で 650 nm 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。

【 0 1 3 7 】

( 例 1 1 )

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 ( E L I Z A ) によって測定した。ドキシソルピシン濃度を測定するこの方法は、例 9 b、c、d に記載するドキシソルピシン [ 5 ] - B S A 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 ~ 10,000 ng/mL の濃度範囲の間で、0.1% B S A 及び 0.01% チメロサルを伴う P B S 中に 10 倍希釈された。測定は、例 10 a で測定された滴定量に希釈された 50  $\mu$ L の抗体 ( 例 3 a、3 b、4 a 及び 4 b 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、0.02 M トリス、0.9% 塩化ナトリウム、0.5% T w e e n - 8 0 及び 0.001% チメロサル、pH 7.8 で、3 回洗浄した。ウェル内のドキシソルピシン [ 5 ] - B S A 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% B S A、0.05% A N S、0.01% 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 / 2800 ) 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 ) 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 - H R P 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、T M B ( T M B Liquid Substrate、H R P 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 650 nm 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 3 a、3 b、4 a 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。

【 0 1 3 8 】

表 1 : ドキシソルピシン [ 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シソルピシン [ 5 ] - B T G 及び K L H ( 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。

【 0 1 3 9 】

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

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 1 2 P 21/08

(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اون ピナックル ドライヴ 8 1  
7

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 特開平07-223969(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-33/98

C07H 15/252

C07K 16/44

C12P 21/08

