

(19)日本国特許庁(J P)

# (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003 - 24065

(P2003 - 24065A)

(43)公開日 平成15年1月28日(2003.1.28)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09		C 0 7 K 16/44	4 B 0 2 4
C 0 7 K 16/44		G 0 1 N 33/53	G 4 B 0 6 4
C 1 2 N 5/10		33/577	B 4 B 0 6 5
15/02		C 1 2 P 21/08	4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/53		C 1 2 N 15/00	A

審査請求 有 請求項の数 6 O L (全 14数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2002 - 130451(P2002 - 130451)  
 (62)分割の表示 特願平6 - 522682の分割  
 (22)出願日 平成6年3月30日(1994.3.30)

(31)優先権主張番号 9307491.2  
 (32)優先日 平成5年4月8日(1993.4.8)  
 (33)優先権主張国 イギリス(GB)

(71)出願人 597011463  
 ノバルティス アクチエンゲゼルシャフト  
 スイス国、4056 バーゼル、リヒトシュト  
 ラーセ 35  
 (72)発明者 ヴァレリ・ケスニオ  
 スイス国ツェーハー - 4123アルシュヴィル、  
 シュッツェンヴェーク7番  
 (72)発明者 リヒャルト・セドラニ  
 スイス国ツェーハー - 4054バーゼル、ヘレ  
 ングラーベンヴェーク15番  
 (74)代理人 100062144  
 弁理士 青山 葆 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ラパマイシン検定

(57)【要約】

【課題】 ラパマイシン対するモノクローナルを提供すること。

【解決手段】 a)活性化結合基を有するラパマイシンを免疫原性タンパク質と反応させ、免疫原性結合体を産生し、b)上記免疫原性結合体を好適な動物種に投与し、免疫原性チャレンジを行い、上記結合体に感受性の抗体 - 産生細胞を回収し、c)上記抗体 - 産生細胞を不死化し、およびd)このように確立した不死化細胞系からモノクローナル抗体を回収する：ことにより得ることができるモノクローナル抗体により解決される。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 40-O-(2-ヒドロキシエチル)-ラパマイシンを認識できるモノクローナル抗体。

【請求項2】 40-O-(2-ヒドロキシエチル)-ラパマイシンのFKBP-結合部分のエピトープを認識できる、請求項1に記載のモノクローナル抗体。

【請求項3】 a)活性化結合基を有する40-O-(2-ヒドロキシエチル)-ラパマイシンを免疫原性タンパク質と反応させて免疫原性結合体を産生し、

b)上記結合体を好適な動物種に投与して免疫化し、上記結合体に感受性の抗体-産生細胞を回収し、

c)上記抗体-産生細胞を不死化し、および

d)このように確立した不死化細胞系からモノクローナル抗体を回収する：ことにより得たまたは得ることができる、請求項1または2に記載のモノクローナル抗体。

【請求項4】 タンパク質を、活性化結合基を有する40-O-(2-ヒドロキシエチル)-ラパマイシンと反応させて産生される、免疫原性結合体。

【請求項5】 請求項1から3のいずれかに記載のモノクローナル抗体の産生が可能な、ハイブリドーマ細胞系。

【請求項6】 請求項1から3のいずれかに記載のモノクローナル抗体を含む、40-O-(2-ヒドロキシエチル)ラパマイシンの血中濃度測定のための免疫検定キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、例えば医薬の血中濃度追跡のためのキットに有用なラパマイシンおよびラパマイシン誘導体に対するモノクローナル抗体に関する。

## 【0002】

【従来の技術】ラパマイシンは、種々の適用において、特に、例えば器官移植拒絶反応および自己免疫疾患の処置および予防における使用のための免疫抑制剤として有用な、ストレプトマイセス・ヒグロスコピクス(*Streptomyces hygroscopicus*)により産生されるマクロライド系抗生物質である。しかしながら、ラパマイシンは高投与量で副作用を示し、いくぶん変わりやすい生体内利用能を有する。ラパマイシンで処置している患者の血中のラパマイシン濃度を追跡することは、従って、薬理学的活性のために十分な最少の濃度を維持し、副作用の過度の危険を避けるために、強く望まれている。臨床環境で素早く、容易に行うことができる感受性で信頼できる検定がないことが、医薬としてのラパマイシンの発展の主要な障害となっている。

【0003】ラパマイシンの臨床的追跡のための検定キットの開発のための以前の努力は特に成功していない。例えば、欧州特許第041795号は、ラパマイシン濃度が抗菌活性の関数として測定される微生物検定を記載

している。WO92/02946は、マクロフィリンへの結合を競合測定することによりラパマイシン濃度を間接的に測定する検定系を提供する。これらの検定の両方とも扱いにくく特に感受性でない。更に重要なことに、これらの両方の検定は、僅かに異なった試験条件下で相当変化し得、異なった病院の試験結果の比較が難しい。

【0004】ラパマイシンを認識するモノクローナル抗体の先行報告はない。ラパマイシンが免疫原性でなく、それ自身非常に免疫抑制性であるため、ラパマイシンに対するモノクローナル抗体の製造は本来難しい。更に、ラパマイシンの代謝物が文献中で十分特徴付されていないため、ラパマイシンとその代謝物の間の識別が可能なモノクローナル抗体の同定は難しい。

## 【0005】

【発明の開示】本発明はラパマイシンに非常に感受性のモノクローナル抗体を提供する。本発明の抗体は、免疫原性タンパク質に結合したラパマイシンの新規誘導体を含む新規免疫原性結合体の接種にตอบสนองして産生される。これらの抗体を使用した検定キットは臨床環境での使用に非常に適しており、今まで可能であったものよりはるかに正確で再現性のある結果を提供する。抗体はラパマイシンの精製および単離にもまた有用である。

【0006】ラパマイシンの免疫抑制誘導体のための検定系の提供は、同様の課題が示される。特に興味のあるのは、例えば米国第5258389号およびPCT/EP93/02604(O-アリルおよびO-アルキルラパマイシン)(両方とも本明細書に引用して包含する)に開示されているようなラパマイシンの40-O-誘導体、即ちシクロヘキシル環のヒドロキシ(40位)でO-置換されたラパマイシン；特に、40-O-置換基がアルキルまたは置換アルキル；例えばヒドロキシアルキル、ヒドロキシアルコキシアルキル、アシルアミノアルキルまたはアミノアルキルである(ここで、「アルク-」または「アルキル-」は分枝鎖または直鎖状のC<sub>1-6</sub>アルキル、好ましくはC<sub>1-3</sub>アルキルを意味し、炭素鎖は所望によりエーテル(-O-)架橋で中断されていてもよい。)である40-O-アルキル化ラパマイシン；最も好ましくは40-O-(2-ヒドロキシエチル)-ラパマイシン、40-O-(3-ヒドロキシプロピル)-ラパマイシン、40-O-[2-(2-ヒドロキシ)エトキシ]エチル-ラパマイシンおよび40-O-(2-アセトアミノエチル)-ラパマイシンである。従って、本発明の更なる対象は、このような40-O-誘導体に対するモノクローナル抗体の提供である。このような抗体は診断的検定およびまた本誘導体の精製および産生に有用である。

【0007】本発明の新規免疫原性結合体の製造に使用するラパマイシンの新規活性化誘導体は、ラパマイシン上のヒドロキシ基の一つ、好ましくはラパマイシンのシクロヘキシル部分(40位)または28位のヒドロキシを

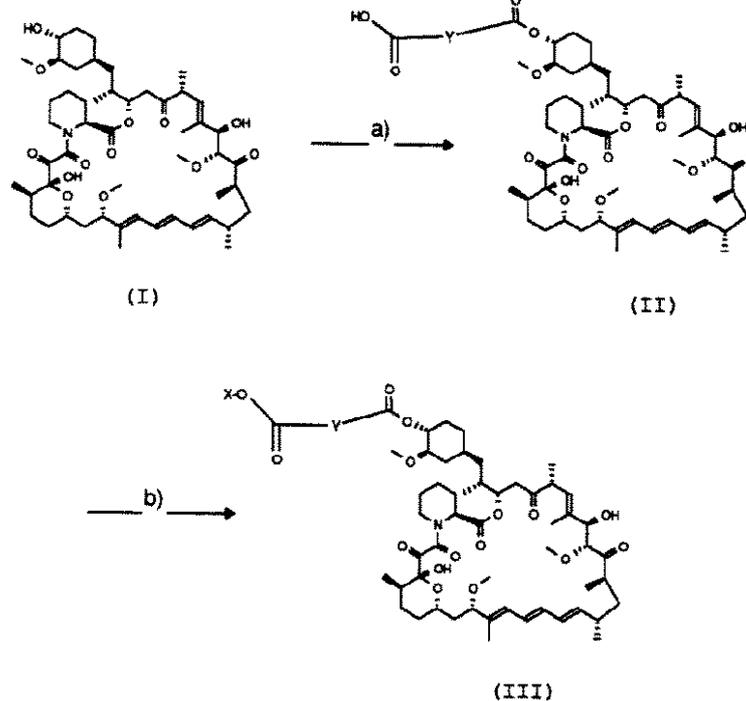
通して、活性結合基、即ちタンパク質との直接の反応が可能な基と結合し、タンパク質との反応を可能にし、作用または促進する結合剤(例えばカルボジイミド試薬)を使用する必要なく共有結合を形成する。好ましくは、活性化結合基は、活性化エステルまたはカルボキシ基、即ち式  $-CO-O-X$  (ここで、 $X$  は  $o$ -または  $p$ -ニトロフェニル、1-ベンズトリアゾール、ペンタフルオロフェニルまたは(特に)  $N$ -サクシニミドのようなカルボキシ活性化基である。)を有する。他の好適な活性化結合基は、例えば  $i$ ) 例えば式  $-S-S-Z$  (ここで、 $Z$  は、ラパマイシンに結合し得る2-ピリジルのような\*

\*ジチオ活性化基)で示される活性化ジチオ基; または  $i$ ) 例えばエポキシメチルのようなエポキシ基である。活性化結合基は、エステル、エーテル、アミド、チオまたは他の好適な結合によりラパマイシンと結合し得るが、エステル結合が好ましい。最も好ましくは、活性化結合基は、一端にラパマイシンへのエステル結合を有し、他方の端に活性化エステルまたは活性化カルボキシ基を有するビス-エステル分子、例えばサクシニルを含む。

【0008】本発明の好ましいラパマイシン誘導体は、

10 反応 I :

【化1】



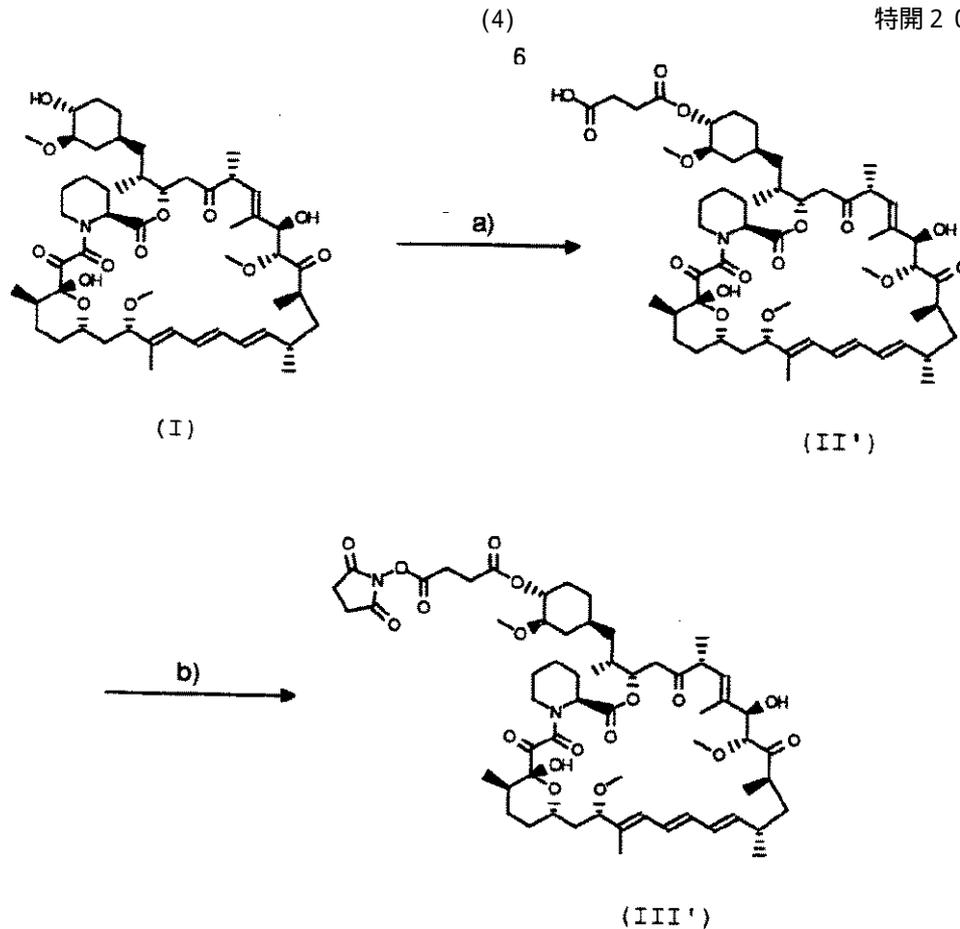
反応 I

(式中、式 I はラパマイシンであり、それを a) アシル化剤、例えば環状無水物またはジカルボン酸誘導体(所望によりヘミ- $O$ -保護形である。)と、好適な反応条件下反応させ、必要であれば脱保護し、式 II (ここで、 $Y$  はスペーサー分子、好ましくは低級アルキレン、例えば  $C_{2-6}$  アルキレン、最も好ましくはエチレンである。)で示されるラパマイシンを産生する。式 II で示され

るラパマイシンを、次いで b) 例えば式  $HO-X$  (ここで、 $X$  は上記で定義の意味である。)のようなカルボキシ活性化基との反応により活性化し、式 III で示される活性化ラパマイシンを産生する。)によって製造される式 III で示される化合物である。

【0009】ラパマイシンの好ましい活性化誘導体は、例えば反応 II :

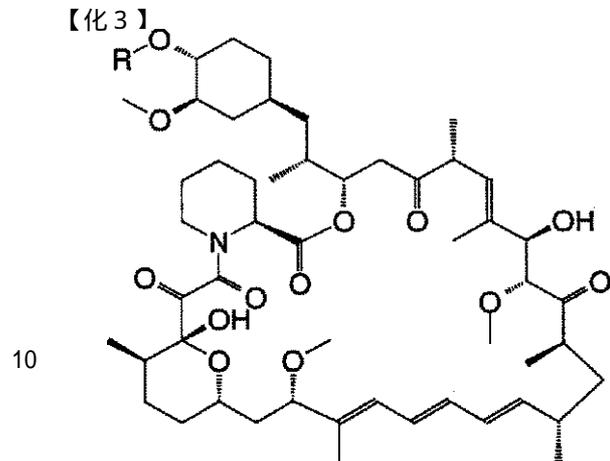
【化2】



## 反応II

〔式中、式Iはラパマイシンであり、例えば、より完全に下記実施例1に記載したように、それをa) DMA P およびピリジンの存在下、無水コハク酸を使用してO-アシル化し、式II'のラパマイシンヘミサクシネート(40-O-(3-カルボキシ)プロパノイル-ラパマイシン)を形成する；それを、次いでb) EDC、 $E t_3 N$  および $C H_2 C l_2$ の存在下、N-ヒドロキシサクシニミドで活性化して、式III'で示される40-O-サクシニミドオキシサクシニルラパマイシンを形成する。〕により製造される上記式III'のサクシニミド誘導体である。40位により結合しているこのようなハブテンを使用して製造したモノクローナル抗体は、通常ラパマイシンおよび上記のようなラパマイシンの40-O-誘導体と交差反応性である。このようなモノクローナル抗体は、下記に開示のように、下記のような例えばバインダードメインまたはエフェクタードメイン中のラパマイシンまたはラパマイシンの40-O-誘導体の特定の領域を認識する化合物に対して選択できる。

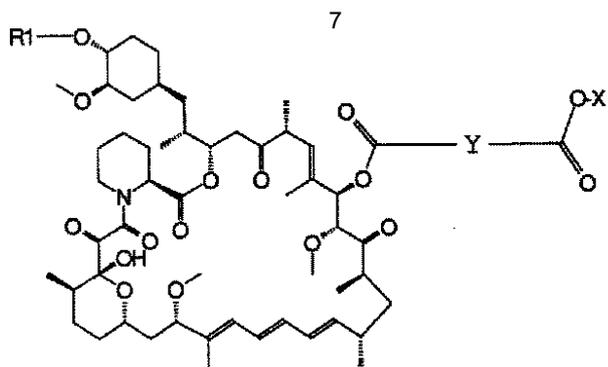
【0010】例えばラパマイシンと40-O-ラパマイシン誘導体を区別する、またはシクロヘキシル領域における代謝物を同定するシクロヘキシル領域の修飾に高い感受性を有するモノクローナル抗体を有するのが好ましい場合がある。このような場合、ハブテンは好ましくは40-O位置よりもむしろ28-O位置で結合している。例えば、式A：



## 【0011】式A

〔式中、RはO-保護基または所望により保護形であり得る上記の置換基、例えばヒドロキシアシルキル、ヒドロキシアシルアルコキシアシルキル、アシルアミノアルキルまたはアミノアルキルである。〕で示されるラパマイシン誘導体を、反応Iにしたがって反応させ、必要であれば脱保護し、例えば式B：

## 【化4】



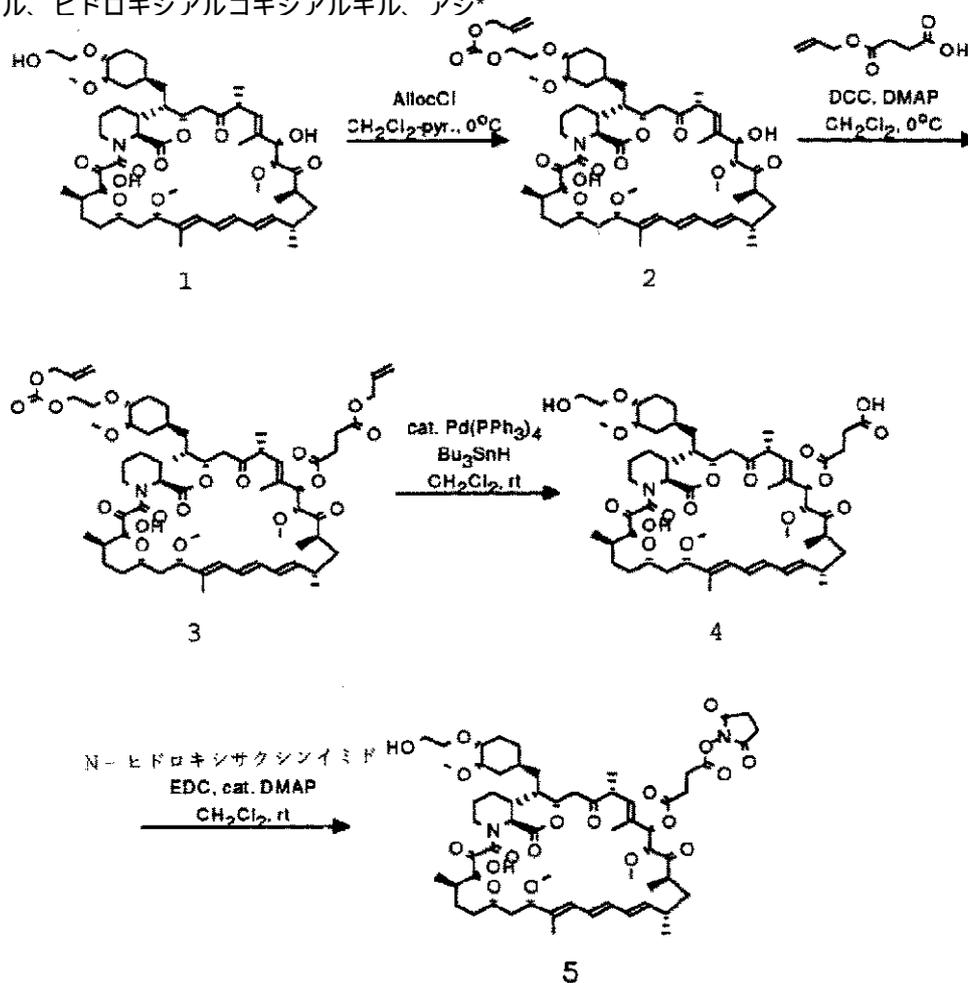
8

\*ルアミノアルキルまたはアミノアルキル、Yは上記のリンカー分子およびXは上記で定義のカルボキシ活性化基である。]で示される化合物である類いの28-O活性化ハプテンを得る。RがO-保護基またはO-保護置換基である本ハプテンの製造において、アシル化剤は、両方O-保護基の続くアシル化でカルボキシ活性化基を添加する1工程前に除去し得るように、所望により、例えばヘミ-O-保護形のジカルボン酸であり得る。例えば、40-O-(2-ヒドロキシエチル)-ラバマイシンの認識が可能なモノクローナル抗体の産生のためのハプテンは、例えば反応III:

式B

[式中、R1はHまたは上記のO-置換基、例えばヒドロキシアリル、ヒドロキシアリコキシアリル、アシ\*

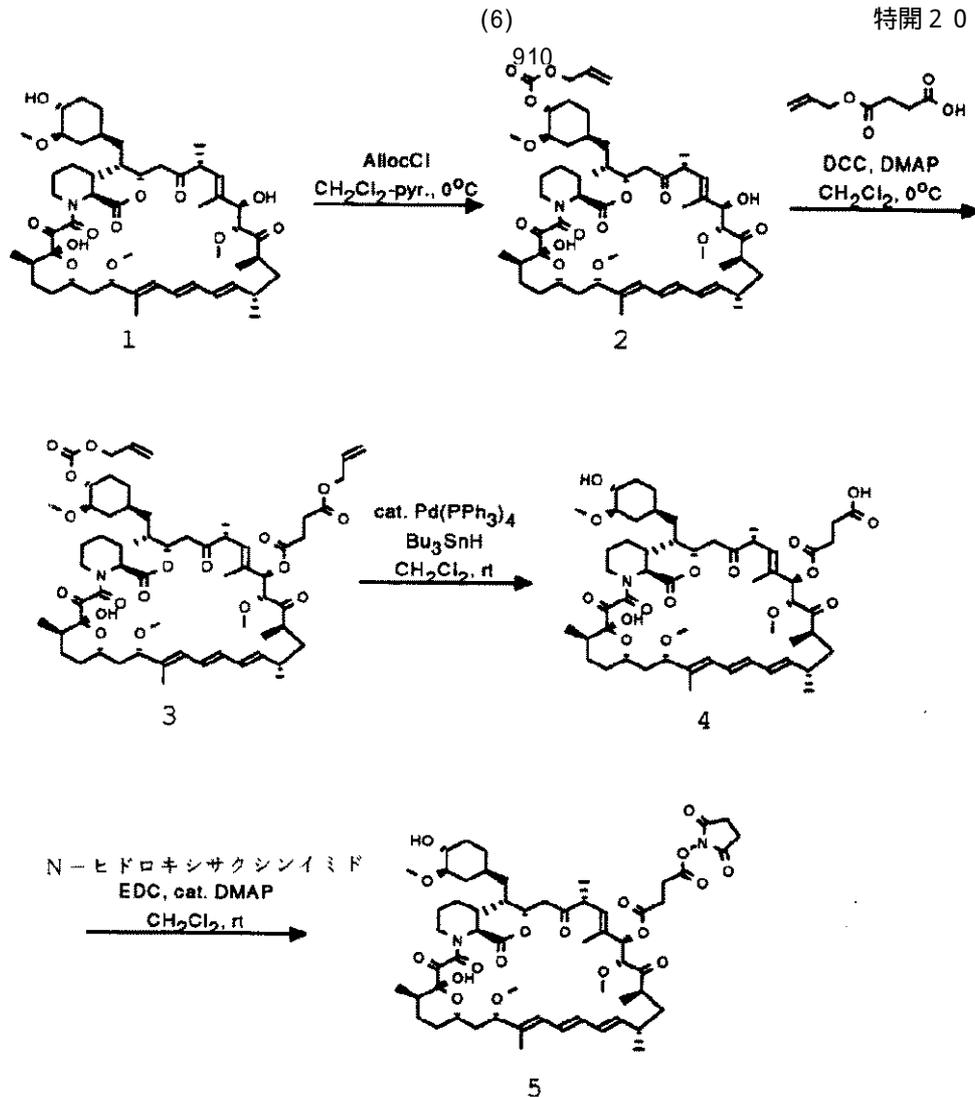
【化5】



反応IIIに従った、第1級ヒドロキシの保護、ヒドロキシのヘミ-O-保護形のジカルボン酸による28位のアシル化、脱保護およびカルボキシ基の活性化により製造できる。

【0012】同様に、ラバマイシンそれ自身は、例えば反応IV:

【化6】



反応IVに従って、C40ヒドロキシのO-保護、28位  
のヒドロキシ基のヘミ-O-保護ジカルボン酸によるア  
シル化、脱保護およびカルボキシ基の活性化により、4  
0-Oよりむしろ28-Oで活性化され得る。

【0013】活性化ラパマイシンまたはラパマイシン誘導  
体は、次いで好適な免疫原性タンパク質、例えばウシ血  
清アルブミン(BSA)、オブアルブミン(OVA)または  
キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)に結合し、  
免疫原性結合体を形成する。モノクローナル抗体は、既  
知の方法、例えば新規免疫原性結合体を好適な動物種に  
投与し、免疫原性チャレンジを行い、上記結合体に感作  
させた抗体産生細胞を回収する；上記抗体産生細胞を、  
好適なミエローマと融合させることにより不死化する；  
およびこのようにして確立した選択した不死化細胞系か  
らモノクローナル抗体を回収する：を使用して製造す  
る。

【0014】本発明の抗体は、次いで、好適な検定に使用  
し得る。当業者には、幾つかの可能性が明確であら  
う。一つの試みは、例えば、ラパマイシンを含む可能性  
があると信じられている試験溶液、例えば患者の血漿ま  
たは全血の存在下および非存在下で、マイクロタイター  
プレートを抗体で被覆し、標識(例えば、蛍光-または

放射-標識、特にビオチニル化)ラパマイシンである競  
合物質に暴露する、抗体およびラパマイシントレーサー  
を使用した競合検定である。プレートをすすぎ、抗体に  
結合している標識競合物質の量を測定し、その量は試験  
溶液中に存在するラパマイシンの量に反比例して変化す  
る。他の試みは、抗体、ラパマイシンタンパク質結合  
体、およびマウスIgGを認識する標識(例えば、酵素  
-標識)トレーサー抗体を使用し、例えばマイクロタイ  
タープレートをラパマイシン-タンパク質結合体(例え  
ば、ラパマイシンまたは40-O-アルキル化ラパマイ  
シンに結合したタンパク質を含む上記の免疫原性結合  
体)で被覆し、試験溶液の存在下または非存在下、抗体  
に暴露し、すすぎ、ラパマイシン結合体に結合する抗体  
を、ラパマイシン結合体に結合する抗体のトレーサー抗  
体の結合により検出する。再び、結合抗体の量は、試験  
サンプル中のラパマイシンの量に反比例して変化する。  
いずれの場合も、検定は既知の濃度のラパマイシンを含  
む試験溶液で標準化する。(i)好ましくは凍結乾燥形ま  
たはマイクロタイタープレート上に被覆させた本発明の  
モノクローナル抗体を含み、および(ii)所望によりプレ  
ートに被覆した形のラパマイシンタンパク質結合体およ  
び/または標識ラパマイシン誘導体のいずれかを所望に

よりまた含み、および(iii)標準化のためのラパマイシン溶液および使用説明書を所望により更に含む検定キットが従って提供される。このようなキットは、10 ng/ml以下、例えば1 ng/ml以下、例えば0.25 - 0.5 ng/mlほど低い濃度でラパマイシンを検出できる。

【0015】本発明の抗体は、更に免疫抑制性アスコマイシン、例えばFK-506への相対的結合親和性により、更に特徴付得る。FK-506は結合ドメインでラパマイシンに幾つかの構造類似性を有する免疫抑制マクロライドである。ラパマイシン(例えば、ラパマイシンおよびその免疫抑制誘導体)およびFK-506の両方もマクロフィリン(FKBP)に結合し、両方のために、免疫抑制活性のために、マクロフィリン結合が必要であるが、十分な基準ではないと信じられている。しかしながら、ラパマイシンのエフェクター領域は、FK-506のものとは非常に異なり、実際、2個の化合物は全く異なる活性機構を有する。(例えば、FK-506は主にIL-2転写抑制により免疫抑制するように思え、一方ラパマイシンは明確にIL-2転写への効果はない。)ラパマイシンは、従ってFKBP結合ドメインおよびエフェクタードメインを有することにより特徴付けられ、FKBP結合ドメインが修飾されたラパマイシン代謝物およびエフェクタードメインが修飾されたものの間の区別ができる。この区別は、本発明のモノクローナル抗体により、本発明のモノクローナル抗体とFK-506の間の交差反応性(交差反応性は、例えば競合ELISAにより測定する)を測定することによりなすことができる：高い(例えば50%以上)交差反応性を有するモノクローナル抗体は、FK-506と類似のラパマイシンのFKBP結合ドメインのエピトープを認識する；低い交差反応性(例えば20%以下、最適には10%以下)のモノクローナル抗体は、ラパマイシンに独特のエフェクター領域のエピトープを認識する。

【0016】本発明の抗体は、ラパマイシンおよびラパマイシンの4-O-誘導体を、例えば上記のように区別できる能力によりスクリーニングおよび特徴付できる。ラパマイシンおよびラパマイシンの4-O-誘導体の区別をしない抗体が望ましい場合、抗体は、少なくとも70%、好ましくは90%以上、ラパマイシンおよびその4-O-誘導体と交差反応性を示すものを選択する。このような場合、モノクローナル抗体の製造に使用するハプテンは、好ましくは、例えば反応Iの式IIIの4-O-活性化ラパマイシンである。ラパマイシンおよびラパマイシンの4-O-誘導体または代謝物の区別が望ましい場合、抗体は、30%以下、好ましくは10%以下のそれらに対する交差反応性を有するものを選択する。この場合、抗体の製造に使用するハプテンは、好ましくは例えば、28-O-活性化ラパマイシンまたは式Bのラパマイシン誘導体である。

【0017】実施例1-4-O-活性化ラパマイシン

の製造

a) ラパマイシンの4-O-ヘミサクシネートの製造  
ピリジン12ml中のラパマイシン1.5g(1.64mmol)および無水コハク酸0.577g(5.77mmol)の攪拌した溶液に、DMA P 195mg(1.64mmol)を加える。得られた混合物を環境温度で19時間攪拌し、減圧下濃縮する。残渣を酢酸エチルに溶解し、3回水で洗浄する。有機溶液を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、減圧下濃縮する。残渣を9:1CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOHを使用したシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製する。予期される生産物を含むフラクションを合わせ、もう1回19:1CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOHを使用したシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、減圧下で溶媒を除去した後、4-O-(3-カルボキシ)プロパノイル-ラパマイシン(前記式II'のラパマイシンヘミサクシネート)が白色泡状物として提供され、下記の特異的スペクトル特性を示す：

【0018】<sup>1</sup>H NMR(CDC l<sub>3</sub>) 2.68(7H, m, H33, H25およびO<sub>2</sub>CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H), 3.14(3H, sおよびm, OCH<sub>3</sub>およびH39), 3.34(3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.38(3H, s, OCH<sub>3</sub>), 4.68(1H, m, H40), 4.72(1H, ブロードs, 10-OH); MS(FAB)m/z 1036([M+Na]<sup>+</sup>), 982([M-CH<sub>3</sub>O]<sup>+</sup>), 964([M-(CH<sub>3</sub>O+H<sub>2</sub>O)]<sup>+</sup>), 946([M-(CH<sub>3</sub>O+2H<sub>2</sub>O)]<sup>+</sup>)。

【0019】b) 4-O-サクシイミドオキシサクシニル-ラパマイシンの製造

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 8ml中の工程a)のラパマイシンヘミサクシネート120mg(0.118mmol)、Et<sub>3</sub>N 16.5μl(0.118mmol)およびEDC 22.7mg(0.118mmol)の攪拌した溶液に、N-ヒドロキシサクシイミド13.6mg(0.118mmol)を加える。得られる混合物を18時間室温で攪拌し、酢酸エチルで希釈し、2回水で洗浄する。有機溶液を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、減圧下濃縮する。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル)で精製し、4-O-サクシイミドオキシサクシニル-ラパマイシ(即ち、前記反応IIの式III'で示される化合物)を白色泡状物として得、以下の特異的スペクトル特性を示す：

【0020】<sup>1</sup>H NMR(DMSO) 2.67(2H, t, O<sub>2</sub>CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>), 2.81(7H, s, CH<sub>3</sub>OおよびサクシイミドCH<sub>2</sub>), 2.92(2H, t, O<sub>2</sub>CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>), 4.55(1H, m, H40), 5.26(1H, d, 28-OH), 6.43(1H, s, 10-OH); MS(FAB)m/z 1133([M+Na]<sup>+</sup>), 1111([M+H]<sup>+</sup>), 1092([M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>), 1079([M-CH<sub>3</sub>O]<sup>+</sup>), 1061([M-(CH<sub>3</sub>O+H<sub>2</sub>O)]<sup>+</sup>), 1043([M-(CH<sub>3</sub>O+2H<sub>2</sub>O)]<sup>+</sup>)。

【0021】実施例2-ラパマイシンの28-O-活性

化40-O-誘導体の製造

a) 40-O-(2-ヒドロキシエチル)-ラパマイシンの28-O-ヘミサクシネート

10 : 1塩化メチレン-ピリジン2.2ml中の40-O-(2-ヒドロキシエチル)-ラパマイシン958mg(1.00mmol)の攪拌した冷却(0 )溶液に、アリルクロロギ酸0.160ml(1.50mmol)を加える。攪拌を0 で続け、ピリジン0.080ml(1.00mmol)およびアリルクロロギ酸各0.053ml(0.50mmol)を2回それぞれ3および4時間後に加える。試薬の最後の添加の後、攪拌を更に1時間続け、反応を1M水性炭酸水素ナトリウムで停止させる。得られる混合物を3回酢酸エチルで抽出する。有機相を連続して1N水性塩酸、1N水性炭酸水素ナトリウムおよび飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過して減圧下濃縮する。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(50 : 50ヘキサン-酢酸エチル)で精製し、アリルオキシカルボニル保護化合物(上記反応IIIの式2)が白色泡状物として得られる。

【0022】塩化メチレン2ml中の本生産物208mg(0.200mmol)の攪拌した冷却(0 )溶液に、DMA P 2.4mg(0.020mmol)およびDCC 82mg(0.400mmol)、続けて塩化メチレン0.5ml中のモノアリルサクシネート63mg(0.400mmol)の溶液を加える。反応混合物を0 で14時間攪拌し、得られた懸濁液をフリットガラス漏斗で濾過した。有機溶液を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(30 : 70ヘキサン-酢酸エチル)で精製し、白色泡状物として生産物を得る(上記反応IIIの式3)。

【0023】塩化メチレン5ml中の本生産物177mg(0.150mmol)の攪拌した溶液に、テトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム17.3mg(0.015mmol)およびトリブチリンハイドライド0.080ml(0.3mmol)を加える。黄色溶液を2時間環境温度で攪拌し、酢酸エチルで希釈し、1回冷2N水性クエン酸および3回飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、減圧下濃縮する。シリカゲルカラムクロマトグラフィー(85 : 15酢酸エチル-メタノール)は、ヘミサクシネート(反応IIIの式4)を薄黄色油状物として提供する。

【0024】b) 28-O-サクシンイミドオキシサクシニル-40-O-(2-ヒドロキシエチル)-ラパマイシン

塩化メチレン2.5ml中の工程a)のヘミサクシネート53mg(0.050mmol)の溶液を、DMA P 2mg、EDC 24mg(0.125mmol)およびN-ヒドロキシサクシンイミド14mg(0.125mmol)で処理する。2時間環境温度で攪拌した後、反応を1N水性炭酸水素ナトリウムで停止する。混合物を3回酢酸エチルで抽出する。有機溶液を水性炭酸水素ナトリウムおよび食塩水で洗浄

し、無水炭酸水素ナトリウムで乾燥し、濾過し、濃縮して標題活性化ハプテン(反応IIIの式5で示される化合物)を得、それを更に精製することなく、タンパク質-ハプテン結合体の製造に使用し、以下の特異的スペクトル特性を示す：

【0025】<sup>1</sup>H NMR(CDC l<sub>3</sub>) 2.43(1H, dd, H33a), 2.50-2.98(10H, m, H25, H33b, サクシネート水素, サクシンイミド水素), 3.58(2H, m, H6b, 1ヒドロキシエチルH), 3.68(3H, m, H16, 2ヒドロキシエチルH), 3.81(2H, m, H14, 1ヒドロキシエチルH), 3.93(1H, d, H27), 5.28(2H, m, H2, H30), 5.34(1H, d, H28); MS(FAB) 1161([M+L i]<sup>+</sup>)。

【0026】実施例3-28-O-活性化ラパマイシンの製造

a) ラパマイシンの28-Oヘミサクシネート

10 : 1塩化メチレン-ピリジン2.2ml中のラパマイシン914mg(1.00mmol)の攪拌した冷却(0 )溶液に、クロロギ酸アリル0.212ml(2.00mmol)を加える。3時間後、ピリジン0.080ml(1.000mmol)およびクロロギ酸アリル0.053ml(0.50mmol)を加える。攪拌を更に1時間続け、反応を1M水性炭酸水素ナトリウムで停止する。得られる混合物を3回メチル-t-ブチルエーテルで抽出する。有機溶液を連続して冷1N水性塩酸、1N水性炭酸水素ナトリウムおよび飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、減圧下濃縮する。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(70 : 30ヘキサン-酢酸エチル)で精製し、アリルオキシカルボニル保護化合物(反応IVの式2)が白色泡状物として得られる。

【0027】塩化メチレン5ml中の本生産物400mg(0.400mmol)の攪拌した冷却(0 )溶液にDMA P 4.8mg(0.040mmol)およびDCC 164mg(0.800mmol)、続いて塩化メチレン1ml中のモノアリルサクシネート127mg(0.800mmol)の溶液を加える。反応混合物を-15 で14時間攪拌し、得られた懸濁液をフリットガラス漏斗で濾過する。有機溶液を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(40 : 60ヘキサン-メチル-t-ブチルエーテル)で精製し、反応IVの式3を白色泡状物として得る。

【0028】塩化メチレン5ml中の本生産物285mg(0.250mmol)の攪拌した溶液に、テトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム28.8mg(0.025mmol)およびトリブチルチンハイドライド0.133ml(0.5mmol)を加える。黄色溶液を1時間環境温度で攪拌し、メチル-t-ブチルエーテルで希釈し、冷2N水性クエン酸および3回飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、減圧下濃縮する。シリカゲルカラムクロマトグラフィー(90 : 10-60 : 40メ

チル - t - ブチルエーテル - メタノール)により、薄黄色油状物として28 - O - ラパマイシンヘミサクシネート(反応IV、式4の化合物)が得られる。

【0029】b) 28 - O - サクシンイミドオキシサクシニル - ラパマイシン

塩化メチレン2ml中の工程a)の生産物51mg(0.050mmol)の溶液をDMAP2mg、EDC24mg(0.125mmol)およびN - ヒドロキシサクシンイミド14mg(0.125mmol)で処理する。4時間環境温度で撹拌した後、反応を1N水性炭酸水素ナトリウムで停止する。混合物をメチル - t - ブチルエーテルで3回抽出する。有機溶液を水性炭酸水素ナトリウムおよび食塩水で洗浄し、無水炭酸水素ナトリウムで乾燥し、濾過し、濃縮して、活性化標題混合物を得、それを更に精製することなくタンパク質 - ハプテン結合体の製造に使用し、それは以下の特異的スペクトル特性を示す：

【0030】<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>) 2.43(1H, dd, H33a), 2.55 - 3.02(11H, m, H25, H33b, H39, サクシネート水素、サクシンイミド水素), 3.56(1H, m, H6b), 3.68(1H, dd, H16), 3.83(1H, m, H14), 3.93(1H, d, H27), 5.28(2H, m, H2, H30), 5.34(1H, d, H28); MS(FAB)1117([M+Li]<sup>+</sup>)。 20

【0031】実施例4 - 免疫原性結合体の製造

a) 40 - O - 架橋ラパマイシン結合体

実施例1の40 - O - 活性化ラパマイシン17.4mgをDMFまたはDMSO400μlに溶解する。本溶液120μl(即ち活性化ラパマイシン5.22mgを含む)を0.1M NaHCO<sub>3</sub>緩衝液(pH7.7)2ml中のKLH8mgを含む激しく撹拌した溶液に滴下する。反応混合物を室温で2時間撹拌し、得られるラパマイシン - KLH結合体を4でPBS5l、3×に対して48時間にわたって透析して精製する。本結合体を、所望により、マイクロコンセンレーター管を使用した遠心により更に濃縮する。ラパマイシン - BSAおよびラパマイシン - OVA結合体は、上記方法のKLHをそれぞれBSAおよびOVAに変えて同様の方法で製造する。 30

【0032】b) 28 - O - 架橋(所望により40 - O - アルキル化)ラパマイシン結合体

実施例2の28 - O - 活性化化合物5mgをDMSO2mlに溶解し、50mMリン酸緩衝液(pH7.3)1ml中のKLH5mgを含む激しく撹拌した溶液に滴下する。反応混合物を室温で2時間撹拌し、得られる結合体を4でPBS2l、3×に対して48時間にわたって透析して精製する。BSAおよびOVAとの結合体は、同様の方法で製造する。実施例3の28 - O活性化化合物を使用して、同様の方法に従って、ラパマイシンはKLH、BSAおよびOVAと28位で結合する。 40

【0033】実施例5 - モノクローナル抗体の製造

a) ラパマイシンに対するモノクローナル抗体

モノクローナル抗体を、本質的にケーラーおよびミルス・タインら、Nature256:49に記載の方法に従って既知の技術を使用して、製造する。雌Balb/Cマウス(20 - 25g)は、各々、フロインド完全アジュバント0.2ml中の実施例4a)の40 - O - 架橋ラパマイシン - KLH免疫原性結合体10または50μgを、4カ所に皮下注射により投与される。2週間後、フロインド不完全アジュバント0.2mlに乳化した同量の免疫原性結合体を含む2回目のブースター注射を、再び皮下注射により投与する。動物血清中の抗原に対して反応性の抗体の存在は、下記実施例6に記載の直接ELISAにより確認する。マウスは、所望により、エフェクター領域(FK - 506との低い交差反応性)およびFKBP結合領域(FK - 506との高い交差反応性)に対する抗体について更に選択し得る。例えば、図1は、ラパマイシン結合ドメインに対する高濃度の抗体を有するマウス(M1)およびエフェクタードメインに対する相対的に高い濃度の抗体を有する他のマウス(M7)の力価曲線を示す。好適な特異性の抗体の最大血清濃度を示すマウスは、抗原10μgを半分腹腔内および半分静脈内で - 3日、静脈内で - 2日および - 1日にブースター注射を受ける。0日において、マウスを屠殺し、その脾臓細胞を単離し、PAI - 0細胞または他の好適なミエローマ系と融合する。得られるハイブリドーマを培養し、ELISAを使用して、ラパマイシンに高親和性を有する抗体の発現について選択する。 50

【0034】b) 40 - (ヒドロキシエチル) - ラパマイシンに対するモノクローナル抗体

雌Balb/Cマウスは、フロインド完全アジュバント0.2ml中の40 - (ヒドロキシエチル) - ラパマイシンKLH免疫原性結合体10または50μgを、皮下注射により4カ所に投与される。2週間後、フロインド不完全アジュバント0.2mlに乳化した同量の免疫原性結合体を含む2回目の注射(ブースター)を、再び皮下注射により投与する。動物血清中の抗原に対して反応性の抗体の存在を、下記の直接ELISAにより試験する。加えて、マウスは、BSA - 40 - O - (2 - ヒドロキシエチル) - ラパマイシンの結合体よりもBSA - ラパマイシンの結合体に結合することにより40 - O領域が修飾されたラパマイシン分子の領域に対する抗体を選択し得る。40 - O - (2 - ヒドロキシエチル) - ラパマイシン結合体に結合するが、ラパマイシン結合体に結合しない抗体および40 - O - (2 - ヒドロキシエチル) - ラパマイシンおよびラパマイシン結合体の両方に結合する抗体の両方が得られる。好適な特異性の抗体の最大血清濃度を示すマウスは、抗原10μgを半分腹腔内および半分静脈内で、 - 3日、静脈内で - 2日および - 1日にブースター注射を受ける。0日において、マウスを屠殺し、その脾臓細胞を単離し、PAI - 0細胞と融合する。得られるハイブリドーマを培養し、ELISAを使用し

て、40-O-(2-ヒドロキシエチル)-ラパマイシンに高親和性を有する抗体の発現について選択する。

【0035】実施例6-固相酵素免疫測定法(ELISA)

a)ラパマイシンのELISA

マイクロタイタープレートを、PBS中の1-2 $\mu$ g/mlラパマイシン-BSA結合体で2時間37 $^{\circ}$ Cで被覆し、次いでPBS中の2%BSAで飽和し、0.05%ツイン-PBSで3 $\times$ 洗浄する。スクリーニングすべきハイブリドーマ上清をPBS中の1%BSA溶液で希釈し、一晩室温(または18時間4 $^{\circ}$ Cまたは37 $^{\circ}$ C 2時間)でインキュベーションする。結合抗体の濃度を、基質としてのパラ-ニトロフェニルホスフェートと一緒にアルカリホスファターゼが結合した抗-マウスIgGヤギグロブリンにより測定する。37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベーションした後、酵素基質を加水分解(1時間室温)し、405nmの吸光度を測定する。ハイブリドーマを、高親和性モノクローナル抗体の産生に対して選択する。

【0036】選択した抗体のラパマイシンに対する相対的親和性を決定するための標準曲線は、既知の濃度のラパマイシン(例えば、血清中1から140ng/ml)を含む溶液を使用して調製する。例えば、図2は、我々のモノクローナル抗体M7-91の標準曲線を示し、ラパマイシンに非常に特異的であるとして選択したモノクローナル抗体が、濃度が0.25ng/mlほど低くてもラパマイシンを検出可能であることを証明する。

【0037】抗体は、更に、ラパマイシン-BSA結合体と同様に製造できるFK-506-BSA結合体で被覆したマイクロタイタープレートをを使用した類似の直接ELISAでFK-506との交差反応性を測定することにより、ラパマイシンのエフェクターまたはFKBP結合ドメインに結合するものとして特徴付け得る。例えば、17個の選択したモノクローナル抗体のラパマイシン-BSAおよびFK-506検定における比較を図3に示す;パーセントとしての交差反応性は図4に示す。このラパマイシン-BSA対FK-506-BSAの結合の比較において、非常に低い親和性のモノクローナル抗体が検出される。

【0038】上記の直接ELISAは、コンペティターを、モノクローナル抗体溶液に加え、競合物質存在下および非存在下でのモノクローナル抗体の結合体への結合を測定する競合的ELISAに変え得る。競合物質がFK-506またはラパマイシンである場合、例えば1mg/mlのエタノール性溶液中の競合物質をモノクローナル抗体溶液に直接加え(例えば2 $\mu$ l/200 $\mu$ l/ウェル)、マイクロタイタープレート中で更に希釈する。例えば図5は、異なった濃度の遊離ラパマイシンの存在下でのM7-91抗体(M7.91.13)のBSA-ラパマイシンへの結合の阻害曲線を示す。このようなモノクローナル抗体の遊離FK-506対遊離ラパマイシンへの

結合を比較する競合的ELISAにおいて、ラパマイシンおよびFK-506の間の直接ELISAよりも低い交差反応性が見られる。あるモノクローナル抗体が、遊離形のその抗原に結合するには低すぎる親和性を有するが、それにもかかわらず巨大タンパク質分子上で違いに緊密に近接して結合した多くのハプテンから成る多量体抗原への二価または多価結合を示すと信じられているため、このような競合的検定はモノクローナル抗体の選択に好ましい。競合的検定は、このような低親和性抗体を除外する。このような競合的検定の結果を図6に示し、それは、相対的に低い交差親和性を有するM7-91抗体(M7.91.13)と、相対的に高い交差反応性を有するM1-303(M1.303.3)を比較する。

【0039】b)40-O-(2-ヒドロキシエチル)-ラパマイシンのELISA

本ELISAは、a)に記載の方法と同様に行う。マイクロタイタープレートをマイクロタイタープレートを、40-O-(2-ヒドロキシエチル)-ラパマイシン-BSAで被覆し、次いでBSAで飽和し、洗浄する。スクリーニングすべきハイブリドーマ上清を18時間4 $^{\circ}$ C、または2時間37 $^{\circ}$ Cでインキュベーションする。結合抗体の濃度を、基質としてのパラ-ニトロフェニルホスフェートを伴ったアルカリホスファターゼが結合した抗-マウスIgGヤギグロブリンで測定する。平衡ELISAを、結合ラパマイシン-BSAを使用して行い、40-O-(2-ヒドロキシエチル)-ラパマイシンをラパマイシンと分けることができるモノクローナル抗体を選択する。例えば図7は、40-O-(2-ヒドロキシエチル)-ラパマイシン-BSA(図中ではBSA-28-RADと呼ぶ)へ特異的に結合するハイブリドーマB3-203(図7A)、40-O-(2-ヒドロキシエチル)-ラパマイシン-BSAおよびラパマイシン-BSA結合体を28位により認識するハイブリドーマB3-113(図7B)および加えて40位によりBSAに結合したラパマイシンを認識するハイブリドーマB3-164(図7C)の上清を示す。

【0040】抗体の40-O-(2-ヒドロキシエチル)-ラパマイシン対ラパマイシンへの相対的親和性を、被覆40-O-(2-ヒドロキシエチル)-ラパマイシン-BSA結合体の、溶液中の40-O-(2-ヒドロキシエチル)-ラパマイシンまたは遊離ラパマイシンへの結合を比較して更に測定する。例えば、図8は、ラパマイシンと低い交差反応性で40-O-(2-ヒドロキシエチル)-ラパマイシンと強く反応するハイブリドーマB3-203により産生された抗体(図8A)および40-O-(2-ヒドロキシエチル)-ラパマイシンおよびラパマイシンと同等に結合するハイブリドーマB3-113およびB3-164により産生された抗体(図8Bおよび8C)を示す。ラパマイシンと比較して、少なくとも10-100倍40-O-(2-ヒドロキシエチル)-ラ

パマイシンに結合する抗体を産生する他のハイブリドーマは、B3-22、B3-127およびB3-156を含む。B3-29、B3-265およびB3-539のような他のハイブリドーマは、ラパマイシンおよび40-O-(2-ヒドロキエチル)-ラパマイシンに結合する抗体を産生する。

【0041】一度所望の抗体を選択したら、同じELISAを使用して、患者のラパマイシンの血中濃度を測定する。本実施例の検定キットは、凍結乾燥形の1個またはそれ以上の選択した抗体、ラパマイシン結合体(例えばラパマイシン-BSA結合体または40-O-(2-ヒドロキエチル)-ラパマイシン-BSA結合体)で被覆したマイクロタイタープレート、ラパマイシン標準および使用説明書を提供する。所望により、キットは、競合検定に使用するための標識ラパマイシン誘導体を更に含む。上記のような抗-マウスIgG-酵素結合体および基質は、付加的に提供され得る。別法として、消費者は、本発明のモノクローナル抗体を、彼ら自身が確立したELISAまたは他の検定系中で使用し得る。

【図面の簡単な説明】

【図1】 ラパマイシン結合ドメインに対する高濃度の抗体を有するマウス(M1)およびエフェクタードメインに対する相対的に高い濃度の抗体を有する他のマウス(M7)の力価曲線を示すグラフである。

【図2】 我々のモノクローナル抗体M7-91の標準曲線を示すグラフである。

【図3】 17個の選択したモノクローナル抗体のラパ

マイシン-BSAおよびFK-506検定における比較を示すグラフである。

【図4】 17個の選択したモノクローナル抗体のラパマイシン-BSAおよびFK-506検定における比較を図3に示す；パーセントとしての交差反応性を示すグラフである。

【図5】 異なった濃度の遊離ラパマイシンの存在下でのM7-91抗体(M7.91.13)のBSA-ラパマイシンへの結合の阻害曲線を示すグラフである。

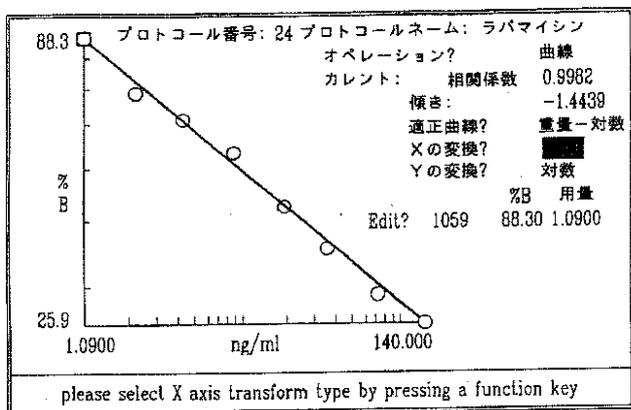
【図6】 競合的検定の結果を示すグラフである。

【図7】 40-O-(2-ヒドロキエチル)-ラパマイシン-BSA(図中ではBSA-28-RADと呼ぶ)へ特異的に結合するハイブリドーマB3-203(図7A)、40-O-(2-ヒドロキエチル)-ラパマイシン-BSAおよびラパマイシン-BSA結合体を28位により認識するハイブリドーマB3-113(図7B)および加えて40位によりBSAに結合したラパマイシンを認識するハイブリドーマB3-164(図7C)の上清の吸光度を示すグラフである。

【図8】 ラパマイシンと低い交差反応性で40-O-(2-ヒドロキエチル)-ラパマイシンと強く反応するハイブリドーマB3-203により産生された抗体(図8A)および40-O-(2-ヒドロキエチル)-ラパマイシンおよびラパマイシンと同等に結合するハイブリドーマB3-113およびB3-164により産生された抗体(図8Bおよび8C)の相対的親和性を示すグラフである。

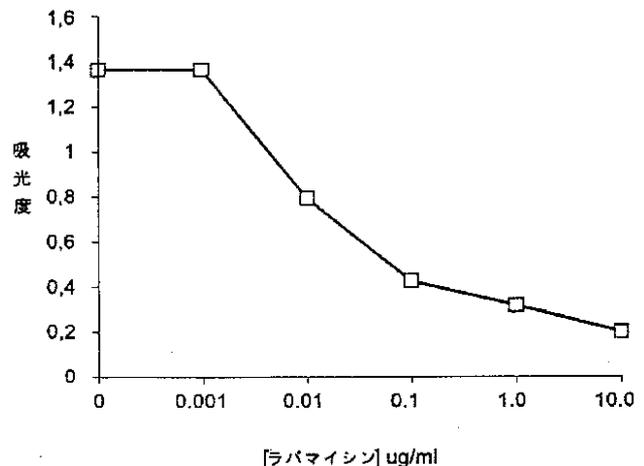
【図2】

FIG. 2



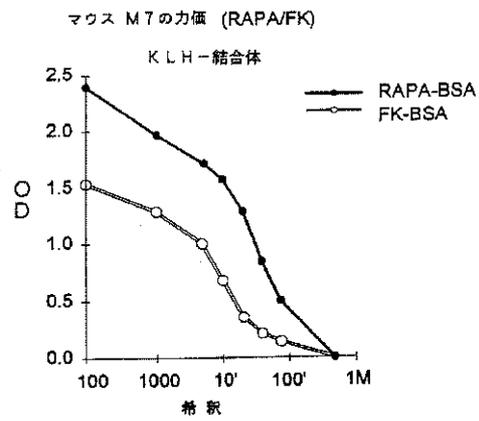
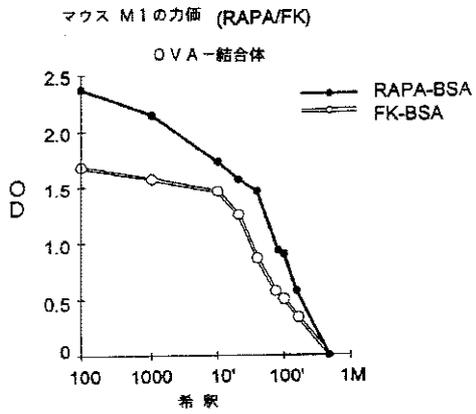
【図5】

FIG. 5



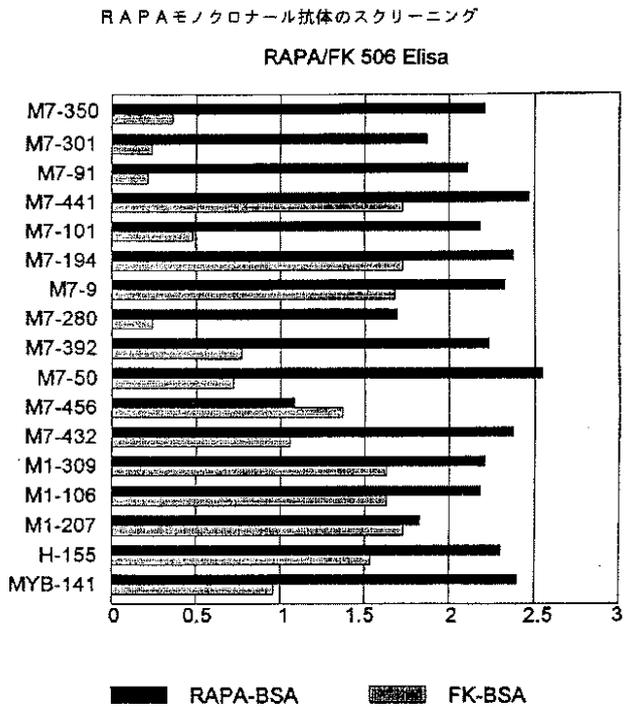
【図1】

FIG. 1



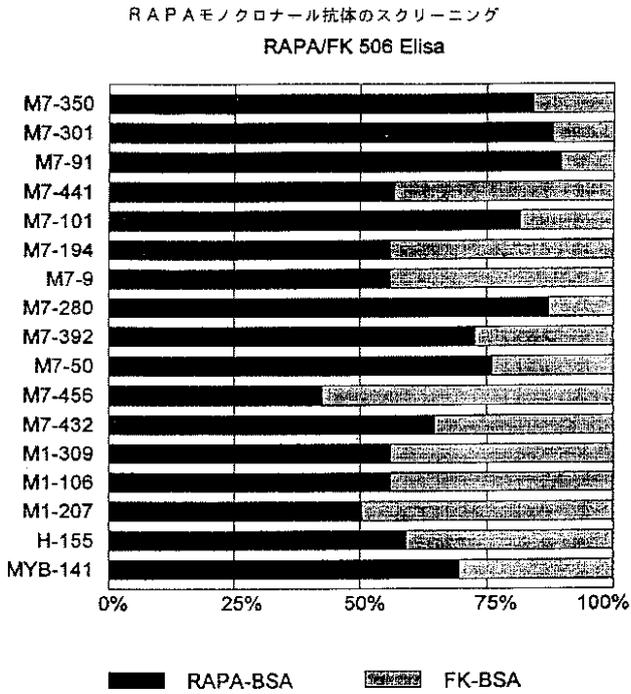
【図3】

FIG. 3



【図4】

FIG. 4

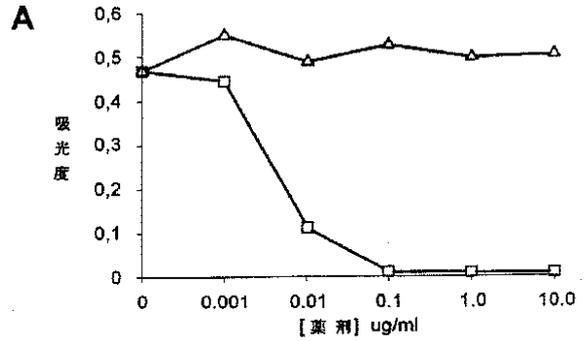


【図6】

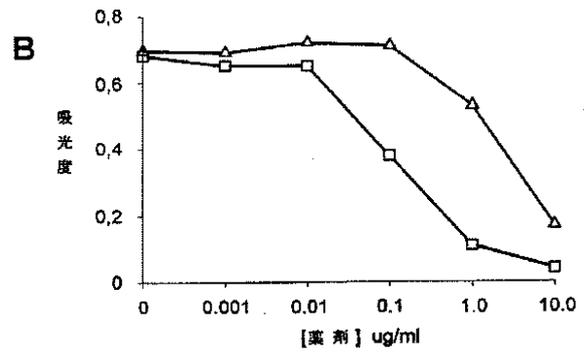
FIG. 6

ラバマイシン(□) 対 FK 506 (△) 競合ELISAにおけるmAbsのラバマイシンへの特異性

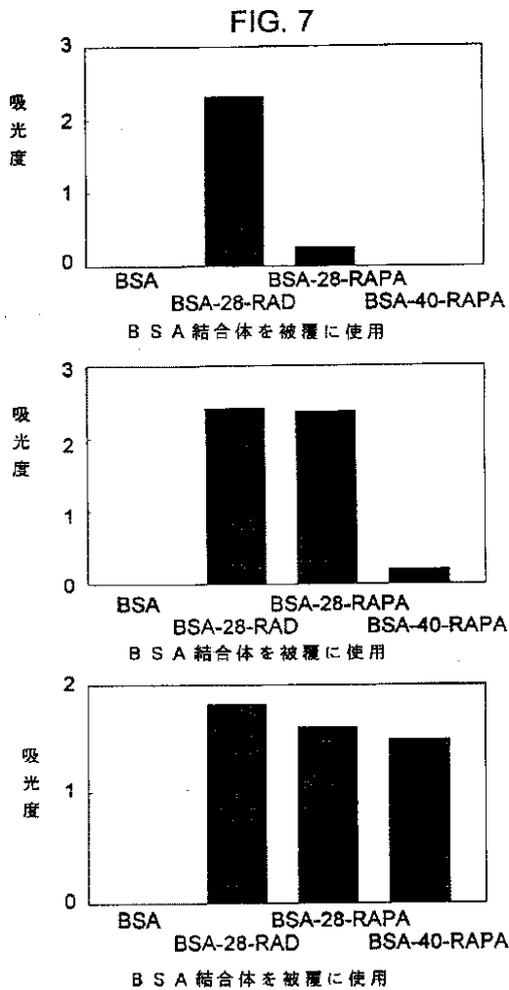
MAb M7.91.13



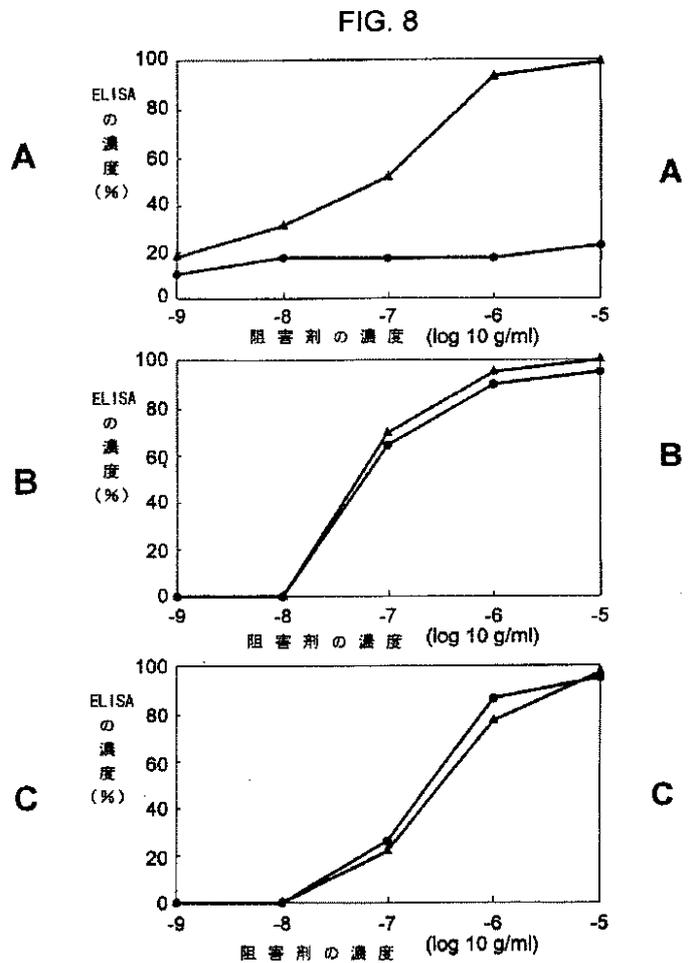
MAb M1.303.3



【図7】



【図8】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テーム(参考)

G 0 1 N 33/577

C 1 2 N 15/00

C

// C 1 2 P 21/08

5/00

B

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA53 GA03 HA15  
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13  
 4B065 AA92X AB05 AC14 BA08  
 CA25 CA46  
 4H045 AA11 BA50 DA76 EA50 FA72

专利名称(译)	雷帕霉素测定		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003024065A</a>	公开(公告)日	2003-01-28
申请号	JP2002130451	申请日	2002-05-02
[标]申请(专利权)人(译)	瑞士商诺华公司		
申请(专利权)人(译)	诺华股份公司		
[标]发明人	ヴァレリケスニオ リハルトセドラニ		
发明人	ヴァレリケスニオ リハルトセドラニ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/385 A61K39/395 C07K16/12 C07K16/14 C07K16/44 C12N5/10 C12N15/02 C12N15/09 C12P21/08 C12R1/91 G01N33/577		
CPC分类号	C07K16/1292		
FI分类号	C07K16/44 G01N33/53.G G01N33/577.B C12P21/08 C12N15/00.A C12N15/00.C C12N5/00.B C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/GA03 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/BA50 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72		
优先权	1993007491 1993-04-08 GB		
其他公开文献	JP4287619B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供雷帕霉素的单克隆抗体。 解决方案：a) 使具有活化结合基团的雷帕霉素与免疫原性蛋白质反应以产生免疫原性结合物，并且b) 将免疫原性结合物施用于合适的动物物种，并制备免疫原。 进行性挑战，回收对结合物敏感的抗体产生细胞，c) 使抗体产生细胞永生化和，和d) 从如此建立的永生细胞系中回收单克隆抗体：它可以通过单克隆抗体来解决

