

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-249090

(P2006-249090A)

(43) 公開日 平成18年9月21日(2006.9.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
CO7K 14/77 (2006.01)	CO7K 14/77	4H045
CO7K 14/435 (2006.01)	CO7K 14/435	
CO7K 14/765 (2006.01)	CO7K 14/765	
CO7K 16/12 (2006.01)	CO7K 16/12	

審査請求 有 請求項の数 5 O L (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2006-79344 (P2006-79344)	(71) 出願人	597011463
(22) 出願日	平成18年3月22日 (2006.3.22)		ノバルティス アクチエンゲゼルシャフト
(62) 分割の表示	特願2002-130451 (P2002-130451) の分割		スイス国、4056 バーゼル、リヒトシ ユトラーセ 35
原出願日	平成6年3月30日 (1994.3.30)	(74) 代理人	100062144
(31) 優先権主張番号	9307491.2		弁理士 青山 稔
(32) 優先日	平成5年4月8日 (1993.4.8)	(74) 代理人	100067035
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 岩崎 光隆
		(72) 発明者	ヴァレリ・ケスニオ
			スイス国ツューハー4123アルシュヴ イル、シュツェンヴェーク7番
		(72) 発明者	リヒャルト・セドラニ
			スイス国ツューハー4054バーゼル、 ヘレングラーベンヴェーク15番
		Fターム(参考)	4H045 AA11 BA10 BA51 CA40 DA76 DA86 EA20 EA50 FA50 GA15

(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。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫原性タンパク質と、活性化結合基を有するラパマイシンを反応させることにより得られる、抗体の産生に有用な免疫原性結合体。

【請求項 2】

免疫原性タンパク質がウシ血清アルブミン、オブアルブミンおよびキーホールリンペットヘモシアニンからなる群から選択される、請求項 1 に記載の免疫原性結合体。

【請求項 3】

活性化結合基が式 - C O - O - X (ここで、X はカルボキシ活性基である。)、式 - S - S - Z (ここで、Z はジチオ活性化基である。)、またはエポキシ基である、請求項 1 または 2 に記載の免疫原性結合体。

10

【請求項 4】

活性化結合基がラパマイシンの 28 位に結合している、請求項 1 に記載の免疫原性結合体。

【請求項 5】

活性化結合基を有するラパマイシンが 28 - O - (サクシンイミドオキシサクシニル) - ラパマイシンである、請求項 1 に記載の免疫原性結合体。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

20

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】

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。

30

【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 0 4 1 7 9 5 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。WO 9 2 / 0 2 9 4 6 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。

40

【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けられていないため、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】

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応答して産生される。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

50

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C₁₋₆アルキル、好ましくはC₁₋₃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。

10

【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、作用し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-サクシンイミドのようなカルボキシ活性基である。)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ii)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。

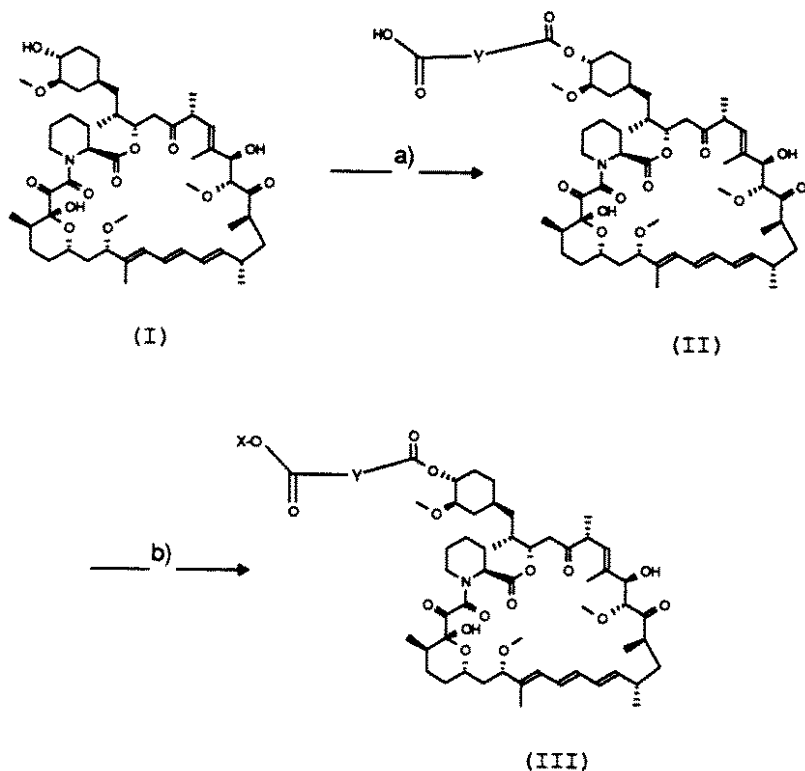
20

30

【0008】

本発明の好ましいラパマイシン誘導体は、反応I：

【化 1】



10

20

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 $C_2 \sim C_6$ アルキレン、最も好ましくはエチレンである。)で示されるラパマシンを産生する。式 II で示されるラパマシンを、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 I II で示される活性化ラパマイシンを産生する。〕

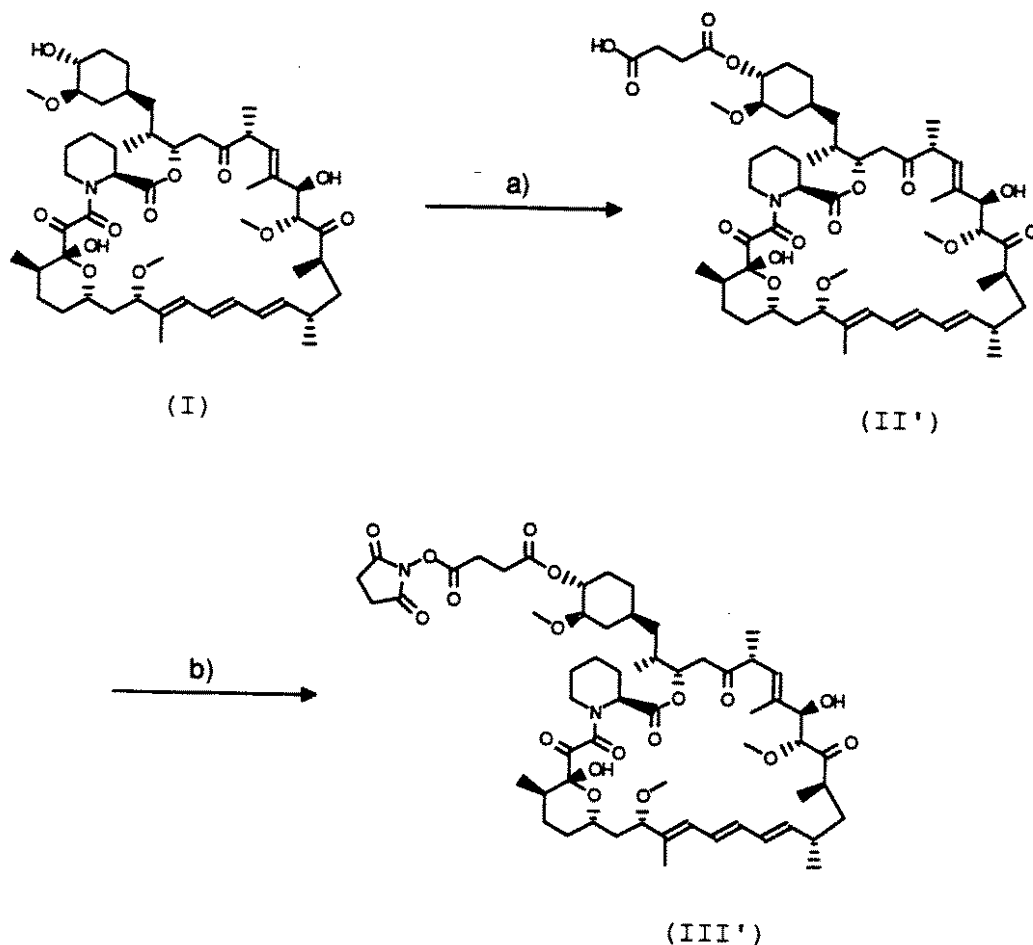
30

によって製造される式 III で示される化合物である。

【 0 0 0 9 】

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】



10

20

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)DMAPO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、Et₃NおよびCH₂Cl₂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。〕

30

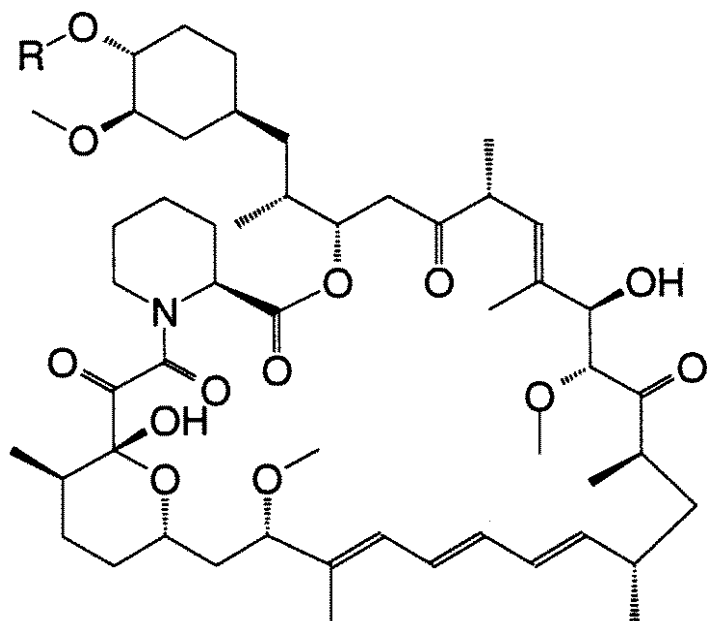
により製造される上記式IIIのサクシニミド誘導体である。40位により結合しているこのようなハプテンを使用して製造したモノクローナル抗体は、通常ラパマイシンおよび上記のようなラパマイシンの40-O-誘導体と交差反応性である。このようなモノクローナル抗体は、下記に開示のように、下記のような例えばバインダードメインまたはエフェクタードメイン中のラパマイシンまたはラパマイシンの40-O-誘導体の特定の領域を認識する化合物に対して選択できる。

【0010】

40

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、ハプテンは好ましくは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：

【化 3】



10

【 0 0 1 1 】

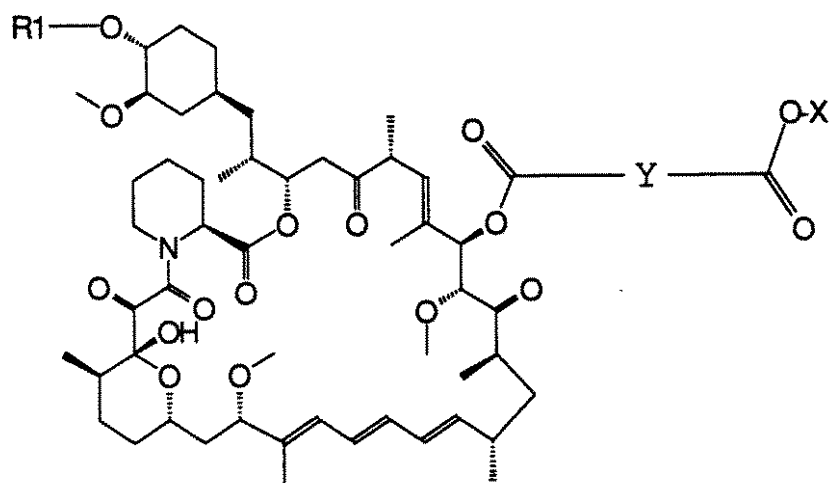
式 A

20

〔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。〕

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】



30

40

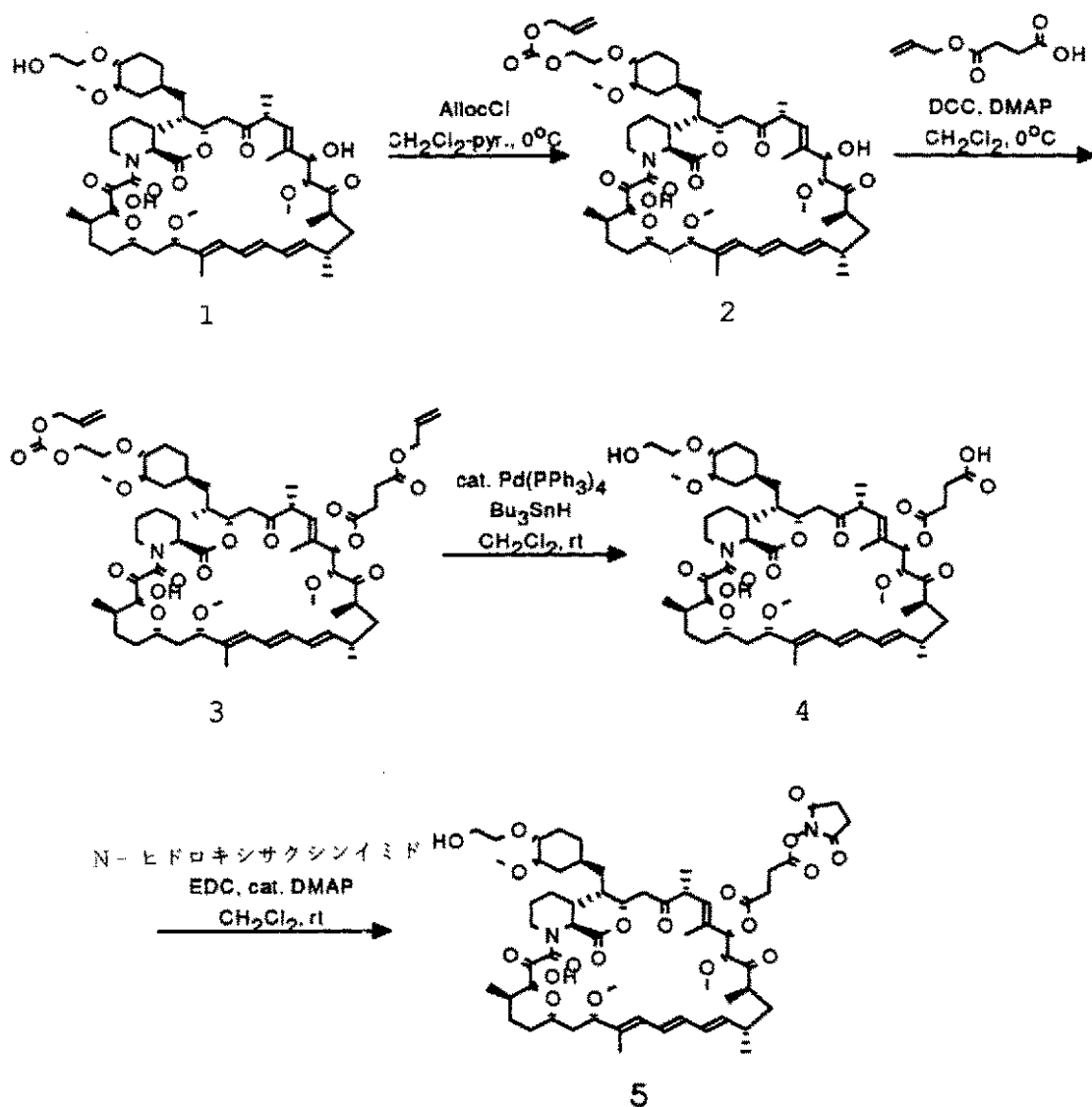
式 B

〔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、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似の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) - ラパ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：

50

【化 5】



10

20

30

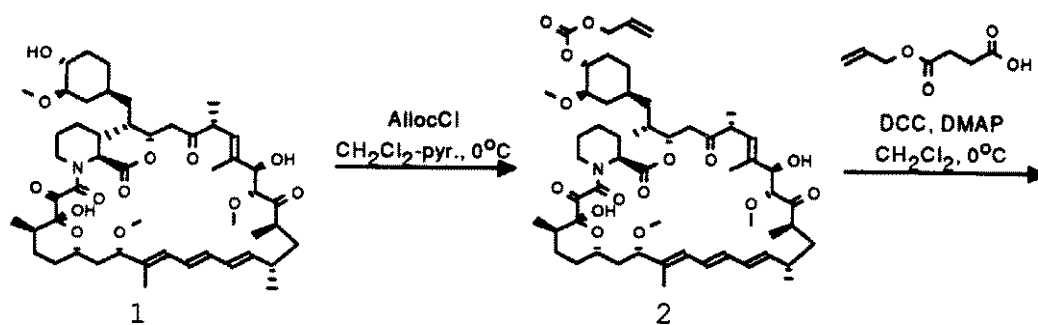
反応III

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。

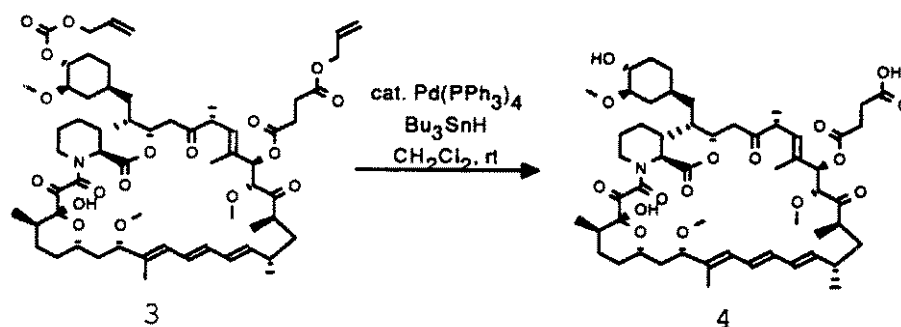
【0012】

同様に、ラパマイシンそれ自身は、例えば反応IV：

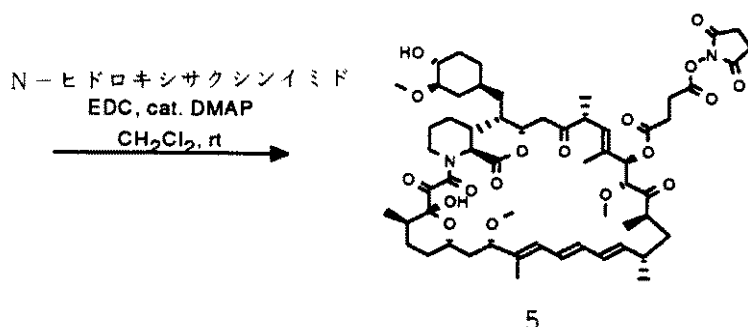
【化 6】



10



20



30

反応 IV

に従って、C 40 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、40 - 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。

40

【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ろう。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に抗体で被覆し、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

50

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、ラパマイシントタンパク質結合体、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にラパマイシン-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ト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、特徴付けることができる。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性マクロライドである。ラパマイシン類(例えば、ラパマイシンおよびその免疫抑制性誘導体)およびFK-506の両方ともマクロフィリン(FKBP)に結合し、両方にとって、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のものと全く異なっており、実際、2つの化合物は全く異なる活性機構を有している。(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考えられるが、ラパマイシンはIL-2転写に対する明確な効果を有していない。)従って、ラパマイシン類は、FKBP結合ドメインとエフェクタードメインを有するものとして特徴付けられ、FKBP結合ドメインが修飾されたラパマイシン代謝物を、エフェクタードメインが修飾されたものから区別することができる。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との相対的交差反応性(交差反応性は、例えば競合ELISAにより測定される)を測定することにより行うことができる;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に類似した、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、好ましくは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、また、そのラパマイシンとラパマイシンの40-O-誘導体(例えば上記のような)とを区別する能力によりスクリーニングおよび特徴付けすることができる。ラパマイシンとラパマイシンの40-O-誘導体の区別をしない抗体が望まれる場合、ラパマイシンとその40-O-誘導体の間の交差反応性が少なくとも70%、好ましくは90%以上のものを選択する。このような場合、モノクローナル抗体の調製に使用するハプテンは、好ましくは40-O-活性化ラパマイシン、例えば反応Iの式IIIの化合物である。ラパマイシンとラパマイシンの40-O-誘導体または代謝物との区別が望まれる場合、抗体は、それらに対する交差反応性が30%以下、好ましくは10%以下のものを選択する。この場合、抗体の製造に使用するハプテンは、好ましくは28-O-活性化ラパマイシンまたはラパマイシン誘導体、例えば式Bの化合物である。

【0017】

実施例1-40-O-活性化ラパマイシンの製造

a) ラパマイシンの40-O-ヘミサクシネートの製造

ピリジン12 ml中のラパマイシン1.5 g(1.64 mmol)および無水コハク酸0.577 g(5.77 mmol)の攪拌した溶液に、DMAPI 19.5 mg(1.64 mmol)を加える。得られた混

10

20

30

40

50

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9:1 CH₂Cl₂ - 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19:1 CH₂Cl₂ - 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、40-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】

¹H NMR(CDCl₃) δ 2.68(7H, m, H33, H25およびO₂CCH₂CH₂CO₂H), 3.14(3H, s および m, OCH₃ および H39), 3.34(3H, s, OCH₃), 3.38(3H, s, OCH₃), 4.68(1H, m, H40), 4.72(1H, ブロード s, 10-OH); MS(FAB) m/z 1036([M+Na]⁺), 982([M-CH₃O]⁺), 964([M-(CH₃O+H₂O)]⁺), 946([M-(CH₃O+2H₂O)]⁺)。 10

【0019】

b) 40-O-サクシンイミドオキシサクシニル-ラパマイシンの製造

CH₂Cl₂ 8 ml中の工程a)のラパマイシンヘミサクシネート120 mg(0.118 mmol)、Et₃N 16.5 μl(0.118 mmol)およびEDC 22.7 mg(0.118 mmol)の攪拌した溶液に、N-ヒドロキシサクシンイミド13.6 mg(0.118 mmol)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、40-O-サクシンイミドオキシサクシニル-ラパマイシン(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: 20

【0020】

¹H NMR(DMSO) δ 2.67(2H, t, O₂CCH₂CH₂CO₂), 2.81(7H, s, CH₃OおよびサクシンイミドCH₂), 2.92(2H, t, O₂CCH₂CH₂CO₂), 4.55(1H, m, H40), 5.26(1H, d, 28-OH), 6.43(1H, s, 10-OH); MS(FAB) m/z 1133([M+Na]⁺), 1111([M+H]⁺), 1092([M-H₂O]⁺), 1079([M-CH₃O]⁺), 1061([M-(CH₃O+H₂O)]⁺), 1043([M-(CH₃O+2H₂O)]⁺)。 30

【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2.2 ml中の40-O-(2-ヒドロキシエチル)-ラパマイシン95.8 mg(1.00 mmol)の攪拌した冷却(0)溶液に、アリルクロロギ酸0.160 ml(1.50 mmol)を加える。攪拌を0 で続け、ピリジン0.080 ml(1.00 mmol)およびアリルクロロギ酸各0.053 ml(0.50 mmol)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1 M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1 N水性塩酸、1 N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IIの式2)が白色泡状物として得られる。 40

【0022】

塩化メチレン2 ml中の本生産物20.8 mg(0.200 mmol)の攪拌した冷却(0)溶液に、DMAP 2.4 mg(0.020 mmol)およびDCC 8.2 mg(0.400 mmol)、続けて塩化メチレン0.5 ml中のモノアリルサクシネート6.3 mg(0.400 mmol)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 50

- 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 5 ml 中の本生産物 177 mg (0.150 mmol) 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 17.3 mg (0.015 mmol) およびトリブチリンハイドライド 0.080 ml (0.3 mmol) 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 2 N 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) - ラバマイシン

塩化メチレン 2.5 ml 中の工程 a) のヘミサクシネート 53 mg (0.050 mmol) の溶液を、DMA P 2 mg、EDC 24 mg (0.125 mmol) および N - ヒドロキシサクシンイミド 14 mg (0.125 mmol) で処理する。2 時間環境温度で攪拌した後、反応を 1 N 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ブテン(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 - ハブ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】

¹ H NMR (CDCl₃) δ 2.43 (1 H, dd, H 33 a), 2.50 - 2.98 (10 H, m, H 25, H 33 b, サクシネート水素, サクシンイミド水素), 3.58 (2 H, m, H 6 b, 1 ヒドロキシエチル H), 3.68 (3 H, m, H 16, 2 ヒドロキシエチル H), 3.81 (2 H, m, H 14, 1 ヒドロキシエチル H), 3.93 (1 H, d, H 27), 5.28 (2 H, m, H 2, H 30), 5.34 (1 H, d, H 28); MS (FAB) 1161 ([M + Li]⁺)。

【0026】

実施例 3 - 28 - O - 活性化ラバマイシンの製造

a) ラバマイシンの 28 - O ヘミサクシネート

10 : 1 塩化メチレン - ピリジン 2.2 ml 中のラバマイシン 914 mg (1.00 mmol) の攪拌した冷却(0)溶液に、クロロギ酸アリル 0.212 ml (2.00 mmol) を加える。3 時間後、ピリジン 0.080 ml (1.000 mmol) およびクロロギ酸アリル 0.053 ml (0.50 mmol) を加える。攪拌を更に 1 時間続け、反応を 1 M 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 1 N 水性塩酸、1 N 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 5 ml 中の本生産物 400 mg (0.400 mmol) の攪拌した冷却(0)溶液に DMA P 4.8 mg (0.040 mmol) および DCC 164 mg (0.800 mmol)、続いて塩化メチレン 1 ml 中のモノアリルサクシネート 127 mg (0.800 mmol) 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 5 ml 中の本生産物 285 mg (0.250 mmol) 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 28.8 mg (0.025 mmol) およびトリブチルチンハイドライド 0.133 ml (0.5 mmol) 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 2 N 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

10

20

30

40

50

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-サクイ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DMA 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。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：

10

【0030】

¹H NMR(CDC1₃) δ 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]⁺)。

【0031】

実施例4-免疫原性結合体の製造

20

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DMSO 400μl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 NaHCO₃緩衝液(pH 7.7)2ml中のKLH 8mg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PBS 51、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、マイクロコンセント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。

【0032】

30

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DMSO 2mlに溶解し、50mMリン酸緩衝液(pH 7.3)1ml中のKLH 5mg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PBS 21、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。

【0033】

実施例5-モノクローナル抗体の製造

40

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、Nature 256:49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

50

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10 µg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、P A I - 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、E L I S A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。

【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B a l b / Cマウスは、フロインド完全アジュバンド0.2 ml中の40 - (ヒドロキシエチル) - ラパマイシンK L H免疫原性結合体10または50 µg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ド0.2 ml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E L I S Aにより試験する。加えて、マウスは、B S A - 40 - O - (2 - ヒドロキシエチル) - ラパマイシンの結合体よりもB S A - 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10 µg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、P A I - 0細胞と融合する。得られるハイブリドーマを培養し、E L I S A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(E L I S A)

a) ラパマイシンのE L I S A

マイクロタイタープレートに、P B S中の1 - 2 µg / mlラパマイシン - B S A結合体で2時間37 で被覆し、次いでP B S中の2 % B S Aで飽和し、0.05 % ツイン - P B Sで3 × 洗浄する。スクリーニングすべきハイブリドーマ上清をP B S中の1 % B S A溶液で希釈し、一晚室温(または18時間4 または37 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I g Gヤギグロブリンにより測定する。37 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、405 nm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140 ng / 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0.25 ng / 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 - B S A結合体と同様に製造できるF K - 506 - B S A結合体で被覆したマイクロタイタープレートを使用した類似の直接E L I S AでF K - 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F K B P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 - B S AおよびF K - 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 - B S A対F K - 506 - B S A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 E L I S A 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 E L I S A に変え得る。競合物質が F K - 5 0 6 またはラパマイシンである場合、例えば 1 mg / 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 μ l / 2 0 0 μ 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 M 7 - 9 1 抗体(M 7 . 9 1 . 1 3) の B S A - 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 F K - 5 0 6 対遊離ラパマイシンへの結合を比較する競合的 E L I S A において、ラパマイシンおよび F K - 5 0 6 の間の直接 E L I S A 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 M 7 - 9 1 抗体(M 7 . 9 1 . 1 3) と、相対的に高い交差反応性を有する M 1 - 3 0 3 (M 1 . 3 0 3 . 3) を比較する。

【 0 0 3 9 】

b) 4 0 - O - (2 - ヒドロキシエチル) - ラパマイシンの E L I S A

本 E L I S A 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、4 0 - O - (2 - ヒドロキシエチル) - ラパマイシン - B S A で被覆し、次いで B S A 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 1 8 時間 4 、または 2 時間 3 7 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 I g G ヤギグロブリンで測定する。平衡 E L I S A を、結合ラパマイシン - B S A を使用して行い、4 0 - 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、4 0 - O - (2 - ヒドロキシエチル) - ラパマイシン - B S A (図中では B S A - 2 8 - R A D と呼ぶ) へ特異的に結合するハイブリドーマ B 3 - 2 0 3 (図 7 A) 、4 0 - O - (2 - ヒドロキシエチル) - ラパマイシン - B S A およびラパマイシン - B S A 結合体を 2 8 位により認識するハイブリドーマ B 3 - 1 1 3 (図 7 B) および加えて 4 0 位により B S A に結合したラパマイシンを認識するハイブリドーマ B 3 - 1 6 4 (図 7 C) の上清を示す。

【 0 0 4 0 】

抗体の 4 0 - 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 4 0 - O - (2 - ヒドロキシエチル) - ラパマイシン - B S A 結合体の、溶液中の 4 0 - 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 4 0 - 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 B 3 - 2 0 3 により産生された抗体(図 8 A) および 4 0 - 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 B 3 - 1 1 3 および B 3 - 1 6 4 により産生された抗体(図 8 B および 8 C) を示す。ラパマイシンと比較して、少なくとも 1 0 - 1 0 0 倍 4 0 - 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、B 3 - 2 2 、B 3 - 1 2 7 および B 3 - 1 5 6 を含む。B 3 - 2 9 、B 3 - 2 6 5 および B 3 - 5 3 9 のような他のハイブリドーマは、ラパマイシンおよび 4 0 - 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。

【 0 0 4 1 】

一度所望の抗体を選択したら、同じ E L I S A 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 - B S A 結合体または 4 0 - O - (2 - ヒドロキシエチル) - ラパマイシン - B S A 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 I g G - 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 E L I S A または他の検定系中で使用し得る。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 4 2 】

【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(M 1)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(M 7)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 M 7 - 9 1 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 - B S A および F K - 5 0 6 検定における比較を示すグラフである。 10

【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 - B S A および F K - 5 0 6 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 M 7 - 9 1 抗体(M 7 . 9 1 . 1 3) の B S A - ラパマイシンへの結合の障害曲線を示すグラフである。

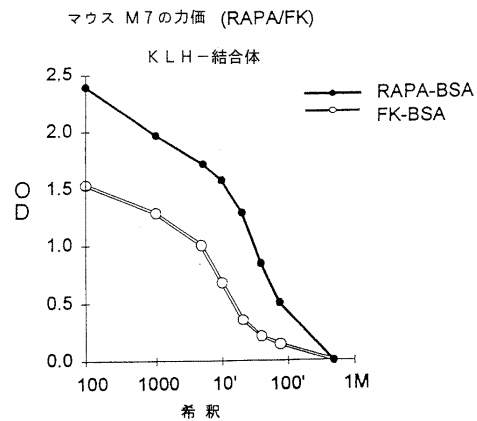
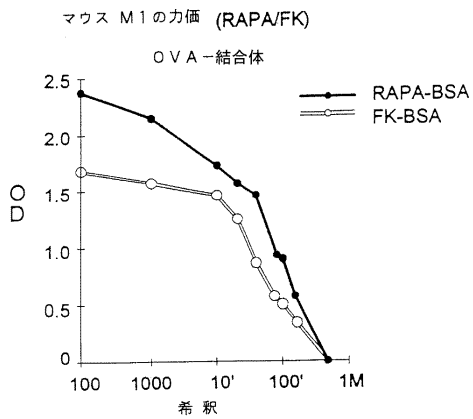
【図 6】競合的検定の結果を示すグラフである。

【図 7】4 0 - O - (2 - ヒドロキシエチル) - ラパマイシン - B S A (図中では B S A - 2 8 - R A D と呼ぶ)へ特異的に結合するハイブリドーマ B 3 - 2 0 3 (図 7 A)、4 0 - O - (2 - ヒドロキシエチル) - ラパマイシン - B S A およびラパマイシン - B S A 結合体を 2 8 位により認識するハイブリドーマ B 3 - 1 1 3 (図 7 B) および加えて 4 0 位により B S A に結合したラパマイシンを認識するハイブリドーマ B 3 - 1 6 4 (図 7 C) の上清の吸光度を示すグラフである。 20

【図 8】ラパマイシンと低い交差反応性で 4 0 - 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 B 3 - 2 0 3 により産生された抗体(図 8 A) および 4 0 - 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 B 3 - 1 1 3 および B 3 - 1 6 4 により産生された抗体(図 8 B および 8 C) の相対的親和性を示すグラフである。

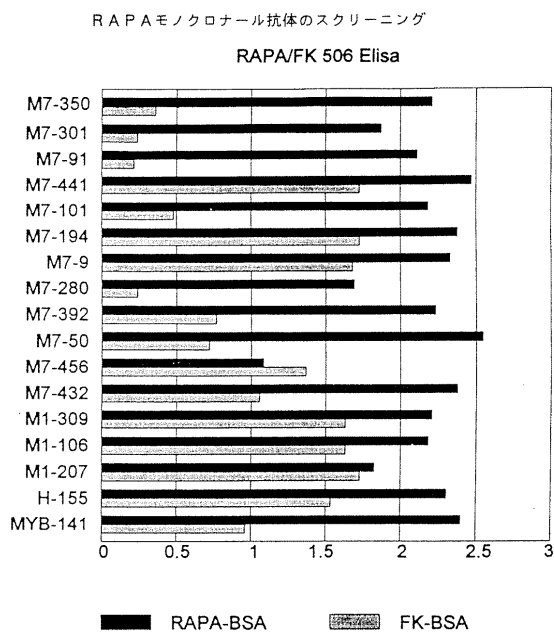
【 図 1 】

FIG. 1



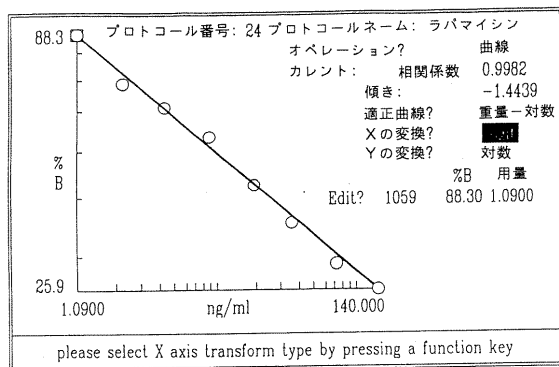
【 図 3 】

FIG. 3



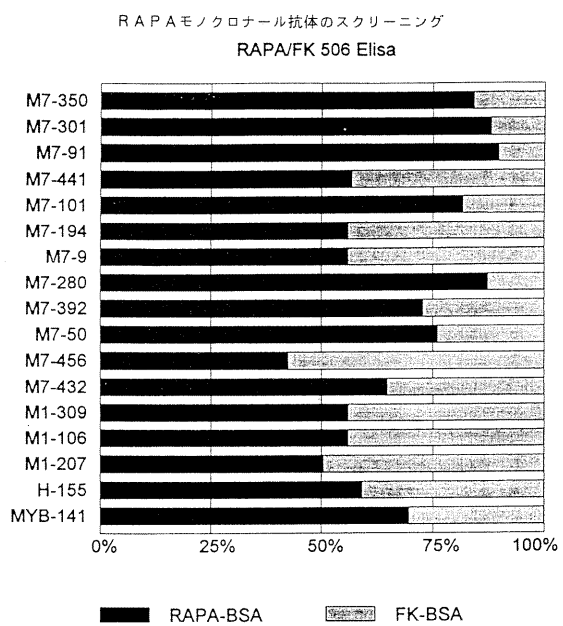
【 図 2 】

FIG. 2



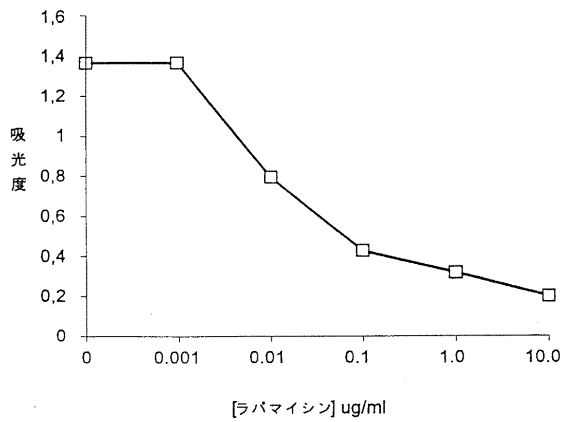
【 図 4 】

FIG. 4



【図 5】

FIG. 5

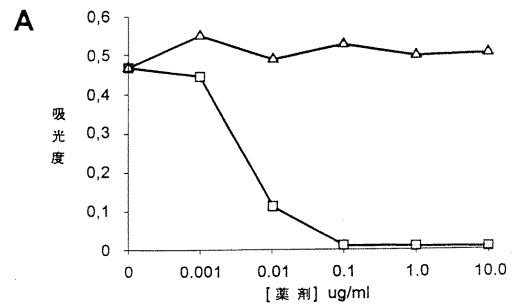


【図 6】

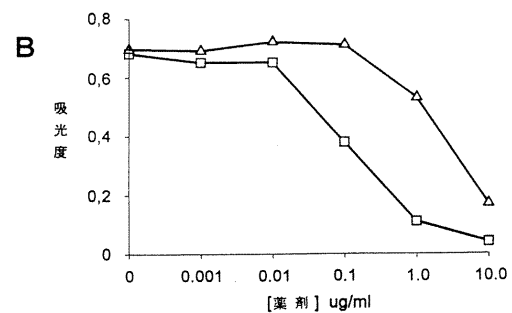
FIG. 6

ラパマイシン(□) 対 FK506(△) 競合ELISAにおけるmAbsのラパマイシンへの特異性

MAb M7.91.13

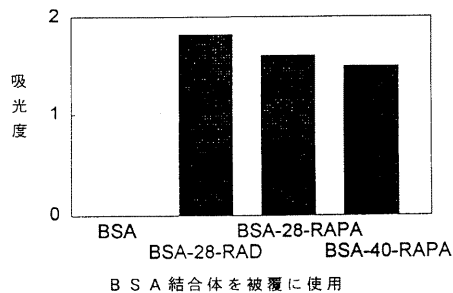
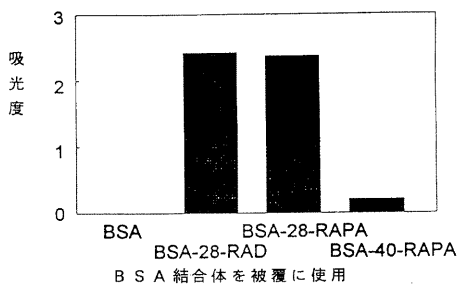
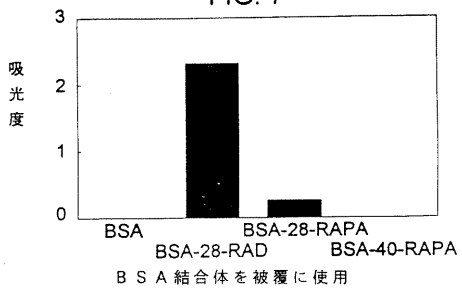


MAb M1.303.3



【図 7】

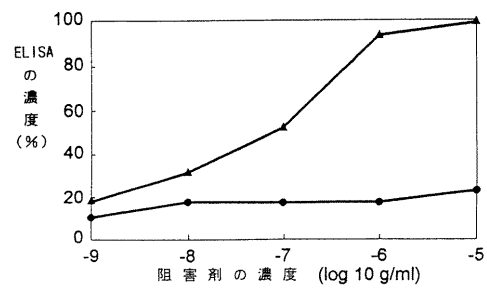
FIG. 7



【図 8】

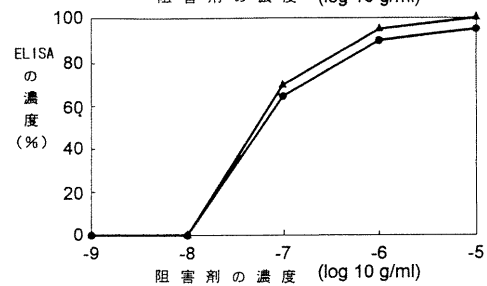
FIG. 8

A



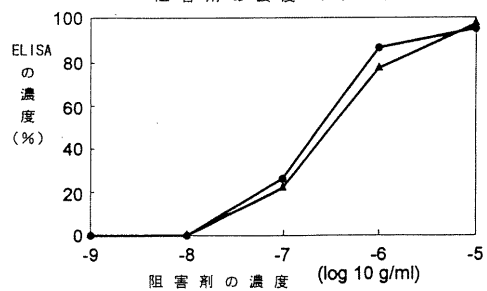
A

B



B

C



C

专利名称(译)	雷帕霉素测定		
公开(公告)号	JP2006249090A	公开(公告)日	2006-09-21
申请号	JP2006079344	申请日	2006-03-22
[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 リヒャルトセドラニ		
发明人	ヴァレリ・ケスニオ リヒャルト・セドラニ		
IPC分类号	C07K14/77 C07K14/435 C07K14/765 C07K16/12 G01N33/53 A61K39/385 A61K39/395 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	C07K14/77 C07K14/435 C07K14/765 C07K16/12		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/BA51 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA50 4H045/GA15		
优先权	1993007491 1993-04-08 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供针对雷帕霉素的单克隆抗体。 溶液：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缀合物， b) 将所述免疫原性缀合物给予合适的动物物种，进行免疫原性攻击，回收对所述缀合物敏感的抗体产生细胞， c) 永生化所述抗体产生细胞，和 d) 从如此建立的永生化细胞系中回收单克隆抗体：通过可以获得的单克隆抗体。 【选择图】无

