

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-522594

(P2013-522594A)

(43) 公表日 平成25年6月13日(2013.6.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 S	4 B O 6 4
<b>CO 7 D 401/04 (2006.01)</b>	CO 7 D 401/04 CSP	4 C O 6 3
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 2 5 E	4 H O 4 5
<b>GO 1 N 33/547 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/547	
<b>CO 7 K 16/44 (2006.01)</b>	CO 7 K 16/44	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 48 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2012-557073 (P2012-557073)	(71) 出願人	511069507
(86) (22) 出願日	平成23年2月23日 (2011. 2. 23)		サラダックス バイオメディカル インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成24年11月12日 (2012. 11. 12)		アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 1 8 0 1 5 ベスレヘム リサーチ ドライブ 1 1 6
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/025883	(74) 代理人	110000855
(87) 国際公開番号	W02011/112358		特許業務法人浅村特許事務所
(87) 国際公開日	平成23年9月15日 (2011. 9. 15)	(72) 発明者	サラモネ、サルヴァトーレ、ジェイ、
(31) 優先権主張番号	12/722, 829		アメリカ合衆国、ニュージャージー、スト
(32) 優先日	平成22年3月12日 (2010. 3. 12)	(72) 発明者	コートニー、ジョディ、ブレイク
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国、ペンシルヴァニア、ドイルズタウン、ヒッコリー ホロウ レイン 5 8 5 9
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 レナリドマイド及びサリドマイドイムノアッセイ

## (57) 【要約】

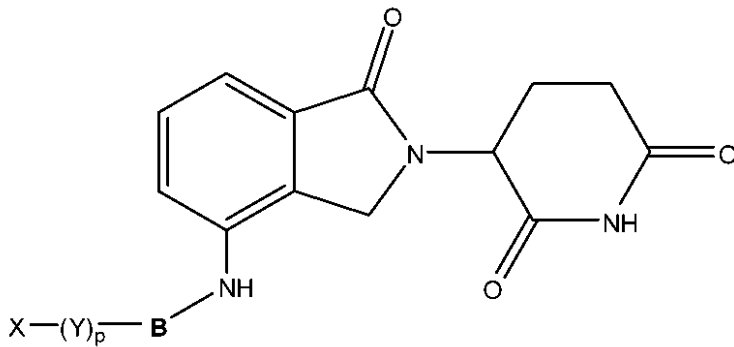
新規なコンジュゲート並びにレナリドマイドに由来する免疫原及びこれらの免疫原によって産生される抗体は、体液中のサリドマイド及びレナリドマイドを定量及びモニタリングするためのイムノアッセイにおいて有用である。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

試料中のサリドマイドを検出するためのイムノアッセイであって、前記試料と、薬学的に活性な化学療法薬であるレナリドマイド及びサリドマイドの混合物と選択的に反応性であり且つ薬学的に活性な化学療法薬の前記混合物とのその反応性に基づいて少なくとも 10% の、サリドマイドとの反応性を有する抗体と、次式を有するリガンド：

## 【化 1】



III;

10

[ 式中、B は、 $-C(=O)-CH_2-$ 、 $-C(=O)-NH-CH_2-$ 、 $-C(=O)-O-CH_2-$  又は  $-CH_2-$  であり、

Y は、有機スペーサー基であり、

p は、0 から 1 までの整数であり、

X は、担体に結合することができる末端官能基である ]

との担体のコンジュゲートとを含有する混合物を用意するステップと、前記試料中のサリドマイド及び前記コンジュゲートを前記抗体と結合させるステップと、その後、前記抗体に結合している又は結合していない前記混合物中の前記コンジュゲートを測定し、それによって前記試料中のサリドマイドの存在が検出可能となるステップとを含む上記イムノアッセイ。

30

## 【請求項 2】

前記試料がヒト試料である、請求項 1 に記載のイムノアッセイ。

## 【請求項 3】

前記ヒト試料が、サリドマイドで治療した患者から採取された試料であり、前記イムノアッセイが、前記抗体に結合している又は結合していないコンジュゲートの量を測定することによって前記試料中のサリドマイドの量を測定する、請求項 2 に記載のイムノアッセイ。

## 【請求項 4】

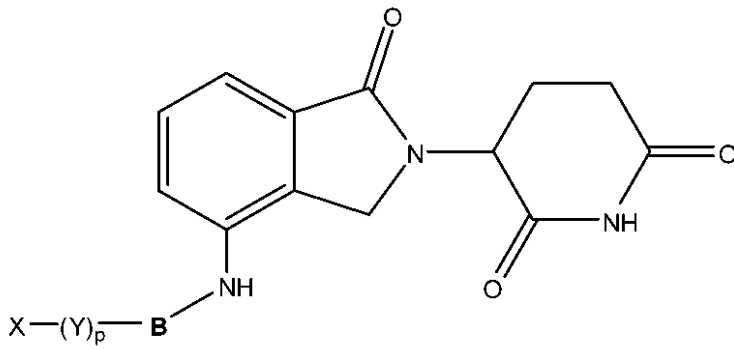
前記抗体が、前記化学療法薬（複数）とのその反応性に基づいて最少 10% の、サリドマイドとの選択的反応性を有する、請求項 3 に記載のイムノアッセイ。

## 【請求項 5】

前記抗体が、次式のリガンド：

40

## 【化 2】



;III

10

【式中、Y及びBは、上記の通りであり、Xは、ポリアミンポリマーに結合することができる末端官能基である】  
とコンジュゲートしたポリアミンポリマーを含む免疫原性担体を含む免疫原から作製される、請求項1に記載のイムノアッセイ。

## 【請求項6】

前記抗体が固体支持体に結合されている、請求項5に記載のイムノアッセイ。

## 【請求項7】

前記固体支持体がマイクロタイタープレートである、請求項6に記載のイムノアッセイ。

20

## 【請求項8】

前記固体支持体がナノ粒子である、請求項6に記載のイムノアッセイ。

## 【請求項9】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項1に記載のイムノアッセイ。

## 【請求項10】

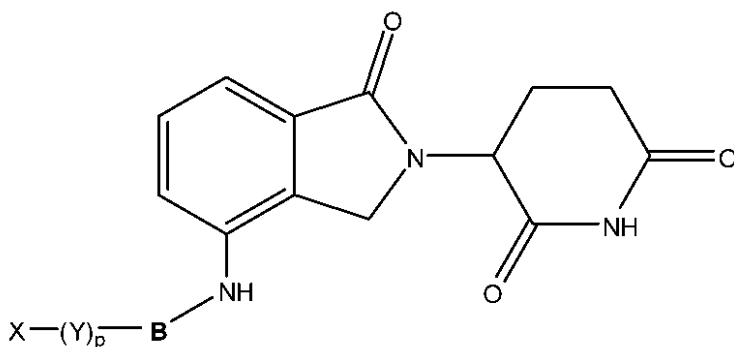
前記抗体が、マウス、ウサギ、ヒツジ又はラットに由来する、請求項9に記載のイムノアッセイ。

## 【請求項11】

試料中のレナリドマイドを検出するためのイムノアッセイであって、前記試料と、レナリドマイド及びレナリドマイドとサリドマイドとの混合物からなる群から選択される薬学的に活性な化学療法薬と選択的に反応性である抗体と、次式を有するリガンド：

30

## 【化 3】



III;

40

【式中、Bは、 $-C(=O)-CH_2-$ 、 $-C(=O)-NH-CH_2-$ 、 $-C(=O)-O-CH_2-$ 又は $-CH_2-$ であり、  
Yは、有機スペーサー基であり、  
pは、0から1までの整数であり、

50

Xは、担体に結合することができる末端官能基である ]  
 との担体のコンジュゲートとを含有する混合物を用意するステップと、前記試料中のレナリドマイド及び前記コンジュゲートを前記抗体と結合させるステップと、その後、前記抗体に結合している又は結合していない前記混合物中の前記コンジュゲートの量を測定し、それによって前記試料中のレナリドマイドの存在が検出可能となるステップとを含む上記イムノアッセイ。

【請求項 1 2】

前記試料がヒト試料である、請求項 1 1 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 1 3】

前記ヒト試料が、レナリドマイドで治療した患者から採取された試料であり、前記イムノアッセイが、前記抗体に結合している又は結合していないコンジュゲートの量を測定することによって前記試料中のレナリドマイドの量を測定する、請求項 1 2 に記載のイムノアッセイ。

10

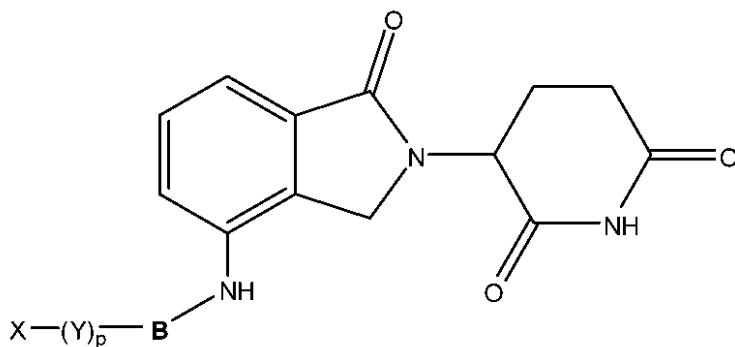
【請求項 1 4】

前記抗体が、前記化学療法薬（複数）とのその反応性に基づいて約 1 0 0 % の、レナリドマイドとの選択的反応性を有する、請求項 1 3 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 1 5】

前記抗体が、次式のリガンド：

【化 4】



20

30

[ 式中、Y 及び B は、上記の通りであり、X は、ポリアミンポリマーに結合することができる末端官能基である ]  
 とコンジュゲートしたポリアミンポリマーを含む免疫原性担体を含む免疫原から作製される、請求項 1 1 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 1 6】

前記抗体が固体支持体に結合されている、請求項 1 5 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 1 7】

前記固体支持体がマイクロタイタープレートである、請求項 1 6 に記載のイムノアッセイ。

40

【請求項 1 8】

前記固体支持体がナノ粒子である、請求項 1 6 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 1 9】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 2 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 2 0】

前記抗体が、マウス、ウサギ、ヒツジ又はラットに由来する、請求項 1 9 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 2 1】

レナリドマイド及びレナリドマイドとサリドマイドとの混合物からなる群から選択される薬学的に活性な化学療法薬と選択的に反応性である抗体。

50

## 【請求項 2 2】

前記抗体が、薬学的に活性な前記化学療法薬の薬学的に活性でない代謝産物と 1 2 % を超えない交差反応性を有し、前記交差反応性が、薬学的に活性な前記化学療法薬に対する前記抗体の結合に相対したものである、請求項 2 1 に記載の抗体。

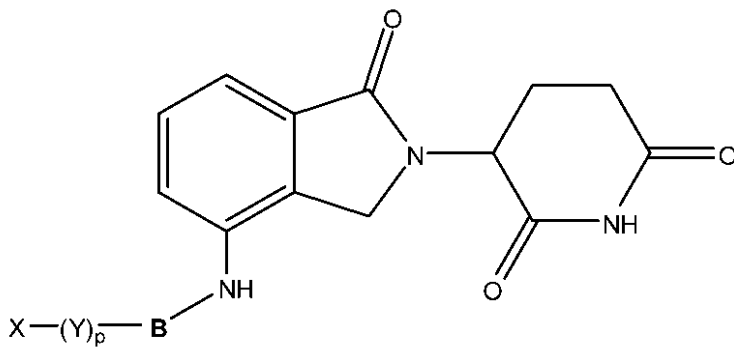
## 【請求項 2 3】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 2 2 に記載の抗体。

## 【請求項 2 4】

前記抗体が、次式のリガンド：

## 【化 5】



10

20

[ 式中、B は、 $-C(=O)-CH_2-$ 、 $-C(=O)-NH-CH_2-$ 、 $-C(=O)-O-CH_2-$  又は  $-CH_2-$  であり、

Y は、有機スペーサー基であり、

p は、0 から 1 までの整数であり、

X は、ポリアミンに結合することができる末端官能基である ]

とコンジュゲートしたポリアミンポリマーを含む免疫原性担体を含む免疫原から作製される、請求項 2 2 に記載の抗体。

## 【請求項 2 5】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 2 4 に記載の抗体。

30

## 【請求項 2 6】

前記抗体が、マウス、ヒツジ、ウサギ又はラットに由来する、請求項 2 5 に記載の抗体。

## 【請求項 2 7】

前記抗体が、前記化学療法薬（複数）とのその反応性に基づいて少なくとも 1 0 % の、サリドマイドとの選択的反応性を有する、請求項 2 2 に記載の抗体。

## 【請求項 2 8】

前記抗体が、前記化学療法薬（複数）とのその反応性に基づいて 4 8 % の、サリドマイドとの反応性を有する、請求項 2 7 に記載の抗体。

## 【請求項 2 9】

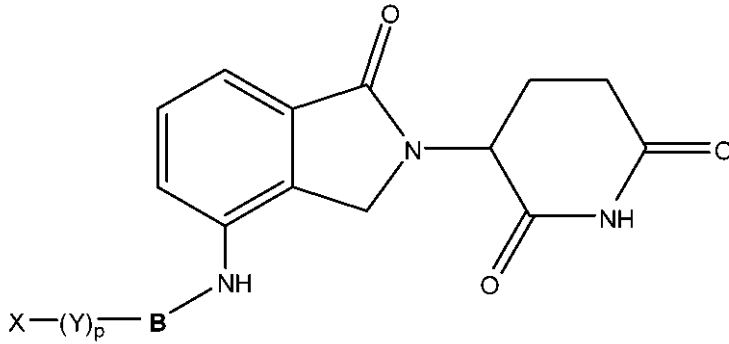
前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 2 7 に記載の抗体。

40

## 【請求項 3 0】

前記抗体が、次式のリガンド：

## 【化 6】



III

10

【式中、Bは、 $-C(=O)-CH_2-$ 、 $-C(=O)-NH-CH_2-$ 、 $-C(=O)-O-CH_2-$ 又は $-CH_2-$ であり、

Yは、有機スペーサー基であり、

pは、0から1までの整数であり、

Xは、ポリアミンポリマーに結合することができる末端官能基である】

とコンジュゲートしたポリアミンポリマーを含む免疫原性担体を含む免疫原から作製される、請求項28に記載の抗体。

20

## 【請求項31】

前記抗体がレナリドマイドと選択的に反応性である、請求項22に記載の抗体。

## 【請求項32】

前記抗体が、前記化学療法薬（複数）とのその反応性に基づいて少なくとも20%の、レナリドマイドとの選択的反応性を有する、請求項31に記載の抗体。

## 【請求項33】

前記抗体が、前記化学療法薬（複数）とのその反応性に基づいて約100%の、レナリドマイドとの選択的反応性を有する、請求項32に記載の抗体。

## 【請求項34】

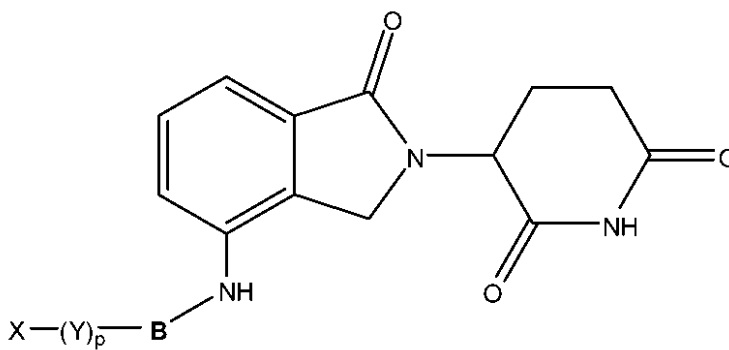
前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項32に記載の抗体。

30

## 【請求項35】

前記抗体が、次式のリガンド：

## 【化 7】



III;

40

【式中、Bは、 $-C(=O)-CH_2-$ 、 $-C(=O)-NH-CH_2-$ 、 $-C(=O)-O-CH_2-$ 又は $-CH_2-$ であり、

Yは、有機スペーサー基であり、

pは、0から1までの整数であり、

Xは、ポリアミンポリマーに結合することができる末端官能基である】

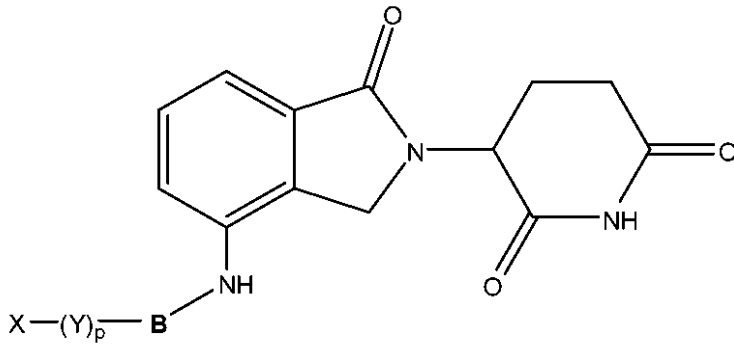
50

とコンジュゲートしたポリアミンポリマーを含む免疫原性担体を含む免疫原から作製される、請求項 3 2 に記載の抗体。

【請求項 3 6】

次式の化合物：

【化 8】



III;

[ 式中、B は、 $-C(=O)-CH_2-$ 、 $-C(=O)-NH-CH_2-$ 、 $-C(=O)-O-CH_2-$  又は  $-CH_2-$  であり、

Y は、有機スペーサー基であり、

p は、0 から 1 までの整数であり、

X は、ポリアミンポリマーに結合することができる末端官能基である ]。

20

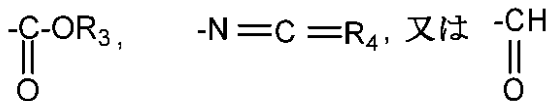
【請求項 3 7】

p が 0 である、請求項 3 6 に記載の化合物。

【請求項 3 8】

X が

【化 9】



30

[ 式中、 $R_3$  は、水素又はそれに結合した酸素原子と共に反応性エステルを形成しており、 $R_4$  は、酸素又は硫黄である ]

である、請求項 3 7 に記載の化合物。

【請求項 3 9】

X が

【化 1 0】



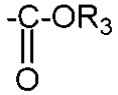
40

である、請求項 3 8 に記載の化合物。

【請求項 4 0】

X が

【化 1 1】

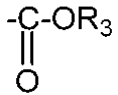


であり、R<sub>3</sub> が水素である、請求項 3 8 に記載の化合物。

【請求項 4 1】

X が

【化 1 2】



10

であり、R<sub>3</sub> が反応性エステルを形成している、請求項 3 8 に記載の化合物。

【請求項 4 2】

形成されているエステルが、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、請求項 4 1 に記載の化合物。

【請求項 4 3】

20

p が 1 である、請求項 3 6 に記載の化合物。

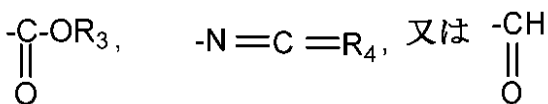
【請求項 4 4】

B が -C(=O)-CH<sub>2</sub>- である、請求項 4 3 に記載の化合物。

【請求項 4 5】

X が

【化 1 3】



30

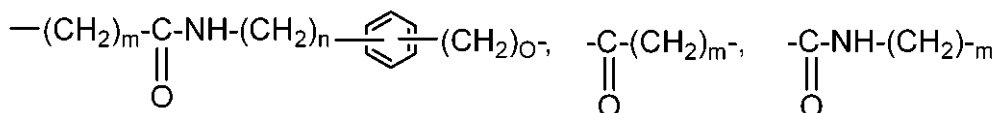
[ 式中、R<sub>3</sub> は、水素又はそれに結合した酸素原子と共に反応性エステルを形成しており、R<sub>4</sub> は、酸素又は硫黄である ]

である、請求項 4 3 に記載の化合物。

【請求項 4 6】

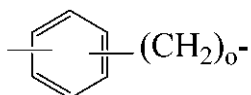
Y が、1 個から 10 個までの炭素原子を含むアルキレン、

【化 1 4】



40

又は



50

[ 式中、n 及び o は、0 から 6 までの整数であり、m は、1 から 6 までの整数である ]  
 である、請求項 4 5 に記載の化合物。

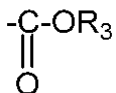
【請求項 4 7】

Y が、1 個から 6 個までの炭素原子を含む低級アルキレンである、請求項 4 6 に記載の化合物。

【請求項 4 8】

X が

【化 1 5】



10

であり、R<sub>3</sub> が上記の通りである、請求項 4 4 に記載の化合物。

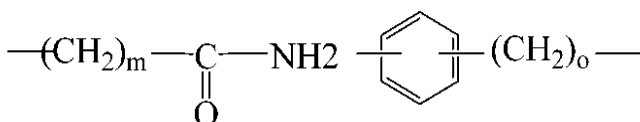
【請求項 4 9】

OR<sub>3</sub> がヒドロキシスクシンイミドエステルを形成する、請求項 4 8 に記載の化合物。

【請求項 5 0】

Y が

【化 1 6】



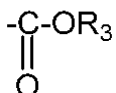
20

[ 式中、m 及び o は、上記の通りである ]  
 である、請求項 4 6 に記載の化合物。

【請求項 5 1】

X が

【化 1 7】



30

であり、R<sub>3</sub> が上記の通りである、請求項 5 0 に記載の化合物。

【請求項 5 2】

OR<sub>3</sub> がスルホ - N - ヒドロキシスクシンイミドエステルを形成する、請求項 5 1 に記載の化合物。

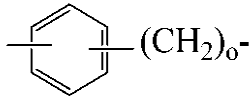
【請求項 5 3】

次式のリガンド：

40



【化 2 1】



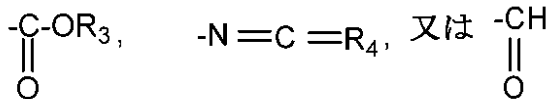
[ 式中、n 及び o は、0 から 6 までの整数であり、m は、1 から 6 までの整数である ]  
 である、請求項 5 7 に記載のコンジュゲート。

【請求項 5 9】

X が

10

【化 2 2】



[ 式中、R<sub>3</sub> は、水素又はそれに付加された酸素原子と共に反応性エステルを形成しており、R<sub>4</sub> は、酸素又は硫黄である ]  
 である、請求項 5 8 に記載のコンジュゲート。

【請求項 6 0】

20

前記担体が、ポリアミンポリマーを含む免疫原性担体であり、X が、前記ポリアミンポリマーに結合することができる末端官能基である、請求項 5 7 に記載のコンジュゲート。

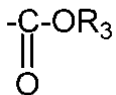
【請求項 6 1】

Y が、1 個から 6 個までの炭素原子を含むアルキレンである、請求項 6 0 に記載のコンジュゲート。

【請求項 6 2】

X が

【化 2 3】



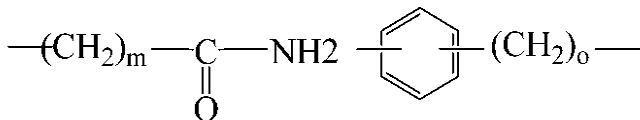
30

であり、R<sub>3</sub> が上記の通りである、請求項 6 1 に記載のコンジュゲート。

【請求項 6 3】

Y が

【化 2 4】



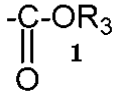
40

[ 式中、m 及び o は、上記の通りである ]  
 である、請求項 6 0 に記載のコンジュゲート。

【請求項 6 4】

X が

【化 2 5】



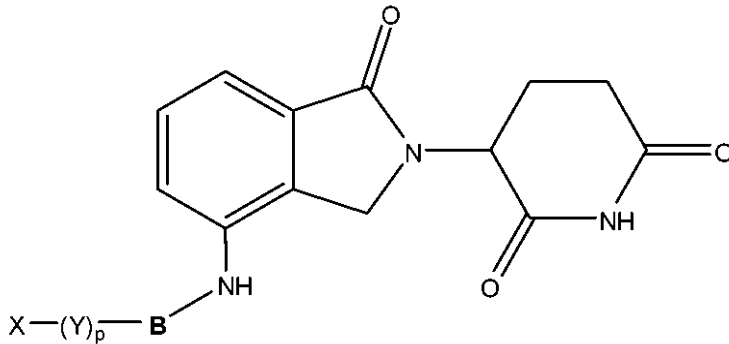
であり、 $R_3$  が上記の通りである、請求項 6 3 に記載のコンジュゲート。

【請求項 6 5】

患者の試料中のサリドマイドの存在を決定するためのキットであって、別々の容器中にパッケージングされた別々の試薬を含み、前記試薬のうち的一方が、次式のリガンド：

10

【化 2 6】



III;

20

[ 式中、B は、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-$  又は  $-\text{CH}_2-$  であり、

Y は、有機スペーサー基であり、

p は、0 から 1 までの整数であり、

X は、担体に結合することができる末端官能基である ]

との担体のコンジュゲートであり、他方の試薬が、薬学的に活性な化学療法薬であるレナリドマイド及びサリドマイドの混合物と選択的に反応性であり且つ薬学的に活性な化学療法薬の前記混合物とのその反応性に基づいて少なくとも 10% の、サリドマイドとの選択的反応性を有する抗体であるキット。

30

【請求項 6 6】

p が 1 である、請求項 6 5 に記載のキット。

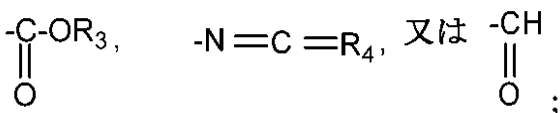
【請求項 6 7】

Y が低級アルキレンである、請求項 6 6 に記載のキット。

【請求項 6 8】

X が

【化 2 7】



40

[ 式中、 $R_3$  は、水素又はそれに付加された酸素原子と共に反応性エステルを形成しており、 $R_4$  は、酸素又は硫黄である ]

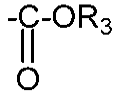
である、請求項 6 7 に記載のキット。

【請求項 6 9】

X が

50

【化 2 8】



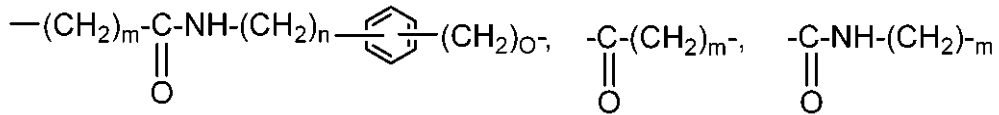
であり、R<sub>3</sub> が上記の通りである、請求項 6 8 に記載のキット。

【請求項 7 0】

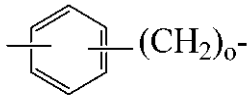
Y が

【化 2 9】

10



又は



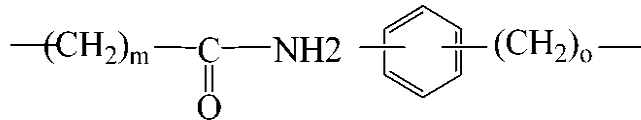
20

である、請求項 6 9 に記載のキット。

【請求項 7 1】

Y が

【化 3 0】



30

[ 式中、m 及び o は、上記の通りである ]

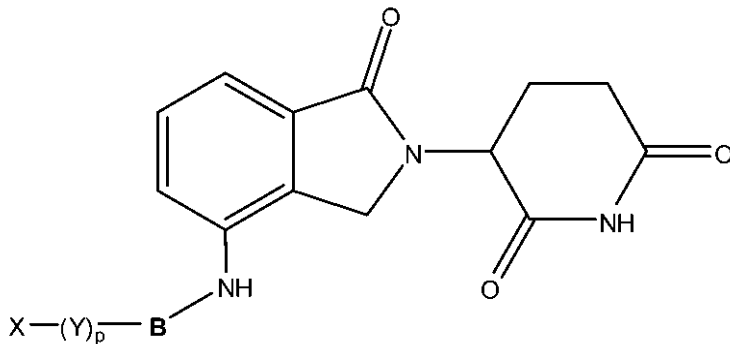
である、請求項 7 0 に記載のキット。

【請求項 7 2】

患者の試料中のレナリドマイドの存在を決定するためのキットであって、別々の容器中にパッケージングされた別々の試薬を含み、前記試薬のうち的一方が、次式のリガンド：

【化 3 1】

40

**III;**

50

[ 式中、B は、 $-C(=O)-CH_2-$ 、 $-C(=O)-NH-CH_2-$ 、 $-C(=O)-O-CH_2-$  又は  $-CH_2-$  であり、

Y は、有機スペーサー基であり、

p は、0 から 1 までの整数であり、

X は、担体に結合することができる末端官能基である ]

との担体のコンジュゲートであり、他方の試薬が、レナリドマイド、及びサリドマイドとレナリドマイドとの混合物からなる群から選択される薬学的に活性な化学療法薬と選択的に反応性である抗体である、キット。

【請求項 7 3】

10

p が 1 である、請求項 7 2 に記載のキット。

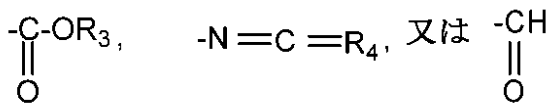
【請求項 7 4】

Y が低級アルキレンである、請求項 7 3 に記載のキット。

【請求項 7 5】

X が

【化 3 2】



20

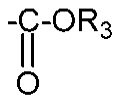
[ 式中、R<sub>3</sub> は、水素又はそれに付加された酸素原子と共に反応性エステルを形成しており、R<sub>4</sub> は、酸素又は硫黄である ]

である、請求項 7 4 に記載のキット。

【請求項 7 6】

X が

【化 3 3】



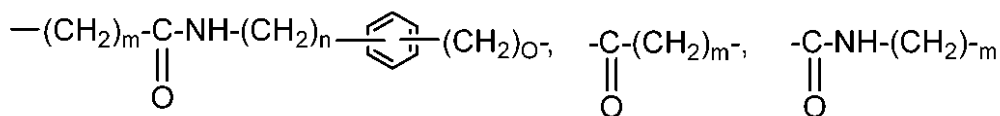
30

であり、R<sub>3</sub> が上記の通りである、請求項 7 5 に記載のキット。

【請求項 7 7】

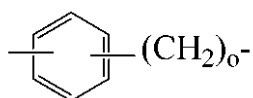
Y が

【化 3 4】



40

又は



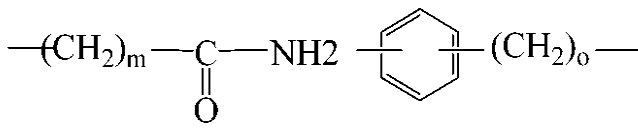
である、請求項 7 3 に記載のキット。

50

【請求項 78】

Y が

【化 35】



[ 式中、m 及び o は、上記の通りである ]

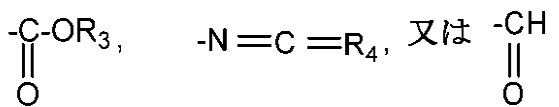
10

である、請求項 77 に記載のキット。

【請求項 79】

X が

【化 36】



20

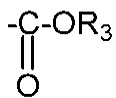
[ 式中、R<sub>3</sub> は、水素であるか、又はそれに付加された酸素原子と共に反応性エステルを形成しており、R<sub>4</sub> は、酸素又は硫黄である ]

である、請求項 78 に記載のキット。

【請求項 80】

X が

【化 37】



30

であり、R<sub>3</sub> が上記の通りである、請求項 79 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、治療期間中の最適薬物濃度を迅速に決定するためにヒト体液においてレナリドマイド及びサリドマイドの存在の決定及び/又は量の定量をするためのイムノアッセイの分野に関する。

【背景技術】

【0002】

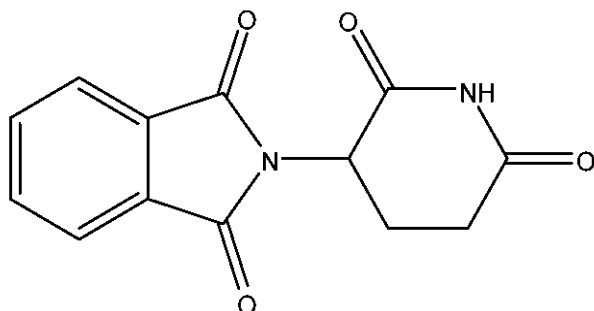
40

癌とは、身体の一部にある細胞が制御を外れて増殖し始めたときに発症するという共通した特性を共有する、一群の悪性腫瘍を説明するのに使用される用語である。多くの癌は、腫瘍として形成されるが、血液中にも出現することがあり、他の組織を循環してそこで増殖する恐れがある。悪性の癌は、最も一般的には、外科手術、化学療法、及び/又は放射線療法の組合せで治療される。特定の癌を治療するために使用される治療の種類は、悪性癌の型及びそれが診断されたときのその段階を含むいくつかの因子に依存する。

【0003】

一般化学名がサリドマイドである化学療法薬は、次式を有する：

## 【化1】



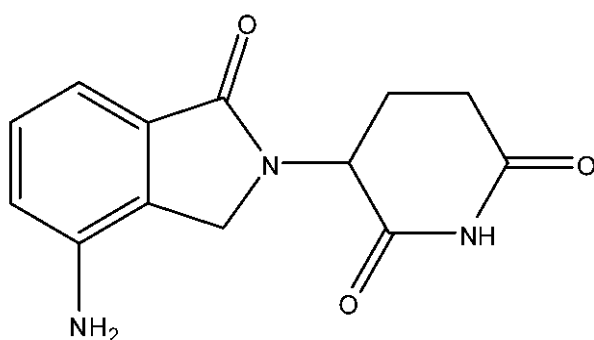
I

10

## 【0004】

一般化学名がレナリドマイドである化学療法薬は、次式を有する：

## 【化2】



II

20

## 【0005】

サリドマイドは、免疫調節性、抗炎症性及び抗血管新生性を有する。この免疫調節性及び抗炎症性は、腫瘍壊死因子をコードしている mRNA の分解を通じた、過剰な腫瘍壊死因子 - アルファ 産生の抑圧に関連している可能性がある (Moreira, J Exp Med, 177(6):1675-80, 1993)。サリドマイドの他の免疫調節性及び抗炎症性としては、プロスタグランジン合成におけるマクロファージ関連の抑圧、並びに末梢血単核細胞によるインターロイキン - 10 及びインターロイキン - 12 の産生の調節等が挙げられる。この抗炎症性と抗血管新生性との組合せにより、サリドマイドは、多種多様な疾患を治療するのに重大な潜在可能性を有する新規な治療薬となっている (Teo, Clin Pharmacokinet, 43(5):311-27, 2004)。最近のいくつかの臨床試験により、多発性骨髄腫、腎癌又は多形神経膠芽腫を有する患者においてサリドマイドの治療効果が実証されている (Singhal, N Engl J Med, 341(21):1565-71, 1999; Marx, J Neurooncol, 54(1):31-8, 2001)。現在、サリドマイドは、新たに診断された多発性骨髄腫を有する患者の治療用及び癩性結節性紅斑の急性治療用に承認されている (Package-insert-Thalidomide, Celgene Corp., 2009)。

30

40

## 【0006】

レナリドマイドは、免疫調節性、抗増殖性、及び抗血管新生性を有するサリドマイド誘導体である。レナリドマイドは、細胞周期停止及びアポトーシスを誘導することによって多発性骨髄腫細胞に対して直接に抗増殖性効果を発揮する (Armoiry, J Clin Pharm Ther, 33(3):219-26, 2008)。レナリドマイドは、多発性骨髄腫又は欠失 5q 染色体異常に関連した骨髄異形成症候群を有する患者の治療用に承認されている (Package-insert-Revlimid, Celgene Corp., 2009)。

## 【0007】

50

サリドマイド及びレナリドマイドの作用機序及び代謝経路は、まだ完全には特徴付けられていない。in vivoにおいて、いずれの薬剤も、多数の代謝産物を生じる非酵素的加水分解及び酵素代謝を受けるが、これらの化合物のうちでサリドマイドの治療効果の原因となるものは見出されていない (Lepper, Curr Drug Metab, 7(6): 677-85, 2006)。

#### 【0008】

サリドマイド及びレナリドマイドは、血漿中濃度において顕著な変動性を示す。HIV患者におけるサリドマイドの薬物動態学的作用の第一相試験により、広範囲にわたる最高血中濃度  $C_{max}$  ( $2.8 \pm 2.6 \text{ mg/L}$ ) 及び半減時間  $t_{1/2}$  ( $5.9 \pm 2.3$  時間) が実証されている (Wohl, J Infect Dis, 185(9): 1359-63, 2002)。健常被験者に対するサリドマイドの投与により、結果として  $C_{max}$  において最高52%の変動性及び  $t_{1/2}$  において最高37%の変動性が生じた (Package-insert-Thalidomide, Celgene Corp., 2009)。中枢神経系腫瘍を有する患者におけるレナリドマイドの第一相試験により、 $C_{max}$  において最高78%の変動性及び  $t_{1/2}$  において最高122%の変動性が認められている (Fine, Clin Cancer Res, 13(23): 7101-6, 2007)。

#### 【0009】

サリドマイド及びレナリドマイドの効力はより高い濃度レベルで増大し、この薬剤は広範囲にわたる患者内及び患者間薬物動態学的変動を示すので、血液中のこれらの薬剤の濃度をモニタリングして目標レベルに調整することは、効力を増大させて毒性を最小限に抑えるのに重要なはずである。サリドマイド及びレナリドマイドの、個体内及び個体間の薬物動態学的変動の程度は、以下を含む多くの因子によって影響される：

- 年齢
- 体重
- 臓器機能
- 薬剤 - 薬剤相互作用
- 遺伝的調節
- コンプライアンス

#### 【0010】

この変動の結果として、異なる個体における等用量の同一薬剤によって臨床転帰が劇的に異なる結果となり得る。同一投与量のサリドマイド及びレナリドマイドの有効性は、患者における個々の薬物クリアランス及び最終的な血清中薬物濃度に基づいて著しく変化する。治療薬管理により、臨床医が薬剤投与の際の患者の変化を洞察できるようになるはずである。治療薬管理を行えば、薬剤投与量を患者に合わせて個別化することができ、望ましくない副作用なく該障害を有効に治療する可能性がかなり高くなるであろう。

#### 【0011】

サリドマイド及びレナリドマイドの日常的な治療薬管理には、一般実験機器に適合可能な簡単な自動化された試験を利用できることが必要とされるであろう。ヒトの血液中及び血漿中のサリドマイド及びレナリドマイドの濃度を決定するための、UV検出又は質量分光検出を用いた液体クロマトグラフィー (LC) の使用は、記載されている (Tohny, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 811(2): 135-41, 2004; Chen, J Clin Pharmacol, 47(12): 1466-75, 2007; Teo, J Clin Pharmacol, 39(11): 1162-8, 1999)。これらの方法は、労働集約的であり、液液抽出又は固相抽出を必要とするので、高価な装置を使用し、日常的な臨床検査での使用に受け入れられるものではない。現在までのところ、レナリドマイド及び/又はサリドマイドを、これらの化学療法剤で治療した患者のヒト体液中で測定するためのイムノアッセイはない。

#### 【0012】

上記からわかるように、ヒト体液においてサリドマイド及び/又はレナリドマイドの存在の決定及び/又は量の定量をするためのイムノアッセイはない。イムノアッセイによるサリドマイド及びレナリドマイドの日常的な治療薬管理により、標準実験機器に適合した簡単な自動化された試験が可能となるはずである。しかし、こうしたイムノアッセイを可能にするためには、サリドマイド及びレナリドマイドに特異的な抗体を作製する必要がある。このアッセイにおいて使用される誘導体及び免疫原は、作製された対応するそれらの抗体を通して、サリドマイド及びレナリドマイドに対する特異的反応性を付与しなければならない。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

10

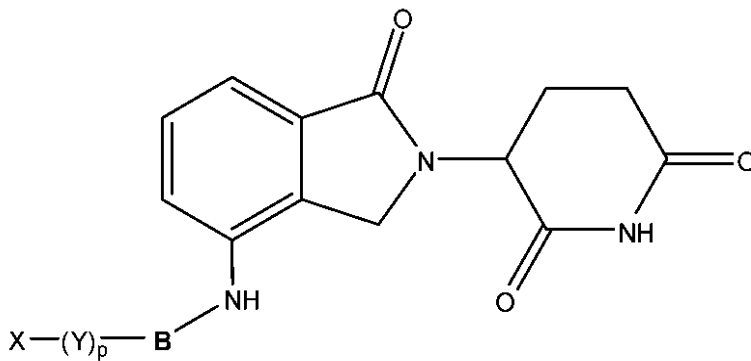
【0013】

本発明によれば、サリドマイド及びレナリドマイドに対して実質的に反応性であり、これらの化学療法薬で治療した患者の試料におけるサリドマイド及びレナリドマイドの存在の決定及び/又は量の定量をするための同一のイムノアッセイにおいて使用することができる、新しいクラスの抗体が作製されている。

【0014】

ポリアミンポリマーを含む免疫原性担体と次式の化合物：

【化3】



20

30

[式中、Bは、 $-C(=O)-CH_2-$ 、 $-C(=O)-NH-CH_2-$ 、 $-C(=O)-O-CH_2-$ 又は $-CH_2-$ であり、

Yは、有機スペーサー基であり、

pは、0から1までの整数であり、

Xは、前記ポリアミンポリマーに結合することができる末端官能基である]

とのコンジュゲートである免疫原を使用することによって、レナリドマイド並びにレナリドマイドとサリドマイドとの混合物に特異的であって、サリドマイド及びレナリドマイドの双方の薬学的に不活性な代謝産物とは反応も結合もしない抗体が産生されることが見出されている。

40

【0015】

レナリドマイド又はサリドマイドとレナリドマイドとの混合物のいずれかと選択的に反応性である、これらの抗体の提供により、サリドマイド又はレナリドマイドのいずれかで治療している患者の体液試料中のサリドマイド及びレナリドマイドをモニタリングするために特異的に検出及び定量することができるイムノアッセイを行うことが可能となる。本発明にさらに含まれるのは、前記イムノアッセイ用の試薬及びキットである。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明によれば、レナリドマイド又はレナリドマイドとサリドマイドとの混合物に選択的に結合し、サリドマイド及びレナリドマイドのいずれの薬学的に不活性な代謝産物とも交差反応性でない、新しいクラスの抗体が得られる。式IIIのレナリドマイドのこれ

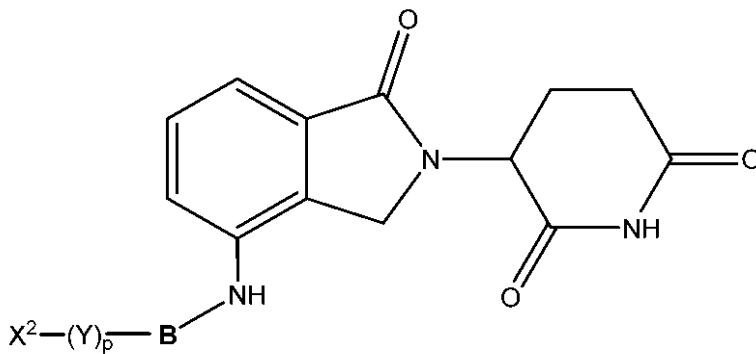
50

らの誘導体を免疫原として使用することによって本発明の新しいクラスの抗体が得られることが発見された。これらの抗体を使用することにより、血液、血漿又は他の体液の試料中のサリドマイド及びレナリドマイドを検出及び/又は定量するためのこうしたイムノアッセイ用の試薬及びキットを含めて、イムノアッセイが開発された。

【0017】

本発明によれば、試料中のサリドマイド又はレナリドマイドを検出及び/又は定量するためのこれらのイムノアッセイのいずれにおいても使用することができる、新しいクラスの試薬が得られる。この試薬は、担体と次式を有するリガンド：

【化4】



III-A

[式中、B、Y及びPは、上記の通りであり、 $X^2$ は、前記担体に結合することができる末端官能基である]

とのコンジュゲートである。

【0018】

このイムノアッセイを使用することにより、いずれかの治療薬で治療している患者の体液試料中のサリドマイド又はレナリドマイドの存在及び量を検出及び/又は定量することができる。この方法では、サリドマイド又はレナリドマイドで治療している患者を療法期間中にモニタリングすることができ、式IIIの免疫原及び式III-Aのコンジュゲートによって産生される抗体を使用することによって前記モニタリングに従ってその治療を調整することができる。本発明により、治療薬としてサリドマイド又はレナリドマイドのいずれかで治療している患者におけるサリドマイド及びレナリドマイドの治療薬管理が実現する。検出及び/又は定量される治療薬は、式Iのサリドマイド及び式IIのレナリドマイドである。

【0019】

イムノアッセイにおける試薬としての式III-Aのコンジュゲート及び免疫原性担体とコンジュゲートした式IIIの免疫原の提供は、化学療法薬のレナリドマイド及びサリドマイドを検出及び/又は定量するためのイムノアッセイにおいて利用することができる抗体及び試薬を提供する。本発明に従って作製されるこれらの試薬及び抗体は、レナリドマイド又はサリドマイドを検出及び定量するためのイムノアッセイの双方において利用することができる。一般に、患者は、これらの化学療法薬の双方ではなく一方で治療される。したがって、レナリドマイド及びサリドマイドの双方に対して選択的に反応性である抗体又は試薬は、レナリドマイド又はサリドマイドのいずれかを検出するためのこれらのイムノアッセイにおいて利用することができる。レナリドマイドで治療される患者は、一般にサリドマイドでは治療されず、サリドマイドで治療される患者は、一般にレナリドマイドでは治療されないもので、これは本当である。したがって、本発明の試薬及び抗体は、これらの2種の化学療法薬を別々に検出及び/又は定量するためのこれらの2種のイムノアッセイのいずれにおいても使用することができる。

【0020】

本明細書中で前記したように、式IIIの免疫原によって作製することができる抗体は

、レナリドマイド及びレナリドマイドとサリドマイドとの混合物と選択的に反応性であり、サリドマイド又はレナリドマイドのイムノアッセイのいずれにおいても使用することができる。これらの抗体はサリドマイド及びレナリドマイドの双方と選択的に反応性であるが、サリドマイドのイムノアッセイにおいて使用するためには、その抗体が、サリドマイド及びレナリドマイドの双方とのその合計の反応性に基づいて、サリドマイドについて少なくとも約10%、好ましくは少なくとも約40%の選択的反応性を有していなければならない。本発明によれば、式IIIの免疫原を利用して、レナリドマイド及びサリドマイドの双方とのその反応性に基づいて、少なくとも約10%、多くとも約50%の、サリドマイドとの反応性を有する抗体を作製することができる。

【0021】

一方、レナリドマイドのイムノアッセイにおいて抗体を利用するためには、式IIIの免疫原によって産生され、レナリドマイドとの又はレナリドマイド及びサリドマイドの双方との選択的反応性を有するあらゆる抗体を使用することができる。本発明によれば、サリドマイド及びレナリドマイドとのその反応性に基づいてレナリドマイドと選択的に反応性である抗体、又はレナリドマイド及びサリドマイドの双方と選択的に反応性である抗体を、式IIIの免疫原によって作製することができる。本発明によれば、レナリドマイドと選択的に反応性であってサリドマイドとはそうでない抗体、すなわち、レナリドマイド及びサリドマイドの双方とのその選択的反応性に基づいて100%のレナリドマイドとの選択的反応性を有する抗体を、式IIIの免疫原を使用することによって作製することができる。レナリドマイドのイムノアッセイにおける使用には、レナリドマイドと実質的に100%の選択的反応性を有し、サリドマイドとの選択的反応性が実質的にない抗体が特に好ましい。

【0022】

本発明のアッセイにおいて利用される試薬は、ポリマー担体と式III-Aの化合物とのコンジュゲートである。これらのコンジュゲートは、本発明の抗体との結合について、試料中に存在するサリドマイド及びレナリドマイドと競合的な結合パートナーである。したがって、該抗体に結合するコンジュゲート試薬の量は、試料中のサリドマイド及びレナリドマイドの量に反比例することになる。本発明によれば、該アッセイは、該抗体に結合している又は結合していない前記コンジュゲートの量を検出及び測定するための従来の任意の測定方法を利用する。前記方法の使用により、結合している又は結合していないコンジュゲートの量を測定することができる。一般に、試料中のサリドマイド及びレナリドマイドの量は、試料中のサリドマイド及びレナリドマイドによって得られる、結合している又は結合していないコンジュゲートの測定量を、既知量のサリドマイド又はレナリドマイドを含有する試料で得られた標準曲線又は校正曲線から決定された、結合している又は結合していないコンジュゲートの値と関連付けることによって決定され、この既知量は、試験する試料について予想される範囲内にある。校正曲線を作成するためのこれらの試験は、試料に使用したのと同様のイムノアッセイ法を使用して決定される。

【0023】

該コンジュゲート、並びに該免疫原は、式IIIの化合物から調製される。コンジュゲート又は免疫原におけるときには、担体及びポリアミンポリマーは、式IIIの化合物のリガンド部分に連結され、このリガンド部分は次式を有する：

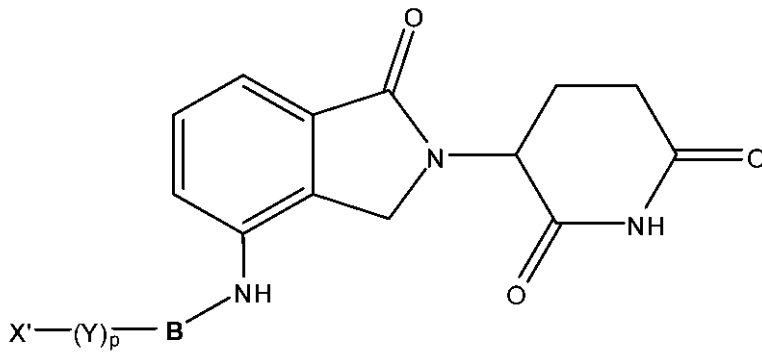
10

20

30

40

【化5】



IV

10

[ 式中、X' は、 $-CH_2-$  又は官能リンカー基であり、  
Y、p 及び B は、上記の通りである ]。

【0024】

このリガンド部分は、コンジュゲート又は免疫原の担体上の1つ又は複数の活性部位に連結され得る。一般に、これらの担体には、ポリマー、最も好ましくは、反応性アミノ基を有するポリアミンポリマーが含まれる。該コンジュゲート、特に該免疫原を形成する際に、X' は、アミノ基と反応可能な官能基であることが好ましい。しかし、該イムノアッセイにおいて使用される試薬に関して、X' は、任意の従来の担体と反応可能ないかなる官能基であってもよい。免疫原を作製するために式IIIの化合物が使用されるときには、式IIIの化合物中のX' は、ポリアミンポリマーに結合又は連結することができる任意の官能基であることが好ましい。

20

【0025】

定義

本明細書の全体にわたり、以下の定義を理解しておくべきである：

【0026】

「アルキレン」という用語は、1から10個までの炭素原子を含む2価の飽和した直鎖又は分岐鎖の炭化水素置換基を意味する。

30

【0027】

「免疫原」及び「免疫原性」という用語は、生物において免疫応答を誘発、生成、又は発生させることができる物質を指す。

【0028】

「コンジュゲート」という用語は、2つの部分を結合させて一緒にすることから形成されるあらゆる物質を指す。本発明による代表的なコンジュゲートとしては、式IIIの化合物又は式III-Aの化合物のような小分子と、担体、好ましくはポリアミンポリマーを含む担体、特に、タンパク質のような大分子とを結合させて一緒にすることによって形成されるものが挙げられる。該コンジュゲートにおいて、小分子は、大分子上の1つ又は複数の活性部位で結合又は連結され得る。コンジュゲートという用語には、免疫原という用語も含まれる。試薬として使用されるコンジュゲートにおいて、担体は、いかなる担体であってもよく、Xは、担体に連結可能ないかなる官能基であってもよい。免疫原において、担体は、ポリアミンポリマーであり、Xは、ポリアミンポリマーに連結可能ないかなる官能基であってもよい。

40

【0029】

「ハプテン」は、部分的又は不完全な抗原である。これらは、タンパク質を含んでいない物質、大抵は低分子量の物質であり、抗体形成を刺激することはできないが、抗体と反応する。後者は、ハプテンを高分子量の免疫原性担体にカップリングさせることと、次いで、このカップリングされた生成物、すなわち、免疫原をヒト又は動物の対象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、レナリドマイド(II)である。

50

## 【0030】

本明細書において、「スペーサー基」又は「スペーサー」とは、ハブテン、担体、免疫原、標識、又はトレーサーのような2つ以上の部分構造を $\text{CH}_2$ 又は官能リンカー基を通して連結する化学構造の一部を指す。これらのスペーサー基については、本出願において以下に列挙することになる。スペーサー基の原子及びスペーサー基中の鎖の原子は、それら自体が化学結合によって連結されている。中でも好ましいスペーサーは、直鎖又は分岐状の、飽和又は不飽和の炭素鎖である。これらの炭素鎖は、鎖中又は鎖の末端に1つ又は複数のヘテロ原子も含み得る。「ヘテロ原子」とは、酸素、窒素及び硫黄からなる群から選択される炭素以外の原子を意味する。スペーサー基は、鎖の一部として又は鎖中の原子のうち1個の上にある置換基として環状又は芳香族の基も含み得る。

10

## 【0031】

該スペーサー基中の原子の数は、水素以外の原子を計数することによって決定される。スペーサー基中の鎖中の原子の数は、連結されている部分構造間の最短経路に沿った水素以外の原子の数を計数することによって決定される。官能リンカー基は、ハブテンと標識又は担体若しくはポリアミンポリマーとのコンジュゲートを合成するためのハブテン又はスペーサー基を活性化するために、例えば、その上に利用可能な官能部位を提供するために、使用され得る。

## 【0032】

本明細書において、「免疫原性担体」という用語は、この場合にはレナリドマイド又は上で説明したレナリドマイド誘導体である、ハブテンと結合することができ、それによってこれらのハブテン誘導体が免疫応答を誘導してこれらのハブテン及びサリドマイドと特異的に結合できる抗体の産生を誘発するのを可能にする、一般的にはタンパク質である、免疫原性物質である。免疫原性担体及びリンカー基については、本出願において以下に列挙することになる。免疫原性担体物質には、異物として認識され、それによって宿主からの免疫応答を誘発する、タンパク質、糖タンパク質、複合ポリアミノ-多糖、粒子、及び核酸が含まれる。ポリアミノ-多糖は、その調製で知られている従来の方法のうちの任意のものを使用して多糖から調製することができる。

20

## 【0033】

多様なタンパク質の型も、ポリ(アミノ酸)免疫原性担体として用いられ得る。こうした型としては、アルブミン、血清タンパク質、リポタンパク質等が挙げられる。例示的なタンパク質としては、ウシ血清アルブミン(BSA)、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、卵オボアルブミン、ウシサイログロブリン(BTG)等が挙げられる。代替的に、合成ポリ(アミノ酸)が利用され得る。

30

## 【0034】

免疫原性担体には、単糖の繰り返し縮合によって構築された高分子量ポリマーである、ポリアミノ-多糖も含まれ得る。多糖の例は、デンプン、グリコーゲン、セルロース、アラビアガムのような炭水化物ガム、及び寒天等である。多糖には、ポリ(アミノ酸)残基及び/又は脂質残基も含まれる。

## 【0035】

免疫原性担体は、単独のポリ(核酸)、又は上述のポリ(アミノ酸)若しくは多糖のうちの一方とコンジュゲートしたポリ(核酸)のいずれかであってもよい。

40

## 【0036】

免疫原性担体は、固体粒子も含み得る。該粒子は、一般に、直径が、少なくとも約0.02ミクロン( $\mu\text{m}$ )であり、約100 $\mu\text{m}$ を超えず、通常は、約0.05 $\mu\text{m}$ から10 $\mu\text{m}$ までである。該粒子は、有機又は無機、膨潤性又は非膨潤性、多孔性又は非多孔性であってもよく、最適には、水に近い、一般に約0.7から1.5g/mLまでの密度を有し、透明、部分的に透明、又は不透明であり得る物質を含んでいてもよい。該粒子は、赤血球、白血球、リンパ球、ハイブリドーマ、連鎖球菌(*Streptococcus*)、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)、大腸菌(*E. coli*)、及びウィルス等の非限定的な例を含む、細胞及び微生物のような生体物質であって

50

もよい。該粒子は、有機及び無機のポリマー、リポソーム、ラテックス、リン脂質小胞、又はリポタンパク質も含み得る。

【0037】

「ポリ(アミノ酸)」又は「ポリペプチド」は、アミノ酸から形成されたポリアミドである。ポリ(アミノ酸)は、分子量の上限を有さず、一般に約2,000の分子量からの範囲に及ぶことになり、普通は10,000,000未満、通常は約600,000ダルトン未満である。免疫原性担体又は酵素が含まれているかどうかによって、通常は異なる範囲もあろう。

【0038】

「ペプチド」は、アミド(ペプチド)結合による2個以上のアミノ酸の結合によって形成されたあらゆる化合物であり、通常は、各アミノ酸残基の -カルボキシル基が隣の残基の -アミノ基に直鎖状に結合している -アミノ酸のポリマーである。ペプチド、ポリペプチド及びポリ(アミノ酸)という用語は、本明細書において、大きさについて限定することなくこのクラスの化合物を言及するのに同義的に使用される。このクラスの中で最も大きなものはタンパク質と呼ばれる。

10

【0039】

「標識」、「ディテクター分子」、又は「トレーサー」は、検出可能なシグナルを生成するか、又はその生成を誘導することができるあらゆる分子である。標識は、検体、免疫原、抗体に、又は別の分子、例えば受容体若しくは受容体に結合可能な分子、例えばリガンド、特にハプテン等にコンジュゲートさせることができる。標識の非限定的な例としては、放射性同位体、酵素、酵素断片、酵素基質、酵素阻害剤、補酵素、触媒、フルオロフォア、色素、化学発光体、発光体、又は増感剤；非磁性粒子若しくは磁性粒子、固体支持体、リポソーム、リガンド、又は受容体等が挙げられる。

20

【0040】

「抗体」という用語は、抗原の特異的タンパク質結合パートナーを指し、他の物質を排除して抗原に対して特異的な結合親和性を有する、あらゆる物質、又は物質群である。抗体という総称には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体及び抗体フラグメントが含まれる。

【0041】

「誘導體」という用語は、1つ又は複数の化学反応によって親化合物から生成された化学的な化合物又は分子を指す。

30

【0042】

「担体」という用語は、固体粒子及び/又は、例えば、上述のもののような免疫原性ポリマー等の、高分子ポリマーを指す。担体が固体粒子の場合には、式IIIの化合物中の末端官能基Xに結合するための1つ又は複数の反応部位を提供するために、好ましくはポリアミンポリマーである高分子材料が、固体粒子に結合、コーティング、又はそれ以外では付加されていてもよい。

【0043】

「試薬キット」、又は「試験キット」という用語は、アッセイを行う際に使用される材料の集合体を指す。試薬は、それらの交差反応性及び安定性に依存して、同一又は別々の容器中に、液体又は凍結乾燥された形態でパッケージングされた組合せで提供されてもよい。キットで提供する試薬の量及び比率は、特定の用途で最適の結果が得られるように選択することができる。本発明の特徴を実現する試薬キットは、式I及び式IIの化合物に特異的な抗体を含む。キットは、検体のリガンド並びに校正物質及び対照物質をさらに含んでいてもよい。試薬は、液体の形態のままであってもよく、又は凍結乾燥されていてもよい。

40

【0044】

「校正物質及び対照物質」という語句は、既知量の測定する薬剤を含有するあらゆる標準物質又は参照物質を指す。薬剤の濃度は、未知の試料で得られた結果を標準物質で得られた結果と比較することによって算出される。これは、一般的には、校正曲線を作成する

50

ことよって行われる。

【 0 0 4 5 】

「生体試料」という用語は、生物又は元生物からの任意の量の物質を含むが、これらに限定されない。こうした生物としては、ヒト、マウス、サル、ラット、ウサギ、ウマ、及び他の動物等が挙げられるが、これらに限定されない。こうした物質としては、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、軟骨細胞、滑膜マクロファージ、内皮細胞、及び皮膚等が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 4 6 】

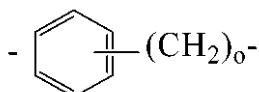
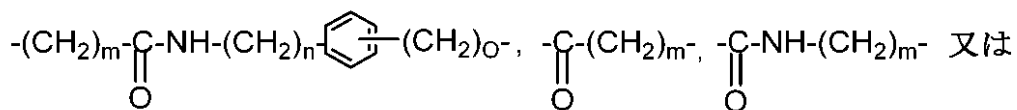
試薬及び免疫原

イムノアッセイの構築において、式 I V の化合物のコンジュゲートは、試料中でその抗体上の結合部位について式 I 又は式 I I の化合物と競合するように構築される。本発明のイムノアッセイにおいて、試薬は、担体と式 I V の化合物とのコンジュゲートである。式 I V の化合物において、リンカー Spacer は、この分子の「 - B - ( Y ) p - X ' - 」部分を構成する。このリンカー X ' 及び Spacer 「 - B - ( Y ) p - 」は、コンジュゲート及び免疫原を調製する際の従来型である。イムノアッセイ用のコンジュゲート及び免疫原を調製するのに利用される従来の Spacer - リンカー基のうちの任意のものを、式 I V の化合物において利用することができる。こうした従来のリンカー及び Spacer は、米国特許第 5, 5 0 1, 9 8 7 号及び米国特許第 5, 1 0 1, 0 1 5 号に開示されている。

【 0 0 4 7 】

好ましい Spacer 基の中には、本明細書中で前述した Spacer 基が含まれる。特に好ましい Spacer 基は、1 から 1 0 までの炭素原子を含むアルキレン、

【 化 6 】



[ 式中、m 及び o は、0 から 6 までの整数であり、n は、1 から 6 までの整数であり、アルキレンがあれば特に好ましい Spacer 基となる ]

等の基である。これらの式において、m は 0 であり、n は好ましくは 1 から 6 までの整数、最も好ましくは 1 又は 2 であり、o は好ましくは 0 又は 1 である。

【 0 0 4 8 】

式 I V の化合物において、X ' は、担体、好ましくは高分子担体上のアミン基に、Spacer を結合している - C H <sub>2</sub> - 又は官能基である。基 X ' は、担体に、好ましくは担体中に存在する又は免疫原として使用されるポリアミンポリマー中のアミノ基に、結合することができる、式 I I I の化合物中の末端官能基 X の結果である。担体に結合することができ、好ましくはアミンと反応することができるいずれの末端官能基も、式 I I I の化合物中の官能基 X として利用することができる。X 中に含まれていることが好ましいこれらの末端官能基は、以下のものである：

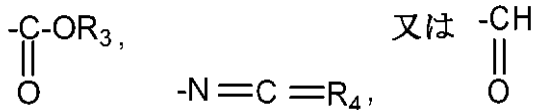
10

20

30

40

## 【化 7】



[ 式中、 $R_3$  は、水素であるか、又は結合した酸素原子と共に反応性エステルを形成しており、 $R_4$  は、酸素又は硫黄である ]。

## 【化 8】



10

基は、イソシアネート又はイソチオシアネートであってもよい。 $OR_3$  によって形成される活性エステルとしては、例えば 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、イミドエステル等が挙げられる。しかし、アミン基と反応可能なあらゆる活性エステルを使用することができる。

## 【0049】

カルボン酸基及び活性エステルは、従来の方法によって担体又は免疫原性ポリマーに結合される。タンパク質等の、ポリアミンポリマー上のアミン基は、本発明のポリマー、免疫原又は担体及び / 又はコンジュゲートにスペーサーを連結するアミド基を生成する。一方、担体は、リガンド部分に連結するためのアミノ基を供給するために、ポリアミンポリマーでコーティングされていてもよい。

20

## 【0050】

本発明の免疫原及びコンジュゲートにおいて、カルボキシル基を含むハプテンなどの式 I I I の化合物と、担体又は免疫原のポリアミンポリマー上のアミノ基との間の化学結合は、当業者に知られている多様な方法を使用して作製され得る。アミド結合の形成が好ましいことが多い。アミド結合は、まず、式 I I I の化合物中のハプテンのカルボン酸部分を活性化し、次いで、このカルボキシ基を脱離基試薬（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ル、o - ニトロフェノール若しくは p - ニトロフェノール、又はクロロギ酸 o - ニトロフェニル若しくはクロロギ酸 p - ニトロフェニル）と反応させることによって形成される。ジシクロヘキシルカルボジイミド、及びジイソプロピルカルボジイミド等の活性化試薬を使用することができる。次いで、式 I I I のハプテン中の活性化型のカルボキシル基を、タンパク質担体を含有する緩衝溶液と反応させる。ハプテンと担体とを結合する多様な方法は、米国特許 3, 996, 344 及び米国特許 4, 016, 146 にも開示されており、これらは参照により本明細書に組み込まれている。

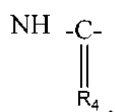
30

## 【0051】

式 I I I の化合物において、X が、末端のイソシアネート基又はイソチオシアネート基である場合、これらの基は、ポリアミンポリマーの遊離アミンと反応したときに、X' が

40

## 【化 9】



である、式 I V のハプテンのコンジュゲート又は免疫原を生成する。

50

## 【 0 0 5 2 】

式 I V のリガンドにおいて、X' は、ハプテンを、担体を含むポリアミン上の又は免疫原性ポリペプチド上のアミノ基と機能的に連結する。

## 【 0 0 5 3 】

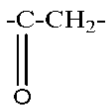
式 I I I の化合物中の、X がアルデヒド基を含む場合、これらの化合物を、還元的アミノ化によるアミン結合を通してポリアミンポリペプチドのアミノ基又は担体に連結することもできる。アルデヒドをアミンと縮合させるあらゆる従来法、例えば還元的アミノ化を通じたものなどを、この結合を形成するのに使用することができる。この場合には、式 I V のリガンド部分中の X' は、 $-CH_2-$  である。反応性カルボニルをアミン基と縮合させるあらゆる従来法を、この縮合反応を行う際に使用することができる。

10

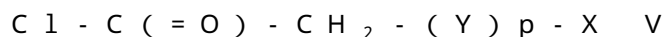
## 【 0 0 5 4 】

式 I I I の化合物は、B が次式のメチレンカルボニル：

## 【 化 1 0 】



であるときに、式 I I の化合物中のアミン基を次式の塩化アシル：



と縮合させることによって生成される。

20

## 【 0 0 5 5 】

第一級アミンを塩化アシルと反応させるあらゆる従来法を、この縮合法において使用することができる。式 I I I の化合物において、Y が低級アルキレンであり、B が上記のメチレンカルボニル基である場合、この化合物は、式 I I の化合物をグルタル酸無水物のようなジカルボン酸の無水物と処理することによって生成される。無水物を第一級アミン基と縮合させるあらゆる従来法を、この縮合反応を行う際に使用することができる。

## 【 0 0 5 6 】

式 I I I の化合物は、B が  $-CH_2-$  であるとき、式 I の化合物を次式のハロゲン化アルキル：

30



[ 式中、Y、p 及び X は、上記の通りである ]

と反応させることによって生成され得る。

## 【 0 0 5 7 】

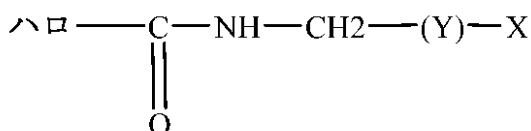
ハロゲン化アルキルを第一級アミン基と縮合させるあらゆる従来法を、この縮合反応を行う際に使用することができる。

## 【 0 0 5 8 】

式中の B が  $-C(=O) - NH - CH_2$  である式 I I I の化合物は、従来法を利用して式 I I の化合物をハロゲン化物又は次式：

40

## 【 化 1 1 】



## VIII

[ 式中、Y、p 及び X は、上記の通りである ]

と縮合させることによって生成され得る。

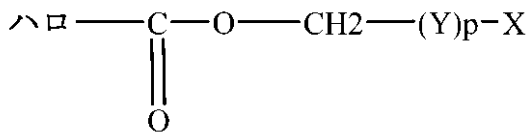
## 【 0 0 5 9 】

式中の B が  $-C(=O) - O - CH_2 -$  である式 I I I の化合物は、従来法を利用して

50

式 I I の化合物を次式の化合物：

【化 1 2】



IX

[ 式中、Y、p 及び X は、上記の通りである ]

と縮合させることによって生成され得る。

10

【0060】

式 V、V I I、V I I I、及び I X の化合物に反応性アミノ基並びに反応性カルボキシル基が含まれる場合には、式 I I I の化合物を形成するための反応中にアミン又はエステルの保護基を使用することが必要である。典型的には、これらのアミンは、対応する N - トリフルオロアセトアミド、N - t e r t ブチルオキシカルボニルウレタン ( N - t - B o c ウレタン )、N - カルボベンジルオキシウレタン又は同様の構造を形成することによって保護される。一度、上記のような、式 I の構造との縮合反応が完了すれば、このアミン又はエステルの保護基を、それ以外にはコンジュゲートの構造を変えない試薬を使用して除去することができる。こうした試薬及び方法は、当業者に知られており、水性又は無水の弱酸又は強酸、水性又は無水の弱塩基又は強塩基、水素化物を含有する試薬、例えば、水素化ホウ素ナトリウム又はシアノ水素化ホウ素ナトリウム等、及び接触水素化などが挙げられる。

20

【0061】

式 I I I の化合物は、この化合物を担体、好ましくはポリアミンポリペプチド、又は上で説明したようにポリアミンポリペプチドでコーティングされた担体、と反応させることによって本発明の免疫原及び / 又はコンジュゲート試薬に変換することができる。ポリアミン又はポリペプチドが免疫学的に活性であるならば、同一のポリペプチドを、本発明の免疫原において担体として、また免疫原性ポリマーとして利用することができる。しかし、イムノアッセイにおいて試薬として使用するコンジュゲートを形成するために、これらのポリマーは、免疫原に必要とされるような免疫学的応答を生成する必要はない。本発明によれば、式 I I I の化合物中で X によって表される多様な官能基は、担体に官能基を付加する従来の方法によって、担体にコンジュゲートさせることができる。好ましい一実施形態によれば、式 I I I の化合物において、X は、カルボン酸基又は活性カルボキシル基である。

30

【0062】

抗体

本発明は、新規な抗体、特に、上述の免疫原を利用することによって産生することができる、式 I の化合物及び式 I I の化合物並びにそれらの混合物に対するモノクローナル抗体にも関する。本発明に従って作製されるこれらの抗体は、式 I の化合物及び式 I I の化合物並びにこれらの混合物と選択的に反応性であることが見出されている。これらの抗体は、式 I の化合物及び式 I I の化合物のいずれについてのイムノアッセイとも干渉するはずである、式 I の化合物及び式 I I の化合物の薬学的に不活性でない代謝産物とは反応しない。これらの不活性な代謝産物とは反応しない本発明の抗体の能力により、これらの抗体は、式 I の化合物又は式 I I の化合物のいずれかについてのイムノアッセイを行う際に特に有用とされる。

40

【0063】

本発明は、式 I の化合物及び式 I I の化合物並びにそれらの混合物に対して選択的に反応性であるこれらの新規抗体に関する。本発明の抗血清は、本発明の免疫原で宿主動物を免疫化することによって都合よく作製することができる。好適な宿主動物としては、例えば、マウス、ラット、ウサギ、モルモット等のげっ歯動物、又はヤギ、ヒツジ、ウマ等の

50

高等哺乳動物等が挙げられる。初回投与、採血及び追加抗原注射は、動物において免疫応答を誘発するための受け入れられているプロトコルに従って行うことができる。定期的な採血を通して、免疫化したマウスの血液試料で、従来のイムノアッセイを利用して式 I 及び式 I I の化合物に対する免疫応答の獲得が認められた。これらの方法により、所望の活性を有する抗血清を産生する宿主及び抗体をスクリーニングする便利な方法が可能となる。

【 0 0 6 4 】

レナリドマイドと実質的に 1 0 0 % の選択的反応性を有し、サリドマイドとの選択的反応性が実質的にないか、又はサリドマイド及びレナリドマイドの双方と実質的に選択的に反応性である抗体は、式 I I I の免疫原を利用して、以下に開示しているスクリーニング法によって作製することができる。このスクリーニング法を使用して、レナリドマイド及びサリドマイドの化学療法剤の双方と反応性がある抗体を得ることができ、これは、これらの化学療法剤について任意の望ましい相対反応性を有するレナリドマイド及び抗体に対して特異的且つ選択的な抗体である。

【 0 0 6 5 】

これらの抗体の調製において、免疫原性担体を、式 I I I の免疫原とコンジュゲートさせることができ、マウス、ウサギ、ヒツジ、又はラット等の宿主動物の免疫化に使用することができる。式 I I I の化合物に対する免疫応答の獲得は、B S A と式 I I I の化合物とのコンジュゲートをコーティングしたマイクロタイタープレートを利用して E L I S A によってモニタリングすることができる。一度免疫応答が十分に獲得されれば、宿主動物の脾細胞を単離して、不死化された細胞系と融合させることができる。モノクローナル抗体の作製に関して、この融合細胞を、9 6 ウェルプレート上に播種して、ハイブリドーマ細胞を選択するための選択培地の存在下で培養することができる。ハイブリドーマ上清及び抗血清を、E L I S A によって抗レナリドマイド抗体の存在について試験することができる。陽性の E L I S A 結果が得られたウェルからの抗体を、間接的競合マイクロタイタープレートアッセイによってレナリドマイド及びサリドマイドの結合について試験することができる。レナリドマイド、サリドマイド及びこれらの代謝産物等の検体の  $I C_{50}$  値を、このアッセイから算出することができる。アッセイにおける検体の  $I C_{50}$  ( 5 0 % での阻害濃度 ) は、阻害アッセイにおいてアッセイでのシグナルが検体の存在しないアッセイでの総シグナルの 5 0 % であるときの試料中のその検体の濃度である。検体の選択的反応性は、% として表される  $I C_{50}$  の以下の比率から算出される： $100\% - ([I C_{50} - \text{検体} / (I C_{50} - \text{レナリドマイド} + I C_{50} - \text{サリドマイド})] \times 100)$ 。レナリドマイドと実質的に 1 0 0 % の選択的反応性を有し、サリドマイドとの選択的反応性が実質的にない抗体では、この値が 1 0 0 % に近づくことになる。 $I C_{50}$  の計算は、D . W i l d によって編集され、E l s e v i e r , A m s t e r d a m によって 2 0 0 5 に出版された、The I m m u n o a s s a y H a n d b o o k , p p 1 0 8 - 1 1 0 , 3 r d e d i t i o n 中に見出される方法に従って行われる。上記の式からわかるように、検体の  $I C_{50}$  は、検体の反応性に反比例する。レナリドマイド及びサリドマイドの双方と望ましい相対反応性を有するウェルからの細胞をスクリーニングして限界希釈によってサブクローン化することによって得て、サリドマイド及びレナリドマイドと望ましい反応性を有するモノクローナル抗体を産生している個々のクローンを単離することができる。

【 0 0 6 6 】

モノクローナル抗体は、スケジュールに従って B a l b / c マウスを免疫化し、その後、このマウスに追加の免疫原を、細胞融合の 3 日前から始めて連続して 3 日間、腹腔内又は静脈内に注射することによって作製するのが好都合である。抗体の技術分野においてよく知られている他のプロトコルも、当然同様に利用することができる。本明細書中で詳述している完全な免疫化プロトコルは、式 I 及び式 I I の化合物に対する抗体の血清抗体応答に最適なプロトコルを実現した。

【 0 0 6 7 】

10

20

30

40

50

宿主の脾臓、末梢血、リンパ節又は他の組織から得られるBリンパ球を、モノクローナル抗体産生細胞として使用することもできる。最も好ましいのは、脾臓から得られるBリンパ球である。本発明の所望のモノクローナル抗体を産生することができるハイブリドーマは、こうしたBリンパ球を、ハイブリッド細胞に長期間の組織培養安定性を付与する細胞系である不死細胞系と融合することによって得られる。本発明の好ましい実施形態において、不死細胞は、リンパ芽球腫細胞又は形質細胞腫細胞、例えば、骨髄腫細胞等であってもよい。レナリドマイド及びサリドマイドモノクローナル抗体を産生する、ネズミ科動物のハイブリドーマは、マウスの骨髄腫細胞と、上記免疫原性コンジュゲートに対して免疫化されたマウスからの脾細胞との融合によって形成される。キメラなヒト化モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞からの遺伝子を発現する抗体をクローン化し、当技術分野で現在よく知られている組換えDNA法を用いて、マウスの可変領域の部分配列をヒトの定常領域に結合するか、又はヒトのフレームワーク領域をドナーのマウス又はラットの免疫グロブリンからの相補性決定領域(CDR)と結合するかのいずれかによって作製することができる。親和性が高められた抗体を提供する、ネズミ科動物のモノクローナル抗体をヒト化するための改良された方法は、国際特許出願W O 9 2 / 1 1 0 1 8に記載されている。

10

20

30

40

50

#### 【0068】

一次抗体構造の一部のみを含むポリペプチド断片を作製することもでき、この断片は1種又は複数の免疫グロブリン活性を有する。これらのポリペプチド断片は、当技術分野においてよく知られている方法により、完全な抗体をタンパク分解で切断することによって、又はFabフラグメント又は(Fab')<sub>2</sub>フラグメントを作製するための部位特異的変異生成を使用して、抗体遺伝子を含む発現ベクター内の所望の位置に終止コドンを挿入することによって作製することができる。単鎖抗体は、VL領域及びVH領域をDNAリンカーと結合することによって作製することができる(Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85:5879-5883(1988)及びBird et al., Science, 242:423-426(1988)を参照されたい)。

#### 【0069】

本発明に従って作製された抗体は、式Iの化合物及び式IIの化合物の薬理的、治療的に活性でない代謝産物とのいかなる実質的な交差反応性も有することなく、式IIの化合物、又は式Iの化合物及び式IIの化合物の双方と選択的に反応性であり得る。実質的な交差反応性を有さないことは、本発明の抗体が、式Iの化合物及び式IIの化合物とのその双方の反応性に相対して、10%未満、好ましくは5%未満の交差反応性を有することを意味する。

#### 【0070】

本発明によれば、レナリドマイドと選択的に反応性であって、サリドマイドとの選択的反応性を有さない抗体を作製することができる。レナリドマイドについての選択的反応性を有し、サリドマイドとの選択的反応性がない抗体とは、その抗体が、サリドマイド及びレナリドマイドの双方とのその反応性又は結合に基づいて、レナリドマイドについて少なくとも95%の活性を有することを意味する。サリドマイドイムノアッセイにおいて利用するためには、その抗体が、レナリドマイド及びサリドマイドの双方と選択的に反応性であり、式I及び式IIの双方の化合物とのその反応性に基づいて10%未満の、式Iの化合物及び式IIの化合物の薬理的、治療的に活性でない上述の代謝産物との交差反応性を有し、サリドマイド及びレナリドマイドの双方とのその反応性に基づいて少なくとも10%の、サリドマイドとの反応性を有していなければならない。レナリドマイドイムノアッセイにおいて利用するためには、レナリドマイドと選択的に反応性であるか又はレナリドマイド及びサリドマイドの双方と選択的に反応性であり、式I及び式IIの双方の化合物とのその反応性に基づいて10%未満の、式Iの化合物及び式IIの化合物の薬理的、治療的に活性でない上述の代謝産物との交差反応性を有する、任意の本発明の抗体を使用することができる。

## 【 0 0 7 1 】

## イムノアッセイ

本発明によれば、該コンジュゲート及び式 I I I の化合物の免疫原から産生される該抗体は、患者の試料中の式 I 及び式 I I の化合物の決定のための試薬として利用することができる。この決定は、イムノアッセイによって行われる。患者の試料中の式 I 又は式 I I の化合物の存在を決定するために、式 I I I の化合物から形成される試薬コンジュゲートが、本発明に従って作製された抗体上の結合部位について、試料中の式 I 又は式 I I の化合物と競合するあらゆるイムノアッセイを利用することができる。レナリドマイド又はサリドマイドを含有すると考えられる試料において式 I 及び式 I I の化合物についてのこうしたアッセイを行う方法には、( a ) 水性媒体試料、( b ) 本発明に従って作製された、  
10  
式 I 及び式 I I の化合物に対する抗体、及び( c ) 式 I I I の化合物から形成される該コンジュゲートを組み合わせることが含まれる。試料中の式 I 又は式 I I の化合物は、該試料と抗体との混合物に添加された既知量のコンジュゲートの特異的抗体に対する結合の阻害を測定することによって決定することができる。既知量のコンジュゲートのこうした結合の、未知の試料による阻害の結果を、同様のアッセイにおいて式 I 又は式 I I の化合物の既知の標準溶液を利用することによって得られる結果と比較する。未知の試料中の式 I 又は式 I I の化合物の量を決定する際には、該試料、式 I I I の化合物から形成される該コンジュゲート、及び該抗体を、任意の順序で添加することができる。

## 【 0 0 7 2 】

抗体に結合した、式 I I I の化合物から形成されたコンジュゲートの量を測定するために、多様な方法を利用することができる。1つの方法は、コンジュゲートが抗体に結合することにより、フルオロフォアコンジュゲートの回転速度の低下が引き起こされるものである。液体混合物中のフルオロフォアコンジュゲートの回転速度の低下量は、米国特許第 4 , 2 6 9 , 5 1 1 号及び米国特許第 4 , 4 2 0 , 5 6 8 号に開示されているような蛍光偏光技術によって検出することができる。  
20

## 【 0 0 7 3 】

一方、該抗体は、ナノ粒子上にコーティング又は吸収されていてもよく、その結果、これらの粒子が式 I I I の化合物から形成される式 I 又は式 I I の化合物及びコンジュゲートと反応するときこれらのナノ粒子が集合体を形成ようになる。しかし、抗体をコーティング又は吸収したナノ粒子が試料中のサリドマイド又はレナリドマイドと反応する  
30  
ときには、これらのナノ粒子に結合した試料からのサリドマイド又はレナリドマイドは抗体ナノ粒子の集合を引き起こさない。この集合又は凝集の量は、アッセイ混合物において吸光度によって測定することができる。

## 【 0 0 7 4 】

一方、これらのアッセイは、抗体又は式 I I I の化合物のいずれかを、固体支持体、例えばマイクロタイタープレート、又は固体粒子等の他の従来 of 固体支持体に結合させることによって行うことができる。抗体及びタンパク質をこうした固体粒子に結合させることは、当技術分野においてよく知られている。こうした結合の実施には、任意の従来の方法を使用することができる。多くの場合、測定を補助するために、該抗体と結合している又は結合していない、式 I I I の化合物から形成されるコンジュゲートの量を検出する際  
40  
の補助として、抗体、コンジュゲート又は固体粒子上に、放射性標識又は酵素標識のような標識をつけることもできる。他の好適な標識としては、発色団、フルオロフォア等が挙げられる。

## 【 0 0 7 5 】

便宜上、本発明のアッセイ構成材料は、式 I 又は式 I I の化合物についてのアッセイに使用される所定量の新規試薬を含むパッケージングされた組合せである、キットで提供される。これらの試薬には、本発明の抗体、並びに、式 I I I の化合物から形成されたコンジュゲートが含まれる。本発明に従ってイムノアッセイを行う際に、所定のイムノアッセイにおいて使用される、試薬と、抗体を形成する免疫原とにおいて、基 p、X、Y 及び B は、これらの基のそれぞれについて定義される基の範囲内で、同一の置換基であってもよ  
50

く、又は異なる置換基であってもよい。したがって、基 p、X、Y、及び B の定義は、コンジュゲート試薬と免疫原とで同一であるが、これらの基によって示される特定の置換基は、所定のアッセイにおいて免疫原とコンジュゲート試薬とで異なってもよい。

【0076】

これらの必要な試薬に加えて、補助的な試薬のような添加物、例えば、安定剤、緩衝液等が含まれていてもよい。種々の試薬の相対量は、アッセイの感度を実質的に最適にする試薬の溶液中濃度を得るために幅広く変えることもできる。試薬は、溶液で又は、溶解時に、アッセイを行うのに適切な濃度を有する試薬溶液を提供することになる添加剤を含む、通常は凍結乾燥した、乾燥粉末として提供され得る。

【実施例】

【0077】

実施例において、以下のものを指すのに以下の略語を使用する：

H A T U O - ( 7 - アザベンゾトリアゾール - 1 - イル ) - N , N , N ' , N ' - テ  
トラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート

D I P E A N - N ' - ジイソプロピルエチルアミン

D M F ジメチルホルムアミド

T F A トリフルオロ酢酸

C H <sub>2</sub> C l <sub>2</sub> ジクロロメタン

D M S O ジメチルスルホキシド

N H S N - ヒドロキシスクシンイミド

s - N H S スルホ - N - ヒドロキシスクシンイミド

E D C 1 - ( 3 - ジメチルアミノプロピル ) - 3 - エチルカルボジイミドヒドロクロ  
リド

K L H キーホールリンペットヘモシアニン

B S A ウシ血清アルブミン

P B S リン酸緩衝生理食塩水

N a C l 塩化ナトリウム

H R P ホースラディッシュペルオキシダーゼ

A N S 8 - アニリノ - 1 - ナフタレンスルホン酸

T M B 3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジン

T R I S トリス ( ヒドロキシメチル ) アミノメタンヒドロクロリド

d i H <sub>2</sub> O 脱イオン水

リン酸緩衝液の組成には、

1 5 . 4 m M 二塩基性リン酸ナトリウム ( N a <sub>2</sub> H P O <sub>4</sub> )

4 . 6 m M 一塩基性リン酸ナトリウム ( N a H <sub>2</sub> P O <sub>4</sub> )

p H = 7 . 2 ± 0 . 1 0

を含有する水溶液がある。

【0078】

実施例において、以下のスキーム 1 ~ 2 は、実施例における番号によって参照される、調製した特定の化合物を示している。これらのスキームは、以下の通りである：

10

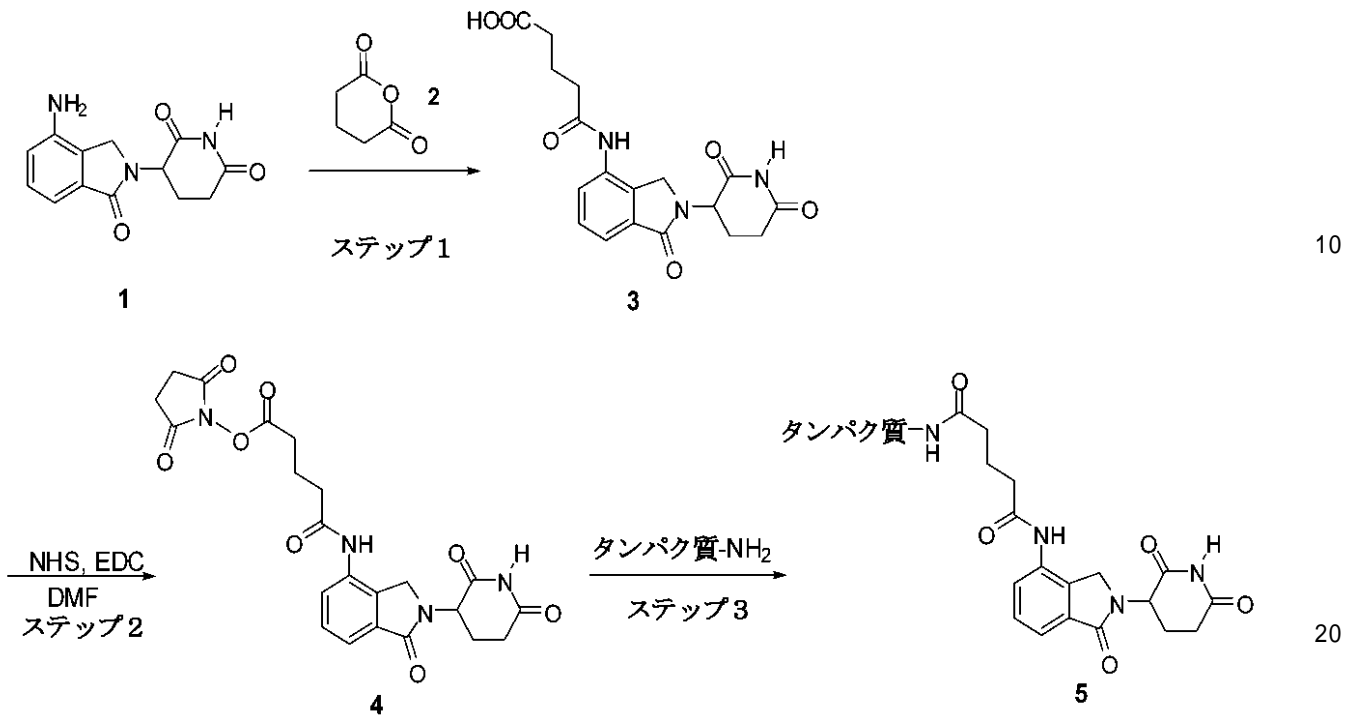
20

30

40

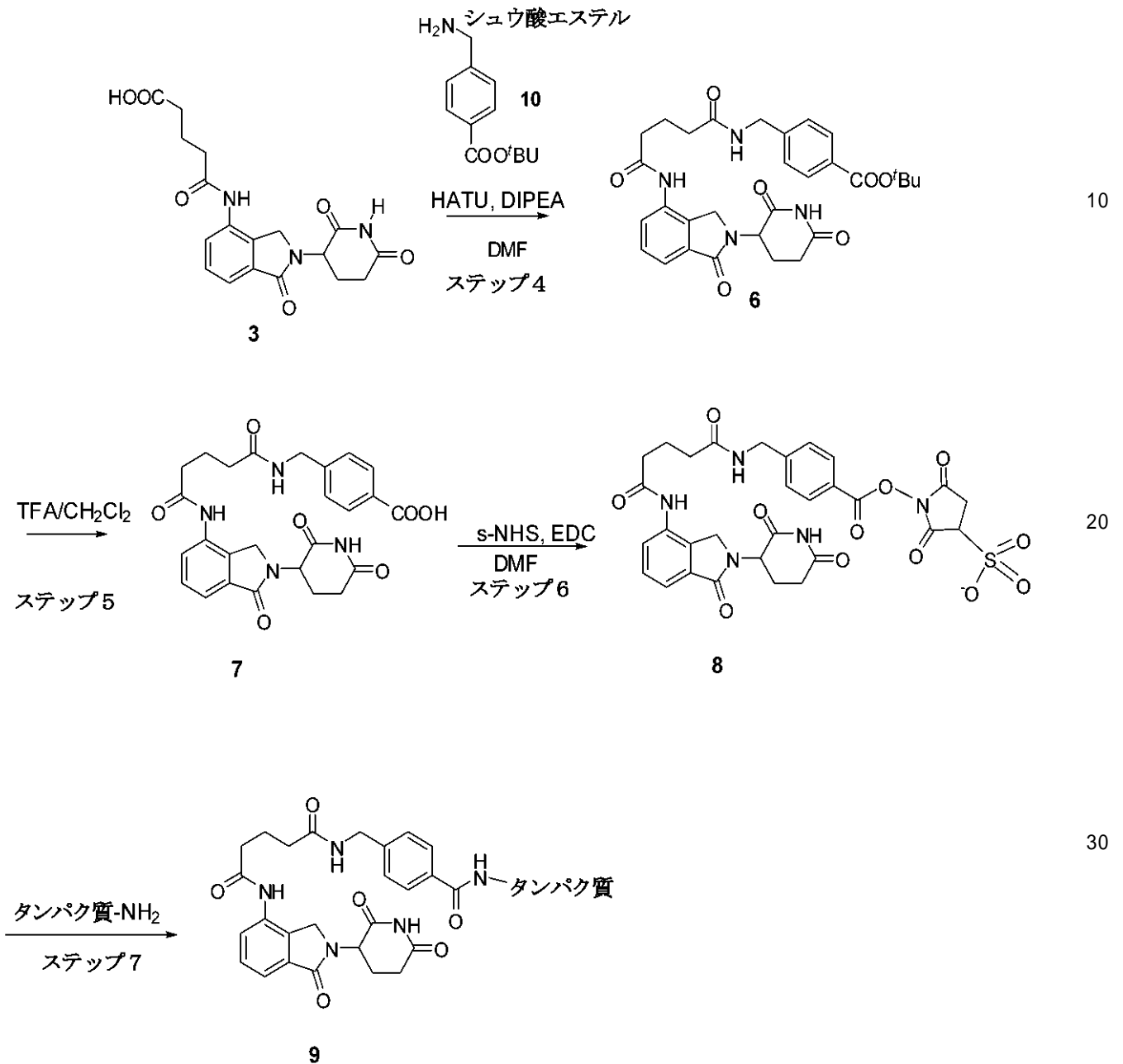
【化 1 3】

## スキーム 1



【化 1 4】

## スキーム 2



【 0 0 7 9】

(例 1)

レナリドマイド誘導体のカルバモイルペンタント (pentantonic) 酸誘導体 [ 3 ] の調製 (スキーム 1)

レナリドマイド [ 1 ] ( 1 . 0 g、 3 . 8 6 m m o l ) 及びグルタル酸無水物 [ 2 ] ( 0 . 4 8 g、 4 . 2 5 m m o l ) の無水トルエン中の混合物を窒素下で 3 . 5 時間加熱還流した。別のグルタル酸無水物 [ 2 ] ( 0 . 1 8 g、 1 . 5 3 m m o l ) を添加し、この混合物をさらに 2 時間加熱して [ 3 ] を生成させた。この混合物を 0 まで冷却し、 [ 3 ] を沈澱させた。この沈澱した固体を濾過し、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  で洗浄して 1 . 5 5 g の粗化合物 [ 3 ] を得た。この粗化合物をエタノール ( 2 0 m L ) /  $\text{H}_2\text{O}$  ( 1 m L ) から再結晶化させて、純粋な [ 3 ] ( 1 . 3 0 g、 9 0 % ) を白色固体として得た。

【 0 0 8 0】

10

20

30

40

50

(例2)

レナリドマイド誘導体のカルバモイル - ブチリルアミノ - 安息香酸メチル誘導体 [7] の調製 (スキーム2)

例1において生成した化合物 [3] (800 mg、2.14 mmol) を窒素下で無水DMF (20 mL) 中に溶解して、これに、ジイソプロピルエチルアミン (DIPEA) (1.27 mL、7.27 mmol) 及びアミン [10] (700 mg、2.35 mmol) を添加し、その後、HATU (1.88 g、4.93 mmol) を添加した。この反応混合物を25℃で24時間攪拌して、[6] を生成させた。フラスコの内容物を酢酸エチルで希釈した。その有機相 (酢酸エチル) を、1 Mの塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム及び水で洗浄した。次いで、この酢酸エチル層を硫酸ナトリウム上で乾燥させ、これを濾過して取り除いた。酢酸エチル溶媒の除去によって粗生成物 [6] が得られ、これを100%のEtOAc及び1~2%のMeOH/EtOAcを用いたフラッシュクロマトグラフィーによって精製して、純生成物 [6] (680 mg、57%) を白色固体として得た。【化15】

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  11.03 (s, 1H), 9.82 (s, 1H), 8.46 (t,  $J = 6.0$  Hz, 1H), 7.82-7.86 (m, 3H), 7.46-7.52 (m, 2H), 7.35 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 5.14 (dd,  $J = 5.0, 13.5$  Hz, 1H), 4.32-4.38 (m, 4H), 2.86-2.96 (m, 1H), 2.56-2.64 (m, 2H), 2.39 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 2.25 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 1.97-2.05 (m, 1H), 1.82-1.92 (m, 2H), 1.53 (s, 9H).

APCI $^-$  = 561.

【0081】

この白色固体 [6] (676 mg、1.20 mmol) をジクロロメタン (3 mL) 中に溶解した。この化合物 [6] の溶液に $\text{N}_2$ 下0℃でTFA (3 mL) を添加して、[7] を生成させた。ジクロロメタンを減圧下で除去して、得られた残留物 [7] をエーテルで粉末化して粗酸を単離した。この物質をEtOH水から再結晶化して、純粋な [7] (507 mg、83%) を得た。

【0082】

(例3)

NHS/s-NHSで活性化された薬剤誘導体を、対応する酸 [3] 及び [7] から調製する一般的な方法

レナリドマイド酸誘導体 [3] をEDC及びNHSで活性化して、タンパク質に対する最終的な結合 (例4及び5a) のための、NHSで活性化されたレナリドマイドのエステル [4] を作製した。レナリドマイド酸誘導体 [7] をEDC及びs-NHSで活性化して、最終的にタンパク質に結合させるための (例5b)、s-NHSで活性化されたレナリドマイドのエステル [8] を作製した。

【0083】

(例3a)

NHSで活性化されたレナリドマイドカルバモイルペンタン酸誘導体 [4] の調製

レナリドマイド誘導体 [3]、例1、スキーム1、(67.62 mg) を、7 mLのDMSO中に溶解し、これに、NHS (59.60 mg) 及びEDC (93.00 mg) を添加した。この反応混合物を、窒素雰囲気下、周囲温度で20時間攪拌して、NHSで活性化されたレナリドマイド誘導体のエステル [4] を作製した。この反応混合物を、例4及び5aにおいて直接使用した。

【0084】

(例3b)

s-NHSで活性化されたエステルレナリドマイドカルバモイル - ブチリルアミノ - メチ

### ル - 安息香酸誘導体 [ 8 ] の調製

レナリドマイド誘導体 [ 7 ]、例 2、スキーム 2 ( 16 . 3 mg ) を、1 . 6 mL の DMSO 中に溶解し、これに、s - NHS ( 25 . 3 mg ) 及び EDC ( 18 . 1 mg ) を添加した。この反応混合物を、窒素雰囲気下、周囲温度で 20 時間攪拌して、s - NHS で活性化されたレナリドマイド誘導体のエステル [ 8 ] を作製した。この反応混合物を、例 5 b において直接使用した。

【 0085 】

( 例 4 )

#### 活性化ハプテン [ 4 ] を有する K L H 免疫原の調製

300 mg の K L H を 15 mL のリン酸緩衝液 ( 50 mM、pH 7 . 5 ) 中に溶解することによって K L H のタンパク質溶液を調製し、その後、1 . 5 mL の DMSO 及び例 3 a において調製した、NHS で活性化されたレナリドマイド誘導体 [ 4 ] を 3 . 50 mL 添加した。K L H と、活性化されたレナリドマイド誘導体 [ 4 ] とのこの反応混合物を、室温で 20 時間攪拌させてレナリドマイド - K L H コンジュゲート [ 5 ] を作製した。次いで、このレナリドマイド - K L H コンジュゲート [ 5 ] を、リン酸緩衝液 ( 50 mM、pH 7 . 5 ) 中の 10 % DMSO に対する透析によって室温で精製した。その後、レナリドマイド - K L H コンジュゲート [ 5 ] を、室温でリン酸緩衝液 ( 50 mM、pH 7 . 5 ) に対して透析した。最後の透析は、4 でリン酸緩衝液に対して行った。このレナリドマイド - K L H コンジュゲート [ 5 ] を、紫外 - 可視分光法 ( UV / VIS ) によって特徴付けした。このコンジュゲートを希釈して、リン酸緩衝液 ( 50 mM、pH 7 . 5 ) 中 2 mg / mL の最終濃度にした。

10

20

【 0086 】

( 例 5 a )

#### 活性化ハプテン [ 4 ] を有する B S A コンジュゲートの調製

1 g の B S A をリン酸緩衝液 ( 50 mM、pH 7 . 5 ) 中に溶解して 50 mg / mL の最終濃度にするによって B S A のタンパク質溶液を調製した。この B S A のタンパク質溶液に、氷上で攪拌しながらゆっくりと DMSO ( 3 . 3 mL ) を添加し、その後、例 3 a において調製した、NHS で活性化されたレナリドマイド誘導体 [ 4 ] を 0 . 60 mL 添加した。B S A のタンパク質溶液に添加する、NHS で活性化されたレナリドマイド誘導体 [ 4 ] の量は、レナリドマイド [ 4 ] の誘導体と B S A との間で 1 : 1 のモル比で算出した。B S A と、活性化されたレナリドマイド誘導体 [ 4 ] とのこの混合物を、室温で 18 時間攪拌させて、活性化されたレナリドマイドエステル [ 4 ] と B S A とのコンジュゲートを作製した。次いで、このコンジュゲートを、リン酸緩衝液 ( 50 mM、pH 7 . 5 ) 中の 10 % DMSO に対する透析によって室温で精製した。その後、レナリドマイド - B S A コンジュゲート [ 5 ] を、室温でリン酸緩衝液 ( 50 mM、pH 7 . 5 ) に対して透析した。最後の透析は、4 でリン酸緩衝液に対して行った。精製したレナリドマイド - B S A コンジュゲート [ 5 ] を、UV / VIS 分光法によって特徴付けした。

30

【 0087 】

( 例 5 b )

#### 活性化されたハプテン [ 8 ] を有する B S A コンジュゲートの調製

0 . 5 g の B S A をリン酸緩衝液 ( 50 mM、pH 7 . 5 ) 中に溶解して 50 mg / mL の最終濃度にするによって B S A のタンパク質溶液を調製した。この B S A のタンパク質溶液に、例 3 b において調製した、s - NHS で活性化されたレナリドマイド誘導体 [ 8 ] を、氷上で攪拌しながらゆっくりと添加した。B S A のタンパク質溶液に添加する、s - NHS で活性化されたレナリドマイド誘導体 [ 8 ] の量は、レナリドマイドの誘導体 [ 8 ] と B S A との間で 1 : 1 のモル比で算出した。B S A と、活性化されたレナリドマイド誘導体 [ 8 ] とのこの混合物を、室温で 18 時間攪拌させて、活性化されたレナリドマイドエステル [ 8 ] と B S A とのコンジュゲートを作製した。次いで、このコンジュゲートを、リン酸緩衝液 ( 50 mM、pH 7 . 5 ) 中の 10 % DMSO に対する透析によって室温で精製した。その後、レナリドマイド - B S A コンジュゲート [ 9 ] を、室温

40

50

でリン酸緩衝液 (50 mM、pH 7.5) に対して透析した。最後の透析は、4 でリン酸緩衝液に対して行った。精製したレナリドマイド - BSA コンジュゲート [9] を、UV/VIS 分光法によって特徴付けした。

【0088】

(例 6 a)

レナリドマイド [3] に対するポリクローナル抗体の調製

10匹の雌のBALB/cマウスを、完全フロイントアジュバント中に乳化させた、例4において調製したような、100 µg / マウスのレナリドマイド - KLH 免疫原 [5] で腹腔内に免疫化した。これらのマウスに、初回注射の4週間後に、不完全フロイントアジュバント中に乳化させた100 µg / マウスの同一の免疫原で追加免疫を1回行った。追加免疫の20日後に、ポリクローナル抗体を含有する、各マウスからの試験採血を眼窩出血によって得た。レナリドマイド抗体を含有する、これらの試験採血からの抗血清を、例8及び9において評価した。

10

【0089】

(例 6 b)

レナリドマイド [3] に対するモノクローナル抗体の調製

例4において調製したレナリドマイド - KLH コンジュゲート [5] で免疫化した例6aからのマウスを、モノクローナル抗体の産生に使用した。モノクローナル抗体の場合は、融合の3日前から始めて、例4において調製した、PBS中の400 µg (融合の3日前)、200 µg (融合の2日前)、及び200 µg (融合の1日前)のレナリドマイド - KLH コンジュゲート [5] を該マウスに腹腔内注射した。脾細胞を、選択したマウスから単離して、Coligan, J. E. et al., eds., Current Protocols in Immunology, 2.5.1 - 2.5.8, (1992), Wiley & Sons, NYの方法に従って、50%のポリエチレングリコール1500を用いて $2 \times 10^7$ のSP2/0細胞で融合させた。この融合細胞を、10枚の96ウェルプレート上の、20%のFetal Clone I、2%のL-グルタミン(100 mM)及び2%の50 X HATを補ったDMEM/F12中に播種した。2週間から3週間後に、このハイブリドーマ上清を、(例8bにおけるような)ELISAによって抗レナリドマイド抗体の存在について試験した。陽性のELISA結果が得られたウェルからの細胞を、24ウェルプレートに展開した。これらのモノクローナル抗体を、例9に記載のような間接的競合マイクロタイタープレートアッセイによって、レナリドマイド及びサリドマイドの結合について試験した。ELISAによって陽性のクローンを、Coligan, J. E. et al., eds., Current Protocols in Immunology, 2.5.8 - 2.5.17, 1992, Wiley & Sons, NY中に開示されている方法に従って、限界希釈によって少なくとも1回サブクローン化した。

20

30

【0090】

(例 7 a)

レナリドマイド - BSA コンジュゲート [5] でのマイクロタイタープレート感作方法

レナリドマイド濃度を測定するためのELISA法を、タンパク質結合用に最適化されており、プレートあたり96個のウェルを含む、ポリスチレンマイクロタイタープレート(Nunc MaxiSorp F8 Immunomodules)中で行った。各ウェルを、0.05 Mの炭酸ナトリウム、pH 9.6中に10 µg / mLのレナリドマイド - BSA コンジュゲート [5] を300 µL添加して、室温で3時間インキュベートすることによって、(例5aにおけるように調製した)レナリドマイド - BSA コンジュゲート [5] でコーティングした。これらのウェルを0.05 Mの炭酸ナトリウム、pH 9.6で洗浄し、次いで、375 µLの5%ショ糖、0.2%カゼインナトリウム溶液で室温で30分間ブロッキングした。後からコーティングした溶液を除去した後に、このプレートを37 で一晩乾燥させた。

40

【0091】

50

(例7b)

レナリドマイド - BSAコンジュゲート [ 9 ] でのマイクロタイタープレート感作方法

レナリドマイド濃度を測定するためのELISA法を、タンパク質結合用に最適化されており、プレートあたり96個のウェルを含む、ポリスチレンマイクロタイタープレート (Nunc MaxiSorp F8 Immunomodules) 中で行った。各ウェルを、0.05 Mの炭酸ナトリウム、pH 9.6中に10 µg/mLのレナリドマイド - BSAコンジュゲート [ 9 ] を300 µL添加して、室温で3時間インキュベートすることによって、(例5bにおけるように調製した) レナリドマイド - BSAコンジュゲート [ 9 ] でコーティングした。これらのウェルを0.05 Mの炭酸ナトリウム、pH 9.6で洗浄し、次いで、375 µLの5%ショ糖、0.2%カゼインナトリウム溶液で室温で30分間ブロッキングした。後からコーティングした溶液を除去した後に、このプレートを37 °Cで一晩乾燥させた。

10

【0092】

(例8a)

抗体スクリーニング法 - 力価 (タイター)

この方法は、例9におけるような置換について試験する抗体の希釈率を見出すためのものである。(例6において作製した) レナリドマイド抗体をスクリーニングするためのELISA法を、例7a及び7bにおいて調製したレナリドマイド - BSAコンジュゲートで感作したマイクロタイタープレートを用いて行った。抗体スクリーニングアッセイは、ポリクローナルレナリドマイド抗体を含有する、(例6aにおけるような) 試験採血からのネズミ科動物の血清を、0.1%のBSA及び0.01%のチメロサルを含有するリン酸緩衝生理食塩水中で1:2,000、1:6,000、1:18,000及び1:54,000 (容積/容積) に希釈することによって行った。(例7a及び7bにおいて調製した) レナリドマイド - BSAで感作したウェルの各ウェルに、0.1%のBSA及び0.01%のチメロサルを含有する50 µLのリン酸緩衝生理食塩水及び50 µLの希釈した抗体を添加し、振盪しながら室温で10分間インキュベートした。このインキュベート中に、抗体が、ウェル中に受動的に吸収されたレナリドマイド - BSAコンジュゲート (例7a及び7b) に結合する。プレートのウェルを、0.02 MのTRIS、0.9%のNaCl、0.5%のTween-80及び0.001%のチメロサル、pH 7.8で3回洗浄し、結合していない抗体をすべて除去した。ウェル中でレナリドマイド - BSAコンジュゲートに結合したレナリドマイド抗体の量を検出するために、ネズミ科動物の免疫グロブリンと特異的に結合することができ、基質 (本例ではTMB) と共に培養したときに着色生成物を生成することができる、ヤギの抗マウス抗体 - HRP酵素コンジュゲート (Jackson ImmunoResearch) を、0.1%のBSA、0.05%のANS、0.01%のチメロサルを含むPBS中で特定の活性 (約1/3000) まで希釈して、これを各ウェルに100 µL添加した。振盪しながら室温で10分間インキュベートし、この間にヤギ抗マウス抗体 - HRP酵素コンジュゲートがウェル中でレナリドマイド抗体に結合し、その後、これらのプレートを再び3回洗浄して、結合していないヤギ抗マウス抗体 - HRP酵素コンジュゲートを除去した。ウェル中で測定可能な発色をさせるために、洗浄後に、HRPの基質であるTMB (TMB Substrate, BioFex) を100 µL添加して、振盪しながら室温で10分間インキュベートしている間に発色させた。発色のためのインキュベート後に、50 µLの停止液 (dH<sub>2</sub>O中1.5%のフッ化ナトリウム) を各ウェルに添加して発色を停止させ、20秒間振盪した後に、650 nmにおいて吸光度を決定した (Molecular Devices Plate Reader)。1ウェル中の抗体の量は、測定された吸光度に比例し、希釈率 (力価) として表され、1.5の吸光度という結果になった。力価は、測定された抗体の抗体希釈率 (x軸) 対吸光度650 nm (y軸) をグラフ化して、1.5の吸光度における力価を補間することによって決定した。1.5の吸光度が得られたこの力価により、例9に記載の間接的競合マイクロタイタープレートアッセイにおいて使用する抗体の濃度 (希釈率) を決定した。

20

30

40

50

## 【 0 0 9 3 】

( 例 8 b )

## 抗体スクリーニング法 - モノクローナルスクリーニング

( 例 8 b において作製した ) レナリドマイドモノクローナル抗体をスクリーニングするための E L I S A 法を、例 7 b に記載のレナリドマイド - B S A コンジュゲート [ 9 ] で感作したマイクロタイタープレートを用いて行った。( 例 7 b において調製した ) レナリドマイド - B S A で感作したウェルの各ウェルに、0 . 1 % の B S A 及び 0 . 0 1 % のチメロサルを含有する 5 0  $\mu$  L のリン酸緩衝生理食塩水及び次いで 5 0  $\mu$  L のモノクローナル培養液上清を添加し、振盪しながら室温で 1 0 分間インキュベートした。このインキュベート中に、抗体が、ウェル中でレナリドマイド - B S A コンジュゲートに結合する。プレートのウェルを、0 . 0 2 M の T R I S、0 . 9 % の N a C l、0 . 5 % の T w e e n - 8 0 及び 0 . 0 0 1 % のチメロサル、p H 7 . 8 で 3 回洗浄し、結合していない抗体をすべて除去した。ウェル中のレナリドマイド - B S A コンジュゲートに結合したレナリドマイド抗体の量を検出するために、ネズミ科動物の免疫グロブリンと特異的に結合することができる、ヤギの抗マウス抗体 - H R P 酵素コンジュゲート ( J a c k s o n I m m u n o r e s e a r c h ) を、0 . 1 % の B S A、0 . 0 5 % の A N S、0 . 0 1 % のチメロサルを含む P B S 中で 1 / 3 0 0 0 に希釈して、これを各ウェルに 1 0 0  $\mu$  L 添加した。振盪しながら室温で 1 0 分間インキュベートし、この間にヤギ抗マウス抗体 - H R P 酵素コンジュゲートがウェル中でレナリドマイド抗体に結合し、その後、これらのプレートを再び 3 回洗浄して、結合していないヤギ抗マウス抗体 - H R P 酵素コンジュゲートを除去した。ウェル中で測定可能な発色をさせるために、洗浄後に、H R P の基質である T M B ( T M B S u b s t r a t e、B i o F x ) を 1 0 0  $\mu$  L 添加して、振盪しながら室温で 1 0 分間インキュベートしている間に発色させた。発色のためのインキュベート後に、5 0  $\mu$  L の停止液 ( d i H <sub>2</sub> O 中 1 . 5 % のフッ化ナトリウム ) を各ウェルに添加して発色を停止させ、1 0 秒間振盪した後に、6 5 0 n m において吸光度を決定した ( M o l e c u l a r D e v i c e s P l a t e R e a d e r ) 。1 ウェル中の抗体の量は、測定された吸光度に比例した。バックグラウンドの 3 倍より大きい吸光度を有する試料が陽性であるとされた。例 8 b に記載のように、0 . 4 を超える吸光度を有する試料を 2 4 ウェルプレートに展開した。

10

20

30

## 【 0 0 9 4 】

( 例 9 )

## 間接的競合マイクロタイタープレートイムノアッセイ法

レナリドマイドに対する抗体の I C <sub>50</sub> の決定

I C <sub>50</sub> 値を決定するための E L I S A 法を、例 7 b に記載のレナリドマイド - B S A コンジュゲート [ 9 ] で感作したマイクロタイタープレートを用いて行った。検体、すなわちレナリドマイド及びサリドマイドを D M S O 中に溶解し、1 から 1 0 0 , 0 0 0 n g / m L の濃度範囲にわたって、d i H <sub>2</sub> O 中に希釈した。それぞれのアッセイは、5 0  $\mu$  L の検体溶液を、例 4 ( レナリドマイド ) の免疫原で例 6 a において産生されたポリクローナル抗体から選択される抗体のうちの 1 種の 5 0  $\mu$  L 及び例 8 b ( レナリドマイド及びサリドマイド ) において産生されたモノクローナル抗体から選択されるうちの 1 種の 5 0  $\mu$  L と共にインキュベートすることによって行った。これらのアッセイはすべて、ウェルのそれぞれにおいて、抗体の濃度を、例 8 a において決定された力価に希釈することによって行った。( 振盪しながら室温で ) 1 0 分間のインキュベート中に、( 例 7 b において作製した ) ウェル中のレナリドマイド - B S A コンジュゲートと、溶液中の検体とに対する抗体結合の競合が生じる。このインキュベート後に、プレートのウェルを、0 . 0 2 M の T R I S、0 . 9 % の N a C l、0 . 5 % の T w e e n - 8 0 及び 0 . 0 0 1 % のチメロサル、p H 7 . 8 で 3 回洗浄し、結合しなかった物質をすべて除去した。( 例 7 b において作製した ) ウェル中のレナリドマイド - B S A コンジュゲートに結合したレナリドマイド抗体の量を検出するために、ネズミ科動物の免疫グロブリンと特異的に結合するこ

40

50

とができ、基質（本例ではTMB）と共に培養したときに着色生成物を生成することができる、ヤギの抗マウス抗体-HRP酵素コンジュゲート（Jackson Immuno research）を、0.1%のBSA、0.05%のANS、0.01%のチメロサルを含むPBS中で予め決定された特定の活性（約1/3000）まで希釈して、これを各ウェルに100 $\mu$ L添加した。振盪しながら室温で10分間インキュベートし、この間にヤギ抗マウス抗体-HRP酵素コンジュゲートがウェル中でレナリドマイド抗体に結合し、その後、これらのプレートを再び3回洗浄して、結合していない二次コンジュゲートを除去した。ウェル中で測定可能な発色をさせるために、洗浄後に、HRPの基質であるTMB（TMB Substrate、BioF<sub>x</sub>）を100 $\mu$ L添加して、振盪しながら室温で10分間のインキュベートにおいて発色させた。発色のためのインキュベート後に、50 $\mu$ Lの停止液（dH<sub>2</sub>O中1.5%のフッ化ナトリウム）を各ウェルに添加して発色を停止させ、20秒間振盪した後に、650nmにおいて吸光度を決定した（Molecular Devices Plate Reader）。1ウェル中の抗体の量は、測定された吸光度に比例し、試料中のレナリドマイド又はサリドマイドの量に反比例した。レナリドマイド及びサリドマイドのIC<sub>50</sub>値は、ウェル中の吸光度をウェル中の検体濃度に対してプロットした、用量反応曲線を構築することによって決定した。検体を含有するウェルにおける色の吸光度を、検体を含まないものと比較して、標準曲線を作成した。所与の検体のIC<sub>50</sub>値は、検体を含有しないウェルの吸光度の50%を有するのに必要な検体の濃度として定義された。下記の表Iに、レナリドマイドに対するポリクローナル抗体についての結果がある。下記の表IIに、レナリドマイドに対するモノクローナル抗体についての結果がある。

10

20

【表1】

表 I

レナリドマイド-BSAコンジュゲート[9] (例7b) でコーティングされたプレートを使用した、レナリドマイドのIC<sub>50</sub>及びレナリドマイドに対するポリクローナル抗体(例6a)の力価。

採血番号	力価	IC <sub>50</sub> , ng/mL
1	51,000	84
2	66,000	59
3	28,000	3,400
4	15,000	2,200
5	111,000	510
6	5,200	810
7	9,300	80
8	9,400	870
9	58,000	570
10	18,000	9

30

40

【表 2】

表II

レナリドマイド-BSAコンジュゲート [9] (例7b) でコーティングされたプレートを使用し、レナリドマイドに対するモノクローナル抗体 (例6b) を使用した、レナリドマイド及びサリドマイドのIC<sub>50</sub>。

モノクローナル抗体番号	検体		サリドマイドに対する交差反応性%
	レナリドマイド	サリドマイド	
1H12	1	7	< 15%
6G1	11	992	< 2%
7E4	6	7	< 86%

10

【0095】

20

これらの表からわかるように、本発明の抗体は、レナリドマイド及びサリドマイドと実質的に反応性である。

【手続補正書】

【提出日】平成24年11月14日(2012.11.14)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

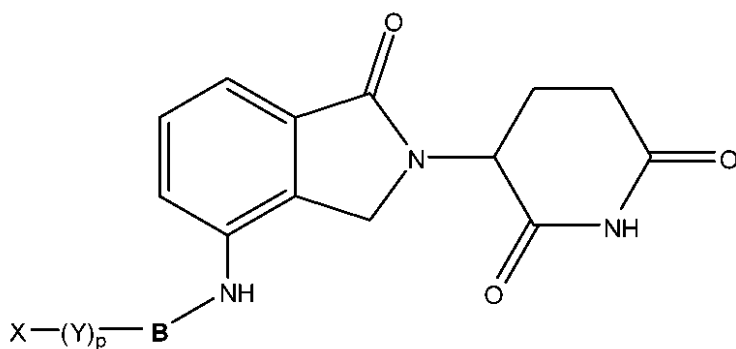
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料中のサリドマイドを検出するためのイムノアッセイであって、前記試料と、薬学的に活性な化学療法薬であるレナリドマイド及びサリドマイドの混合物と選択的に反応性であり且つ薬学的に活性な化学療法薬の前記混合物とのその反応性に基づいて少なくとも10%の、サリドマイドとの反応性を有する抗体と、次式を有するリガンド：

【化1】



III;

[式中、Bは、 $-C(=O)-CH_2-$ 、 $-C(=O)-NH-CH_2-$ 、 $-C(=O)-O-CH_2-$ 又は $-CH_2-$ であり、

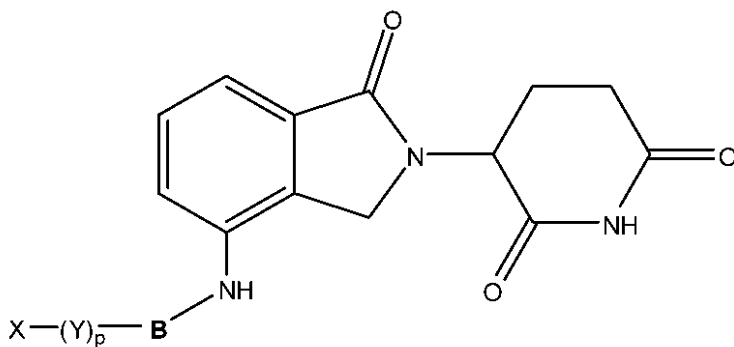
Y は、有機スペーサー基であり、  
 p は、0 から 1 までの整数であり、  
 X は、担体に結合することができる末端官能基である]

との担体のコンジュゲートとを含有する混合物を用意するステップと、前記試料中のサリドマイド及び前記コンジュゲートを前記抗体と結合させるステップと、その後、前記抗体に結合している又は結合していない前記混合物中の前記コンジュゲートを測定し、それによって前記試料中のサリドマイドの存在が検出可能となるステップとを含む上記イムノアッセイ。

【請求項 2】

試料中のレナリドマイドを検出するためのイムノアッセイであって、前記試料と、レナリドマイド及びレナリドマイドとサリドマイドとの混合物からなる群から選択される薬学的に活性な化学療法薬と選択的に反応性である抗体と、次式を有するリガンド：

【化 2】



III;

[ 式中、B、Y、p 及び X は請求項 1 に記載の定義のとおりである ]

との担体のコンジュゲートとを含有する混合物を用意するステップと、前記試料中のレナリドマイド及び前記コンジュゲートを前記抗体と結合させるステップと、その後、前記抗体に結合している又は結合していない前記混合物中の前記コンジュゲートの量を測定し、それによって前記試料中のレナリドマイドの存在が検出可能となるステップとを含む上記イムノアッセイ。

【請求項 3】

p が 0 である、請求項 1 または 2 に記載のイムノアッセイ。

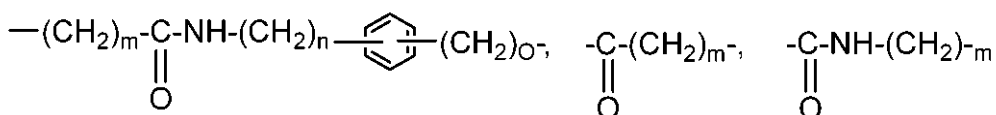
【請求項 4】

p が 1 である、請求項 1 または 2 に記載のイムノアッセイ。

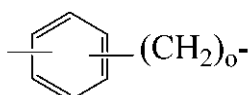
【請求項 5】

Y が、1 個から 10 個までの炭素原子を含むアルキレン、

【化 3】



又は



[ 式中、n 及び o は、0 から 6 までの整数であり、m は、1 から 6 までの整数である ]  
 である、請求項 4 に記載の イムノアッセイ。

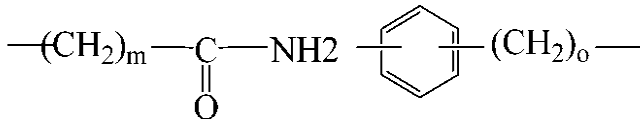
【請求項 6】

Y が、1 個から 6 個までの炭素原子を含む低級アルキレンである、請求項 5 に記載の イムノアッセイ。

【請求項 7】

Y が

【化 4】

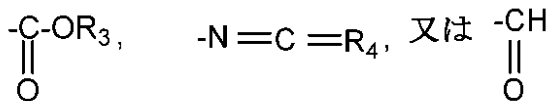


[ 式中、m 及び o は、請求項 5 に記載の定義の通りである ]  
 である、請求項 5 に記載の イムノアッセイ。

【請求項 8】

X が

【化 5】



[ 式中、R<sub>3</sub> は、水素又はそれに結合した酸素原子と共に反応性エステルを形成しており、R<sub>4</sub> は、酸素又は硫黄である ]  
 である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の イムノアッセイ。

【請求項 9】

X が

【化 6】

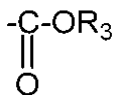


である、請求項 8 に記載の イムノアッセイ。

【請求項 10】

X が

【化 7】



であり、

R<sub>3</sub> が水素であるか；又は

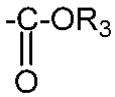
反応性エステル、好ましくは低級アルキルエステル、イミドエステル又はアミドエステルを形成している、

請求項 8 に記載の イムノアッセイ。

【請求項 1 1】

X が

【化 8】



であり、

OR<sub>3</sub> がヒドロキシスクシンイミドエステル又はスルホ - N - ヒドロキシスクシンイミドエステルを形成する、請求項 8 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 1 2】

B が - C ( = O ) - CH<sub>2</sub> - である、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載のイムノアッセイ。

【請求項 1 3】

前記試料がヒト試料である、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載のイムノアッセイ。

【請求項 1 4】

前記ヒト試料が、サリドマイドで治療した患者から採取された試料であり、前記イムノアッセイが、前記抗体に結合している又は結合していないコンジュゲートの量を測定することによって前記試料中のサリドマイドの量を測定する、請求項 1 3 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 1 5】

前記抗体が、前記化学療法薬とのその反応性に基づいて最少 1 0 % の、サリドマイドとの選択的反応性を有する、請求項 1 4 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 1 6】

前記ヒト試料が、レナリドマイドで治療した患者から採取された試料であり、前記イムノアッセイが、前記抗体に結合している又は結合していないコンジュゲートの量を測定することによって前記試料中のレナリドマイドの量を測定する、請求項 1 3 に記載のイムノアッセイ。

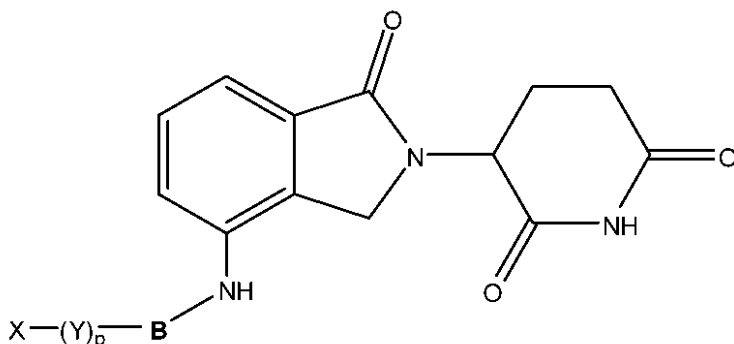
【請求項 1 7】

前記抗体が、前記化学療法薬とのその反応性に基づいて約 1 0 0 % の、レナリドマイドとの選択的反応性を有する、請求項 1 6 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 1 8】

前記抗体が、次式のリガンド：

【化 9】



[ 式中、Y、p 及び B は、請求項 1 ~ 7 及び 1 2 のいずれか 1 項に記載の定義の通りであり、X は、ポリアミンポリマーに結合することができる末端官能基である ]  
とコンジュゲートしたポリアミンポリマーを含む免疫原性担体を含む免疫原から作製され

る、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のイムノアッセイ。

【請求項 19】

前記抗体が固体支持体、好ましくはマイクロタイタープレート又はナノ粒子に結合されている、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載のイムノアッセイ。

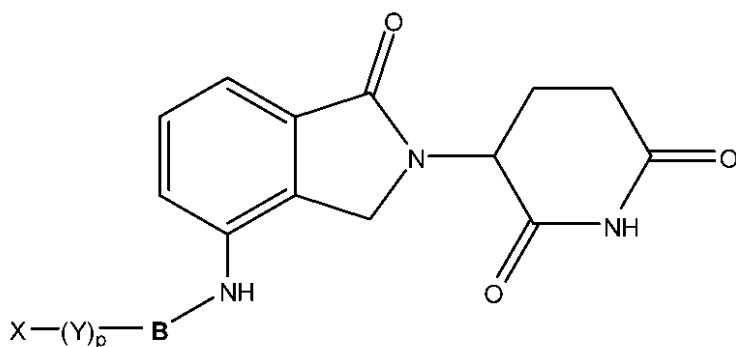
【請求項 20】

レナリドマイド及びレナリドマイドとサリドマイドとの混合物からなる群から選択される薬学的に活性な化学療法薬と選択的に反応性があり、好ましくは薬学的に活性な前記化学療法薬の薬学的に活性でない代謝産物と 12% を超えない交差反応性を有する抗体であって、前記交差反応性が、薬学的に活性な前記化学療法薬に対する前記抗体の結合に相対したものである、抗体。

【請求項 21】

前記抗体が、次式のリガンド：

【化 10】



[ 式中、B、Y、p 及び X は、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の定義の通りである ] とコンジュゲートしたポリアミンポリマーを含む免疫原性担体を含む免疫原から作製される、請求項 20 に記載の抗体。

【請求項 22】

前記抗体が、前記化学療法薬とのその反応性に基づいて少なくとも 10% の、好ましくは少なくとも 40% の、サリドマイドとの選択的反応性を有する、請求項 20 又は 21 に記載の抗体。

【請求項 23】

前記抗体が、前記化学療法薬とのその反応性に基づいて少なくとも約 20% の、好ましくは約 100% の、レナリドマイドとの選択的反応性を有する、請求項 20 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の抗体。

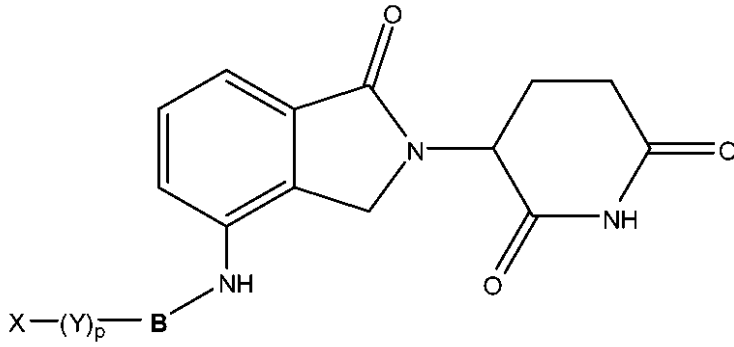
【請求項 24】

前記抗体が、モノクローナル抗体であり、好ましくはマウス、ヒツジ、ウサギ又はラットに由来する、請求項 20 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 25】

次式の化合物：

【化 1 1】



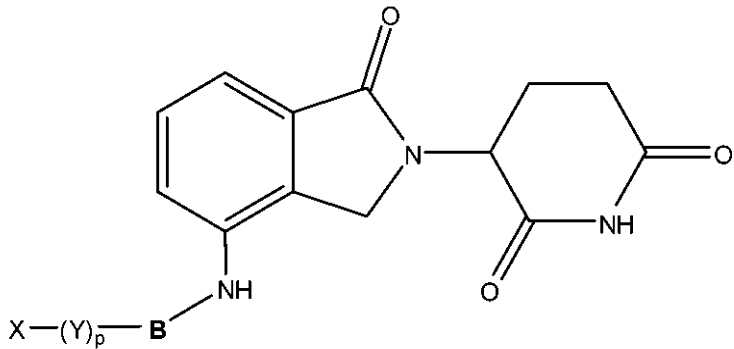
III;

[ 式中、B、Y、p 及び X は、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の定義の通りである ]。

【請求項 2 6】

次式のリガンド：

【化 1 2】



III

[ 式中、B、Y、p 及び X は、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の定義の通りである ] とコンジュゲートした担体を含むコンジュゲート。

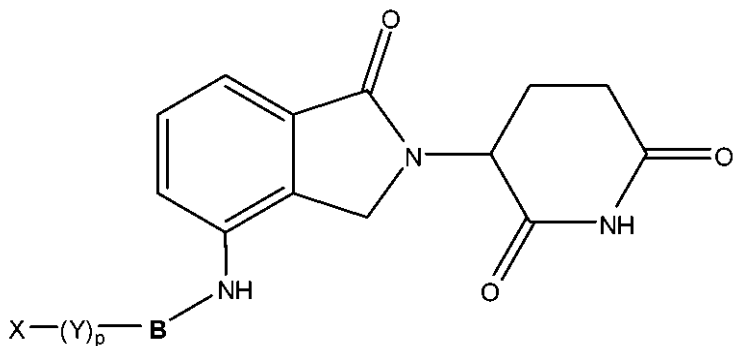
【請求項 2 7】

前記担体がポリアミンポリマーを含む免疫原性担体であり、X は前記ポリアミンポリマーに結合することができる末端官能基である、請求項 2 6 に記載のコンジュゲート。

【請求項 2 8】

患者の試料中のサリドマイドの存在を決定するためのキットであって、別々の容器中にパッケージングされた別々の試薬を含み、前記試薬のうち的一方が、次式のリガンド：

【化 1 3】

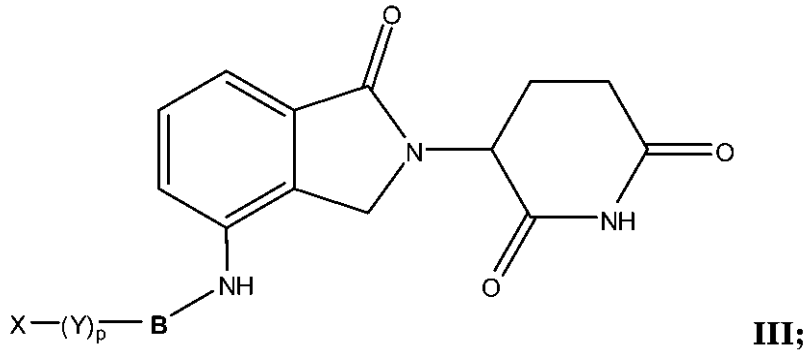


III;

[ 式中、B、Y、p 及び X は、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の定義の通りである ] との担体のコンジュゲートであり、他方の試薬が、薬学的に活性な化学療法薬であるレナリドマイド及びサリドマイドの混合物と選択的に反応性であり且つ薬学的に活性な化学療法薬の前記混合物とのその反応性に基づいて少なくとも 10% の、サリドマイドとの選択的反応性を有する抗体であるキット。

【請求項 29】

患者の試料中のレナリドマイドの存在を決定するためのキットであって、別々の容器中にパッケージングされた別々の試薬を含み、前記試薬のうち的一方が、次式のリガンド：  
【化 14】



[ 式中、B、Y、p 及び X は、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の定義の通りである ] との担体のコンジュゲートであり、他方の試薬が、レナリドマイド、及びサリドマイドとレナリドマイドとの混合物からなる群から選択される薬学的に活性な化学療法薬と選択的に反応性である抗体である、キット。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 11/25883
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A01N 43/38; A61K 31/40 (2011.01) USPC - 514/417 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC: 514/417 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 435/7.1; 514/300, 316, 323, 339, 419; 548/476 (see search terms below) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Electronic Database Searched: PUBWEST (PCPUB, EPAB, JPAB, USPT), Google, Search Terms Used Conjugate, carrier, chemothera\$, immunogen, immunoassay, lenalidomide, thalidomide, microtitor, polyamine, nanoparti\$		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X -- Y	US 2003/0096841 A1 (Robarge et al.) 22 May 2003 (22.05.2003) entire document especially table I, pg 22, compound I-46, terminal functional group X is amine; table I, pg 20, compound I-34, terminal functional group X is acetate group	36-52 ----- 1-20, 24-30, 33-35, 53-80  21-23 and 31-32
X -- Y	US 2007/0281320 A1 (Sabbadini et al.) 06 December 2007 (06.12.2007) especially para [0002], [0028], [0037]-[0040], [0044], [0070], [0089], , [0156], [0241]	1-20, 24-30, 33-35, 53-80
P/A	US 2010/0196392 A1 (Shiraishi et al.) 05 August 2010 (05.08.2010) entire document	1-80
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 06 April 2011 (06.04.2011)		Date of mailing of the international search report <b>19 APR 2011</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young  PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## フロントページの続き

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

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

(72) 発明者 サード、ハワード  
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ、アーリントン、ヒルサイド アヴェニュー 67

(72) 発明者 ヘッジ、ヴィシュヌマーシー  
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ、チェルムスフォード、リトルトン ロード 175、ナンバー エイ4

(72) 発明者 ヴォルコフ、アレグザンダー  
 アメリカ合衆国、ペンシルヴァニア、アレントاون、ウェスト ペンシルヴァニア ストリート 2440

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA19 CA20 DA13  
 4C063 AA01 BB02 CC10 DD07 EE10  
 4H045 AA11 AA30 DA76 EA50 FA74

专利名称(译)	来那度胺和沙利度胺免疫测定		
公开(公告)号	<a href="#">JP2013522594A</a>	公开(公告)日	2013-06-13
申请号	JP2012557073	申请日	2011-02-23
[标]申请(专利权)人(译)	萨拉戴克斯生物医学公司		
申请(专利权)人(译)	莎拉·达克斯生物医学公司		
[标]发明人	サラモネサルヴァトーレジェイ コートニージョディブレイク サードハワード ヘッジヴィシユヌマーシー ヴォルコフアレグザンダー		
发明人	サラモネ、サルヴァトーレ、ジェイ. コートニー、ジョディ、ブレイク サード、ハワード ヘッジ、ヴィシユヌマーシー ヴォルコフ、アレグザンダー		
IPC分类号	G01N33/53 C07D401/04 G01N33/543 G01N33/547 C07K16/44 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/44 C07D401/04 C07D401/14 G01N33/5308 G01N33/9453 Y10S436/815		
FI分类号	G01N33/53.S C07D401/04.CSP G01N33/543.525.E G01N33/547 C07K16/44 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/DA13 4C063/AA01 4C063/BB02 4C063/CC10 4C063/DD07 4C063/EE10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	12/722829 2010-03-12 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

来自来那度胺和由这些免疫原产生的抗体的新型缀合物和免疫原可用于免疫测定，用于定量和监测体液中的沙利度胺和来那度胺。

