

(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 - 201298

(P2003 - 201298A)

(43)公開日 平成15年7月18日(2003.7.18)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 0 7 K 7/64 16/44		C 0 7 K 7/64 16/44	4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	S

審査請求 有 請求項の数 13 O L (全 44数)

(21)出願番号 特願2002 - 366051(P2002 - 366051)  
(62)分割の表示 特願平3 - 354242の分割  
(22)出願日 平成3年11月20日(1991.11.20)  
  
(31)優先権主張番号 616116  
(32)優先日 平成2年11月20日(1990.11.20)  
(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 398032751  
デイド・ベーリング・マルブルク・ゲゼル  
シャフト・ミット・ベシユレンクテル・ハ  
フツング  
ドイツ連邦共和国 マルブルク/ラーン(番  
地なし)  
(72)発明者 ダリウシュ ダバリアン  
アメリカ合衆国カリフォルニア州サン ジ  
ョセ,ロムフォード ドライブ 5363  
(74)代理人 100066692  
弁理士 浅村 皓 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 シクロスポリン免疫アッセイ

(57)【要約】

【目的】 本発明はシクロスポリン含有試料中のシクロ  
スポリンの測定方法において、測定妨害物質の不活性化  
方法に関する。

【解決手段】 シクロスポリンを含有すると考えられる  
試料中のシクロスポリン量測定アッセイにおける妨害的  
交差反応性物質の不活性化方法であって、前記試料を含  
むアッセイ媒質を、妨害的交差反応性物質に結合可能な  
抗体と合併することを含んでなり、前記抗体がシクロス  
ポリン量測定アッセイを妨害しないものである方法を用  
いる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 シクロスポリンを含有すると考えられる試料中のシクロスポリン量測定アッセイにおける妨害的交差反応性物質の不活性化方法であって、前記試料を含むアッセイ媒質を、妨害的交差反応性物質に結合可能な抗体と合併することを含んでなり、前記抗体がシクロスポリン量測定アッセイを妨害しないものである方法。

【請求項2】 前記妨害的交差反応性物質が、前記シクロスポリンの代謝産物である請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記抗体が、シクロスポリン代謝産物M 10 - 1に結合し、シクロスポリンAに実質的に結合不可能な抗体である請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 シクロスポリンを含有すると考えられる試料中のシクロスポリン量測定アッセイにおいて、

a) 水性媒質中において:

- 1) シクロスポリンを含有すると考えられる前記試料、
- 2) 標識に接合されるシクロスポリン(シクロスポリン接合体)、

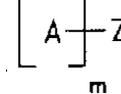
\* 3) シクロスポリンおよび前記シクロスポリン接合体に結合可能な第1の抗体、および

4) シクロスポリンの代謝産物に結合可能な第2の抗体を混合し; ならびに

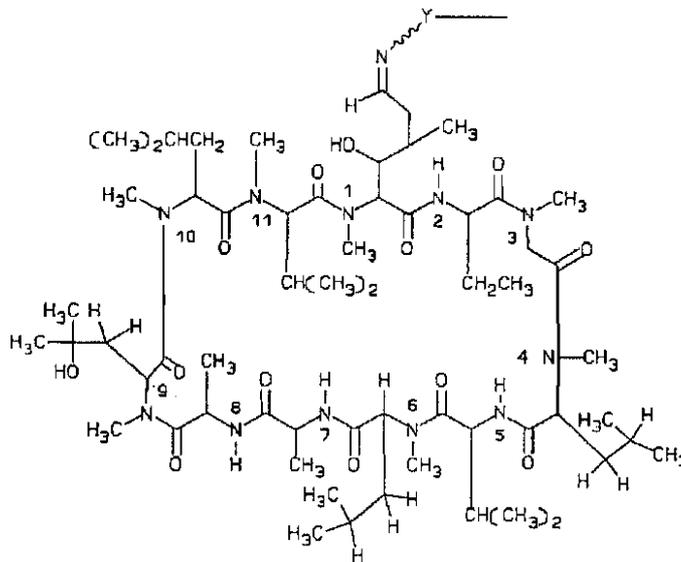
b) 前記標識の活性を測定する、工程を含んでなることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項5】 前記第2の抗体は、シクロスポリン代謝産物M 1に結合可能な抗体であるが、シクロスポリンAまたは前記シクロスポリン接合体に実質的に結合不可能である請求項4に記載の方法。

【請求項6】 前記第2の抗体が、式:



[式中: Zは免疫原性担体であり; mは、1からZの分子量を5000で割った値までの数であり; そしてAは、式:

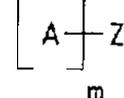


(式中、Yは、結合または水素以外約30個の原子以下の長さの鎖を有する1~60個の原子からなる連結基である)を有するシクロスポリン誘導体である]を有する化合物に対する応答により生じる抗体である、請求項4または5に記載の方法。

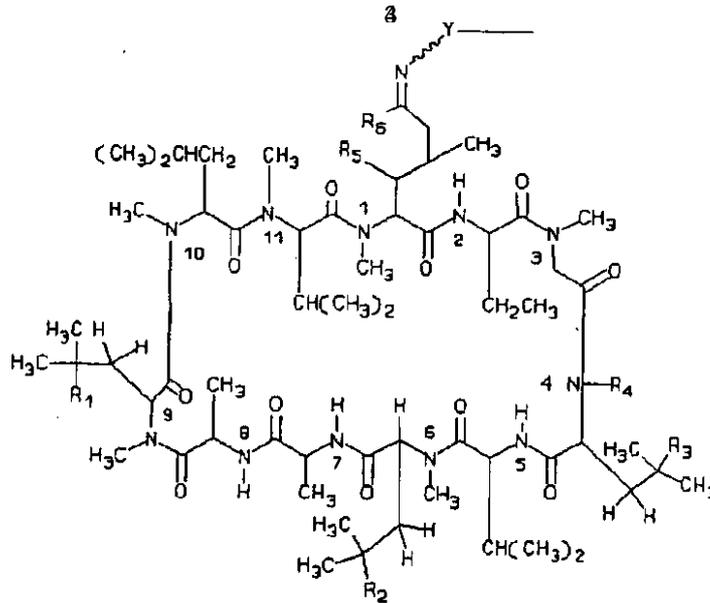
【請求項7】 グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ-ハプテン接合体(G6PDH接合体)およびシクロスポリンに対する抗体の免疫複合体から構成される組成物において、さらにシクロスポリン代謝産物に結合するが、シクロスポリンまたは前記G6PDH接合体には実

質的に結合しない第2の抗体を含む、請求項4に記載の方法において用いる組成物。

【請求項8】 式:



[式中、Zはヒドロキシル、標識、または分子量が5000を超える基であり; mは1からZの分子量を5000で割った値までの数であり; そしてAは、式:



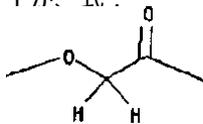
(式中、

Yは、結合または水素以外約30個の原子以下の長さの鎖を有する1~60個の原子からなる連結基であり； $R_1$ 、 $R_2$ および $R_3$ は、水素またはヒドロキシルであり、但し $R_1$ 、 $R_2$ および $R_3$ のうち少なくとも一つがヒドロキシルであり； $R_4$ は、水素または低級アルキルであり；そして $R_5$ はヒドロキシルであり、そして $R_6$ は水素である)を有するシクロスポリン誘導体である]を有する化合物。

【請求項9】  $R_5$ がヒドロキシルであり、そして $R_6$ が水素である請求項8に記載の化合物。

【請求項10】  $R_1$ がヒドロキシルであり、 $R_2$ および $R_3$ が水素であり、そして $R_4$ がメチルである請求項8または9に記載の化合物。

【請求項11】 Yが、式：



を有する請求項8、9または10のいずれか一つに記載の化合物。

【請求項12】 Zが免疫原性相体である、請求項8の化合物に反応して形成された抗体であって、同抗体はZが標識である請求項8に記載の化合物に結合可能であるが、シクロスポリンには実質的に結合不可能である、上記抗体。

【請求項13】 請求項8に記載の化合物の製造方法であって、

a) シクロスポリン代謝産物をアミノ酸残基番号1のオ

レフィン性側鎖において酸化的に分解し、

b) a)の生成物をアミノオキシアルカン酸と反応させ、

c) b)の生成物を接合のために活性化し、

d) c)の活性化生成物を、標識または免疫原性担体と反応させることにより、請求項8に記載の化合物を形成する工程、

を含んでなることを特徴とする方法。

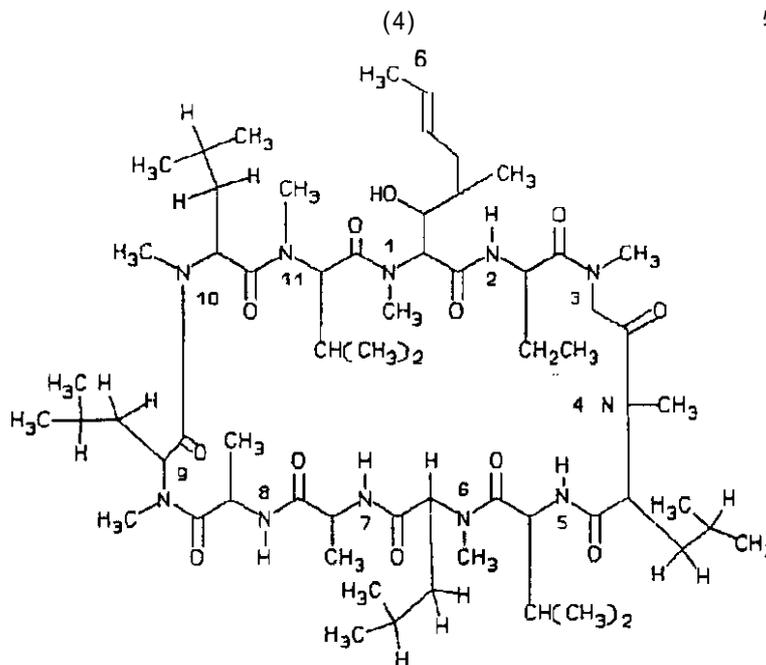
【発明の詳細な説明】

【0001】 1. 発明の分野

体は、自分と他とを区別する複雑な免疫応答系に頼っている。免疫系が正常に機能することは、体の長期にわたる健康のために肝要である。

【0002】 欠陥ある免疫応答は、自己を他者から護る体の能力の欠失を招き得る。過大な免疫応答は、他の場合は無害なものに対する体の過剰な反応を招き得る。時に応じ、体の免疫系は欠足する応答を増大させるか、あるいは過大な応答を抑制するために制御されなければならない。例えば、腎臓、心臓、心肺、骨髄および肝臓等の器官をヒトに移植した場合、時により体は、同種移植片拒絶と称される工程により移植組織を拒絶する。同種移植片拒絶の治療において、しばしば免疫系が、薬剤処置を通して制御された様式で抑制される。免疫抑制薬は、他者組織の同種移植片拒絶を防止するために、移植受容者に対して注意深く投与される。

【0003】 米国および他の国々において免疫抑制剤としての用途が見出されているシクロスポリン薬の一つは、シクロスポリンA(CsA)である。CsAは、一般構造：



を有する環状ウンデカペプチドであり、式中のシクロスポリンAの環状骨格を形成しているすべての - アミノ酸残基は、D - 配置である - アミノ酸8を除いてL - 配置である。アミノ酸残基1は、通常9個の炭素のアミノ酸である〔2S, 3R, 4R, 6E〕- 3 - ヒドロキシ - 4 - メチル - 2 - メチルアミノ - 6 - オクテン酸から誘導される。アミノ酸残基1、3、4、6、9、10、および11は、シクロスポリンAの環状骨格のアミド窒素原子においてN - メチル化されている。シクロスポリンAは、米国特許第4, 117, 118号(1978)および4, 396, 542号(1983)に記述されている。

【0004】CsAは、抗菌性、抗関節炎および抗炎症活性等の他の有用な性質を有し、また糖尿病、マラリアおよび自己免疫疾患等の他の症状の治療における用途も見出されるであろう。ウンデカペプチド環を保持している多数のCsA代謝産物が同定され、報告されている(Maurer, G.; Loosli, H.R.; Schreier, E.; Keller, B.のDrug Metabolism and Disposition, 1984, 12(1), 120 - 126, 該代謝産物の構造、命名および分析データを、ここに参考として取入れる)。CsAが同種移植片拒絶の防止のために使用された場合に、これらの代謝産物が所望の免疫抑制活性または何らかの望ましくない反応のいずれかにおいてどのような役割を演ずるものかは知られていない。

【0005】CsAは、極めて効果的な免疫抑制剤ではあるが、有効投与量の範囲が狭く、また過剰投与は深刻な副作用を生じるため、その使用は注意深く管理されなければならない。CsA治療を受け、過少なCsAが移植片拒絶を起こすであろう腎臓、心臓または肝臓移植患者において、腎機能不全、高血圧、心臓血管痙攣、多毛

症、にきび、振せん、痙攣、頭痛、ガム質過形成、下痢、悪心、嘔吐、肝毒性、腹部不快感、感覚異常、潮紅、白血球減少、リンパ腫、静脈洞炎、および女性化乳房等が観察されている。

【0006】CsA投与の管理は、患者内の該薬剤の存在水準の注意深い制御を含む。CsAの分布および代謝は、患者毎に大きく異なり、また逆反応の広い範囲および重篤さゆえに、薬物水準の正確な監視が基本的であると考えられる。

【0007】シクロスポリン検出のための実験室的方法が開発された。これらの技術は、典型的には高速液体クロマトグラフィ(HPLC)、放射免疫アッセイ(RIA)、または蛍光偏光免疫アッセイ(FPIA)に関する。例えば、Wolf, B.A.らのClinical Chem. 1989, 35(1), 120 - 124; Vernillet, L.らのClinical Chem. 1989, 35(4), 608 - 611; Ball, P.E.らのClinical Chem. 1988, 34(2) 257 - 260; Schran, H.F.らのClinical Chem. 1987, 33(12), 2225 - 2229; Sanghvi, A.らのClinical Chem. 1988, 34(9), 1904 - 1906; McBride, J.H.らのClinical Chem. 1989, 35(8), 1726 - 1730; Qusniaux, V.らのClinical Chem. 1987, 33(1), 32 - 37参照。

【0008】これらの技術のそれぞれは、手法の安全性および複雑さ、ならびに興味あるシクロスポリンに対する特異性の程度等においてある程度制限がある。例えば、HPLCは、長い試料調製および/または操作時間を、高いコストの労力集中的の方法を用いながら要求し、RIAは、放射性材料の取扱いについて周知の危険性を

与え、またFPIAは、非特異的モノ - またはポリクローナル抗体に基づく場合には、しばしばCSAとその代謝産物との間の区別がつかない。選択されたシクロスポリン類に対して特異的な単純な分析方法が、シクロスポリン治療の管理に使用するために必要とされる。

【0009】免疫アッセイは、シクロスポリンを含むと考えられる試料中のシクロスポリン量の単純な測定方法の要求には合致した技術である。しかしながら、興味あるシクロスポリンを認識し得る利用可能な抗体類のほとんどは、シクロスポリン代謝産物等の密接に関連する化合物をも認識し、交差反応を起こす。この交差反応のために、これらの抗体に依存する免疫アッセイは、興味あるシクロスポリンに対する特異性が、望まれる程度より低い。興味あるシクロスポリン以外の化合物と交差反応を起こす抗体に依存するシクロスポリン免疫アッセイは、交差反応性化合物が、興味あるシクロスポリンを認識する抗体による認識に対して実質的に不活性化された場合には改善され得るであろう。

【0010】本発明の方法および組成物は、シクロスポリン類についての単純な特異的免疫アッセイに関連する。本発明の方法および組成物は、シクロスポリンの免疫アッセイ方法における交差反応性化合物の不活性化方法にも関連するものである。

#### 【0011】2. 関連技術の簡単な説明

国際特許出願第8,602,080(1986)は、ある種のシクロスポリンに対して選択的なモノクローナル抗体を記述している。これらの抗体は、抗原性担体に対して8位の(D)-リジンまたは2位の(L)-スレオニン等の修飾アミノ酸残基を介して結合されたシクロスポリン類に対する応答において調製される。

【0012】ヨーロッパ特許出願第283,801号(1988)は、蛍光免疫アッセイ法および抗体産生に使用するシクロスポリンA誘導体を記述している。シクロスポリンAは、第1のアミノ酸残基のアミノ酸側鎖を介して免疫原性担体に連結されている。Cacalano, N.A.; Cleveland, W.L.; Erlanger, B.F.のJ. Immunol. Meth. 1989, 118, 257-263は、確かではないが多分、4-ベンゾイル安息香酸上のシクロスポリンAアルキル側鎖の無作為の光化学的結合を記述している。これらの結合は、抗体調製用の免疫原性担体への結合のために使用される。

【0013】米国特許第4,727,035号(1988)は、シクロスポリンの免疫アッセイ方法を記述している。該方法は、放射性ヨウ素または蛍光免疫アッセイのいずれかに関連する。

Quesniaux, V.F.J.; Tees, R.; Schreier, M.H.; Wenger, R.M.; Van Regenmortel, M.H.V.らのMolecular Immunology 19

87, 24(11), 1159-1168は、シクロスポリン-免疫原接合体に対する応答において生成する抗体を記述している。該接合体は、シクロスポリンに対して2または8のアミノ酸上の修飾側鎖を介して結合されている。

【0014】米国特許第4,764,503号(1988)、第4,639,434号(1987)および第4,384,996号(1983)は、第8のアミノ酸残基において修飾されたシクロスポリン類を記述している。これらのシクロスポリンは、アミノ酸側鎖においてヒドロキシル化され、免疫抑制剤として有用である。

#### 【0015】発明の要約

本発明は一局において、シクロスポリンを含むと考えられる試料中のシクロスポリン量の測定に有用な方法に関する。該方法は、a)水性媒質中に、1)シクロスポリンを含むと考えられる試料、2)シクロスポリンの環状骨格の一部であるアラニン窒素原子の一つにおいて、場合により連結基を介して標識に接合されるシクロスポリン、および3)該シクロスポリン標識接合体に結合可能な抗体類を合し;ならびに、場合によりb)該抗体類に結合する該シクロスポリン標識接合体の量を測定する工程を含む。

【0016】本発明の他の局面は、シクロスポリンを含むと考えられる試料中のシクロスポリン量測定アッセイにおいて、妨害交差反応物質を不活性化するために有用な方法に関する。該方法は、試料を含むアッセイ媒質を、該妨害交差反応物質を認識可能であってシクロスポリン量測定アッセイを実質的に妨害しない抗体と合する工程を含む。

【0017】本発明の他の局面は、シクロスポリンの環状骨格の一部であるアラニン窒素原子の一つにおいて、場合により連結基を介して標識に接合されるシクロスポリンに関するものである。これらの接合体は、本発明のアッセイ方法において有用である。

【0018】本発明の他の局面は、シクロスポリンの環状骨格の一部であるアラニン窒素原子の一つにおいて、場合により連結基を介して免疫原性担体に接合されるシクロスポリンに関する。これらの接合体は、本発明のアッセイ方法において使用するための抗体類の生成に有用である。

【0019】本発明の他の局面は、場合により連結基を介して標識に結合されるアチオシクロスポリンに関する。

【0020】本発明の他の局面は、場合により連結基を介して免疫原性担体に結合されるアチオシクロスポリンに関する。

【0021】本発明の他の局面は、シクロスポリンの環状骨格の一部であるアラニン窒素原子の一つにおいて、場合により連結基を介して免疫原性担体に接合されるシクロスポリンに対する応答により生成される抗体類に関

する。これらの抗体は、本発明のアッセイ方法において有用である。

【0022】本発明の他の局面は、場合により連結基を介して免疫原性担体に接合されるアチオシクロスポリンに対する応答により生成される抗体類に関する。これらの抗体は、妨害的交差反応物質の低減において有用である。

【0023】本発明の他の局面は、シクロスポリンの環状骨格の一部であるアラニン窒素原子の一つにおいて、場合により連結基を介して免疫原性担体または標識に接合されるシクロスポリンの調製方法に関する。

【0024】本発明の他の局面は、場合により連結基を介して免疫原性担体または標識に接合されるアチオシクロスポリンの調製方法に関する。

【0025】本発明の他の局面は、本発明のアッセイ方法の遂行に有用な試薬類に関する。

【0026】本発明の他の局面は、シクロスポリンのアッセイにおける妨害的交差反応物質の不活性化方法の遂行に有用な試薬類に関する。

【0027】本発明の他の局面は、本発明のアッセイ方法を都合良く遂行するために有用なキットに関する。

【0028】本発明の他の局面は、シクロスポリンのアッセイにおける妨害的交差反応物質の不活性化方法を都合良く遂行するために有用なキットに関する。

#### 【0029】特定の実施態様の記述

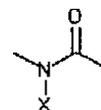
シクロスポリン免疫アッセイにおいて有用な方法、組成物、試薬およびキットが提供される。特定の実施態様の記述に先立って、多くの用語を定義しておく。

#### 【0030】定義

連結基 - 連結基は、2つ以上の準構造を連結している構造中の部位である。連結基は、準構造間に張り渡る水素（または他の一価原子）以外の原子の少なくとも一つの連続鎖を有している。連結基の原子および連結基内の鎖の原子は、それら自体化学結合により結合されている。連結基内の原子数は、水素以外の原子を計数することにより決定される。連結基内の鎖の原子数は、連結される準構造間の最短経路に沿った水素原子以外の原子数を計数することによって決定される。例えば、ジフェニルメタンは、1個の原子の鎖を含む1原子の連結基により連結された2個のベンゼン環を有し、スチルベンは、2個\* 40

\*の原子の鎖を含む2原子の連結基により連結された2個のベンゼン環を有し、1,2-ジフェニル-3-エチルシクロヘキサンは、2個の原子の鎖を含む8原子の連結基により連結された2個のベンゼン環を有する。

【0031】カルボキサミド基 - カルボキサミド基は、式：



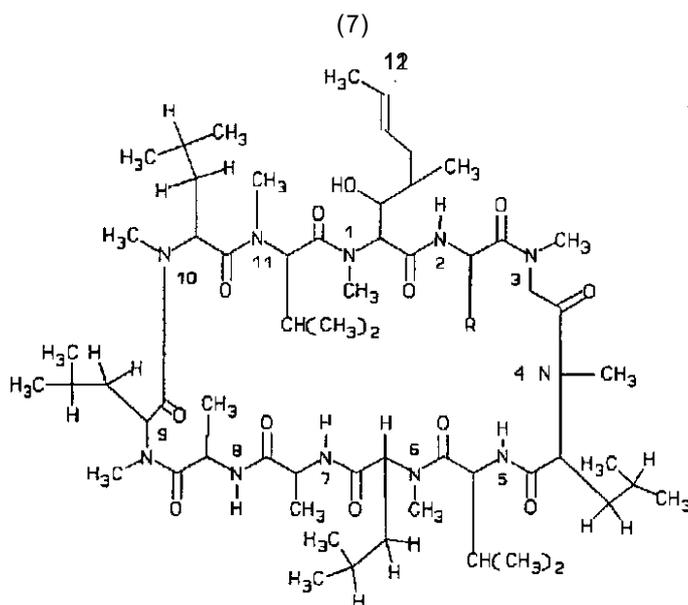
式中、Xは、水素、アルキル（約9個未満の炭素原子）、またはヒドロキシルアルキル（約9個未満の炭素原子）である、を有する準構造を含んだ構造中の一部である。Xは、好ましくは水素または水素原子以外に主として約9個未満の炭素原子、好ましくは約7個未満の炭素原子、更に好ましくは約5個未満の炭素原子を含む、場合によりヒドロキシル基で置換されていてもよい直鎖または分枝状アルキル基である。カルボキサミドは、典型的にはアルキレン鎖により互いに連結され、ポリ（ペプチド類）とも称されるポリ（カルボキサミド）を形成する。該アルキレン鎖は、好ましくは水素原子以外に主として約11個未満の炭素原子、好ましくは約9個未満の炭素原子、更に好ましくは約7個未満の炭素原子を含む、場合によりヒドロキシル基で置換されていてもよい直鎖または分枝状アルキル鎖である。

【0032】非 - オキソカルボニル - 式：



の一般構造を有するケトンまたはアルデヒド以外の基であって、式中、T<sub>1</sub>はカルコゲン（酸素または硫黄）または置換窒素であり、窒素の置換基は、例えばHまたはアルキルであってよい。非 - オキソカルボニル基の例は、カルボン酸（エステル類、アミド類、カルバメート類、カルボネート類、尿素類等）であり、また、それらの硫黄および窒素類似体も含む。

【0033】シクロスポリン - 本発明との関連において、シクロスポリン基は、天然または合成シクロスポリンまたは誘導体である。シクロスポリン基は、一般式：



【0034】式中、Rは、水素原子以外に主として約9個未満の炭素原子、好ましくは約7個未満の炭素を含む、場合によりヒドロキシル基で置換されていてもよい直鎖または分枝状アルキル基である、を有する環状のウンデカペプチドである。

【0035】例えば、シクロスポリンAにおいてRは、 $-CH_2CH_3$ であり、シクロスポリンBにおいてRは、 $-CH_3$ であり、シクロスポリンCにおいてRは、 $-CH(OH)CH_3$ であり、およびシクロスポリンDにおいてRは、 $-CH(CH_3)_2$ である。好適なシクロスポリン類は、シクロスポリンA、シクロスポリンB、シクロスポリンC、シクロスポリンD、シクロスポリンE、シクロスポリンF、シクロスポリンG、シクロスポリンH、およびシクロスポリンIを含む。

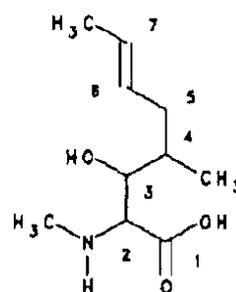
【0036】シクロスポリンの厳密な構造は、例毎に非主要部分で変わり得る。例えば、アミノ酸残基2-6、および9-11の側鎖構造の変化は、本発明の範囲において熟考される。更に、アミノ酸残基2-6、および9-11のアミド窒素原子上の付属置換基の構造変化は、本発明の範囲において熟考される。また更に、アミノ酸残基2-11の炭素の立体化学的絶対配置の変化は、本発明の範囲において、熟考される。

【0037】本発明の範囲内において、第1のアミノ酸残基は、実質的に修飾されずに保たれるであろう。更に、第7および第8のアミノ酸残基の一方または両者は、d-アラニン、l-アラニンまたはそれらの混合物であろう。

【0038】シクロスポリンのアラニン窒素原子-シクロスポリン分子の各環状ペプチド単位は、該シクロスポリン環の骨格の部分としてアミド窒素原子を含んでい  
30  
る。本発明の範囲において、アラニン残基のアミド窒素原子は、シクロスポリンのアラニン窒素原子である。例えば、これらはシクロスポリンA、CおよびDにおける第7および第8のアミノ酸残基、ならびにシクロスポリンDにおける第2、第7および第8のアミノ酸残基の窒

\*素原子である。

【0039】シクロスポリン第1アミノ酸残基の第6炭素原子-シクロスポリンA(CsA)の第1のアミノ酸残基は、遊離のアミノ酸〔2S, 3R, 4R, 6E〕-3-ヒドロキシ-4-メチル-2-メチルアミノ-6-オクテン酸の縮合形態である。Wenger, R.の米国特許第4, 396, 542号(1983); Wenger, R.M.のHelvetica Chim. Acta. 1983, 66(7), 2308-2321参照。この固有なアミノ酸は、N-メチル-(4R)-4-プト-2E-エン-1-イル-4-メチル(L)スレオニン(MeBmt)とも称される。Wegner, R.らの米国特許第4, 639, 434号(1987)参照。MeBmtの縮合および遊離形態の両者の構造および番号付けは、式:



に示される。

【0040】アチオシクロスポリン-その組成の面の一つにおいて、本発明は、第1のシクロスポリンアミノ酸残基を第6および第7の炭素原子を連結している結合で開裂させ、得られた開裂生成物を、場合により連結基を介して、標識、免疫原性担体、小有機分子等に接合することにより調製される化合物に関する。第1のアミノ酸の側鎖が、第6の炭素-第7の炭素結合において開裂される場合には、第7および第8の炭素原子は除去され、第6の炭素原子に官能基が導入される。

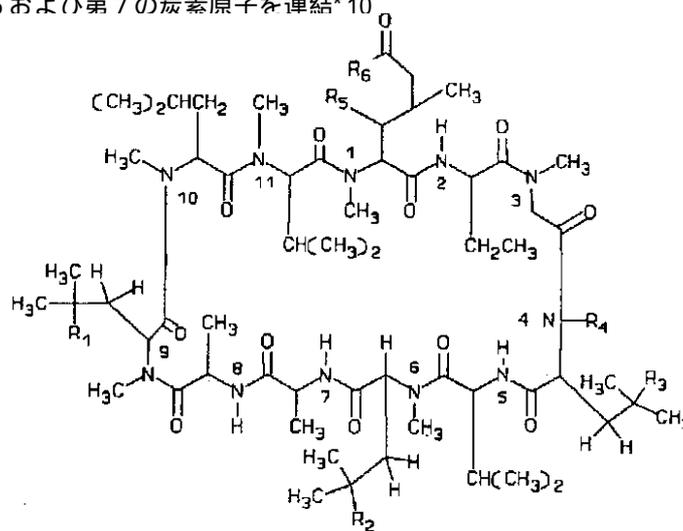
【0041】第6の炭素原子上の新たな官能基は、第6

の炭素原子の連結基、標識、免疫原性担体、小有機分子等への結合を許容するいずれの官能基でもよい。このような官能基は、複素原子含有基、好ましくはオキソカルボニルまたは非-オキソカルボニルを含む。第1のシクロスポリンアミノ酸残基の第7および第8の炭素原子が除去され、第6の炭素原子に官能基が導入されて得られたシクロスポリンを、アチオシクロスポリンと称する。

【0042】アチオシクロスポリンカルボキシアレヒド - 本発明の範囲において、シクロスポリンの第1のアミノ酸残基の側鎖が、第6および第7の炭素原子を連結\*

\*しているオレフィン性結合において酸化的に開裂され、第1のアミノ酸残基の側鎖の第7および第8の炭素原子が除去されて該第1のシクロスポリンアミノ酸残基の第6の炭素原子においてアルデヒド官能基を形成するように酸素原子により置換されたシクロスポリンを形成することが好ましい。

【0043】上述の好ましい化合物は、アチオシクロスポリンカルボキシアレヒドと称され、その構造は、式：



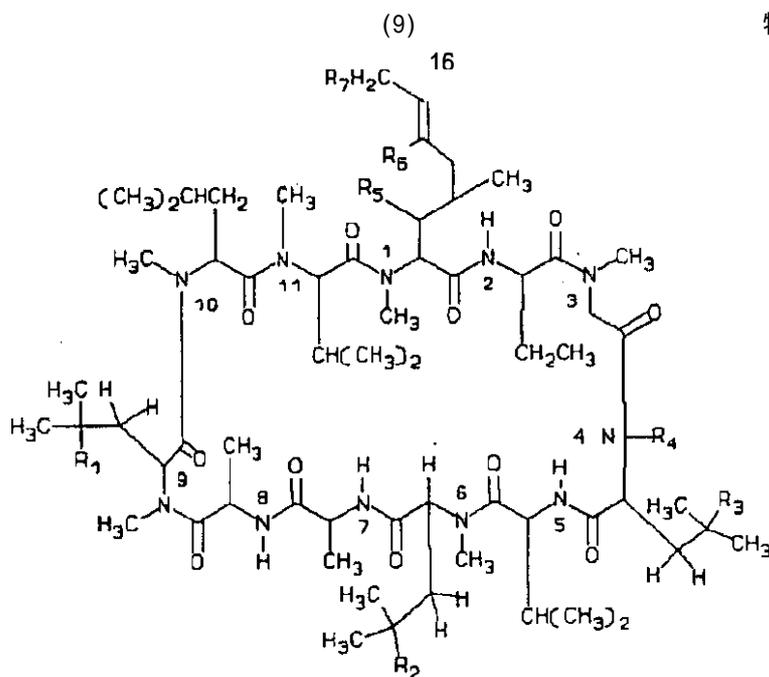
により示される。

【0044】 $R_1$ ,  $R_2$  および  $R_3$  は、H またはヒドロキシルであり、少なくとも一つがヒドロキシルである。 $R_4$  は、H またはメチルである。 $R_5$  は、ヒドロキシル、トリアルキルシロキシまたはアシロキシであり、 $R_6$  は、  
30 H である。更に好ましくは、 $R_1$  および  $R_5$  はヒドロキシルであり、 $R_2$ ,  $R_3$  および  $R_6$  は H であり、 $R_4$  はメチルである。この最も好ましい実施態様は、シクロスポリン A 代謝産物 M-1 から形成されるアチオシクロスポリンカルボキシアレヒドである。

【0045】妨害的交差反応性物質 - 興味あるシクロスポリンを認識し得る抗体類によって認識されるであろう興味あるシクロスポリン以外の物質は、妨害的交差反応

性物質である。そのような物質は、興味あるシクロスポリンに関連する化合物を含み得る。特に、ウンデカペプチド環を保存しているシクロスポリンの代謝産物は、共通する妨害的交差反応性物質である。Maurer らの  
30 前述に取入れた業績は、多くのシクロスポリン代謝産物を記述している。8種類の共通代謝産物の構造を下記に示す。これらの8種類の代謝産物は例示的なものであって排他的ではない妨害的交差反応性物質の例である。本発明は、その最も好ましい面における一つにおいて、妨害的交差反応性物質としてシクロスポリン A 代謝産物 M-1 に関連する。

【0046】



【0047】

代謝産物	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>
M 1	OH	H	H	CH <sub>3</sub>	OH	H	H
M 8	OH	H	H	CH <sub>3</sub>	OH	H	OH
M 9	OH	OH	H	H	OH	H	H
M 10	OH	H	OH	CH <sub>3</sub>	OH	H	H
M 16	OH	OH	H	CH <sub>3</sub>	OH	H	H
M 17	H	H	H	CH <sub>3</sub>	OH	H	OH
M 18	H	H	H	CH <sub>3</sub>	*	*	OH
M 21	H	H	H	H	OH	H	H

\* R<sub>5</sub>およびR<sub>6</sub>は酸素原子と共にテトラヒドロフラン環を構成し、またジエ

【0048】有機基は有機基結合基を有する分子の残基であるか、または小有機分子の残基である。有機基は、好ましくは免疫原性担体および標識をいずれかの連結基と共に含んでなる。有機基は、任意の数の原子を有してもよいが、好ましくは水素を含めて少なくとも5個の原子を含む。

【0049】小有機分子の残基 - 小有機分子の残基は、小有機分子の結合により誘導される基である。小有機分子は、ピオチン、フルオレセイン、ローダミンおよび他の染料、テトラサイクリンおよび他の蛋白質結合性分子、ならびにハプテン類等の分子量が約2000未満、好ましくは約100 - 1000、更に好ましくは約300 - 600の化合物である。該小有機分子は、シクロスポリンのアラニン窒素原子の一つにおいて、場合により連結基を介してシクロスポリンに結合（接合）可能である。該小有機分子がこのように結合した場合に、これは小有機分子の残基になる。

【0050】大有機分子の残基 - 大有機分子の残基は、30分子量が2000を越える分子を有する基であり、ポリ（アミノ酸）、リポポリサッカライド類、粒状物等を含む。このような基は、他の物のうちで標識または免疫原

性担体であり得る。

【0051】ポリ（アミノ酸） - ポリ（アミノ酸）は、アミノ酸から形成されるポリアミドである。ポリ（アミノ酸）は、ポリペプチドとも称され、一般的には約2,000からの分子量範囲にわたり、分子量の上限はないが通常10,000,000未満、普通には600,000ダルトンを越えない。また、通常は、抗原性担体であるか、または酵素が関与するかに依存して、異なる範囲となるであろう。

【0052】免疫原性担体 - 免疫原性担体は、シクロスポリンのアラニン窒素原子に対して場合により連結基を介して接合され、哺乳動物に注射された場合に、免疫応答を誘発し、シクロスポリンに結合する抗体類の産生を引起する基である。免疫原性担体は、抗原性担体とも称され、またこの技術で一般的な他の同義語により称される。

【0053】抗原性担体の分子量は、典型的には約2,000から10<sup>7</sup>の範囲、通常は約20,000 ~ 600,000、より普通には約25,000 ~ 250,000の範囲である。通常、150,000の分子量あたり少なくとも約1個のシクロスポリン基、更に通常に

は、50,000分子量あたり少なくとも約1個、好ましくは25,000の分子量あたり少なくとも1個が存在する。

【0054】ポリ(アミノ酸)抗原性物質として種々の型の蛋白質が使用されてよい。これらの型は、アルブミン類、グロブリン等の血清蛋白質類、水晶体蛋白質類、リポ蛋白質等を含む。例示的な蛋白質は、ウシ血清アルブミン(BSA)、キーホールリンペットヘモシアン(KLH)、卵アルブミン、ウシガンマ-グロブリン(BGG)等を含む。別法として、合成ポリ(アミノ

酸)を使用してもよい。  
【0055】該免疫原性担体は、モノサッカライドの反復する縮合により構築される高分子量ポリマーであるポリサッカライドであってもよい。ポリサッカライドの例は、デンプン、グリコーゲン、セルロース、アラビアゴム等の炭化水素ゴム、寒天等である。ポリサッカライドは、ポリアミノ酸残基および/または脂質残基を含んでいてもよい。該免疫原性担体は、単独または上述のポリ(アミノ酸)もしくはポリサッカライドの一つに接合するポリ(核酸)であってもよい。

【0056】該免疫原性担体は、粒状物であってもよい。該粒状物は、少なくとも約0.02ミクロンであるが約100ミクロンを越えないものが一般的で、通常は少なくとも約0.05ミクロンで約20ミクロン未満、好ましくは約0.3~10ミクロンの直径である。該粒状物は、有機または無機性の、膨潤性または非膨潤性、多孔性、または非多孔性の、好ましくは水に近似した密度を有する一般的には約0.7~1.5g/mLのものであって、透明、半透明または不透明材料からなっている。該粒状物は、例えば、赤血球、白血球、リンパ

球、ハイブリドーマ、ストレプトコッカス、スタフィロコッカスアウレウス、E.コリ、ウイルス等の細胞および微生物等、生物学的材料であってもよい。該粒状物は、有機または無機のポリマー、リポソーム、ラテックス粒子、リン脂質ベシクル、キロミクロン(chylomicrons)、リポ蛋白質等であってもよい。  
【0057】ポリマー類は、付加または縮合ポリマーのいずれであってもよい。これらから誘導される粒状物は、水性媒質中に容易に分散し、またシクロスポリン基に直接あるいは連結基を介して間接的に結合(接合)する

ように吸着性または官能性付与可能である。  
【0058】該粒状物は、天然産生材料、合成的に修飾された天然材料、および合成材料から誘導され得る。有機ポリマーのうち特に興味あるものは、ポリサッカライド、特にセファロースとして入手可能なアガロース、セファデックスおよびセファクリルとして入手可能なデキストラン、セルロース、デンプン等の交差結合ポリサッカライド; ポリスチレン、ポリビニルアルコール等の付加ポリマー類; アクリレートおよびメタクリレート等の誘導體であるホモポリマー類およびコポリマー類、等

には遊離のヒドロキシル官能基を有するエステル類およびアミド類等である。

【0059】該粒状物は、通常多官能性であり、シクロスポリン基に対して場合により連結基を介して結合されるか、あるいは結合(接合)可能である。多くの官能基が利用可能、または取込み可能である。官能基は、カルボン酸、アルデヒド、アミノ基、シアノ基、エチレン基、ヒドロキシル基、メルカプト基等を含む。多くの種類の化合物を粒子に連結する方法は、周知であり、また文献中に広く例示されている。例えば、CautrecasasのJ. Biol. Chem. 1970, 245, 3057が参考となり、その連結方法をここに参考として取入れる。

【0060】標識-標識は、信号を生成するか、あるいは生成を誘発され得る任意の分子である。該標識は、分析対象もしくは抗体に対し、または他の分子、例えばレセプタ、もしくはレセプタに結合可能なリガンド等、特にハプテンに対して接合されてよい。この発明において、標識は、以下に記述されるように信号生成手段を含む信号生成系の一つであり得る。

【0061】該標識は、同位体的または非同位体的なものであって、好ましくは非同位体である。限定ではなく、例示のために、標識は、酵素、酵素断片、酵素基質、酵素阻害剤、補酵素、または触媒等の触媒反応系の一部; 蛍光剤、染料、化学発光剤、発光剤、または感応剤等の発色原系の一部; 非磁性または磁性であり得る分散性粒子、固体担体、リポソーム、リガンド、レセプタ、ハプテン、放射性同位体等である。

【0062】酵素、酵素断片、酵素阻害剤、酵素基質、および酵素反応系の他の成分を標識として使用し得る。これらの成分のいずれかを標識として使用する場合、該成分の一つに関連する化学反応は、信号生成系の一部である。酵素類を使用する場合、分子量は、典型的には約10,000~600,000の範囲、更に普通には約10,000~300,000の範囲であり、また関与する反応は、多くの場合加水分解または酸化還元反応であろう。結合触媒は、非酵素的触媒と共に酵素を含むことができる。該酵素は、該非酵素的触媒による触媒反応を進行させる反応試剤を生成するか、あるいは該非酵素的触媒は、該酵素の基質(補酵素を含む)を生成し得る。使用可能な多様な非酵素的触媒は、米国特許第4,160,645号(1979)に見出され、その適切な部分をここに参考として取入れる。

【0063】使用される該酵素または補酵素は、染料等の光吸収、または蛍光体等の輻射により光を放射する生成物の産生により、所望の増幅を与える。別法として、触媒反応は、例えば化学的発光等、直接的放射を導き得る。このような生成物を与える多数の酵素および補酵素が、米国特許第4,275,149号の19~23欄および米国特許第4,318,980号の10~14欄に

示されており、その開示をここに参考として取入れる。多数の酵素の組合せが、米国特許第 4, 275, 149 号の 23 ~ 28 欄に示されており、その組合せは、本発明において用途が見出され得る。この開示をここに参考として取入れる。

【0064】特に興味あるものは、過酸化水素の生成に関与する酵素であり、また過酸化水素の染料前駆体を染料へと酸化するための用途である。特定の組合せは、例えば、グルコースおよびガラクトースオキシダーゼ等のサッカライドオキシダーゼ、またはウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼ等の複素環オキシダーゼと組合せられる、過酸化水素を染料前駆体の酸化のために使用する酵素、すなわち西洋ワサビパーオキシダーゼ、ラクトパーオキシダーゼまたはマイクロパーオキシダーゼ等のパーオキシダーゼを含む。他の酵素の組合せは、参考として取入れた主題中に見出されるであろう。

【0065】単一の酵素を標識として使用する場合、用途が見出されるであろう酵素は、ヒドロラーゼ、トランスフェラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼまたはシンターゼおよびオキシドリダクターゼであり、好ましくはヒドロラーゼである。別法として、ホタルのルシフェラーゼおよび細菌性ルシフェラーゼ等のルシフェラーゼも使用することができる。主として I . U . B 分類に基づき酵素の選択は：クラス 1 のオキシドレダクターゼおよびクラス 3 のヒドロラーゼ；特に、クラス 1 において興味ある酵素はクラス 1 . 1、更に特定のには 1 . 1 . 1、1 . 1 . 3 および 1 . 1 . 99 のデヒドロゲナーゼ、およびクラス 1 . 11 のパーオキシダーゼである。ヒドロラーゼについては特にクラス 3 . 1、更に特定のには 3 . 1 . 3 およびクラス 3 . 2、更に特定のには 3 . 2 . 1 である。

【0066】例示的なデヒドロゲナーゼとしては、マレーエートデヒドロゲナーゼ、グルコース - 6 - リン酸デヒドロゲナーゼ、およびラクテートデヒドロゲナーゼを含む。オキシダーゼとしては、グルコースオキシダーゼが例示される。パーオキシダーゼとしては、西洋ワサビパーオキシダーゼが例示的である。ヒドロラーゼとしては、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼおよびリゾチームが例示的である。ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) またはそのホスフェート (NADP) を補酵素として使用するこれらの酵素は、特に前者を使用する。一つの好ましい酵素は、グルコース - 6 - リン酸デヒドロゲナーゼ、好ましくは NAD - 依存性グルコース - 6 - リン酸デヒドロゲナーゼである。

【0067】標識は、直接に、あるいは常法により粒子または他の分子に結合する蛍光性化合物または蛍光体によって蛍光性であってもよい。蛍光性標識は、場合により連結基を介して、シクロスポリンまたはシクロスポリンに対する抗体もしくはレセプタに対し、結合されるか、あるいは結合 (接合) 可能とすべく官能化されるで

あろう。

【0068】興味ある蛍光体は、一般に約 350 nm 以上、通常約 400 nm 以上、好ましくは約 450 nm 以上の波長の光を放射するであろう。蛍光体は、望ましくは高い量子効率を有し、大きいストークスシフトを有し、かつそれらの接合および使用条件下で化学的に安定である。冷光性標識の用語は、電磁的照射、電気化学的励起または化学的活性化による活性化において光を輻射する物質を含み、また蛍光性およびリン光性物質、シンチレータ類ならびに化学発光性物質を含むことを意図するものである。

【0069】興味ある蛍光体は、ある種の主要な官能基を有する種々の種類に含まれる。これらの主要な官能基は、1 - および 2 - アミノナフタレン、p - p - ジアミノスチルベン類、ピレン類、四級フェナントリジン塩類、9 - アミノアクリジン類、p , p - ジアミノスチルベンイミン類、アントラセン類、オキサカルボキシアニン、メロシアニン、3 - アミノエキレニン、ペリレン、ビス - ベンゾキサゾール、ビス - p - オキサゾリルベンゼン、1 , 2 - ベンゾフェナジン、レチノール、ビス - 3 - アミノピリジニウム塩類、ヘレブリゲニン、テトラサイクリン、ステロフェノール、ベンズイミダゾリルフェニルアミン、2 - オキソ - 3 - クロメン、インドール、キサンテン、7 - ヒドロキシクマリン、4 , 5 - ヘンズイミダゾール類、フェノキサジン、サリシレート、ストロファンチジン、ポルフィリン類、トリアリルメタン類、フラビン、および希土類キレート酸の塩類を含む。例示的蛍光体は米国特許第 4, 318, 707 号の 7 および 8 欄に列挙され、その開示をここに参考として取入れる。

【0070】エネルギー吸収体または冷却体が、分離して、あるいは相互に組合せられて使用され得る。該吸収体または冷却体は、更に少なくとも約 50 nm の直径を有する固体不溶性粒子に結合され得る。該吸収体および冷却体の間の距離の特異的結合 (抗体 - 抗原結合等) に由来する場合、吸収体の蛍光が、冷却体により冷却される。冷却体は、蛍光体と同じまたは異なってよく、通常異なっている。

【0071】検出可能な信号としての別の光源は、化学発光源であり、従って標識は化学発光性化合物であり得る。該化学発光源は、化学反応により電子的に励起した状態となり、次いで検出可能な信号として作用するか、あるいはエネルギーを蛍光性受容体に与える光を放射する化合物に関連する。

【0072】種々の条件において、化学発光性を与える多くの数の化合物群が見出されている。一つの化合物群は、2 , 3 - ジヒドロ - 1 , 4 - フタルアジンである。最も一般的な化合物は、上記化合物の 5 - アミノ類似体であるルミノールである。該群の他の構成員は、5 - アミノ - 6 , 7 , 8 - トリメチル - およびジメチルアミン

- [Ca] ベンゾ類似体である。これらの化合物は、アルカリ性過酸化水素またはカルシウムの次亜塩素酸塩、および塩基により発光性になり得る。他の群の化合物は、その親化合物について慣用名としてロフィン (lophine) をもつ 2, 4, 5 - トリフェニルイミダゾール類である。化学発光性類似体は、パラ - ジメチルアミノ - およびパラ - メトキシ - 置換基を含む。化学発光体は、ゲリジニウムエステル類、ジオキセタン類、および例えば p - ニトロフェニル等の通常はオキサリル活性エステル類であるオキサレート、ならびに塩基性条件下の過酸化水素等のパーオキソド等により得ることもできる。別法として、ルシフェリン類は、ルシフェラーゼまたはルシゲニンとの組合せにおいて使用されてもよい。

【0073】接合体 - 接合体は、2つ以上のサブユニットを場合により連結基を介して互いに結合し、単一の構造を形成した分子である。結合は、サブユニット間の直接結合 (例えば化学結合) により、または連結基の使用により形成され得る。例えば、本発明に関連して、シクロスポリンのアラニン窒素原子において、場合により連結基を介して酵素に接合されたシクロスポリンは、シクロスポリン - 酵素接合体である。場合により連結基を介してサブユニット B に接合されたサブユニット A を含むものとして記述される構成物は、サブユニット A が、場合により連結基を介してサブユニット B に結合している構成物である。

【0074】接合 - 接合は、2つのサブユニットを互いに結合して接合体を形成する任意の方法である。接合工程は、任意の数の工程を含んでもよい。

【0075】レセプタ - レセプタは、分子の特定の空間的および極性的組織を認識し得るいずれかの化合物または組成物である。これらの分子の組織化領域は、エピトープまたは決定部位と称される。天然に産生する例示的なレセプタ類は、抗体類、酵素類、fab断片、ポリ (核酸)、補体成分、すなわちチロキシン結合グロブリン、レクチン類、蛋白質 A 等を含む。レセプタ類は、抗リガンドとも称される。シクロスポリンを特異的に結合する天然のレセプタが存在する。

【0076】リガンド - リガンドは、そのためのレセプタが天然に存在するか、あるいは調製可能であるいずれかの有機分子である。例えば、本発明との関連においてシクロスポリンはリガンドであり、本発明はシクロスポリンのレセプタ抗体を提供する。本発明の他の関連において、シクロスポリンは、場合により連結基を介してアラニン窒素原子において第2のリガンドに接合され得る。シクロスポリンがこのような様式で第2のリガンドに連結した場合 (シクロスポリン - リガンド接合体)、該第2のリガンドを認識可能なレセプタ類は、該シクロスポリン - リガンド接合体を認識するであろう。

【0077】ハプテン - ハプテンは、対応する抗体に特異的に結合し得るが、それら自体は抗体調製のための免

疫原 (抗原) としては作用しない。ハプテンを認識する抗体は、免疫原性 (抗原性) 担体に結合されたハプテンを含んでなる化合物に対して調製され得る。ハプテンは、リガンドの一部分 (subset) である。

【0078】例えば、本発明との関連においてシクロスポリンはハプテンである。シクロスポリンがそのアラニン窒素原子の一つにおいて、場合により連結基を介して抗原性担体に接合された場合に、シクロスポリンを認識し得る抗体が調製可能である。本発明の別の関連において、シクロスポリンは、そのアラニン窒素原子の一つにおいて、場合により連結基を介して第2のハプテンに接合される。シクロスポリンがこのような形で第2のハプテンに接合された場合 (シクロスポリン - ハプテン接合体)、第2のハプテンを認識可能な抗体およびシクロスポリンを認識可能な抗体は、該シクロスポリン - ハプテン接合体に結合可能であろう。

【0079】特異的結合対の一員 - 特異的結合対の一員 (spbメンバ) は、他方の分子の特定の空間的および極性的組織に特異的に結合し、従って補体として定義される、表面上または空孔内の領域を有する異なった2つの分子の一つである。特異的結合対のメンバは、リガンドとレセプタ (抗リガンド) と称される。これらは、通常は、抗原 - 抗体等の免疫学的対であるが、ピオチン - アビジン、ホルモン - ホルモンレセプタ、核酸複製物、IgG - 蛋白質 A、DNA - DNA、DNA - RNA 等の他の特異的結合対は、免疫学的対ではない。

【0080】支持体または表面 - 支持体または表面は、多孔性または非多孔性の水不溶性材料である。該支持体は、親水性または親水性を付与し得るものであって、シリカ、硫酸マグネシウム、およびアルミナ等の無機粉体; 例えば、濾紙、クロマトグラフィ用紙等の紙類を含む繊維等、特にセルロース性またはセルロースから誘導される材料である天然ポリマー材料; ニトロセルロース、セルロースアセテート、ポリ (ビニルクロライド)、ポリアクリルアミド、交差結合デキストラン、アガロース、ポリアクリレート、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ (4 - メチルブテン)、ポリスチレン、ポリメタクリレート、ポリ (エチレンテレフタレート)、ナイロン、ポリ (ビニルブチレート) 等の合成または修飾された天然産生ポリマー類; それら自体で使用されるか、あるいは他の材料と組合せて使用される、Bioglassとして入手可能なガラス、セラミクス、金属等を含む。リボソーム、リン脂質胞、および細胞等の天然または合成組合体も使用可能である。使用可能な他の材料は、上述の免疫原性担体粒子の定義、および後述の信号生成系の定義中に記述されている。

【0081】spbメンバの支持体または表面への結合は、一般に文献中から入手できる周知の技術により行なうことができ、また上述の免疫原性担体粒子の定義にも記述されている。表面は、小片、棒、ビーズを含む粒子

等、多くの形状のいずれであってもよい。該表面は、通常多官能性もしくは多官能性とし得るか、またはs b pメンバを、特異的または非特異的な共有または非共有的相互作用を介して結合し得るものである。連結のための多くの種類の官能基が免疫原性担体粒子の定義に記述されている。s b pメンバについて連結基の長さは、連結される化合物の性質、連結される化合物間の距離、支持体に連結される化合物間の距離のアッセイに対する効果等に依存して広く変化し得る。該s b pメンバは、実質的には支持体の外部表面に結合されるであろう。

【0082】信号生成系 - 信号生成系の機能は、結合および/または非結合標識の量に関連する検出可能な信号を提供する生成物を生じることである。該信号生成系は、少なくとも一つが標識である1種以上の成分を有している。該信号生成系は、信号生成のために標識と相互作用し得る信号生成手段を含め、測定可能な信号を生成するために要するすべての試薬類を含む。

【0083】該信号生成系は、外部的手段、通常は電磁放射、好ましくは目視試験により検出可能な信号を提供する。そのほとんどにおいて、該信号生成系は、発色性基質と酵素とを含み、発色性基質が酵素反応的に紫外または可視領域において光を吸収する染料、リン光物質、または蛍光物質に変換される。

【0084】該信号生成手段は標識と相互作用して検出可能な信号を生成する。このような手段は、例えば電磁放射、熱、化学的試剤等を含む。化学的試剤が使用される場合、該化学的試剤のある種のみは展開溶液の部分として含まれてもよい。該化学的試剤は、基質、補酵素、増強剤、第2の酵素、活性化剤、共因子、阻害剤、清浄化剤、金属イオン、信号発生物質の結合に必要な特異的結合物質等を含んでよい。補酵素、酵素的生成物と反応する物質、他の酵素および触媒等、該化学的試剤のあるものは、他の分子または支持体に対して固定されてもよい。

【0085】標識を含む信号生成系は、1種以上の粒子を含んでもよく、粒子は不溶性であって、少なくとも約50nmかつ約50ミクロン以下、通常は少なくとも約100nmかつ約25ミクロン以下、好ましくは約0.2~5ミクロンの直径である。該粒子は、有機または無機、多孔性または非多孔性、好ましくは水に近似する密度、一般に約0.7から約1.5g/mLであってよく、透明、半透明または不透明な材料からなる。一般に、標識として使用される粒子は、上述の免疫原性担体、および支持体または表面の定義に記述されるものと類似した特徴を有するであろう。

【0086】多くの異なった型の粒子を、光放射の制御に使用してもよい。特に興味あるものは、木炭、すす、グラファイト、コロイド性炭素等の炭素粒子である。炭素粒子の他に、金属ゾルもまた有用であり、特に金、銀および白金等の貴金属が有用である。他の金属誘導粒

子は、鉛、銀または銅スルフィド等の金属スルフィド類、あるいは鉄または銅酸化物等の金属酸化物を含む。

【0087】螢光化ラテックス粒子は、米国特許第3,853,987号中に教示されており、Covalent Technology Corp.からCovaspheresとして商業的に入手可能である。

【0088】シクロスポリン量の測定 - シクロスポリン測定のための、定量的、半定量的および定性的方法、ならびに他の方法は、シクロスポリン量の測定方法として考慮される。例えば、シクロスポリンを含むと考えられる試料中のシクロスポリンの存在の有無のみを検出する方法は、本発明の範囲に含まれると考えられる。本発明の範囲内と考えられる語法 "シクロスポリン量の測定" の同義語は、限定的ではなく、シクロスポリンの検出、測定、または決定;シクロスポリンの存在の検出、測定、または決定;およびシクロスポリンの量の検出、測定、または決定を含む。

【0089】実質的に結合もしくは認識可能または不可能 - は、特定のアッセイ条件下におけるアッセイ混合物中の分子間の、結合または認識する量、またはその欠如を指している。その最も広い面において、ある分子の他の分子を結合もしくは認識可能であることと、第3の分子を結合もしくは認識可能であることとの差異は、該分子の相対濃度を含む特定の組合せのアッセイ条件下で、意味のあるアッセイの実施を許容するために充分である。他の面において、分子の相対濃度を含む特定の組合せのアッセイ条件下において第3の分子に対して示される反応性の25%未満、好ましくは10%未満、更に好ましくは5%未満であるような反応性を、第1の分子が第2の分子に対して示す場合、交差反応的な意味である分子は他の分子を結合または認識できない。

【0090】シクロスポリンを含むと考えられる試料 - シクロスポリンを含むことが合理的に考えられる任意の試料は、本発明の方法により分析可能である。このような試料は、ヒト、動物またはヒト生成試料を含む。試料は、アッセイの妨害とならない任意の都合よい媒質中に調製され得る。典型的には、該試料は、水性溶液、または天然の液体、好ましくは尿、全血、血清、血漿または唾液、更に好ましくは全血である。

【0091】試料の前処理 - 場合により、シクロスポリンを含むと考えられる試料は、前処理を受けてもよい。前処理は、標的分析対象を1種以上のアッセイ試薬についてより容易に利用できるように設計された工程である。好ましくは、本発明の方法により分析される試料は、存在するであろう細胞を溶解し、存在するであろう蛋白質を沈殿させ、存在するであろうシクロスポリンを可溶化することによって前処理される。このような前処理は、有機溶媒、好ましくはアルコール、更に好ましくはメタノールによる試料の処理を含む。

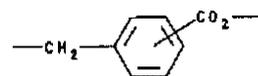
【0092】特定の実施態様

本発明の一面は、シクロスポリンのアラニン窒素原子において場合により連結基を介して有機基に接合されたシクロスポリンを含む組成物に関する。好ましくは、シクロスポリンAが、その第7および/または8のアミノ酸残基のアラニン窒素原子において、場合により、水素以外に約35個未満、好ましくは25個未満、更に好ましくは15個未満の原子の長さの鎖を有する、水素以外に約50個未満、好ましくは約35個未満、更に好ましくは約20個未満の原子を有する連結基を介して接合される。該有機基は、分子量が約2,000を越え、好ましくは約5,000を越える基、または、リガンド、ハブテンもしくはピオチン等の小有機分子である。好ましくは、2,000以上の分子量を有する基は、ポリ(アミノ酸)である。更に好ましくは、該ポリ(アミノ酸)は、キーホールリンペットのヘモシアニン(KLH)、ウシ血清アルブミン(BSA)、もしくはウシガンマグロブリン(BGG)等の免疫原性担体、またはグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ(G6PDH)等の酵素である。

【0093】連結基は、存在する場合には、好ましくは20式： $-(CH_2)_nO-$ のヒドロキシアルカン鎖を含んでなり、ここでシクロスポリンのアラニン窒素原子は、該ヒドロキシアルカンの炭素原子に接合し、また有機基は、該酸素原子に接合し、nは1~6、好ましくは2~4の範囲の整数、更に好ましくはnは2である。更に好

ましくはヒドロキシアルカン連結基は、アルキレン鎖によって互いに結合された約1~3個のカルボキサミド基によって、該酸素原子に延びている。拡張された場合、有機基は、カルボキサミド拡張基の一端に結合され、また該ヒドロキシアルカン基の酸素原子は、該カルボキサミド拡張基の他端に結合される。

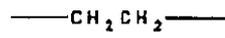
【0094】別法として、連結基が存在する場合、該基は式：



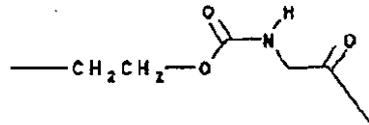
【0095】のカルボキシベンジル基を含んでなり、ここにおいてシクロスポリンのアラニン窒素原子は、ベンジルの炭素原子に接合され、また有機基はカルボキシル基の酸素原子に結合される。該カルボキシル基は、ベンジルの炭素に対して、好ましくはオルトまたはパラ、更に好ましくはパラである。更に好ましくは、該カルボキシベンジル基は、アルキレン鎖によって互いに結合された約1~約3個のカルボキサミド基によって、該酸素原子に延びている。拡張された場合、有機基は、カルボキサミド拡張基の一端に結合され、また該カルボキシル基の酸素原子は、該カルボキサミド拡張基の他端に結合される。

【0096】更に好ましくは、連結基は：

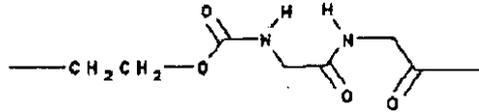
【0097】



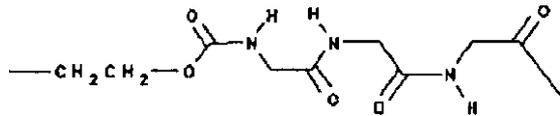
(I)



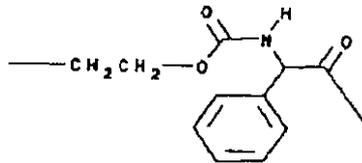
(II)



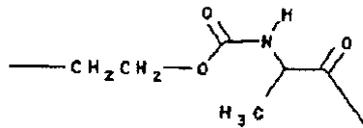
(III)



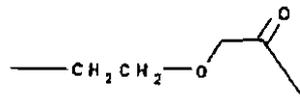
(IV)



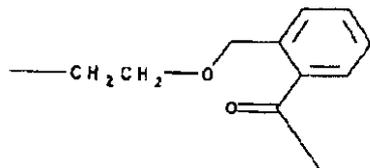
(V)



(VI)



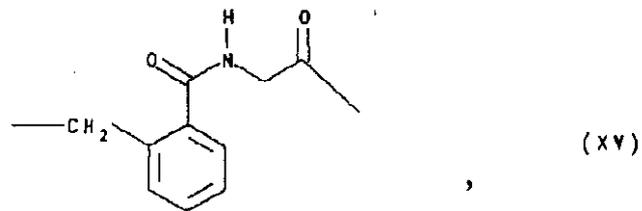
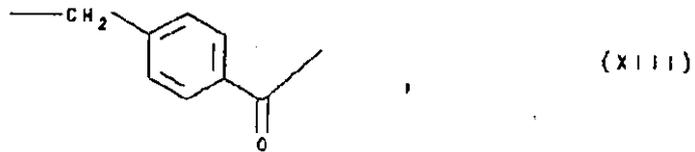
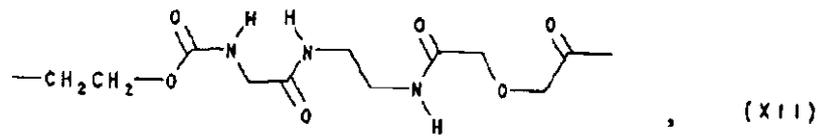
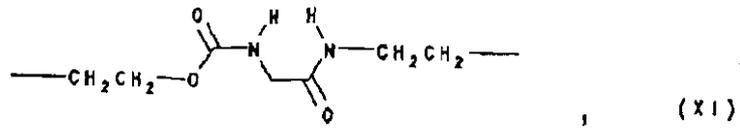
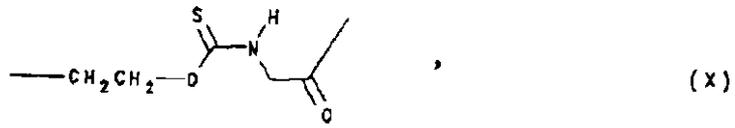
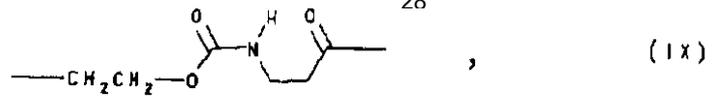
(VII)



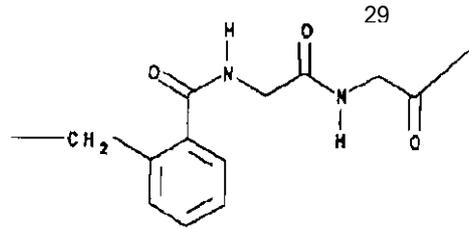
(VIII)

(16)

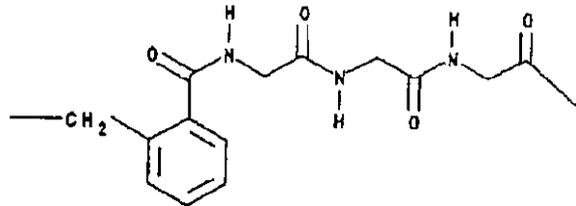
28



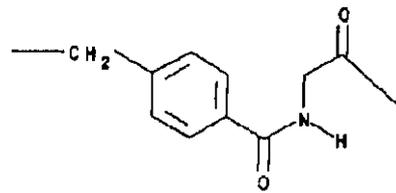
(17)



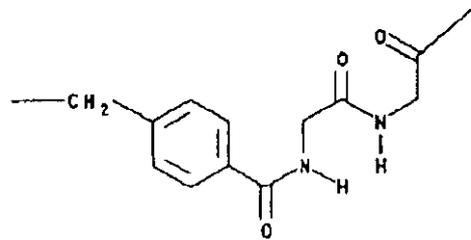
(XVI)



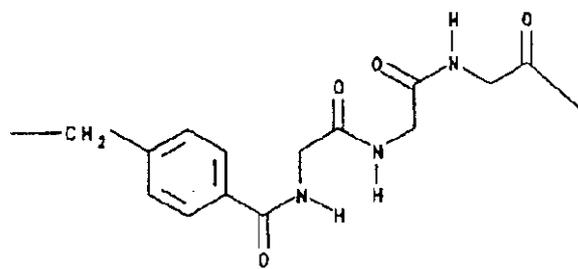
(XVII)



(XVIII)

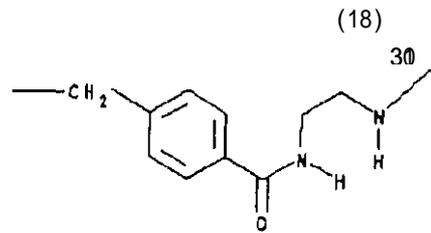


(XIX)

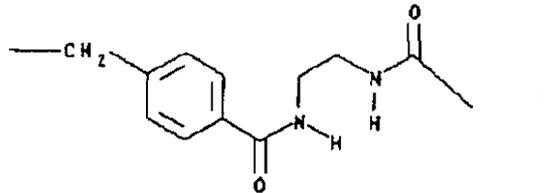


(XX)

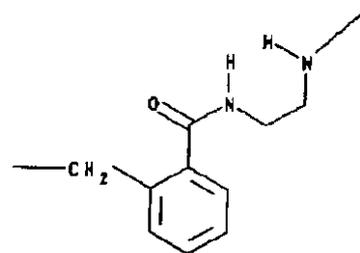
【0100】



(XXI)

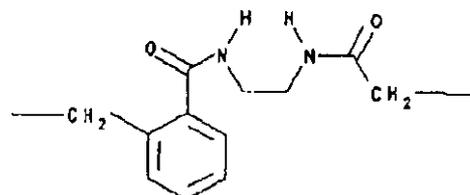


(XXII)



, および

(XXIII)



(XXIV)

【0101】シクロスポリン類は、環状ウンデカペプチドであるため、アラニン窒素は、アミノ酸残基の一部である。好ましくは、該アラニン窒素は、第7または8番目のシクロスポリンアミノ酸残基の部分である。更に好ましくは、該連結基が場合によりカルボキサミド拡張のヒドロキシャルカンを含んでなる場合、該アラニン窒素はシクロスポリンアミノ酸残基第7番の部分であり、また該連結基が場合によりカルボキサミド拡張のカルボキシベンジル基を含んでなる場合、該アラニン窒素は第7番または8番から選択されたシクロスポリンアミノ酸残基の部分である。

【0102】該有機基が免疫原性担体である場合、好適には、これは抗原性ポリ(アミノ酸)、リポポリサッカライドおよび粒子であってよい。それが、ポリ(アミノ酸)であることは好ましい。更に好ましくは、それはキーホールリンペットのヘモシアニン(KLH)、またはウシ血清アルブミン(BSA)である。該有機基が免疫原性担体である場合、連結基がカルボキシベンジル基であることは更に好ましい。また更に好ましくは、カルボキシベンジル基は、アルキレン鎖により互いに結合された約1個~3個のカルボキサミド基により拡張される。

【0103】本発明により考慮される好ましい組成物の

一つは、式(XIX)の連結基を介してキーホールリンペットヘモシアニンに対して、第7のアミノ酸残基のアラニン窒素原子において接合されるシクロスポリンAおよび第8のアミノ酸残基のアラニン窒素原子において接合されるシクロスポリンAの混合物である。

【0104】有機基が標識である場合、標識の型は、行なわれるアッセイの型に依存する。酵素免疫アッセイのためには、該標識は酵素である。好ましくは、均一酵素免疫アッセイのためには、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼである。有機基が標識である場合、連結基がヒドロキシャルカン基であることが更に好ましい。更に好ましくは、該ヒドロキシャルカン基は、約1~3個のカルボキサミド基により拡張されている。

【0105】本発明により考慮されるその他の好ましい組成物は、基(II)の連結基を介して第7のアミノ酸残基のアラニン窒素原子においてグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼに接合されるシクロスポリンAである。

【0106】別の面において本発明は、シクロスポリンの環状骨格の一部であるアラニン窒素原子の一つにおいて、場合により連結基を介して有機基に接合されるシクロスポリンの調製方法に関する。該方法は：

a) 場合により保護されたシクロスポリンを、2級アミドを脱水素化するために十分な塩基性の塩基と反応させ、

b) a) の化合物をアルキリ化剤と反応させてその環状骨格のアミド窒素原子の一つにおいて連結基に接合するシクロスポリンを形成し、

c) 場合により、b) の化合物の連結基の長さをカルボキサミド基の付加により延長してその環状骨格のアミド窒素原子の一つにおいてカルボキサミド拡張連結基に接合するシクロスポリンを形成し、

d) b) または c) の化合物からいずれの保護基をも除去して、その環状骨格のアラニン窒素原子の一つにおいて、連結基またはカルボキサミド拡張連結基に接合するシクロスポリン(シクロスポリン-連結基接合体)を形成し、

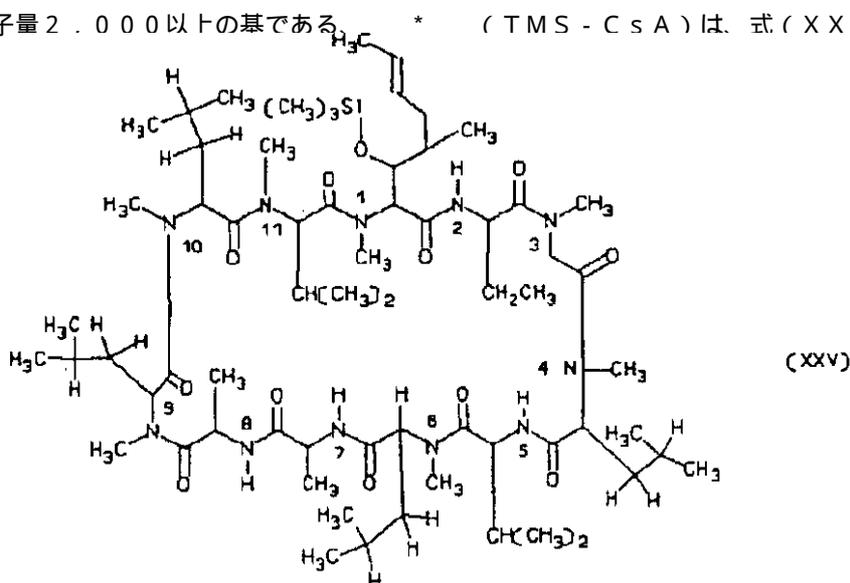
e) d) のシクロスポリン-連結基接合体上の官能基を場合により活性化して、その環状骨格のアラニン窒素原子の一つにおいて、活性化連結基に接合するシクロスポリン(シクロスポリン-活性化連結基接合体)を形成し、および

f) 場合により、e) のシクロスポリン-活性化連結基接合体を、小有機分子または分子量2,000以上の化合物と反応させ、場合により連結基を介してアラニン窒素原子の一つにおいて、有機基に対して接合するシクロスポリンを形成し、ここにおいて該有機基は、小有機分子の残基または分子量2,000以上の基である。

\*工程を含んでなる。

【0107】好ましくは、a) の保護基は、強塩基性条件下で安定であり、かつ他のおだやかな条件で容易に除去可能なものであるヒドロキシ保護基であろう。このような基は当技術分野で周知であり、詳細は示さない。しかしながら、このような基の詳細、ならびにそれらの調製および後の除去のために必要な条件は、ここに参考として取入れるGreene, T. W. の“Protective Groups in Organic Synthesis” (Wiley-Interscience, NY, 1981) 1頁、第1章、および10-72頁、ならびにここに参考として取入れるMcOmie, J. F. W. 編“Protective Groups in Organic Chemistry” (Plenum Press, NY, 1973) 96-120頁に見出すことができる。このような基は、メチル、t-ブチル、アリル、ベンジル、トリアリールメチル、シリル、およびテトラヒドロピラニルエーテル類；アセタール類、ケタール類、アセテート類、ベンゾエート類、p-ニトロベンゾエート類、ホルメート類；トリフルオロ-、クロロ-、メトキシ-およびフェノキシアセテート類；カルボネート類等を含む。更に好ましくは、保護基はアルキルシランに基づくものである。なお好ましくは、トリメチルシリルであろう。

【0108】トリメチルシリル(TMS)保護CsA(TMS-CsA)は、式(XXV)に示される。



【0109】シリル化反応(取入れた参考文献であるGreeneの39-50頁に詳細に記述される)は、アミン/ハロアルカン混合物等の混合溶媒中において、典型的に行なわれる。好ましくは、ジクロロメタンと混合されるトリアルキルアミンまたはピリジン、更に好ましくは、ピリジン/ジクロロメタンである。該反応は、窒素、アルゴン、ヘリウム等の不活性雰囲気下に行なわれる。典型的には、該反応は、1分から24時間を要

し、好ましくは、30分から18時間である。反応温度は、-10と100との間、好ましくは0と50との間、更に好ましくは20と25との間である。

【0110】工程a)にて使用される塩基は、好ましくは、ポリ(アミノ酸)の一部である2級アミド基を脱水素化するために十分な強度の塩基である。このような塩基は、当該技術分野で周知であり、詳細は記さない。好

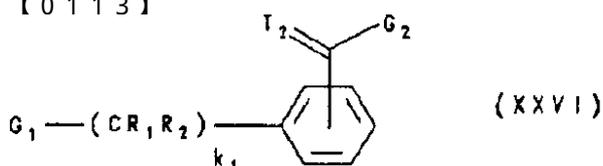
ましくは、該塩基は、メチルリチウム、ブチルリチウム、リチウムヒドライド、カリウムヒドライド、リチウムジイソプロピルアミド、リチウムシクロヘキシルイソプロピルアミド等を含む金属のヒドライド、アルキル化物またはアミド等、アルカリ金属陰イオン（ヒドライドまたは有機陰イオンの第1A族塩）である。更に好ましくは、塩基はナトリウム、リチウムまたはカリウムのヒドライド等、金属ヒドライド塩基である。

【0111】脱水素化反応は、-78 ~ 100、好ましくは-10 ~ 40、更に好ましくは0 ~ 20

にて行なわれる。このような反応のための溶媒は、例えばベンゼン、トルエンまたはヘキサン等の脂肪族炭化水素、および芳香族炭化水素等、不活性有機溶媒である。場合により第1A族の錯形成に好適な金属イオンキレート剤、例えばクラウンエーテル、 $\beta$ -ジカルボニル化合物、またはポリ（アルキレンオキサイド）等が溶媒に添加される。好ましくは、18-クラウン-6または15-クラウン-5等のクラウンエーテルが、芳香族有機溶媒において使用され、更に好ましくは、15-クラウン-5エーテルが、トルエン中で使用される。該反応は、典型的には不活性雰囲気下で1分間と24時間との間、好ましくは10分間と12時間との間、更に好ましくは10分間と2時間との間で行なわれる。

【0112】b)のアルキル化基は、好ましくは $\beta$ -ハロアルキル安息香酸エステルまたはエポキシドである。更に好ましくは、調製すべき化合物がカルボキシベンジル連結基を有する場合には、アルキル化基は式(XXVI)のものである。

【0113】



【0114】式(XXVI)において、 $R_1$ および $R_2$ は、互いに独立してHまたは炭素原子数が約7個未満のアルキルであり、好ましくはHまたはメチル、更に好ましくはHである。式(XXVI)において、 $G_1$ は、ハロゲン原子、好ましくは臭素、塩素またはヨウ素、更に好ましくは臭素原子である。

【0115】式(XXVI)において、 $T_2$ はO、Sまたは $NR_3$ であり、ここで $R_3$ は、Hまたは炭素数が約7個未満のアルキルであり、好ましくはOまたはS、更に好ましくはOである。式(XXVI)において、 $k_1$ の値は、1から約4まで、好ましくは、約2まで、更に好ましくは $k_1$ は1である。

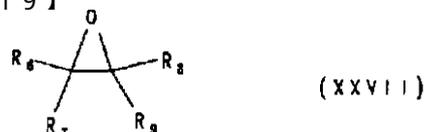
【0116】式(XXVI)において、 $G_2$ は、 $OR_4$ または $SR_5$ であり、ここで $R_4$ および $R_5$ は、 $T_2$ および $G_2$ の本質に依存して選択される、対応する酸素、窒素またはサルファカルボニル官能基の保護基である。これら

の官能基のための保護基は、ここに参考として取入れるGreen, T.W.の“Protective Groups in Organic Synthesis” (Wiley-Interscience, NY, 1981) 1頁、第1節、154-192、209-210、および249-278頁；およびMcOmie, J.F.W.編“Protective Groups in Organic Chemistry” (Plenum Press, NY, 1973) 183-210、286-295、および404-412頁に記述されており、ここに詳細は示さない。好ましくは、 $G_2$ は $OR_4$ であり、 $R_4$ は炭素原子数が約7個未満のアルキルであり、更に好ましくは $R_4$ はメチルである。

【0117】更になお好ましくは、調製されるべき化合物がカルボキシベンジル連結基を有する場合には、アルキル化剤はオルト-またはパラ- $\beta$ -ハロメチル安息香酸のアルキル（約7個未満の炭素原子を有する）エステルであろう。好ましくは、該 $\beta$ -ハロメチル安息香酸アルキルエステルとのアルキル化生成物は、シクロスポリンアミノ酸残基の第7および第8のアラニン窒素原子の一つにおいて、オルト-またはパラ-カルボキシベンジルアルキルエステル基に接合するシクロスポリンであろう。

【0118】更に好ましくは、調製されるべき化合物がヒドロキシルアルカン連結基を有する場合には、アルキル化基は、式(XXVII)のものであろう。

【0119】



【0120】式(XXVII)において、 $R_6$ 、 $R_7$ 、 $R_8$ および $R_9$ は、それぞれ独立してHまたは約7個未満の炭素原子を有するアルキルであり、好ましくはHまたはメチル、更に好ましくはHである。

【0121】更になお好ましくは、調製されるべき化合物がヒドロキシルアルカン連結基を有する場合には、アルキル化剤は、エチレンオキサイド、プロピレンオキサイド等、約7個未満の炭素原子を有するアルキレンエポキシドであろう。好ましくは、エチレンエポキシドによるアルキル化生成物は、第7のシクロスポリンアミノ酸残基のアラニン窒素原子において、末端がヒドロキシル基である炭素2個の鎖に接合するシクロスポリンである。

【0122】アルキル化剤は、典型的には上述した脱水素化の後に反応混合物に添加される。該アルキル化剤添加後、反応は1分間と48時間との間、好ましくは1時間と36時間との間、更に好ましくは12時間と24時間との間継続される。好ましくは、場合により行なわれるカルボキサミド鎖拡張工程c)は、ポリ（アミノ酸）

合成の標準的方法である。このような工程は、当技術分野において常法であり、詳述はしない。しかしながら、このような工程の要約は、ここに参考として取り入れるWhite, A.らの、"Principles of Biochemistry" (McGraw-Hill, NY, 1978) 92 - 95頁に見出される。

【0123】一般的に、反応させるべきでない任意のアミノ、ヒドロキシル、カルボニルまたはその他の基は保護される(上記GreeneおよびMcOmieの参考文献のとおり)。保護基は、ベンジルオキシカルボニル、トリフェニルメチル、3級ブチルオキシカルボニル、フタロイル、トリフルオロアセチル、ベンジル、p-トルエンスルホンニル、飽和低級アルキル、ベンジリエステル、3級ブチルエステル、アセチル等を含む。反応すべく保護されていないカルボキシル基は、カップリング剤との反応により活性化され、活性化エステル基を形成する。このようなカップリング剤は、ジクロロヘキシルカルボジイミド(DCC)、イソブチルクロロホルメート、N,N-カルボニルジイミダゾール、p-ニトロフェノール/DCC等を含む。次いで活性化エステル

は、アミノ化合物との反応に付され、c)のカルボキサミド鎖拡張化合物が形成される。

【0124】更に好ましくは、カルボキサミド鎖延長工程は、b)の化合物とイソシアネートまたはチオイソシアネートとの反応を含む。典型的には、鎖延長されるべき化合物が、アルキル金属アルコキシド等の有機金属触媒と、脂肪族または芳香族炭化水素溶媒中で反応に付され、イソシアネートまたはチオイソシアネート、飽和アルキル(炭素数7個未満)エステルが添加される。好ましくは、触媒はトリアルキルチン錯体、更に好ましくはトリブチルチンエポキシドである。好ましい溶媒は、芳香族炭化水素、更に好ましくはトルエンである。カルボキサミド鎖延長試薬は、好ましくは、アラニンイソシアネート、メチルエステル、メチルグリコネートイソシアネート等のイソシアネート、メチルエステルである。

【0125】別法として、更に好ましいカルボキサミド鎖延長工程は、b)の化合物の下記条件下における反応を接合工程のために含む。好ましくは、鎖延長される化合物を、下記活性化剤と反応させ、該活性化エステルを、精製または未精製で、カルボキサミド鎖延長単位、好ましくはアミノ酸またはポリ(アミノ酸)、更に好ましくはグリシン、アラニン、バリン、ロイシンもしくはイソロイシンまたはこれらの2~12残基からなるポリ(アミノ酸)等の未置換のアミノ酸、更になお好ましくは、該鎖延長単位は、グリシルグリシンの2個のアミノ酸単位からなる。

【0126】種々の長さのカルボキサミド鎖延長鎖を得るために、数種の適当な鎖延長工程を順次行なってもよい。

【0127】d)の脱保護工程は、上記に詳述した保護

基に基いて選択される。先に引用し、参考とした文献は、好適な保護基の除去のための条件および試薬を記述してある。典型的に脱保護は、pH約2-12、好ましくは3-11、更に好ましくは4-10における、5-95、好ましくは10-40、更に好ましくは20-25の水中での水性加水分解を含む。場合により加水分解触媒は、酸または塩基を含み、好ましくはHCl、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、HF、HBr、p-トルエンスルホン酸、NaOH、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、NaHCO<sub>3</sub>、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、またはKHCO<sub>3</sub>、更に好ましくはHClまたはK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>を含む。場合により有機共溶媒を使用することができ、典型的にはプロトン性溶媒、好ましくはアルコール、更に好ましくはメタノールが使用される。

【0128】別法として好ましい脱保護反応は、フッ素イオン供給源との処理を含み、例えば、HF、または有機性フッ素塩、好ましくは4級フッ化アンモニウム、更に好ましくは、テトラアルキルアンモニウムフルオリドを含む。該反応は、上記の温度にて不活性有機溶媒、好ましくはエーテル、更に好ましくはジエチルエーテルまたはテトラヒドロフラン中にて行なわれる。

【0129】上述したカルボキサミド鎖延長方法は、e)およびf)の活性化および接合工程においても有用である。好ましくは、e)およびf)の活性化および接合工程は、この技術における通常の方法で行なわれる。例えば、Maglio, E.T.の"Enzyme-Immunoassay" (CRC Press, Boca Raton, FL, 1980)、第4章は、このような技術の分類を含み、その81-86頁をここに参考として取り入れる。

【0130】更に好ましくは、シクロスポリン-連結基接合体は、DMF等の有機溶媒中において、アルキル(炭素原子数9個未満)クロロホルメート、例えばイソブチルクロロホルメート；ジアルキルカルボジイミド、例えばジシクロヘキシルカルボジイミド；1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDAC)、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノ-4-エチル)カルボジイミドメチル-p-トルエンスルフォネート(CMC)、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)/EDAC、N-ヒドロキシルホスクシンイミド(スルホ-NHS)/EDAC等の活性化剤との反応により活性化される。該活性化反応は、典型的には-10~100、好ましくは0~30、更に好ましくは0~10にて、好ましくは窒素、ヘリウム、アルゴン等の雰囲気下で行なわれる。該活性化反応は、1分間から10日間、好ましくは1時間から2日間、更に好ましくは6-18時間で行なわれる。該活性化反応後、活性化化合物は、小有機分子の溶液、または分子量2000以上の化合物の溶液に、有機性または水性/有機性溶媒、例えばDMFまたはDMF/ボレート緩衝溶液等の中で添加される。この添加は、ある一定時

間にわたって行なわれてもよく、または、一回に行なわれてもよい。添加を一定時間にわたり行なう場合には、典型的には1分から12時間、好ましくは10分から8時間、更に好ましくは30分から3時間を要する。添加後に、該混合物は、1分から3日間、好ましくは10分から1日間、更に好ましくは1~18時間、攪拌される。

【0131】該生成物は、場合により、必要に応じて精製される。ポリ(アミノ酸)-ハプテン接合体の精製および特徴付けは、ここに参考として取り入れるMagio 10らの"Enzyme-Immunoassay"(CRC Press, Boca Raton, FL, 1980)、第4章86-88頁に詳細に記述されている。例えば、該接合体がシクロスポリン-免疫原性担体接合体、またはシクロスポリン-酵素接合体の場合、精製は、水性/有機性および水性溶液、例えば水/DMFまたは水等に対する透析、あるいはセファデックス等の担体上のゲル濾過クロマトグラフィにより行なうことができる。

【0132】本発明の別の面は、シクロスポリン環状骨 20格のアラニン窒素原子において免疫原性担体に接合されたシクロスポリンを免疫原とする応答において調製される抗体類を含む。更に本発明は、このような抗体類および標識の接合体を含む。

【0133】好ましくは、該抗体類は、免疫原性担体に接合されるシクロスポリンA、場合により水素以外に約50個未満の原子、好ましくは水素以外に約35個未満の原子、更に好ましくは水素以外に約20個未満の原子を有し、かつ約35個以下、好ましくは約25個以下、 30更に好ましくは約15個以下の原子の長さを有する鎖をもった連結基を介して、第7および/または第8のシクロスポリンAアミノ酸残基のアラニン窒素原子において免疫原性担体に接合されるシクロスポリンAに対して生じたものである。

【0134】抗体は、他の分子の特定の空間的および極性組織に特異的に結合し、従って相補的なものとして定義される免疫グロブリンである。該抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであってよく、この分野で周知の技術、例えば宿主の免疫および公知技術により免疫グロブリンが分離される血清の収集(ポリクローナル) 40によって、また継続的ハイブリッド細胞系の調製および分泌蛋白質の収集(モノクローナル)によって、または天然抗体の特異的結合に要するアミノ酸配列を少なくともコードしているヌクレオチド配列またはその変異体のクローニングおよび発現によって調製され得る。抗体類は、完全な免疫グロブリンまたはその断片を含み、免疫グロブリン類は、IgA、IgD、IgE、IgG1、IgG2a、IgG2bおよびIgG3、IgM等の種々のクラスおよびアイソタイプを含む。それらの断片は、Fab、FvおよびF(ab)2、Fab等を 50

含んでよい。

【0135】モノクローナル抗体類は、MilsteinおよびKohlerにより議論され、Nature 1975、256、495-7に報告された方法によって得ることができる。この方法の詳細は周知であってここには反復しない。しかしながら、それは基本的には通常マウスまたは他の適当な動物である宿主に、免疫原を注射することを含む。次いで該動物の脾臓から細胞を取出す。別法として、該宿主は、インビトロにおいて免疫原に感作された非感作脾臓細胞であってもよい。得られる細胞は、ミエローマ細胞と融合される。融合細胞が結果として得られ、"ハイブリドーマ"と称され、インビトロにおいて培養可能である。ハイブリドーマの母集団は、選択され、個々のクローンが単離されるように操作され、それぞれが抗原に対して単一の抗体を分泌する。

【0136】本発明の抗体は、シクロスポリンおよび1位に非修飾9個の炭素原子のアミノ酸を含む密接に関連した化合物を特異的に認識することができる(CsA番号付け)。

【0137】本発明の抗体と標識との接合体は、ポリ(アミノ酸)のシクロスポリン基への接合について既に述べた方法により調製可能である。該シクロスポリン-連結基接合体の活性化は、前述のようにして行なわれる。活性化化合物の抗体への接合は、前述のようにして行なわれる。

【0138】好ましくは、標識接合体試薬のpHは、他の考慮において該標識接合体の活性および安定性を平衡化するように最適化される。その好ましい実施態様の一つにおいて、本発明は、シクロスポリン-G6PDH接合体試薬に関し、ここにおいてpHは6-10、好ましくは7-9、更に好ましくは7.5-8.5である。好ましくは、抗体試薬のpHは、アッセイ試薬組成物の安定性および精度を最大とするように最適化される。好ましい実施態様の一つにおいて、本発明は、シクロスポリン抗体試薬に関し、ここにおいてpHは、4-7、好ましくは5-6、更に好ましくは5.25-5.85である。

【0139】BLGまたはPEG等のバルク化剤を含む表面活性剤; トウイーン-20、プルラファクスA38、トライトンX-100、ブルロニク25R2、RSA、BSA、モジュサイト(Mod-u-cyte)、ゾルプロ(Sol-u-pro)等の消胞剤および界面活性剤; およびこの分野で通常使用されている他の材料は、抗体および標識接合体試薬の両者に添加することができる。表面活性添加剤は、疎水性または低安定性化合物の溶液中への維持、アッセイ試薬成分の安定化、またはアッセイ試薬活性の最適化のために添加することができる。

【0140】表面活性添加剤は、好ましくは、シクロスポリンを含むと考えられる試料に該抗体試薬を加えた際

に、シクロスポリンを溶液中に維持するために添加される。その好ましい一つの実施態様において、本発明は、一種以上のバルク化剤、界面活性剤および/または消泡剤が添加されたシクロスポリン抗体試薬に関する。

【0141】表面活性添加剤は、保存および使用時に、標識接合体を溶液中に維持するために、標識接合体に添加される。好ましい実施態様の一つにおいて、本発明は、一種以上のバルク化剤、界面活性剤、および/または消泡剤を含むシクロスポリン-G6PDH接合体試薬に関する。

【0142】試薬の保存寿命を長くするために、抗微生物剤をアッセイ試薬に添加してもよい。この分野で一般的な抗微生物剤が有用である。その最も好ましい実施態様の一つにおいて、本発明は、抗微生物剤を含むシクロスポリンアッセイ試薬に関する。

【0143】本発明の他の面は、シクロスポリンを含むと考えられる試料中のシクロスポリン量の測定方法に関する。本発明の抗体および標識接合体は、シクロスポリンを含むと考えられる試料中のシクロスポリン量の測定方法において使用される。該アッセイは、場合により試料の前処理、それに続く試料とシクロスポリンに対する抗体との接触、および該抗体とシクロスポリンとの免疫複合体の直接あるいは間接的定量という工程を含んでなる。本発明のこの面において与えられる改良は、本抗体のシクロスポリンに対する抗体としての利用である。該免疫複合体は、例えば使用する抗体が標識に接合している場合、直接に検出される。該免疫複合体は、アッセイ媒質中の免疫複合体形成の信号生成系に対する効果を試験することにより、あるいは、本発明の抗体に特異的に結合する標識レセプタを使用することにより間接的に検出される。

【0144】場合により前処理されるシクロスポリンを含むと考えられる試料中のシクロスポリン測定アッセイの他の構成において、該試料を、シクロスポリンに対する抗体、および該抗体により認識される本発明の標識接合体に接触させる。この方法は、更に、該標識接合体と抗体との免疫複合体の量を、直接または間接的に測定することを含む。場合により、水素以外に約50個未満、好ましくは35、更に好ましくは20個未満の原子を有し、かつ長さにおいて約35個以下、好ましくは25、更に好ましくは15個以下の原子を有する鎖をもった連結基を介し、標識に接合されたシクロスポリンを、標識接合体として使用してもよい。

【0145】本発明のアッセイは、シクロスポリンに対するすべての免疫アッセイに応用される。該アッセイは、いずれかのアッセイ成分または生成物の分離を伴わず（均質的）、あるいは分離を伴って（非均質的）行なわれ得る。非均質的アッセイの例は、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）等の酵素結合免疫アッセイである。Edward T. Magglioによる "Enzy

me Immunoassay" CRC Press Incorporated, Boca Raton, Florida, 1980参照。均質的免疫アッセイは、酵素多重化免疫アッセイ（enzyme multiplied immunoassay）技術（例えば、米国特許第3,817,837号参照）、米国特許第3,993,345号に開示されている免疫蛍光法、米国特許第4,233,402号に開示されている酵素チャネリング（enzyme channeling）技術、およびMagglioの前出文献に議論されている他の酵素免疫アッセイにより例示される。上記特許の開示を、前述の特定のアッセイ方法の記述についてその全体を参考としてここに取入れる。

【0146】分析すべき試料は、存在し得る細胞の溶解、存在し得る蛋白質の沈殿、および/または存在し得るシクロスポリンの可溶化等のために前処理されてもよい。本発明の方法により分析される試料を、有機溶媒、好ましくはアルコール、更に好ましくはメタノール等の炭素原子7個未満のアルコールと接触させることにより前処理することが好ましい。分析対象のアッセイは、通常は最適なアッセイ感度を与える中程度のpHにて、水性緩衝媒質中で行なわれる。

【0147】該水性媒質は、水のみでよく、または0~40体積パーセントの共溶媒を含んでもよい。該媒質についてのpHは、通常は約4~11の範囲、更に普通には約5~10の範囲、および、好ましくは約6.5~9.5の範囲である。pHは、通常、いずれかの特異的結合対の結合構成要素の最適結合、および信号生成系の構成要素等、他のアッセイ試薬について最適なpHの間での妥協点である。

【0148】種々の緩衝溶液を、所望のpH値を達成し、また測定中のpHを維持するために使用してもよい。例示的な緩衝溶液は、ボレート、ホスフェート、カルボネート、トリス、バルビタール等を含む。この発明において使用された緩衝溶液は、臨界的ではなく、また個々のアッセイにおいて一方あるいは他方の緩衝剤が好ましい。

【0149】該アッセイを行なうためには、通常中程度の温度が使用され、また測定の間、特に速度測定の間は一定温度が使用される。熟成温度は、通常約5~45の範囲、更に普通には約15~40である。測定間の温度は、一般には10~50の範囲、更に普通には約15~40である。

【0150】アッセイされるシクロスポリンの濃度は、一般には約 $10^{-5}$ ~ $10^{-13}$ M、より普通には $10^{-6}$ ~ $10^{-8}$ Mで変化する。アッセイが、定量的、半定量的、または定性的であること（試料中に存在するシクロスポリンの量に相対的）等の考慮、特定の検出技術、およびシクロスポリンの濃度は、一般に種々の試薬の濃度を決定する。

【0151】一方においてアッセイ媒質中の種々の試薬濃度は、興味あるシクロスポリンの濃度範囲により決定されるが、各試薬の最終濃度は、範囲にわたるアッセイの感度を最適化するように経験的に決定される。すなわち、重要であるシクロスポリン濃度の変化は、正確に測定可能な信号の差異を与える。

【0152】添加量の順序は、広範囲に変化するが、アッセイの性質に依存するある種の選択がある。添加の最も簡単な順序は、すべての材料を同時に添加し、アッセイ媒質が信号に対して有する効果を均質アッセイとして測定する。別法として、試薬は順次合せられ得る。場合により、熟成工程は、各添加に引続き、一般に30秒から6時間、より普通には1分から1時間の範囲で行われてもよい。

【0153】均質系アッセイにおいてすべての試薬が同時に、または順次合せられた後、信号が測定される。該信号は、試験試料中のシクロスポリン量に関連する。例えば酵素多重化アッセイ技術において、その開示をここに参考として取り入れる米国特許第3,817,837号(1974)に記述されているように、シクロスポリンの検出のためにはシクロスポリンを含むと考えられる試料を、水性媒質中に同時あるいは順次に、本発明の抗体および本発明のシクロスポリン酵素接合体と合わせる。

【0154】一般には酵素に対する基質が添加され、これは酵素触媒反応により発色性または蛍光性生成物を生じる。好ましくは、該シクロスポリン酵素接合体は、第7のシクロスポリンアミノ酸残基のアラニン窒素原子において、場合により水素以外に約50個未満の原子、好ましくは水素以外に約35個未満の原子、更に好ましくは水素以外に約20個未満の原子を有し、かつ長さにおいて約35個以下、好ましくは25個以下、更に好ましくは15個以下の原子からなる鎖を有する連結基を介して、酵素に接合されるシクロスポリンAである。特に好ましい酵素は、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼである。試料中のシクロスポリンと該シクロスポリン酵素接合体とは、抗体上の部位について競合する。

【0155】次いで、媒質中の酵素活性が、通常分光学的手段により測定され、シクロスポリンの存在量が既知の標準または参照試料を試験した場合に測定される酵素活性と比較される。典型的には、標準または参照試料は、シクロスポリンが含まれると考えられる試料と実質的に同じ方法で試験される。一般的に、比較は、未知試料からの結果と、数種の標準試料のアッセイ操作の結果とについてなされる。該標準試料は、測定すべきシクロスポリン分析対象物を、既知であるが異なった濃度で含む。好ましくは、標準試料中に存在する濃度範囲は、未知試料中の考えられる分析対象物濃度の範囲におよぶものである。

【0156】非均質系アッセイは、通常は1以上の分離工程を含む。該非均質系アッセイは、競合的または非競

合的であり得る。競合的アッセイにおいて、本発明の抗体は、支持体に結合され、次いで試料およびシクロスポリンの環状骨格のアラニン原子において酵素等の検出可能な標識に接合されたシクロスポリンを含有する媒質に接触させられる。試料中のシクロスポリンは、支持体に結合された抗体上の部位について該接合体と競合する。支持体と媒質とを分離した後、支持体または媒質の標識活性を、常法により測定し、試料中のシクロスポリン量と関連付ける。

【0157】別の競合的非均質系手段において、本発明の抗体が支持体に結合される。媒質は、シクロスポリンを含むと考えられる試料、およびシクロスポリンの環状骨格のアラニン窒素原子において、ピオチン等の小有機分子(分子量2,000未満)に接合されたシクロスポリンを含有して調製される。好ましくは、シクロスポリンAは、第7および/または第8のシクロスポリンアミノ酸残基のアラニン窒素原子において、場合により水素以外に約50個未満の原子、好ましくは水素以外に約35個未満の原子、更に好ましくは水素以外に約20個未満の原子を有し、長さにおいて約35個以下、好ましくは25個以下、更に好ましくは15個以下の原子からなる鎖を有する連結基を介して接合される。

【0158】シクロスポリンおよび該接合体は、抗体部位について競合する。一定時間後、該支持体は媒質から分離され、洗浄され、レセプタまたは酵素等、標識に結合された小有機分子の結合相手を含む第2の媒質に接触させられる。該小有機分子がピオチンである場合に、該支持体は、酵素に結合するアビジンと接触させられる。該支持体が第2の媒質から分離され、支持体または第2の媒質のいずれかの酵素活性が、常法により測定される。該酵素活性は、試料中のシクロスポリン量に関連する。

【0159】非競合的方法の例は、2種の抗体を含むサンドイッチアッセイであり、抗体の一方は、標識され、他方は支持体に固定されるか、または支持体への固定化が図られる。

【0160】別の面において、試料中のシクロスポリンの存在または量を測定するために、凝集を利用することができる。シクロスポリンの環状骨格のアラニン窒素原子において免疫原性担体に接合されたシクロスポリンに対する応答において生じた抗体は、粒子に接合することができる。好ましくは該抗体は、第7および/または第8のシクロスポリンアミノ酸残基のアラニン窒素原子において、場合により水素以外に約50個未満の原子、好ましくは水素以外に約35個未満の原子、更に好ましくは水素以外に約20個未満の原子を有し、長さにおいて約35個以下、好ましくは25個以下、更に好ましくは15個以下の原子からなる鎖を有する連結基を介して免疫原性担体に接合されるシクロスポリンAに対する応答において生じるものである。好ましい免疫原性担体

は、K L HおよびB S Aを含み、更に好ましくはK L Hである。

【0161】凝集という点で利用できる他の接合体は、シクロスポリンの環状骨格のアラニン窒素原子において粒子に接合されたシクロスポリンである。好ましくはシクロスポリンAは、第7および/または第8のシクロスポリンAアミノ酸残基のアラニン窒素原子において、場合により水素以外に約50個未満の原子、好ましくは水素以外に約35個未満の原子、更に好ましくは水素以外に約20個未満の原子を有し、長さにおいて約35個以下、好ましくは25個以下、更に好ましくは15個以下の原子からなる鎖を有する連結基を介して免疫原性担体に接合される。

【0162】この凝集という面における一方法として、シクロスポリンを含むと思われる試料は、上述の抗体粒子接合体に合されてもよい。適当な熟成の後、シクロスポリンの存在による粒子の凝集の程度が直接的に測定され得る。他方において、該粒子は媒質から分離され得、かつ上述の方法で粒子に接合されたシクロスポリンと合することができる。凝集は、試料中のシクロスポリン量の指標として測定される。上の記述は、本発明の化合物を使用して行なうことができる多くの凝集プロトコールのうちの2種類を例示するにとどまる。

【0163】本発明の他の局面は、シクロスポリンを含むと思われる試料中のシクロスポリン量測定のための本発明のアッセイ方法を都合よく実施するに有用なキットに関するものである。この発明の応用性を増強するために、試薬類は、その割合が該方法およびアッセイの実質的な最適化を与えるように、同じまたは分離された容器において包装された組合せとして提供される。試薬類は、その交差反応性および安定性に依存して、それぞれ分離された容器とするか、あるいは種々の試薬を1個以上の容器に合せることができる。該キットは、試薬の一つとして、シクロスポリンの環状骨格のアラニン窒素原子において免疫原性担体に接合されたシクロスポリンに対する応答において生ずる抗体を含む。好ましくは、該抗体は、第7および/または第8のシクロスポリンAアミノ酸残基のアラニン窒素原子において、場合により水素以外に約50個未満の原子、好ましくは約35個未満の原子、更に好ましくは水素以外に約20個未満の原子を有し、長さにおいて約35個以下、好ましくは25個以下、更に好ましくは15個以下の原子からなる鎖を有する連結基を介して接合されるシクロスポリンAに対する応答において生じたものである。好ましい免疫原性担体は、K L HおよびB S Aを含み、更に好ましくはK L Hである。この抗体は、標識されてもされなくてもよい。

【0164】このキットは、シクロスポリンの環状骨格のアラニン窒素原子において標識に接合されるシクロスポリンを含んでもよい。好ましくは、シクロスポリンA

は、第7および/または第8のシクロスポリンAアミノ酸残基のアラニン窒素原子において、場合により水素以外に約50個未満の原子、好ましくは水素以外に約35個未満の原子、更に好ましくは水素以外に約20個未満の原子を有し、長さにおいて約35個以下、好ましくは25個以下、更に好ましくは15個以下の原子からなる鎖を介して接合される。該キットは、更に信号生成系の構成要素、支持体、補助試薬等を含む、アッセイの実施のための他の包装試薬を包むことができる。

【0165】上記定義に記述したように、支持体は、多孔性または非多孔性の水不溶性材料である。該支持体は、親水性または親水性を付与し得るものであって、シリカ、硫酸マグネシウム、およびアルミナ等の無機粉体；例えば濾紙、クロマトグラフィ用紙等の紙類を含む繊維等、特にセルロース性またはセルロースから誘導される材料である天然ポリマー材料；ニトロセルロース、セルロースアセテート、ポリ(ビニルクロライド)、ポリアクリルアミド、交差結合デキストラン、アガロース、ポリアクリレート、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ(4-メチルプテン)、ポリスチレン、ポリメタクリレート、ポリ(エチレンテレフタレート)、ナイロン、ポリ(ビニルブチレート)等の合成または修飾された天然産生ポリマー類；それら自体で使用されるか、あるいは他の材料と組合せて使用される、Bioglassとして入手可能なガラス、セラミクス、金属等を含む。

【0166】本発明によるアッセイにおいては、種々の補助材料がしばしば使用される。緩衝剤は、アッセイ媒質およびアッセイ成分のための安定化剤と共に、通常アッセイ媒質中に存在する。これらの添加物に加え、アルブミン等の付加的な蛋白質、または界面活性剤、特に非イオン性界面活性剤、結合増強剤、例えばポリエチレングリコール等がしばしば含まれるであろう。

【0167】別の局面において、本発明は、場合により連結基を介して標識または免疫原性担体に接合されたアチオシクロスポリンに関する。該アチオシクロスポリンは、好ましくはシクロスポリン代謝産物、更に好ましくはシクロスポリンA代謝産物、更になお好ましくはシクロスポリンA代謝産物M1から形成される。

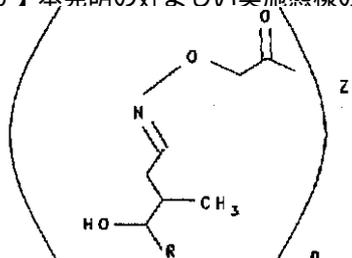
【0168】好ましくは、連結基は、結合または水素以外に1~60個の原子を有し、かつ長さにおいて30個以下の原子からなる鎖を有する基である。更に好ましくは、連結基は、水素以外に1~10個の原子を有し、かつ長さにおいて5個以下の原子からなる鎖を有する基である。

【0169】標識および免疫原性担体は、シクロスポリン接合体について上述した標識および免疫原性担体と同じ群から選択される。酵素アッセイについては、標識は酵素である。均質系酵素免疫アッセイについては、好ましくは標識はデヒドロゲナーゼ、更に好ましくはグルコ

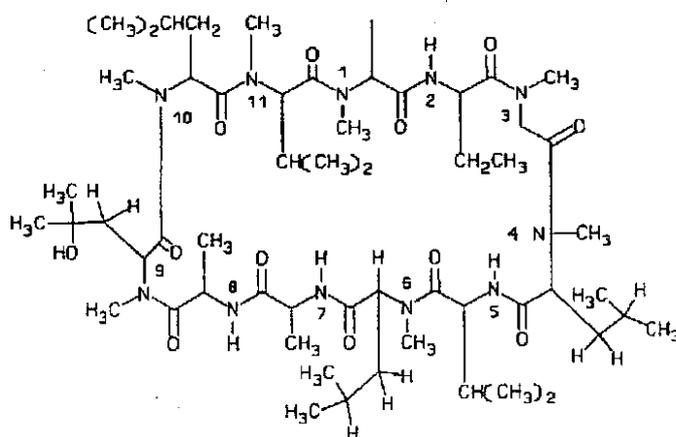
ース - 6 - リン酸デヒドロゲナーゼである。免疫原性担体は、好ましくは抗原性ポリ(アミノ酸)、更に好ましくは、キーホールリンペットヘモシアニンである。

\*【0171】の組成物に関し、式中Rは、式：

【0170】本発明の好ましい実施態様の一つは、式：\*



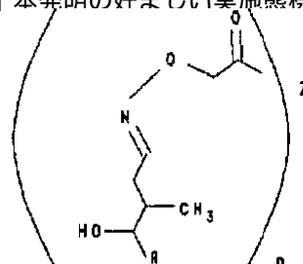
10



【0172】であり、Zは、蛋白質、ポリサッカライド、リポ蛋白質、糖蛋白質等、好ましくは分子量2,000以上のポリペプチド等の免疫原性担体であり、更に好ましくはZは、キーホールリンペットヘモシアニンまたはグルコース - 6 - リン酸デヒドロゲナーゼであり、またnは、1から、Zの分子量を5000で割った値までの数である。

するが、アッセイ条件下においてシクロスポリンまたはシクロスポリン - 標識接合体には実質的に結合できない。好ましくは、該抗体は、ウンデカペプチド環をなおも含んでいるシクロスポリンA代謝産物に結合し、シクロスポリンAには実質的に結合せず、またシクロスポリン - 酵素接合体の酵素活性を実質的に阻害しない。

【0175】本発明の好ましい実施態様の一つは、式：

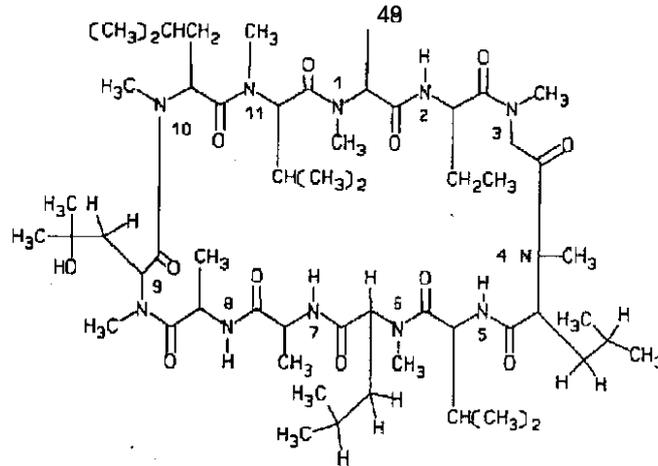


【0173】別の局面において、本発明は、シクロスポリンのアッセイにおいて交差反応性物質を認識できる抗体に関するものである。該アッセイは、好ましくは上述のアッセイの一つである。上述したように、妨害的交差反応性物質は、シクロスポリン代謝産物、更に好ましくはシクロスポリンA代謝産物、更になお好ましくは、シクロスポリンA代謝産物M1である。

【0174】本発明のこの局面における抗体類は、シクロスポリン量測定のためのアッセイにおいて妨害しない。従って、該抗体類は、妨害的交差反応性物質に結合

【0176】の組成物に対する応答により生ずる抗体に関するものであり、式中Rは、式：

(27)



【0177】であり、Zは、蛋白質、ポリサッカライド、リポ蛋白質、糖蛋白質等、好ましくは分子量2,000以上のポリペプチド等の免疫原性担体であり、更に好ましくはZは、キーホールリンペットヘモシアニンであり、またnは、1から、Zの分子量を5000で割った値までの数である。これらの抗体は、シクロスポリンA代謝産物M1に結合可能であり、シクロスポリンAを実質的に認識せず、かつ第7のシクロスポリンAアミノ酸残基のアラニン窒素原子において、場合により連結基を介してグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼに接合されるシクロスポリンAの酵素活性を実質的に阻害しない。

【0178】妨害的交差反応性物質を認識可能な抗体類は、前述のシクロスポリンを認識する抗体に関する方法によって調製され得る。

【0179】他の面において、本発明は、場合により連結基を介して免疫原性担体または標識に接合されるアチオシクロスポリンの調製方法に関するものである。

【0180】これらの接合体の調製方法は、次の工程を含む：

- (a) シクロスポリン代謝産物を、第1のアミノ酸残基のオレフィン性側鎖において酸化的に開裂させる；
- (b) 場合により、a)の生成物を延長し、アチオシクロスポリン-連結基接合体を形成する；
- (c) b)の生成物を、接合のために活性化する；および、
- (d) c)の活性化生成物を、標識または免疫原性担体と反応させることにより、接合体を形成させる。

【0181】工程a)の酸化的開裂反応は、シクロスポリン代謝産物の第1のアミノ酸残基の第6および第7の炭素原子を結合する1個以上の結合を開裂することが好ましい。該開裂反応は、第6の炭素原子に官能基を生成する。この官能基は、ヒドロキシ、ケト、アルデヒド、カルボン酸、アミノ、イミド、スルフィド、ジスルフィド等のいずれかであり、これは、アチオシクロスポリン-連結基接合体を形成するために側鎖を延長するか、あるいは該アチオシクロスポリンを直接に結合を介して免疫原性担体または標識に接合するために使用され得る。

【0182】更に好ましくは、酸化的開裂反応は、アチオシクロスポリンカルボキシアルデヒドを生成する。この型の2種類の開裂反応の例は、オゾン分解および過ヨウ素酸分解である。エポキシ化/二重結合の開環により調製される1,2-ジオール類の過ヨウ素酸分解は、詳述されている(Dryhurst, G.の"ジオールおよび他の官能基の過ヨウ素酸酸化"(Pregamon Press, New York, 1970))。二重結合のオゾン分解は、やはり詳述されている("Ozone Chemistry and Technology"(American Chemical Society, Washington, D.C. 1959); May D, F. R. "有機化合物の酸化"(American Chemical Society, Washington, D.C. 1967); Augustidine, R. L.らの"酸化"(Marcel Dekker, New York, 1971))。

【0183】更になお好ましくは、酸化的開裂反応は、溶液相オゾン分解と引続く還元的仕上げである。該反応のための好ましい溶媒は、ジクロロメタン等のハロアルカンを含む。反応温度は、-100 ~ 10、好ましくは-78 ~ -50である。オゾンは、反応内に気体流、好ましくは酸素または空気、更に好ましくは酸素中に導入される。該反応は、オゾンの特徴的な青色を溶液が示すまで継続される。次いで、過剰のオゾンを溶液から好ましくは不活性気体流により除去する。反応混合物の温度を30以下まで、好ましくは0以下まで、更に好ましくは-10以下まで昇温させる。次いで還元剤を加え、最終アルデヒド生成物を生成させる。好ましくは、還元剤は、ジアルキルスルフィド、更に好ましくはジメチルスルフィドである。

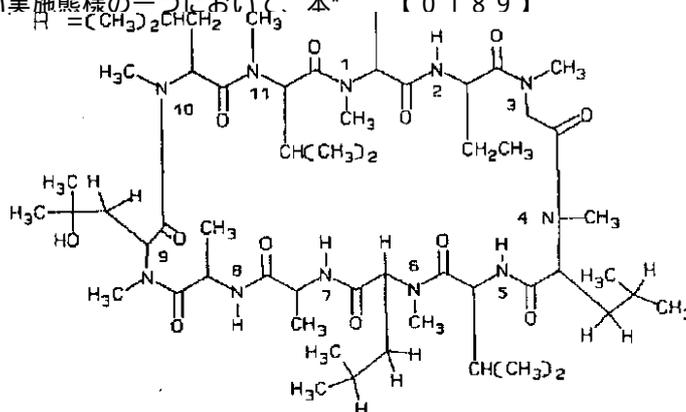
【0184】鎖延長反応b)は、シクロスポリン分子の連結基を延長するための上述したいずれの反応であってもよい。好ましくは、該反応b)はアルデヒド延長反応である。更に好ましくは、延長は、アチオシクロスポリンカルボキシアルデヒドをアミノオキサールカン酸と反応させることにより達成される。

【0185】好ましくは、該アミノオキサールカン酸

は、アミノオキシ酢酸HCl塩である。該反応は、アルコール溶媒、好ましくは低級アルコール溶媒、更に好ましくはメタノール中で行なわれる。この反応は、0と100との間、好ましくは20と50との間、更に好ましくは室温にて行なわれる。この反応は、不活性雰囲気下で、1分間と20時間との間、好ましくは10分間と10時間との間、更に好ましくは1時間と2時間との間で行なわれる。

【0186】c)の活性化反応は、上述したシクロスポリン-連結基接合体の活性化と同様にして行なわれ、該活性化反応は、スルホ-NHSによる処理を含む。d)の接合反応は、上述したシクロスポリン-連結基接合体の接合反応と同様にして行なわれ、好ましくは、該接合反応は、工程c)の活性化エステル生成物をポリ(アミノ酸)と共に処理することを含む。

【0187】その好ましい実施態様の一つにおいて、本\*



【0190】別の局面において、本発明は、シクロスポリンを含むと考えられる試料中のシクロスポリン量測定のためのアッセイにおいて、妨害的交差反応性物質を不活性化する方法に関する。好ましくは、該アッセイは上述したシクロスポリンアッセイの一つである。該不活性化方法は、シクロスポリンを含むと考えられる試料を含有する媒質を、妨害的交差反応性物質に結合可能な抗体と合せることを含む。好ましくは、該アッセイ媒質は、上述したアッセイ媒質である。

【0191】使用される抗体は、シクロスポリン量測定のためのアッセイにおいて妨害しない。好ましくは、該抗体類はアッセイ条件下で、シクロスポリンに実質的に結合しない。更になお好ましくは、抗体は妨害的交差反応性物質に結合し、シクロスポリンに実質的に結合せず、またアッセイ条件下でシクロスポリン-標識接合体に実質的に結合しない。

【0192】好ましい実施態様の一つにおいて、本発明は、シクロスポリンA代謝産物M1に結合し、シクロスポリンAに実質的に結合せず、かつ第7のシクロスポリンアミノ酸残基のアラニン窒素原子において、場合により連結基を介してグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼに接合されるシクロスポリンAを実質的に阻害(すなわち実質的に認識)しない抗体を合せることを含む。

\*発明は、スキームIの化合物(4)の調製方法に関するものである。スキームIの工程a)は、シクロスポリンA代謝産物M1(化合物(1)、スキームI)のオゾンによる分解であり、ジメチルスルフィドによる仕上げが引続く。スキームIの工程b)は、化合物(2)のアミノオキシ酢酸HCl塩を用いた処理による鎖延長であり、化合物(3)が形成される。スキームIの工程c)は、スルホ-NHSを用いた化合物(3)の活性化であり、活性化エステルが形成される。スキームIの工程d)は、工程c)の活性化エステル生成物と、キーホールリンペットヘモシアニンまたはグルコース-6-リン酸とのカップリングであり、好ましい化合物(4)が形成される。

### 【0188】スキームI

K L H = キーホールリンペットヘモシアニン

### 【0189】

【0193】妨害的交差反応性物質を不活性化するために必要とされる抗体の量は、シクロスポリンを含むと考えられる試料中に存在する物質の量、および該物質がアッセイを妨害する程度に依存する。より多くの妨害物質が存在し、かつ交差反応の程度が大きいほど、より多くの抗体が要求され、アッセイの性能を犠牲にせずに交差反応を最小とすべく十分な抗体が添加される。

【0194】血清中に存在するM1の量は、検出される全CsA(代謝産物を含む)の下限9.6%および上限23%であることが報告されている。M1の濃度は、心臓移植患者の群において30~90ng/mL、および肝臓移植患者の群において226~544ng/mLであることが報告されている(Transplant Proceeding 1988, VXX, 173-175および614-622参照)。代謝産物M1の妨害の程度は、シクロスポリンに結合する抗体の選択性に依存する。選択性がより低いシクロスポリン抗体を用いるほど、M1による妨害の程度は大きい。

【0195】別の局面において、本発明は、シクロスポリンのアッセイにおける妨害的交差反応性物質の不活性化方法を都合よく行なうために有用なキットに関する。このようなキットについての好ましい考察は前述されており、また該キットは、本発明のこの局面に従って抗体

を含んでいる。

【実施例】

【0196】下記の実施例は、本発明の特定の実施態様を更に記述するものである。これらは典型的な例示の実施例であり、また本発明の範囲を記述するが限定することを意図するものではない。

【0197】例 1

保護シクロスポリン

乾燥ピリジン (6 mL) および乾燥ジクロロメタン (6 mL) 中のシクロスポリン A (1800 mg、1.5 mmol) の攪拌されている溶液に、クロロトリメチルシランを、室温にてアルゴン雰囲気下に滴々加えた。添加完了後、該混合物を一夜攪拌した。次いで、該混合物を真空下に乾燥まで蒸発させ、固体残渣をジクロロメタンに再溶解させ、エチルアセテート/ヘキサン (80:20) により溶出するシリカゲルカラム上で精製し、TMS 保護シクロスポリン A を得た (式 (XXV))、TMS-CsA、1700 mg、89%) ; 白色固体。M.P. : 152 - 156 。I.R. (CHCl<sub>3</sub>) : 3650 w、3300 s、2950 s、2945 s、2850 s、1650 s、1415 s、および 1400 cm<sup>-1</sup>。M.S. : m/e 1275 (M<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H および <sup>13</sup>C NMR スペクトルは、与えられた構造に一致した。

【0198】例 2

p - カルボキシベンジルシクロスポリンのキーホールリンペットヘモシアニン接合体

A . 保護 p - カルボキシベンジルシクロスポリン  
乾燥トルエン (20 mL) 中の例 1 の生成物 (900 mg、0.71 mmol) の攪拌溶液に、15 - クラウン - 5 エーテル (0.3 mL) を加えた。次いで、ナトリウムハイドライド (350 mg、鉍油中の 50% 懸濁液、乾燥トルエンにて洗浄) を、氷浴温度にてアルゴン雰囲気下で加えた。該混合物を攪拌し、30 分間に室温まで加温されることを許容した。メチル p - プロモメチルベンゾエート (400 mg、2.5 x 0.71 mmol) を添加し、該混合物を室温にて 24 時間攪拌した。

【0199】エチルアセテート (150 mL) を加え、続けて水 (50 mL) を徐々に注意深く加え、次いで塩酸 (1 N) を、該混合物が酸性 (pH 3.0) となるまで加えた。有機層を分離し、水 (2 x 50 mL)、食塩水 (100 mL) により洗浄し、乾燥 (MgSO<sub>4</sub>) させた。溶媒を減圧下で除去して青白色泡状物 (1.3 g) を得、これをシリカゲル薄層プレート上にてエチルアセテート/ヘキサン (65:35; R、約 0.6) で溶離して、第 7 および第 8 のシクロスポリン A アミノ酸残基のアラニン窒素原子において式 (XII) の連結基を介してメトキシ基に結合する TMS 保護シクロスポリン A 混合物 (約 50:50) を得た ; 白色固体 (670 mg、67%)。M.S. : m/e 1,423

(M<sup>+</sup>)。 <sup>1</sup>H および <sup>13</sup>C NMR スペクトルは、与えられた構造式に一致した。

【0200】B . p - カルボキシベンジルシクロスポリン

メタノール (5 mL) 中の例 2 A の生成物 (280 mg、0.197 mmol) の攪拌溶液に水を加えた (滴々、約 1.5 mL または溶液がわずかに白濁するまで)。炭酸カリウム (無水、230 mg) を加え、該混合物を 12 時間攪拌し、追加的に水を、溶液がわずかに白濁するまで滴々加えた。該混合物を更に 12 時間、室温にて攪拌した。この混合物に、塩酸 (1 N) を溶液が酸性 (pH 2.0) になるまで注意深く入れた。水 (50 mL) を加え、該混合物をジクロロメタン (3 x 50 mL) で抽出した。有機抽出分を合せ、食塩水 (2 x 50 mL) にて洗浄し、乾燥させた (MgSO<sub>4</sub>)。溶媒を減圧下で除去して粗製の生成物 (270 mg) を得、これをジクロロメタン (10 mL) に再溶解し、シリカゲルカラム上で、出発物質を除去するまでエチルアセテートで溶出させ、次いでエチルアセテート/酢酸 (99.99:0.01) で溶離して、第 7 および第 8 のシクロスポリン A アミノ酸残基のアラニン窒素原子において式 (XII) の連結基を介してヒドロキシ基に結合するシクロスポリン A 混合物 (約 50:50) を得た (160 mg、0.12 mmol、63%) ; 白色固体。M.P. : 171 - 177 。I.R. (CHCl<sub>3</sub>) : 3700 w、3300 w、3000 m、2950 s、2920 m、2875 m および 1640 cm<sup>-1</sup>。U.V. : (エタノール) 230 NM (ε = 2.4 x 10<sup>4</sup>)。M.S. : m/e 1334 (M<sup>+</sup>, 24)。元素分析 C<sub>70</sub>H<sub>117</sub>N<sub>11</sub>O<sub>14</sub> についての理論値 : C, 62.90 ; H, 8.82 ; N, 11.06。実験値 : C, 62.10 ; H, 8.83 ; N, 10.08。 <sup>1</sup>H および <sup>13</sup>C NMR スペクトルは与えられた構造に一致した。

【0201】C . キーホールリンペットヘモシアニン免疫原

乾燥 DMF (1.3 mL) 中の例 2 B の生成物 (100 mg、0.074 mmol) の攪拌溶液に、氷浴温度にてアルゴン雰囲気下で、1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EDAC) (21 mg、1.5 x 0.074 mmol) および N - ヒドロキシルホスホスシンイミド (スルホ - NHS) (25 mg、1.5 x 0.074 mmol) を加えた。該混合物を、一夜または TLC 分析 (エチルアセテート/酢酸、99:1) により出発物質が無くなるまで攪拌した。この溶液を、ボレート緩衝溶液 (6 mL、100 mM、(pH 9.1) および DMF (0.5 mL) 中のキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) (150 mg、66% 蛋白質、92% 純度) の溶液を、氷浴温度で 1.5 時間で加えた。添加完了後、該混合物を、4 の

冷室（以下“冷室”と称す）中で一夜攪拌した。該乳様混合物を、水/DMF（80：20）、水/DMF（90：10）、最後に水のみに対して透析した。透析袋内容物を凍結乾燥して、第7および第8のシクロスポリンAアミノ酸残基のアラニン窒素原子において式（XIII）の連結基を介してキーホールリンペットヘモシアニンに結合するシクロスポリンA（150mg）を得た。

#### 【0202】D・ハプテン数の測定

ボレート緩衝溶液（pH 9.1、100mM）中の例2Cの生成物の溶液（0.59mg/mL、1mL）に、2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸（TNB）（0.1%、1mL）溶液を加え、該混合物を40にて2時間攪拌した。該混合物を室温まで冷却後、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）の溶液（10%、1mL）および塩酸（1N、1m）を加えた。ボレート緩衝溶液（pH 9.1、100mM）中のKLH（精製、1.09mg/mL）の標準溶液を調製し、TNBS溶液（1mL、0.1%）により40にて2時間処理した。この標準溶液を、SDS溶液（10%、1mL）および塩酸（1N、1mL）と反応させた。試料および標準溶液の340nmにおける吸光度を測定し、Habebe, A. F. Analytical Biochem. 1966, 14, 328（ここに参考として加える）の方法に従ってハプテン数を計算し、1,100を得た。

#### 【0203】例 3

#### o-カルボキシベンジルシクロスポリンのキーホールリンペットヘモシアニン接合体

A・保護o-カルボキシベンジルシクロスポリン乾燥トルエン中のナトリウムハイドライド（350mg、鉱油中の50%懸濁物、乾燥トルエンにより3×10mLで洗浄）の攪拌懸濁物に、例1の生成物（900mg、0.71mmol）を室温に加え、続けて15-クラウン-5エーテル（0.35mL）を加えた。該混合物を室温にてアルゴン雰囲気下で30分間攪拌した。メチル o-プロモメチルベンゾエートを4分割して加えた（0, 12時間、24時間、36時間の時点；各時点で508mgを加え、全体として4×508mg、4×2mmol）。該混合物を、室温にて36時間攪拌した後、エチルアセテート（150mL）を加え、次いで水（20mL）を注意深く加えた。該混合物を、塩酸（1N）により酸性化した。

【0204】有機層を分離し、水（3×30mL）、食塩水（50mL）により洗浄し、乾燥させた（MgSO<sub>4</sub>）。有機溶媒を除去し、油状残渣をエチルアセテートに再溶解させ、エチルアセテート/ヘキサン（65：35、RF 0.6）で溶離するシリカゲル薄層プレートにて精製し、第7および第8のシクロスポリンAアミノ酸残基のアラニン窒素原子において、式（XIV）の連結基を介してメトキシル基に結合するTMS保護シクロ

スポリンA混合物（約50：50）を得た（600mg、60%）。白色固体。M.S.：m/e 1,423（M<sup>+</sup>）。<sup>1</sup>Hおよび<sup>13</sup>C NMRスペクトルは、与えられた構造に一致した。

#### 【0205】B・o-カルボキシベンジルシクロスポリン

メタノール（10mL）中の例3Aの生成物（500mg、0.357mmol）の攪拌溶液に、水を添加した（3.0mLまたはわずかに白濁するまで）。炭酸カリウム（無水、1000mg）を加えた（混合物の白濁が残っている場合には、透明な溶液が得られるまでメタノールを数滴加える）。該混合物を室温で、アルゴン雰囲気下で27時間攪拌した。ジクロロメタン（150mL）および水（50mL）を加えた。該有機層を分離し、水性層をジクロロメタン（2×50mL）で抽出した。合せた有機層を、水/食塩水（1：1、2×50mL）により洗浄し、乾燥させた（MgSO<sub>4</sub>）。溶媒を蒸発させて乾燥させ、粗生成物（40mg）を得、これをシリカゲルカラム上で、出発物質および非酸性物質が除去されるまでエチルアセテートで溶出し、次いでエチルアセテート/酢酸（99.5：0.5）の混合物により溶出させて、第7および第8のシクロスポリンAアミノ酸残基のアラニン窒素原子において式（XIV）の連結基を介してヒドロキシル基に結合するシクロスポリンAの混合物（約50：50）を得た（350mg、0.26mmol、75%）。白色固体。M.P.：162-171。I.R.（CHCl<sub>3</sub>）：3500w、3450w、3400m、3300s、2950m、2850m、および1620s、1420m、1400および1200bcm<sup>-1</sup>。M.S.：m/e 1334（M-1、60）。元素分析C<sub>70</sub>H<sub>117</sub>N<sub>11</sub>O<sub>14</sub>についての理論値：C, 62.90；H, 8.82；N, 11.06。実験値：C, 62.23；H, 8.48；N, 11.79。<sup>1</sup>Hおよび<sup>13</sup>C NMRスペクトルは、与えられた構造に一致した。

#### 【0206】C・キーホールリンペットヘモシアニン免疫原

例3Bの生成物および例2Cの方法を使用して、第7および第8のシクロスポリンAアミノ酸残基のアラニン窒素原子において、式（XIV）の連結基を介してキーホールリンペットヘモシアニンに結合するシクロスポリンAの混合物（約50：50）を、同様な収率をもって調製した。

#### 【0207】D・ハプテン数の測定

例3Cの生成物および例2Dの方法を使用して、ハプテン数500を得た。

#### 【0208】例 4

#### o-カルボキシベンジルシクロスポリンのウシ血清アルブミン接合体

A・ウシ血清アルブミンシクロスポリン

ウシ血清アルブミンをK L Hに代えて用いた点を除き、例3 Bの生成物および例2 Cの方法を使用して、第7および第8のシクロスポリンAアミノ酸残基のアラニン窒素原子において、式(XIV)の連結基を介してウシ血清アルブミンに結合するシクロスポリンA(Cs-BSA)の混合物(約50:50)を、同様な収率をもって得た。

#### 【0209】B. ハプテン数の測定

BSAをK L Hに代えて使用した点を除き例2 Dの方法を使用して、例4 Aで形成したCs-BSA接合体のハプテン数として55が見出された。

#### 【0210】例 5

##### 保護ヒドロキシメチルシクロスポリン

乾燥トルエン(30 mL)中の例1の化合物(1000 mg、0.78 mmol)および15-クラウン-5エーテル(0.2 mL)の攪拌溶液に、ナトリウムヒドライド(450 mg、鉱油中の50%懸濁物、乾燥トルエンにて洗浄)を、室温にてアルゴン雰囲気下に加えた。30分後に該反応混合物を4 に冷却し、エチレンオキシド(6 mL)をシリンジにより加えた。反応フラスコを密栓し(ストッパーおよびパラフィンにより封止した)、室温にて24時間攪拌した。該反応混合物を水(100 mL)により注意深く処理し、塩酸(1 N)により酸性化し、ジクロロメタン(200 mL)を添加した。有機層を分離し、水(100 mL)にて洗浄し、乾燥させた(MgSO<sub>4</sub>)。溶媒を減圧下で除去して粗生成物を白色固体として得、これをシリカゲルカラム上でエチルアセートを用いて溶離して精製し、第7のシクロスポリンアミノ酸残基のアラニン窒素原子において式(I)の連結基を介してヒドロキシル基に結合するTMS保護シクロスポリンAを得た；白色固体(350 mg、34%)。M.P.: 124-132。I.R.(CHCl<sub>3</sub>): 3650 w、3400 w、3300 m、2950 m、1620 s、1460 w、および1400 wならびに1200 b cm<sup>-1</sup>。M.S.: m/e 1317(M<sup>+</sup>, 100)、1217(M-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, 10)。<sup>1</sup>Hおよび<sup>13</sup>C NMRスペクトルは、与えられた構造に一致した。

#### 【0211】例 6

##### モノカルボキシアミド延長ヒドロキシエチルシクロスポリンのキーホールリンペットヘモシアニン接合体

##### A. 保護モノカルボキシアミド延長ヒドロキシエチルシクロスポリン

乾燥トルエン(2 mL)中の例5の生成物(300 mg、0.23 mmol)およびトリ-n-ブチルチンエトキシド(154 mg、0.4 mmol)の攪拌溶液に、メチルグリシネートイソシアネートを室温にてアルゴン雰囲気下で加えた。該反応混合物を2時間攪拌した。エチルアセート(50 mL)および水(50 mL)を加えた。有機層を分離し、食塩水/水(1:1, 50

2×50 mL)により洗浄し、乾燥させた(MgSO<sub>4</sub>)。溶媒を減圧下で除去し、粗生成物をエチルアセートで溶離するシリカゲルカラムで精製して、第7のシクロスポリンAアミノ酸残基のアラニン窒素原子において式(II)の連結基を介してメトキシ基に結合するTMS保護シクロスポリンAを得た(280 mg、0.2 mmol、85%)。M.S.: m/e 1433(M+1, 100)。<sup>1</sup>Hおよび<sup>13</sup>C NMRスペクトルは、与えられた構造に一致した。

#### 【0212】B. モノカルボキシアミド延長ヒドロキシエチルシクロスポリン

メタノール(10 mL)中の例6 Aの生成物(250 mg、0.17 mmol)の攪拌溶液に、水を該混合物がわずかに白濁するまで加えた。炭酸カリウム(200 mg、無水)を加え、該混合物を室温にてアルゴン雰囲気下で一夜攪拌した。該混合物を塩酸(1 N)により酸性化し、水(20 mL)を加えた。該混合物をジクロロメタン(3×75 mL)により抽出した。合せた有機抽出物を、食塩水(10 mL)で洗浄し、乾燥させた(MgSO<sub>4</sub>)。溶媒を減圧下で除去し、第7のシクロスポリンAアミノ酸残基のアラニン窒素原子において式(II)の連結基を介してヒドロキシル基に結合されたシクロスポリンAを得た；白色固体(220 mg、0.16 mmol、96%)。M.P.: 156-166。この物質は約95%の純度であったが、エチルアセート/メタノール/酢酸(98:1.9:1, R.=0.15)により溶離されるシリカゲルカラムによって更に精製され得る。I.R.(CHCl<sub>3</sub>): 3650 w、3400 w、3300 w、2950 m、1700 w、1620 s、1460 m、1400 mおよび1090 w cm<sup>-1</sup>。M.S.: e/m 1369(M<sup>+</sup>+Na, 60)、1347(M+H, 50)。<sup>1</sup>Hおよび<sup>13</sup>C NMRスペクトルは、与えられた構造に一致した。

#### 【0213】C. キーホールリンペットヘモシアニン接合体

乾燥DMF(1 mL)中の例6 Bの生成物(30 mg、2.2×10<sup>-2</sup> mmol)の攪拌溶液に、EDAC(5.2 mg、1.2×2.2×10<sup>-2</sup> mmol)およびスルホ-NHS(5.2 mg、1.2×2.2×10<sup>-2</sup> mmol)を、4 にてアルゴン雰囲気下で加えた。次いで該混合物を冷室内で一夜攪拌した。該溶液を、ボレート緩衝溶液(pH 9.1、3.5 mL、100 mL)およびDMF(0.5 mL)中のK L H溶液に2時間で添加した。添加完了後、該混合物を冷室内にて一夜攪拌した。該混合物を、H<sub>2</sub>O/DMF(75%:25%)に対し、次いで水に対して透析し、第7のシクロスポリンAアミノ酸残基のアラニン窒素原子において式(II)の連結基を介してキーホールリンペットヘモシアニンに結合するシクロスポリンAを得た(74 mg)。

## 【0214】D. ハブテン数測定

例6Cの生成物および例2Dの方法を使用してハブテン数500が測定された。

## 【0215】例7

トリカルボキシアミド延長ヒドロキシエチルシクロスポリンのキーホールリンペットヘモシアニン接合体

A. ジカルボキシアミド - アミノ延長ヒドロキシエチルシクロスポリン

乾燥THF (1 mL) 中の例6Bの生成物 (80 mg、 $6 \times 10^{-2}$  mmol) の攪拌溶液に、N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) (9.0 mg、 $1.3 \times 6 \times 10^{-2}$  mmol) およびジクロロヘキシルカルボジイミド (DCC) (16.1 mg、 $1.3 \times 6 \times 10^{-2}$  mmol) を、4 にてアルゴン雰囲気下で加えた。該混合物を冷室内で一夜攪拌し、THF (5 mL) 中のエチレンジアミン (600 mg、10 mmol) 溶液にゆっくり加えた。該混合物を室温にて4時間攪拌し、水 (20 mL) を加えた。該混合物をジクロロメタン (3 × 50 mL) により抽出し、乾燥させた ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )。溶媒を減圧下で除去して、第7のシクロスポリンAアミノ酸残基のアラニン窒素原子において、式(XI)の連結基を介してアミノ基に結合するシクロスポリンを得 (80 mg、 $5.6 \times 10^{-2}$  mmol、94%)、これを更に精製することなく使用した。

【0216】B. トリカルボキシアミド延長ヒドロキシエチルシクロスポリン

乾燥THF (1 mL) 中の例7Aの生成物 (80 mg、 $5.6 \times 10^{-2}$  mmol) の攪拌溶液に、無水ジグリコール酸 (97%、24 mg、 $3 \times 5.6 \times 10^{-2}$  mmol) およびトリエチルアミン (26 mg、0.26 mmol) を室温にてアルゴン雰囲気下で加えた。該反応物を一夜攪拌した。水 (10 mL) およびジクロロメタン (50 mL) を加え、該混合物を塩酸 (1 N) により酸性化した。有機相を分離し、水性相をジクロロメタン (2 × 25 mL) により抽出した。合せた有機層を食塩水 (50 mL) により洗浄し、乾燥させた ( $\text{MgSO}_4$ )。溶媒を減圧下にて除去し、第7のシクロスポリンAアミノ酸残基のアラニン窒素原子において式(XII)の連結基を介してヒドロキシル基に結合するシクロスポリンAを得た (70 mg、83%) ; ガラス様固体。M.S. : m/e 1505 (M+H, 30%)。<sup>1</sup>H NMRスペクトルは、与えられた構造に一致した。

【0217】C. キーホールリンペットヘモシアニン接合体

DMF (1 mL) 中の例7Bの生成物 (60 mg、 $4 \times 10^{-2}$  mmol) の攪拌溶液に、NHS (5.5 mg、 $1.2 \times 4 \times 10^{-2}$  mmol) およびDCC (9.8 mg、 $1.2 \times 4 \times 10^{-2}$  mmol) を4 にてアルゴン雰囲気下で加えた。該混合物を一夜攪拌した。該溶液

を、リン酸緩衝溶液 (6 mL、pH 8.3、100 mM) 中のKLH (120 mg、6%蛋白質、92%の純度) の溶液およびDMF (0.8 mL) に4 にて3時間で加えた。添加完了後、該溶液を冷室内で一夜攪拌した。該混合物を $\text{H}_2\text{O}$  / DMF (90 : 10) および水に対して透析した。次いで接合体を凍結乾燥して、第7のシクロスポリンAアミノ酸残基のアラニン窒素原子において、式(XII)の連結基を介してキーホールリンペットヘモシアニンに結合するシクロスポリンAを得た (120 mg)。

【0218】D. ハブテン数測定

例7Cの生成物および例2Dの方法を使用して、ハブテン数700が測定された。

【0219】例8

モノカルボキシアミド延長ヒドロキシエチルシクロスポリン同族体

A. 保護カルボキシアミド延長ヒドロキシエチルシクロスポリン同族体

乾燥トルエン (1 mL) 中の例5の生成物 (60 mg、 $4.5 \times 10^{-2}$  mmol) およびトリ-n-ブチルチンエトキシド (30 mg、 $8.9 \times 10^{-2}$  mmol) の攪拌溶液に、 $\alpha$ -アラニンイソシアネートメチルエステルを加えた。該混合物を2時間攪拌した。エチルアセテート (50 mL) および水 (50 mL) を加え、有機層を分離し、食塩水 / 水 (1 : 1、2 × 50 mL) により洗浄し、乾燥させた ( $\text{MgSO}_4$ )。減圧下で有機相を除去し、泡状固体を、エチルアセテートで溶離するシリカゲルカラムで精製し、第7のシクロスポリンAアミノ酸残基のアラニン窒素原子において、式(IX)の連結基を介してメトキシ基に結合するTMS保護シクロスポリンAを得た (59 mg、 $4.1 \times 10^{-2}$  mmol、91%)。

【0220】B. モノカルボキシアミド延長ヒドロキシエチルシクロスポリン同族体

メタノール (1 mL) 中の例8Aの生成物の攪拌溶液に、水および炭酸カリウム (30 mg、無水) を加え、該混合物を20時間攪拌した。該混合物を塩酸 (1 N) により酸性化し、水 (20 mL) を加え、該混合物をジクロロメタン (2 × 20 mL) により抽出し、乾燥させた ( $\text{MgSO}_4$ )。この物質をシリカゲルカラム上にてエチルアセテート / メタノール / 酢酸 (98 : 2 : 0.1) により溶離させて精製し、第7のシクロスポリンAアミノ酸残基のアラニン窒素原子において、式(IX)の連結基を介してヒドロキシル基に結合されるシクロスポリンAを得た (25 mg、90%)。M.S. : m/e 1318 (M+H, 100)。

【0221】例9

モノカルボキシアミド延長ヒドロキシエチルシクロスポリンチオ類似体

A. 保護モノカルボキシアミド延長ヒドロキシエチルシ

クロスポリンチオ類似体乾燥トルエン(1 mL)中の例5の生成物(60 mg、 $4.5 \times 10^{-2}$  mmol)およびトリ-n-ブチルチンエトキシド(70 mg、0.2 mmol)の攪拌溶液に、酢酸イソチオシアネートメチルエステル(90 mg)を加えた。該混合物を2時間攪拌した。エチルアセテート(50 mL)および水(50 mL)を加えた。有機層を分離し、食塩水/水(1:1、2×50 mL)により洗浄し、乾燥させた(MgSO<sub>4</sub>)。減圧下で有機層を分離し、泡状固体を、シリカゲルカラム上にてエチルアセテートにより溶離させて精製し、第7のシクロスポリンAアミノ酸残基のアラニン窒素原子において、式(X)の連結基を介してメトキシ基に結合されるTMS保護シクロスポリンAを得た(55 mg、 $3.8 \times 10^{-2}$  mmol)。

【0222】B. モノカルボキシアミド延長ヒドロキシエチルシクロスポリンチオ類似体

メタノール(10 mL)中の例9Aの生成物(55 mg、 $3.4 \times 10^{-2}$  mmol)の攪拌溶液に、水および炭酸カリウム(30 mg、無水)を加え、該混合物を20時間攪拌した。該混合物を塩酸(1 N)により酸性化し、水(20 mL)を加え、該混合物をジクロロメタン(2×20 mL)によって抽出し、乾燥させた(MgSO<sub>4</sub>)。この材料を、シリカゲルカラム上にてエチルアセテート/メタノール/酢酸(98:2:0.1)により溶離させて精製し、第7のシクロスポリンAアミノ酸残基のアラニン窒素原子において、式(X)の連結基を介してヒドロキシル基に結合するシクロスポリンAを得た(50 mg、 $3.4 \times 10^{-2}$  mmol、89%)。M.S.: m/e 1496(70%), 1363(80%)。

【0223】例1.0

モノカルボキシアミド延長ヒドロキシエチルシクロスポリンアルキル類似体

A. 保護モノカルボキシアミド延長ヒドロキシエチルシクロスポリンアルキル類似体

例5の生成物および例8Aの方法を使用して(-アラニンイソシアネートメチルエステルに代えて -アラニンイソシアネートメチルエステルを使用した点を除く)、第7のシクロスポリンAアミノ酸残基のアラニン窒素原子において式(VI)の連結基を介してメトキシ基に結合するTMS保護シクロスポリンAを、同様な収率をもって調製した。

【0224】B. モノカルボキシアミド延長ヒドロキシエチルシクロスポリンアルキル類似体

例10Aの生成物および例8Bの方法を使用して、第7のシクロスポリンAアミノ酸残基のアラニン窒素原子において式(VI)の連結基を介してヒドロキシル基に結合するシクロスポリンAを、90%の収率をもって調製した。M.S.: m/e 1399(M+K, 100%)、1383(M+Na, 70%)、1362(M+

H, 30%)。

【0225】例1.1

モノカルボキシアミド延長ヒドロキシエチルシクロスポリン芳香族類似体

A. 保護モノカルボキシアミド延長ヒドロキシエチルシクロスポリン芳香族類似体

例5の生成物および例8Aの方法を使用して(-アラニンイソシアネートメチルエステルに代えて -フェニル -アラニンイソシアネートメチルエステルを使用した点を除く)、第7のシクロスポリンAアミノ酸残基のアラニン窒素原子において、式(V)の連結基を介してメトキシ基に結合するTMS保護シクロスポリンAを同様な収率をもって得た。

【0226】B. モノカルボキシアミド延長ヒドロキシエチルシクロスポリン芳香族類似体

例10Aの生成物および例8Bの方法を使用して、第7のシクロスポリンAアミノ酸残基のアラニン窒素原子において、式(V)の連結基を介してヒドロキシル基に結合するTMS保護シクロスポリンAを同様な収率をもって得た。M.S.: m/e 1422(M-H, 30%)。

【0227】例1.2

カルボキシメチル延長ヒドロキシエチルシクロスポリン  
A. 保護カルボキシメチル延長ヒドロキシエチルシクロスポリン

乾燥THF(1.5 mL)中の例5の生成物(130 mg、 $9.8 \times 10^{-2}$  mmol)の攪拌溶液に、ナトリウムハイドライド(20 mg、鉱油中の50%懸濁物、乾燥THFにて洗浄)および15-クラウン-5エーテル(20 mg)を、室温にてアルゴン雰囲気下で加えた。該混合物を1時間攪拌し、乾燥THF(0.5 mL)中の -プロモ酢酸メチルエステル(80 mg)を加えた。

【0228】該反応物を更に2時間攪拌し、追加分の -プロモ酢酸メチルエステル(80 mg)を添加し、該反応物を2時間攪拌した。エチルアセテート(50 mL)および(20 mL)を加え、該混合物を塩酸(1 N)により酸性化した(pH 3.0)。有機相を分離し、水(2×50 mL)により洗浄し、乾燥させた(MgSO<sub>4</sub>)。溶媒を減圧下で除去し、残渣をシリカゲル薄層プレート上でエチルアセテートにより溶離して精製し、第7のシクロスポリンAアミノ酸残基のアラニン窒素原子において、式(VII)の連結基を介してメトキシ基に結合するTMS保護シクロスポリンAを得た(80 mg、60%)；白色固体。M.S.: m/e 1358(M-H, 100)。<sup>1</sup>H NMRスペクトルは、与えられた構造に一致した。

【0229】B. カルボキシメチル延長ヒドロキシエチルシクロスポリン

メタノール(4 mL)中の例1.2Aの生成物(79 m

g、 $5.8 \times 10^{-2}$  mmol) の攪拌溶液に、水を該混合物が白濁するまで(約1.5 mL) 加えた。炭酸カリウム(無水、40 mg) を加え、該混合物を20時間攪拌した。該混合物を塩酸(1 N) により酸性化し、水(20 mL) を加え、該混合物をジクロロメタン(2 × 20 mL) により抽出し、乾燥させた(MgSO<sub>4</sub>)。該粗生成物を、シリカゲルカラム上でエチルアセテート/メタノール/酢酸(98:2:0.1) により溶離して精製し、第7のシクロスポリンAアミノ酸残基のアラニン窒素原子において、式(VII) の連結基を介して

10 ヒドロキシル基に結合するシクロスポリンAを得た(65 mg、80%) ; 白色固体。M.S.: m/e 1326 (M+Na)、1304 (M+H)。<sup>1</sup>H NMR スペクトルは、与えられた構造式に一致した。

【0230】例13

ジカルボキシアミド延長p-カルボキシベンジルシクロスポリンキーホールリンペットヘモシアニン接合体

A. ジカルボキシアミド延長p-カルボキシベンジルシクロスポリン

DMF(0.69 mL) 中の例2Bの生成物(60 mg) の攪拌溶液に、N-ヒドロキシルホスホスクシンイミド(スルホ-NHS、12.8 mg) および(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDAC、13.9 mg) を4 にてアルゴン雰囲気下で加えた。該反応混合物を4 にて一夜攪拌した。スルホ-NHSエステルの完全な形成は、18時間後にTLC(シリカゲル、溶離剤0.15:2:8の酢酸/メタノール/ジクロロメタン) により観察した。得られたスルホ-NHSエステルを、ボレート緩衝液(1 mL、pH9、0.05 M) およびDMF(2 mL) の混

30 合物中のグリシルグリシン(12.1 mg) の溶液に、pHを8.5~9に調節しながら4 にて30分間でゆっくり加えた。淡黄色溶液を4 にて更に30分間攪拌し、室温で2時間攪拌した。得られた生成物に、1 N HClを加え(混合物がpH4となるまで)、沈殿を収集し、真空下で乾燥させて白色生成物を得た(49 mg)。濾液をエチルアセテートで抽出し、該有機抽出物を乾燥させ(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、溶媒を蒸発させて生成物の第2の量を得た。合せた生成物を調製用層クロマトグラフィ(シリカゲル、溶離液3:40:160の酢酸/メ

40 タノール/ジクロロメタン) により精製し、第7および第8のシクロスポリンアミノ酸残基のアラニン窒素原子において、式(XIX) の連結基を介してヒドロキシル基に結合するシクロスポリンAの混合物(約50:50) を得た(29 mg)。M.S.: m/e 1450 (M+H)、1488 (M+K)。

【0231】B. キーホールリンペットヘモシアニン接合体

DMF(300 μL) 中の例13Aの生成物(20 mg) に、DMF(300 μL) 中のEDAC(3.1 m

50

g) およびN-ヒドロキシルホスホスクシンイミド(3.58 mg) を加えた。該反応混合物を4 にて一夜攪拌した。スルホ-NHSエステルの不完全形成は、TLC(シリカゲル、溶離液3:40:160の酢酸/メタノール/ジクロロメタン) により観察された。追加的にEDAC(3.1 mg) およびN-ヒドロキシルスクシンイミド(3.58 mg) を添加した。該反応混合物を、室温にて4時間攪拌した。完全反応をTLC(シリカゲル、溶離液3:40:160の酢酸/メタノール/ジクロロメタン) により観察した。

【0232】ボレート緩衝液(3.0 mL、pH9、0.05 M) およびDMF(0.7 mL) の混合物中のKLH(40 mg) の溶液に、上記で調製されたスルホ-NHSエステル反応混合物を、pH8.5の一定pH調節を行ないつつ室温にて4時間で添加した。追加量のDMF(0.25 mL) を4時間で加えた。得られた反応混合物を4 にて一夜攪拌した。該白濁混合物を、10% DMF/水(NH<sub>4</sub>OHによりpH8、3 × 4 L) および水(NH<sub>4</sub>OHによりpH8、5 × 4 L) に対して透析した。得られた生成物を凍結乾燥し、第7および第8のシクロスポリンAアミノ酸残基のアラニン窒素原子において、式(XIX) の連結基を介してキーホールリンペットヘモシアニンに結合するシクロスポリンAを得た(32 mg)。

【0233】C. ハプテン数測定

例13Bの生成物および例2Dの方法を使用して、ハプテン数948が測定された。

【0234】例14

シクロスポリン、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ接合体

A. シクロスポリンハプテンの活性化

炎中で乾燥させたフラスコに、35 mgのシクロスポリンハプテン、特に例6Bの生成物、6.2 mgのスルホ-NHS、5.5 mgのEDAC、および0.35 mLのDMFを容れた。該混合物を4 にて一夜攪拌した。

【0235】B. グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼへの接合

例14Aの生成物を、pH8.8の炭酸ナトリウム緩衝液/DMF(0.2 mL/mLの緩衝液) 中のグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ(G6PDH、炭酸ナトリウム緩衝液中で0.055 m)、グルコース-6-リン酸(G6P、4.5 mg/mg G6PDH)、およびNADH(9 mg/mg G6PDH) の溶液に対して、氷浴温度にて小分けして加えた。反応を、監視し、抗-CsA抗体不在時の酵素活性に相対的な、抗-CsA抗体存在時の酵素活性の29-35%阻害において停止させた。

【0236】C. 接合体の単離

この例14Bの接合体である、第7のシクロスポリンAアミノ酸残基のアラニン窒素原子において式(II) の

連結基を介してグルコース-6-デヒドロゲナーゼに結合するシクロスポリンAを、G100セファデックス上のクロマトグラフィ的分離により、0.05%のナトリウムアジドおよび0.005%のチメロサルを含む0.055M Tris-HCl (pH8.0)を用いて単離した。約35%未満の不活性化において、5-10のハプテン数を得た。例2B、3B、7B、8B、9B、10B、11Bまたは12Bも、例14と同様な方法で対応するG6PDH接合体に変換された。

#### 【0237】例15

#### モノクローナル抗体の調製、シクロスポリン

##### A. 一般的方法

使用した標準的ハイブリドーマ技術は、詳述されている(Kohler, G.; Milstein, C. Nature 1975, 256, 495-7; Hurrell, J. G. R. "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications", CRC Press, 1982, Boca Raton, FL 33431)。

##### 【0238】B. 免疫

BALB/Cマウスを、完全フロイントアジュバンド(CFA)中のイムノゲン(特には例13BのKLH接合体)の50~200µgを用いて、腹腔内の(IP)または皮下(SC)注射により免疫した。イムノゲン(不完全フロイントアジュバンド(IFA)、IPまたはSC)を用いてブーストを月毎に行なった。最終のIP、SC、または静脈内(IV)注射を生理食塩水中の100-500µgにて融合に先立って実施した。

##### 【0239】C. 免疫の監視

マウスの監視のために、血清抗体に向けたELISA試験を2~3回の免疫後に使用した。血清抗体力価は、アッセイに先立って倍々希釈した。

【0240】マイクロタイターEIAプレート(Coster #3590)を、イムノゲンと同じハプテンにより標識したG6PDH酵素-接合体の50µL/ウェルにより被覆し、リン酸緩衝食塩水(PBS, 0.01Mリン酸ナトリウム, 0.15M塩化ナトリウム, および0.02%ナトリウムアジド, pH7.2)に1:100に希釈し、37にて1時間熟成させ、次いでPBS中の1%正常ヒツジ血清(NSS)を、非特異的結合を防ぐために300µL/ウェル添加した。30分間放置した後、プレートの内容物を傾けて排出した。一連の希釈を行なった血清を50µL/ウェルに加え、37にて30分間熟成した。該プレートを、ELISA洗浄緩衝液(0.05%Tween-20[Fisher Scientific Co. #CS-279-3]、PBS中、pH7.2)を用いて3回洗浄した。PBS中に1:1000に希釈されたアルカリホスファターゼ(IgG+IgM+軽鎖特異的、Tago #6543、

887Mitten Road, Burlingame, CA 94011, USA)にて標識されたヤギの抗-マウス血清を50µL/ウェルでプレートに加え、更に30分間37にて熟成した。該プレートを前述と同様に洗浄し、次いで100µL/ウェルの基質(15mgのp-ニトロフェニルホスフェート・2ナトリウム[P-NPP, Sigma #S104-105]25mLの10%ジエタノールアミン[Eastman-Kodak #1598]あたり、pH9.8、0.5mM MgCl<sub>2</sub>[Mallinckrodt #5958]を含む)を添加した。プレートを震盪機上に室温で30分間、または可視的な発色があるまで置いた。該プレートを、次いでTitertek Multiscanにより405nmで測定した。OD値を、血清試料の希釈度に対してプロットした。血清抗体力価は、滴定曲線の最大ODから70%低減する希釈度と定義した。

##### 【0241】D. 細胞融合

免疫マウスから脾臓細胞を取出し、PGEを用いてP3X63-AG8.653ミエロマ細胞と融合させた。該細胞をHAT添加媒質中に懸濁し、96-ウェルのマイクロタイタープレートに分配した。4日後に、細胞に半量のHAT添加媒質を置換することにより養分を与えた。

##### 【0242】E. ハイブリドーマの選択

細胞融合から約1週間後、ハイブリドーマを特異的抗体について選択した。抗体産生に対する選択のために、逆ELISAアッセイを使用した。マイクロタイターEIAプレートを、PBS中に1:100に希釈したIgG+IgA+IgM, H+L鎖に対するウサギの抗-マウス特異的抗体(Zymed #61-6400SY)、pH7.2により50µL/ウェルを用いて被覆し、使用まで4にて1週間を限度として保存した。該プレートに、非特異的結合を防ぐために1%NSS/PBSを300µL/ウェル用いて充填し、30分間静置した後、傾けて排出した。次いで用いた媒質50µL/ウェルに加え、37にて30~60分間熟成させた。イムノゲンと同じハプテンにより標識したG6PDH酵素を、PBS中に1:100~1:700に希釈し、50µL/ウェルに加え、次いで37にて30~60分間熟成した。プレートを前述と同様に洗浄し、最終的に100µL/ウェルの基質(0.053M trizma塩基[Sigma #T1503]、0.02M NAD、0.033M G-6-P、0.025%NaN[ナトリウムアジド、J.T. Baker #7-VO15]、HClにてpH6.2に調節、0.63mM p-ヨウ化ニトロテトラゾリウムバイオレット[INT, Sigma #I8377]、1%NSSおよび6単位/mLのジアホラーゼ(diaphorase)[Sigma #2381])を添加した。該プレートを室温にて約1時間、震盪機上に置き、492nmにてTitertec

Multiscanにより測定した。背景より少なくとも2倍高い読取値を与えるウェルをELISA+とした。

#### 【0243】F. 腹水中における抗体産生

腹水中においてモノクローナル抗体産生の規模を拡大するために、細胞の移植の2～7日前に0.3～0.5 mL/マウスのIFAのIP注射によりマウスをプライムして腫瘍細胞の生育を誘発した。細胞をT-75フラスコ中で対数相にて約 $1.8 \times 10^6$ 細胞に生育させ、遠心分離し、次いで2 mLのS-DMEM中に再懸濁させ、各マウスに、約 $4-5 \times 10^6$ 細胞の0.5 mL IP注射を行なった。腹水腫瘍は、通常1または2週間で発達する。次いで高濃度の抗体を含む腹水を18-gageの針を用いて流出させた。該液体を室温で凝結させ、次いで、1500 rpmにて30分間遠心分離を行なった。抗体を含む液体を注出し、-20℃に冷凍して保存した。この例15の方法により、例2C、3C、6C、7Cおよび4Aの生成物に対しても抗体を生成させた。

#### 【0244】例16

##### 抗体および酵素接合体の選択

###### A. 一般的因子

シクロスポリンに対するEMIT（登録商標）アッセイに使用する最適なモノクローナル抗体および酵素接合体の選択は、多くの相互関連因子に依存する。主には、抗体は酵素接合体を認識し、効果的でなければならない。グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ（G6PDH）は、好適な酵素であるため、抗体は、グルコース-

6-リン酸接合体の活性を阻害する能力に基づいて選択されるであろう。更には、抗体は、興味あるシクロスポリンを認識する能力に基いて選択される。例えば、シクロスポリンAを検出し、その代謝産物は検出しないアッセイが望まれる場合、抗体はこの特異性をもつものが選択されるであろう。別法として、シクロスポリンAとその主要な代謝産物を検出し得るアッセイが望まれる場合には、この特異性を有する抗体が選択されるであろう。

【0245】他の選択因子は、安定性、調製の容易さ、ならびに抗体および酵素接合体の溶解性を含む。行なわれるアッセイの詳細も、抗体および酵素接合体の選択に影響を与える。例えば、試料は全血、血清、尿等であり得る。アッセイ希釈剤、安定化用添加剤、緩衝剤成分、消泡剤、および前処理も、抗体および酵素接合体の選択に影響を与える。上述の因子は、一般的であり、かつ相互関連性のものである。最適抗体および酵素接合体の選択は、上述の因子のいくつかの注意深い平衡に加えて、興味ある特定のアッセイにおいて重要な他の因子に関連する。

#### 20 【0246】B. 酵素接合体スクリーニング

例14において調製されたシクロスポリンA、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ接合体を、例15の2種類の抗体（クローン5E10および2G4）を用いて処理した場合の阻害百分率について選択を行なった。主要な選択因子は、接合阻害能および安定性を最大にすることを含む。

#### 【0247】

##### 【表1】

表 1<sup>69</sup>

## シクロスポリン-G6PDII接合体スクリーニング

連結基	H/E 比	a	% D <sup>b</sup>	% I <sup>c</sup> (5E10)	% I <sup>c</sup> (2G4)
I	392		50	3.7	
II	39		26	4.0	
	63		37	60.5	
	93		56	63.2	
III	33		56	3.5	
	65		79	6.7	
V	73		62	10.7	6.5
VI	70		45		37.3
VII			31	53.0	41.0
			52	64.4	52.5
VIII	217		47	11.4	
IX			36		44.5
XIII	380		37	5.9	
XIV	202		27	13.0	
	347		47	25.0	
	551		64	29.0	
XV	319		56	18.5	

a . 接合反応混合物中の酵素に対するハプテンの最終モル比

b . 不活性化百分率

c . 酵素阻害百分率

【0248】C . 抗体スクリーニング

例15の抗体を例14のグルコース-6-リン酸接合体

に対する阻害割合について選択した。主要な選択因子は、酵素接合体の阻害およびCsA添加による阻害低下を最大にすることを含む。

【0249】

【表2】

70  
表 2

シクロスポリン抗体スクリーニング阻害百分率

G 6 P D H 接合体連結基

KLHイムノゲン連結基XIII

クローン	II	XIII	XIV	V
3E3	35	4	33	18
16K9	20	3	20	10
13A11	26	1	22	10
4B10	47	7	39	21
6F11	25	2	27	15
2F9	12	5	13	5
11C6	16	3	18	11
2E3	13	3	16	9
12H5	30	1	20	9
5F2	13	1	13	6

KLHイムノゲン連結基XIV

クローン				
4A10	19	6	18	10
5E6	22	3	23	10
6H1	11	3	18.4	11.3
6B10	27	2	18	8
2G5	45		2	1
4C7		2	4.5	3

(表3続き)

【0250】

【表3】

表 3

G 6 P D H 接合体連結基 I I に対する阻害百分率の  
シクロスポリン抗体スクリーニング

KLHイムノゲン、連結基XIV

クローン	% I
5F7	25
3A8	18
3H2	9
2G2	22
5E12	31
3G6	24
2A3	52
10E6	47
4D7	59
5F5	46
7G10	57
7H4	46
19C5	36
4A10	20
5E6	22
6H1	11
6B10	27
6F12	15
8D9	2

KLHイムノゲン、連結基XIII

クローン	% I
7D4	45
2G5	45
7G10	17
5G5	3
8A1	1
5E10	55
15B8	18
14A9	2
3C8	25
3B4	17
9H8	27
10C6	27
9H7	46
10B6	24
8F2	12
9E7	22
1G1	19
10H3	14
10H9	23
3B7	18
2D8	34
9A10	22
6G11	38

KLHイムノゲン、連結基XIX

クローン	% I
2G4	42
7D9	4
2E3	13
3E3	35
16K9	20
13A11	26
4B10	47
6F11	25
2F9	12
11C6	16
12H5	30
5F2	13
18H6	30
4E9	46
12G10	53
3A3	47
9D10	19
6E10	28

【0251】

【表4】

【0252】D. 抗体交差反応スクリーニング \*含む。  
 例15の抗体を、G6DPH接合体、連結基IIを使用  
 してシクロスポリン代謝産物に対する交差反応性の選択  
 を行なった。主要な選択因子は、交差反応性の最小化を\*

【0253】  
 【表5】

表 4

代謝産物M1、M8、M17およびM21を  
 用いた抗体の交差反応性

妨害物 (ng/ml)	みかけのCsA濃度		
	5E10	2G4	3B5
対 照			
150ng/mL CsA	262.5	269.3	253.7
代謝産物のみ			
2000ng/mL M1	>550	>500	>500
2000ng/mL M8	>500	<50	>500
2000ng/mL M17	>500	103.6	>500
2000ng/mL M21	353.1	174.5	233.3
代謝産物+親			
2000ng/mL M1 + 250ng/mL CsA	>500	>500	>500
2000ng/mL M8 + 250ng/mL CsA	>500	206.5	>500
2000ng/mL M17 + 250ng/mL CsA	>500	284.3	>500
2000ng/mL M21 + 250ng/mL CsA	>500	323.5	348.7

【0254】

【表6】

表 5

代謝産物M17を用いた抗体の交差反応性

クローン	2A3	7H4	10E6	6E5	4D7	4B10	7G10
M17 濃度 (ng/mL)							
0	<50	<50	<50	<50	58	<50	<50
100	57	59	<50	119	136	73	<50
200	86	118	92	175	175	138	<50
350	186	253	140	363	215	238	155
500	241	304	212	534	286	334	163
1000	469	>500	415	>500	>500	>500	415

【0255】D. 結論

上記スクリーニングに基づくと、第7のシクロスポリン  
 Aアミノ酸残基のアラニン窒素原子において、式IIの  
 連結基を介してグルコース-6-リン酸デヒドロゲナー  
 ゼに接合するシクロスポリンが、例示的な酵素接合体と  
 して選択される。抗体クローン番号2G4が、例示的な  
 抗体として選択される。

【0256】例17

E M I T (登録商標) アッセイ性能

E M I Tアッセイプロトコルの詳細は、米国特許第  
 3,517,837号(1974)に記述されている。  
 例13BのKLH接合体を使用する例15の方法により  
 調製された抗体を使用し、これを、この例においては抗  
 -CsAモノクローナル抗体と称する。G6DPH接合  
 体は例6Bの化合物を使用して例14の方法により調製  
 され、この例においてはCsA-G6DPH接合体と称  
 する。該アッセイは、COBAS MIRA分析装置で

行なわれた。

【0257】100マイクロリットルの全血試料および  
 6種の基準を、別々に200μLのメタノールと回転攪  
 拌した。メタノールは、細胞を溶解させ、シクロスポリ  
 ンを可溶化し、また血液蛋白質を沈殿させた。1分間の  
 熟成後、混合物を遠心分離にかけた。上澄を前処理希釈  
 剤で1~3に希釈した。分析機において、得られた前処  
 理試料36μLを、基質および補体を含むモノクローナ  
 ル抗-CsA-抗体試薬の155μLと共に75秒間熟  
 成した。次いで、75μLのCsA-G6DPH接合体  
 試薬を加えた。175秒間熟成後、酵素活性、(薬剤濃  
 度の機能)をNADH生成を追って、340nmにて分  
 光測定的に100秒間監視した。

【0258】該モノクローナル抗-CsA抗体試薬は、  
 モノクローナル抗-CsA抗体、ニコチンアミドアデニ  
 ンジヌクレオチド、グルコース-6-リン酸、塩化ナト  
 リウム、バルク剤、界面活性剤および保存剤を含んでい

40

50

た。該CsA-G6PDH接合体試薬は、酵素接合体、トリス緩衝剤、バルク剤、安定剤および保存剤を含んでいた。希釈剤は、トリス緩衝剤、界面活性剤および保存剤を含んでいた。

【0259】各試薬は、標準的EMIT技術に適合するように調剤される。該試薬は凍結乾燥されておらず、従って液体である。バルク剤、界面活性剤および保存剤は、使い易さおよび試薬の保存のために選択された。CsA-G6DPH接合体試薬のために好ましい安定剤は、酵素活性部位以外の部位においてグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼに結合する抗体である。このような抗体は、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼをイムノゲンに用いて例15に記述した標準的なハイブリドーマ技術により調製される。抗-G6PDH抗体は、CsA-G6PDH接合体試薬の安定化剤として使用された。

\*【0260】20の試料および6種の基準を、このプロトコールのもとに2時間以内で前処理し、アッセイした。アッセイの標準曲線の範囲は、500ng/mLまで広がっている。曲線の範囲内の分析的回復は、95-104%変化した。3種の水準の対照を用いた操作精度は、5.0~7.1%CVの範囲であった。同じ対照間の操作精度は4.9~7.4%CVであった。シクロスポリン代謝産物M1を用いて交差反応性が観察されたが、他の主な代謝産物M8、M17およびM21については観察されなかった。57種類の可能的に同時投与されている薬剤、血球数の変化、ビリルビンまたはトリグリセリドの高い水準は、アッセイにおいて妨害しなかった。

【0261】  
【表7】

COBAS MIRA分析機上のアッセイパラメータ

アッセイ温度	37
波長	340nm
前処理試料の体積	36μL
希釈体積(水)	59μL
抗体試薬体積	155μL

【0262】3種の水準のシクロスポリンAを2種類の新鮮なシクロスポリンA-負の全血試料に入れた。該試料を2つ一組でアッセイした。

\*【0263】  
【表8】

添加濃度 (ng/mL)	75	250	400
遅延時間(試料+抗体および酵素試薬)	10	10	10
平均回収時間/mL	74.3	237.1	306.7
SD (ng/mL)	6.2	11.8	18.0

【0264】5種の水準のシクロスポリンAを2種類の分離した新鮮なシクロスポリンA-負の全血試料に入れた。アッセイを2つ一組で行なった。

【0265】  
【表9】

回収率濃度)	35	79.9	150	927.8	99.2
(ng/mL)					
N	2	2	2	2	2
平均 (ng/mL)	41.6	77.8	151.6	277	

【0266】操作内の精度決定を、それぞれ3種の水準にある20の別個の試料抽出物について行なった。操作間の精度決定を、2台の分析機において合計20回の操作における各々3種の水準について行なった。個々の試

料抽出物は、各操作においてアッセイされ、また、定量化は同一の標準曲線から行なった。

【0267】  
【表10】

	平均	SD	CV
	(ng/mL)	(ng/mL)	(%)
操作内	20	82.3	5.6
			6.8

20 187.3 9.4 5.0  
20 372.2 26.4 7.1

操作間 20 91.1 6.7 7.4  
20 183.9 9.0 4.9  
75 20 356.6 17.5 476.9

【0268】 American Association of Clinical Chemists/College of American Pathologists (AACC/CAP) の Whole Blood Cyclosporin A Survey の試料、および the United Kingdom Quality Assessment Scheme (UKQAS) から (AS) の試料を EMIT シクロスポリン A アッセイにより測定した。結果は、HPLC および CYCLO-TRAC SPRIA (INCSTAR) のものと良好に一致した。  
【0269】  
【表11】

AACC/CAP 試料ID	平均シクロスポリンA濃度		
	EMIT®	HPLC	RIA
CS1-A (1989)	380	409	--
CS1-B (1989)	191	188	194
CS1-C (1989)	45	44	42
CS1-D (1989)	99	96	98
CS1-A (1990)	52	59	60

UKQAS 試料ID	平均シクロスポリンA濃度		
	EMIT®	HPLC	RIA
67A	135	111	130
67B	195	167	191
67C	449	432	534
68A	159	138	163
68B	169	141	164
68C	160	148	162
69A	134	123	127
69B	200	205	217
69C	161	152	161
70A	152	122	144
70B	249	157	223
70C	98	86	87
71A	122	100	116
71B	154	114	146
71C	314	221	314
72A	247	205	265
72B	119	94	121
72C	124	115	131
73A	273	211	268
73B	190	132	176
73C	97	68	89

【0270】 4種の主要なシクロスポリンA代謝産物による交差反応性を、200 ng/mL のシクロスポリンAの存在下で評価した。これらの代謝産物中、M1 (A M9) のみが有意な交差反応性を示した。  
【0271】  
【表12】

見かけのシクロスポリンA濃度  
代謝産物濃度 M1 M8 M17 M21

(ng/mL)	(AM9)	(AM19)	(AM1)	(AM4N)
0	197	197	200	190
100	231	197	190	173
200	250	209	203	193
350	290	207	202	200
500	312	207	187	174

【0272】下記の57種の化合物は、アッセイにおいて交差反応を起こさなかった。それらは、以下の濃度において200 ng/mLのシクロスポリンAの存在下で試験された。実質的な交差反応性は、シクロスポリンA\*

\*濃度において、125%を越える上昇として定義した。

【0273】

【表13】

交差反応物	試験レベル (μ/mL)	交差反応物	試験レベル (μ/mL)
アセトミノフェン	100	マプロチリン	100
アミカシン	500	メロファラン	100
アミトリプチリン	500	メチルグルドニソフ	100
アンソテリシチンB	100	N-アセチルプロカイナムド	100
アソピシリン	100	ネオマイシン	500
アザチオプリン	100	オキシシチン	100
カルバマゼピン	500	フェニバルビタール	500
セフォキシム	100	フェニトイン	200
セファロスピリン	100	プレニソロン	10
クロラムフェニコール	500	プレニソフ	10
クロルシタセキシド	100	プリミドン	200
クロルプロバミド	100	プロカイナムド	50
シメキチン	100	チープロプラノロール	100
シタロキスファミド	100	キニジン	100
ジアゼパム	100	リファンピシチン	100
ジギトキシン	100	チリチル酸	1000
ジコキシチン	0.1	スベチチノマイシン	100
ジピリダモール	100	ストレプトマイシン	500
ジソピラミド	100	スルファメタゾフ	100
エソカイニド	100	スルファメトキサゾール	100
エリスロマイシン	500	チオファイリン	100
エトスタシチド	500	トブラマイシン	500
フロセミド	100	トカイニド	100
ゲンタマイシン	100	トリアソテレン	100
イミプラミン	500	トリメトプリム	100
インドメタシチン	100	バルプロン酸	1000
カナマイシン	500	バンコマイシン	100
ケトコナゾール	100	ベラパミル	100
リドカイン	100		

【0274】30 mg/dLのビルリピンまたは1000 mg/dLのトリグリセリドの存在下において、EMIT (登録商標) シクロスポリンAアッセイでは何らの

有意な妨害を生じないことが見出された。

【0275】

【表14】

シクロスポリンA (ng/mL)	75	400
対照	107.1	107.7
ビルリピン (30 mg/dL)	111.7	101.6
トリグリセリド (1000 mg/dL)	102.8	102.5

【0276】18%~66%の範囲のヘマトクリット値を有する試料は、シクロスポリンAの濃度75、250および400 ng/mLにおける回収率について、何らヘマトクリット

臨床的に有意な変位を示さなかった。

【0277】

【表15】

(%)	75 ng/mL	250 ng/mL	250 ng/mL
18	97.3	106	101
26	95.6	108	97.0
38	113	103	97.7
45	107	111	103
56	104	111	101

66 79 105

## 【0278】例18

オキシ酢酸イミノ延長アチオシクロスポリン

無水メタノール(1ml)中のシクロスポリンA代謝産物M-1(化合物(1)、スキームI、6mg、 $4.9 \times 10^{-3}$ mmol、Christians, U.らのClinical Chem. 1988, 34(1), 34-39の方法により、Roerig, D.L.らのS. Chematog. 1975, 110, 349の方法に従ってBio-Beadsを使用して、イヌ尿から得た)の攪拌溶液に、-78にてオゾンを含む酸素気流(Welbachオゾン発生装置、0.5mL/分、制御圧6psi、オゾン発生器圧4psi、オゾン発生器を80ポルトで運転)を10分間(溶液が青色に変わるまで)通し、オゾン含有酸素気流を停止した。該溶液にアルゴンを10-15分間通気した(溶液温度が-20となるまで)。ジメチルスルフィド(0.2ml)を加えた。該混合物を、室温まで温め、メタノールのほとんどが蒸発するまでアチオシクロスポリンカルボキシアルデヒド生成物(化合物(2)、スキームI)は単離、精製、分析されなかった。オゾン分解生成物を含む反応混合物を、無水メタノール(1ml)中に再溶解し、アミノオキシ酢酸(HCl塩、12mg、0.1mmol)を加えた。該混合物を、室温にて2時間攪拌した。ジクロロメタン(30ml)、食塩水/水混合物(1:1、20ml)および2滴のHCl(1N)を加えた。ジクロロメタン層を分離し、乾燥させ(MgSO<sub>4</sub>)、蒸発させてオキシ酢酸イミノ延長アチオシクロスポリン(化合物(3)、スキームI、6mg、 $4.7 \times 10^{-3}$ mmol、96%)。M.S., m/e 1279.9 (M+H)<sup>+</sup>。該生成物を、精製なしで使用したが、更に、調製用薄層クロマトグラフィ(シリカゲル、エチルアセテート/MeOH/AcOH, 90:10:0.1)によって精製することもできる。

## 【0279】例19

オキシ酢酸イミノ延長アチオシクロスポリンキーホールリンペットヘモシアニン接合体

乾燥DMF(0.2ml)中の例18の生成物(化合物(3)、スキームI、5mg、 $3.9 \times 10^{-3}$ mmol)およびN-ヒドロキシルホスホスクシイミド(スルホ-NHS、11mg、 $1.2 \times 3.9 \times 10^{-3}$ mmol)の攪拌溶液に、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDAC、1.1mg、 $1.6 \times 3.9 \times 10^{-3}$ mmol)を添加した。該混合物を室温にてアルゴン雰囲気下に5時間攪拌した。該反応の監視に薄層クロマトグラフィ(シリカゲル、エチルアセテート/MeOH/AcOH, 85:15:0.4)を使用した。この技術により、すべての出発物質が消費された。該活性化エステル生成物は、単離、精製、分析を行なわなかった。リン酸緩衝液(pH 8.

110

11080

1、100mM、2ml)およびDMF(0.2ml)中のキーホールリンペットヘモシアニン(KLH、64%純度、17mg、 $2 \times 10^{-5}$ mmol)の攪拌溶液に、4において活性化エステル生成物を、1時間で添加した。該混合物を4にて一夜攪拌した。該混合物を、H<sub>2</sub>O/DMF(80:20、500ml)および水に対して透析した。透析生成物を凍結乾燥して、オキシ酢酸イミノ延長アチオシクロスポリンのキーホールリンペットヘモシアニン接合体(式(4)、スキームI、15mg)を得た。この接合体は、M1-KLH接合体とも称される。

## 【0280】例20

オキシ酢酸イミノ延長アチオシクロスポリンのグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ接合体

例14の方法および例18のアチオシクロスポリンハブテンを使用して、オキシ酢酸イミノ延長連結基を介してグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼに接合するアチオシクロスポリン(化合物(4)、スキームI、KLHに代えて接合はG6PDHに対して)を調製した。この接合体は、M1-G6PDH接合体とも称される。

## 【0281】例21

抗M1モノクローナル抗体の調製

## A. 一般的方法

例15の方法、および例19のオキシ酢酸イミノ延長アチオシクロスポリンのキーホールリンペットヘモシアニン接合体生成物を使用して、モノクローナル抗体を調製した。例20のオキシ酢酸イミノ延長アチオシクロスポリンのグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ接合体生成物をELISAスクリーニングに使用した。

## 【0282】B. 抗-M1抗体の選択

Balb/cマウスを免疫した。3回の免疫(100μg/注射/マウス、月毎)後、マウスから尾部静脈にて採血し、血清抗体力価を測定した。Forward ELISAプロトコルにより、血清の一連の希釈物をCsA-G6PDHおよびM1-G6PDHの両者に対して選択した。初期の力価は、CsA-G6PDHに比べてM1-G6PDHに対して約3倍高いものであった。力価は、M1-G6PDHに対して選択した場合、1:30,000であったが、一方CsA-G6PDHに対しては、わずか1:10,000であった。

【0283】4回の融合を行なった。融合の際、脾臓は、免疫応答の上昇を示してわずかに拡大した。脾臓の大きさは、置換により測定して0.25~0.5mLの範囲であった。初期の選択は、逆ELISAにより、ウサギ-マウスIgG+IgA+IgM鎖(Zymed, 458, Carlton Court, S. San Francisco, CA 94080, USA, #61-6400SY)で被覆した複写プレート上で行なわれた。初期選択の応答は、融合あたり3~36ELI

S A - 正ウェルの範囲の変化があった。第2の選択は、E M I Tにより行なった。抗体類を、C s A - G 6 P D Hを阻害する能力について試験した。抗体は、抗 - C s A - 抗体の存在下で、C s Aの存在において阻害の逆転を示すが、M 1の存在において阻害の逆転を示さず、かつM 1 - G 6 P D Hを阻害するが、C s Aには実質的に結合せず、またC s A - G 6 P D Hを阻害しないものとして選択された。一つの抗体(クローン2 B 1 0)が、抗 - M 1モノクローナル抗体として選択された。

【0284】C . 抗 - M 1抗体の調製および精製  
抗 - M 1モノクローナル抗体(クローン2 B 1 0)を産生可能な細胞をスピナーフラスコ中で、37 °および7 % C O<sub>2</sub>において生育させた。培養物を、新鮮培地の供給および培養の追加またはより大型の容器に分割することにより維持した。Trypan Blueを用いた細胞の計数および生存性測定は、細胞生育を監視するために常法どおり行なった。使用媒質の5 X ~ 1 0 X濃縮物のParagonゲル電気泳動を、抗体産生を監視するために常法どおり行なった。1 0日後、培養物をB e c k m a n R C 2 B遠心分離機により5 0 0 0 r p mで1 5分間、4 °にて遠心分離し、抗体から細胞を除去した。

【0285】1 5 Lの培養液中の抗体を5倍に濃縮し、1 0 m M M E S緩衝溶液にて透析した。該抗体を、B\*

見かけのシクロスポリン濃度

代謝産物濃度 ( n g / m L )	M 1 ( A M 9 )	M 8 ( A M 1 9 )	M 1 7 ( A M 1 )	M 2 1 ( A M 4 N )
0	2 0 0	2 0 0	2 0 0	2 0 0
1 0 0	2 0 3	2 0 5	2 1 0	2 0 0
2 0 0	2 0 8	1 9 8	1 9 9	2 1 4
3 5 0	2 1 5	2 0 8	2 0 1	2 0 6
5 0 0	2 2 4	2 1 5	1 9 4	2 0 1

【0288】前述の本発明は、0例示のためにある程度詳細に記述されているが、ある種の変更や修飾が、添付する請求の範囲の内で行なわれ得るであろうことは自明であろう。特に、本発明の化合物の連結基の構造の重要

\* a k e r b o n d A B x ( J . T . B a k e r I n c . # 7 2 6 9 - 0 0 ) 上のカラムクロマトグラフィにより精製した。高さ5 0 c m、直径2 . 6 c mのカラムに、約1 0 0グラムのA B xを1 0 m M M E S緩衝液で平衡化して充填した。抗体を5 m L / 分にて負荷し、次いで、1 0 m M M E S p H 5 . 6から2 0 0 m M N a C l / 1 0 0 m M トリス p H 7 . 4までの1 Lの勾配により溶出した。試料は、カラムから1 0 m Lの分画で収集され、蛋白質濃度について2 8 0 n mにおいて吸光度の監視が行なわれた。抗体を含む分画を集めた。

【0286】例2.2  
抗 - M 1抗体を用いたE M I Tアッセイの性能  
例1.7のアッセイを、例Aに特定した成分に加えて例2.1の抗 - M 1抗体を含むモノクローナル抗 - C s A抗体試薬を使用して行なった。4種の主要なシクロスポリンA代謝産物の交差反応性を、2 0 0 n g / m LのシクロスポリンAの存在下で評価した。代謝産物M 1、M 8、M 1 7またはM 2 1について、臨床的に有意な交差反応性(臨床的に有意な交差反応性は、C s A定量値を2 0 0 %で増大させる交差反応性である)は観察されなかった。アッセイ性能の他の局面は、実質的に影響を受けなかった。

【0287】

【表16】

ズない変更が行なわれ得る。本発明の化合物または抗体の性質を顕著に変えるものではないこのような修飾は、自明のものと考えられる。

フロントページの続き

(72)発明者 モウリーン エイチ・ベレシニ  
アメリカ合衆国カリフォルニア州モス ビーチ, ケルモアー ストリート 821

(72)発明者 スベットラナ アレクサンダー  
アメリカ合衆国カリフォルニア州サニベイイル, ホレンベック アベニュー 913

(72)発明者 マエ ダブリュ・フ  
アメリカ合衆国カリフォルニア州ロス アルトス ヒルズ, セント フランシス 26705

(72)発明者 エドウィン エフ・ウルマン  
アメリカ合衆国カリフォルニア州アサートン, セルビィ レーン 135

Fターム(参考) 4H045 AA10 AA11 BA16 BA35 DA83  
DA86 EA20 EA50

专利名称(译)	环孢菌素免疫测定		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003201298A</a>	公开(公告)日	2003-07-18
申请号	JP2002366051	申请日	2002-12-18
[标]申请(专利权)人(译)	日德白令maru堡ゲゼルシヤフトミツトベシユレンクテルハフツング		
申请(专利权)人(译)	德灵公司马尔堡, Gezerushiyafuto-Mitsuto-Beshiyurenkuteru-有限公司		
[标]发明人	ダリウシュダバリアン モウリーンエイチベレシニ スペットラナアレクサンダー マエダブリュフ エドウィンエフウルマン		
发明人	ダリウシュダバリアン モウリーンエイチベレシニ スペットラナアレクサンダー マエダブリュフ エドウィンエフウルマン		
IPC分类号	A61K38/00 A61K39/385 A61K39/395 C07K1/06 C07K1/113 C07K7/64 C07K14/00 C07K16/00 C07K16/44 C07K19/00 C12Q1/32 G01N33/53 G01N33/535 G01N33/94		
CPC分类号	G01N33/5306 C07K7/645 C07K16/44 G01N33/535 G01N33/9493 Y02A50/58 Y10S435/962 Y10S436/815 Y10S436/825 Y10S436/829 Y10S530/807		
FI分类号	C07K7/64 C07K16/44 G01N33/53.S G01N33/53.D G01N33/535		
F-TERM分类号	4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA16 4H045/BA35 4H045/DA83 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50		
优先权	07/616116 1990-11-20 US		
其他公开文献	JP3936285B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

环孢菌素的测定方法技术领域本发明涉及使含有环孢菌素的样品中的环孢菌素的测定方法中的使测定干扰物质失活的方法。一种在怀疑含有环孢菌素的样品中的环孢素定量测定中灭活干扰交叉反应物质的方法，包括所述样品的测定介质能够与干扰交叉反应物质结合。使用一种抗体为不干扰环孢菌素定量测定的方法。

