

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-168782

(P2004-168782A)

(43) 公開日 平成16年6月17日(2004.6.17)

(51) Int.Cl.⁷

C07D 498/18

F I

C07D 498/18 301

テーマコード (参考)

4C072

審査請求 有 請求項の数 4 O L (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願2003-412071 (P2003-412071)	(71) 出願人	598014180
(22) 出願日	平成15年12月10日 (2003.12.10)		ワイス
(62) 分割の表示	特願平6-524408の分割		アメリカ合衆国ニュージャージー州079
原出願日	平成6年4月22日 (1994.4.22)		40マデイソン・ファイブジラルダファア
(31) 優先権主張番号	08/053, 030		ムス
(32) 優先日	平成5年4月23日 (1993.4.23)	(74) 代理人	100062007
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 川口 義雄
(31) 優先権主張番号	08/224, 205	(74) 代理人	100113332
(32) 優先日	平成6年4月14日 (1994.4.14)		弁理士 一入 章夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100114188
			弁理士 小野 誠
		(74) 代理人	100103920
			弁理士 大崎 勝真

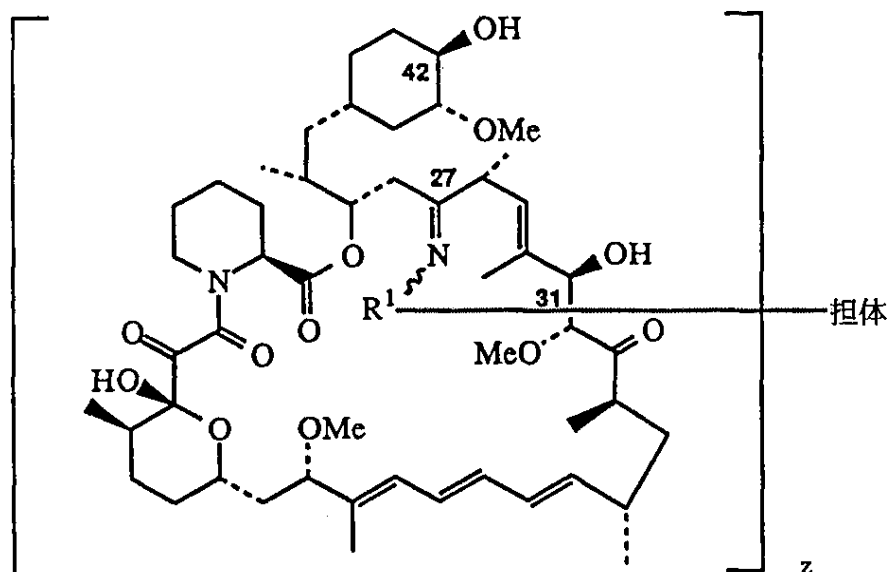
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ラパマイシン結合体及び抗体

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 免疫原性分子として有用なラパマイシン結合体を提供する。

【解決手段】 式 I V で示されるラパマイシン結合体またはその塩。



10

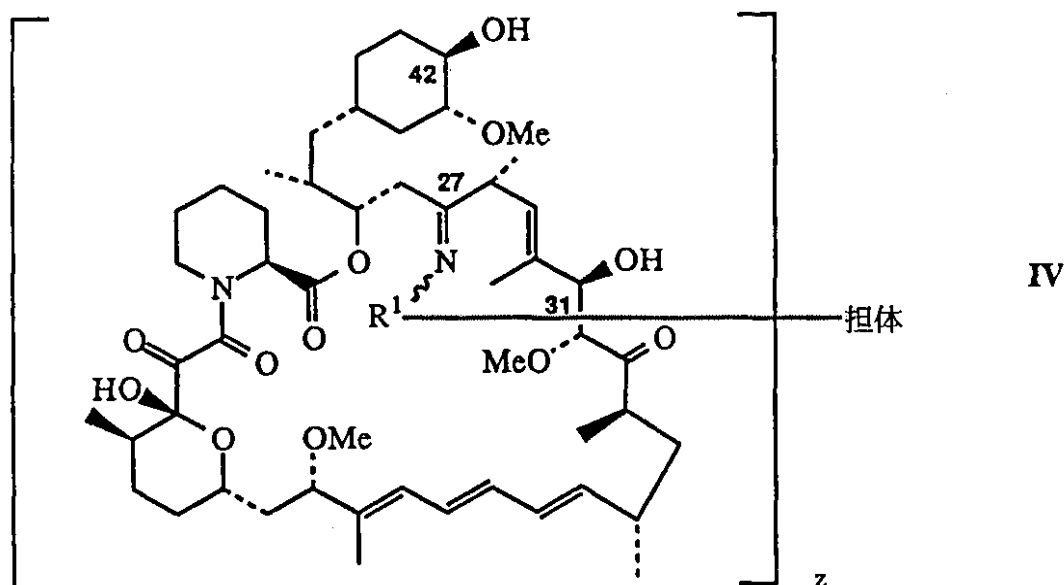
20

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 (I V)

【化 1】



10

20

〔式中、 R^1 は $-OCH_2(CH_2)_qR^4-$ であり、 R^4 はカルボニル、 $-NH-$ 、 $-S-$ 、 $-CH_2-$ および $-O-$ から成る群より選択され、 q は 0 乃至 6 であり、 z は約 1 から約 120 であり、担体は免疫原性担体材料である。〕

で示されるラパマイシン結合体またはその塩。

【請求項 2】

前記式 (I V) が前記免疫原性担体材料に結合したラパマイシン - O - カルボキシメチル - 27 - オキシムである請求項 1 に記載のラパマイシン結合体。

【請求項 3】

前記免疫原性担体材料がスカシガイヘモシアニンおよび卵白アルブミンからなる群より選択される請求項 1 に記載のラパマイシン結合体。

30

【請求項 4】

前記免疫原性担体材料がスカシガイヘモシアニンおよび卵白アルブミンからなる群より選択される請求項 2 に記載のラパマイシン結合体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ラパマイシン (rapamycin) 又はその開環誘導体に特異的な抗体の産生、ラパマイシン又はその誘導体の量の測定、ラパマイシン結合タンパク質の単離及びラパマイシン又はその誘導体に特異的な抗体の検出のための免疫原性分子として有用なラパマイシン誘導体に関する。

40

【背景技術】

【0002】

ラパマイシンは、*Streptomyces hygroscopicus* によって産生されるマクロサイクリックトリエン抗生物質であり、特に *in vitro* 及び *in vivo* のいずれにおいても *Candida albicans* に対して抗真菌活性を有することが見いだされた (C . Vezina ら , J . Antibiot . 28 , 721 (1975) ; S . N . Sehgal ら , J . Antibiot . 28 , 727 (1975) ; H . A . Baker ら , J . Antibiot . 31 , 539 (1978) ; 米国特

50

許第3,929,992号;及び米国特許第3,993,749号]。

【0003】

ラパマイシン単独(米国特許第4,885,171号)又はピシバニールと組み合わせたラパマイシン(米国特許第4,401,653号)は抗腫瘍作用を有することが示されている。R. Martelら[Can. J. Physiol. Pharmacol. 55, 48(1977)]は、ラパマイシンが多発性硬化症用のモデルである実験的アレルギー性脳脊髄炎モデル、リウマチ性関節炎モデルであるアジュバント関節炎モデルに有効であり、且つIgE様抗体の形成を有効に阻害し得ることを開示した。

【0004】

ラパマイシンの免疫抑制作用は、FASEB 3,3411(1989)に開示されている。他のマクロサイクリック分子であるシクロスポリンA及びFK-506も免疫抑制剤として有効であり、従って移植片拒否反応の予防に有用であることが示されている[FASEB 3,3411(1989);FASEB 3,5256(1989);R. Y. Calneら, Lancet 1183(1978);及び米国特許第5,100,899号]。 10

【0005】

ラパマイシンはまた、全身性エリテマトーデス[米国特許第5,078,999号]、肺の炎症[米国特許第5,080,899号]、インシュリン依存性真性糖尿病[Fifth In. Conf. Inflamm. Res. Assoc. 121(Abstrac t), (1990)]、成人のT細胞白血病/リンパ腫[欧州特許出願公開第525,960号]、並びに平滑筋細胞増殖及び脈管損傷後の血管内膜厚化[Morris, R. J. Heart Lung Transplant 11(第2部):197(1992)]の予防及び治療にも有用であることが示されている。 20

【0006】

ラパマイシンのモノ及びジアシル化誘導体(28位及び43位でエステル化された)は、抗真菌剤(米国特許第4,316,885号)として有用であることが示されており、ラパマイシンの水溶性プロドラッグ(米国特許第4,650,803号)の製造に用いられている。最近、ラパマイシンのナンバリング規約が変わった。従って、ケミカルアブストラクト命名法によれば、上記のエステルは31位及び42位に存在する。米国特許第5,100,883号はラパマイシンのフッ素化エステルを開示している。 30

【0007】

米国特許第5,118,677号はラパマイシンのアミドエステルを開示している。

【0008】

米国特許第5,118,678号はラパマイシンのカルバメートを開示している。

【0009】

米国特許第5,130,307号はラパマイシンのアミノエステルを開示している。

【0010】

米国特許第5,177,203号はラパマイシンのスルホネート及びスルファメートを開示している。

【0011】

米国特許第5,194,447号はラパマイシンのスルホニルカルバメートを開示している。 40

【0012】

PCT出願公開WO92/05179号はラパマイシンのカルボン酸エステルを開示している。

【0013】

Yatscoffは、HPLC法を用いてラパマイシンの量を1ng/mlの感度で定量し得ると報告している[Ther. Drug Monitoring 14:138(1992)]。この方法は時間がかかり、各試料は個別に検定しなければならない。

【0014】

多くのタンパク質並びにシクロスポリン A [Morris, R. G., Ther. Drug Monitoring 14: 226 - (1992)] 及び FK506 [Tamura, Transplant Proc. 19: 23 (1987); Cadoff, Transplant Proc. 22: 50 (1990)] を含む種々の薬剤用のイムノアッセイが開発されている。タンパク質又は化合物の測定に開発された多種のイムノアッセイは、拮抗阻害、二重抗体、受容体 - 抗体相互作用、抗原の捕獲、ディップスティック、抗体又は受容体の捕捉、又はアフィニティークロマトグラフィーに基づいている。ラパマイシン類縁体がマトリックスに共有結合しているラパマイシンを有するアフィニティークラムが報告されている [Fretz J. Am. Chem. Soc. 113: 1409 (1991)]。これらのカラムはラパマイシン結合タンパク質の単離に用いられている。

10

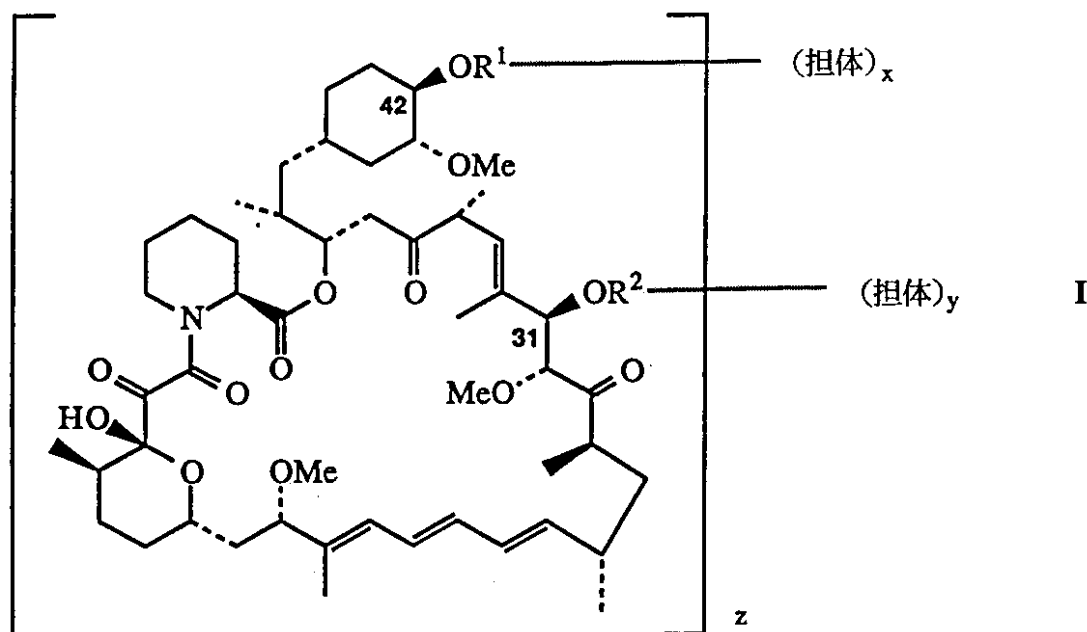
【0015】

本発明の説明

本発明は、構造

【0016】

【化1】



20

30

〔式中、 R^1 及び R^2 はそれぞれ独立に、水素又は $-(R^3 - L - R^4)_a-$ であり；

L は結合基であり；

R^3 は、カルボニル、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-P(O)_2-$ 、 $-P(O)(CH_3)-$ 、 $-C(S)-$ 及び $-CH_2C(O)-$ からなる群から選択され；

R^4 は、カルボニル、 $-NH-$ 、 $-S-$ 、 $-CH_2-$ 及び $-O-$ からなる群から選択され；

40

$a = 1 \sim 5$ であり；

$x = 0 \sim 1$ であり；

$y = 0 \sim 1$ であり；

z は約 1 ～ 約 120 であり；

担体は、免疫原性担体材料、ディテクター担体材料若しくは固体マトリックス又はその塩であり、但し、 R^1 及び R^2 は共に水素ではなく、 a が 1 より大きい場合には各 L 基は同一でも異なってもよく、さらに、 R^1 が水素の場合 x は 0 であり、 R^2 が水素の場合 y は 0 であり、 x 及び y が共に 1 の場合、担体部分はどちらの場合も同一である）を有する式 I のラパマイシン結合体を提供する。

【0017】

50

結合基 L は、一方の末端に基 R^3 を、他方の末端に R^4 を含み、従って、結合基が一方の末端ではラパマイシンの 42 - 及び / 又は 31 - ヒドロキシル基に結合し、他方の末端では別の結合基又は免疫原性担体材料、ディテクター材料又はマトリックスに結合し得る任意の部分である。a が 1 より大きい場合、各 L 基は同一でも異なってもよい。そのような場合、第 1 の L 基は L^1 、第 2 の L 基は L^2 というように称される。本発明のラパマイシン結合体は多岐にわたる結合基 (L) 及び末端官能基 R^4 を含むように製造し得る。例えば、L は、1 ~ 15 個までの範囲、より一般的には 10 個未満、通常 6 個未満の炭素原子を含む直鎖又は分枝鎖アルキレン (即ち、メチレン、エチレン、n - プロピレン、iso - プロピレン、n - ブチレンなど) であってよい。さらに、そのようなアルキレンは、シアノ、アミノ (置換アミノを含む)、アシルアミノ、ハロゲン、チオール、ヒドロキシル、カルボニル基、カルボキシル (置換カルボキシル、例えば、エステル、アミド及び置換アミドを含む) のような他の置換基を含んでいてよい。結合基 L は、置換若しくは非置換アリール、アラキル又はヘテロアリール基 (例えば、フェニレン、フェネチレンなど) も含んでいてよい。さらに、そのような結合基は、エーテル、エステル、アミド、アミノ、チオエーテル、アミジノ、スルホン又はスルホキシドの形態の、窒素、硫黄及び酸素から選択される 1 個以上のヘテロ原子を含んでいてよい。またそのような結合基は、オレフィン又はアセチレン結合、ジスルフィド、イミノ又はオキシイミノ基のような不飽和基を含んでいてよい。L が、水素を除く 1 ~ 約 20 個の原子、より一般的には 1 ~ 10 個の原子、そのうち 0 ~ 5 個は好ましくは窒素、酸素及び硫黄から選択される原子を含む一般に脂肪族の鎖であるのが好ましい。従って、結合基 L の選択は、本発明にあっては重要ではなく、安定な化合物を確実に生成させるための通常の予防処置を講じて当業者が選択し得る。

10

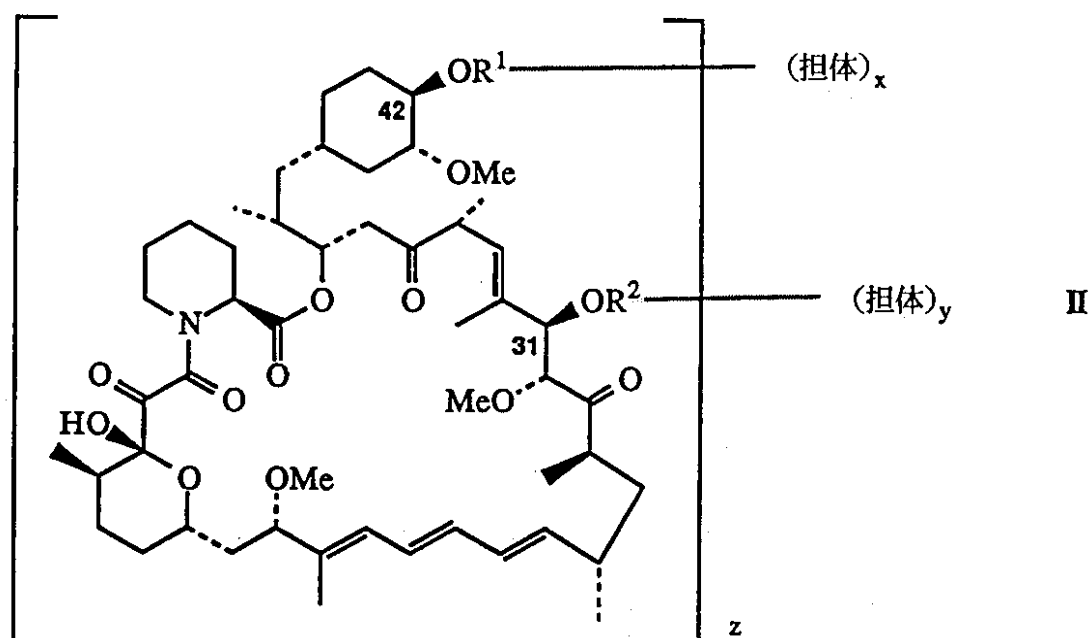
20

【0018】

本発明の好ましい実施態様は、構造

【0019】

【化 2】



30

40

〔式中、 R^1 及び R^2 はそれぞれ独立に水素又は $-R^3-L-R^4-$ であり；

L は $-A-(CR^5R^6)_b[B-(CR^7R^8)_d]_e-$ であり、

A は $-CH_2-$ 又は $-NR^9-$ であり；

B は $-O-$ 、 $-NR^9-$ 、 $-S-$ 、 $-S(O)-$ 又は $-S(O)_2-$ であり；

R^3 は、カルボニル、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-P(O)_2-$ 、 $-P(O)(C$

50

H_3) -、-C(S)- 及び -CH₂C(O)- からなる群から選択され；

R⁴ は、カルボニル、-NH-、-S-、-CH₂- 及び -O- からなる群から選択され；

R⁵、R⁶、R⁷ 及び R⁸ はそれぞれ独立に、水素、1～6個の炭素原子を含むアルキル、2～7個の炭素原子を含むアルケニル、2～7個の炭素原子を含むアルキニル、ハロ、ヒドロキシ、トリフルオロメチル、7～10個の炭素原子を含むアリールアルキル、1～6個の炭素原子を含むアミノアルキル、1～4個の炭素原子を含むヒドロキシアルキル、1～6個の炭素原子を含むアルコキシ、2～7個の炭素原子を含むカルボアルコキシ、シアノ、アミノ、CO₂H、又は1～6個の炭素原子を含むアルキル、1～6個の炭素原子を含むアルコキシ、ヒドロキシ、シアノ、ハロ、ニトロ、2～7個の炭素原子を含むカルボアルコキシ、トリフルオロメチル、アミノ又は-CO₂Hから選択される置換基で任意にモノ、ジ-又はトリ置換されるフェニルであり；

10

R⁹ は、水素、1～6個の炭素原子を含むアルキル又は7～10個の炭素原子を含むアルキルであり；

b = 0～10であり；

d = 0～10であり；

e = 0～2であり；

x = 0～1であり；

y = 0～1であり；

z は約1～約120であり；

20

担体は、免疫原性担体材料、ディテクター担体材料若しくは固体マトリックス、又はその塩であり、但し、R¹ 及び R² は共に水素ではなく、bが1より大きい場合 C R⁵ R⁶ 基は同一でも異なってもよく、dが1より大きい場合、各 C R⁷ R⁸ はそれぞれ同一でも異なってもよく、さらに R¹ が水素の場合 x は0であり、R² が水素の場合 y は0であり、x 及び y は共に1の場合担体部分はどちらの場合も同一である）を有する式IIの結合体を提供する。

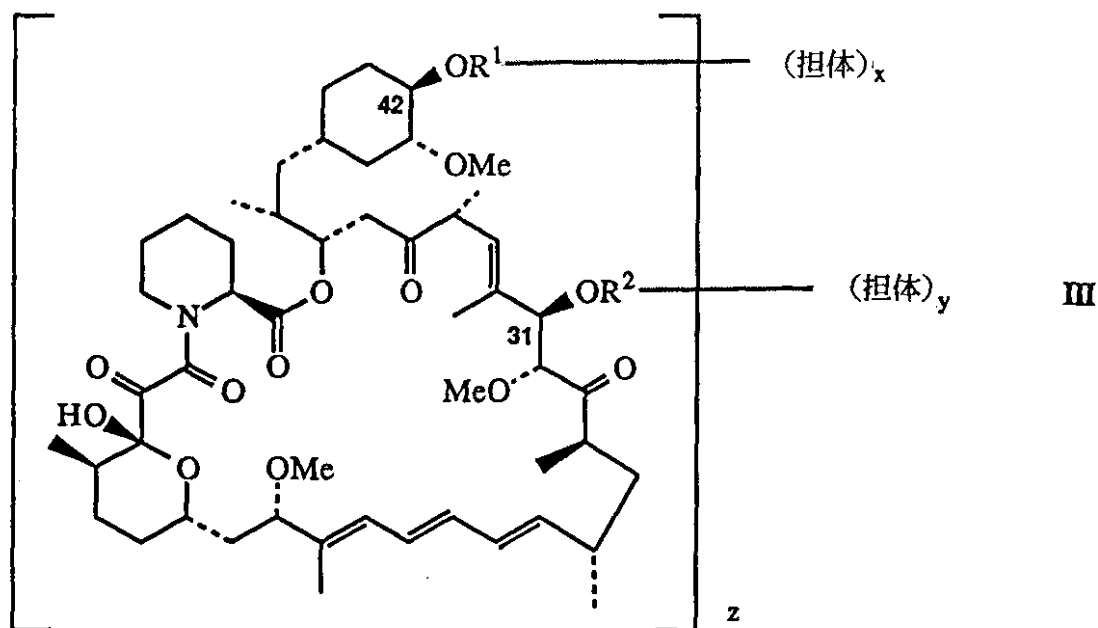
【0020】

本発明の第2の好ましい実施態様は、構造

【0021】

【化3】

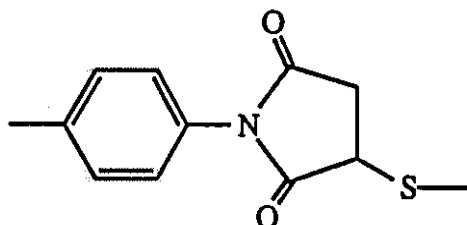
30



40

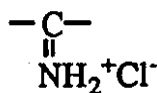
〔式中、R¹ 及び R² はそれぞれ独立に、水素又は -(R³ - L¹ - R⁴)_f - (R¹⁰ 50

- $L^2 - R^{11})_g$ - 担体であり ;
 L^1 は - $(CH_2)_h - CHR^{12} - (CH_2)_j$ - であり ;
 L^2 は - $(CH_2)_k - D - (CH_2)_m - E$ - であり ;
 D は - CH_2 - 、 - $S - S$ - 又は
 【 0 0 2 2 】
 【 化 4 】



10

であり ;
 E は - CH_2 - 又は
 【 0 0 2 3 】
 【 化 5 】



20

であり ;
 R^3 及び R^{10} はそれぞれ独立に、カルボニル、 - $S(O)$ - 、 - $S(O)_2$ - 、 - $P(O)_2$ - 、 - $P(O)(CH_3)$ - 、 - $C(S)$ - 及び - $CH_2C(O)$ - からなる群から選択され ;

R^4 及び R^{11} はそれぞれ独立に、カルボニル、 - NH - 、 - S - 、 - CH_2 - 及び - O - からなる群から選択され ;

R^{12} は、水素、1 ~ 6 個の炭素原子を含むアルキル、7 ~ 10 個の炭素原子を含むアリールアルキル、2 ~ 7 個の炭素原子を含むアルケニル、2 ~ 7 個の炭素原子を含むアルキニル、 - $(CH_2)_nCO_2R^{13}$ - 、 - $(CH_2)_pNR^{14}R^{15}$ - 、2 ~ 3 個の炭素原子を含むカルバミルアルキル、1 ~ 4 個の炭素原子を含むアミノアルキル、1 ~ 4 個の炭素原子を含むヒドロキシアルキル、2 ~ 4 個の炭素原子を含むグアニルアルキル、1 ~ 4 個の炭素原子を含むメルカプトアルキル、2 ~ 6 個の炭素原子を含むアルキルチオアルキル、インドリルメチル、ヒドロキシフェニルメチル、イミダゾイルメチル、ハロ、トリフルオロメチル、又は1 ~ 6 個の炭素原子を含むアルキル、1 ~ 6 個の炭素原子を含むアルコキシ、ヒドロキシ、シアノ、ハロ、ニトロ、2 ~ 7 個の炭素原子を含むカルボアルコキシ、トリフルオロメチル、アミノ又は - CO_2H から選択される置換基で任意にモノ - 、ジ - 又はトリ置換されるフェニルであり ;

30

R^{14} 及び R^{15} はそれぞれ独立に、水素、1 ~ 6 個の炭素原子を含むアルキル又は7 ~ 10 個の炭素原子を含むアリールアルキルであり ;

40

R^{13} は、水素、1 ~ 6 個の炭素原子を含むアルキル、7 ~ 10 個の炭素原子を含むアリールアルキル、2 ~ 7 個の炭素原子を含むアルケニル、2 ~ 7 個の炭素原子を含むアルキニル、又は1 ~ 6 個の炭素原子を含むアルキル、1 ~ 6 個の炭素原子を含むアルコキシ、ヒドロキシ、シアノ、ハロ、ニトロ、2 ~ 7 個の炭素原子を含むカルボアルコキシ、トリフルオロメチル、アミノ又は - CO_2H から選択される置換基で任意にモノ - 、ジ - 又はトリ置換されるフェニルであり ;

$f = 0 \sim 3$ であり ;

$g = 0 \sim 1$ であり ;

$h = 0 \sim 10$ であり ;

50

$j = 0 \sim 10$ であり ;
 $k = 0 \sim 10$ であり ;
 $m = 0 \sim 10$ であり ;
 $n = 0 \sim 6$ であり ;
 $p = 0 \sim 6$ であり ;
 $x = 0 \sim 1$ であり ;
 $y = 0 \sim 1$ であり ;
 z は約 1 ~ 約 120 であり ;

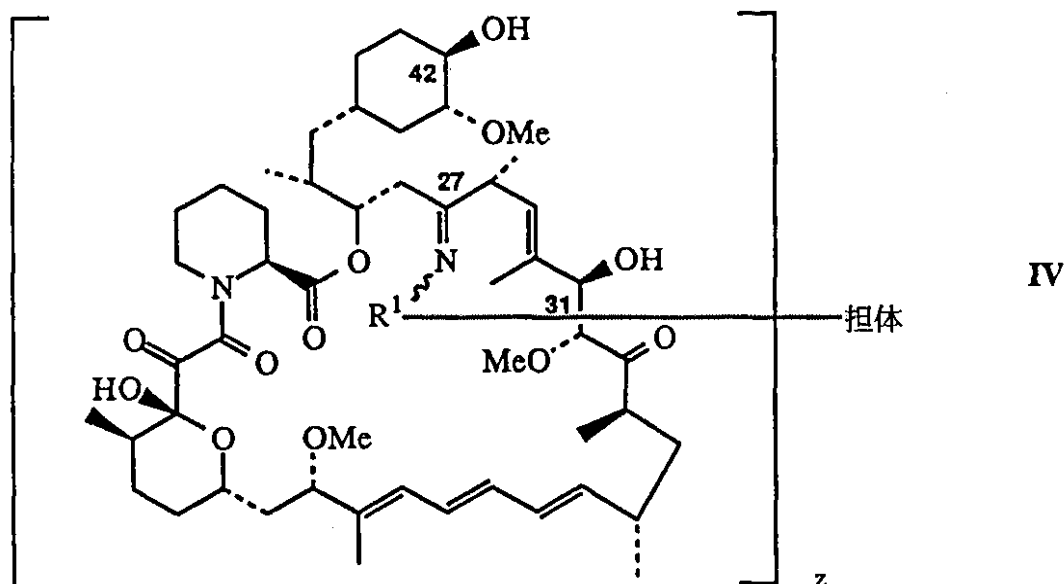
担体は、免疫原性担体材料、ディテクター担体材料若しくは固体マトリックス、又はその塩であり、但し、 R^1 及び R^2 は共に水素ではなく、 f 及び g は共に 0 ではなく、 f が 1 より大きい場合、各 - ($R^3 - L^1 - R^4$) - 部分は同一でも異なってもよく、さらに R^1 が水素の場合 x は 0 であり、 R^2 が水素の場合 y は 0 であり、 x 及び y が共に 1 の場合、担体部分はどちらの場合も同一である] を有する式 III の結合体を提供する。

【0024】

本発明はさらに、構造

【0025】

【化 6】



20

30

〔式中、 R^1 は $-OCH_2(CH_2)_qR^4-$ であり ;
 R^4 は、カルボニル、 $-NH-$ 、 $-S-$ 、 $-CH_2-$ 及び $-O-$ からなる群から選択され ;

$q = 0 \sim 6$ であり ;
 z は約 1 ~ 約 120 であり ;

担体は、免疫原性担体材料、ディテクター担体材料若しくは固体マトリックス又はその塩である]

を有する式 IV の結合体を提供する。

【0026】

免疫原性担体材料は、慣用的に用いられている公知の任意の材料から選択してよい。大抵の場合、担体はタンパク質又はポリペプチドであろうが、十分なサイズと免疫原性を有する炭水化物、多糖類、リポ多糖、核酸などのような他の材料を用いてもよい。大抵の場合、免疫原性タンパク質及びポリペプチドは、5,000 ~ 10,000 の範囲、好ましくは 15,000 より大きく、より一般的には 40,000 より大きい分子量を

40

50

有している。

【0027】

一般に、1つの動物種から採取したタンパク質は、他の種の血流中に導入されると免疫原性になる。特に有用なタンパク質は、アルブミン、グロブリン、酵素、ヘモシアニン、グルテリン又は有意な非タンパク性成分、例えば、糖タンパク質などを有するタンパク質のようなタンパク質である。慣用の免疫原性担体材料及び該担体材料にハプテンを結合させる方法に関する最新技術は以下の文献を参照されたい：Parker, Radioimmunoassay of Biologically Active Compounds, Prentice-Hall (Englewood Cliffs, N.J., USA, 1976), Butler, J. Immunol. Meth. 7: 1-24 (1975) 及び Pharmacol. Rev. 29(2); 103-163 (1978); Weinryb 及び Shroff, Drug Metab. Rev. 10: 271-283 ページ (1975); Broughton 及び Strong, Clin. Chem. 22: 726-732 (1976); 並びに Playfair, Br. Med. Bull. 30: 24-31 (1974)。本発明に用いるのに好ましい免疫原性担体材料は、オボアルブミン及びKLHである。本発明に用いるのに特に好ましい担体材料はオボアルブミンである。ディテクター担体材料は、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼのような酵素、フルオレセインセン又はフルオレセイン誘導体、テキサスレッド又はローダミンのような蛍光部分、化学発光部分などに結合したラパマイシン結合部分であってよい。固体マトリックス担体材料は、樹脂ビーズ、ELISA プレート、ラジオイムノアッセイに慣用的に用いられているガラス板、プラスチックビーズ、一般にディップスティックタイプのアッセイに用いられる固体マトリックス材料であってよい。ラパマイシンが固体マトリックスに結合すると、得られた結合体は、本発明に開示されているように、抗体の親和性精製用又はラパマイシン結合タンパク質単離用のディップスティックアッセイに用いることができる。

10

20

【0028】

上記の特異的ラパマイシン結合体を表す式に用いられている場合、 z は担体材料に結合したラパマイシンの数を表す。値 z は、免疫原、ディテクター又は固体マトリックスのエピトープ密度と称されることもあり、通常、平均して約1～約120の範囲、より一般的には1～50の範囲である。

30

【0029】

しかし該密度は用いられる特定の担体材料に応じて大きく変化し得る。

【0030】

本発明の化合物がどれでも、アリール又はアリールアルキル部分を含む場合、該アリール部分は、1～6個の炭素原子を含むアルキル、7～10個の炭素原子を含むアリールアルキル、1～6個の炭素原子を含むアルコキシ、シアノ、ハロ、ニトロ、2～7個の炭素原子を含むカルボアルコキシ、トリフルオロメチル、アミノ、アルキル基1個当たり1～6個の炭素原子を含むジアルキルアミノ、1～6個の炭素原子を含むアルキルチオ、 $-SO_3H$ 及び $-CO_2H$ から選択される基で任意にモノ-、ジ-又はトリ置換されるよい、フェニル、ナフチル、ピリジル、キノリル、イソキノリル、キノオキサリル、チエニル、チオナフチル、フリリル、ベンゾフリル、ベンゾジオキシル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾイソオキサゾリル又はベンゾジオキソリル基であるのが好ましい。アリール部分が、1～6個の炭素原子を含むアルキル、7～10個の炭素原子を含むアリールアルキル、1～6個の炭素原子を含むアルコキシ、シアノ、ハロ、ニトロ、2～7個の炭素原子を含むカルボアルコキシ、トリフルオロメチル、アミノ、アルキル基1個当たり1～6個の炭素原子を含むジアルキルアミノ、1～6個の炭素原子を含むアルキルチオ、 $-SO_3H$ 及び $-CO_2H$ から選択される基で任意にモノ-、ジ-又はトリ置換されるフェニル基であるのがより好ましい。

40

【0031】

塩は、ナトリウム、カリウムなどのような無機カチオン、アルキル基1個につき1～6

50

個の炭素原子を含むモノ - 、ジ - 及びトリアルキルアミン及びアルキル基 1 個につき 1 ~ 6 個の炭素原子を含むモノ - 、ジ - 、トリヒドロキシアルキルアミンなどのような有機塩基、並びに有機酸及び無機酸、例えば、酢酸、乳酸、クエン酸、酒石酸、コハク酸、マレイン酸、マロン酸、グルコン酸、塩酸、臭化水素酸、リン酸、硝酸、硫酸、メタンスルホン酸及び同様な公知の許容し得る酸から誘導されたものである。

【 0 0 3 2 】

本発明の化合物は、ラパマイシンの 4 2 及び / 又は 3 1 - ヒドロキシル基とリンカー基部分としての役割を果たす適当な求電子試薬とを反応させて製造し得る。以下の特許明細書は、本発明の化合物を製造するための結合基として使用し得るラパマイシンの 4 2 及び / 又は 3 1 - 誘導体の製造を示している。ラパマイシンのフッ素化エステルの製造は、米

10

【 0 0 3 3 】

アミドエステルの製造は米国特許第 5 , 1 1 8 , 6 7 7 号明細書に開示されている。

【 0 0 3 4 】

ラパマイシンのカルバメートの製造は米国特許第 5 , 1 1 8 , 6 7 8 号明細書に開示されている。ラパマイシンのアミノエステルの製造は米国特許第 5 , 1 3 0 , 3 0 7 号明細書に記載されている。

【 0 0 3 5 】

ラパマイシンのスルホネート及びスルファメートの製造は米国特許第 5 , 1 7 7 , 2 0 3 号明細書に記載されている。

20

【 0 0 3 6 】

ラパマイシンのスルホニルカルバメートの製造は米国特許第 5 , 1 9 4 , 4 4 7 号明細書に記載されている。

【 0 0 3 7 】

上記に引用した米国特許の開示は本明細書に参考として組み込むものとする。

【 0 0 3 8 】

これらの特許から、カルバメートの製造に用いられるイソシアナート又はスルホネートの製造に用いられるスルホニルクロリドのような反応性求電子剤は活性化剤を用いる必要なしに、ラパマイシンのヒドロキシル基と反応し得ることがわかる。

【 0 0 3 9 】

カルボン酸を用いてラパマイシンのヒドロキシル基をエステル化するために、通常 D C C 又はその水溶性類縁体、例えばジメチルアミノプロピル) - 3 - エチルカルボジイミド (D A E C) のような結合試薬を用いた活性化が必要とされる。ラパマイシン結合基部分の製造の代表的な例を以下に実施例として示す。ラパマイシンの他の誘導体は実施例 1 8 に開示されている方法を用いて達成し得る。

30

【 0 0 4 0 】

リンカー基が 4 2 - ヒドロキシル基又は 3 1 , 4 2 - ヒドロキシル基に結合している本発明の化合物の場合は、求電子剤 (又は活性化求電子剤) をラパマイシンと反応させて、典型的にはクロマトグラフィーによって分離可能な 4 2 - 及び 3 1 , 4 2 - 誘導体化ラパマイシン混合物を得る。リンカー基がラパマイシンの 3 1 - ヒドロキシルに結合している本発明の化合物の場合は、4 2 - ヒドロキシル基を適当な保護基、例えば ϵ - ブチルジメチルシリル基で保護しなければならない。次いで 3 1 - ヒドロキシルを適当な求電子剤と反応させて、誘導体化ラパマイシンを得、その後で 4 2 - ヒドロキシル基の脱保護をする。ラパマイシンの 4 2 - O - シリルエーテルの製造及びその後の脱保護は、米国特許第 5 , 1 2 0 , 8 4 2 号明細書に記載されており、該明細書は本明細書に参考として組み込むものとする。

40

【 0 0 4 1 】

種々のリンカーを 3 1 位及び 4 2 位に含む化合物は、先ず 4 2 - 誘導体化化合物を製造し、次いで種々のリンカーを用いて 3 1 位を誘導体化することにより製造し得る。2 7 - オキシム結合基は、米国特許第 5 , 0 2 3 , 2 6 4 号明細書に開示されている方法を用い

50

、実施例 2 1 に記載のようにして製造することが可能である。

【 0 0 4 2 】

該特許明細書は、本明細書に参考として組み込むものとする。

【 0 0 4 3 】

ラパマイシンに結合したリンカー基は、ペプチド文献に記載されている標準的な方法を用い、典型的には D C C タイプの結合試薬若しくは N - ヒドロキシスクシンイミドを用いて又は活性化エステル若しくは無水物として求電子部分を活性化することにより、第 2 のリンカー基に結合させることができる。次いで一方の結合部分の活性化求電子末端が他方のリンカー部分の求核末端と反応させることが可能である。

【 0 0 4 4 】

ラパマイシン結合基部分と免疫原性担体との結合は、標準的な文献記載条件下に行うことが可能である。一般に、免疫原性担体材料上の求核基との反応の場合は、結合基上のカルボン酸のような求電子部分を N - ヒドロキシスクシンイミドのような適当な活性化剤で活性化し、次いで免疫原性担体材料上の求核部分と反応させる。実施例 2 及び 3 は特にこの方法を示すものである。同様な方法が結合基上の求核部分と免疫原性担体材料上の求電子部分との結合に用いられる。そのような場合、免疫原性担体材料上の求電子部分を上記のように活性化し、次いで結合基の求核性末端と反応させる。

【 0 0 4 5 】

本発明の化合物の製造に用いられる試薬は、市販のものでもよいし、当該文献に開示されている方法により製造してもよい。

【 0 0 4 6 】

本発明はさらに、29 - デメトキシラパマイシン〔米国特許第 4 , 3 7 5 , 4 6 4 号明細書、C . A . 命名法下では 3 2 - デメトキシラパマイシン〕；1 - 、3 - 及び / 又は 5 位の二重結合が還元されているラパマイシン誘導体〔米国特許第 5 , 0 2 3 , 2 6 2 号明細書〕；4 2 - オキシラパマイシン〔米国特許第 5 , 0 2 3 , 2 6 2 号明細書〕；ラパマイシンの 2 7 - オキシム〔米国特許第 5 , 0 2 3 , 2 6 4 号明細書〕；ラパマイシンの 2 7 - ヒドラゾン〔米国特許第 5 , 1 2 0 , 7 2 6 号明細書〕；2 9 - デスメチルラパマイシン〔米国特許第 5 , 0 9 3 , 3 3 9 号明細書、C . A . 命名法下では 3 2 - デスメチルラパマイシン〕；7 , 2 9 - ビスデスメチルラパマイシン〔米国特許第 5 , 0 9 3 , 3 3 8 号明細書、C . A . 命名法下では 7 , 3 2 - デスメチルラパマイシン〕；並びに 1 5 - ヒドロキシ - ラパマイシン及び 1 5 , 2 7 - ビスヒドロキシ - ラパマイシン〔米国特許第 5 , 1 0 2 , 8 7 6 号明細書〕のような他のラパマイシンの同類の結合体も包含し得るが、それらには限定されない。上記に引用した米国特許明細書に開示されている内容は本明細書に参考として組み込むものとする。ジエチルアジドジカルボキシレートが付加されたラパマイシン 1 , 3 - ディールス - アルダー付加化合物及びフェニルトリアゾリンジオンが付加されたラパマイシン 1 , 3 - ディールス - アルダー付加化合物の結合体も包含される。これらの化合物の製造は実施例 1 4 及び 1 5 に記載されている。

【 0 0 4 7 】

本発明の化合物は、ラパマイシン及びその誘導体に特異的な抗体の産生及び検出、生物学的又は実験用流体におけるラパマイシン若しくはその誘導体の量の測定及びラパマイシン結合タンパク質の単離のために有用なラパマイシンの免疫原、ディテクター及びマトリックスが結合した結合体である。本明細書に定義されているラパマイシン誘導体は、ラパマイシン核、ラパマイシン代謝物又は開環ラパマイシン（例えば、本明細書に参考として組み込まれる米国特許第 5 , 2 5 2 , 5 7 9 号に記載のセコラパマイシン）を含む化合物である。該化合物においては、1 つ以上のヒドロキシル基がカルボン酸エステル、カルバメート、スルホン酸エステル、アミドなどにエステル化されているか、あるいは 1 つ以上のケトンがヒドロキシル基に還元されているか、あるいは 1 つ以上の二重結合が還元されているか、あるいは 1 つのケトンがオキシム又はヒドラゾンに変換されている。本発明の化合物を抗体量の測定又は抗体の産生に用い得る他のラパマイシン誘導体は、本発明の開示を基にすれば当業者には明らかであろう。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 8 】

本発明のラパマイシン免疫原結合体を用いたラパマイシン又はその誘導体に特異的な抗体は、当該技術において公知の標準法により産生し得る。一般的には、宿主動物の1カ所以上の部位に免疫原結合体を単独又はアジュバントと組み合わせて接種する。典型的な宿主哺乳類には、マウス、ヤギ、ウサギ、モルモット、ヒツジ又はウマが含まれるが、それらには限定されない。十分なタイターを有する抗体が産生されるまで引き続き注射を行ってよい。本発明のラパマイシン免疫原結合体から産生した抗体は、ラパマイシン量の測定、E L I S A、ラジオイムノアッセイ、化学発光イムノアッセイ及び蛍光イムノアッセイなど多くのイムノアッセイに用いることが可能である。多くの異種イムノアッセイ（抗原捕獲、抗体捕獲、拮抗阻害又は2抗体イムノアッセイ）を用いることが可能ではあるが、以下のような基本的な拮抗阻害イムノアッセイを行うことが可能である：リガンド特異抗体は通常マトリックスに結合する。溶液を加えて、リガンドとマトリックスの非特異的結合を弱める。場合によって、過剰物をリンスした後で抗体結合マトリックスを貯蔵し得るように処理する。拮抗阻害アッセイでは、リガンド標準曲線を作成し、ラパマイシンディテクター結合体を加えて、ラパマイシン特異抗体に結合するために競合させる。必要に応じて過剰物を除去する。当業者により用いられている標準法によりディテクター分子を検出する。ディップスティックアッセイ、F P I A、E M I T、E L I S A、V I S T A、R I A 及び M E I A を含む種々のフォーマットを用いてよいがそれらには限定されない。本発明のディテクター結合体を製造して上記のアッセイに用いることが可能である。例えば、ディテクター結合体は標識蛍光部分、化学発光部分又は酵素部分を含む担体材料であ

10

20

【 0 0 4 9 】

本発明はさらに、市販し得る試験キットにおけるラパマイシン免疫原結合体又はラパマイシン若しくはその誘導体に特異的な抗体の使用を提供する。該試験キットは、生物学的又は実験用流体におけるラパマイシン量の測定に用い得る。試験キットの成分は、ラパマイシン若しくはその誘導体に対する抗体、抗血清又はラパマイシン担体結合体を含んでよい。結合体又は抗体は固体マトリックスに結合し得、ラパマイシン誘導体又は抗体はアッセイに必要な場合には放射標識し得る。標準濃度曲線を生成し得るようにラパマイシンの標準濃縮物を含んでよい。適当な容器、マイクロタイタープレート、固体支持体、試験管、トレイもそのようなキットに含まれていてよい。用いられるアッセイのタイプに応じてキット中に多様な試薬を含んでいてよい。

30

【 0 0 5 0 】

以下に、ラパマイシン又はその誘導体に特異的な抗体を産生するための及びE L I S Aフォーマットイムノアッセイを用いて該抗体を検出するための本発明のラパマイシン免疫原結合体の使用を示す。完全フロイントアジュバント中のグルタル酸とのラパマイシン31, 42-ジエステルとK L Hとの結合体50 μ gで5匹のマウスに脾臓内免疫感作し、約1カ月後、完全フロイントアジュバント中のグルタル酸とのラパマイシン31, 42-ジエステルとK L Hとの結合体50 μ gでフットパッド中に追加免疫した。マイクロタイタープレート（Immuno1on I）を一晚100 μ lのヤギ抗マウス抗体〔10 mMのリン酸カリウム緩衝液（pH 7.2）中10 μ g/ml〕を用いて4でコーティングした。プレートを軽く振り、リン酸緩衝塩水中100 μ lの1%ウシ血清アルブミンを用いて4で一晚ブロックした。プレートを軽く振り、10 mMのリン酸緩衝液（pH 7.05）、30 mMのNaCl、0.02%のTriton X-100及び0.004%のチメロサル洗浄緩衝液で3回洗浄した後、ウエルにリン酸緩衝溶液で希釈した各マウス血清100 μ lを加え、室温で一晩インキュベートした。プレートを軽く振り、洗浄緩衝液で3回洗浄した後、グルタル酸とのラパマイシン31, 42-ジエステルと西洋ワサビペルオキシダーゼとの結合体〔実施例10の化合物（100 μ l、0.5 ng/ml）〕を加え、室温で1時間暗所でインキュベートした。プレートを軽く振り、洗浄緩衝液で3回洗浄した後、H₂O₂と共にテトラメチルベンジジン（TMB）基質を加え、プレートを室温で30分間暗所でインキュベートした。450 nmの分光光度計で光学密度を

40

50

読み取った。表 1 に示されているように、5 匹のマウス全部がグルタル酸とのラパマイシン 3 1 , 4 2 - ジエステルと西洋ワサビペルオキシダーゼとの結合体（実施例 1 0 の化合物）に反応性の抗体を有していた。

【 0 0 5 1 】

【表 1】

表 1

マウス番号	希釈 ^a	O. D.
6 9 0 2	1 / 3 0 0	0 . 1 9 9
6 9 0 3	1 / 1 0 0	0 . 2 3 1
6 9 0 4	1 / 5 0 0	0 . 4 1 2
6 9 0 5	1 / 1 0 0	0 . 1 2 1
6 9 0 6	1 / 3 0 0	0 . 3 2 1
バックグラウンド ^a	—	0 . 0 7 6

^a P B S 中のマウス血清の希釈率

10

【 0 0 5 2 】

表 1 の結果は、マウス 6 9 0 4 が実施例 1 0 の化合物に対して最高量の抗体を産生したことを示している。標準法を用いてハイブリドーマを産生した。実施例 4 の化合物を用いて免疫感作し、3 回追加免疫したマウスの脾摘の後で、脾臓細胞を S P 2 0 と融合させてハイブリドーマを産生した。以下に簡単に説明する E L I S A アッセイを用いて、ラパマイシン又はその誘導体に特異的な抗体の産生についてハイブリドーマを評価した。

20

【 0 0 5 3 】

1 0 0 μ l のヤギ抗マウス抗体（1 0 m M のリン酸カリウム緩衝液（p H 7 . 2 ）中 1 0 μ g / m l ）を用いてマイクロタイタープレート（Immunolon I ）を一晩 4 でコーティングした。プレートを軽く振り、リン酸緩衝塩水（P B S ）中 1 0 0 μ l の 1 % ウシ血清アルブミンを用いて一晩 4 でブロックした。プレートを軽く振り、0 . 0 2 % T r i t o n X - 1 0 0 及び 0 . 0 0 4 % チメロサルを含む 0 . 2 $\times$ P B S で 3 回洗浄した後、ウェルに各ハイブリドーマ上清 1 0 0 μ l を加え、室温で一晩インキュベートした。プレートを軽く振り、0 . 0 2 % T r i t o n X - 1 0 0 及び 0 . 0 0 4 % チメロサルを含む 0 . 2 $\times$ P B S で 3 回洗浄した後、実施例 2 2 の化合物（1 0 0 μ l 、 0 . 1 7 μ M ）を加え、4 で 1 時間インキュベートした。プレートを軽く振り、0 . 0 2 % T r i t o n X - 1 0 0 及び 0 . 0 0 4 % チメロサルを含む 0 . 2 $\times$ P B S で 3 回洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ（1 0 0 μ l 、 0 . 2 μ g / m l ）に結合したストレプトアビジン又はアビジンを加え、室温で 1 時間暗所でインキュベートした。プレートを軽く振り、0 . 0 2 % T r i t o n X - 1 0 0 及び 0 . 0 0 4 % チメロサルを含む 0 . 2 $\times$ P B S で 3 回洗浄した後、T M B 基質及び H ₂ O ₂ を加え、プレートを被覆して室温で 3 0 分間暗所でインキュベートした。4 5 0 n m の分光光度計で光学密度を読み取った。読み取られた光学密度が 0 . 2 5 ~ 3 の範囲であったことは、特異的抗体結合を示している。表 2 の結果は、ウエル P 4 G 1 由来のハイブリドーマが実施例 2 2 の化合物に正の結合をしており、従ってラパマイシン又はその誘導体に特異的であることを示している。

30

40

【 0 0 5 4 】

【表 2】

表2

ラパマイシン又はその誘導体に特異的な
モノクローナル抗体用スクリーニング

ウエル	光学密度
P 3 H 4	0. 1 2 0
P 3 H 5	0. 1 0 5
P 4 G 1	1. 9 4 0

10

【0055】

P 4 G 1 のハイブリドーマ細胞系を限界希釈によりクローン化し、ハイブリドーマ細胞系 R A P - 4 2 - O V A F₂ # 1 h c - と称する。蛍光偏光イムノアッセイ (F P I A) において、コハク酸とのラパマイシン 4 2 - エステルと 5 - グリシニルフルオレセインアミンとの結合体 (実施例 2 3 a) を 1 0 m M の濃度でトレーサーとして用い、1 0 0 n M のリン酸ナトリウム (p H 7 . 5) 中、7 7 m P の偏光を示した。過剰な F K B P 1 2 を添加した後では、測定された偏光は 1 9 5 m P であり、過剰な R A P - 4 2 - O V A F₂ # 1 M o A b を添加した後では、偏光は 8 4 m P であった。上記トレーサーの開環非酵素的転換産物 (コハク酸とのセコラパマイシン 4 2 - エステルと 5 - グリシニルフルオレセインアミンとの結合体、実施例 2 4) を T L C プレート上で単離した (5 0 クロロホルム : 4 メタノール : 0 . 5 酢酸 ; 3 種の化合物の中最も遅く移動した) 。

20

【0056】

実施例 2 3 及び 2 4 のラパマイシン - 及びセコラパマイシン - フルオレセイン誘導体は、F K B P 1 2 及び R A P - 4 2 - O V A F₂ # 1 M o A b に結合することを特徴としていた。1 0 n M のラパマイシン - フルオレセイン 1 . 0 0 m L に 0 . 0 1 μ g の F K B P 1 2 を添加すると、蛍光偏光が 5 7 m P から 1 4 8 m P に増大したが、セコラパマイシン - フルオレセイン誘導体の蛍光偏光は 4 9 m P から 5 8 m P に増大したにすぎず、これは、セコ誘導体のはるかに弱くしか結合しないことを示している。ラパマイシン誘導体に 5 μ g / m l の R A P - 4 2 - O V A F₂ # 1 M o A b を添加すると、蛍光偏光は 5 8 m P で変わらないが、セコラパマイシン誘導体の蛍光偏光は 4 4 m P から 1 3 6 m P に増大した。R A P - 4 2 - O V A F₂ # 1 M o A b がセコラパマイシン - フルオレセイン誘導体に特異的に結合するが、そのラパマイシン - フルオレセイン前駆体には結合しないことを示している。

30

【0057】

これら 2 つの系の特異性はアッセイフォーマットでも示された。5 0 0 μ l の 1 0 μ g / m l R A P - 4 2 - O V A F₂ # 1 に、ラパマイシン又はセコラパマイシンを加えて、0 ~ 1 0 0 n M の範囲の最終濃度にした。5 0 0 μ l の 2 0 n M セコラパマイシン - フルオレセインを添加すると、分析物の不在下では蛍光偏光は 1 2 4 m P であり、1 0 0 n M のラパマイシンの存在下での蛍光偏光は 1 2 0 m P であり、1 0 0 n M のセコラパマイシンの存在下では 7 4 m P であった。従って、セコラパマイシンは R A P - 4 2 - O V A F₂ # 1 に対するセコラパマイシンフルオレセイン誘導体の結合を阻害したが、ラパマイシンは何の作用もしなかった。逆の実験では、0 . 0 2 μ g / m l の F K B P 1 2 に、ラパマイシン又はセコラパマイシンを加えて、0 ~ 1 0 0 m M の最終濃度にした。2 0 n M のラパマイシン - フルオレセイン 5 0 0 μ l を加えると、分析物の存在下での蛍光偏光は 1 2 8 m P であり、1 0 0 n M のラパマイシンの存在下では 6 1 m P であり、1 0 0 n M のセコラパマイシンの存在下では 1 2 2 m P であった。この場合、ラパマイシンは結合を阻害したが、セコラパマイシンは何の作用もしなかった。

40

【0058】

50

ラパマイシンに特異的な34-294-163 MoAbと称される第2の抗体を以下のようにして製造した。6~8週齢のメスPBF/DnJマウス(Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine)を、フロイントアジュバント(Difco, Detroit, Michigan)中で乳化したヘミスクシネートリンカーを含むウシ血清アルブミンに42位で結合したラパマイシン(RAPA-42-HS-BSAと称する)を用いて免疫感作した。フロイント完全アジュバントを用いて一次免疫感作し、次いでフロイント不完全アジュバントを用いて免疫追加した。この長期免疫感作動物用の動物の追加免疫間隔は、1、3、9及び19週であり、動物1匹当たりそれぞれ50、25、25及び100 µgの用量レベルで、その都度2カ所の皮下位置で行った。動物に14週の休養期間を与え、その後で融合の3日前に脾臓に5 µgの融合前追加免疫を投与した。

10

【0059】

融合当日に、素早く頸管を脱きゅうさせてマウスを安楽死させ、脾臓を取り出した。脾臓細胞をIscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (GIBCO, Grand Island, New York)中で1度洗浄し、1000 rpmで10分間遠心した。ペレット化した脾臓細胞をSP2/0骨髓腫細胞(Dr. Milstein, Cambridge, United Kingdom)と1:1の割合で合わせ、IMDM中で洗浄、遠心した。上清を除去し、ペレットに1 mlの50%ポリエチレングリコール(PEG) (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland)を1分間で加え、その間、ペレットがゆっくり分散するように軽くたたいたりかき回したりした。混合物にIMDM 30 mlを加え、上記のように遠心した。上清をデカントし、ペレットをヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン(HAT) (GIBCO)及び10%ウシ胎児血清(FBS) (Hyclone Laboratories, Logan, Utah)と共にIMDMに最懸濁した。融合頻度を高めるために、96ウエルの組織培養プレートに入った融合細胞懸濁液に、0.5%のSalmonella typhimuriumマイトジェンv/v (STM; RIBI Immunochem Research, Inc., Hamilton, Montana)及び1% v/v ORIGEN (Igen, Rockville, Maryland)を加えた。

20

【0060】

融合の一次スクリーニングは10日目の集密期培養時に行った。EIAを用いて、上清試料中の抗ラパマイシンの反応性を検出した。マイクロタイターウエルを、リン酸緩衝塩水(PBS)中2 µg/mlの42-HS-BSA溶液100 µlでコーティングし、室温で2時間インキュベートした。プレートを1ウエル当たり200 µlのPBS中3%ウシ血清アルブミン(BSA)で1時間ブロックした。プレートを蒸留水で3回洗浄した後、1ウエル当たり100 µlの培養上清を加え、30分間インキュベートした。プレートを3回洗浄し、30分間のインキュベート時間中に、プレートに、ブロック溶液に希釈した1ウエル当たり100 µlのヤギ抗マウスIgG+M-HRPO結合体(Kirkgaard Perry Laboratories, Gaithersburg, Maryland)を加えた。最後のプレート洗浄を行い、発色に、o-フェニレンジアミン: 2 HCl (OPD) (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois)を用いる。光学密度読み取りの相対強度から、陰性対照である正常なマウス血清(NMS) (Organon Teknika-Cappel, Malvern, Pennsylvania)の少なくとも5倍のハイブリッド34-294を同定し、該ハイブリッドをクローニング及びその後の評価用の候補として選択した。1-100~1-100、000の範囲の限界希釈によりハイブリッド#34-294をクローン化した。用いたクローニング培地は、10% v/v FBS及び1% v/v HT Supplement (GIBCO)を含むIMDMであった。組織培養プレート中の各96ウエルに200 µlの細胞懸濁液を加えた。

30

40

【0061】

50

集密期培養のクローン上清の追加のE I Aスクリーニングに基づいてさらに評価するために、クローン# 34 - 294 - 163 (34 - 294 - 163 h cと称する)を選択した。用いたE I Aスクリーニングプロトコルは上記のものであった。

【0062】

マウスモノクローナル抗体イソタイプ化キット、RPN29 (Amersham Life Science, Arlington Heights, 11)で、34 - 294 - 163 (34 - 294 - 163 MoAbと称する)として識別される細胞系から分泌されたモノクローナル抗体のイソタイプを決定した。販売業者の推薦に従って検定を行ったが、その結果は、IgG I、κ L鎖のイソタイプを示している。

【0063】

実施例12及び13の化合物は、以下に記載するラパマイシン又はその誘導体に特異的なポリクローナル及びモノクローナル抗体の検出用アッセイに用いることが可能である。

【0064】

マイクロタイタープレート (Immunolon I) を100 µlのヤギ抗マウス抗体 (10 mMのリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.2) 中10 µg/ml) を用い、一晚4でコーティングした。プレートを軽く振り、リン酸緩衝塩水中100 µlの1%ウシ血清アルブミンで一晚4でブロックした。プレートを軽く振り、洗浄緩衝液で3回洗浄した後、ウェルにリン酸緩衝塩水中1:5に希釈したウサギ血清100 µlを加え、室温で一晚インキュベートした。プレートを軽く振り、洗浄緩衝液で3回洗浄した後、3 - (3 - (4 - イミノブチルチオ) スクシンイミジル) フェナシルグリシンとのラパマイシン42 - エステルと西洋ワサビペルオキシダーゼとの結合体 (実施例12の化合物) (100 µl, 0.5 ng/ml) 又は (N - (3 - カルボキシフェニル) - 3 - チオスクシンイミジル) グリシンとのラパマイシン42 - エステルと西洋ワサビペルオキシダーゼとの結合体 (実施例13の化合物) (100 µl, 0.5 ng/ml) を加え、室温で1時間暗所でインキュベートした。プレートを軽く振り、洗浄緩衝液で3回洗浄した後、H₂O₂と共にTMB基質を加え、プレートを被覆して室温で30分間暗所でインキュベートした。450 nmの分光光度計で光学密度を読み取った。結果を表3に示す。

【0065】

【表3】

表3

捕獲E L I S Aアッセイを用いた実施例3の化合物で免疫感作したウサギと実験を受けたことのないウサギとの抗ラパマイシン抗体レベルの比較

ウサギ番号	予備出血 実施例10	ΔA 450 (3回目の出血－予備出血)		
		実施例10	実施例12	実施例13
81	0.119	0.713	0.217	0.114
89	0.136	0.037	0.026	0.020

【0066】

表3に示されているデータは、ウサギ番号81に見られるように、実施例12及び13の化合物を用いて、哺乳類におけるラパマイシン又はその誘導体に特異的な抗体を検出し得ることを示している。

【0067】

下記は、ラパマイシンに特異的な抗体を用い、E L I S Aフォーマットにより、ラパマイシンに対する拮抗阻害アッセイを用いたラパマイシン濃度の測定の例である。マイクロタイタープレート (Immunolon I) を100 µlのヤギ抗マウス抗体 (10 mMのリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.2) 中10 µg/ml) を用いて一晚4でコーティングした。プレートを軽く振り、リン酸緩衝塩水中100 µlの1%ウシ血清アルブミ

ンを用いて4 で一晩ブロックした。プレートを軽く振り、洗浄緩衝液で3回洗浄した後、各ウェルに上記のラパマイシン特異抗体 ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $100 \mu\text{l}$) 加え、室温で1~4時間インキュベートした。プレートを軽く振り、洗浄緩衝液で3回洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼとのラパマイシン31, 42-ビス(ヘミグルタレート)結合体 ($100 \mu\text{l}$ 、 $0.5 \text{ ng}/\text{ml}$) を加え、室温で1時間暗所でインキュベートした。プレートを軽く振り、洗浄緩衝液で3回洗浄した後、TMB基質を加え、プレートを被覆して室温で5分間暗所でインキュベートした。450nmの分光光度計で光学密度を読み取った。マウス血清に結合する、ラパマイシンと、グルタル酸とのラパマイシン31, 42-ジエステルと西洋ワサビペルオキシダーゼとの結合体との競合の結果を表4に示す。これらの結果から、標準曲線の構築及び試料中のラパマイシンの濃度の測定が可能である。

【0068】

【表4】

表4

遊離ラパマイシン	光学密度×1000			阻害 (%)
	1	2	平均	
10 μM	158	158	158	74.1
5	182	194	188	69.2
0.5	304	322	313	48.6
0.05	494	501	498	18.4
0.005	528	546	537	11.9
0.0005	601	611	606	0.6
0	583	636	610	—

【0069】

実施例11の化合物(N-[9H-フルオレン-9-イルメトキシ)カルボニル]グリシンとのラパマイシン42-エステル)は、実施例12に用いた手順により脱保護し、固体マトリックスに結合させることが可能である。該化合物は、いくつかのディップスティックイムノアッセイ法又はラパマイシン結合タンパク質の単離に用いられるラパマイシン又はその誘導体に特異的な抗体に結合し得る。以下の実施例は、実施例11の化合物の803共鳴単位(RU)がBIAcoreに用いられるEDC及びNHSに基づいたBIAcore標準プロトコルを用いて固体マトリックス上に固定化し得ることを示している。このマトリックスはラパマイシン特異抗体の1401RU単位に結合した。試験した各濃度の抗体(0.625 、 1.25 、 2.5 、 5.0 、 $10.0 \mu\text{g}/\text{ml}$)について会合及び解離動力学を測定した。これらのデータは、実施例11の化合物が、マトリックスに結合している場合でさえ、開環ラパマイシン特異抗体による結合にアクセスし得、相互作用の特性決定も可能であることを示している。同様な手順を用いて、ラパマイシン結合タンパク質を、脱保護されたN-[9H-フルオレン-9-イルメトキシ)カルボニル]グリシンとのラパマイシン42-エステル結合マトリックスに結合させることが可能である。このマトリックスは、当業者により実践されているように新規な結合タンパク質の単離にも用いることができる。脱保護されたN-[9H-フルオレン-9-イルメトキシ)カルボニル]グリシンとのラパマイシン42-エステルを用いて、以下の方法の中のいずれかによりラパマイシン-FKBP結合体の結合タンパク質を単離することが可能である。一つの方法において、適切なプロテアーゼインヒビターを含む組織又は細胞溶解物と、脱保護されたN-[9H-フルオレン-9-イルメトキシ)カルボニル]グリシンとのラパマイシン42-エステル結合マトリックスでインキュベートしてあるFKBPとを結合に十分な時間インキュベートする。種々の緩衝液を用いて非特異的結合しているタンパク質を洗浄する。

【0070】

ラパマイシン核-FKBPと結合タンパク質との間の結合を壊す追加の緩衝液を添加

するとタンパク質が遊離する。

【0071】

ハイブリドーマ細胞系、RAP-42-OVAF₂#1hcを、ブタペスト条約の下に、1994年3月10日、米国メリーランド州、ロックビル、パークローンドライブ12301に所在のAmerican Type Culture Collection (ATCC)に寄託し、受託番号HB11568で寄託された。

【0072】

ハリブリドーマ細胞系34-293-163hcも、1994年4月6日、ブタペスト条約の下にATCCに寄託され、受託番号HB11606で寄託された。

【0073】

以下の実施例は本発明の代表的な化合物の製造を表す。

【実施例1】

【0074】

コハク酸とのラパマイシン42-エステル

15mlの塩化メチレン中5g(5.5mmol)のラパマイシン及び880μlのピリジンの攪拌溶液に、無水コハク酸1.1g(11mmol)及びジメチルアミノピリジン(DMAP)400mgを加えた。反応混合物を2日間室温で攪拌し、塩化メチレンで希釈、1NのHCl50mlずつで3回洗浄した。次いで有機層をNa₂SO₄上で脱水、真空下に濃縮して、粗生成物を得た。溶離剤として55%アセトニトリル/水を用いる逆相HPLCクロマトグラフィーにより純粋物質を得、標記化合物1g(18%)を得た。スペクトルデータは以下の通り：¹H NMR(CDCl₃, 300MHz) 4.650(m, 1H, H₂COC=O), 4.168(d, 1H, H₂COH), 2.795(s, 4H, OC=OCH₂CH₂C=O)。

【実施例2】

【0075】

(N-ヒドロキシスクシンイミド(ヘミスクシネート))とのラパマイシン42-エステル

3mlの酢酸エチル中コハク酸とのラパマイシン42-エステル100mgの攪拌溶液にDCC21mg(0.098mmol)及びN-ヒドロキシスクシンイミド12mg(0.098mmol)を加えた。

【0076】

反応混合物を室温で一晩攪拌し、濾過、真空下に濃縮して粗生成物を得た。

【0077】

溶離剤として80%アセトニトリル/水を用いる逆相HPLCにより純粋物質を得、標記化合物75mg(69%)を得た。スペクトルデータは以下の通り：¹H NMR(CDCl₃, 300MHz) 4.650(m, 1H, H₂COC=O), 4.168(d, 1H, H₂COH), 2.951(m, 2H, OC=OCH₂), 2.795(m, 4H, OC=OCH₂CH₂C=O), 2.705(m, 2H, OC=OCH₂); MS(負イオンFAB) 1110(M⁻), 1056, 1012, 913, 148(100)。

【実施例3】

【0078】

コハク酸とのラパマイシン42-エステルとKLHとの結合体

1,4-ジオキサン3ml中(N-ヒドロキシスクシンイミド(ヘミスクシネート))とのラパマイシン42-エステル37mgの攪拌溶液に、0.05Mのリン酸緩衝液6ml中197mgのKLH(keyhole limpet hemocyanin)を加え、反応材料を3日間4℃で攪拌した。次いで反応混合物を4℃で24時間0.05Mのリン酸緩衝液1500mlで透析し、さらに精製することなく使用可能な標記化合物を得た。

【0079】

KLH当たりのコハク酸とのラパマイシン42-エステル部分の数は約42:1であっ

10

20

30

40

50

た。

【実施例 4】

【0080】

コハク酸とのラパマイシン 42 - エステルとオボアルブミンとの結合体

1, 4 ジオキサン 3 ml 中 (N - ヒドロキシスクシンイミド - (ヘミスクシネート)) とのラパマイシン 42 - エステル 37 mg に、0.05 M のリン酸緩衝液 6 ml 中 197 mg のオボアルブミンを加え、反応材料を 3 日間 4 で攪拌した。次いで反応混合物を 24 時間 4 で 0.05 M のリン酸緩衝液 1500 ml 中で透析して、さらに精製することなく使用可能な標記化合物を得た。

【実施例 5】

【0081】

コハク酸とのラパマイシン 42 - エステルと西洋ワサビペルオキシダーゼとの結合体

1, 4 - ジオキサン 40 μl 中 (N - ヒドロキシスクシンイミド (ヘミスクシネート)) とのラパマイシン 42 - エステル 1 mg に、1, 4 ジオキサン 0.4 ml 及び 0.5 % 重炭酸ナトリウム 0.4 ml 溶液中 16 mg の西洋ワサビペルオキシダーゼを加え、反応材料を 4 で 2.5 時間攪拌した。次いで反応混合物を 24 時間 4 で 0.05 M のリン酸緩衝液 1500 ml 中で透析して、さらに精製することなく使用可能な標記化合物を得た。

【実施例 6】

【0082】

グルタル酸とのラパマイシン 31, 42 - ジエステル

実施例 1 に用いた方法に従って標記化合物を調製した。

【実施例 7】

【0083】

(N - ヒドロキシスクシンイミド (ヘミグルタレート)) とのラパマイシン 31, 42 - ジエステル

ジメチルホルムアミド 160 μl 中グルタル酸とのラパマイシン 31, 42 - ジエステル 15.9 mg の溶液に、N, N - ジメチルアミノプロピルエチルカルボジイミド 3.65 mg 及び N - ヒドロキシスクシンイミド 1.8 mg を加えた。

【0084】

反応が完結するまで反応混合物を攪拌し、水に注ぎ、酢酸エチルで抽出した。

【0085】

有機層を合わせ、硫酸ナトリウム上で脱水、濾過、真空下に濃縮して、標記化合物を得、0.1 N のリン酸ナトリウム緩衝液中 4 で貯蔵し、さらに精製することなく使用した。

【実施例 8】

【0086】

グルタル酸とのラパマイシン 31, 42 - ジエステルと K L H との結合体

0.1 M の NaHCO_3 2 ml 中の K L H 20 mg に、(N - ヒドロキシスクシンイミド (ヘミグルタレート)) とのラパマイシン 31, 42 - ジエステル 55 μl を 10 μl ずつ 0 で 30 分かけて加えた。

【0087】

反応が完結するまで溶液をゆっくり振りまぜ、6000 rpm で 20 分間遠心し、結合していない出発物質をリン酸緩衝溶液を用いる G - 25 カラム上で標記化合物から分離した。

【0088】

結合体をグリセロールと 50 % 混合し、-70 で貯蔵した。

【0089】

K L H 当たりのグルタル酸とのラパマイシン 31, 42 - ジエステル部分の数は 17 ~ 45 : 1 の範囲であった。

10

20

30

40

50

【実施例 9】

【0090】

グルタル酸とのラパマイシン 31, 42 - ジエステルとオボアルブミンとの結合体

0.1 M の NaHCO_3 2 ml 中 20 mg のオボアルブミンに、(N - ヒドロキシスクシンイミド - (ヘミグルタレート)) とのラパマイシン 31, 42 - ジエステル 55 μl を 10 μl ずつ 0 で 30 分かけて加えた。反応が完結するまで、溶液をゆっくり振りまぜ、600 rpm で 20 分間遠心し、結合していない出発物質をリン酸緩衝溶液を用いる G - 25 カラム上で標記化合物から分離した。結合体をグリセロールと 50 % 混合して、-70 で貯蔵した。

【実施例 10】

10

【0091】

グルタル酸とのラパマイシン 31, 42 - ジエステルと西洋ワサビペルオキシダーゼとの結合体

0.1 M の NaHCO_3 1 ml 中 10 mg の西洋ワサビペルオキシダーゼに、(N - ヒドロキシスクシンイミド (ヘミグルタレート)) とのラパマイシン 31, 42 - ジエステル 105 μl を 10 μl ずつ 30 分かけて加えた。反応が完結するまで溶液をゆっくり振りまぜ、6000 rpm で 20 分間遠心し、リン酸緩衝溶液を用いた G - 25 カラムから標記化合物を溶離した。結合体をグリセロールと 50 % 混合し、-20 で貯蔵した。

【実施例 11】

【0092】

20

N - [(9H - フルオレン - 9 - イルメトキシ) カルボニルグリシン] とのラパマイシン 42 - エステル

塩化メチレン (5 ml) 中のラパマイシン (0.73 g, 0.08 mmol) の冷凍 (0) 溶液に、N - [(9H - フルオレン - 9 - イルメトキシ) カルボニル] グリシンペンタフルオロフェニルエステル 0.6 g (1.19 mmol)、次いでピリジン (0.85 ml, 10.5 mmol) 及びジメチルアミノピリジン (18 mg, 0.14 mmol) を加え、不均一溶液を形成し、室温に温めて均質にした。反応混合物を室温で一晩攪拌した。大過剰の EtOAc を加えた。有機層を 0.5 N の HCl (2 x) 及び塩水で洗浄し、脱水 (MgSO_4)、濃縮して、オフホワイトの泡状物を得た。フラッシュクロマトグラフィー (30 ~ 50 % ヘキサン / EtOAc) にかけて、収率 71 % で標記化合物 (0.679 g, 0.57 mmol) を得た。質量スペクトル (負イオン FAB) M^- : m/z 1192。

30

【実施例 12】

【0093】

3 - [(3 - (4 - イミノブチルチオ) スクシンイミジル) フェナシルグリシン] とのラパマイシン 42 - エステルと西洋ワサビペルオキシダーゼとの結合体

アセトニトリル (84 μl) 中の N - [(9H - フルオレン - 9 - イルメトキシ) カルボニル] グリシンとのラパマイシン 42 - エステル (10 mg, 8.4 μmol) の溶液に、ジエチルアミン 10 μl (0.84 M、アセトニトリル中) を加えた。反応混合物を室温で 60 分間攪拌し、窒素流により溶媒を除去した。

40

【0094】

残渣をアセトニトリル (100 μl) に溶解し、ヘキサン (5 回、200 μl) で洗浄し、次いで窒素流により溶媒を濃縮した。得られたグリシンとのラパマイシン 42 - エステルを、DMF (200 μl) 中の m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスクシンイミド (MBS) (2 mg) に入れ、4 で 2 時間インキュベートし、次いで 50 mM のトリス HCl (pH 8.0) 中の 50 nM エタノールアミン (20 μl) を加えた。西洋ワサビペルオキシダーゼ (5 mg) 及びウサギ IgG (10 mg) を 2 - イミノチオレーンで処理し、Sephadex G - 25 で精製し、次いで MBS - ラパマイシングリシンエステル付加化合物を加えた。混合物を 4 で一晩インキュベートし、Sephadex G - 25 上でゲル濾過して精製し、標記化合物を得た。

50

【実施例 13】

【0095】

(N - (3 - カルボキシフェニル) - 3 - チオスクシンイミジル) - グリシンとのラパマイシン 42 - エステルと西洋ワサビペルオキシダーゼとの結合体

アセトニトリル (84 μ l) 中の N - [(9H - フルオレン - 9 - イルメトキシ) カルボニル] グリシンとのラパマイシン 42 - エステル (10 mg, 8.4 μ mol) の溶液に、ジエチルアミン 10 μ l (0.84 M、アセトニトリル中) を加えた。反応混合物を室温で 60 分間攪拌し、窒素流により溶媒を除去した。

【0096】

残渣をアセトニトリル (100 μ l) に溶解し、ヘキサン (5 回、200 μ l) で洗浄し、次いで窒素流により溶媒を濃縮した。得られたグリシンとのラパマイシン 42 - エステルを、DMF (200 μ l) 中の N - スクシンイミジル - S - アセチルチオアセテート (2 mg) に入れた。反応混合物を室温で 15 分間、次いで 4 で一晩攪拌した。ラパマイシン反応混合物溶液に、ヒドロキシルアミン HCl (50 μ l の DMF 中 7 mg) 溶液を加えて 1 時間インキュベートし、次いで MBS - 西洋ワサビペルオキシダーゼ付加化合物及び MBS - ウサギ IgG を加えて、標記化合物を得、Sephadex G - 25 ゲル濾過により精製した。

【実施例 14】

【0097】

ジエチルアジドジカルボキシレートとのラパマイシン 1, 3 - ディールスアルダー付加化合物

ラパマイシン (1 g, 1.093 mmol) 及びジエチルアジドジカルボキシレート (0.381 g, 2.187 mmol) をジクロロメタン (10 ml) に溶解し、65 で一晩加熱した。

【0098】

TLC により、反応が完結したことが示された。混合物を溶離剤として酢酸エチルを用いるシリカゲルカラム上で精製して、白色固体 (0.750 g) を得、ヘキサンですり碎き、風乾して、粉末として標記化合物 (0.666 g) を得た。

C₅₇H₈₉N₃O₁₇ の元素分析：計算値：C, 62.91; H, 8.24; N, 3.86; 実測値：C, 62.81; H, 8.12; N, 3.91。IR (KBr, cm⁻¹) 3450, 1720。

NMR (CDCl₃) δ 6.15 (m, 1H), 5.20 (d, 1H), 3.40 (s, 3H), 3.30 (s, 3H), 3.15 (s, 3H), 0.9 (t, 3H), 0.72 (q, 1H)。

MS (-FAB) 1087 (M⁻)。

【実施例 15】

【0099】

フェニルトリアゾリンジオンとのラパマイシン 1, 3 - ディールスアルダー付加化合物

ラパマイシン (0.66 g, 721 μ mol) をジクロロメタン (10 ml) に溶解し、0 に冷却した。これに、ジクロロメタン (10 ml) 中のフェニルトリアゾリンジオン (0.133 g, 758 μ mol) 溶液を滴下した。溶液を一晩攪拌した。TLC により、反応がまだ完結していないことが示された。追加のフェニルトリアゼンジオン (0.025 g, 27 μ mol) を加えた。溶離剤として酢酸エチルを用いる HPLC (4.1 $\times$ 31 cm, SiO₂) を用いて反応材料を精製して、固体として標記化合物を得た。固体をヘキサン 30 ml 及び酢酸エチル 1 ml ですり碎き、濾過、風乾して、粉末として標記化合物 (0.383 g) を得た。

C₅₉H₈₄N₄O₁₅ の元素分析：計算値：C, 65.05; H, 7.77; N, 5.14; 実測値：C, 65.39; H, 7.98; N, 4.92。IR (KBr, cm⁻¹) 3450, 1715。

NMR (DMSO) δ 7.50 (m, 3H), 7.40 (m, 2H), 3.11 (s, 3

H), 3.00 (s, 3H), 2.95 (s, 3H), 0.8 (q, 1H)。
MS (-FAB) 1088 (M⁺)。

【0100】

以下の化合物は、ラパマイシンの31位でリンカーを介して結合し得る蛍光ラパマイシン誘導体の代表的な例である。

【実施例16】

【0101】

42-ダンシルラパマイシン

乾燥ピリジン(2ml)中のラパマイシン(200mg, 0.22mmol)を0℃に冷却し、ダンシルクロリド(840mg, 3.1mmol)で処理した。反応材料を室温に温め、24時間撹拌した。反応混合物を冷却した2NのHCl(30ml)に注ぎ、酢酸エチル(4×25ml)で抽出した。酢酸エチルをプールし、塩水で洗浄、MgSO₄上で脱水、濾過、真空下に濃縮した。残渣をベンゼン中25%の酢酸エチルを用いるシリカクロマトグラフィーにかけ、黄色粉末として標記化合物150mgを得た(融点: 101-104℃)。

【実施例17】

【0102】

ピレン酪酸とのラパマイシン42-エステル

ラパマイシン(459mg, 0.5mmol)及びピレン酪酸(216mg, 0.75mmol)をTHF/CH₂Cl₂(10ml, 1:1)に溶解した。該溶液に、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(146mg, 0.67mmol)及び4-ジメチルアミノピリジン(15mg)を加えた。15時間かけて反応材料を室温に温めた。反応材料をCH₂Cl₂で希釈し、5% HCl、次いで塩水で洗浄した。溶液をMgSO₄上で脱水、濾過、蒸発させて、固体を得た。固体を3mmシリカゲルクロマトプレートにかけ、ヘキサン中50%の酢酸エチルで溶離して、泡状物として標記化合物180mgを得た。この反応によりさらに、31、42-ジエステル化ラパマイシン100mgも得られた。

IR (KBr, cm⁻¹) 3420, 1740。

NMR (CDCl₃) δ 8.3 (d, 1H), 8.14 (dd, 2H), 8.10 (d, 2H), 7.85 (d, 1H), 3.34 (s, 3H), 3.30 (s, 3H), 3.11 (s, 3H)。

MS (-FAB) 1183 (M⁺)。

【0103】

下記の化合物は、上記の手順により免疫原性担体に結合するか又は別のリンカーに結合してから該担体に結合し得るラパマイシン誘導体の代表的な例である。

【実施例18】

【0104】

ラパマイシン42-カルボメトキシメチルエーテル及びラパマイシン42-ビス(カルボメトキシメチルエーテル)

ラパマイシン(2.0g, 2.187mmol)及び酢酸ロジウム(II)(0.37g, 0.08mmol)をベンゼン中で加熱還流し、ベンゼン(10ml)中のエチルジアゾアセレート溶液(500ml)で10分かけて処理した。溶液を室温に冷却し、一晚撹拌した。TLCにより、反応が完結していないことが示された。追加のエチルジアゾアセレート(3mlずつ)を2回に分けて24時間間隔で加えた。混合物を濃縮し、酢酸エチルを用いるシリカゲル上のフラッシュクロマトグラフィーにかけて精製して、油状物として42-モノエーテル(1g)及び31, 42-ジエーテル(0.850g)を得た。42-モノエーテルをヘキサン、酢酸エチル及びジクロロメタン混合物中で週末にかけてすり砕き、粉末として生成物を得た。溶離剤として酢酸エチルを用いるシリカゲルカラム上のHPLCにかけてジエーテルを精製し、固体として生成物を得た。モノエーテルについての分析データ:

$C_{55}H_{85}N_{15}O_{15}$ の元素分析：計算値：C, 66.04; H, 8.57; N, 1.40; 実測値：C, 65.29; H, 8.64; N, 1.60。

IR (KBr, cm^{-1}) 3420, 1715。

NMR ($CDCl_3$) δ 4.82 (s, 1H), 3.41 (s, 3H), 3.33 (s, 3H), 3.13 (s, 3H), 1.28 (t, 3H), 0.70 (q, 1H)。

MS (-FAB) 999 (M^+)。

ジエーテルについての分析データ：

$C_{59}H_{91}N_{17}O_{17}$ の元素分析：計算値：C, 65.23; H, 8.44; N, 1.29; 実測値：C, 63.29; H, 8.40; N, 1.44。

IR (KBr, cm^{-1}) 1740。

NMR ($CDCl_3$) δ 6.36 (q, 2H), 5.24 (s, 1H), 3.39 (s, 3H), 3.32 (s, 3H), 3.12 (s, 3H), 0.65 (q, 1H)。

MS (-FAB) 1085 (M^+)。

【実施例 19】

【0105】

ラパマイシン 42 - (4 - ニトロフェニル) カーボネート 及び ラパマイシン 31, 42 - ビス (4 - ニトロフェニル) カーボネート

ラパマイシン (0.450 g, 0.49 mmol) を乾燥ジクロロメタン (10 ml) に溶解し、0 に冷却した。この溶液に、ピリジン (0.4 ml, 5.7 mmol) 及び 4 - ジメチルアミノピリジンの結晶を加えた。ジクロロメタン (3 ml) 中の 4 - ニトロフェニルクロロホルメート (0.3 g, 1.49 mmol) 溶液を加えた。該溶液を一晩かけて室温に温め、室温で 24 時間撹拌した。0.1 N の HCl (5 ml) に加えて反応を停止し、水層をジクロロメタンで洗浄した。有機層を $MgSO_4$ 上で脱水、濾過、真空下に蒸発させて、黄色固体を得た。ヘキサン中の 75% 酢酸エチルを用いるシリカゲルクロマトグラフィーにかけ、黄色固体として 42 - モノカーボネート 180 mg 及び 31, 42 - ジカーボネート 47 mg を得た。

【実施例 20】

【0106】

42 - O - (フェノキシチオカルボニル) - ラパマイシン

ラパマイシン (1.030 g, 1.12 mmol) を乾燥ジクロロメタン (100 ml) に溶解し、0 に冷却した。この溶液に、ピリジン (0.27 ml, 3.33 mmol) 及び 4 - ジメチルアミノピリジンの結晶を加えた。反応混合物に、ジクロロメタン (5 ml) 中のチオフェニルクロロホルメート (0.47 ml, 1.49 mmol) 溶液を加えた。該溶液を一晩かけて室温に温め、室温で 24 時間撹拌した。0.1 N の HCl (5 ml) に加えて反応を停止し、水層をジクロロメタンで洗浄した。有機層を $MgSO_4$ 上で脱水、濾過、真空下に蒸発させて、黄色固体を得た。ヘキサン中 40% ~ 70% の酢酸エチルの勾配溶離を用いる 4 mm シリカゲルクロマトプレート上のクロマトグラフィーにかけて、黄色泡状物として標記化合物 520 mg を得た。

$C_{58}H_{83}N_{14}O_{14}S_4$ の元素分析：計算値：C, 66.32; H, 7.97; N, 1.33; 実測値：C, 66.48; H, 8.05; N, 1.12。

IR (KBr, cm^{-1}) 3420, 1715。

NMR ($CDCl_3$) δ 7.41 (t, 1H), 7.25 (t, 2H), 7.12 (d, 1H), 3.45 (s, 3H), 3.33 (s, 3H), 3.13 (s, 3H)。

MS (-FAB) 1049 (M^+)。

【実施例 21】

【0107】

ラパマイシン - O - カルボキシメチル - 27 - オキシム

メタノール (6 ml) 中のラパマイシン 600 mg (650 μM) の溶液に、無水酢酸ナトリウム 100 mg (1.2 mmol) 及びカルボキシメトキシルアミンヘミヒドロクロリド 140 mg (660 μM) を室温に加えた。室温で一晩撹拌した後で、反応が完結

10

20

30

40

50

した。反応混合物を真空下に濃縮し、残渣を水ですり碎いた。固体を濾過し、水で完全に洗浄した。生成物を高真空下に乾燥して、白色固体 575 mg (89.78%) を得た。 ^{13}C 及び ^1H NMR により、27 位にオキシム誘導体として E 異性体及び Z 異性体の混合物が示された。

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): 3.43 及び 3.41 (2s, 3H, CH_3O), 3.30 (s, 3H, CH_3O), 3.18 及び 3.12 (2s, 3H, CH_3O), 1.82 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{C}$), 1.695 及び 1.633 (2s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{C}$); ^{13}C NMR (CDCl_3 , MHz): 215.8 ($\text{C}=\text{O}$), 211.5 ($\text{C}=\text{O}$), 194.5 ($\text{C}=\text{O}$), 191.0 ($\text{C}=\text{O}$), 172.5 ($\text{C}=\text{O}$), 169.0 ($\text{C}=\text{O}$), 168.5 ($\text{C}=\text{O}$), 167.0 ($\text{C}=\text{O}$), 161.5 ($\text{C}=\text{NOC}$), 160.0 ($\text{C}=\text{NOC}$), 140.0; MS (負イオン FAB: 985 ($\text{M}-\text{H}$) $^-$, 590, 167, 128, 97, 75 (100%)).
 $\text{C}_{53}\text{H}_{82}\text{N}_2\text{O}_{15} \cdot 0.15\text{H}_2\text{O}$ の元素分析: 計算値: C, 63.90; H, 8.40; N, 2.81; 実測値: C, 63.81; H, 8.41; N, 2.85。

【0108】

以下の化合物をラパマイシン又はその誘導体に特異的な抗体の産生に用いた。

【実施例 22】

【0109】

グリシルピオチンとのラパマイシン 42 - エステル

DMF 60 ml 中のピオチン (0.83 g, 3.4 mmol) 溶液に、グリシン - t - ブチルエステル塩酸塩 (0.57 g, 3.4 mmol)、N - メチルモルホリン (0.92 ml, 8.36 mmol)、1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール (0.61 g, 3.99 mmol) 及び 1 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 3 - エチルカルボ - ジイミド塩酸塩 (0.65 g, 3.4 mmol) を加えた。反応混合物を室温で 7 日間撹拌した。DMF を濃縮し、酢酸エチルを加え、有機層を水、0.5 N の HCl、飽和重炭酸ナトリウム及び塩水で洗浄した。酢酸エチル層を脱水 (MgSO_4)、濃縮して、TLC 上実質的に一つのスポットを示す白色固体状の t - ブチルグリシルピオチン (0.611 g, 1.71 mmol, 50%) を得た。質量スペクトル m/z 358 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)。 20

【0110】

CH_2Cl_2 (0.5 ml) 中の t - ブチルグリシルピオチン (0.271 g, 0.758 mmol) 溶液に、トリフルオロ酢酸 0.5 ml を加えた。反応混合物を室温で 2 時間撹拌し、濃縮して、無水ジエチルエーテルですり碎いた。オフホワイトの沈殿物を回収して、グリシルピオチン 0.209 g (0.694 mmol, 92%) を得た。質量スペクトル m/z 302 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)。 30

【0111】

1 - メチルピロリジノン (5 ml) 中のグリシルピオチン (0.65 g, 2.16 mmol) 溶液に、6 ml の CH_2Cl_2 を加え、沈殿物を形成させて、トリエチルアミン 0.33 ml (2.36 mmol) を添加した後でさえ沈殿物は残留した。この不均一溶液に、ラパマイシン 2 g (2.19 mmol)、1 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 3 - エチルカルボジイミド塩酸塩 0.43 g (2.24 mmol) 及び DMAP 30 mg (2.46 mmol) を加えた。数時間後、反応混合物は均質になり、さらに 4 日間撹拌した。大過剰の酢酸エチルを加え、有機層を水、0.5 N の HCl、飽和重炭酸ナトリウム及び塩水で洗浄した。有機層を脱水 (MgSO_4)、濃縮した。薄黄色の泡状物を温無水ジエチルエーテルですり碎いて、薄黄色の固体として不純な標記化合物 1.2 g を得た。該物質中の一部 (0.5 g) を 5% MeOH / CHCl_3 中のフラッシュクロマトグラフィーにかけ、再び温エーテルですり碎いて、少量のラパマイシンで汚染された標記化合物 87 mg を得た。該物質を再度クロマトグラフィー (0 ~ 5% の勾配の MeOH / CHCl_3) にかけ、エーテルで最終的にすり碎いて、白色固体として純粋な標記化合物 34 mg (0.028 mmol) を得た。質量スペクトル m/z 1196 ($-\text{FAB M}^-$)。 40

【実施例 23】

【 0 1 1 2 】

a) コハク酸とのラパマイシン - 4 2 - エステルと 5 - グリシニルフルオレセインアミンとの結合体

1 0 μ l のトリエチルアミンを含むメタノール 2 0 0 μ l に溶解した 4 . 2 m g の 5 - グリシニルフルオレセインアミンに、実施例 2 の化合物 4 m g を加えた。2 時間後、混合物の一部をシリカ薄層クロマトグラフィープレートにかけ、1 0 0 部のクロロホルム、1 0 部のメタノール、1 部の酢酸で展開した。乾燥後、生成物を含むバンドをプレートから剥がし、メタノールを用いて生成物をシリカから溶離した。生成物は、F K B P 1 2 を添加すると、水溶液の蛍光偏光が変化することを特徴としていた。

【 0 1 1 3 】

b) コハク酸とのラパマイシン 4 2 - エステルと 5 - アミノメチルフルオレセインとの結合体

実施例 2 3 a の方法に従って、2 . 5 m g の 5 - アミノメチルフルオレンを 5 - グリシニルフルオレセインの代わりに用いて標記化合物を調製した。

【 0 1 1 4 】

c) コハク酸とのラパマイシン 4 2 - エステルと 4 ' - アミノメチルフルオレセインとの結合体

実施例 2 3 a の方法に従って、1 . 1 m g の 4 ' - アミノメチルフルオレセインを 5 - グリシニルフルオレセインの代わりに用いて標記化合物を調製した。薄層クロマトグラフィー溶媒は、1 0 0 部のクロロホルム、8 部のメタノール及び 1 部の酢酸であった。

【 実施例 2 4 】

【 0 1 1 5 】

コハク酸とのセコラパマイシン 4 2 - エステルと 5 - グリシニルフルオレセインアミンとの結合体

実施例 2 3 の生成物の一部をシリカ薄層クロマトグラフィープレートにかけ、5 0 部のクロロホルム、4 部のメタノール及び 0 . 5 部の酢酸の混合物で溶離した。3 つの移動蛍光バンドが観察され、変化していない出発物質は最も高い r f 値を有し、標記化合物は最も低い r f 値を有していた。目的生成物を含むシリカをプレートから剥がし、標記化合物をメタノールで溶離した。生成物は、R A P - 4 2 - O V A F₂ # 1 M o A b を添加すると水溶液の蛍光偏光が変化することを特徴としていた。

【 実施例 2 5 】

【 0 1 1 6 】

a) アジピン酸とのラパマイシン 4 2 - エステル

実施例 2 の方法の変形によりアジピン酸とのラパマイシン 4 2 - エステルを調製した。ジメチルホルムアミド 1 . 0 m l 中 1 4 6 m g のアジピン酸を 2 0 0 μ l のジシクロヘキシルカルボジイミドと合わせて無水アジピン酸を調製し、室温で 2 時間インキュベートした。該反応材料の上清 3 0 0 μ l を、塩化メチレン 2 0 0 μ l に溶解したラパマイシン 9 0 m g 及びジメチルアミノピリジン 4 5 m g に加えた。

【 0 1 1 7 】

5 分後、混合物を遠心して、沈殿した物質を沈降させた。上清を 3 m l の水と 1 0 0 μ l の酢酸及び 2 × 1 m l の塩化メチレンとに分配した。

【 0 1 1 8 】

有機層を合わせて、無水硫酸ナトリウムで脱水し、溶媒を蒸発させた。残渣を 1 . 0 m l のメタノール及び 0 . 5 m l のエタノールに溶解し、氷中で冷却し、5 m l の水を加えて沈殿させた。これを遠心し、上清を廃棄、残渣を減圧デシケーター中で乾燥して、白色粉末 7 8 m g を得た。

【 0 1 1 9 】

b) アジピン酸とのラパマイシン 4 2 - エステルと N - ヒドロキシスクシンイミドとのエステル

実施例 2 5 a の化合物 3 8 m g 、N - ヒドロキシスクシンイミド 3 8 m g 及び 1 - エチ

10

20

30

40

50

ル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - カルボジイミド 4 0 m g をジメチルホルムアミド 0 . 4 m l と混合した。6 0 分後、追加のカルボジイミド 4 0 m g を加えた。さらに 6 0 分間してから混合物を氷中で冷却し、水 4 m l を激しくかき回しながら加えた。遠心して沈殿物を回収し、水 5 m l に再懸濁し、2 回遠心して洗浄し、真空デシケーターで乾燥して、白色粉末 3 8 m g を得た。

【 0 1 2 0 】

c) アジピン酸とのラパマイシン 4 2 - エステルと 5 - グリシニルフルオレセインアミンとの結合体

トリエチルアミン 6 μ l を添加して、5 - グリシニルフルオレセインアミン 2 . 3 m g をメタノール 2 0 0 μ l に溶解した。メタノール 2 0 0 μ l 中 1 0 . 6 m g の実施例 2 5 b の化合物の溶液 6 0 μ l を加えた。2 5 分後、混合物をシリカ薄層クロマトグラフィープレートにかけ、1 0 0 部のクロロホルム、1 2 部のメタノール及び 1 部の酢酸の混合物で展開した。目的生成物を含むシリカをプレートから剥がし、標記化合物をメタノールで溶離した。

10

【 0 1 2 1 】

d) アジピン酸とのラパマイシン 4 2 - エステルと 5 - アミノメチルフルオレセインとの結合体

実施例 2 5 c のようにして標記化合物を調製したが、但し、5 - アミノメチルフルオレセイン 2 . 6 m g を用いた。

【 0 1 2 2 】

e) アジピン酸とのラパマイシン 4 2 - エステルと 4 ' - アミノメチルフルオレセインとの結合体

実施例 2 5 c のようにして標記化合物を調製したが、但し、4 ' - アミノメチルフルオレセイン 2 . 5 m g を用いた。薄層クロマトグラフィー溶媒は、クロロホルム 1 0 0 部、メタノール 4 部及び酢酸 2 部であった。

20

フロントページの続き

- (72)発明者 エドゥアルド・ゴンザレス
アメリカ合衆国、イリノイ・60085、ウオーキガン、2・イー、ノース・ウオルナット・アベ
ニュー、726
- (72)発明者 ジョン・シー・ラツセル
アメリカ合衆国、ウイスコンシン・53221、グリーンフィールド、ウエスト・アイオウナ・テ
ラス・3925
- (72)発明者 キヤサリン・エル・モルナー - キンバー
アメリカ合衆国、ペンシルバニア・19038、グレンサイド、ハリソン・アベニュー・222
- Fターム(参考) 4C072 AA03 BB03 CC01 CC12 EE09 FF15 GG07

【要約の続き】

【選択図】なし

专利名称(译)	雷帕霉素缀合物和抗体		
公开(公告)号	JP2004168782A	公开(公告)日	2004-06-17
申请号	JP2003412071	申请日	2003-12-10
[标]申请(专利权)人(译)	惠氏公司		
申请(专利权)人(译)	魏斯		
[标]发明人	エドゥアルドゴンザレス ジヨンシーラツセル キヤサリンエルモルナーキンバー		
发明人	エドゥアルド・ゴンザレス ジヨン・シー・ラツセル キヤサリン・エル・モルナー・キンバー		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/435 A61K47/48 A61P37/04 C07D498/18 C07K16/12 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 C12R1/91 G01N33/533 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/533 A61K31/435 A61K47/643 A61K47/6835		
FI分类号	C07D498/18.301 C07D498/18		
F-TERM分类号	4C072/AA03 4C072/BB03 4C072/CC01 4C072/CC12 4C072/EE09 4C072/FF15 4C072/GG07		
代理人(译)	小野 诚 Masarushin大崎		
优先权	08/053030 1993-04-23 US 08/224205 1994-04-14 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供雷帕霉素缀合物，用作免疫原性分子。式IV的雷帕霉素缀合物或其盐。[选择图]无

