

(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2005-225864

(P2005-225864A)

(43) 公開日 平成17年8月25日(2005.8.25)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)	
CO7D 265/18	CO7D 265/18	CSP	4B064
CO7K 16/44	CO7K 16/44		4B065
C12N 5/10	GO1N 33/53	G	4C056
GO1N 33/53	GO1N 33/577	B	4H045
GO1N 33/577	C12N 5/00	B	

審査請求 有 請求項の数 9 O L 外国語出願 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-358924 (P2004-358924)	(71) 出願人	591003013
(22) 出願日	平成16年12月10日 (2004.12.10)		エフ・ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(31) 優先権主張番号	10/732, 767		F. HOFFMANN-LA ROCH
(32) 優先日	平成15年12月10日 (2003.12.10)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(33) 優先権主張国	米国 (US)		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
			グレンツアーヘルストラツセ124
		(74) 代理人	100091096
			弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100096183
			弁理士 石井 貞次
		(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100122389
			弁理士 新井 栄一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エファビレンツを検出するための試薬

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】

HIV療法に効果的な血漿中のエファビレンツレベル測定のための簡単で迅速な分析方法が必要であり、イムノアッセイ技術は、このような分析応用に好適である。イムノアッセイ技術にとって、エファビレンツに対して高度に特異的な抗体は不可欠であり、エファビレンツ誘導体およびエファビレンツ誘導体の製造法を提供する。

【解決手段】

誘導体には、エファビレンツに対する抗体を産生する免疫原性化合物およびラベルされたエファビレンツトレーサーが含まれる。これらの化合物は、エファビレンツを測定するためのイムノアッセイに有用である。

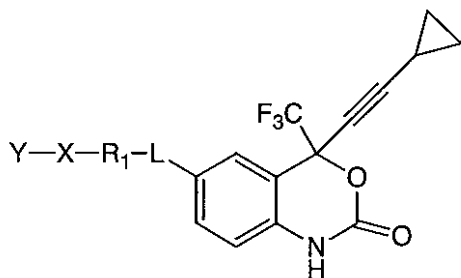
【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記構造を有する化合物。

【化 1】



10

式中、LはNHまたはOであり；

R₁は、0-10個の炭素またはヘテロ原子を含む飽和または不飽和の、置換または無置換の、直鎖または分岐鎖であり；

Xは、0-2個の置換もしくは無置換の芳香族環からなる結合基または0-10個の炭素もしくはヘテロ原子を含む脂肪族結合基であり；

Yは、活性化エステル、マレイミド基、チオール、またはNH-Z(Zはキャリアまたはラベル)である。

【請求項 2】

20

キャリアが、ポリ(アミノ酸)、多糖、ポリ(核酸)、および粒子からなる群から選択される、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

ラベルが、酵素、酵素フラグメント、放射性同位元素、酵素基質、酵素阻害剤、補酵素、蛍光発生化合物、化学発光物質、電気化学介在物質、レポーター基、核酸および粒子からなる群から選択される、請求項 1 または 2 に記載の化合物。

【請求項 4】

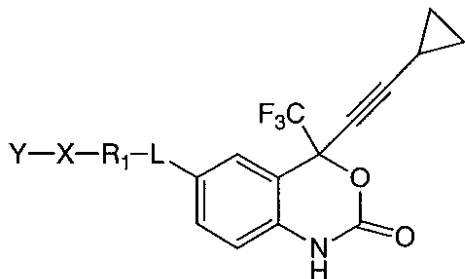
Yは、N-ヒドロキシスクシンイミジル、p-ニトロフェニル、ペンタフルオロフェニル、およびN-ヒドロキシベンゾトリアゾリルエステルからなる群から選択される活性化エステルである、請求項 1 ~ 3 のいずれか1項に記載の化合物。

30

【請求項 5】

請求項 1 に記載の下記構造を有する化合物に応答して産生される抗体。

【化 2】



40

式中、LはNHまたはOであり；

R₁は、0-10個の炭素またはヘテロ原子を含む飽和または不飽和の、置換または無置換の、直鎖または分岐鎖であり；

Xは、0-2個の置換もしくは無置換の芳香族環からなる結合基または0-10個の炭素もしくはヘテロ原子を含む脂肪族結合基であり；

Yは、NH-Z(Zはポリ(アミノ酸)、多糖、ポリ(核酸)、および粒子からなる群から選択されるキャリアである)である。

【請求項 6】

ネルフィナビル、サキナビル、インディナビル、リトナビル、アンブレナビル、ロピナビル 50

ル、およびアタザナビルからなる群から選択される1種以上のプロテアーゼ阻害剤との交差値が1%未満であることを特徴とする、エファビレンツに対して特異的なモノクローナル抗体。

【請求項7】

3'-アジド-3'-デオキシチミジンおよび2',3'-ジデヒドロ-3'-デオキシチミジンからなる群から選択される1種以上のヌクレオシド逆転写酵素阻害剤との交差値が1%未満であることを特徴とする、エファビレンツに対して特異的なモノクローナル抗体。

【請求項8】

ネビラピンおよびデラピラジンからなる群から選択される1種以上の非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤との交差値が1%未満であることを特徴とする、エファビレンツに対して特異的なモノクローナル抗体。

10

【請求項9】

エファビレンツに対して特異的なモノクローナル抗体を産生する、ATCC受託番号PTA-5820の細胞系EFA97.1。

【請求項10】

請求項9に記載のATCC受託番号PTA-5820の細胞系EFA97.1から産生される、エファビレンツに対して特異的なモノクローナル抗体。

【請求項11】

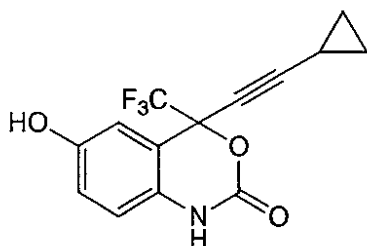
エファビレンツに対して特異的であり、請求項9に記載のATCC受託番号PTA-5820である細胞系EFA97.1から産生される抗体の結合と等価な結合をするモノクローナル抗体。

20

【請求項12】

下記構造を有する6-ヒドロキシエファビレンツ類似体。

【化3】



30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、エファビレンツを含む免疫原およびエファビレンツの検出のためのイムノッセイに用いられるエファビレンツ誘導体に関する。

【背景技術】

【0002】

ヒト免疫不全ウイルスタイプ-1(HIV-1)は、後天性免疫不全症候群(AIDS)の発症に導くレトロウイルスである。米国のHIV感染率は、新規感染が年に約40,000と推定されている。HIV感染の現在の治療では、HIVプロテアーゼまたはHIV逆転写酵素(RT)を阻害することによって、ウイルスの複製能力を妨げるように設計されている。

40

【0003】

エファビレンツ(SUSTIVA, Bristol-Meyers Squibb)は、HIVに感染した患者の治療において使用されるFDA認可薬のうちの1つである。エファビレンツによって、血液中のHIV量(「ウイルス量」)が低下することが判明している。エファビレンツを他の抗HIV薬と同時に摂取すると、患者のウイルス量が低減し、CD4細胞数が増加することが判明している。

【0004】

臨床試験の結果、HIVは、エファビレンツを始めとしてHIV療法で使用される薬に対して

50

耐性をもつようになり得ることが示された。このような薬剤耐性は、治療の不成功の主たる原因であると考えられる。HIVの薬剤耐性の獲得は、ウイルスの速い複製速度の結果であり得る。その効力にもかかわらず、エファビレンツは遺伝的障壁(genetic barrier)が低い。単一の突然変異(多くはRT遺伝子中のリジン-103で起こるK103N)により、高レベルの表現型耐性(phenotypic resistance)が生じ得る。エファビレンツ耐性HIV変異体の出現は、効力のない、すなわち有効治療量以下の薬物に繰り返しさらされた結果であり得る。

【0005】

治療の不成功は、エファビレンツの血清濃度が低い患者で一層頻繁に観察される。例えば、Marzoliniら、AIDS 15(London)、71-75、2001では、エファビレンツの血漿レベルが低い(例えば、1000 μ g/L未満)患者(全85人の患者)の50%においてウイルス学的不具合(virological failure)があることが報告されている。1000-4000 μ g/Lまたは4000 μ g/Lを超える範囲にあるエファビレンツの血漿レベルを有する患者においては、患者の18-22%でウイルス学的不具合が観察された。さらに、エファビレンツを接種している患者の20-40%では、めまい、幻覚、悪夢および不眠症を含む中枢神経系(CNS)副作用が報告されている。これらの徴候は通常軽~中程度であり、エファビレンツ療法の開始後2、3週で次第におさまることが報告されているが、これらの副作用が重症であるかまたは持続するために患者の約4%で治療を中断することが報告されている。CNS毒性は、1000-4000 μ g/Lの範囲のレベルにある患者と比較して高いエファビレンツレベル(例えば、4000 μ g/Lを超える)にある患者においてはおよそ3倍の高い頻度で存在していた。このことは、治療の不成功およびCNS副作用が、エファビレンツ血漿レベルの高低と関係していることを意味する。個体におけるエファビレンツレベルの変化は、CNS副作用を最小にする一方で有益な治療効果を最適化するためには、治療薬物モニタリング(TDM)に基づいて用量調整しなければならないことを強く支持している。

10

20

【0006】

患者間の薬理学的な違いにより、抗ウイルス療法に対する応答に大きな変化が生じるので、薬物レベルのモニタリングは、HIV感染ならびにHIV感染と関連する障害および疾患の管理に有用となり得る。高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)法(Marzoliniら、上掲)を使用する、HIV療法に有用な抗ウイルス剤の正規の治療薬物モニタリングは公知である。

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

HPLC法を用いて血漿中のエファビレンツレベルを測定することができるが、このような方法は、例えば、長い試料調製時間、長い分析時間、高コストおよび労働集約型手法のために、商業的な使用に対しては非実用的である。従って、効果的なTDMには、エファビレンツの血漿レベル測定のための簡単で迅速な分析法が必要である。イムノアッセイ技術は、このような分析応用に好適である。

【0008】

HIV感染の治療のための標準的な医療行為は、3種のHIV薬剤を同時投与することであり、そのうちの少なくとも2種は、異なる種類、例えば、2ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤(NRTI)および非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤(NNRTI)に由来する。エファビレンツを測定するイムノアッセイ技術にとって、抗体がエファビレンツに対して高度に特異的であることが不可欠である。

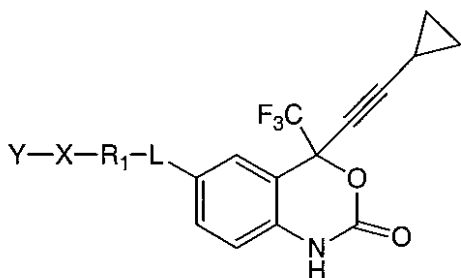
40

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、下記構造を有する化合物を提供する。

【化1】



【0010】

10

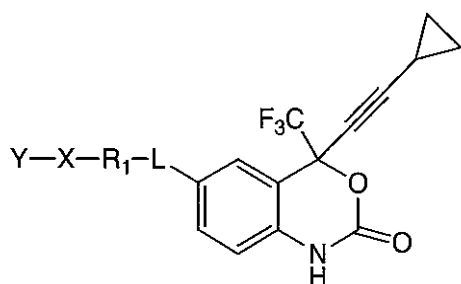
式中、LはNHまたはOであり；R₁は、0-10個の炭素またはヘテロ原子を含む飽和または不飽和の、置換または無置換の、直鎖または分岐鎖であり；Xは0-2個の置換または無置換の芳香族環からなる結合基または0-10個の炭素またはヘテロ原子を含む脂肪族結合基であり；Yは活性化エステル、マレイミド基、チオール、またはNH-Z(Zはキャリアまたはラベル)である。

【0011】

他の態様において、本発明は下記構造を有する化合物に応答して産生される抗体を提供する。

【化2】

20



【0012】

30

式中、LはNHまたはOであり；R₁は、0-10個の炭素またはヘテロ原子を含む飽和または不飽和の、置換または無置換の、直鎖または分岐鎖であり；Xは0-2個の置換または無置換の芳香族環からなる結合基または0-10個の炭素またはヘテロ原子を含む脂肪族結合基であり；YはNH-Z(Zはキャリア、例えばポリ(アミノ酸))である。

【0013】

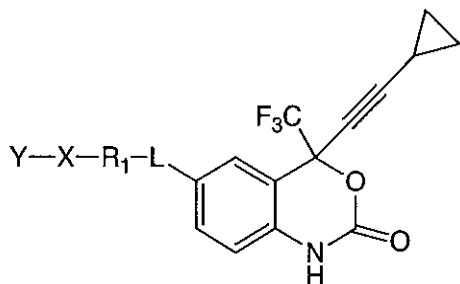
他の態様において、本発明は、一般に同時投薬される他のHIV薬剤と比べて、エファビレンツに対して高い特異性を有するモノクローナル抗体を提供する。これら他の薬剤には、他の非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤(NNRTI)、例えばネビラピンおよびデラピラジン等、およびヌクレオシド逆転写酵素阻害剤(NRTI)、例えば3'-アジド-3'-デオキシチミジンおよび2', 3'-ジデヒドロ-3'-デオキシチミジン等、およびプロテアーゼ阻害剤(PI)、例えばネルフィナビル、サキナビル、インディナビル、リトナビル、アンブレナビル、ロピナビル、およびアタザナビル等が含まれる。

40

【0014】

本発明の他の態様は下記構造を有する化合物を提供する。

【化3】



【0015】

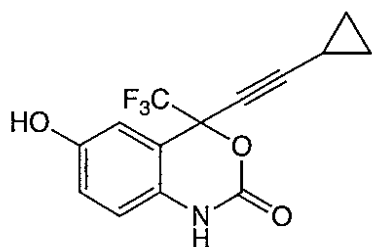
式中、LはNHまたはOであり；R₁は0-10個の炭素またはヘテロ原子を含む飽和または不飽和の、置換または無置換の、直鎖または分岐鎖であり；Xは0-2個の置換または無置換の芳香族環からなる結合基または0-10個の炭素またはヘテロ原子を含む脂肪族結合基であり；YはNH-Z(Zはラベル、例えば酵素、蛍光発生化合物、化学発光物質、電気化学介在物質、粒子、レポーター基、酵素阻害剤、および核酸等)である。

10

【0016】

本発明のさらに他の形態は、エファビレンツの6-ヒドロキシ類似体(9、キラルおよびラセミ)である。

【化4】



20

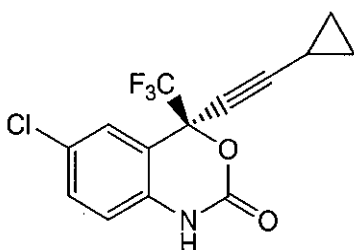
【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

「エファビレンツ」は、HIV(AIDSを発症し得るウイルス)感染患者の治療に用いられるFDA認可薬SUSTIVA(Bristol-Meyers Squibb)中の活性成分である化合物である。エファビレンツは下記化学構造式により示すことができる。

30

【化5】



40

【0018】

「エファビレンツ」の用語は、上記構造のキラルおよびラセミ混合物の双方を含めて同一の実質構造を有する化合物、その代謝物、およびその類似体を包含すると考えることができる。

【0019】

「ハプテン」は部分的な、または不完全な抗原である。それはタンパク質を含まない物質であり、たいてい低分子量の物質で、抗体形成を刺激することができないが抗体と反応する。抗体は、ハプテンを高分子量のキャリアと結合させ、その後この結合産物、すなわち免疫原をヒトまたは動物被験体に注射することにより形成される。エファビレンツはハ

50

プテンである。

【0020】

「誘導体」の用語は、1以上の化学反応により親化合物または分子から生成される化学物質または分子をいう。

【0021】

「活性化ハプテン」とは、結合基の結合等により、ハプテン誘導体コンジュゲートを合成するための反応に利用可能なサイトを付与されているハプテン誘導体をいう。

【0022】

本明細書において、「結合基」または「リンカー」とは、ハプテン、キャリア、免疫原、ラベル、トレーサーその他のリンカー等の2以上の基礎構造体をつなぐ化学構造体の一部分をいう。結合基は、基礎構造体間に伸びる、水素（または他の一価原子）以外の原子の少なくとも1の中断されていない連続鎖を有する。結合基の原子および結合基内の鎖の原子はそれ自体、化学結合により結合されている。リンカーは線状または分岐で、飽和または不飽和の炭素鎖であり得る。また、鎖内または該鎖の終端に1以上のヘテロ原子を含んでいてもよい。「ヘテロ原子」は、酸素、窒素および硫黄からなる群から選択される炭素以外の原子を意味する。結合基はまた、鎖の1部としてまたは鎖中の1つの原子上の置換基として環状または芳香族の基を含んでいてもよい。

10

【0023】

結合基またはリンカーにおける原子数は、水素以外の原子の数を数えることにより決定される。結合基内の鎖における原子数は、結合される基礎構造体間の最短ルートに沿って水素以外の原子数を数えることにより決定される。

20

【0024】

結合基を使用して、活性化、例えば、ハプテンとラベルまたはキャリアとのコンジュゲートを合成するためのハプテン上の利用可能なサイトを提供することができる。

【0025】

本明細書で用いる「免疫原」および「免疫原性」の用語は、生物中で免疫応答を誘発するかまたは生じ得る物質をいう。

【0026】

「活性エステル」は、例えば、ペプチドおよびタンパク質等の化合物の遊離アミノ基と反応し得るエステル基をいう。活性エステルの例としては、N-ヒドロキシスクシンイミド、p-ニトロフェニル、ペンタフルオロフェニル、およびN-ヒドロキシベンゾトリアゾリルがある。

30

【0027】

本明細書で用いる用語の「キャリア」または「免疫原性キャリア」は、ハプテンと結合し得、これによりハプテンが免疫応答を誘発し、抗原（ハプテン）と特異的に結合し得る抗体の産生を誘発することができる免疫原性物質、一般にタンパク質である。キャリア物質には、異物として認識されることにより宿主から免疫応答を誘発するタンパク質、糖タンパク質、複合多糖、粒子、および核酸が含まれる。

【0028】

種々のタンパク質のタイプを、ポリ（アミノ酸）免疫原性キャリアとして用いることができる。これらのタイプには、アルブミン、血清タンパク質、例えば、グロブリン、眼レンズタンパク質、リポタンパク質等が含まれる。実例となるタンパク質には、ウシ血清アルブミン（BSA）、キーホールリンベットヘモシアニン（KLH）、卵オバルブミン、ウシガンマグロブリン（BGG）等が含まれる。また、合成ポリ（アミノ酸）を利用し得る。

40

【0029】

免疫原性キャリアはまた多糖であり得、これは単糖の縮合が繰り返されることにより構築される高分子量ポリマーである。多糖の例としては、澱粉、グリコーゲン、セルロース、炭水化物ゴム、例えばアラビアゴム、寒天等がある。多糖はまた、ポリ（アミノ酸）残基および/または脂質残基を含むことが可能である。

【0030】

50

免疫原性キャリアはまた、ポリ(核酸)単独、または上記ポリ(アミノ酸)もしくは多糖の1つとコンジュゲートされたポリ(核酸)であり得る。

【0031】

免疫原性キャリアはまた粒子であり得る。該粒子は一般に、直径が少なくとも約0.02ミクロン(μm)で約100 μm 以下であり、通常約0.05から10 μm である。該粒子は有機または無機、膨潤可能または膨潤不可能、多孔性または非多孔性であり、場合によりほぼ水の密度、一般には約0.7~1.5g/mLであり、透明、部分的に透明または不透明であり得る物質からなる。該粒子は、細胞および微生物等の生物学的物質であり得、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、大腸菌、および、ウイルス等の非限定的な例を含む。該粒子はまた、有機および無機ポリマー、リポソーム、ラテックス、リン脂質小胞またはリポタンパク質からなり得る。

10

【0032】

「ポリ(アミノ酸)」または「ポリペプチド」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)は一般に、分子量が約2,000から、無限の分子量、通常10,000,000未満、普通は約600,000ダルトン以下の範囲にある。免疫原性キャリアまたは酵素が関与するかどうかにより通常異なる範囲となる。

【0033】

「ペプチド」は、アミド(ペプチド)結合による2以上のアミノ酸の結合により形成されるあらゆる化合物であり、通常、(NH_2 末端以外の)各アミノ酸残基の α -アミノ基が直鎖中の次の残基の β -カルボキシル基に結合している α -アミノ酸のポリマーである。「ペプチド」、「ポリペプチド」および「ポリ(アミノ酸)」の用語は、大きさに関して制限することなくこの種の化合物を意味するとして本明細書において同義的に用いられる。この種の中で最大のものはタンパク質と称される。

20

【0034】

「ラベル」、「検出分子」、または「トレーサー」は検出可能な信号を生じるかまたは生じるように誘起され得るいずれかの分子である。該ラベルは、分析物、免疫原、抗体または他の分子(例えばレセプター若しくはリガンド、特にハプテンのようにレセプターに結合し得る分子)にコンジュゲートし得る。ラベルの非限定的な例としては、放射性同位元素、酵素、酵素フラグメント、酵素基質、酵素阻害剤、補酵素、触媒、蛍光団、染料、化学発光物質(chemiluminescer)、発光物質(luminescer)、増感剤、非磁性もしくは磁性粒子、固体支持体、リポソーム、リガンド、レセプターまたはハプテン放射性同位元素がある。

30

【0035】

「生物学的サンプル」の用語には、生物または生物であったもの由来のある量の物質が含まれるが、これに制限されるわけではない。このような生物には、ヒト、マウス、サル、ネズミ、ウサギ、ウマその他の動物が含まれるが、これに制限されるわけではない。このような物質には、血液、血清、尿、涙、細胞、器官、組織、骨、骨髄、リンパ、リンパ節、滑液組織、軟骨細胞、滑液大食細胞、内皮細胞および皮膚が含まれるが、これに限定されるものではない。

【0036】

「患者」の用語には、ヒトと動物の被験体が含まれる。

40

【0037】

本発明は、エファビレンツの検出用のイムノアッセイに用いるための免疫原およびコンジュゲートの調製に有用なエファビレンツハプテン誘導体を提供する。

【0038】

本発明のエファビレンツ誘導体を免疫原性キャリア物質に結合させることにより、エファビレンツ検出のためのイムノアッセイ用の有用な試薬となる抗血清およびポリクローナル抗体ならびにモノクローナル抗体を製造し、単離することができる。

【0039】

該誘導体はまた、当技術分野で周知の方法により種々のラベルに結合させて、種々のイ

50

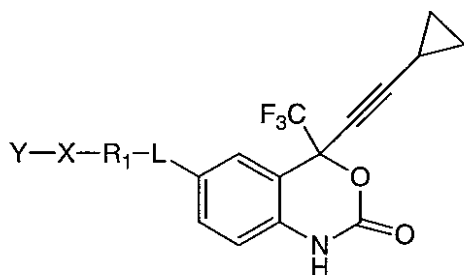
ムノアッセイフォーマットに有用な種々の試薬を提供することもできる。検出のためには3つの可能性があり、発色団（例えば、フルオレセイン）のような検出分子を結合したり、ハプテン自体を放射性標識したり、または化学発光基を結合したりすることができ、これら3つのいずれでもこの分子の検出に有用なトレーサーが生成する。ハプテンは、ラテックス凝集およびクロマトグラフィーストリップテストのような分光測光法または直接光学検出フォーマットに用いる着色ラテックスを始めとする微粒子に結合することができる。この結合した基は、エネルギー伝達相手、酵素または、更なる化学反応により検出される他の基等の間接的検出分子であってもよい。

【0040】

結合は、該ラベルまたはキャリアを結合させるいずれかの化学反応により実施することができる。この結合には、多くの化学的なメカニズム、例えば、共有結合、アフィニティ結合、挿入 (intercalation)、配位結合、および複合体形成が含まれ得る。ほとんどの場合、該結合は、共有結合を介して生成される。共有結合は、存在する側鎖と直接縮合するか、または外部の架橋分子を取り込むことによりなされ得る。多くの2価または多価結合剤はキャリア等のタンパク質分子を他の分子に結合する際に有用である。代表的な結合剤には、チオエステル、カルボジイミド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、ジイソシアネート、グルタルアルデヒド、ジアゾベンゼン、およびヘキサメチレンジアミン等の有機化合物が含まれる。このリストは、本技術分野で公知の種々の結合剤を網羅したものでなく、より一般的な結合剤の代表例である。(Killenら "J. Immunol. 133:1335-2549, 1984; Jansen, F. K., Immunological Reviews 62:185-216, 1982; および Hermanson, G., "Bioconjugate Techniques", Academic Press, 1995を参照のこと)

本発明は、下記構造を有する化合物を提供する。

【化6】



30

【0041】

式中、LはNHまたはOであり；R₁は、0-10個の炭素またはヘテロ原子を含む飽和または不飽和の、置換または無置換の、直鎖または分岐鎖であり；Xは0-2個の置換または無置換の芳香族環からなる結合基または0-10個の炭素またはヘテロ原子を含む脂肪族結合基であり；Yは活性化エステル、マレイミド基、チオール、またはNH-Z (Zはキャリアまたはラベル)である。

【0042】

本発明のエファビレンツ免疫原合成の主な特徴は、エファビレンツの芳香族環のフェノール又はアミノ基のアルキル化又はアシル化によるエファビレンツ類似体の調製である。該免疫原の全合成は、ベンゾオキサジノン環系の構築を必要とする。フェノール基を含有するエファビレンツ類似体の合成は、酸に鋭敏な保護基、特に2-メトキシエトキシメチル (MEM) エーテルを用いて、5-ヒドロキシ2-ニトロベンズアルデヒド(1)のフェノール基の保護から出発する。トリフルオロメチルトリメチルシランを用いるアルデヒドのフッ化セシウム触媒によるトリフルオロメチル化は文献にて公知である (J. Org. Chem. 64, 2873, 1999)。5-OMEM-2-ニトロベンズアルデヒド(2)のトリフルオロメチル化は、フッ化セシウムの存在下でのトリフルオロメチルトリメチルシラン存在下、20 ~ 30 の温度で行なうことができる。

【0043】

50

ニトロ基のアミノ基への還元は、文献において公知であり、本発明の属する技術分野における当業者が種々の反応条件下で行なうことができる。

【0044】

フッ化生成物(3)のニトロ基の還元は、水添条件下、好ましくは10%Pd-C、50psi下で行われ、脱シリル化されたアミノアルコール生成物(4)を得る。t-Boc基のような芳香族アミノ基の保護は、文献にて公知である("Protective Groups in Organic Synthesis", 2nd edition, T. Greene and P. Wuts, Wiley-Interscience, 1991を参照のこと)。アミノアルコール(4)は、炭酸ナトリウムの存在下、ジ-t-ブチルジカーボネートを用いてt-BOC基により保護されて、5となる。

【0045】

二級アルコールのケトンへの酸化は、種々の反応条件下、例えば、Swern酸化の条件下で、PCC、PDC、CrO₃、好ましくは塩化オキサリル/DMSOを用いて行なうことができる。例えば、実施例4においては、ジクロロメタン中、DMSOの存在下、-40 ~ -60 の温度で、化合物5を塩化オキサリルと反応させ、6を得た。カルボニル基への求核付加は、種々の反応条件下、例えばGrignard付加またはリチオ化された求核剤での付加で行なうことができる。エファビレンツ類似体(6)のトリフルオロメチルケトンに対するリチオ化シクロプロピルアセチリドの求核付加反応により、付加生成物(7)を得る。この付加生成物(7)を、溶媒、好ましくはトルエン存在下、還流条件下でn-ブチルリチウムと反応させることにより環化させるとベンゾオキサジノン環系となり、8を得ることができる。エファビレンツを調製するためのこのタイプの環化は、文献で公知である(Synthetic Communication 27, 4 20 373, 1997)。2-メトキシエトキシメチルエーテルの脱保護は、酸性条件下、好ましくはトリフルオロ酢酸を用いて行なうことができる。すなわち、実施例6では、トリフルオロ酢酸を用いてベンゾオキサジノン誘導体(8)のMEM基を脱保護し、9を得た。フェノール性水酸基のアルキル化反応は、塩基、例えば水素化ナトリウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸セシウム、好ましくは炭酸カリウム等の存在下、相間移動触媒を用いるかまたは用いずにアルキルハライドを用いて行なうことができる。例えば、実施例7においては、エファビレンツ類似体(9)のエチル-4-プロモブチレートによるアルキル化反応を、炭酸カリウムの存在下、50 ~ 150 の温度で、アセトン中、相間移動触媒である18-クラウン-6の存在下で行なうことで、10を得た。アルキルエステル基の脱保護は、穏やかな塩基性条件または酸性条件下、好ましくはアルコール水溶液下で水酸化リチウムを用いて、行なう 30 ことができる。

【0046】

例えば、実施例9においては、メタノール水溶液中、10を水酸化リチウムと反応させることにより加水分解されたカルボン酸生成物11を得た。この酸誘導体を活性エステルに変換した後タンパク質にコンジュゲートさせた。エファビレンツ類似体(9)のアルキル化反応は、保護されたアミンを有するハロアルキル鎖を用いても行うことができる(図3を参照)。アミンに対する保護基は、t-BOC(酸に対して不安定な保護基)またはフタルイミドまたはFMOC(塩基に対して不安定な基)であり得る。アルキル基リンカーは、適切に官能化されたエファビレンツ類似体とタンパク質またはペプチドとの間に追加のスペーサーを提供する目的を果たす。この段階でリンカー伸長を用いて、末端の活性化基、例えば活性エステル、イソシアネート、チオール、およびマレイミド等を生成することができる。例えば、ビスカルボン酸、例えばテレフタル酸等のホモ二官能性のN-ヒドロキシスクシンイミドエステル的一端とアミノ基含有エファビレンツ誘導体との反応により、安定なN-ヒドロキシスクシンイミドエステル末端リンカーアダクト(18)が生成する。このアダクトは、ポリペプチド、多糖、およびラベル上のアミンにコンジュゲートするのに有用である。リンカー伸長は、また、ヘテロ二官能性の試薬を用いて行なうこともでき、ポリペプチドおよびラベルのチオール基に後でコンジュゲートするためのマレイミド官能基(19)を得ることができる(図4および5を参照)。一方、アミノ末端リンカーを、ヘテロ二官能性のチオール化用試薬を用いて伸長し、一方の末端にアミド結合を、もう一方の末端に遊離または保護されたチオールを形成することができる。当技術分野で周知であるこのタイプのチオール化剤 40 50

のいくつかの例は、例えば2-イミノチオラン(2-IT)、スクシンイミジルアセチルチオプロピオネート(SATP)、およびスクシンイミド2-ピリジルジチオプロピオネート(SPDP)である。始めのチオール基は、マレイミド修飾された免疫原またはラベルと共にチオールエーテルを形成するために利用可能である。アミノ結合エファビレンツ誘導体との結合点で、ウレアまたはチオウレア結合を有するアシル化誘導体を形成させるための他のアプローチは、エファビレンツ誘導体のアミノ官能基を4-ニトロクロロホルメート、ホスゲン、またはチオホスゲンと反応させることである。これらの中間は、アミン(アミノデキストラン、タンパク質、またはペプチド由来の)と容易に反応して、ウレアまたはチオウレアを与える。他のホスゲン等価体、例えばカルボニルジイミダゾール(図6を参照)またはジスクシンイミジルカーボネート等も同様に反応するであろう。

10

【0047】

6-位のヒドロキシ誘導体(9)の他に、6-位がアミノ官能化されたエファビレンツ誘導体(23)を、文献の手法に準じて調製することができる(Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 9, 3221, 1991)。

【0048】

エファビレンツ類似体(23)のアミノ基での伸長は、図7に記載のように塩基の存在下で、アミノ基を、好ましくは無水コハク酸とアシル化反応させることにより行なうことができる。この酸誘導体は、ポリペプチドおよびタンパク質との結合に適切な活性エステル、好ましくはN-ヒドロキシスクシンイミドエステル(25)として官能化して化合物26を得ることができる。

20

【0049】

本発明の活性エステルは、例えば、化合物12,18および25であり、比較的低温で、水溶性溶媒と非水溶性溶媒の混合物中、求核剤、特に1級アミンと反応しやすい。免疫原性キャリアは、一般に、分子量が100kDを超えるポリペプチドまたは多糖である。好ましいキャリアは、例えば、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)およびウシサイログロブリン(BTG)である。活性化ハプテンとキャリア上のアミノ基との反応は一般に、水と水混和性有機溶媒(例えば、DMSO等)との緩衝混合液中、室温で、約6~約8のpHで行われる。

【実施例】

【0050】

下記の実施例は、本発明の特定の態様を単に例示するためのものであり、本発明の範囲または精神を制限するものとしてみなされるべきではない。

30

【0051】

実施例 1 5-(2-メトキシ-エトキシメトキシ)-2-ニトロ-ベンズアルデヒド(2)の合成

100mLのジクロロメタンおよび10mLの新たに蒸留したテトラヒドロフランに懸濁した5g(30mmol)の5-ヒドロキシ-2-ニトロベンズアルデヒド(1)の懸濁液を0 にまで冷却した。この懸濁液に6.25mL(57mmol)のN,N-ジイソプロピルエチルアミンを加え、得られた反応混合物を5分間攪拌した。この反応混合物に3.76mL(33mmol)の2-メトキシエトキシメチルクロライドを加え、10分間、0 で攪拌し、室温にまで温め、室温で、18時間攪拌した。反応混合物を減圧下で濃縮し、150mLの酢酸エチルを加えた。得られたオフホワイト色の沈殿物を濾別し、濾液を分液漏斗に移した。有機層を75mLの1N水酸化ナトリウム溶液、100mLの水、および75mLのブラインで洗浄した。有機層を無水炭酸カリウムで乾燥し、濾過し、濃縮して、7.4g(29mmol、97%)の2を得た[LC-MS; M+Na 278]。

40

【0052】

実施例 2 トリメチル-{2, 2, 2-トリフルオロ-1-[5-(2-メトキシ-エトキシメトキシ)-2-ニトロ-フェニル]-エトキシ}-シラン(3)の合成

2g(7.8mmol)の2の溶液に、5mLのアセトニトリル、次いで2mL(13.5mmol)のトリメチル(トリフルオロメチル)シランおよび20mg(0.13mmol)のフッ化セシウムを加えた。反応混合物を室温で、アルゴン下、10分間攪拌した。反応混合物はこの間に褐色に変化した。これを濃縮し、溶離液としてジクロロメタンを用いてシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィで精製して2.89g(7.3mmol、93%)の3を得た。

50

【0053】

実施例 3 [4-(2-メトキシ-エトキシメトキシ)-2-(2, 2, 2-トリフルオロ-1-ヒドロキシ-エチル)-フェニル]-カルバミン酸 tert-ブチルエステル(5)の合成

75mLのメタノールに溶解した3.9g(9.8mmol)の3の溶液を調製し、その中にアルゴンを約2分間泡立たせた。この溶液に280mgの10%Pd-Cと4滴の氷酢酸を加え、得られた混合物をPars装置中、50psiで、2時間、水素添加した。得られた混合物をCELITE(Celite Corp.)を介して濾過し、濾液を減圧下で濃縮した。生成物である1-[2-アミノ-5-(2-メトキシ-エトキシメトキシ)-フェニル]-2, 2, 2-トリフルオロ-エタノール(4)は、新たに精製することなく次の反応に用いた。

【0054】

4の全てに50mLの水、50mLのTHF、2.5g(23.5mmol)の炭酸ナトリウム、および2.5g(11.4mmol)のジ-t-ブチルジカーボネートを加えた。得られた反応混合物を、室温で、72時間攪拌し、揮発性溶媒を減圧下で除去した。得られた残渣に20mLの水を加え、水性混合液を5x40mLのジクロロメタンで抽出した。有機層を合わせ、乾燥し(Na₂SO₄)、濃縮した。残渣を、溶離液として2:1のヘキサン:酢酸エチルを用いてシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーにて精製し、1.18g(2.98mmol、2ステップで30%)の生成物(5)を淡褐色ガムとして得た[LC-MS; M+Na 418.1]。

【0055】

実施例 4 [4-(2-メトキシ-エトキシメトキシ)-2-(2, 2, 2-トリフルオロ-アセチル)-フェニル]-カルバミン酸 tert-ブチルエステル(6)の合成

20mLのジクロロメタンに溶解した410μL(4.6mmol)のオキサリルクロライド溶液を-40~-60にまで冷却し、650μL(9.1mmol)の無水DMSOをゆっくり反応物中に加えた。この溶液を-40~-60で、55分間攪拌し、1mLのジクロロメタンに溶解した450mg(1.1mmol)の5の溶液を加えた。反応混合物を-40から-60で、55分間攪拌し、1mL(7.1mmol)のトリエチルアミン、次いで20mLの水を添加した。得られた反応混合物を2時間攪拌し、有機成分を分離し、20mLの水で洗浄し、乾燥し(無水Na₂SO₄)、減圧下で濃縮した。残渣を、ジクロロメタンを用いたフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、400mg(1.0mmol、89%)の6を山吹色のオイルとして得た[LC-MS; M+K 432]。

【0056】

実施例 5 [2-(3-シクロプロピル-1-ヒドロキシ-1-トリフルオロメチル-プロパ-2-イニル)-4-(2-メトキシ-エトキシメトキシ)-フェニル]-カルバミン酸 tert-ブチルエステル(7)の合成

2mLの新たに蒸留したTHFに溶解した200μL(2.3mmol)のエチニル-シクロプロパン溶液を-40にまで冷却し、1mL(2.5mmol)のn-ブチルリチウム(2.5Mヘキサン溶液)をアルゴン雰囲気下に加えた。反応混合物を-40で10分間攪拌した。反応混合物に、4mLの新たに蒸留したTHFに溶解した400mg(1.0mmol)の6の溶液を加え、反応を-40で15分間攪拌した。反応混合物に、2mLのイソプロパノール、次いで20mLの飽和塩化アンモニウム溶液を-40で加えた。反応混合物を室温にまで温め、30mLのジクロロメタンを加えた。有機層を分離し、水層を3x30mLのジクロロメタンで抽出した。有機層を合わせ、乾燥(無水Na₂SO₄)し、減圧下で濃縮した。残渣を、20%の酢酸エチルのヘキサン溶液を用いてシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーで精製して280mg(0.61mmol、60%)の7を得た[LC-MS; M+Na 482.2]。

【0057】

実施例 6 4-シクロプロピルエチニル-6-(2-メトキシ-エトキシメトキシ)-4-トリフルオロメチル-1,4-ジヒドロ-ベンゾ[d][1,3]オキサジン-2-オン(8)の合成

1.2g(2.6mmol)の7に15mLのトルエンを加え、反応混合物を、アルゴン雰囲気下、0~-4にまで冷却した。反応混合物に、1.4mL(3.5mmol)のn-ブチルリチウム(2.5Mヘキサン溶液)を加え、得られた反応混合物を0~-4で10分間攪拌し、室温にまで温め、1時間還流した。反応混合物を濃縮した。次いで、20mLの水を加え、水層を4x20mLのジクロロメタンで抽出した。有機層を合わせ、乾燥し(Na₂SO₄)、濃縮した。残渣を、20%の酢酸エチ

10

20

30

40

50

ルのヘキサン溶液を用いてシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、965mg(2.5mmol、96%)の8を淡褐色オイルとして得た[LC-MS; M+H 386.1]。

【0058】

実施例 7 4-(4-シクロプロピルエチニル-6-ヒドロキシ-4-トリフルオロメチル-1,4-ジヒドロ-2H-ベンゾ[d][1,3]オキサジン-2-オン(9)の合成

150mg(0.39mmol)の8に2mLのトリフルオロ酢酸を加えた。混合物を室温で、2時間攪拌した。反応混合物を減圧下で濃縮し、残渣を、5%のメタノールのジクロロメタン溶液を用いて分取薄層クロマトグラフィー(2mmシリカゲルプレート、E.Merck)にて精製して、110mg(0.37mmol、96%)の9を無色のオイルとして得た[LC-MS; M+H 298.1]。

【0059】

実施例 8 4-(4-シクロプロピルエチニル-2-オキソ-4-トリフルオロメチル-1,4-ジヒドロ-2H-ベンゾ[d][1,3]オキサジン-6-イルオキシ)-酪酸エチルエステル(10)の合成

120mg(0.40mmol)の9に12mLの無水アセトン、120mg(0.86mmol)の無水炭酸カリウム、2mgの18-クラウン-6および40 μ L(0.28mmol)の4-プロモ酪酸エチルを加えた。反応混合物を56で、3時間攪拌し、減圧下で濃縮した。残渣に20mLの水、次いで1mLの1N HClを加えた。水層を4 x 20mLのジクロロメタンで抽出した。有機層を合わせ、乾燥(Na₂SO₄)し、減圧下で濃縮した。残渣を、1%のメタノールのジクロロメタン溶液を用いて分取薄層クロマトグラフィー(シリカゲル、2mm厚、E.Merck)にて精製して、45mg(0.11mmol、27%)の10を無色の濃厚なオイルとして得た[LC-MS; M+H 412.1]。

【0060】

実施例 9 4-(4-シクロプロピルエチニル-2-オキソ-4-トリフルオロメチル-1,4-ジヒドロ-2H-ベンゾ[d][1,3]オキサジン-6-イルオキシ)-酪酸(11)の合成

4mLの50%のメタノール水溶液に懸濁した45mg(0.11mmol)の10の懸濁液に、60mg(2.5mmol)の水酸化リチウムを加えた。反応混合物を室温で、1時間攪拌し、減圧下で濃縮した。残渣に20mLの水、次いで1mLの1N HClを加えた。反応混合物を4 x 30mLの酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせ、乾燥(Na₂SO₄)し、減圧下で濃縮した。残渣を、5%のメタノールのジクロロメタン溶液を用いて分取薄層クロマトグラフィー(シリカゲル、2mm厚、E.Merck)により精製して、35mg(0.091mmol、83%)の11を得た。

【0061】

実施例 10 4-(4-シクロプロピルエチニル-2-オキソ-4-トリフルオロメチル-1,4-ジヒドロ-2H-ベンゾ[d][1,3]オキサジン-6-イルオキシ)-酪酸 2,5-ジオキソ-ピロリジン-1-イルエステル(12)の合成

2mLの無水THFに溶解した35mg(0.091mmol)の酸11の溶液を0 にまで冷却し、30 μ L(0.15mmol)のN,N-ジイソプロピルエチルアミン、次いで40mg(1.28mmol)のO-(N-スクシンイミジル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレートを加えた。反応混合物を室温にまで温めた。反応混合物を減圧下で濃縮し、残渣を、移動相として0.1%のトリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルおよび水を用いてRP分取HPLCにより精製して、30mg(0.062mmol、68%)の12を白色粉末として得た[LC-MS; M+H 481.0]。

【0062】

実施例 11 エファビレンツ類似体活性化エステルを用いたKLH コンジュゲート(13)

4.5mlの50mMリン酸カリウム(pH7.5)に溶解した68mgのキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)溶液を氷浴中で冷却した。5mLのDMSOを溶液に滴下し、反応温度を室温以下に維持した。次いで、0.5mLのDMFに溶解した25mg(0.052mmol)の12の溶液を、タンパク質の溶液に滴下した。混合物を室温で、18時間攪拌した。得られたコンジュゲートを透析管(10,000MWカットオフ)に入れ、1Lの70%DMSOの50mMリン酸カリウム溶液(pH7.5、3回の交換、それぞれ少なくとも3時間)、1Lの50%DMSOの50mMリン酸カリウム溶液(少なくとも3時間)、1Lの30%DMSOの50mMリン酸カリウム溶液(少なくとも3時間)、1Lの10%DMSOの50mMリン酸カリウム溶液(少なくとも3時間)中、室温で透析し、次いで4 で50mMリン酸カリウム(pH7.5)を(各1Lを少なくとも6時間ごとに)6回交換した。BioRad Coomassie blue protein assay (Bradford, M., Anal. Biochem. 72, 248, 1976)を用いてタンパク質濃度を2.1mg/mLと決定

10

20

30

40

50

した。全部で20mLのコンジュゲートを得た。利用可能なリジン修飾の程度をTNBS法 (Habeb AFSA, Anal. Biochem.14, 328-34,1988)を用いて60%と決定した。

【0063】

実施例 12 エファピレンツ 類似体活性化エステルを用いたBSA コンジュゲート(14)

5mLの50mMリン酸カリウム (pH7.5)に溶解した475mgのウシ血清アルブミン (BSA)溶液を氷浴中で冷却した。この溶液に、7mLのDMSOを滴下し、反応混合物を室温以下に保持した。タンパク質の溶液に、1mLの無水DMFに溶解した10mg(0.020mmol)の12の溶液を滴下した。反応混合物を室温で、48時間攪拌した。得られたコンジュゲートを、透析管 (10,000MWカットオフ)に入れ、1Lの70%DMSOの50mMリン酸カリウム溶液 (pH7.5、それぞれ少なくとも3時間、3回の交換)、1Lの50%DMSOの50mMリン酸カリウム溶液 (少なくとも3時間)、1Lの30%
MSOの50mMリン酸カリウム溶液 (少なくとも3時間)、1Lの10%DMSOの50mMリン酸カリウム溶液 (少なくとも3時間)中、室温で透析し、次いで4 で、50mMリン酸カリウム (pH7.5) (各1L)で6回交換した。タンパク質濃度を、BioRad Coomassie blue protein assayを用いて、7.12mg/mLと決定した。全部で45mLのコンジュゲートを得た。

【0064】

実施例 13 N-(4-シクロプロピルエチニル-2-オキソ-4-トリフルオロメチル-1,4-ジヒドロ-2H-ベンゾ[d][1,3]オキサジン-6-イル)-スクシニアミド酸 (24)の合成

25mLの1,2ジクロロエタンに溶解した100mg(0.33mmol)の23の溶液に、50mg(0.5mmol)の無水コハク酸、0.50mL(0.35mmol)のトリエチルアミンおよび20mg(0.16mmol)の4-(ジメチルアミノ)ピリジンを加えた。反応混合物を1.5時間、還流加熱し、室温にまで冷却した。
有機層を5%塩化アンモニウム水溶液、水で洗浄し、乾燥し(Na₂SO₄)、濃縮して、酸24を得た。

【0065】

実施例 14 N-(4-シクロプロピルエチニル-2-オキソ-4-トリフルオロメチル-1,4-ジヒドロ-2H-ベンゾ[d][1,3]オキサジン-6-イル)-スクシニアミド酸 2,5-ジオキソ-ピロリジン-1-イル エステル(25)の合成

11を12に変換する実施例10に記載の手法に従い活性化エステル25を24から調製した。

【0066】

実施例 15 6-アミノ-4-シクロプロピルエチニル-4-トリフルオロメチル-1,4-ジヒドロ-ベンゾ[d][1,3]オキサジン-2-オン(23)の合成

アミノベンゾオキサジノン誘導体23は、Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 9, 3221-3224, 1999に記載の手法に従い調製することができる。

【0067】

実施例 16 エファピレンツに対するモノクローナル抗体の構築

16週齢の雌のBalb/cマウスをエファピレンツ-KLH免疫原(13)で免疫した。Freund's Complete Adjuvant中で乳化した100μgの免疫原の最初の免疫処置は腹膜内経路でなされた。免疫処置を約3週間の間隔で行った。Freund's Incomplete Adjuvant中で乳化した同一製剤からなる以下の免疫処置も全て腹腔内注射によって行った。合計4回の免疫処置を行った。

【0068】

融合

最後の免疫処置から4日後、マウスを頸椎脱臼で殺し、その脾臓を取り出した。保温した細胞培地中で、脾臓を2枚の無菌の曇りガラススライド間ですり合わせ処理した。遊離細胞を無菌の15ml遠心分離管に入れ、ラージフラグメントを1-2分間沈澱させた。浮遊細胞を異なる無菌の50ml遠心分離管にピペットで移し、計数用にサンプルを採取した。F0株(ATCC)の骨髓腫細胞を、脾細胞の5に対して1の割合で添加し、得られた混合物を遠心分離して、細胞をコンパクトなペレットに沈澱させた。融合は、骨髓腫細胞(リンパ球数の1/5)の添加、遠心分離による洗浄、無血清の温かいIscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM, Irvine Scientific)中での再懸濁、並びに再遠心分離を含む。得られたペレットを含む遠心分離管を軽くたたくことにより、細胞同士を離れさせてから、1mLの保温し

たPEG/DMSO溶液 (Sigma Chemicals) を穏やかに混合しながらゆっくりと添加した。細胞を1.5分間保温してから、予熱しておいた無血清IMDMを次の速度：1ml/分、2ml/分、4ml/分、10 ml/分で添加して、管に50 mlまで充填し、密封し、15分インキュベートした。細胞懸濁液を遠心分離し、上清をデカントし、10%ウシ胎児血清(Summit Biologicals)を含むIMDMを添加した。細胞を再度遠心分離し、完全クローニング培地中に再懸濁させた。これは、IMDM、10%FCS、10%Condimed H1 (Roche Molecular Systems)、4mMのグルタミン、50 μ Mの2-メルカプトエタノール、40 μ Mエタノールアミン、pen/strep抗生物質(全てSigma製)からなるものであった。細胞を4 x 10⁵リンパ球/mlの濃度で懸濁させ、滅菌した96-ウェルマイクロ培養プレートに100 μ L/ウェルで配分し、5%CO₂において37 °Cで24時間インキュベートした。翌日、100 μ LのHMT選択培地(クローニング培地 + 1:25 HMT補充物 (Sigma Chemicals製))を添加した。インキュベートしてから6日目に、低度の真空源に接続された無菌の8箇所マニフォールドを用いて、各ウェルから約150 μ Lの培地を抜き取った。次に、150 μ LのHT培地を添加した。これは、クローニング培地 + 1:50 HT補充物 (Sigma Chemicals製) からなる。プレートをインキュベーターに戻し、増殖の徴候について毎日検査した。増殖が十分であると判断された場合には、ELISAにより抗体産生についてウェルをスクリーニングした。

【0069】

ELISA スクリーニング

0.1M炭酸バッファー (pH9.5) 中、100 μ Lのエファビレンツ-BSAコンジュゲート(14)で、マイクロプレートを37 °Cで(加湿)1時間コーティングした。次に、プレートを空にし、Tris緩衝液、1%のゼラチン加水分解物、2%のスクロース、および0.17%のTWEEN(試薬は全てSigma Chemicals製であった)からなる後コーティング(post-coat)溶液を充填した。プレートを37 °Cで(加湿)さらに1時間インキュベートした後、0.1%TWEEN 20含有のリン酸緩衝食塩水で洗浄した。次に、0.15M Tris (pH 7.2~7.4) 中の2%スクロース溶液をプレートに簡単に充填した後、空にして、室温で空気乾燥させた。乾燥したら、乾燥剤ピロー袋(desiccant pillow)をいくつか含むジッパー付バッグにプレートをパックし、密封して、使用するまで4 °Cで保存した。

【0070】

増殖中のクローンを試験できると判断した場合には、ウェルから25 μ Lの上清を取り出し、96ウェルの可撓性プレートに移した。培地を各ウェルに添加して、培地サンプルの1:10希釈物を得た。コーティングされたマイクロプレート各ウェルに25 μ LのPBS-TWEENを添加し、PBS-TWEENに溶解した800ng/mlのキラルエファビレンツ溶液25 μ Lを、コーティングされた別のプレートのウェルに添加した。25 μ Lの希釈された培地サンプルを上記コーティングされた各プレートに移した。プレートを37 °Cで1時間インキュベート被覆した後、PBS-TWEENで洗浄した。次に、PBS-TWEENで希釈した100 μ Lのヤギ抗マウスIgG-HRPコンジュゲート (Zymed Labs) をウェルに充填してから、プレートをさらに1時間インキュベートした。次にプレートを再度洗浄し、100 μ LのK-Blue Substrate (Neogen Corp) を各ウェルに添加した。5~15分間発色させ、次いで100 μ Lの1N HClを添加して反応を停止した。マイクロプレートリーダーにより450nmで色を読み取り、コンピューターにより収集して分析した。選択基準は、PBS-TWEENを受けるエファビレンツ-BSAコンジュゲートコーティングされたウェルとの結合および遊離エファビレンツ薬剤を含むコーティングされたウェルとの結合の低下であった。

【0071】

下記の表は、融合プレートのスクリーニングから選択されたデータと限界希釈培養からのサブクローンを示す。

【表 1】

クローン	エファビレンツ-BSA	エファビレンツ-BSA+エファビレンツ
EFA-1	1.712	0.223
EFA-2	1.196	0.225
EFA-3	1.797	0.247
EFA-4	1.448	0.069
EFA-97	2.703	0.272
EFA-97.1	3.059	0.381

10

【0072】

選択されたクローンを、限界希釈により直ちにサブクローンし、準備され次第、同一の方法で再試験した。安定なサブクローンを増殖させ、液体窒素中で凍結し、使用済みの培地を用いて、以下の交差アッセイを用いて特異性を決定した。

20

【0073】

交差アッセイ

上澄みを段階的に希釈し、遊離薬剤との競合的阻害を省略する上記ELISAスクリーンにて再試験した。交差試験を行なうために最大ODから約50%低いODを与える希釈度を選択した。これは、選択した希釈度で、且つ、異なる薬剤の濃度を变化させて抗体との上記アッセイを繰り返すことからなる。図8はこのような測定結果を表している。

【0074】

標準的な薬剤である、エファビレンツとの結合の50%低下をもたらす薬剤濃度(ED_{50})を測定し、互いの薬剤の ED_{50} で割り、100倍することにより、モノクローナル抗体EFA97.1の交差値%からなる下記の表を算出した。

30

【表 2】

薬剤	交差値%
エファビレンツ (キラル)	100
3'-アジド-3'-デオキシチミジン	0
2', 3'-ジデヒドロ-3'-デオキシチミジン	0
ネビラピン	0
デラビラジン	0
ネルフィナビル	0
サキナビル	0
インディナビル	0
リトナビル	0
アンプレナビル	0
ロピナビル	0
アタザナビル	0

10

20

【0075】

エファビレンツ-KLH(ラセミ)での免疫処置から得られたこの抗体は、意外にも、臨床的に意義のあるキラルな薬剤形態に対して明確な特異性を示した。この抗体は、さらに、同時投与される他の一般的な薬剤、例えば、NNRTIのネビラピンおよびデラビラジン、NRTIの3'-アジド-3'-デオキシチミジンおよび2',3'-ジデヒドロ-3'-デオキシチミジン、およびPIのネルフィナビル、サキナビル、インディナビル、リトナビル、アンプレナビル、ロピナビル、およびアタザナビルとの交差値が1%未満であることを示した。

30

【0076】

マウスのハイブリドリーマ細胞系 EFA 97.1は、2004年2月14日、the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)に寄託され、ATCC 番号PTA-5820が割り当てられている。

【0077】

イムノアッセイによる薬剤定量化

モノクローナル抗体EFA-97.1を用いて、競合的阻害によりキラルエファビレンツを定量化するためのイムノアッセイを構築した。マイクロプレートウェルを、上記ELISAスクリーニング用に示したのと同様の条件下、0.1 μg/mlの濃度でテストコンジュゲート(14)を用いてコーティングした。キラルエファビレンツをPBS-T緩衝液で連続希釈して(9.5 μM(マイクロモル)から始め、キラルエファビレンツを同一の緩衝液で1:3希釈)したものを調製することにより標準曲線を作成した。コーティングされたマイクロプレート中のウェルに、連続希釈物の一定分量である25 μLを加えた。次に、特異性を測定するのに用いた濃度の2倍に予め希釈した25 μLの抗体を加えた。プレートを密閉し、37 °Cで1時間、インキュベートした。インキュベートした後、プレートウェルを4回、200 μLのPBS-T緩衝液で洗

40

50

浄し、1:5000に前希釈した50 μ Lのヤギ抗マウスIgG-HRP抗体を加えた。プレートを密閉し、1時間、インキュベーターに戻した。その後、ウェルをPBS-T緩衝液で洗浄した。当該アッセイの残りは、上記の通りに行なった。

【0078】

薬剤濃度に対する450nmでの光学密度の用量応答の結果は、曲線となり、この曲線により未知の試料の応答を比較することが可能で、そのためエファビレンツの濃度を決定することができる。図8は、当該アッセイの濃度範囲が、0.0004~0.1 μ Mであることを示している。この薬剤に対して、12.9 μ Mのピーク濃度を与えるため(Physician's Desk Reference)、約0.2 μ Lの血清サンプルの大きさは、この薬剤の臨床濃度のピーク範囲をカバーするのに十分であることを示している。図8は、競合的阻害イムノアッセイでの遊離エファビレンツによる応答を表すグラフである。

10

【図面の簡単な説明】

【0079】

【図1】図1は、エファビレンツの6-ヒドロキシ類似体である構造体9の合成法の略図である。

【図2】図2は、エファビレンツのKLHおよびBSAコンジュゲートである構造体13および14の合成法の略図である。

【図3】図3は、芳香族結合基を有するエファビレンツの活性化エステルの合成法の略図である。

【図4】図4は、マレイミドエファビレンツ誘導体を用いるタンパク質コンジュゲートの合成法の略図である。

20

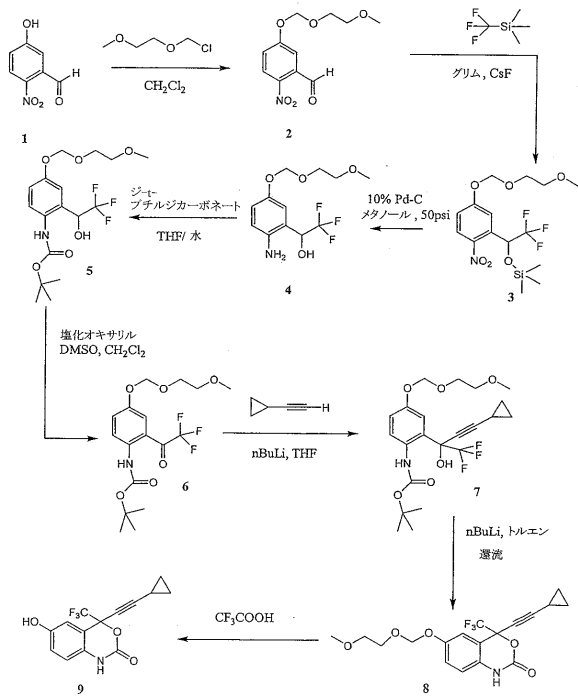
【図5】図5は、エファビレンツの2-イミノチオランKLHコンジュゲートの合成法の略図である。

【図6】図6は、エファビレンツのカルボニルジイミダゾール誘導体を用いるKLHコンジュゲートの合成法の略図である。

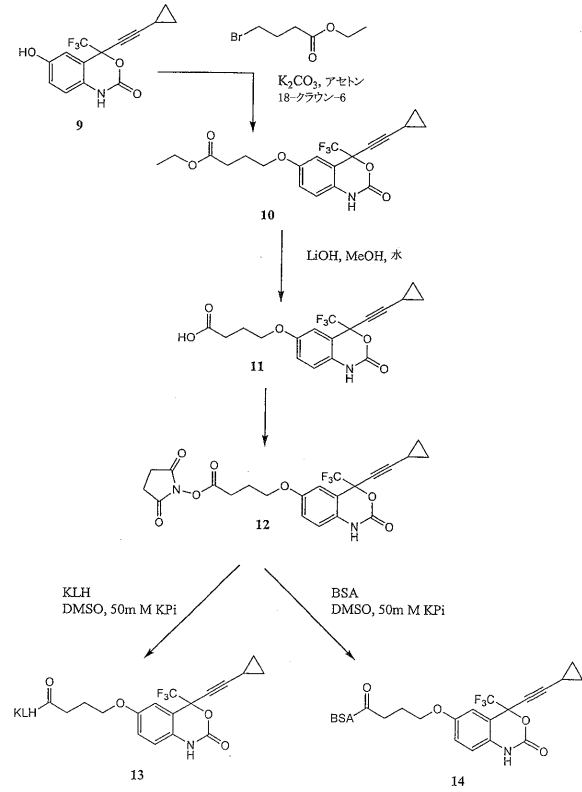
【図7】図7は、6-アミノエファビレンツを用いる別のタンパク質コンジュゲート合成法の略図である。

【図8】図8は、モノクローナル抗体EFA97.1を用いる競合的阻害イムノアッセイにおける遊離エファビレンツによる応答を表すグラフである。

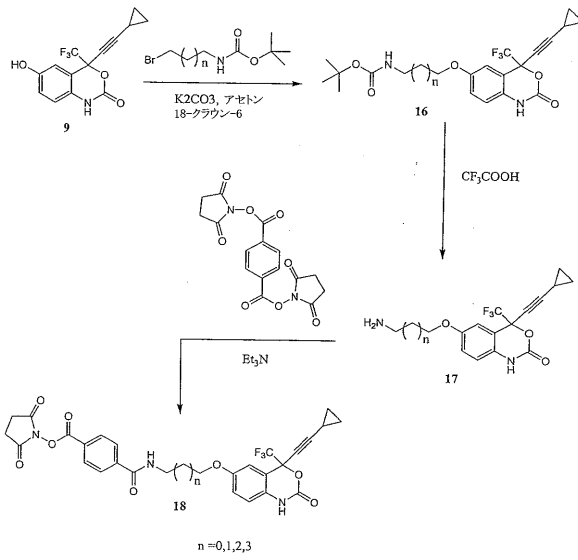
【 図 1 】



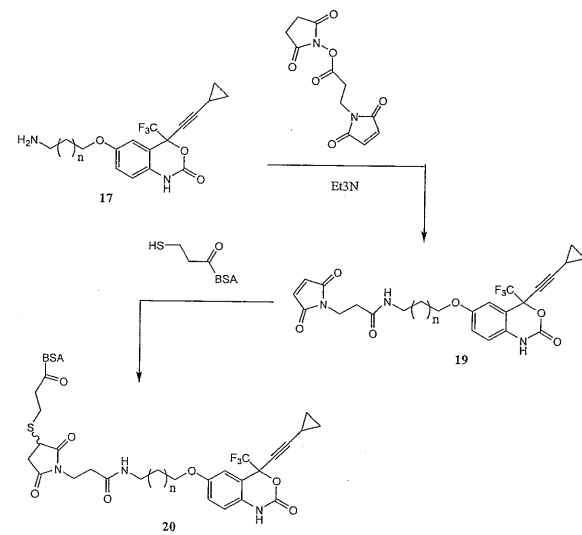
【 図 2 】



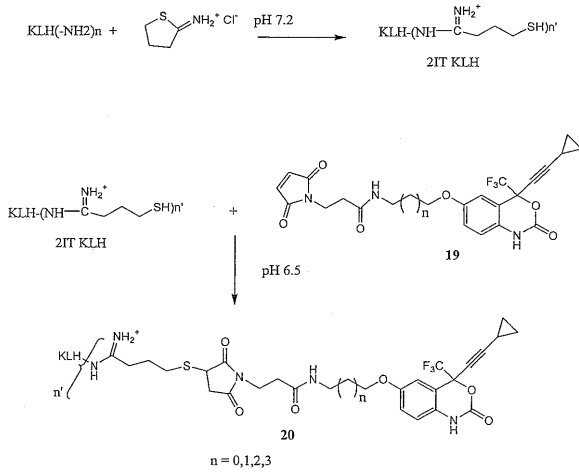
【 図 3 】



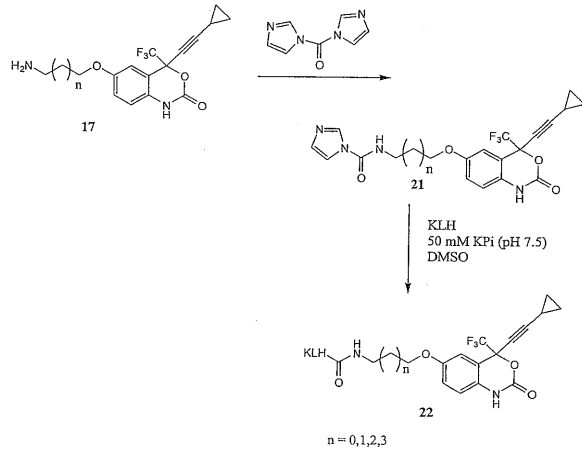
【 図 4 】



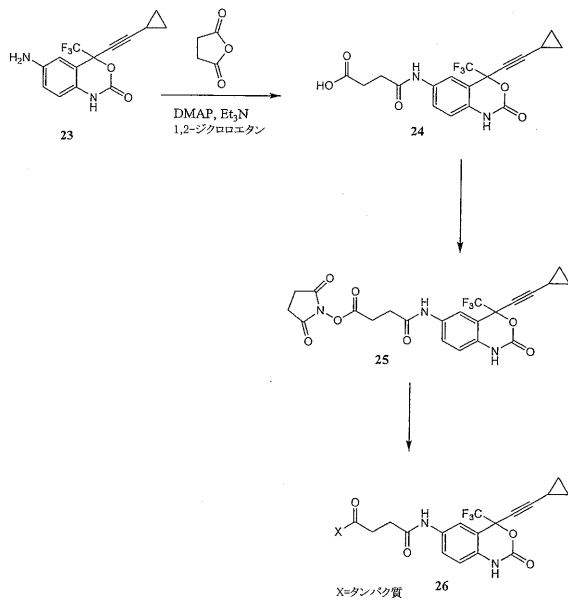
【 図 5 】



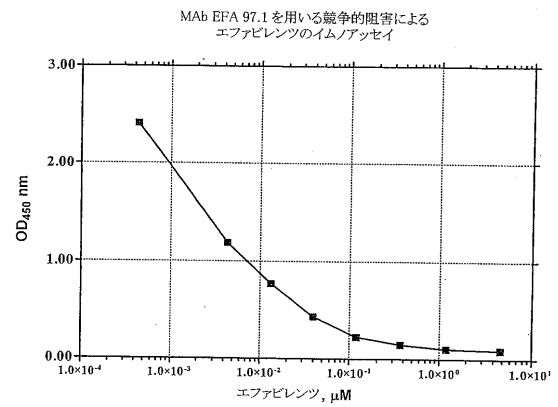
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【手続補正書】

【提出日】平成16年12月14日(2004.12.14)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

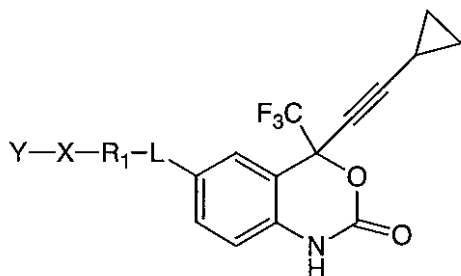
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記構造を有する化合物。

【化1】



式中、LはNHまたはOであり；

R₁は、0-10個の炭素またはヘテロ原子を含む飽和または不飽和の、置換または無置換の、直鎖または分岐鎖であり；

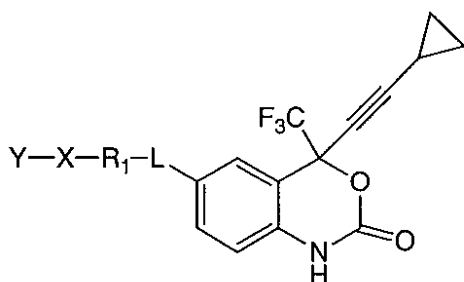
Xは、0-2個の置換もしくは無置換の芳香族環からなる結合基または0-10個の炭素もしくはヘテロ原子を含む脂肪族結合基であり；

Yは、活性エステル、マレイミド基、チオール、またはNH-Z(Zはキャリアまたはラベル)である。

【請求項2】

請求項1に記載の下記構造を有する化合物に反応して産生される抗体。

【化2】



式中、LはNHまたはOであり；

R₁は、0-10個の炭素またはヘテロ原子を含む飽和または不飽和の、置換または無置換の、直鎖または分岐鎖であり；

Xは、0-2個の置換もしくは無置換の芳香族環からなる結合基または0-10個の炭素もしくはヘテロ原子を含む脂肪族結合基であり；

Yは、NH-Z(Zはポリ(アミノ酸)、多糖、ポリ(核酸)、および粒子からなる群から選択されるキャリアである)である。

【請求項3】

ネルフィナビル、サキナビル、インディナビル、リトナビル、アンブレナビル、ロピナビール、およびアタザナビルからなる群から選択される1種以上のプロテアーゼ阻害剤との交差値が1%未満であることを特徴とする、エファビレンツに対して特異的なモノクローナル抗体。

【請求項4】

3'-アジド-3'-デオキシチミジンおよび2',3'-ジデヒドロ-3'-デオキシチミジンからなる群から選択される1種以上のヌクレオシド逆転写酵素阻害剤との交差値が1%未満であることを特徴とする、エファビレンツに対して特異的なモノクロナール抗体。

【請求項5】

ネビラピンおよびデラピラジンからなる群から選択される1種以上の非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤との交差値が1%未満であることを特徴とする、エファビレンツに対して特異的なモノクロナール抗体。

【請求項6】

エファビレンツに対して特異的なモノクロナール抗体を産生する、ATCC受託番号PTA-5820の細胞系EFA97.1。

【請求項7】

請求項6に記載のATCC受託番号PTA-5820の細胞系EFA97.1から産生される、エファビレンツに対して特異的なモノクロナール抗体。

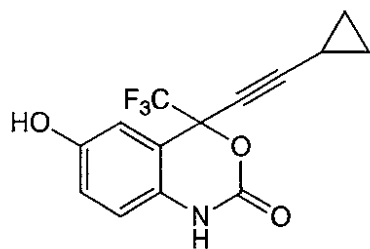
【請求項8】

エファビレンツに対して特異的であり、請求項6に記載のATCC受託番号PTA-5820である細胞系EFA97.1から産生される抗体の結合と等価な結合をするモノクロナール抗体。

【請求項9】

下記構造を有する6-ヒドロキシエファビレンツ類似体。

【化3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	
G 0 1 N 33/531	G 0 1 N 33/531	A

(72)発明者 ミタリ ゴーシャル
 アメリカ合衆国 4 6 0 6 0 インディアナ州, ノーブルズヴィル, パークショアー ドライブ
 1 0 1 5 3

(72)発明者 ジェラルド ジーグラ
 アメリカ合衆国 4 6 0 3 3 インディアナ州, カメル, アイアンウッド ドライブ 8 8 8

(72)発明者 アンロン オーヤン
 アメリカ合衆国 4 6 2 5 6 インディアナ州, インディアナポリス, ナンバー イー, ミーガン
 シーティー. 8 5 5 1

(72)発明者 リチャード ルート
 アメリカ合衆国 4 6 0 3 8 インディアナ州, フィッシャーズ, ヒッコリー ウッズ ドライブ
 7 4 8 4

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA20 CC24 DA13
 4B065 AA91 AB05 BA08 CA25 CA46
 4C056 AA02 AB01 AC02 AD03 AE03 AF01 AF04 AF05 AF06 DA03
 DA05 DB04 DC01
 4H045 AA11 DA76 EA50 FA72

【外国語明細書】

2005225864000001.pdf

专利名称(译)	用于检测依法韦仑的试剂		
公开(公告)号	JP2005225864A	公开(公告)日	2005-08-25
申请号	JP2004358924	申请日	2004-12-10
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	ミタリゴージャル ジェラルドジージャー アンロンオーヤン リチャードルート		
发明人	ミタリゴージャル ジェラルドジージャー アンロンオーヤン リチャードルート		
IPC分类号	A61K39/385 C07D265/18 C07K16/44 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/577		
CPC分类号	C07K16/44 A61K39/385 A61K2039/6081		
FI分类号	C07D265/18.CSP C07K16/44 G01N33/53.G G01N33/577.B C12N5/00.B C12P21/08 G01N33/531.A C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA91 4B065/AB05 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4C056/AA02 4C056/AB01 4C056/AC02 4C056/AD03 4C056/AE03 4C056/AF01 4C056/AF04 4C056/AF05 4C056/AF06 4C056/DA03 4C056/DA05 4C056/DB04 4C056/DC01 4H045/AA11 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72		
代理人(译)	荒井英一		
优先权	10/732767 2003-12-10 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

[问题] 需要一种简单且快速的分析方法来测量对HIV治疗有效的血浆依非韦仑水平，并且免疫测定技术非常适合这种分析应用。对依非韦仑具有高度特异性的抗体对于免疫测定技术至关重要，可提供依非韦仑的衍生物和制备依非韦仑的衍生物的方法。[解决方案] 衍生物包括产生针对依非韦仑的抗体和标记依非韦仑示踪剂的免疫原性化合物。这些化合物可用于测定依非韦仑的免疫测定中。[选择图]无

特開200

(P200

(43) 公開日 平成17年8月25日(

(51) Int. Cl. ⁷	FI	テーマコード (
C07D 265/18	C07D 265/18 CSP	4B064
C07K 16/44	C07K 16/44	4B065
C12N 5/10	G01N 33/53 G	4C056
G01N 33/53	G01N 33/577 B	4H045
G01N 33/577	C12N 5/00 B	

審査請求 有 請求項の数 9 OL 外国語出願 (全 24 頁) 最

(21) 出願番号	特願2004-358924 (P2004-358924)	(71) 出願人	591003013
(22) 出願日	平成16年12月10日 (2004.12.10)		エフ・ホフマンン-ラ ロシュ
(31) 優先権主張番号	10/732,767		F. HOFFMANN-LA
(32) 優先日	平成15年12月10日 (2003.12.10)		E AKTIENGESELLS
(33) 優先権主張国	米国 (US)		T
			スイス・シーエイチー4070ノ
			グレンツァーヘルストラッセ1;
		(74) 代理人	100091096
			弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100096183
			弁理士 石井 貞次
		(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 郎
		(74) 代理人	100122389