

(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2010-159263

(P2010-159263A)

(43) 公開日 平成22年7月22日(2010.7.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>CO7D 305/14</b> (2006.01)	CO7D 305/14 CSP	4CO48
<b>CO7K 16/00</b> (2006.01)	CO7K 16/00	4CO63
<b>CO7D 405/12</b> (2006.01)	CO7D 405/12	4HO45
<b>GO1N 33/53</b> (2006.01)	GO1N 33/53 S	

審査請求 有 請求項の数 5 O L (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2010-26554 (P2010-26554)	(71) 出願人	507028181 サラダックス バイオメディカル インコーポレイテッド アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 18015 ベスレヘム ジョーダン ホール リサーチ ドライブ 115
(22) 出願日	平成22年2月9日 (2010.2.9)	(74) 代理人	100082005 弁理士 熊倉 禎男
(62) 分割の表示	特願2007-523798 (P2007-523798) の分割	(74) 代理人	100084009 弁理士 小川 信夫
原出願日	平成17年7月28日 (2005.7.28)	(74) 代理人	100084663 弁理士 箱田 篤
(31) 優先権主張番号	60/592,017	(74) 代理人	100093300 弁理士 浅井 賢治
(32) 優先日	平成16年7月29日 (2004.7.29)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	11/044,667		
(32) 優先日	平成17年1月27日 (2005.1.27)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

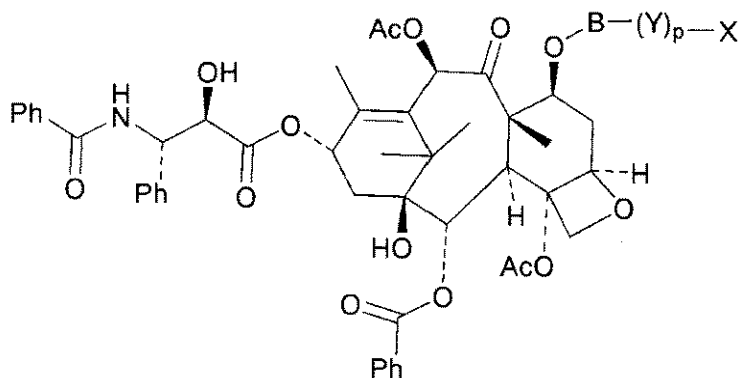
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タキソールの免疫学的検定用の化合物

(57) 【要約】

【課題】 免疫学的検定において生体液中のタキソールの定量及び追跡に有用な化合物、複合体及び免疫原を提供する。

【解決手段】 次式で示される化合物又は、キャリアー又は免疫原性ポリアミンポリマーとの結合体。



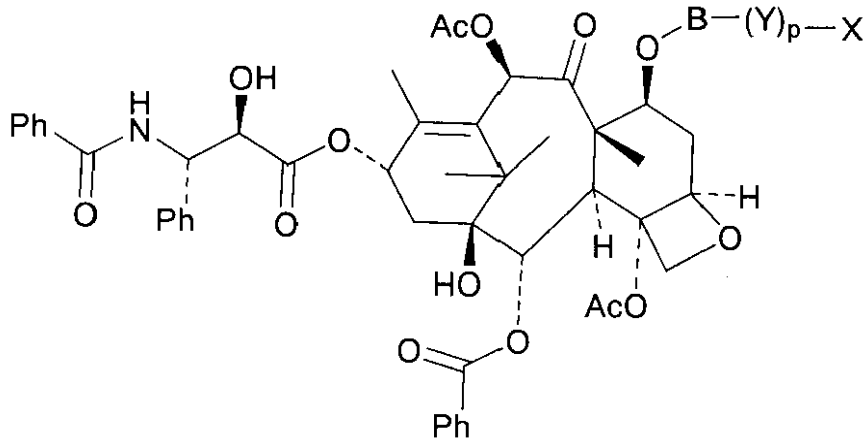
(式中、Phは、フェニルであり、pは、0乃至1の整数であり、Xは、ポリアミンポリマーと結合しうる末端官能基であり、Yは、有機スペーサ基であり、Bは、-CH<sub>2</sub>-又はCO-NH-CH<sub>2</sub>-である。)

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

下式で示される化合物。

## 【化 1】



10

**II-B**

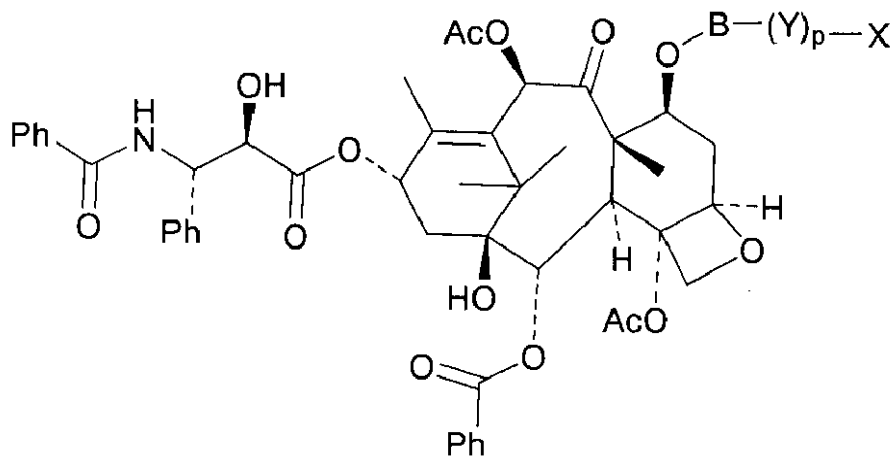
(式中、Phは、フェニルであり、  
pは、0乃至1の整数であり、  
Xは、ポリアミンポリマーと結合しうる末端官能基であり、  
Yは、有機スペーサ基であり、そして  
Bは、 $-CH_2-$ 又は $CO-NH-CH_2-$ である。)

20

## 【請求項 2】

キャリアーと、下式の化合物との複合体。

## 【化 2】



30

**II-B**

(式中、Ph、p、X、Y及びBは、請求項1に記載した通りである。)

## 【請求項 3】

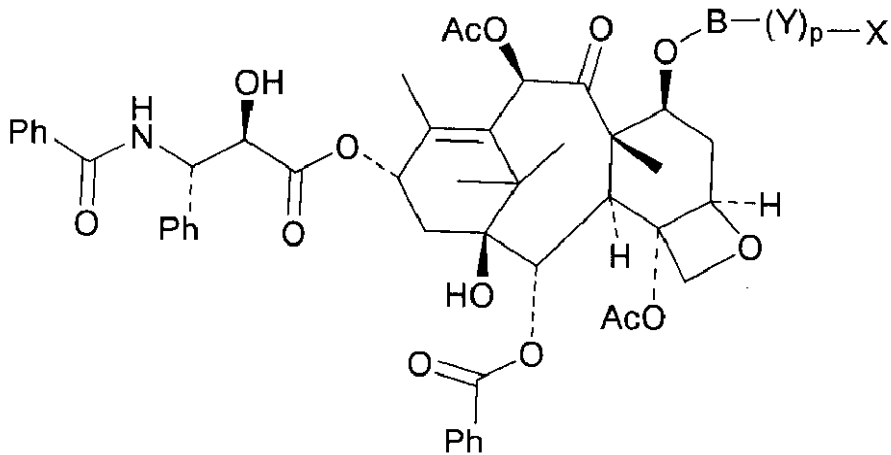
前記キャリアーが、 $-CO-$ 又は $-NH-C(=R_4)-$  ( $R_4$ は、酸素又は硫黄である。)により結合された1以上のアミノ基を含む請求項2記載の複合体。

40

## 【請求項 4】

下式の化合物に結合した免疫原性ポリアミンポリマーを含む免疫原。

【化3】



II-B

10

(式中、Ph、p、X、Y及びBは、請求項1に記載した通りである。)

【請求項5】

前記免疫原性ポリマーが、 $-CO-$ 又は $-NH-C(=R_4)-$ ( $R_4$ は、酸素又は硫黄である。)により結合された1以上のアミノ基を含む請求項4記載の免疫原。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は、化学療法中の最適薬物濃度を迅速に決定するための、ヒトの体液中におけるタキソールの存在の判定及び/又はその量の定量に関する免疫学的分析の分野に関する。

【背景技術】

【0002】

癌は、体の一部にある細胞が制御できなくなり始めるときに発現する一般的な特徴を共有する一群の悪性腫瘍を記載するのに使用される用語である。多くの癌は腫瘍の形をとるが、血液に現われたり、それらが成長するその他の組織を循環することもある。悪性腫瘍は、最も一般的には外科手術、化学療法、及び/又は放射線治療の組み合わせで治療される。特定の癌を治療するのに使用される治療の種類は、悪性腫瘍の種類及びそれが診断された段階を含む複数の因子に依存する。

30

【発明の概要】

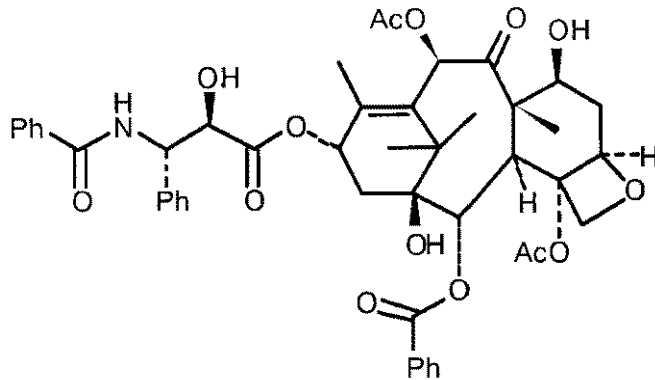
【発明が解決しようとする課題】

【0003】

パクリタキセルとしても知られているタキソールは、胸部(Holmes et. al. Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., 10, 60, 1991)、卵巣(Einzig et. al. Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 31, 1114, 1990)及び非小細胞肺癌の治療に使用される一般的な細胞毒性薬の一である。タキソールは下式を有する。

【0004】

## 【化1】



10

## 【0005】

この化合物は、骨髄密度損失、アレルギー反応、好中球減少症、低血圧症、徐脈、吐き気及び嘔吐のような衰弱させる副作用を伴う。体内のタキソールの量を追跡して投与量を調整することにより、これらの副作用を患者においてよりよく制御して制限しうる。

同時に、タキソールの投与量及びその結果得られる治療効果に影響を及ぼす血中薬物濃度との間には、しばしば極めて変わりやすい関係がある。タキソールの個体内及び個体間薬物動態学的変動度は5倍程度であり(Gurney et. al., J. Clin. Oncol. 14, pp 2590-2611, 1996)、以下の因子を含む多くの因子により影響を受ける。

20

## 【0006】

- ・臓器機能
- ・遺伝的調節
- ・病状
- ・年齢
- ・薬物-薬物相互作用
- ・薬物服用の時間
- ・薬物の投与方法
- ・技術関連投与

## 【0007】

この変動の結果、異なる個体において等量の同一の薬物を投与しても劇的に異なる臨床転帰となりうる(Hon et. al. Clinical Chemistry 44, pp 388-400, 1998)。同一タキソール投与量の効果は、患者における個々の薬物クリアランス及び極限血中濃度に基づいて有意に変化する。治療薬物管理では、経口的及び静脈内の両方の薬物投与において臨床医学者が患者の変化を洞察するであろう。治療薬物管理を用いると、薬物の投与量は個々の患者により調節でき、迷惑な副作用なしに癌を効果的に治療する可能性がずっと高いであろう。

30

## 【0008】

更に、タキソールの治療薬物管理は、化学療法における現実の所定の投与量の順守及び効果的な血中濃度の達成を確実にする優れた手段として役立つであろう。血中濃度の変動は、生理学的因子によるばかりでなく、投与技術の変化にもよることが見出された。

40

タキソールの定期的な治療薬物管理は、一般的な実験装置に適合する簡単な自動化試験の利用を必要とするであろう。これらの基準に最も適合する試験は免疫学的検定である。タキソールに関しては、放射免疫測定及び酵素免疫吸着測定法(ELISA)が報告されている(Erlanger et. al. US Patent 5,756,301, May 26, 1998)。しかしながら、この検定において使用される誘導体及び免疫原は、対応する抗体にタキソール、及びタキソール代謝産物、特に6-ヒドロキシパクリタキセルとの幅広い交差反応性を付与する。薬物濃度の追跡において最も効果的であるためには、抗体は活性化合物と最も特異性であり、不活性代謝産物に対して非常に低い交差反応性を示すか、まったく交差反応性を示すべきではない。

50

【課題を解決するための手段】

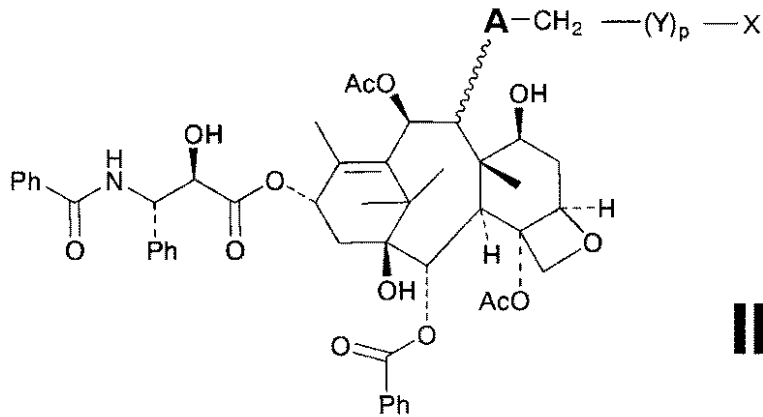
【0009】

本発明によれば、実質的に選択的にタキソールと反応性で、タキソール代謝産物、特に6'-'-ヒドロキシパクリタキセル及び3'-p-ヒドロキシパクリタキセルとの実質的な交差反応性なしに、タキソールと結合する新規種類の抗体が製造された。選択的に反応性とは、この抗体がタキソール分子と反応するだけで、タキソール代謝産物のようなその他の化合物とは実質的に反応しないことを意味し、最も重要な遮断代謝産物は6'-'-ヒドロキシパクリタキセル及び3'-p-ヒドロキシパクリタキセルである。

免疫原性ポリアミンポリマーと下式の化合物

【0010】

【化2】



II-A

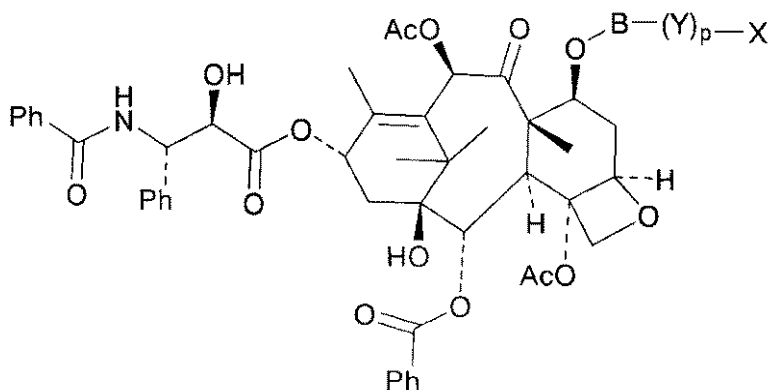
(式中、Aは、-NH-CO-又は=N-O-であり、  
Yは、有機スペーサ基であり、  
Xは、ポリアミンポリマーと結合しうる末端官能基であり、  
pは、0乃至1の整数であり、かつ  
Phは、フェニルである。)

【0011】

又は下式の化合物

【0012】

【化3】



II-B

(式中、Ph、p、Y及びXは、前述のとおりであり、Bは、-CH<sub>2</sub>-又は-CO-NH-CH<sub>2</sub>-である。)

【0013】

又はそれらの混合物との複合体である免疫原を用いることにより、タキソールとは特異性であるが、Baccatin III、3'-p-ヒドロキシパクリタキセル、及び6'-'-ヒドロキシパクリタキセルのようなタキソールの代謝産物又は関連化合物のようなその他の化合物とは実質的に反応しないか結合しない抗体が製造されることが見出された。実質的に選択的にタキソールと反応するが、6'-'-ヒドロキシパクリタキセル及び3'-p-ヒドロキシパクリタキセル

10

20

30

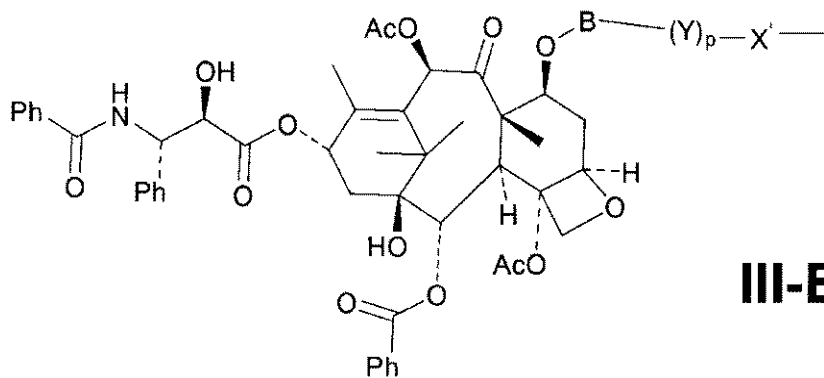
40

50



【 0 0 1 9 】

【 化 5 】



10

(式中、X'、A、B及びpは、前述のとおりである。)

【 0 0 2 0 】

を有するポリアミンポリマーリガンド部分に結合している。これらのリガンド部分は、キャリアー又は免疫原のポリアミンポリマー上の1以上の活性サイトに結合されていてもよい。

本明細書の至るところで以下の定義が理解されるべきである。

本明細書の至るところで使用されている“Ph”という用語は、フェニル基を意味する。“アルキレン”という用語は、1乃至10個の炭素原子を含む2価の飽和した直鎖状又は分岐状連鎖の炭化水素置換基を意味する。

“免疫原”及び“免疫原性の”という用語は、生物において免疫反応を誘発しうる、引き起こしうる、又は発生させうる物質を言及する。

“複合体”という用語は、2つの部分の結合により形成されるいずれかの物質を言及する。本発明による典型的な複合体には、式II-A及びII-Bの化合物のような小さな分子とキャリアー又はポリアミンポリマー、特にたんぱく質のような大きな分子との結合により形成されるものが含まれる。複合体においては、小さな分子は大きな分子上の1以上の活性サイトにおいて結合しうる。複合体という用語には、免疫原という用語も含まれる。

【 0 0 2 1 】

“ハプテン”とは、部分的又は不完全な抗原である。それらは、抗体の形成を刺激することはできないが抗体と反応する、たんぱく質を含まない、大部分は低分子量の物質である。抗体はハプテンを高分子量の免疫原性キャリアーと結合させることにより形成され、この結合させた生成物、すなわち免疫原をヒト又は動物の被検者に注射する。本発明のハプテンはタキソールである。

本明細書において使用されている“スペーサ基”又は“スペーサ”という用語は、ハプテン、キャリアー、免疫原、ラベル、又はトレーサのような2以上の部分構造物をCH<sub>2</sub>又は官能性結合基により結合する化学構造の部分而言及する。これらのスペーサ基は、本明細書において以下に列挙されよう。スペーサ基の原子及びスペーサ基内の連鎖の原子は化学結合により結合している。好ましいスペーサ基には、直鎖状又は分岐状の飽和又は不飽和炭素連鎖がある。これらの炭素連鎖はまた、連鎖内又は連鎖の末端に1以上のヘテロ原子を含みうる。“ヘテロ原子”とは、酸素、窒素及び硫黄からなる群から選択される炭素以外の原子を意味する。スペーサ基はまた、連鎖の一部として又は連鎖内の原子の一上の置換基として環状又は芳香族基を含みうる。

スペーサ基内の原子の数は、水素以外の原子を数えることにより判断される。スペーサ基内の連鎖内の原子数は、部分構造物が結合されている最短経路に沿って水素以外の原子の数を数えることにより判断される。官能性結合基は、ラベル又はキャリアー又はポリアミンポリマーとハプテンの複合体を合成するためにハプテン又はスペーサ基を活性化、例えばその上に利用できる官能性サイトを提供するのに使用されうる。

【 0 0 2 2 】

50

本明細書において使用されている“免疫原性キャリアー”という用語は、ハプテン、本発明の場合にはタキソール又は前述のようなタキソール誘導体と結合することによりこれらのハプテン誘導体に免疫反応を誘導して、これらのハプテンと特異的に結合しうる抗体の製造を誘発する免疫原性物質、一般的にはたんぱく質である。免疫原性キャリアー及び結合基は、本明細書において以下に列挙されよう。免疫原性キャリアー物質には、異物として認められ、それにより宿主からの免疫反応を誘発するたんぱく質、糖たんぱく質、複合ポリアミノ-多糖類、粒子、及び核酸が含まれる。ポリアミノ-多糖類は、この調製に関して公知である従来手段のいずれかを用いて多糖類から調製しうる。

#### 【0023】

ポリ(アミノ酸)免疫原性キャリアーとして種々のたんぱく質類も使用されうる。これらの種類には、アルブミン、血清たんぱく質、リポたんぱく質等が含まれる。典型的なたんぱく質には、ウシ血清アルブミン(BSA)、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、卵オボアルブミン、ウシサイログロブリン(BTG)等が含まれる。あるいは、合成ポリ(アミノ酸)が使用されうる。

免疫原性キャリアーには、単糖類の繰り返し縮合により形成された高分子量ポリマーであるポリアミノ-多糖類も含まれうる。多糖類の例は、でんぷん、グリコーゲン、セルロース、アラビアゴムのような炭水化物ガム、寒天等である。多糖類はまた、ポリアミノ酸残基及び/又は脂質残基を含む。

免疫原性キャリアーはまた、単独の又は前述のポリ(アミノ酸)又は多糖類の一方と結合したポリ(核酸)でもよい。

#### 【0024】

免疫原性キャリアーはまた固体粒子を含みうる。粒子は、一般的には直径が約0.02乃至約100µmであり、通常約0.05乃至10µmである。粒子は有機でも無機でも、膨潤性でも非膨潤性でも、多孔性でも非多孔性でもよく、好ましくはほぼ水と同じ密度、一般的には約0.7乃至1.5g/mLであり、透明、部分的透明、又は不透明の材料から構成されうる。粒子は、赤血球、白血球、リンパ球、ハイブリドーマ、連鎖球菌、黄色ブドウ球菌、大腸菌、及びウィルスのような非限定例を含む細胞及び微生物のような生体物質でもよい。粒子はまた、有機及び無機ポリマー、リポソーム、ラテックス、リン脂質小胞、又はリポたんぱく質から構成されてもよい。

#### 【0025】

“ポリ(アミノ酸)”又は“ポリペプチド”は、アミノ酸から形成されたポリアミドである。“ポリ(アミノ酸)”は、一般的には約2,000以上の上限のない分子量を有し、標準的には10,000,000未満、通常約600,000以下の原子質量単位である。通常、免疫原性キャリアー又は酵素が含まれているか否かに依存して、異なる範囲である。

“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たいずれかの化合物であり、通常、各アミノ酸残基(NH<sub>2</sub>末端以外)の -アミノ基が直鎖状連鎖における次の残基の -カルボキシル基に結合している -アミノ酸のポリマーである。ペプチド、ポリペプチド及びポリ(アミノ酸)という用語は、本明細書においては同義語として、大きさに関する限定なしにこの種の化合物を言及するのに使用される。この種の化合物の中で最も大きなものはたんぱく質と言及される。

#### 【0026】

“ラベル”、“検出分子”、又は“トレーサ”は、検出しうるシグナルを形成するか、又は形成するように誘導されうるいずれかの分子である。ラベルは、検体、免疫原、抗体、又は受容体又はリガンド、特にハプテンのような受容体に結合しうる分子のような別の分子に結合しうる。ラベルの非限定例には、放射性同位体、酵素、酵素フラグメント、酵素基質、酵素阻害剤、補酵素、触媒、蛍光プローブ、染料、化学発光体、発光体、又は感光薬、非磁性又は磁性粒子、固体支持体、リポソーム、リガンド、又は受容体が含まれる。

“抗体”という用語は、抗原の特異的なたんぱく質結合パートナーを言及し、他の物質を

10

20

30

40

50

排除して抗原に対して特異的な結合親和性を有するいずれかの物質又は物質群である。抗体という総称には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体及び抗体フラグメントが含まれる。

【0027】

“誘導体”という用語は、1以上の化学反応により親化合物から製造された化合物又は分子を言及する。

“キャリアー”という用語は、前述の免疫原性ポリマーのような固体粒子及び/又は高分子量ポリマーを言及する。キャリアーが固体粒子の場合には、固体粒子にポリアミンポリマーが巻きつけられているか、塗布されているか、又は結合して、式II-A及びII-Bの化合物内の末端官能基Xに結合する1以上の反応性サイトを提供してもよい。

10

【0028】

“試薬キット”、又は“試験キット”という用語は、検定を実施するのに使用される物質の集合体を言及する。試薬は、それらの交差反応性及び安定性に依存して、同一又は別々の容器に、液体又は凍結乾燥された形で充填された組み合わせで提供されうる。キットに提供される試薬の量及び性質は、特定の適用に最適の結果を提供するように選択される。本発明の特徴を具体化する試薬キットはタキソールに対して特異性の抗体を含む。キットは更に、検体のリガンド及び較正及び対照物質を含む。試薬は液体の形のままで凍結乾燥されてもよい。

【0029】

“較正及び対照物質”という語句は、既知の量の測定される薬物を含むいずれかの標準又は対照物質を言及する。薬物の濃度は、未知の試料に関して得られた結果を標準物質に関して得られた結果と比較することにより計算される。これは、通常較正曲線を作成することによりなされる。

20

“生体試料”という用語には、限定するわけではないが、いずれかの量の生物又は以前の生物からの物質が含まれる。そのような生物には、限定するわけではないが、ヒト、マウス、サル、ラット、ウサギ、ウマ、及びその他の動物が含まれる。そのような物質には、限定するわけではないが、血液、血清、血漿、尿、細胞、臓器、組織、骨、骨髄、リンパ液、リンパ節、滑膜組織、軟骨細胞、滑液マクロファージ、内皮細胞、及び皮膚が含まれる。

【0030】

免疫学的検定の構築においては、抗体上の結合サイトに関して試料中のタキソールと競合させるために、タキソールの複合体を構築する。本発明の免疫学的検定においては、試薬は、式III-Aの化合物の9-置換タキソール誘導体及び式III-Bの化合物の7-置換タキソール誘導体である。式III-A及びIII-Bの化合物においては、リンカー Spacer がこの分子の  $-CH_2-(Y)_p-X'$  -又は  $B-(Y)_p-X'$  部分を構成する。これらのリンカー  $X'$  及びSpacer  $-CH_2-(Y)_p$  -又は  $B-(Y)_p-X'$  は、複合体及び免疫原の調製において従来のとおりである。免疫学的検定のための複合体及び免疫原の調製に使用される従来Spacer-結合基はいずれも式III-A及びIII-Bの化合物に使用されうる。そのような従来リンカー及びSpacerは、米国特許第5,501,987号及び米国特許第5,101,015号に開示されている。

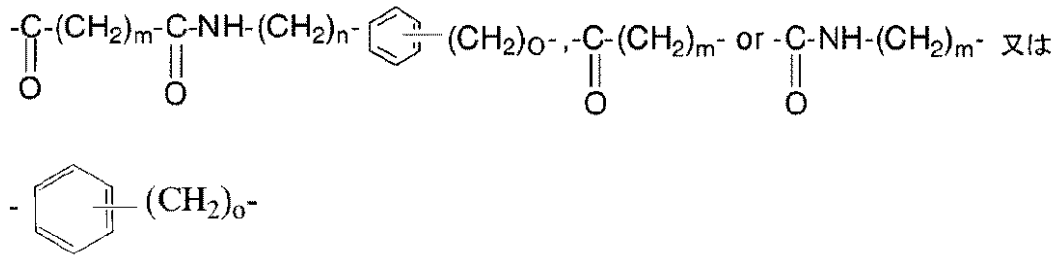
30

好ましいSpacer基には、前述のようなSpacer基が含まれる。特に好ましいSpacer基は1乃至10個の炭素原子を含むアルキレン基、

40

【0031】

## 【化6】



(式中、n及びoは0乃至6の整数であり、mは1乃至6の整数である)

10

## 【0032】

のような基であり、アルキレンが特に好ましいスペーサ基である。

式III-A及びIII-Bの化合物においては、X'は-CH<sub>2</sub>-又はスペーサを、好ましくは高分子キャリアー上のアミン基に結合する官能基である。基X'は、キャリアー又は免疫原のいずれかとして使用されるポリアミンポリマー中のアミノ基に結合しうる式II-A及びII-Bの化合物中の末端官能基Xから生じたものである。アミンと反応しうるいずれの末端官能基も、式II-A及びII-Bの化合物中の官能基Xとして使用しうる。好ましくはXに含まれるこれらの末端官能基は、-CO-OR<sub>3</sub>、-N=C=R<sub>4</sub>、又は-COH(式中、R<sub>3</sub>は水素であるか結合している酸素原子とともに反応性エステルと考えられ、R<sub>4</sub>は酸素又は硫黄である)である。基-N=C=R<sub>4</sub>はイソシアネート又はイソチオシアネートでもよい。OR<sub>3</sub>により形成される活性エステルには、N-ヒドロキシスクシンアミド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール及びp-ニトロフェニルエステルのようなイミドエステルが含まれる。しかしながら、アミン基と反応しうるいずれの活性エステルも使用されうる。

20

## 【0033】

カルボキシル基及び活性エステルは従来手段によりキャリアー又は免疫原性ポリマーと結合する。たんぱく質のようなポリアミンポリマー上のアミン基は、スペーサを本発明のポリマー、免疫原又はキャリアー及び/又は複合体に結合するアミド基を形成する。

本発明の免疫原及び複合体においては、カルボキシル基を含むタキソールハプテン及びキャリアー又は免疫原のポリアミンポリマー上のアミノ基との化学結合が当業者に公知の種々の方法により確立されうる。アミド結合の形成がしばしば好ましい。アミド結合は、まずカルボキシ基を脱離基試薬(例えば、N-ヒドロキシスクシンアミド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、及びp-ニトロフェノール等)と反応させることにより式II-A及びII-Bの化合物中のタキソールハプテンのカルボン酸部分を活性化することにより形成される。ジシクロヘキシルカルボジイミド及びジイソプロピルカルボジイミド等のような活性化試薬が使用されうる。次いで、式II-A又はII-Bのタキソールハプテン中のカルボキシル基の活性化された形を、たんぱく質キャリアーを含む緩衝溶液と反応させる。

30

## 【0034】

式II-A及びII-Bのタキソール誘導体が第一又は第二アミノ基並びにカルボキシル基を含む場合には、活性化及びカップリング反応中に複合体をそれ自体との反応から防ぐためにアミン保護基を用いる必要がある。典型的には、複合体上のアミンは対応するN-トリフルオロアセトアミド、N-tert-ブチロキシカルボニルウレタン(N-t-BOCウレタン)、N-カルボベンジルオキシウレタン又は同様な構造を形成することにより保護される。前述のようにして、免疫原性ポリマー又はキャリアーへのカップリング反応が完了したら、その他の点では免疫原又は複合体の構造を変えない試薬を用いてアミン保護基が除去されうる。そのような試薬及び方法は当業者には公知であり、それらには水性又は非水性の弱又は強酸、水性又は非水性の弱又は強塩基、ホウ化水素ナトリウム又はシアノホウ化水素ナトリウムのような含水素化物試薬及び接触水素化が含まれる。ハプテン及びキャリアーを結合する種々の方法はまた、参考として本明細書に導入されている米国特許第3,996,344号及び米国特許第4,016,146号に開示されている。

40

他方、Xが式II-A又はII-Bの化合物中の末端イソシアネート又はチオイソシアネート基

50

である場合には、ポリアミンポリマーの遊離アミンと反応するこれらの基は、X'がポリアミンキャリアー又は免疫原性ポリペプチド上のアミノ基と官能的に結合しているNH-CR<sub>4</sub>- (式中のR<sub>4</sub>は前述のとおりである)である式III-A又はIII-Bの複合体又は免疫原を形成する。

【0035】

式II-A又はII-Bの化合物中のXがアルデヒド基である場合には、これらの化合物は還元的アミン化によるアミン結合によりポリアミンポリペプチド又はキャリアーのアミン基に結合しうる。還元的アミン化によるようなアルデヒドとアミンの縮合の従来の方法がこの結合の形成に使用されうる。この場合には、式III-A及びIII-Bのリガンド部分中のX'は-C H<sub>2</sub>-である。

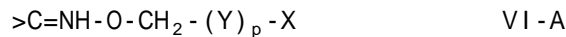
10

式Iの化合物のタキソール及びその9-ケト基は>C=Oで表され、>C=Oは9-ケト基を有するタキソールを表す。9-ケトタキソールは、タキソールと下式



のメトキシアミンとの反応によりAが=N-O-である式II-Aの化合物と結合して、下式の化合物を生成する。

【0036】



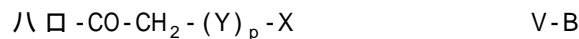
(式中、p、Y及びXは、前述のとおりである)

式Iの化合物は、米国特許第4,039,385号に開示されているような式VI-Aのオキシルアミンを形成するためのメトキシアミンとカルボニル基とを縮合する従来的手段により、その9-オキシ基において式V-Aのメトキシアミンと反応して式VI-Aの化合物を形成する。式V-Aの化合物がいずれかの反応性アミノ又はその他の官能性置換基を含む場合には、これらの置換基は、タキソールと式V-Aの化合物との反応のまえに従来の保護基と反応させうる。式VI-Aの化合物が生成した後、これらの保護基は、式VI-Aの化合物中のオキシルアミン結合を保持しつつそのような保護基を除去する当業者に公知の手順により除去されうる。

20

【0037】

Aが-NH-CO-である式II-Aの化合物は、まずタキソールの9-オキシ基を9-アミノ基に変換し、次いでこの9-アミノタキソールを下式の酸ハロゲン化物と縮合させることにより調製しうる。



30

(式中、Y、p及びXは前述のとおりである)

タキソールの9-オキシ基は、塩化アンモニウム及びシアノホウ化水素ナトリウムのような還元剤を用いる還元的アミノ化により9-アミノ基に変換されうる。

タキソールの9-オキシ基のアミン基への変換には、還元的アミノ化において伝統的ないずれの条件も使用されうる。9-アミノタキソールは縮合により酸ハロゲン化物と反応してAが-NH-CO-である式II-Aのアミドを形成する。この縮合の実施には、アミドを形成するための酸ハロゲン化物とアミンとを縮合させるいずれの方法も使用されうる。

Bが-CH<sub>2</sub>-である式II-Bの7-置換化合物は、タキソールの7-ヒドロキシ基を下式のハロゲン化物と反応させることにより形成される。



40

(式中、p、Y及びXは前述のとおりである)

【0038】

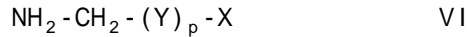
タキソールからの式II-Bの化合物の形成においては、アルコールを反応させてエーテルを形成するいずれかの従来的手段が、式V-Cの化合物とタキソールの7-ヒドロキシ位との縮合に使用されうる。式V-Cの化合物におけるハロゲン化物の使用は、アルコールとの縮合によるそのようなエーテルの形成に有効な手段を提供する。他方、式V-Cの化合物が、式II-Bの化合物を形成するこの反応を妨げうる官能基を含む場合には、これらの官能基は、前述のようにこの反応後に除去されうる適する保護基により保護されうる。

【0039】

Bが-CO-NH-CH<sub>2</sub>-である式II-Bの7-置換化合物は、タキソールの7-ヒドロキシ基を下式の

50

アミノ化合物と反応させることにより形成される。



(式中、X、Y及びpは前述のとおりである)

まずタキソールの7-ヒドロキシ基をクロロ蟻酸基-O-CO-Clに変換する。ヒドロキシ基をクロロ蟻酸基に変換するいずれの従来的手段も使用されうる。クロロ蟻酸エステルの形成後、クロロ蟻酸エステルのハロ基を式VIの化合物のアミン基と縮合させる。この反応のまえに、タキソール及び/又は式VIの化合物上の反応性基は、前述のように従来 of 保護基で保護される。これらの保護基はこのハロゲン化物の縮合後前述のような従来的手段により除去されうる。

【0040】

10

式II-A及びII-Bの化合物は、これらの化合物をポリアミン又はポリペプチドと反応させることにより本発明の免疫原及び/又は複合体試薬に変換されうる。ポリアミン又はポリペプチドが免疫学的に活性であれば、同一のポリペプチドが本発明の免疫原中のキャリアー及び免疫原性ポリマーとして使用されうる。しかしながら、複合体の形成には、これらのポリマーは免疫原に必要な免疫反応を発現する必要はない。本発明によれば、式II-A及びII-Bの化合物においてXにより表される種々の官能基は、官能基をポリマー内に含まれるアミン基に結合させる従来的手段によりポリマー物質に複合させうる。好ましい実施態様によれば、式II-A及びII-Bの化合物において、Xはカルボン酸基である。

抗体

【0041】

20

本発明はまた、前述の免疫原を用いることにより製造されるタキソールに対するモノクローナル抗体を含む新規抗体に関する。本発明によれば、本発明に従って製造されたこれらの抗体は選択的にタキソールと反応性で、先行技術の抗体と異なり、タキソールの免疫学的検定を妨げる代謝産物とは反応しない。これらのタキソール代謝産物のうち最も問題があるのは、6'-ヒドロキシパクリタキセル及び3'-p-ヒドロキシパクリタキセルである。本発明の抗体がこれらの6'-ヒドロキシパクリタキセル及び3'-p-ヒドロキシパクリタキセル代謝産物とは反応しない能力が、タキソールの免疫学的検定の提供においてこれらの抗体を特に価値あるものにする。

【0042】

30

本発明は新規抗体及びタキソールに対するモノクローナル抗体に関する。本発明の抗血清は、本発明の免疫原で宿主動物に免疫性をあたえることにより便宜的に製造されうる。適する宿主動物には、例えば、マウス、ラット、ウサギ、モルモット等のようなげっ歯動物、又はヤギ、ヒツジ、ウマ等の高等動物が含まれる。初回の投与、採血及び追加抗原注射は、動物における免疫反応を誘発するための許容される実験記録にしたがってなされる。例えば、好ましい実施態様においては、マウスは100 µg免疫原/マウスの腹腔内初期投与及びその後の2回以上の6ヶ月にわたる50~100 µg免疫原/マウスの追加抗原注射を受けた。定期的な採血により、免疫性を与えられたマウスの血液試料について、従来 of 免疫学的検定を用いたタキソール結合に対する免疫反応の展開を観察した。これらの方法は、所望の活性を有する抗血清を提供する宿主を選別する便宜的な方法を提供する。抗体もまた、タキソールの主要な代謝物質に対して選別され、これらの化合物と実質的に結合していないことが示された。

40

【0043】

モノクローナル抗体は、前述のスケジュールにしたがってBalb/cマウスに免疫性を与えた後、細胞融合の4日前に始めて連続して3日間、マウスに100 µgの免疫原を腹腔内又は静脈内に注射することにより便宜的に製造される。抗体の技術に関して公知であるその他の実験記録ももちろん同様に使用しうる。本明細書において詳述される完全な免疫実験記録は、タキソールに対する抗体の血清抗体反応の最適実験記録を提供した。

宿主の脾臓、末梢血、リンパ節又はその他の組織から得られるBリンパ球は、細胞を形成するモノクローナル抗体として使用されうる。脾臓から得られるBリンパ球が最も好ましい。

50

## 【0044】

本発明の所望のモノクローナル抗体を産生しうるハイブリドーマは、そのようなBリンパ球と、ハイブリッド細胞に長期間の組織培養安定性を付与する細胞株である死なない細胞株との融合により得られる。本発明の好ましい実施態様においては、死なない細胞はリンパ芽球様細胞又は骨髓腫細胞のような形質細胞種細胞、細胞ばかりでなく悪性種を産生する抗体自身でもよい。タキソールモノクローナル抗体を産生するマウスハイブリドーマは、マウスの骨髓腫細胞及びタキソール-たんぱく質複合体に対して免疫が付与されたマウスの脾臓細胞との融合により形成される。キメラ及びヒト化モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞からの遺伝子を示す抗体のクローンを作成し、マウスの種々の領域のサブシークエンスをヒトの一定領域に結合するか又はヒトのフレームワーク領域とドナーのマウス又はラットの免疫グロブリンからの相補性決定領域とを結合するための当業者に公知の遺伝子組み換え法を用いることにより製造しうる。親和性の強められた抗体を提供するマウスのモノクローナル抗体のヒト化を実施する改良方法は、国際特許願第WO 92/11018号に説明されている。

10

## 【0045】

1種以上の免疫グロブリン活性を有する一次抗体構造の一部のみを含むポリペプチドフラグメントが製造されうる。これらのポリペプチドフラグメントは、当業者に公知の方法によるそのままの抗体のたんぱく分解的切断により、又はFabフラグメント又は(Fab')<sub>2</sub>フラグメントを形成する部位特異的突然変異誘発を用いる抗体遺伝子を含む発現ベクターの所望の位置における挿入終止コドンにより製造されうる。単一連鎖の抗体は、VL及びVH領域をDNAリンカーと結合することにより製造されうる(Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 85: 5879-5883 (1988)及びBird et al., Science, 242: 423-426 (1988)を参照されたい)。

20

本発明の抗体は、前述の代謝産物のようなタキソールの代謝産物との交差反応性を実質的に有することなくタキソール選択性である。実質的に交差反応性を示さないことにより、本発明の抗体は、タキソールと比較してこれらの代謝産物との交差反応性が10%未満であることを意味する。本発明の抗体は、ドセタキセルのようなその他のタキソール様化合物と反応性でもよい。

免疫学的検定

## 【0046】

本発明によれば、式II-A及びII-Bの化合物又はこれらの混合物の免疫原から産生された複合体及び抗体が患者試料中のタキソールを測定するための試薬として使用されうる。この測定は、免疫学的検定により実施されうる。患者試料中のタキソールの存在の測定には、式II-A及びII-Bの化合物から形成される試薬複合体が本発明に従って産生された抗体上の結合サイトに関して試料中のタキソールと競合する免疫学的検定のいずれかを使用しうる。そのようなタキソールを含むことが疑われる試料中のタキソールの検定を実施する方法は、(a)水性媒体試料、(b)本発明に従って産生されたタキソールに対する抗体及び(c)式II-A又はII-Bの化合物又はこれらの混合物から形成された複合体の組み合わせを含む。試料中のタキソールの量は、試料及び抗体の混合物に添加された既知の量の複合体の特異性抗体への結合の障害を測定することにより測定されうる。未知の試料による既知の量の複合体のそのような結合の障害の結果を、タキソールの既知の標準溶液を用いた同一の検定において得られた結果と比較する。未知の試料におけるタキソールの量の決定においては、試料、式II-A及びII-Bの化合物から形成された複合体及び抗体をいずれの順序で添加してもよい。

30

40

抗体に結合した式II-A及びII-Bの化合物から形成された複合体の量の測定には、種々の方法を使用しうる。その一においては、複合体と抗体の結合が蛍光プローブ複合体の回転率の低下を引き起こす。液体混合物中の蛍光プローブ複合体の回転率の低下量は、米国特許第4,269,511号及び米国特許第4,420,568号に開示されているような蛍光偏光技術により検出されうる。

## 【0047】

50

他方、抗体は、ナノ粒子が式II-A及びII-Bの化合物から形成されたタキソール複合体と反応するときこれらの粒子が凝集体を形成するように、ナノ粒子上に塗布されるか吸着されてもよい。しかしながら、抗体が塗布されているか吸着されているナノ粒子が試料中のタキソールと反応すると、これらのナノ粒子に結合している試料からのタキソールは抗体ナノ粒子の凝集を引き起こさない。凝集量は吸光度により検定混合物において測定される。

他方、これらの検定は、マイクロタイタープレートのような固体支持体又は固体粒子を含むいずれかのその他の従来の固体支持体に結合した抗体又はタキソール複合体のいずれかを用いることにより実施しうる。抗体及びたんぱく質のそのような固体粒子への結合は当業者には公知である。そのような結合の実施にはいずれかの従来の方法が使用されうる。多くの場合には、測定を助けるために、抗体と結合している又は結合していない式II-A及びII-Bの化合物から形成された複合体の量の検出における援助として、抗体、複合体又は固体粒子上に、放射性ラベル又は酵素ラベルのようなラベルをつけうる。その他の適するラベルには、発色団、蛍光プローブ等が含まれる。

#### 【0048】

便宜上、本発明の検定成分は、キット、すなわちタキソールの検定に使用される所定量の新規試薬の組み合わせで提供される。これらの試薬には、本発明の抗体、並びに、式II-A及びII-Bの化合物又はそれらの混合物から形成された複合体が含まれる。所与の免疫学的検定においては、式II-Aの化合物から形成された複合体が使用される場合には、抗体は式II-Aの化合物から形成された免疫原により産生されることが一般的には好ましい。同様に、式II-Bの化合物から形成された複合体が使用される場合には、抗体は式II-Bの化合物から形成された免疫原により産生される。しかしながら、このことはそうである必要はなく、所与の検定における抗体及び複合体はこれらの複合体及び免疫原の一方又は両方から誘導されうる。

これらの必須の試薬のほかに、補助試薬のような添加剤、例えば、安定剤、緩衝剤等が含まれうる。種々の試薬の相対量は、検定の感度を実質的に最適にする試薬の溶液内濃度を提供するために幅広く変化しうる。試薬は溶液状態又は乾燥粒子として、通常、溶解時に検定を実施するのに適する濃度を有する試薬溶液を提供する賦形剤を含む凍結乾燥粒子として提供されうる。

#### 実施例

#### 【0049】

実施例において、Phはフェニルを表す。実施例において、以下の略語は以下のものを示すのに使用される。

THF テトラヒドロフラン

EA エチルアルコール

EtOAc 酢酸エチル

DCM ジクロロメタン

DMAP ジメチルアミノピリジン

NHS N-ヒドロキシスクシンイミド

EDC 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

TLC 薄層クロマトグラフィー

ANS 8-アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸

i.p. 腹腔内

HRP ホースラディッシュペルオキシダーゼ

TMB 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン

TRIS トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩酸塩

BSA ウシ血清アルブミン

BTG ウシサイログロブリン

PBS リン酸緩衝生理食塩水

di 脱イオン水

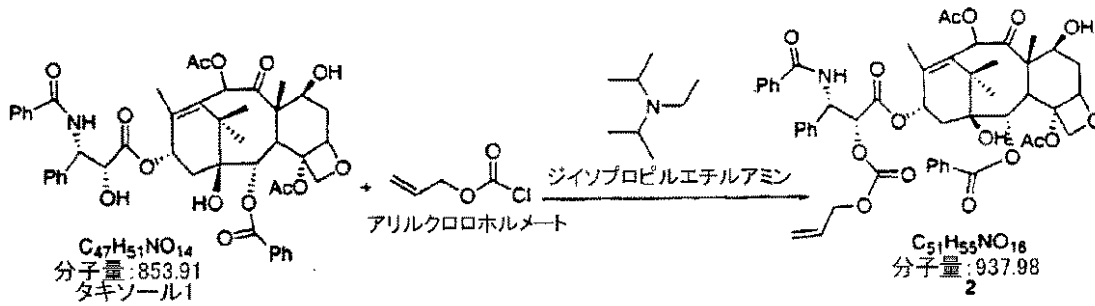
【 0 0 5 0 】

実施例において、スキーム 1 及びスキーム 2 は、調製され、実施例における番号により言及される特定化合物を以下に説明する。スキームは以下のとおりである。

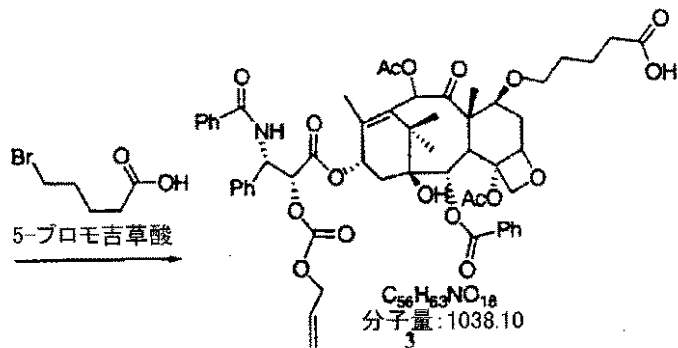
【 0 0 5 1 】

【 化 7 】

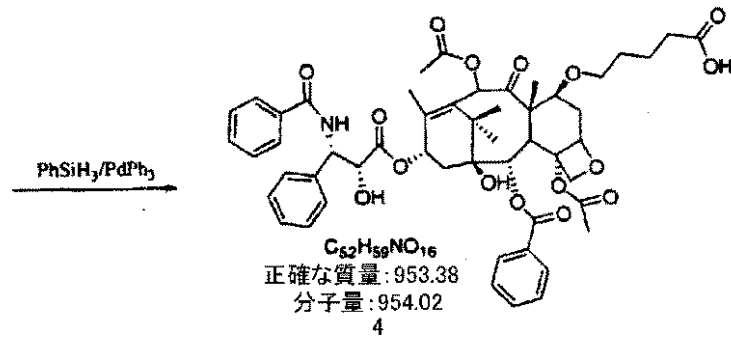
スキーム1



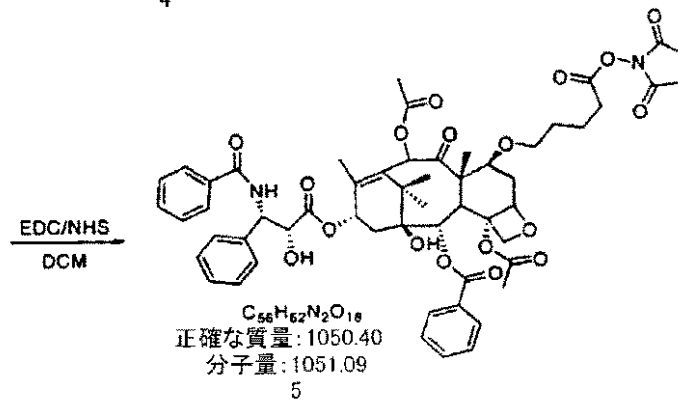
10



20



30

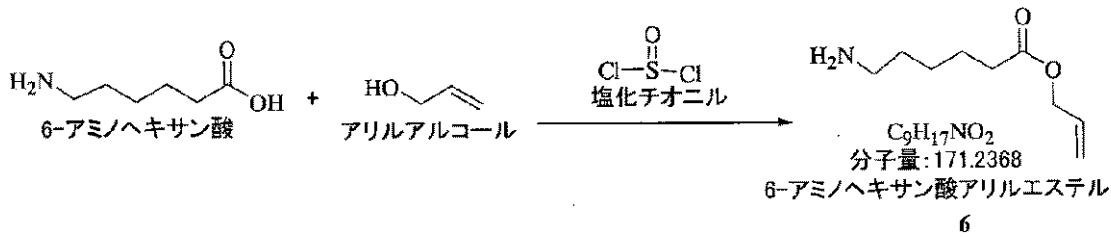


40

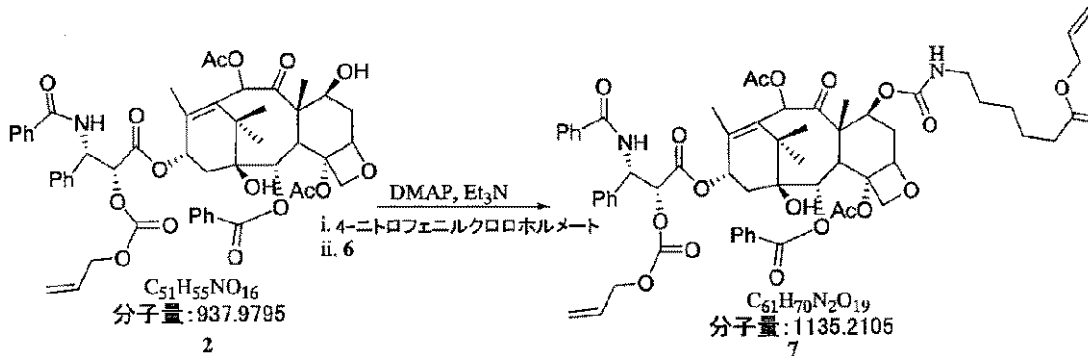
【 0 0 5 2 】

## 【化 8】

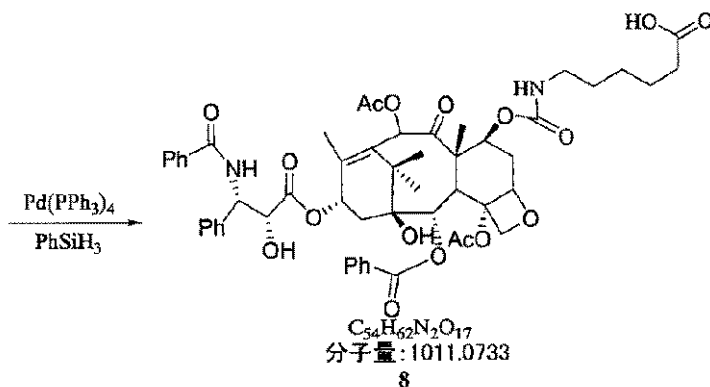
## スキーム2



10



20



30

## 【 0 0 5 3】

(実施例 1)

タキソール誘導体 [ 5 ] の調製 (スキーム 1)

タキソール 1 (1.685 g) を、アルゴンの連続流下の三口フラスコ内の新たに蒸留した 26 mL のジクロロメタン中に入れた。この添加中温度を  $-15^\circ\text{C}$  に保持し、ジイソプロピルアミン (1 当量) 及びアリルクロロホルメート (1.1 当量) も添加した。反応混合物の温度を室温にして 4 時間攪拌した。この後 40 mL のジクロロメタンを添加して反応混合物を 0.1 N HCl (60 mL) で洗浄し、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  上で乾燥させ、回転エバポレータ (? rotavap) で濃縮して、タキソールの 2' ヒドロキシル基が保護されている生成物 2 を形成した。この生成物を 2 日間デシケーター内に置き、更に精製することなく次の工程及び実施例 2 で使用した。

40

次いで生成物 2 を、アルゴン雰囲気下で  $-15^\circ\text{C}$  の温度に保持しながら 40 mL の THF に溶解させた。次いでこの溶液にまず NaH (2 当量) を添加し、10 分後に 5-プロモ吉草酸 (1.1 当量を 3 mL の THF に溶解させてゆっくり添加した) を添加すると、反応混合物中に生成物として生成物 3 が得られた。生成物 3 の TLC 確認後、4.4 mL の 2 N HCl をこの反応混合

50

物に滴下した。生成物 3 を含む反応混合物を水で洗浄し、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  上で乾燥させ、回転エバポレータで濃縮して精製した。生成物 3 はシリカゲルカラムで精製し、15%EtOAc:DCM 乃至 20%EtOAc:DCM で溶離すると、1.1611g の純粋な生成物 3 が得られた。

#### 【0054】

精製された生成物 3 を、アルゴン雰囲気下で 40 mL のジクロロメタンに溶解させ、次いでこの溶液に  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (0.05 当量) とともに  $\text{PhSiH}_3$  (6.25 当量) を添加した。得られた反応生成物を 1 時間放置した。その後 12 mL の MeOH を反応混合物に添加し、得られた反応混合物を 10 分間撹拌した。この反応混合物を蒸発させて乾燥させると、脱保護された 2'-ヒドロキシ基を有する生成物 4 が得られた。生成物 4 は、溶剤系として 30%EtOAc:DCM を用い、シリカゲルカラムで反応混合物から精製し、オフホワイトの粉末として単離された (817 mg、出発物質から 43.4 質量% の収率)。精製された生成物 4 (355 mg、0.37 mmol) を 15 mL のジクロロメタンに溶解させた。次いで N-ヒドロキシスクシンイミド (2 当量) 及び EDC (2 当量) をアルゴン雰囲気下で添加し、得られた反応混合物を一晩撹拌した。生成物 5 を含む反応混合物を 0.1 N HCl、次いでできるだけ迅速に  $\text{H}_2\text{O}$  で洗浄した。生成物 5 を含む反応混合物を  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  上で乾燥させ、高圧下の回転エバポレータで濃縮すると、401 mg (純度 99.9%) の生成物 5 が得られた。

10

#### 【0055】

(実施例 2)

タキソール誘導体 [8] の調製 (スキーム 2)

6-アミノヘキサン酸 (3g、22.87 mmol) のアリルアルコール (14 mL、過剰) 懸濁液に塩化チオニルをゆっくり添加した。反応混合物を室温において一晩撹拌すると、4-アミノヘキサン酸アリルエステル 6 が得られた。過剰のアリルアルコールを除去した後、6-アミノヘキサン酸アリルエステル (3.9g、白色結晶固体) を高圧下で乾燥させた。

20

実施例 1 で形成したアリルで保護したタキソール生成物 2 (400 mg、0.43 mmol) 及び DMAP (191.5 mg、1.57 mmol) の DCM (10 mL) 溶液に、窒素雰囲気下でトリエチルアミン (1.57 mmol) 次いで p-ニトロフェニルクロロホルメート (103 mg、0.51 mmol) を添加した。次いで反応混合物を室温において 5.5 時間撹拌し、前述のようにして調製した白色結晶固体のアミン 6 (1.1 当量) を DCM (2 mL) に溶解させたものを添加すると生成物 7 が得られた。この得られた混合物を室温で一晩撹拌した。この得られた反応混合物から DCM を減圧下で除去し、粗反応生成物 7 を、溶剤系として 15%EtOAc:DCM を用い、シリカゲルカラムで精製し、オフホワイト固体として精製された生成物 7 (320 mg、66.1%) を得た。

30

#### 【0056】

前述のようにして生成した生成物 7 をアルゴン雰囲気下で 30 mL のジクロロメタンに溶解させ、次いで  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (0.05 当量) とともに  $\text{PhSiH}_3$  (6.25 当量) を添加した。1.5 時間後に 12 mL の MeOH を添加し、更に 10 分間撹拌した。反応混合物を蒸発させて乾燥させると、誘導体化された 7-ヒドロキシタキソール生成物 8 が得られた。生成物 8 は、シリカゲルカラム (溶剤系として 10%MeOH:EtOAc を用いた) で精製され、オフホワイトのゴムとして単離された (236 mg、82.8%)。出発物質からの収率は 54.73% であった。

40

#### 【0057】

(実施例 3)

タキソール免疫原の調製

BTG の 50 mM リン酸緩衝液 (50 mM、pH 7.5) 溶液 (36.4 mg/mL) 6.8 mL に、ジメチルスルホキシド (DMSO) (13.8 mL) を滴下して溶液を形成した。16.6 mL のこの溶液に、実施例 1 で調製した精製された活性化 N-ヒドロキシスクシンイミドエステルタキソール誘導体 5 (50 mg/mL DMSO 溶液 1.26 mL) を滴下した。得られた混合物を室温において一晩撹拌して、BTG を精製されたタキソール誘導体 5 に複合させた。次いでこの免疫原性複合体を透析により精製し、すでに記載されている方法 (Wu et al., Bioconj. Chem., 8: pp 385-390, 1997, Li et al., Bioconj. Chem., 8: pp 896-905, 1997, Salamone et al.

50

, J. Forensic Sci. pp 821-826, 1998)に従って特性決定した。

【0058】

(実施例4)

タキソール抗体の調製

10匹のメスのBALB/cマウスに、完全フロインドアジュバント中で乳化させた100 µg/マウスのタキソール-BTG(実施例3で調製した)を腹腔内注射して免疫性を与えた。完全フロインドアジュバント中で乳化させた100 µgの/マウスのタキソール-BTGの最初の注射の4週間後に1度追加免疫した。追加免疫の10日後に、各マウスから眼窩出血により試験採血した。これらの試験採血からの抗血清は、実施例7、8a及び9において評価されるタキソール抗体を含有した。モノクローナル抗体のために、融合の4日前から開始して、マウスに100 µgのタキソール-BTGのPBS溶液を3日連続して腹腔内注射した。選択したマウスから脾臓細胞を単離し、Coligan, J. E. et al., eds., Current Protocols in Immunology, 2.5.1-2.5.8, (1992), Wiley & Sons, NYの方法にしたがって、50%ポリエチレングリコール1500を用いて $2 \times 10^7$ の骨髓腫細胞SP<sub>2/0</sub>と融合させた。

10

【0059】

融合させた細胞を、20%のFetalClone 1、2%のL-グルタミン(100 mM)及び2%の50 X HATを補ったDMEM/F<sub>12</sub>中の10個の96穴プレート上に置いた。2週間後に、ハイブリドーマ上清をELISA(実施例8b)により抗-タキソール-BTG抗体の存在について検定した。プラスのELISA結果(実施例8b)を示す穴からの細胞は24穴プレートに拡大した。ELISAによりプラスのクローンは、Coligan, J. E. et al., eds., Current Protocols in Immunology, 2.5.8-2.5.17, (1992), Wiley & Sons, NYに開示されている方法に従って希釈を限定することにより1回又は2回サブクローン化された。選択されたサブクローンからのモノクローナル抗体を含むハイブリドーマ培養上清は、競争的ELISA(実施例8a及び9)によりタキソール結合に関して確認された。これらのモノクローナル抗体は、実施例9に記載されているような間接競争的マイクロタイタープレート検定によりタキソール結合及びタキソール代謝産物との交差反応性に関して試験された。

20

【0060】

(実施例5)

誘導体5を用いたタキソール-BSA複合体の調製

BSAのリン酸緩衝液(50 mM、pH 7.5)溶液(50 mg/mL)20 mLに、20 mLのジメチルスルホキシド(DMSO)を滴下した。18 mLのこの溶液に、実施例1と同様にして調製した活性化N-ヒドロキシスクシンイミドエステルタキソール誘導体5(50 mg/mL DMSO溶液0.316 mL)を滴下した。混合物を室温において一晩攪拌すると、活性化エステル5及びBSAの複合体が得られた。次いでこの複合体を透析により精製し、すでに記載されている方法(Wu et al., Bioconj. Chem., 8: pp 385-390, 1997, Li et al., Bioconj. Chem., 8: pp 896-905, 1997, Salamone et al., J. Forensic Sci. pp 821-826, 1998)に従って特性決定した。

30

【0061】

(実施例6)

誘導体8を用いたタキソール-BSA複合体の調製

塩化メチレン(3 mL)に溶解させた、25 mgの、実施例2で調製したタキソール誘導体8に、EDC(28 mg)及びNHS(16.8 mg)を添加した。溶液を窒素雰囲気下室温において24時間攪拌した。この混合物に7 mLの追加の塩化メチレン、次いで2 mLの塩酸(0.3 N)を添加した。反応混合物を15分間攪拌し、有機層を分離して、乾燥及び蒸発させると、タキソール誘導体8のNHS活性化エステルである非晶質の白色残渣が得られた。この残渣を2 mLのDMSO中に溶解させ、1.25 mLのこの溶液を40 mLのBSA溶液(25 mg/mL、20 mL DMSO/20 mL 50 mMリン酸緩衝液、pH 7.5)に滴下した。溶液を室温において60時間攪拌すると、BSA及びタキソール誘導体8の複合体が得られた。この複合体をすでに記載されている方法(Wu et al., Bioconj. Chem., 8: pp 385-390, 1997, Li et al., Bioconj. Chem., 8: pp 896-905, 1997, Salamone et al., J. Forensic Sci. pp 821-826, 1998)に従って特性決定した。

40

50

8)に従って透析により精製した。

【0062】

(実施例7a)

タキソール誘導体5を用いたマイクロタイタープレート感作方法

タキソール濃度を測定するELISA法は、たんぱく質結合に関して最適化され、プレートあたり96個の穴を含むポリスチレンマイクロタイタープレート(Nunc MaxiSorp C8 or F8 Immunomodules)で実施した。各穴は、タキソール-BSA複合体(実施例5のようにして調製した)を10 µg/mLで0.05Mの炭酸水素ナトリウム、pH=9.6に溶解させたものを300 µL添加し、室温で3時間培養することによりタキソール-BAS複合体で塗布した。穴を0.05Mの炭酸水素ナトリウム、pH=9.6で洗浄し、次いで5%の蔗糖、0.2%のカゼイン酸ナトリウム溶液400 µLで室温において30分間ブロックした。後から塗布した溶液を除去した後、プレートを37 °Cで一晩乾燥した。

10

【0063】

(実施例7b)

タキソール誘導体8を用いたマイクロタイタープレート感作方法

タキソール濃度を測定するELISA法は、たんぱく質結合に関して最適化され、プレートあたり96個の穴を含むポリスチレンマイクロタイタープレート(Nunc MaxiSorp C8 or F8 Immunomodules)で実施した。各穴は、タキソール-BSA複合体(実施例6のようにして調製した)を10 µg/mLで0.05Mの炭酸水素ナトリウム、pH=9.6に溶解させたものを300 µL添加し、室温で3時間培養することによりタキソール-BAS複合体で塗布した。穴を0.05Mの炭酸水素ナトリウム、pH=9.6で洗浄し、次いで5%の蔗糖、0.2%のカゼイン酸ナトリウム溶液400 µLで室温において30分間ブロックした。後から塗布した溶液を除去した後、プレートを37 °Cで一晩乾燥した。

20

【0064】

(実施例8a)

抗体スクリーニング方法 - タイター

タキソール抗体(実施例4で製造した)をスクリーニングするELISA法は、実施例7に記載したようにしてタキソール-BSAで感作されたマイクロタイタープレートを用いて実施した。抗体スクリーニング検定は、タキソール抗体(実施例4の)を含む抗血清を、0.1%のBSA及び0.01%のチメロサルを含むリン酸緩衝生理食塩水で1:100、1:1000、1:10000及び1:100000に希釈することにより実施した。モノクローナル抗体の評価の場合には、8bの方法により抗体の存在がプラスであることがみいだされた実施例4のハイブリドーマ上清を、0.1%のBSA及び0.01%のチメロサルを含むリン酸緩衝生理食塩水で1:2、1:4、1:8、1:16等に希釈した。タキソール-BSAで感作された穴(実施例7で調製した)の各々に、100 µLの希釈された抗体を添加し、室温において振盪しながら10分間培養した。

30

【0065】

この培養中に抗体は穴の中でタキソール複合体と結合する。プレートの穴を、0.02MのTRIS、0.9%のNaCl、0.5%のTween-80及び0.001%のチメロサル、pH7.8で3回洗浄し、未結合抗体を除去した。穴の中でタキソール-BSA複合体と結合したタキソール抗体の量を検出するために、0.1%のBSA、0.05%のANS、0.01%のチメロサルを含むPBSで所定の特定の活性(約1/2000)に希釈された、基質とともに培養されるとマウス免疫グロブリンと特異的に結合して着色生成物を形成しうるヤギの抗マウス抗体-HRP酵素複合体(Jackson Immunoresearch)を各穴に100 µL添加した。第二の-HRP複合体が穴の中でタキソール抗体と結合する室温における振盪しながらの10分間の培養後に、プレートを再び3回洗浄して未結合の第二の複合体を除去した。穴の中で測定しうる色を発現するために、洗浄後にHRPの基質であるTMB(TMB Liquid Substrate, Sigma)を100 µL添加して室温における振盪しながらの10分間の培養中に色を発現させた。色の発現のための培養後に、50 µLの停止液(フッ化ナトリウムの1.5%脱イオン水溶液)を各穴に添加して色の発現を停止させ、10秒の振盪後に650 nmにおいて吸光度を

40

50

測定した(Molecular Devices Plate Reader)。穴の中の抗体の量は測定された吸光度に比例し、1.5の吸光度における希釈度(タイター)として表された。タイターは、測定された抗体の抗体希釈度の対数(x-軸)対650nmにおける吸光度(y-軸)をグラフにして、1.5の吸光度におけるタイターを外挿することにより決定された。タイターは、実施例9に記載される間接競争的マイクロタイタープレート検定において使用される抗体の濃度(希釈度)を決定した。

【0066】

(実施例8b)

抗体スクリーニング方法 - モノクローナルスクリーニング

タキソールモノクローナル抗体(実施例4で製造した)をスクリーニングするELISA法は、実施例6に記載したようにしてタキソール-BSAで感作されたマイクロタイタープレートを用いて実施した。タキソール-BSAで感作された穴(実施例7bで調製した)の各々に、0.1%のBSA及び0.01%のチメロサルを含むリン酸緩衝生理食塩水50 $\mu$ L、次いで50 $\mu$ Lのモノクローナル培養上清を添加し、室温において浸透しながら10分間培養した。この培養中に抗体は穴の中でタキソール複合体と結合する。プレートの穴を、0.02MのTRIS、0.9%のNaCl、0.5%のTween-80及び0.001%のチメロサル、pH7.8で3回洗浄し、未結合抗体を除去した。

【0067】

穴の中でタキソール-BSA複合体と結合したタキソール抗体の量を検出するために、0.1%のBSA、0.05%のANS、0.01%のチメロサルを含むPBSで所定の特定の活性(約1/2000)に希釈された、基質とともに培養されるとマウス免疫グロブリンと特異的に結合して着色生成物を形成しうるヤギの抗マウス抗体-HRP酵素複合体(Jackson ImmunoResearch)を各穴に100 $\mu$ L添加した。ヤギの抗マウス抗体-HRP複合体が穴の中でタキソール抗体と結合する室温における振盪しながらの10分間の培養後に、プレートを再び3回洗浄して未結合のヤギの抗マウス抗体-HRP酵素複合体を除去した。穴の中で測定しうる色を発現するために、洗浄後にHRPの基質であるTMB(TMB Liquid Substrate, Sigma)を100 $\mu$ L添加して室温における振盪しながらの10分間の培養中に色を発現させた。色の発現のための培養後に、50 $\mu$ Lの停止液(フッ化ナトリウムの1.5%脱イオン水溶液)を各穴に添加して色の発現を停止させ、10秒の振盪後に650nmにおいて吸光度を測定した(Molecular Devices Plate Reader)。穴の中の抗体の量は測定された吸光度に比例した。バックグラウンドの2倍より大きい吸光度を有する試料がプラスであるとされた。

【0068】

(実施例9a)

IC<sub>50</sub>及び交差反応性を測定する間接競争的マイクロタイタープレート免疫学的検定方法タキソール濃度を測定するELISA方法は、実施例7aにおいて記載したタキソール-BSAで感作したマイクロタイタープレートを用いて実施した。タキソール、baccatin III、3'-p-ヒドロキシパクリタキセル、6'-ヒドロキシパクリタキセル及びタキソールを、PBS中又は0.01乃至10,000ng/mLの濃度範囲にわたって0.1%のBSA及び0.01%のチメロサルを含むPBS中で10倍に希釈した。検定は、実施例8aで決定されたタイターに希釈された50 $\mu$ Lの抗体(実施例4で製造された)とともに50 $\mu$ Lの測定する検体を培養することにより実施した。10分間の培養(振盪しながら室温で)中に、穴の中のタキソール複合体及び検体溶液との抗体結合が競争する。

【0069】

この培養後に、プレートの穴を、0.02MのTRIS、0.9%のNaCl、0.5%のTween-80及び0.001%のチメロサル、pH7.8で3回洗浄し、結合されていない物質を除去した。穴の中でタキソール-BSA複合体と結合したタキソール抗体の量を検出するために、0.1%のBSA、0.05%のANS、0.01%のチメロサルを含むPBSで所定の特定の活性(約1/2000)に希釈された、基質とともに培養されるとマウス免疫グロブリンと特異的に結合して着色生成物を形成しうるヤギの抗マウス抗体-HRP酵素複合体(Jackson ImmunoResearch)である第二の抗体を各穴に100 $\mu$ L添加した。第二の抗体-HRP複合体

10

20

30

40

50

が穴の中でタキソール抗体と結合する室温における振盪しながらの10分間の培養後に、プレートを再び3回洗浄して未結合の第二の複合体を除去した。穴の中で測定しうる色を発現するために、洗浄後にHRPの基質であるTMB(TMB Liquid Substrate, Sigma)を100  $\mu$ L添加して室温における振盪しながらの10分間の培養中に色を発現させた。色の発現のための培養後に、50  $\mu$ Lの停止液(フッ化ナトリウムの1.5%脱イオン水溶液)を各穴に添加して色の発現を停止させ、10秒の振盪後に650 nmにおいて吸光度を測定した(Molecular Devices Plate Reader)。穴の中の抗体の量は測定された吸光度に比例し、試料中のタキソールの量に反比例した。検体を含む穴の中の色の吸光度を、検体を含まないそれと比較して標準曲線を作成した。所与の検体の $IC_{50}$ 値は、検体を含まない穴の吸光度の50%を抑制するのに必要な検体の濃度と定義された。所与の検体の交差反応性は、baccatin III、3'-p-ヒドロキシパクリタキセル、6'-ヒドロキシパクリタキセル及びタキソテールに関する $IC_{50}$ に対するタキソールに関する $IC_{50}$ の比を%で表わして計算した。

#### 【0070】

実施例4において産生したタキソールポリクローナル抗体とのbaccatin III、3'-p-ヒドロキシパクリタキセル、6'-ヒドロキシパクリタキセル及びタキソテールの交差反応性を評価するために、眼窩出血からプール抗血清を得た。このプールを、それぞれタキソールに関する $IC_{50}$ 値が<20 ng/mLである4匹のマウスの抗体と一緒にした。このプール抗体を用いて測定すると、タキソールと比較したbaccatin III、3'-p-ヒドロキシパクリタキセル、及び6'-ヒドロキシパクリタキセルに関する相対反応性は10%未満であった。6'-ヒドロキシパクリタキセルとの相対反応性は60%未満であった。結果は表1に示す。baccatin III、3'-p-ヒドロキシパクリタキセル、6'-ヒドロキシパクリタキセル及びタキソテールの実施例4で産生したタキソールモノクローナル抗体との交差反応性を評価するためには、選択されたサブクローニングされたモノクローナル抗体からのハイブリドーマ上清を使用した。これらのモノクローナル抗体2種を用いて測定すると、タキソールと比較したbaccatin III、3'-p-ヒドロキシパクリタキセル、及び6'-ヒドロキシパクリタキセルに関する交差反応性は6%未満であった。結果は表2に示す。

#### 【0071】

(実施例9b)

$IC_{50}$ 及び交差反応性を測定する間接競争的マイクロタイタープレート免疫学的検定方法タキソール濃度を測定するELISA方法は、実施例7bにおいて記載したタキソール-BSAで感作したマイクロタイタープレートを用いて実施した。タキソール、baccatin III、3'-p-ヒドロキシパクリタキセル、6'-ヒドロキシパクリタキセル及びタキソテールを、PBS中又は0.01乃至1000 ng/mLの濃度範囲にわたって0.1%BSA及び0.01%チメロサルを含むPBS中で10倍に希釈した。検定は、実施例8aで決定されたタイターに希釈された50  $\mu$ Lの抗体(実施例4で製造された)とともに50  $\mu$ Lの測定する検体を培養することにより実施した。10分間の培養(振盪しながら室温で)中に、穴の中のタキソール複合体及び検体溶液との抗体結合が競争する。この培養後に、プレートの穴を、0.02MのTRIS、0.9%のNaCl、0.5%のTween-80及び0.001%のチメロサル、pH7.8で3回洗浄し、結合されていない物質を除去した。

#### 【0072】

穴の中でタキソール-BSA複合体と結合したタキソール抗体の量を検出するために、0.1%のBSA、0.05%のANS、0.01%のチメロサルを含むPBSで所定の特定の活性(約1/2000)に希釈されたヤギの抗マウス抗体-HRP酵素複合体(Jackson Immunoresearch)である第二の抗体を各穴に100  $\mu$ L添加した。この第二の抗体は、基質とともに培養されるとマウス免疫グロブリンと特異的に結合して着色生成物を生成しうる。第二の抗体-HRP複合体が穴の中でタキソール抗体と結合する室温における振盪しながらの10分間の培養後に、プレートを再び3回洗浄して未結合の第二の複合体を除去した。穴の中で測定しうる色を発現するために、洗浄後にHRPの基質であるTMB(TMB Liquid Substrate, Sigma)を100  $\mu$ L添加して室温における振盪しながらの10分間の培養中に色を発現させた。色の発現のための培養後に、50  $\mu$ Lの停止液(フッ化ナトリウムの1.5%脱イオン水溶

10

20

30

40

50

液)を各穴に添加して色の発現を停止させ、10秒の振盪後に650nmにおいて吸光度を測定した(Molecular Devices Plate Reader)。穴の中の抗体の量は測定された吸光度に比例し、試料中のタキソールの量に反比例した。検体を含む穴の中の色の吸光度を、検体を含まないそれと比較して標準曲線を作成した。所与の検体の $IC_{50}$ 値は、検体を含まない穴の吸光度の50%を抑制するのに必要な検体の濃度と定義された。所与の検体の交差反応性は、baccatin III、3'-p-ヒドロキシパクリタキセル、6- $\alpha$ -ヒドロキシパクリタキセル及びタキソテールに関する $IC_{50}$ に対するタキソールに関する $IC_{50}$ の比として%で表された。baccatin III、3'-p-ヒドロキシパクリタキセル、6- $\alpha$ -ヒドロキシパクリタキセル及びタキソテールの実施例4において産生したタキソール抗体との交差反応性を評価するために、実施例9aのプールを使用した。このプール抗体を用いて測定すると、タキソールと比較したbaccatin III、3'-p-ヒドロキシパクリタキセル、6- $\alpha$ -ヒドロキシパクリタキセル及びタキソテール(ドセタキセル)に関する交差反応性は2%未満であった。結果は表1に示す。選択したモノクローナル抗体を用いて測定すると(実施例9aと同様に)、タキソールと比較したbaccatin III、3'-p-ヒドロキシパクリタキセル、及び6- $\alpha$ -ヒドロキシパクリタキセルに関する交差反応性は9%未満であった。結果は表2に示す。

10

【0073】

【表1】

タキソールに対するポリクローナル抗体を用いた競争的免疫学的検定の交差反応性(実施例4)

検体	マイクロタイタープレート感作	
	タキソール誘導体8	タキソール誘導体5
タキソール(パクリタキセル)	100%	100%
ドセタキセル	0.16%	≤5%
3'-p-ヒドロキシパクリタキセル	0.57%	≤10%
6- $\alpha$ -ヒドロキシパクリタキセル	1.60%	<58%
baccatin III	0.10%	0.10%

20

【0074】

【表2】

タキソールに対するモノクローナル抗体を用いた競争的免疫学的検定の交差反応性(実施例4)

検体	モノクローナルAb#1		モノクローナルAb#2	
	マイクロタイタープレート感作		マイクロタイタープレート感作	
	タキソール誘導体8	タキソール誘導体5	タキソール誘導体8	タキソール誘導体5
タキソール(パクリタキセル)	100%	100%	100%	100%
ドセタキセル	77%	76%	85%	101%
3'-p-ヒドロキシパクリタキセル	8.1%	5.9%	1.5%	≤2.3%
6- $\alpha$ -ヒドロキシパクリタキセル	6.5%	5.1%	2.9%	≤4.6%
baccatin III	0.17%	0.13%	0.13%	≤0.19%

30

40

【0075】

前記の表からわかるように、本発明の抗体はタキソールの多くの代謝産物とは反応性ではないが、タキソール及びタキソール様薬物とは反応性である。タキソールを投与されている患者に同時にドセタキセルを投与せずに、タキソールで治療されている患者の流体試料中のタキソールを特異的に検出して追跡できるこれらの抗体が免疫学的検定において使用されうる。

---

フロントページの続き

(72)発明者 サラモネ サルヴァトーレ

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08559 ストックトン ヤード ロード 65

(72)発明者 コートニー ジョディー ブレイク

アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 18901 ドイルズタウン ヒッコリー ホロー レーン  
5859

(72)発明者 ストッカー デニス

アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 19067 ヤードリー ハロー クレッセント 1281

Fターム(参考) 4C048 TT08 UU10 XX04

4C063 AA01 BB08 CC72 DD03 EE10

4H045 AA11 BA72 CA40 DA86 EA50 FA50

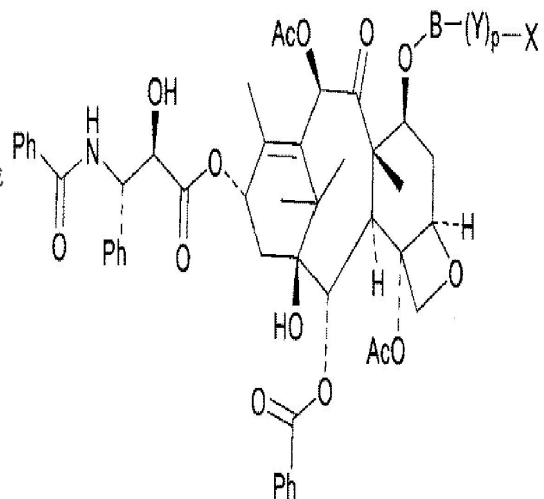
【要約の続き】

【選択図】なし

专利名称(译)	用于紫杉醇免疫测定的化合物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2010159263A</a>	公开(公告)日	2010-07-22
申请号	JP2010026554	申请日	2010-02-09
[标]申请(专利权)人(译)	萨拉戴克斯生物医学公司		
申请(专利权)人(译)	莎拉·达克斯生物医学公司		
[标]发明人	サラモネサルヴァトーレ コートニージョディーブレイク ストッカーデニス		
发明人	サラモネ サルヴァトーレ コートニー ジョディー ブレイク ストッカー デニス		
IPC分类号	C07D305/14 C07K16/00 C07D405/12 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/94 G01N2407/02		
FI分类号	C07D305/14.CSP C07K16/00 C07D405/12 G01N33/53.S		
F-TERM分类号	4C048/TT08 4C048/UU10 4C048/XX04 4C063/AA01 4C063/BB08 4C063/CC72 4C063/DD03 4C063/EE10 4H045/AA11 4H045/BA72 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA50		
代理人(译)	小川伸男		
优先权	60/592017 2004-07-29 US 11/044667 2005-01-27 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

需要解决的问题：提供一种化合物，结合物和免疫原，可用于免疫测定中生物体液中紫杉醇的测定和跟踪。溶液：提供式II-B表示的化合物或其与载体或免疫原性多胺聚合物的缀合物。在该式中，Ph是苯基；p为0或1；X是与多胺聚合物键合的末端官能团；Y是有机间隔基团；B是-CH<sub>2</sub>-或CO-NH-CH<sub>2</sub>-。



II-B