

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-529681

(P2018-529681A)

(43) 公表日 平成30年10月11日(2018.10.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 F 9/6584 (2006.01)	C O 7 F 9/6584 C S P	4 H O 5 O
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 J	
G O 1 N 33/531 (2006.01)	G O 1 N 33/531 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁)

(21) 出願番号 特願2018-512880 (P2018-512880) (86) (22) 出願日 平成28年9月7日 (2016.9.7) (85) 翻訳文提出日 平成30年4月2日 (2018.4.2) (86) 国際出願番号 PCT/US2016/050495 (87) 国際公開番号 W02017/044453 (87) 国際公開日 平成29年3月16日 (2017.3.16) (31) 優先権主張番号 62/216, 943 (32) 優先日 平成27年9月10日 (2015.9.10) (33) 優先権主張国 米国 (US)	(71) 出願人 595117091 ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパニー BECTON, DICKINSON AND COMPANY アメリカ合衆国 ニュー・ジャージー O 7 4 1 7 - 1 8 8 0 フランクリン・レイ クス ベクトン・ドライブ 1 1 BECTON DRIVE, FRANKLIN LAKES, NEW JERSEY O7417-1880, UNITED STATES OF AMERICA (74) 代理人 100094569 弁理士 田中 伸一郎 最終頁に続く
---	---

(54) 【発明の名称】 シクロホスファミド及びイホスファミドのイムノアッセイ用の免疫原及びアッセイ接合体として用いるシクロホスファミド類似体

(57) 【要約】

本出願は、シクロホスファミド、イホスファミド、及びこれらの類似体等の小分子に特異的に結合する抗体、並びにサンプル中のシクロホスファミド及び／若しくはイホスファミドの存在を検出するため及び／又はシクロホスファミド及び／若しくはイホスファミドの量を定量するための免疫学的アッセイに関する。例として、該免疫学的アッセイを環境試験のために使用することができる。

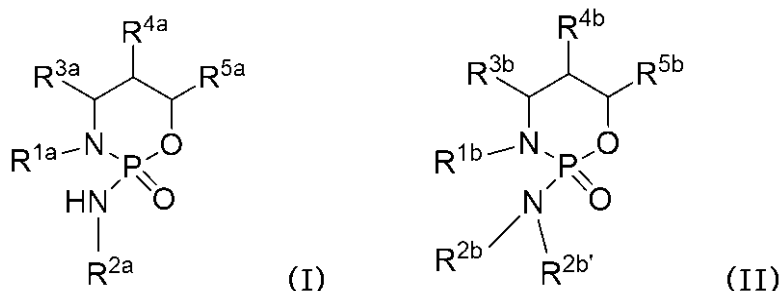
【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記式(I)又は(II)：

【化 1】



10

(式中、 R^{1a} は、水素又は $-(CH_2)_m-X$ から選択され； R^{2a} は、 $-(CH_2)_n-Y$ であり； R^{1b} は、 $-(CH_2)_m-X$ であり； R^{2b} 及び $R^{2b'}$ は、それぞれ独立に $-(CH_2)_k-Z$ から選択され；

R^{3a} 、 R^{4a} 、 R^{5a} 、 R^{3b} 、 R^{4b} 及び R^{5b} は、それぞれ独立に水素、ハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_2-C_6 アルキニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、5-10員ヘテロシクリル、アリール、アラルキル、5-10員ヘテロアリール、 C_1-C_6 アルコキシ、 C_1-C_6 アルコキシ(C_1-C_6)アルキル、アリールオキシ、ハロ(C_1-C_6)アルキル、ハロ(C_1-C_6)アルコキシ、 C_1-C_6 アルキルチオ、アリールチオ、アミノ(C_1-C_6)アルキル、ニトロ、O-カルバミル、N-カルバミル、O-チオカルバミル、N-チオカルバミル、C-アミド、N-アミド、S-スルホンアミド、N-スルホンアミド、C-カルボキシ、O-カルボキシ、アシル、及びオキソ(=O)から選択され；

20

Xは、アミン、チオール、カルボン酸、ヒドラジド、ヒドラジン、オキシム、又はヒドロキシルアミンから選択される官能基であり；

Yは、ハロゲン、ヒドロキシ、アミン、チオール、カルボン酸、ヒドラジド、ヒドラジン、オキシム、又はヒドロキシルアミンから独立に選択される官能基であり；

Zは、ハロゲン又はヒドロキシから選択され；かつ

30

m、n及びkは、それぞれ独立に2～10の整数である)

の構造を含む化合物。

【請求項 2】

 R^{1a} が水素である、請求項1に記載の化合物。

【請求項 3】

Yが、アミン、チオール、カルボン酸、ヒドラジド、ヒドラジン、オキシム、又はヒドロキシルアミンから選択される、請求項2に記載の化合物。

【請求項 4】

 R^{1a} が $-(CH_2)_m-X$ である、請求項1に記載の化合物。

【請求項 5】

Yが、クロリド又はヒドロキシから選択される、請求項4に記載の化合物。

40

【請求項 6】

R^{2b} 及び $R^{2b'}$ がそれぞれ $-(CH_2)_k-Z$ であり、Zがクロリド又はヒドロキシから選択される、請求項1に記載の化合物。

【請求項 7】

mが整数2である、請求項1～6のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項 8】

mが整数3である、請求項1～6のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項 9】

n及びkが、それぞれ整数2である、請求項1～8のいずれか1項に記載の化合物。

50

【請求項 10】

R^{3a} 、 R^{4a} 、 R^{5a} 、 R^{3b} 、 R^{4b} 、 R^{5b} が、それぞれ水素である、請求項1～9のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項 11】

請求項1～10のいずれか1項に記載の化合物を含む免疫原であって、前記化合物が前記化合物の官能基X又はYを介して免疫原性ポリマー又は担体に共有結合している、前記免疫原。

【請求項 12】

免疫原性ポリマー又は担体が、免疫学的に活性なタンパク質又はポリペプチドから選択される、請求項11に記載の免疫原。

10

【請求項 13】

実質的に選択的にシクロホスファミド及び/又はイホスファミドに結合する抗体。

【請求項 14】

請求項11又は12に記載の免疫原由来である、請求項13に記載の抗体。

【請求項 15】

サンプル中のシクロホスファミド又はイホスファミドの存在をサンプル内で検出するための、アッセイ接合体を含むイムノアッセイであって、前記アッセイ接合体が官能基X又はYを介して担体に共有結合している請求項1～10のいずれか1項に記載の化合物を含む、前記イムノアッセイ。

【請求項 16】

担体が、タンパク質又はポリペプチドから選択される、請求項15に記載のイムノアッセイ。

20

【請求項 17】

サンプル中のシクロホスファミド及び/又はイホスファミドの存在をサンプル内で検出するための、請求項13又は14に記載の抗体を含むイムノアッセイ。

【請求項 18】

サンプル中のシクロホスファミド及び/又はイホスファミドの存在を検出するための、試薬を含むキットであって、前記試薬の1つが、請求項1～10のいずれか1項に記載の化合物の官能基X又はYを介して前記化合物に共有結合している担体の接合体である、前記キット。

30

【請求項 19】

担体がタンパク質又はポリペプチドから選択される、請求項18に記載のキット。

【請求項 20】

請求項13又は14に記載の抗体をさらに含む、請求項18又は19に記載のキット。

【請求項 21】

Xに共有結合している担体をさらに含み、前記担体が、アルブミン若しくはそのフラグメント、血清タンパク質、リボタンパク質、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)、オボアルブミン、ウシチログロブリン(BTG)、合成ポリ(アミノ酸)、ポリアミノ-多糖、ポリ核酸、ポリアミノ酸、多糖、又は固体粒子の少なくとも1つを含む、請求項1～10のいずれか1項に記載の化合物。

40

【請求項 22】

Yに共有結合している担体をさらに含み、前記担体が、アルブミン若しくはそのフラグメント、血清タンパク質、リボタンパク質、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)、オボアルブミン、ウシチログロブリン(BTG)、合成ポリ(アミノ酸)、ポリアミノ-多糖、ポリ核酸、ポリアミノ酸、多糖、又は固体粒子の少なくとも1つを含む、請求項1～10又は21のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項 23】

請求項21～22のいずれか1項に記載の化合物に特異的に結合する抗体。

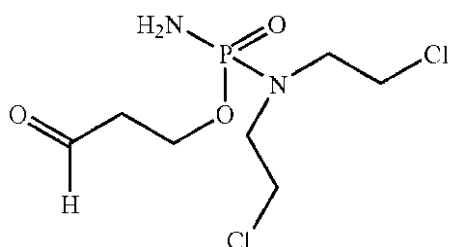
【請求項 24】

下記式(III)の非環式シクロホスファミドに対する解離定数(K_d)の数値的に1/10未満で

50

ある解離定数で環式シクロホスファミドに結合する、請求項23に記載の抗体。

【化 2】



(III)

10

【請求項 2 5】

式(III)の非環式シクロホスファミドに対する解離定数(K_d)の数値的に1/1000未満である解離定数で環式シクロホスファミドに結合する、請求項24に記載の抗体。

【請求項 2 6】

モノクロナール抗体を含む、請求項23～25のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項 2 7】

ポリクロナール抗体を含む、請求項23～25のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項 2 8】

シクロホスファミドに特異的に結合する抗体の作製方法であって、

請求項11～12のいずれか1項に記載の免疫原又は請求項21～22のいずれか1項に記載の化合物を宿主生物に投与すること；

前記宿主生物から抗体産生細胞又は抗体を単離すること；及び

前記抗体産生細胞由来の抗体又は前記宿主生物由来の抗体をシクロホスファミドへの親和性についてスクリーニングすること、を含む、前記方法。

20

【請求項 2 9】

宿主生物が、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ロバ、又はヤギを含む、請求項28に記載の方法。

【請求項 3 0】

担体がKLHを含む、請求項28～29のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項 3 1】

抗体産生細胞が単離され、前記抗体産生細胞に由来する抗体がシクロホスファミドへの親和性についてスクリーニングされ、かつシクロホスファミドに特異的に結合する抗体がモノクロナールである、請求項28～29のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 3 2】

単離した抗体産生細胞からハイブリドーマを構築することをさらに含む、請求項31に記載の方法。

【請求項 3 3】

単離した抗体産生細胞の核酸をファージディスプレイ法によってスクリーニングすることをさらに含む、請求項31又は32に記載の方法。

40

【請求項 3 4】

式(III)の非環式代謝物に比べてシクロホスファミドに特異的に結合する抗体についてスクリーニングすることをさらに含む、請求項28～33のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 3 5】

宿主細胞内で抗体をコードする核酸を発現させることをさらに含む、請求項31～34のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 3 6】

宿主生物からの抗体がシクロホスファミドへの親和性についてスクリーニングされ、かつシクロホスファミドに特異的に結合する抗体がポリクロナールである、請求項28～29のいずれか1項に記載の方法。

50

【請求項 37】

イホスファミドに特異的に結合する抗体の作製方法であって、

請求項11～12のいずれか1項に記載の免疫原又は請求項21～22のいずれか1項に記載の化合物を宿主生物に投与すること；

前記宿主生物から抗体産生細胞又は抗体を単離すること；及び

前記抗体産生細胞由来の抗体又は前記宿主生物由来の抗体をイホスファミドへの親和性についてスクリーニングすること、
を含む、前記方法。

【請求項 38】

宿主生物が、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ロバ、又はヤギを含む、請求項37に記載の方法。

10

【請求項 39】

担体がKLHを含む、請求項37～38のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 40】

抗体産生細胞が単離され、前記抗体産生細胞に由来する抗体がイホスファミドへの親和性についてスクリーニングされ、かつシクロホスファミドに特異的に結合する抗体がモノクローナルである、請求項37～39のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 41】

単離した抗体産生細胞からハイブリドーマを構築することをさらに含む、請求項40に記載の方法。

20

【請求項 42】

単離した抗体産生細胞の核酸をファージディスプレイ法によってスクリーニングすることをさらに含む、請求項40又は41に記載の方法。

【請求項 43】

式(III)の非環式代謝物に比べてシクロホスファミドに特異的に結合する抗体についてスクリーニングすることをさらに含む、請求項37～42のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 44】

宿主細胞内で抗体をコードする核酸を発現させることをさらに含む、請求項40～43のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 45】

宿主生物からの抗体がシクロホスファミドへの親和性についてスクリーニングされ、かつシクロホスファミドに特異的に結合する抗体がポリクローナルである、請求項37～39のいずれか1項に記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

〔発明の詳細な説明〕

関連出願の相互参照

本出願は、参照することによりその内容全体をここに援用する2015年9月10日に出願された米国仮出願第62/216,943号の利益を主張する。

40

【0002】

分野

本出願は、シクロホスファミド、イホスファミド、及びこれらの類似体等の小分子に結合する抗体、並びにサンプル中のシクロホスファミド及び／若しくはイホスファミドの存在を判定するため及び／又はシクロホスファミド及び／若しくはイホスファミドの量を定量するための免疫学的アッセイに関する。例として、該抗体及び／又は免疫学的アッセイを環境試験のために使用することができる。

【背景技術】

【0003】

背景

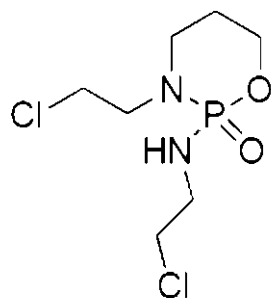
50

シクロホスファミドは、ナイトロジェンマスタードアルキル化薬のプロドラッグであり、ビス(2-クロロエチル)アミノ基の反応性が減弱されている。インビボで酸化されると、6員環が開き、ナイトロジェンマスタードの反応性を増強し、その結果ナイトロジェンマスタードが作用してDNAを架橋する。シクロホスファミドは、特により高い用量では、急性骨髄性白血病、膀胱癌、出血性膀胱炎、及び永久不妊症を含めた重度かつ生命を危うくする副作用を有する。イホスファミドも癌の治療に用いられるナイトロジェンマスタードアルキル化薬である。イホスファミドは、脳症を引き起こす恐れがあり、抹消神経に影響を及ぼし、子供の神経発達を妨害し得る。

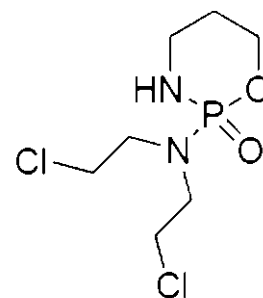
【 0 0 0 4 】

【 化 1 】

10

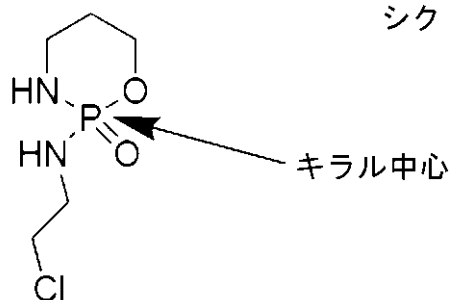


イホスファミド



シクロホスファミド

20



共通コア構造

30

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 5 】

今までのところ、シクロホスファミド又はイホスファミドの検出用の市販のイムノアッセイキットはない。さらに、シクロホスファミド又はイホスファミドに対する商業的に入手可能な抗体もない。従って、これらの細胞傷害性薬用のイムノアッセイを開発する必要性が存在する。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 6 】

概要

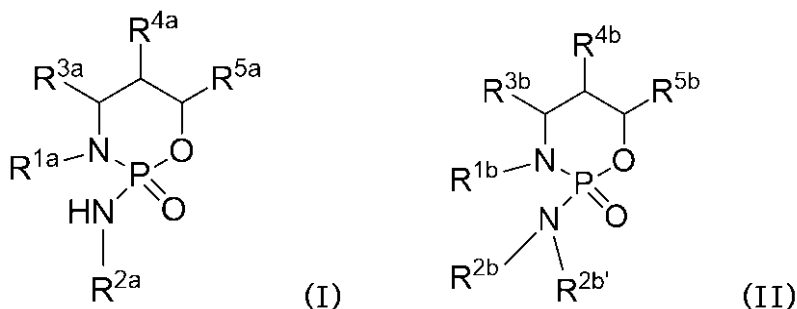
40

本出願の実施形態は、シクロホスファミド及び/又はイホスファミドを認識する抗体を産生する免疫原として使用し得るシクロホスファミド類似体のファミリーに関する。これらのシクロホスファミド類似体は、シクロホスファミド及び/又はイホスファミドの検出用イムノアッセイで使用するアッセイ接合体の産生にも使用可能である。各類似体は、接合目的の官能基を含有するが、抗体産生及び薬物認識用の重要なエピトープとして6員環を維持する。

本出願の一部の実施形態は、下記式(I)又は(II)の構造を含むシクロホスファミド類似体に関する。

【 0 0 0 7 】

【化2】



10

【0008】

式中、 R^{1a} は、水素又は $-(CH_2)_m-X$ から選択され； R^{2a} は、 $-(CH_2)_n-Y$ であり； R^{1b} は、 $-(CH_2)_m-X$ であり； R^{2b} 及び $R^{2b'}$ は、それぞれ独立に $-(CH_2)_k-Z$ から選択され； R^{3a} 、 R^{4a} 、 R^{5a} 、 R^{3b} 、 R^{4b} 及び R^{5b} は、それぞれ独立に水素、ハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_2-C_6 アルキニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、5-10員ヘテロシクリル、アリール、アラルキル、5-10員ヘテロアリール、 C_1-C_6 アルコキシ、 C_1-C_6 アルコキシ(C_1-C_6)アルキル、アリールオキシ、ハロ(C_1-C_6)アルキル、ハロ(C_1-C_6)アルコキシ、 C_1-C_6 アルキルチオ、アリールチオ、アミノ(C_1-C_6)アルキル、ニトロ、O-カルバミル、N-カルバミル、O-チオカルバミル、N-チオカルバミル、C-アミド、N-アミド、S-スルホンアミド、N-スルホンアミド、C-カルボキシ、O-カルボキシ、アシル、及びオキシ(=O)から選択され；Xは、アミン、チオール、カルボン酸、ヒドラジド、ヒドラジン、オキシム、又はヒドロキシルアミンから選択される官能基であり；Yは、ハロゲン、ヒドロキシ、アミン、チオール、カルボン酸、ヒドラジド、ヒドラジン、オキシム、又はヒドロキシルアミンから独立に選択される官能基であり；Zは、ハロゲン又はヒドロキシから選択され；m、n及びkは、それぞれ独立に2~10の整数である。

20

【0009】

式(I)の化合物の一部の実施形態では、 R^{1a} は水素であり、 R^{2a} は $-(CH_2)_n-Y$ であり、ここで、Yは、担体タンパク質と接合体を形成できる官能基、例えば、アミン、チオール、カルボン酸、ヒドラジド、ヒドラジン、オキシム、又はヒドロキシルアミンから選択される。一部の該実施形態では、Yはチオール又はカルボン酸から選択される。該実施形態では、nは整数2である。

30

式(I)の化合物の別の実施形態では、 R^{1a} は $-(CH_2)_m-X$ であり、ここで、Xは、担体タンパク質と接合体を形成できる官能基、例えば、アミン、チオール、カルボン酸、ヒドラジド、ヒドラジン、オキシム、又はヒドロキシルアミンから選択される。一部の該実施形態では、Xはチオール又はカルボン酸から選択される。一部の該実施形態では、 R^{2a} は $-(CH_2)_n-Y$ であり、ここで、Yは、ハロゲン(例えば、クロロ)又はヒドロキシから選択される。一部の該実施形態では、mは、整数3であり、nは、整数2である。

【0010】

式(II)の一部の実施形態では、 R^{1b} は $-(CH_2)_m-X$ であり、ここで、Xは、担体タンパク質と接合体を形成できる官能基、例えば、アミン、チオール、カルボン酸、ヒドラジド、ヒドラジン、オキシム、又はヒドロキシルアミンから選択される。一部の該実施形態では、Xはチオール又はカルボン酸から選択される。一部の該実施形態では、 R^{2b} 及び $R^{2b'}$ は、それぞれ $-(CH_2)_k-Z$ であり、Zは、ハロゲン(例えば、クロロ)又はヒドロキシから選択される。一部の該実施形態では、mは整数2である。一部の実施形態では、少なくとも1つのkは整数2である。一部のさらなる実施形態では、両kが整数2である。

40

一部の実施形態では、式(I)の R^{3a} 、 R^{4a} 、 R^{5a} の少なくとも1つ及び式(II)の R^{3b} 、 R^{4b} 、 R^{5b} の少なくとも1つが水素である。一部のさらなる実施形態では、式(I)の各 R^{3a} 、 R^{4a} 、 R^{5a} 及び式(II)の各 R^{3b} 、 R^{4b} 、 R^{5b} が水素である。

【0011】

本出願の一部の実施形態は、本明細書に記載のシクロホスファミド類似体を含む免疫原

50

に関し、この類似体は該類似体化合物の官能基X又はYを介して免疫原性ポリマー又は担体に共有結合している。一部の実施形態では、免疫原性ポリマー又は担体は、免疫学的に活性なタンパク質又はポリペプチドから選択される。

本出願の一部の実施形態は、実質的に選択的にシクロホスファミド、イホスファミド、又はシクロホスファミド及びイホスファミドに結合する抗体に関する。一部の実施形態では、抗体は、本明細書に記載の免疫原に由来する。そのようなものとして、一部の実施形態では、抗体は、シクロホスファミド、イホスファミド、又はシクロホスファミド及びイホスファミドに結合し、さらに式(I)の化合物に結合する。この式(I)の化合物では、担体がX又はYのどちらかに共有結合しており、この担体は、アルブミン若しくはそのフラグメント、血清タンパク質、リボタンパク質、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)、オボアルブミン、ウシチログロブリン(BTG)、合成ポリ(アミノ酸)、ポリアミノ-多糖、ポリ核酸、ポリアミノ酸、多糖、又は固体粒子の少なくとも1つを含む。一部の実施形態では、抗体は、シクロホスファミド、イホスファミド、又はシクロホスファミド及びイホスファミドに結合し、さらに式(II)の化合物に結合する。この式(II)の化合物では、担体がXに共有結合しており、この担体は、アルブミン若しくはそのフラグメント、血清タンパク質、リボタンパク質、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)、オボアルブミン、ウシチログロブリン(BTG)、合成ポリ(アミノ酸)、ポリアミノ-多糖、ポリ核酸、ポリアミノ酸、多糖、又は固体粒子の少なくとも1つを含む。一部の実施形態では、抗体はシクロホスファミドに結合し、担体はKLHを含む。一部の実施形態では、抗体はイホスファミドに結合し、担体はKLHを含む。一部の実施形態では、抗体はモノクローナル抗体を含む。一部の実施形態では、抗体はシクロホスファミド及びイホスファミドに結合し、担体はKLHを含む。一部の実施形態では、抗体はポリクローナル抗体を含む。

【0012】

本出願の一部の実施形態は、サンプル中のシクロホスファミド及び/又はイホスファミドの存在を検出するための、アッセイ接合体を含むイムノアッセイに関し、該アッセイ接合体は、本明細書に記載のシクロホスファミド類似体を含み、このシクロホスファミド類似体は、該類似体化合物の官能基X又はYを介して担体に共有結合している。一部の実施形態では、担体はタンパク質又はポリペプチドから選択される。一部の実施形態では、担体は、アルブミン若しくはそのフラグメント、血清タンパク質、リボタンパク質、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)、オボアルブミン、ウシチログロブリン(BTG)、合成ポリ(アミノ酸)、ポリアミノ-多糖、ポリ核酸、ポリアミノ酸、多糖、又は固体粒子の少なくとも1つを含む。

【0013】

本出願の一部の実施形態は、サンプル中のシクロホスファミド及び/又はイホスファミドの存在を検出するための試薬を含むキットに関し、該試薬の1つは、本明細書に記載のシクロホスファミド類似体に、この類似体化合物の官能基X又はYを介して共有結合している担体の接合体である。一部の実施形態では、担体はタンパク質又はポリペプチドから選択される。一部の実施形態では、キットは、本明細書に記載の抗体をさらに含む。一部の実施形態では、抗体は、本明細書に記載のシクロホスファミド及び/又はイホスファミドに結合する。

一部の実施形態では、本明細書に記載のシクロホスファミド類似体は、Xに共有結合した担体をさらに含み、この担体は、アルブミン若しくはそのフラグメント、血清タンパク質、リボタンパク質、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)、オボアルブミン、ウシチログロブリン(BTG)、合成ポリ(アミノ酸)、ポリアミノ-多糖、ポリ核酸、ポリアミノ酸、多糖、又は固体粒子の少なくとも1つを含む。一部の実施形態では、本明細書に記載のシクロホスファミド類似体は、Yに共有結合した担体をさらに含み、この担体は、アルブミン若しくはそのフラグメント、血清タンパク質、リボタンパク質、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)、オボアルブミン、ウシチログロブリン(BTG)、合成ポリ(アミノ酸)、ポリアミノ-多糖、ポリ核酸、ポ

リアミノ酸、多糖、又は固体粒子の少なくとも1つを含む。

【0014】

本出願の一部の実施形態は、本明細書に記載のシクロホスファミド類似体、例えば本明細書に記載どおりに、Xに共有結合した担体、及び/又はYに共有結合した担体をさらに含むシクロホスファミド類似体に特異的に結合する抗体に関する。一部の実施形態では、抗体は、式(III)の非環式シクロホスファミドに対する解離定数(K_d)の数値的に1/10未満である解離定数で環式シクロホスファミドに結合する。一部の実施形態では、抗体は、式(II)の非環式シクロホスファミドに対する解離定数(K_d)の数値的に1/1000未満である解離定数で環式シクロホスファミドに結合する。一部の実施形態では、抗体はモノクローナル抗体を含む。一部の実施形態では、抗体はポリクローナル抗体を含む。

10

【0015】

本出願の一部の実施形態は、シクロホスファミドに特異的に結合する抗体の作製方法に関する。本方法は、宿主生物に、本明細書に記載の免疫原又は式(I)の化合物(担体がX又はYに共有結合しており、この担体は、アルブミン若しくはそのフラグメント、血清タンパク質、リボタンパク質、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)、オボアルブミン、ウシチログロブリン(BTG)、合成ポリ(アミノ酸)、ポリアミノ-多糖、ポリ核酸、ポリアミノ酸、多糖、又は固体粒子の少なくとも1つを含む)、又は式(II)の化合物(担体がXに共有結合しており、この担体は、アルブミン若しくはそのフラグメント、血清タンパク質、リボタンパク質、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)、オボアルブミン、ウシチログロブリン(BTG)、合成ポリ(アミノ酸)、ポリアミノ-多糖、ポリ核酸、ポリアミノ酸、多糖、又は固体粒子の少なくとも1つを含む)を投与することを含むことができる。一部の実施形態では、担体はKLHを含む。本方法は、宿主生物から抗体産生細胞又は抗体を単離することを含むことができる。本方法は、抗体産生細胞由来の抗体又は宿主生物由来の抗体をシクロホスファミドへの親和性についてスクリーニングすることを含むことができる。一部の実施形態では、宿主生物は、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ロバ、又はヤギを含む。一部の実施形態では、担体はKLHを含む。一部の実施形態では、抗体産生細胞を単離し、該抗体産生細胞に由来する抗体をシクロホスファミドへの親和性についてスクリーニングし、かつシクロホスファミドに特異的に結合する抗体はモノクローナルである。一部の実施形態では、本方法は、単離した抗体産生細胞からハイブリドーマを構築することをさらに含む。一部の実施形態では、本方法は、単離した抗体産生細胞からの核酸をファージディスプレイ法によってスクリーニングすることさらに含む。一部の実施形態では、本方法は、式(III)の非環式代謝物に比べてシクロホスファミドに特異的に結合する抗体についてスクリーニングすることをさらに含む。一部の実施形態では、宿主生物からの抗体をシクロホスファミドへの親和性についてスクリーニングし、かつシクロホスファミドに特異的に結合する抗体はポリクローナルである。

20

30

【0016】

本出願の一部の実施形態は、イホスファミドに特異的に結合する抗体の作製方法に関する。本方法は、宿主生物に、本明細書に記載の免疫原又は式(I)の化合物(担体がX又はYに共有結合しており、この担体は、アルブミン若しくはそのフラグメント、血清タンパク質、リボタンパク質、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)、オボアルブミン、ウシチログロブリン(BTG)、合成ポリ(アミノ酸)、ポリアミノ-多糖、ポリ核酸、ポリアミノ酸、多糖、又は固体粒子の少なくとも1つを含む)、又は式(II)の化合物(担体がXに共有結合しており、この担体は、アルブミン若しくはそのフラグメント、血清タンパク質、リボタンパク質、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)、オボアルブミン、ウシチログロブリン(BTG)、合成ポリ(アミノ酸)、ポリアミノ-多糖、ポリ核酸、ポリアミノ酸、多糖、又は固体粒子の少なくとも1つを含む)を投与することを含むことができる。一部の実施形態では、担体はKLHを含む。本方法は、宿主生物から抗体産生細胞又は抗体を単離することを含むことができる。本方法は、前記抗体産生細胞に由来する抗体又は前記宿主生物に由来する抗体をイホスファミドへの親

40

50

和性についてスクリーニングすることを含むことができる。一部の実施形態では、宿主生物は、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ロバ、又はヤギを含む。一部の実施形態では、担体はKLHを含む。一部の実施形態では、抗体産生細胞を単離し、該抗体産生細胞に由来する抗体をイホスファミドへの親和性についてスクリーニングすることを含み、かつイホスファミドに特異的に結合する抗体はモノクローナルである。一部の実施形態では、本方法は、単離した抗体産生細胞からハイブリドーマを構築することをさらに含む。一部の実施形態では、本方法は、単離した抗体産生細胞からの核酸をファージディスプレイ法によってスクリーニングすることをさらに含む。一部の実施形態では、本方法は、式(III)の非環式代謝物に比べてイホスファミドに特異的に結合する抗体についてスクリーニングすることをさらに含む。一部の実施形態では、宿主生物からの抗体をイホスファミドへの親和性についてスクリーニングすることを含み、かつイホスファミドに特異的に結合する抗体はポリクローナルである。

10

【発明を実施するための形態】

【0017】

実施形態の詳細な説明
定義

特に定義のない限り、本明細書で使用する全ての技術用語及び科学用語は、当業者が一般的に理解するのと同じ意味を有する。本明細書で参照する全ての特許、出願、公開出願及び他の出版物は、特に指定のない限り、参照によってそれらの内容全体が援用される。ある用語について本明細書に複数の定義が存在する場合には、特に指定のない限り、このセクションの定義が優先する。本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用する場合。単数形「a」、「an」及び「the」には、文脈により明白に指示されていない限り、複数の参照対象が含まれる。特に指定のない限り、質量分析、NMR、HPLC、タンパク質化学、生化学、組換えDNA技術及び薬理学の通常の方法を利用する。「又は」又は「及び」の使用は、特に指定のない限り、「及び/又は」を意味する。さらに、用語「包含する(including)」並びに他の形態、例えば「包含する(include)」、「包含する(includes)」、及び「包含される(included)」の使用は限定的でない。本明細書で使用する場合、請求項の移行句であることが主要部であることが、用語「含む(comprise(s))」及び「含む(comprising)」は、非限定的(open-ended)意味を有するものと解釈すべきである。すなわち、これらの用語は、表現「少なくとも有する」又は「少なくとも包含する」と同義に解釈すべきである。プロセスの文脈で使用する場合には、用語「含む(comprising)」は、プロセスが少なくとも列挙した工程を包含するが、追加工程を包含し得ることを意味する。化合物、組成物、又は装置の文脈で使用する場合には、用語「含む(comprising)」は、化合物、組成物、又は装置が少なくとも列挙した特徴又は成分を包含するが、追加の特徴又は成分をも包含し得ることを意味する。

20

30

【0018】

本明細書で使用するセクション表題は、編成のためだけであり、記載主題を限定するものと解釈すべきでない。

本明細書で使用する場合、「アミン」又は「アミノ」基は、「-NR_AR_B」基を指し、式中、R_A及びR_Bは、それぞれ独立に水素、C₁₋₆アルキル、C₂₋₆アルケニル、C₂₋₆アルキニル、C₃₋₇カルボシクリル、C₆₋₁₀アリール、5-10員ヘテロアリール、及び5-10員ヘテロシクリルから選択される。非限定例としてフリーのアミノ(すなわち、-NH₂)が挙げられる。

40

本明細書で使用する用語「ハロゲン」又は「ハロ」は、元素周期表7列の放射安定性(radio-stable)原子、例えば、フッ素、塩素、臭素、又はヨウ素のいずれか1つを意味し、フッ素及び塩素が好ましい。

本明細書で使用する場合、「カルボン酸」は、「-(C=O)-OH」基を指す。

本明細書で使用する場合、「ヒドラジド」は、「-(C=O)-NH-NH₂」基を指す。

本明細書で使用する場合、「ヒドラジン」は、「-NH-NH₂」基を指す。

本明細書で使用する場合、「オキシム」は、「-RC=N-OH」基を指し、式中、Rは、水素、C₁₋₆アルキル、C₂₋₆アルケニル、C₂₋₆アルキニル、C₃₋₇カルボシクリル、C₆₋₁₀アリー

50

ル、5-10員ヘテロアリアル、及び5-10員ヘテロ環から選択される。

本明細書で使用する場合、「チオール」は、「-SH」基を指す。

【0019】

本明細書で使用する場合、「アルキル」は、完全に飽和している(すなわち、二重結合又は三重結合を含有しない)直線又は分岐炭化水素鎖を指す。アルキル基は、1~20個の炭素原子を有し得る(本明細書で現れるときはいつでも、「1~20」等の数値範囲は、所与の範囲の各整数を指し;例えば、「1~20個の炭素原子」は、アルキル基が1個の炭素原子、2個の炭素原子、3個の炭素原子等から20個まで(20個を含めて)の炭素原子から成り得るが、本定義は、数値範囲を指定しない用語「アルキル」の存在をもカバーする)。アルキル基は、1~9個の炭素原子を有する中間サイズのアルキルであってもよい。アルキル基は、1~4個の炭素原子を有する低級アルキルでもあり得る。アルキル基を「C₁₋₄アルキル」又は同様に指定し得る。例のみとして、「C₁₋₄アルキル」は、アルキル鎖に1~4個の炭素原子があることを示し、すなわち、該アルキル鎖は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、及びt-ブチルから成る群より選択される。典型的なアルキル基としては、限定するものではないが、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、三級ブチル、ペンチル、ヘキシル等が挙げられる。

10

【0020】

本明細書で使用する場合、「アルコキシ」は、式-ORを指し、式中、Rは、上記定義どおりのアルキルであり、例えば「C₁₋₉アルコキシ」としては、限定するものではないが、メトキシ、エトキシ、n-プロポキシ、1-メチルエトキシ(イソプロポキシ)、n-ブトキシ、イソブトキシ、sec-ブトキシ、及びtert-ブトキシ等が挙げられる。

20

本明細書で使用する場合、「アルキルチオ」は、式-SRを指し、式中、Rは、上記定義どおりのアルキルであり、例えば「C₁₋₉アルキルチオ」等であり、限定するものではないが、メチルメルカプト、エチルメルカプト、n-プロピルメルカプト、1-メチルエチルメルカプト(イソプロピルメルカプト)、n-ブチルメルカプト、イソブチルメルカプト、sec-ブチルメルカプト、tert-ブチルメルカプト等が挙げられる。

【0021】

本明細書で使用する場合、「アルケニル」は、1つ以上の二重結合を含有する直線又は分岐炭化水素鎖を指す。アルケニル基は、2~20個の炭素原子を有し得るが、本定義は、数値範囲を指定しない用語「アルケニル」の存在をもカバーする。アルケニル基は、2~9個の炭素原子を有する中間サイズのアルケニルであってもよい。アルケニル基は、2~4個の炭素原子を有する低級アルケニルでもあり得る。アルケニル基を「C₂₋₄アルケニル」又は同様に指定し得る。例のみとして、「C₂₋₄アルケニル」は、アルケニル鎖に2~4個の炭素原子があることを示し、すなわち、アルケニル鎖は、エテニル、プロペン-1-イル、プロペン-2-イル、プロペン-3-イル、ブテン-1-イル、ブテン-2-イル、ブテン-3-イル、ブテン-4-イル、1-メチル-プロペン-1-イル、2-メチル-プロペン-1-イル、1-エチル-エテン-1-イル、2-メチル-プロペン-3-イル、ブタ-1,3-ジエニル、ブタ-1,2-ジエニル、及びブタ-1,2-ジエン-4-イルから成る群より選択される。典型的なアルケニル基としては、決して限定するものではないが、エテニル、プロペニル、ブテニル、ペンテニル、及びヘキセニル等が挙げられる。

30

40

【0022】

本明細書で使用する場合、「アルキニル」は、1つ以上の三重結合を含有する直線又は分岐炭化水素鎖を指す。アルキニル基は、2~20個の炭素原子を有し得るが、本定義は、数値範囲を指定しない用語「アルキニル」の存在をもカバーする。アルキニル基は、2~9個の炭素原子を有する中間サイズのアルキニル基であってもよい。アルキニル基は、2~4個の炭素原子を有する低級アルキニルでもあり得る。アルキニル基を「C₂₋₄アルキニル」又は同様に指定し得る。例のみとして、「C₂₋₄アルキニル」は、アルキニル鎖に2~4個の炭素原子があることを示し、すなわち、アルキニル鎖は、エチニル、プロピン-1-イル、プロピン-2-イル、ブチン-1-イル、ブチン-3-イル、ブチン-4-イル、及び2-ブチニルから成る群より選択される。典型的なアルキニル基としては、決して限定するものではないが

50

、エチニル、プロピニル、ブチニル、ペンチニル、及びヘキシニル等が挙げられる。

【0023】

本明細書で使用する場合、「アリール」は、環骨格に炭素のみを含有する芳香環又は芳香環系(すなわち、2個の隣接炭素原子を共有する2つ以上の縮合環)を指す。アリールが環系であるときは、系内のあらゆる環が芳香族である。アリール基は、6~18個の炭素原子を有し得るが、本定義は、数値範囲を指定しない用語「アリール」の存在をもカバーする。一部の実施形態では、アリール基は、6~10個の炭素原子を有する。アリール基を「C₆₋₁₀アリール」、「C₆又はC₁₀アリール」、又は同様に指定し得る。アリール基の例としては、限定するものではないが、フェニル、ナフチル、アズレニル、及びアントラセニルが挙げられる。

10

本明細書で使用する場合、「アリールオキシ」及び「アリールチオ」は、RO-及びRS-を指し、式中、Rは、上記定義どおりのアリールであり、例えば「C₆₋₁₀アリールオキシ」又は「C₆₋₁₀アリールチオ」等であり、限定するものではないが、フェノキシが挙げられる。

「アラルキル」又は「アリールアルキル」は、置換基として、アルキレン基を介して連結しているアリール基であり、例えば「C₇₋₁₄アラルキル」等であり、限定するものではないが、ベンジル、2-フェニルエチル、3-フェニルプロピル、及びナフチルアルキルが挙げられる。場合によっては、アルキレン基は低級アルキレン基(すなわち、C₁₋₄アルキレン基)である。

【0024】

20

本明細書で使用する場合、「ヘテロアリール」は、1個以上のヘテロ原子、すなわち、炭素以外の元素、例えば、限定するものではないが、窒素、酸素及び硫黄等を環骨格に含有する芳香環又は環系(すなわち、2個の隣接原子を共有する2つ以上の縮合環)を指す。ヘテロアリールが環系であるときは、系内のあらゆる環が芳香族である。ヘテロアリール基は、5~18個の環員(すなわち、炭素原子及びヘテロ原子を含めた、環骨格を構成する原子の数)を有し得るが、本定義は、数値範囲を指定しない用語「ヘテロアリール」の存在をもカバーする。一部の実施形態では、ヘテロアリール基は、5~10個の環員又は5~7個の環員を有する。ヘテロアリール基を「5-7員ヘテロアリール」、「5-10員ヘテロアリール」、又は同様に指定し得る。ヘテロアリール環の例としては、限定するものではないが、フリル、チエニル、フタラジニル、ピロリル、オキサゾリル、チアゾリル、イミダゾリル、ピラゾリル、イソオキサゾリル、イソチアゾリル、トリアゾリル、チアジアゾリル、ピリジニル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、トリアジニル、キノリニル、イソキノリニル(isoquinlinyl)、ベンゾイミダゾリル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾチアゾリル、インドリル、イソインドリル、及びベンゾチエニルが挙げられる。

30

【0025】

本明細書で使用する場合、「シクロアルキル」は、完全に飽和したカルボシクリル環又は環系を意味する。例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、及びシクロヘキシルが挙げられる。

本明細書で使用する場合、「ヘテロシクリル」は、環骨格に少なくとも1個のヘテロ原子を含有する非芳香族環式環又は環系を意味する。ヘテロシクリルは、縮合、架橋又はスピロ連結様式で結合し得る。ヘテロシクリルは、環系内の少なくとも1つの環が芳香族でないという条件で、いずれの飽和度を有してもよい。ヘテロ原子は、環系内の非芳香環又は芳香環のどちらに存在してもよい。ヘテロシクリル基は、3~20個の環員(すなわち、炭素原子及びヘテロ原子を含めた、環骨格を構成する原子の数)を有し得るが、本定義は、数値範囲を指定しない用語「ヘテロシクリル」の存在をもカバーする。ヘテロシクリル基は、3~10個の環員を有する中間サイズのヘテロシクリルであってもよい。ヘテロシクリル基は、3~6個の環員を有するヘテロシクリルでもあり得る。ヘテロシクリル基を「3-6員ヘテロシクリル」又は同様に指定し得る。好ましい6員単環式ヘテロシクリルでは、ヘテロ原子は、1から3個までのO、N又はSから選択され、好ましい5員単環式ヘテロシクリルでは、ヘテロ原子は、O、N、又はSから選択される1又は2個のヘテロ原子から選択される

40

50

。ヘテロシクリル環の例としては、限定するものではないが、アゼピニル、アクリジニル、カルバゾリル、シンノリニル、ジオキサニル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、モルホリニル、オキシラニル、オキセパニル、チエパニル、ペリリジニル、ペラジニル、ジオキソペラジニル、ピロリジニル、ピロリドニル、ピロリジオニル、4-ペリドニル、ピラゾリニル、ピラゾリジニル、1,3-ジオキシニル、1,3-ジオキサニル、1,4-ジオキシニル、1,4-ジオキサニル、1,3-オキサチアニル、1,4-オキサチニル、1,4-オキサチアニル、2H-1,2-オキサジニル、トリオキサニル、ヘキサヒドロ-1,3,5-トリアジニル、1,3-ジオキサニル、1,3-ジオキサニル、1,3-ジチオリル、1,3-ジチオラニル、イソオキサゾリニル、イソオキサゾリジニル、オキサゾリニル、オキサゾリジニル、オキサゾリジノニル、チアゾリニル、チアゾリジニル、1,3-オキサチオラニル、インドリニル、イソインドリニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロチオフエニル、テトラヒドロチオピラニル、テトラヒドロ-1,4-チアジニル、チアモルホリニル、ジヒドロベンゾフラニル、ベンゾイミダゾリジニル、及びテトラヒドロキノリンが挙げられる。

【0026】

本明細書で使用する場合、「アシル」は、 $-C(=O)R$ を指し、式中、Rは、本明細書で定義するように、水素、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニル、 C_{3-7} カルボシクリル、 C_{6-10} アリール、5-10員ヘテロアリール、及び5-10員ヘテロシクリルである。非限定

としては、ホルミル、アセチル、プロパノイル、ベンゾイル、及びアクリルが挙げられる。

「O-カルボキシ」基は「 $-OC(=O)R$ 」基を指し、式中、Rは、本明細書で定義するように、水素、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニル、 C_{3-7} カルボシクリル、 C_{6-10} アリール、5-10員ヘテロアリール、及び5-10員ヘテロシクリルから選択される。

「C-カルボキシ」基は「 $-C(=O)OR$ 」基を指し、式中、Rは、本明細書で定義するように、水素、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニル、 C_{3-7} カルボシクリル、 C_{6-10} アリール、5-10員ヘテロアリール、及び5-10員ヘテロシクリルから選択される。非限定例としては、カルボキシル(すなわち、 $-C(=O)OH$)が挙げられる。

「シアノ」基は「 $-CN$ 」基を指す。

【0027】

「S-スルホンアミド」基は「 $-SO_2NR_A R_B$ 」基を指し、式中、 R_A 及び R_B は、本明細書で定義するように、それぞれ独立に水素、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニル、 C_{3-7} カルボシクリル、 C_{6-10} アリール、5-10員ヘテロアリール、及び5-10員ヘテロシクリルから選択される。

「N-スルホンアミド」基は「 $-N(R_A)SO_2R_B$ 」基を指し、式中、 R_A 及び R_B は、本明細書で定義するように、それぞれ独立に水素、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニル、 C_{3-7} カルボシクリル、 C_{6-10} アリール、5-10員ヘテロアリール、及び5-10員ヘテロシクリルから選択される。

「O-カルバミル」基は「 $-OC(=O)NR_A R_B$ 」基を指し、式中、 R_A 及び R_B は、本明細書で定義するように、それぞれ独立に水素、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニル、 C_{3-7} カルボシクリル、 C_{6-10} アリール、5-10員ヘテロアリール、及び5-10員ヘテロシクリルから選択される。

「N-カルバミル」基は「 $-N(R_A)OC(=O)R_B$ 」基を指し、式中、 R_A 及び R_B は、本明細書で定義するように、それぞれ独立に水素、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニル、 C_{3-7} カルボシクリル、 C_{6-10} アリール、5-10員ヘテロアリール、及び5-10員ヘテロシクリルから選択される。

「O-チオカルバミル」基は「 $-OC(=S)NR_A R_B$ 」基を指し、式中、 R_A 及び R_B は、本明細書で定義するように、それぞれ独立に水素、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニル、 C_{3-7} カルボシクリル、 C_{6-10} アリール、5-10員ヘテロアリール、及び5-10員ヘテロシクリルから選択される。

「N-チオカルバミル」基は「 $-N(R_A)OC(=S)R_B$ 」基を指し、式中、 R_A 及び R_B は、本明細書で定義するように、それぞれ独立に水素、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニル

ル、 C_{3-7} カルボシクリル、 C_{6-10} アリール、5-10員ヘテロアリール、及び5-10員ヘテロシクリルから選択される。

【0028】

「C-アミド」基は「 $-C(=O)NR_AR_B$ 」基を指し、式中、 R_A 及び R_B は、本明細書で定義するように、それぞれ独立に水素、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニル、 C_{3-7} カルボシクリル、 C_{6-10} アリール、5-10員ヘテロアリール、及び5-10員ヘテロシクリルから選択される。

「N-アミド」基は「 $-N(R_A)C(=O)R_B$ 」基を指し、式中、 R_A 及び R_B は、本明細書で定義するように、それぞれ独立に水素、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニル、 C_{3-7} カルボシクリル、 C_{6-10} アリール、5-10員ヘテロアリール、及び5-10員ヘテロシクリルから選択される。

10

「アミノアルキル」基は、アルキレン基によって連結されたアミノ基を指す。

「アルコキシアルキル」基は、アルキレン基によって連結されたアルコキシ基、例えば「 C_{2-8} アルコキシアルキル」等を指す。

【0029】

本明細書で開示する化合物が少なくとも1つのキラル中心を有する場合、該化合物は、個々のエナンチオマー及びジアステレオマーとして又はラセミ体を含め、該異性体の混合物として存在し得る。個々の異性体の分離又は個々の異性体の選択的合成は、当技術分野の熟練家に周知である種々の方法を適用して達成される。特に指定のない限り、全ての該異性体及びその混合物は、本明細書で開示する化合物の範囲に包含される。

20

「免疫原」及び「免疫原性」という用語は、生物において免疫応答を誘発し、引き起こし、又は生み出すことができる物質を指す。

用語「接合体」は、2つの部分の連結から形成されるいずれの物質をも指す。本明細書の一部の実施形態に従う代表的な接合体としては、式(I)又は(II)の化合物等の小分子と、担体又はポリアミンポリマーとの連結、特にタンパク質等の大分子との連結によって形成されるものがある。接合体においては、小分子は大分子の1つ以上の活性部位に連結し得る。

【0030】

「ハプテン」は、部分抗原又は不完全抗原である。それらは、タンパク質を含まない物質、大部分は低分子量物質であり、抗体形成を刺激できないが、抗体と反応する。抗体は、ハプテンを高分子量の免疫原性担体に結合させてからこの結合生成物、すなわち、免疫原をヒト又は動物対象に注入することによって形成される。

30

用語「抗体」は、抗原に特異的なタンパク質結合相手を指し、他の物質を排除して抗原に特異的な結合親和性を有するいずれの物質、又は物質群でもある。総称抗体は、ポリクロナール抗体、モノクロナール抗体及び抗体フラグメントを包含する。

本明細書で使用する「免疫原性担体」は、ハプテンと結合することができ、それによってこれらのハプテン誘導体が免疫応答を誘導し、これらのハプテンと特異的に結合できる抗体の産生を誘発できるようにする免疫原性物質、一般的にタンパク質である。免疫原性担体物質には、異物として認識され、それによって宿主から免疫学的応答を誘発するタンパク質、糖タンパク質、複雑なポリアミノ-多糖、粒子、及び核酸が含まれる。ポリアミノ-多糖は、多糖から、この調製のために知られる通常の手段のいずれを用いても調製可能である。

40

【0031】

また、種々のタンパク質タイプをポリ(アミノ酸)免疫原性担体として利用し得る。これらのタイプには、アルブミン、血清タンパク質、リボタンパク質等が含まれる。例示タンパク質としては、ウシ血清アルブミン(BSA)、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、オボアルブミン、ウシチログロブリン(BTG)等が挙げられる。これとは別に、合成ポリ(アミノ酸)を利用してよい。一部の実施形態では、KLHを免疫原性担体として使用する。

免疫原性担体が、単糖の反復縮合によって構成された高分子量ポリマーであるポリアミノ-多糖を含むこともある。多糖の例は、デンプン、グリコーゲン、セルロース、炭水化

50

物ガム、例えばアラビアガム、寒天等が挙げられる。多糖が、ポリアミノ酸残基及び／又は脂質残基を含有してもよい。

免疫原性担体は、単独であるか又は上記ポリ(アミノ酸)若しくは多糖の1つに接合したポリ(核酸)でもあり得る。

免疫原性担体は固体粒子を含むこともある。粒子は一般的に少なくとも約0.02ミクロン(μm)であり、約100 μm を超えず、通常は直径が約0.05 μm ~10 μm である。

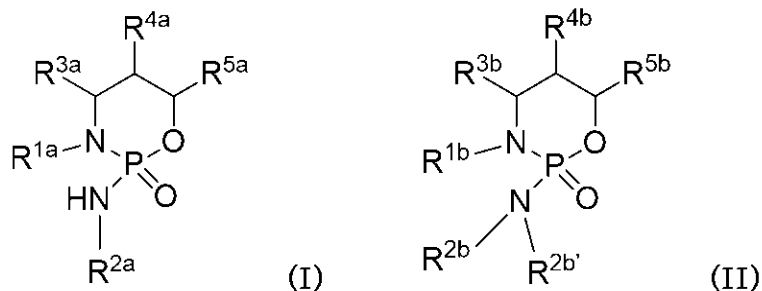
【0032】

シクロホスファミド類似体

本出願の一部の実施形態は、下記式(I)又は(II)の構造を含むシクロホスファミド類似体に関する。

【0033】

【化3】



10

20

【0034】

式中、 R^{1a} は、水素又は $-(\text{CH}_2)_m\text{-X}$ から選択され；

R^{2a} は $-(\text{CH}_2)_n\text{-Y}$ であり；

R^{1b} は $-(\text{CH}_2)_m\text{-X}$ であり；

R^{2b} 及び $\text{R}^{2b'}$ は、それぞれ独立に $-(\text{CH}_2)_k\text{-Z}$ から選択され；

R^{3a} 、 R^{4a} 、 R^{5a} 、 R^{3b} 、 R^{4b} 及び R^{5b} は、それぞれ独立に水素、ハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、 $\text{C}_1\text{-C}_6$ アルキル、 $\text{C}_2\text{-C}_6$ アルケニル、 $\text{C}_2\text{-C}_6$ アルキニル、 $\text{C}_3\text{-C}_7$ シクロアルキル、5-10員ヘテロシクリル、アリール、アラールキル、5-10員ヘテロアリール、 $\text{C}_1\text{-C}_6$ アルコキシ、 $\text{C}_1\text{-C}_6$ アルコキシ($\text{C}_1\text{-C}_6$)アルキル、アリールオキシ、ハロ($\text{C}_1\text{-C}_6$)アルキル、ハロ($\text{C}_1\text{-C}_6$)アルコキシ、 $\text{C}_1\text{-C}_6$ アルキルチオ、アリールチオ、アミノ($\text{C}_1\text{-C}_6$)アルキル、ニトロ、O-カルバミル、N-カルバミル、O-チオカルバミル、N-チオカルバミル、C-アミド、N-アミド、S-スルホンアミド、N-スルホンアミド、C-カルボキシ、O-カルボキシ、アシル、及びオキソ(=O)から選択され；

30

Xは、アミン、チオール、カルボン酸、ヒドラジド、ヒドラジン、オキシム、又はヒドロキシルアミンから選択される官能基であり；

Yは、ハロゲン、ヒドロキシ、アミン、チオール、カルボン酸、ヒドラジド、ヒドラジン、オキシム、又はヒドロキシルアミンから独立に選択される官能基であり；

Zは、ハロゲン又はヒドロキシから選択され；かつ

m、n及びkは、それぞれ独立に2~10の整数である。

40

【0035】

式(I)の化合物の一部の実施形態では、 R^{1a} は水素であり、 R^{2a} は $-(\text{CH}_2)_n\text{-Y}$ である。一部の該実施形態では、Yは、アミン、チオール、カルボン酸、ヒドラジド、ヒドラジン、オキシム、又はヒドロキシルアミンから選択される官能基である。一実施形態では、Yはチオールである。別の実施形態では、Yはカルボン酸である。

式(I)の化合物の一部の実施形態では、 R^{1a} は $-(\text{CH}_2)_m\text{-X}$ であり、Xは、アミン、チオール、カルボン酸、ヒドラジド、ヒドラジン、オキシム、又はヒドロキシルアミンから選択される。一実施形態では、Xはチオールである。別の実施形態では、Xはカルボン酸である。一部の該実施形態では、 R^{2a} は $-(\text{CH}_2)_n\text{-Y}$ であり、Yは、クロリド又はヒドロキシから選択される。

50

【 0 0 3 6 】

式(II)の化合物の一部の実施形態では、 R^{1b} は $-(CH_2)_m-X$ であり、Xは、アミン、チオール、カルボン酸、ヒドラジド、ヒドラジン、オキシム、又はヒドロキシルアミンから選択される官能基である。一実施形態では、Yはチオールである。別の実施形態では、Yはカルボン酸である。一部の該実施形態では、 R^{2b} 及び $R^{2b'}$ は、それぞれ $-(CH_2)_k-Z$ であり、Zは、クロリド又はヒドロキシから選択される。

式(I)又は(II)の化合物の一部の実施形態では、mは整数2である。一部の他の実施形態では、mは整数3である。

式(I)又は(II)の化合物の一部の実施形態では、nは整数2である。

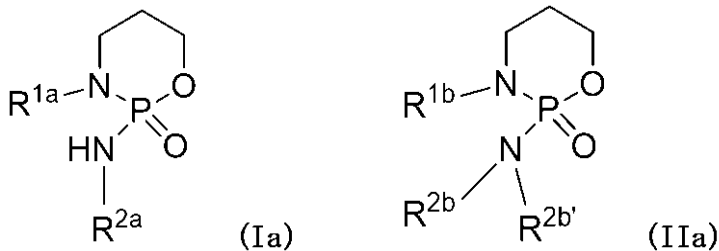
式(I)又は(II)の化合物の一部の実施形態では、kは整数2である。

式(I)又は(II)の化合物の一部の実施形態では、各リンカー基 $-(CH_2)_m-$ 、 $-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_k-$ は、任意に置換されていてもよい。或いは、1個以上の炭素原子が、O、S、又はN等の1個以上のヘテロ原子と置き換わっていてもよい。

式(I)又は(II)の化合物の一部の実施形態では、 R^{3a} 、 R^{4a} 、 R^{5a} 、 R^{3b} 、 R^{4b} 及び R^{5b} の少なくとも1つが水素である。一部の好ましい実施形態では、 R^{3a} 、 R^{4a} 、 R^{5a} 、 R^{3b} 、 R^{4b} 及び R^{5b} がそれぞれ水素であり、式(I)及び(II)が下記式(Ia)及び(IIa)で表される。

【 0 0 3 7 】

【 化 4 】



【 0 0 3 8 】

抗体

一部の実施形態は、抗体、及び/又は抗体の作製方法を含む。本明細書で使用する場合、「抗体」は、完全長抗体、及び特に指定のない限り、その抗原結合フラグメントを指す。本明細書の実施形態に従って抗体の抗原結合フラグメントの体裁を種々のタンパク質フォーマットに整えることができる。抗体の抗原結合フラグメント、又は本明細書で使用する「抗体フラグメント」には、インタクト抗体の抗原結合部位又は可変領域を含むインタクト抗体の部分が含まれる。インタクト抗体のFc領域の定常重鎖ドメイン(すなわち抗体のアイソタイプに応じて C_{H2} 、 C_{H3} 、及び $H4$)、又はその一部がない抗体フラグメントもある。抗体フラグメントの例としては、限定するものではないが、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、及びFvフラグメント；ミニボディ；二重特異性抗体；近接アミノ酸残基の1つの中斷されていない配列から成る一次構造を有するポリペプチドである任意の抗体フラグメント(本明細書では「単鎖抗体フラグメント」又は「単鎖ポリペプチド」と称する)、例えば、限定するものではないが、(1)単鎖Fv(scFv)分子、(2)関連重鎖部分なしで、1つの軽鎖可変ドメイン、又は該軽鎖可変ドメインの3つのCDRを含有するそのフラグメントのみを含有する単鎖ポリペプチド及び(3)関連軽鎖部分なしで、1つの重鎖可変ドメイン、又は該重鎖可変ドメインの3つのCDRを含有するそのフラグメントのみを含有する単鎖ポリペプチド等；並びに抗体フラグメントから形成された多特異性又は多価構造体、例えば二重特異性抗体が挙げられる。一部の実施形態では、抗体はモノクローナル抗体である。一部の実施形態では、抗体はキメラ抗体である。一部の実施形態では、抗体はマウス抗体である。一部の実施形態では、抗体はウサギ抗体である。一部の実施形態では、抗体はラット抗体である。一部の実施形態では、抗体はヤギ抗体である。一部の実施形態では、抗体はモルモット抗体である。一部の実施形態では、抗体はロバ抗体である。一部の実施形態では、抗体はヒト化抗体である。一部の実施形態では、抗体はヒト抗体である。

【0039】

抗体は、インビボ、エキスビボ、及び／又はインビトロ条件下で産生可能である。抗体の一般構造は、例えば、抗体構造のその開示について及び全ての目的で参照することにより内容をここに援用する米国特許第6,156,878号に記載されている。天然起源の抗体又は免疫グロブリンは、典型的に4つの共有結合したペプチド鎖の四量体である。例えば、IgG抗体は、2本の軽鎖及び2本の重鎖を有する。各軽鎖が重鎖に共有結合している。そして次に各重鎖が他方に共有結合して、免疫グロブリンコンフォメーションとしても知られる「Y」形状を形成する。これらの分子のフラグメント、又は重鎖若しくは軽鎖のみでさえが抗原に結合することができる。抗体、抗体フラグメント、及び個々の鎖をも本明細書では免疫グロブリンと称する。

10

【0040】

通常の天然起源の抗体の重鎖又は軽鎖は、N末端(NH₂)可変(V)領域及びC末端(-COOH)定常(C)領域を有する。重鎖可変領域はV_H(例えば、V_Hが含まれる)と呼ばれ、軽鎖可変領域はV_L(V_K又はV_λが含まれる)と呼ばれる。可変領域は、抗体のコグネイト抗原に結合する分子の部分であり、一方Fc領域(C領域の第2及び第3のドメイン)は、抗体のエフェクター機能(例えば、補体結合反応)を決定する。完全長免疫グロブリン又は抗体「軽鎖」(一般的に約25kDa、約214個のアミノ酸)は、N末端の可変領域遺伝子(一般的に約110個のアミノ酸)及びCOOH末端のκ又はλ定常領域遺伝子によってコードされる。完全長免疫グロブリン又は抗体「重鎖」(一般的に約50kDa、約446個のアミノ酸)は、可変領域遺伝子(一般的に約116個のアミノ酸をコードする)及び定常領域遺伝子の1つ、例えばγ(約330個のアミノ酸をコードする)によって同様にコードされる。典型的に、「V_L」は、V_L及び／又はJ_L(J又は連結領域)遺伝子セグメントによってコードされる軽鎖の部分を含むことになり、「V_H」は、V_H及び／又はD_H(D又は多様性領域)及びJ_H遺伝子セグメントによってコードされる重鎖の部分を含むことになる。一般的に、Roitt et al., Immunology (2d ed. 1989), Chapter 6及びPaul, Fundamental Immunology (Raven Press, 2d ed., 1989)(それぞれ参照することにより全ての目的で援用される)を参照されたい。

20

【0041】

免疫グロブリンの軽鎖又は重鎖の可変領域は、相補性決定領域又はCDRとも呼ばれる3つのハイパー可変領域によって中断された「フレームワーク」領域(「FR」、本明細書では「FWR」と称することもある)から成る。CDRは、典型的に、N末端から始まって順次番号付けされたCDR1、CDR2、及びCDR3と呼ばれる。N末端からC末端へ、軽鎖も重鎖もドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及びFR4を包含する。本明細書では重鎖のドメインをHFR1、HCDR1、HFR2、HCDR2、HFR3、HCDR3、及びHFR4と称することがある。本明細書では軽鎖のドメインをLFR1、LCDR1、LFR2、LCDR2、LHFR3、LCDR3、及びLFR4と称することがある。フレームワーク領域及びCDRの広さは明らかにされている(Kabat et al. (1987), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," U.S. Department of Health and Human Services; Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)参照)(それぞれ参照することにより全ての目的でここに援用される)。異なる軽鎖又は重鎖のフレームワーク領域の配列は種内で比較的保存されている。抗体のフレームワーク領域、すなわち、構成する軽鎖と重鎖の組み合わせたフレームワーク領域は、三次元空間にCDRを配置及び整列させる働きをする。CDRは、主に抗原のエピトープへの結合に参与している。

30

40

【0042】

重鎖分子の定常領域は、C_Hとしても知られ、抗体のアイソタイプを決定する。抗体は、重鎖のアイソタイプに応じてIgM、IgD、IgG、IgA、及びIgEと呼ばれる。アイソタイプは、重鎖定常領域のそれぞれμ、δ、γ、α、及びεセグメントにコードされる。さらに、いくつかのγサブタイプがある。軽鎖の2つのタイプ、κ及びλがある。これらのサブタイプの決定因子は、典型的に軽鎖の定常領域に存在し、一般にC_L、特にC_K又はC_λとも呼ばれる。

重鎖アイソタイプは、抗体の様々なエフェクター機能、例えばオプソニン作用又は補体結合反応等を決定することができる。さらに、重鎖アイソタイプは、抗体の分泌型を決定

50

する。分泌IgG、IgD、及びIgEアイソタイプは、典型的に単一単位又は単量体型に見られる。分泌IgMアイソタイプは、五量体型に見られ；分泌IgAは、単量体型でも二量体型でも見られ得る。一部の実施形態では、本明細書に記載の抗体、例えばモノクローナル抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgE、又はIgMアイソタイプを有する。

【0043】

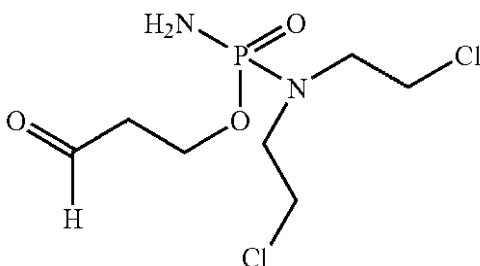
本明細書で使用する場合、用語「特異的に」、「選択的に」等は、これらの根源用語の変形を含め、抗体がさらされている少なくとも1つの他の物質より高い度合で指示エピトープに結合する抗体を指す。例えば、一部の実施形態では、抗体は、シクロホスファミド又はイホスファミドに特異的に結合できるが、その非環式代謝物に結合できない。一部の実施形態では、抗体は、本明細書に記載のシクロホスファミド又はイホスファミドに数値的に約 10^{-6} M未満(K_d 値が小さいほど、より密接に結合することを表す)、例えば、約 10^{-6} M、 5×10^{-7} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M、 5×10^{-13} M、又は 10^{-13} M未満(列挙値の任意の2つの間の範囲、例えば、 10^{-6} M $\sim 10^{-13}$ M、 10^{-6} M $\sim 5 \times 10^{-13}$ M、 10^{-7} M $\sim 10^{-13}$ M、 10^{-7} M $\sim 5 \times 10^{-13}$ M、 10^{-8} M $\sim 10^{-13}$ M、 10^{-8} M $\sim 5 \times 10^{-13}$ M、 10^{-9} M $\sim 10^{-13}$ M、又は 10^{-9} M $\sim 5 \times 10^{-13}$ Mを含む)の K_d で選択的に結合する。一部の実施形態では、抗体は、シクロホスファミド又はイホスファミドに、本明細書に記載どおりに数値的に約 10^{-6} M未満の K_d で結合し、かつ本明細書に記載の式(I)又は式(II)の接合体にも結合する。一部の実施形態では、抗体は、シクロホスファミドに約 10^{-6} M未満、例えば約 10^{-6} M、 5×10^{-7} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M、 5×10^{-13} M、又は 10^{-13} M未満(列挙値の任意の2つの間の範囲を含む)の K_d で特異的に結合し、かつ本明細書に記載の式(I)又は式(II)の接合体にも数値的に約 10^{-6} M未満の K_d で結合する。

【0044】

一部の実施形態では、抗体は、シクロホスファミドの非環式代謝物に対するより強い解離係数(K_d)でシクロホスファミドに特異的に結合する。ここで、シクロホスファミドに対する K_d は、シクロホスファミドの非環式代謝物に対する K_d の数値的に約1/10未満、例えば1/10、1/20、1/50、1/100、1/500、1/1000、1/5000、1/10000、1/50000、又は1/100000未満(列挙値の任意の2つの間の範囲を含む)である。好ましい実施形態では、シクロホスファミドの非環式代謝物は下記式(III)を有する。

【0045】

【化5】



(III)

【0046】

一部の実施形態では、抗体は、本明細書に記載のYに共有結合した担体を含む式(I)の化合物にさらに結合する。一部の実施形態では、抗体は、本明細書に記載のXに共有結合した担体を含む式(I)の化合物にさらに結合する。一部のさらなる実施形態では、抗体は、本明細書に記載のXに共有結合した担体を含む式(II)の化合物にさらに結合する。

一部の実施形態では、抗体は、シクロホスファミドの非環式代謝物に対するより強い解離係数(K_d)でイホスファミドに特異的に結合する。ここで、イホスファミドに対する K_d は、シクロホスファミドの非環式代謝物に対する K_d の数値的に約1/10未満、例えば1/10、1/20、1/50、1/100、1/500、1/1000、1/5000、1/10000、1/50000、又は1/100000未満(列挙値の任意の2つの間の範囲を含む)であり、かつシクロホスファミドの非環式代謝物は式(III)を有する。一部の実施形態では、抗体は、本明細書に記載のYに共有結合した担体を

含む式(I)の化合物にさらに結合する。一部の実施形態では、抗体は、本明細書に記載のXに共有結合した担体を含む式(I)の化合物にさらに結合する。一部のさらなる実施形態では、抗体は、本明細書に記載のXに共有結合した担体を含む式(II)の化合物にさらに結合する。

【0047】

免疫原 / アッセイ接合体

上述したように、式(I)又は(II)のシクロホスファミド類似体の官能基X又はYは、免疫原性ポリマー担体に共有結合して免疫原を形成することができる。或いは、これらの官能基は、これらのポリマー又は担体が免疫原の必要に応じて免疫学的応答を引き起こす必要がないことを除き、同ポリマー又は担体に共有結合して接合体を形成することができる。一実施形態では、X又はYは、担体タンパク質のアミノ基と結合できるカルボン酸基又はその活性エステルである。別の実施形態では、X又はYは、チオール基である。一部の実施形態では、ポリマー担体は、式(I)又は式(II)のシクロホスファミド類似体にアミド結合によって共有結合している。アミド結合は、カルボキシル基を脱離基試薬(例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、p-ニトロフェノール等)と反応させることによって、X又はYのカルボン酸部分を活性化することによって形成可能である。ジシクロヘキシルカルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミド等の活性化試薬を使用することができる。次にカルボキシル基の活性化形を、ポリマー担体、例えばポリペプチドを含有する緩衝溶液と反応させることができる。或いは、X又はYのアミン部分をポリマー担体の活性化カルボン酸部分と反応させることによってアミド結合を形成することができる。

10

20

【0048】

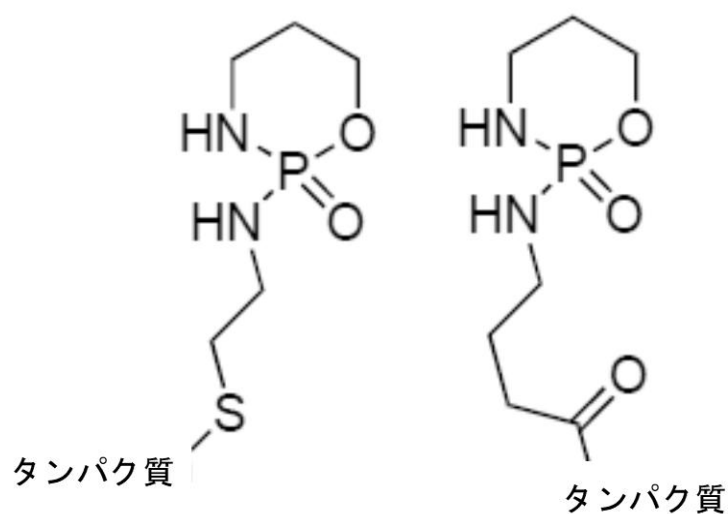
一部の実施形態では、ポリマー担体は、チオエーテル(-S-)結合によって式(I)又は式(II)のシクロホスファミド類似体に共有結合している。チオエーテル結合は、X又はYのチオール部分をポリマー担体、例えば、マレイミド又はヨードアセトアミド部分を含有する担体の活性化又は改変アミン基で架橋することによって形成可能である。或いは、X又はYのチオール部分をポリマー担体の活性化又は改変カルボン酸基と反応させてチオエステルを形成することによってチオエーテル結合を形成することができる。N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)等の典型的なカップリング薬をこの反応に使用し得る。一部の実施形態では、ポリペプチド担体は、式(I)又は式(II)のシクロホスファミド類似体にマレイミド化学を介して共有結合している。この場合、担体の1つ以上のリジン残基がスルフヒドリル反応性マレイミド基に変換され、ポリペプチド担体がスルフヒドリル(-SH)基でシクロホスファミド類似体に結合している。

30

式(I)のシクロホスファミド類似体から調製される非限定の例示免疫原又は接合体を以下に示す。

【0049】

【化 6】



10

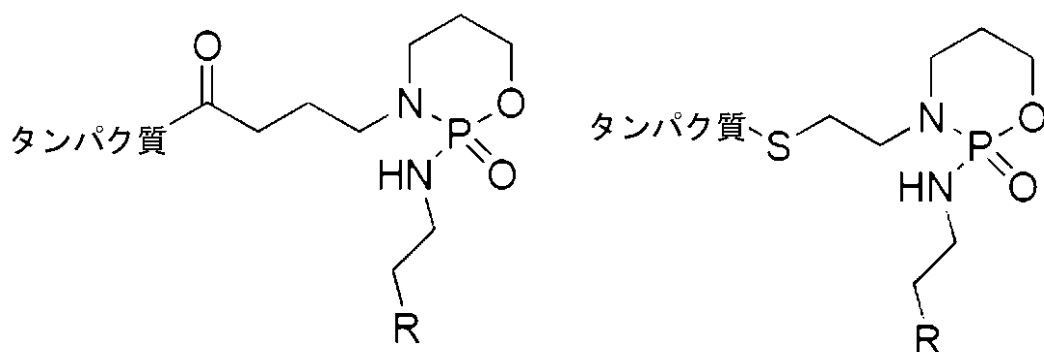
【 0 0 5 0】

この場合、式(I)又は(1a)に関して、 R^{1a} は水素であり、 $Y(R^{2a}$ に関して)は、担体タンパク質と接合したチオール又はカルボン酸であり；又は

20

【 0 0 5 1】

【化 7】



30

(R = Cl、OH)

【 0 0 5 2】

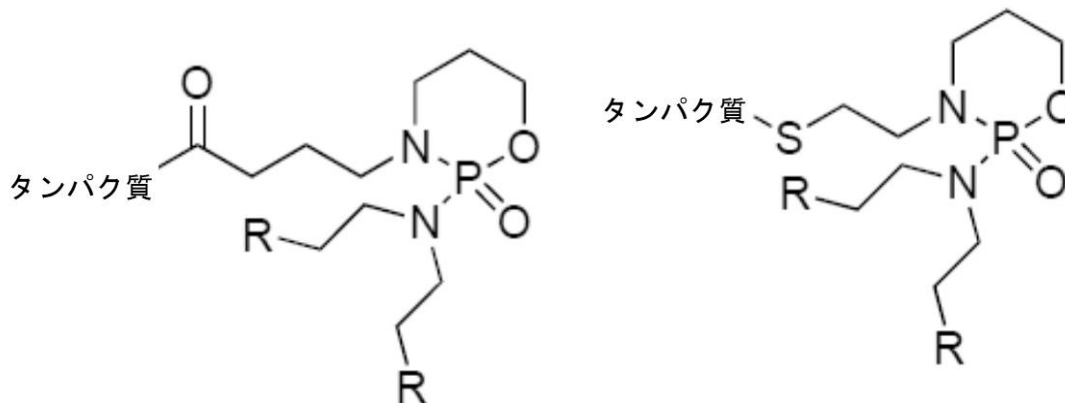
この場合、式(I)又は(1a)に関して、 $X(R^{1a}$ に関して)は、担体タンパク質と接合したチオール又はカルボン酸であり、 R^{2a} は $-(CH_2)_2R$ (Rは、式(I)又は(1a)の R^{2a} の定義中のYに相当し、Rは、クロロ又はヒドロキシから選択され得る)である。

40

さらに、式(II)のシクロホスファミド類似体から調製される非限定の例示免疫原又は接合体を以下に示す。

【 0 0 5 3】

【化 8】



(R = Cl、OH)

【0054】

この場合、式(II)又は(IIa)に関して、 $X(R^{1b})$ に関して)は、担体タンパク質と接合したチオール又はカルボン酸であり、 R^{2b} 及び $R^{2b'}$ はそれぞれ独立に $-(CH_2)_2R$ (Rは、式(II)又は(IIa)の R^{2b} 及び $R^{2b'}$ の定義中のZに相当し、Rはクロロ又はヒドロキシから選択され得る)である。

一部の実施形態では、式(I)の化合物は、下記を含むか、下記から成るか、又は下記から本質的に成る担体に接合している：アルブミン若しくはそのフラグメント、血清タンパク質、リボタンパク質、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)、オボアルブミン、ウシチログロブリン(BTG)、合成ポリ(アミノ酸)、ポリアミノ-多糖、ポリ核酸、ポリアミノ酸、多糖、又は固体粒子(担体に接合した該化合物を本明細書では「接合体」と呼ぶことがあり、この根源用語の変形を含む)。担体は、本明細書に記載どおりに、Y又はXに共有結合することができる。一部の実施形態では、式(I)の化合物は、KLHを含むか、又はKLHから成るか、又はKLHから本質的に成る担体に接合している。

【0055】

一部の実施形態では、式(II)の化合物は、下記を含むか、下記から成るか、又は下記から本質的に成る担体に接合している：アルブミン若しくはそのフラグメント、血清タンパク質、リボタンパク質、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)、オボアルブミン、ウシチログロブリン(BTG)、合成ポリ(アミノ酸)、ポリアミノ-多糖、ポリ核酸、ポリアミノ酸、多糖、又は固体粒子(担体に接合した該化合物を本明細書では「接合体」と呼ぶことがあり、この根源用語の変形を含む)。担体は、Xに共有結合し得る。一部の実施形態では、式(II)の化合物は、KLHを含むか、KLHから成るか、又はKLHから本質的に成る担体に接合している。

一部の実施形態では、担体と式(I)又は(II)の接合体は、単独で或いは式(I)又は(II)の化合物と接合した免疫原性タンパク質から形成された免疫原から産生された抗体と組み合わせ、サンプル中のシクロホスファミド及び/又はイホスファミドの存在を判定するためのイムノアッセイ試薬として利用可能である。

さらに、本出願のアッセイ成分をキットで提供することができる。キットは、追加試薬及び/又は添加剤として、例えば補助的試薬を含有することもでき、例えば、安定剤、緩衝剤等が挙げられる。種々の試薬の相対量を広範に変えて、アッセイの感度を実質的に最適化する試薬の溶液中濃度を与えることができる。試薬は、溶液で又は乾燥粉末として提供可能であり、乾燥粉末は、賦形剤を含めて通常は凍結乾燥状態で提供され、溶解するとアッセイの遂行に適した濃度を有する試薬溶液となる。

【0056】

抗体の作製方法

一部の実施形態では、シクロホスファミド又はイホスファミドに結合する抗体の作製方法を述べる。本方法は、本明細書に記載の担体に接合した式(I)又は式(II)の化合物を含

10

20

30

40

50

む免疫原を準備することを含む。本方法は、宿主生物を免疫原で免疫化することを含むことができる。本方法は、抗体産生細胞を宿主生物から単離することを含むことができる。本方法は、宿主生物からの抗体産生細胞を、式(I)又は式(II)の化合物、例えばシクロホスファミド又はイホスファミドに特異的に結合する抗体についてスクリーニングすることを含むことができる。

種々の異なる技術を用いて適切な抗体を産生させ得る。一部の実施形態では、非ヒト宿主、例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ロバ、ウマ、又はラクダを抗原、例えば本明細書に記載どおりに接合したシクロホスファミド又はイホスファミドで免疫化する。一部の実施形態では、宿主生物は、その内在性免疫グロブリン遺伝子を含む。一部の実施形態では、宿主生物を、異なる生物、例えばヒトの1つ以上の免疫グロブリン遺伝子を含むように遺伝子改変する。一部の実施形態では、宿主生物を、1つ以上のヒト免疫グロブリン遺伝子を含み、かつさらにいずれの実質的な宿主の免疫グロブリン遺伝子活性をも有しない(例えば、宿主がその免疫グロブリン遺伝子を欠失させ、転写的に発現停止させ、変異させ、又は別の方法で不活化させた場合)ように遺伝子改変する。一部の実施形態では、本明細書に記載どおりに静脈内、皮下又は筋肉内の少なくとも1つで抗原を送達する。一部の実施形態では、投与計画に基づいて抗原を送達する。

【0057】

一部の実施形態では、例えばモノクローナル抗体が対象であるとき、宿主動物を本明細書に記載の免疫原で免疫化し、抗体産生細胞を宿主動物から回収し、不死化し、シクロホスファミド又はイホスファミドに特異的に結合する抗体についてスクリーニングすることができる(参照によってその内容全体をここに援用するHarlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual Second Edition (C.S.H.P.NY, 2014)参照)。典型的に、抗体産生細胞はB細胞を含むが、別のタイプの抗体産生細胞、V細胞もWO 2010/002883(参照によってその内容全体をここに援用する)に記載されており、一部の実施形態ではこれをも好適な抗体産生細胞として企図する。一部の実施形態では、免疫原は、下記を含むか、下記から成るか、又は下記から本質的に成る担体に接合した式(I)の化合物を含む：アルブミン若しくはそのフラグメント、血清タンパク質、リボタンパク質、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)、オボアルブミン、ウシチログロブリン(BTG)、合成ポリ(アミノ酸)、ポリアミノ-多糖、ポリ核酸、ポリアミノ酸、多糖、又は固体粒子。担体は、Yに共有結合し得る。一部の実施形態では、式(I)の化合物は、KLHを含むか、KLHから成るか、又はKLHから本質的に成る担体に接合し、かつYに共有結合している。一部の実施形態では、式(I)の化合物は、KLHを含むか、KLHから成るか、又はKLHから本質的に成る担体に接合し、かつXに共有結合している。一部の実施形態では、免疫原は、下記を含むか、下記から成るか、又は下記から本質的に成る担体に接合した式(II)の化合物を含む：アルブミン若しくはそのフラグメント、血清タンパク質、リボタンパク質、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)、オボアルブミン、ウシチログロブリン(BTG)、合成ポリ(アミノ酸)、ポリアミノ-多糖、ポリ核酸、ポリアミノ酸、多糖、又は固体粒子。担体は、Xに共有結合し得る。一部の実施形態では、式(II)の化合物は、KLHを含むか、KLHから成るか、又はKLHから本質的に成る担体に接合し、かつYに共有結合している。一部の実施形態では、化合物の1回以上の追加投与、例えば、少なくとも1、2、3、4、又は5回(列挙値の任意の2つの間の範囲を含む)の追加投与で宿主生物をブーストする。

【0058】

抗体産生細胞は、宿主生物から収集可能であり、通常手段、例えばフローサイトメトリー、又は蛍光標識細胞分取(fluorescence activated cell sorting)(FACS(商標))技術を用いて単離可能である。一部の実施形態では、単離した抗体産生細胞を本明細書に記載どおりに、例えばハイブリドーマ技術を用いて不死化する。一部の実施形態では、抗体をコードする核酸を抗体産生細胞から単離し、シクロホスファミド及び/又はイホスファミドへの適切な親和性を有する抗体についてスクリーニングする。

【0059】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、ハイブリドーマ技術を用いて抗体産生宿主細胞を不死化する。ハイブリドーマ手法は技術上周知である。典型的には宿主動物に抗原を注入し、一定時間後に、通常は脾臓から抗体産生細胞を単離することができる。抗体産生細胞をメラノーマ細胞(又は他の不死化細胞)と融合させて、ハイブリドーマと呼ばれる融合細胞を形成することができる。ハイブリドーマを非融合抗体産生細胞及びメラノーマ細胞から分離することができる。特異的ハイブリドーマを単離及び試験して、単離したハイブリドーマが、免疫化工程で用いた抗原に特異的な抗体を産生することを確認することができる。そのように産生されたハイブリドーマは、細胞培養物としてインビトロで又は動物の腹腔内への注入後の腫瘍としてインビボで、親抗体産生細胞の特異的な単一抗体を産生する能力と、その親メラノーマ(又は他の不死化)細胞の継続的に成長及び分割する能力とを併せ持つ。ハイブリドーマ細胞株を用いて、例えば、モノクローナル抗体を産生させ得る。不死化抗体産生細胞を本明細書に記載のシクロホスファミド又はイホスファミドに特異的に結合する抗体についてスクリーニングすることができる。例えば、不死化抗体産生細胞からの上清を、シクロホスファミド又はイホスファミドに結合する抗体の存在についてスクリーニングすることができる。一部の実施形態では、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)を用いて上清をスクリーニングする。例えば、シクロホスファミド又はイホスファミドを基質上に固定化し、不死化抗体産生細胞からの上清とインキュベートすることができ、基質から上清を洗い流すことができ、固定化ホスファミド又はイホスファミドに結合した抗体の存在を例えば二次アッセイを用いて検出することができる。一部の実施形態では、無洗アッセイを用いて上清をスクリーニングする。例えば、FRET対の第1フルオロフォアを用いてシクロホスファミド又はイホスファミドを直接又は間接的に標識し、上清と接触させることができ、シクロホスファミド又はイホスファミドに結合した抗体の存在を溶液中で例えばFRET対の第2フルオロフォア等の標識を含む二次抗体(シクロホスファミド又はイホスファミドへの二次抗体の近接を検出するために)を用いて検出することができる。一部の実施形態では、抗体をさらに、シクロホスファミド又はイホスファミドの非環式代謝物、例えば式(III)のシクロホスファミドの非環式代謝物よりシクロホスファミド又はイホスファミドに対して優位な親和性についてスクリーニングする(例として、優位な親和性は、非環式代謝物への K_d より数値的に約1/10未満である、シクロホスファミド又はイホスファミドへの親和性と認定される K_d であり得る)。

10

20

30

40

50

【0060】

一部の実施形態に従う別の手法は、抗体産生細胞から核酸配列、例えばDNA配列又はRNA配列を単離してから、本明細書に記載のシクロホスファミド又はイホスファミドに適した結合特性を有する抗体についてスクリーニングする。一部の実施形態では、核酸をクローン化してから、本明細書に記載のシクロホスファミド又はイホスファミドに適した結合特性を有する抗体をコードする核酸についてスクリーニングする。ヒトB細胞の核酸をスクリーニングするためのプロトコル例は、参照によってここに援用するHuse et al., Science 246:1275-1281 (1989)に記載されている。一部の実施形態では、ファージディスプレイ技術を用いて対象とする核酸を同定する。例えば、WO 91/17271及びMcCafferty et al., WO 92/01047を参照されたい。ファージディスプレイ技術を用いて、シクロホスファミド又はイホスファミドに対して親和性を有することが以前に示された抗体の可変領域(又はそのタンパク質、例えばCDR)に突然変異を誘発し、より大きい結合親和性を有する抗体についてスクリーニングすることもできる。一部の実施形態では、核酸を配列決定する。

【0061】

注目する所望抗体をコードする単離オリゴヌクレオチドを発現系、例えば細胞発現系又は無細胞発現系において発現させ得る。例示的細胞発現系としては、抗体をコードするヌクレオチド配列を含有する組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母(例えば、哺乳動物細胞、大腸菌、昆虫細胞、サッカロミセス(Saccharomyces)、ピキア(Pichia)); 抗体をコードする配列を含有する組換えウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)に感染した昆虫細胞系; 組換えウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV; タバコモザイクウイルス、TMV)に感染したか又は抗体をコードするヌクレオ

チド配列を含有する組換えプラスミド発現ベクター(例えば、Tiプラスミド)で形質転換された植物細胞系；哺乳動物細胞ゲノム又は哺乳動物ウイルス由来プロモーター(例えば、メタロチオネインプロモーター)を含有する組換え発現構築物を内部に持つ哺乳動物細胞系(例えば、COS、CHO、BHK、293、3T3)が挙げられる。例示的無細胞系としては、大腸菌抽出物及び酵母抽出物が挙げられる。抽出物はライセートであり得る。抽出物を精製して、例えば、リボソームを濃縮し、及び/又はデブリ若しくは宿主ゲノムDNA等の望ましくない物質を除去することができる。無細胞系内で抗体をコードする核酸は、プラスミドDNA、線状DNA、又はRNAを包含し得る。

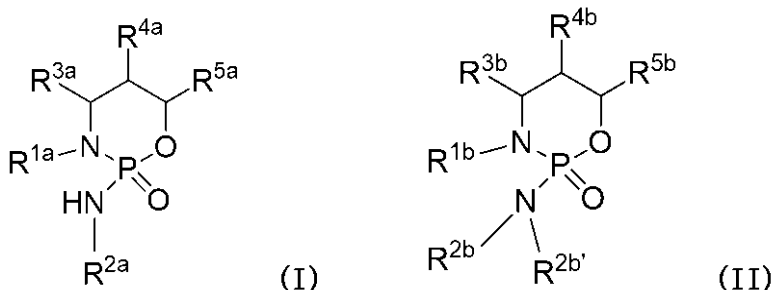
【0062】

一部の実施形態では、例えばポリクロナール抗体に注目したとき、宿主動物を本明細書に記載の免疫原で免疫化し、宿主動物の血清を得、シクロホスファミド又はイホスファミドに対するポリクロナール抗体を例えばアフィニティークロマトグラフィーを用いてアフィニティ精製する。例えば、アフィニティークロマトグラフィーでは、興味のある抗原、例えばシクロホスファミド又はイホスファミドをカラム内で基質に結合させることができ、血清をカラムに通すことができ、その結果、シクロホスファミド又はイホスファミドに親和性を有する抗体がカラムに固定化される。カラムを1回以上洗浄して、非特異的抗体及び他の物質を除去してから、シクロホスファミド又はイホスファミドに親和性を有する抗体をカラムから溶出し得る(例えば、Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual Second Edition (C.S.H.P.NY, 2014)参照)。

上記項目に加えて、本明細書ではいくつかのオプションを示す。
オプション1は、下記式(I)又は(II)の構造を含む化合物を含む。

【0063】

【化9】



【0064】

式中、 R^{1a} は、水素又は $-(CH_2)_m-X$ から選択され； R^{2a} は $-(CH_2)_n-Y$ であり； R^{1b} は $-(CH_2)_m-X$ であり； R^{2b} 及び $R^{2b'}$ は、それぞれ独立に $-(CH_2)_k-Z$ から選択され； R^{3a} 、 R^{4a} 、 R^{5a} 、 R^{3b} 、 R^{4b} 及び R^{5b} は、それぞれ独立に水素、ハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_2-C_6 アルキニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、5-10員ヘテロシクリル、アリール、アラルキル、5-10員ヘテロアリール、 C_1-C_6 アルコキシ、 C_1-C_6 アルコキシ(C_1-C_6)アルキル、アリールオキシ、ハロ(C_1-C_6)アルキル、ハロ(C_1-C_6)アルコキシ、 C_1-C_6 アルキルチオ、アリールチオ、アミノ(C_1-C_6)アルキル、ニトロ、O-カルバミル、N-カルバミル、O-チオカルバミル、N-チオカルバミル、C-アミド、N-アミド、S-スルホンアミド、N-スルホンアミド、C-カルボキシ、O-カルボキシ、アシル、及びオキシ(=O)から選択され；Xは、アミン、チオール、カルボン酸、ヒドラジド、ヒドラジン、オキシム、又はヒドロキシルアミンから選択される官能基であり；Yは、ハロゲン、ヒドロキシ、アミン、チオール、カルボン酸、ヒドラジド、ヒドラジン、オキシム、又はヒドロキシルアミンから独立に選択される官能基であり；Zは、ハロゲン又はヒドロキシから選択され；かつm、n及びkは、それぞれ独立に2~10の整数である。オプション2は、 R^{1a} が水素である、オプション1の化合物を含む。オプション3は、Yが、アミン、チオール、カルボン酸、ヒドラジド、ヒドラジン、オキシム、又はヒドロキシルアミンから選択される、オプション2の化合物を含む。オプション4は、 R^{1a} が $-(CH_2)_m-X$ である、オプション1の化合物を含む。

む。オプション5は、Yが、クロリド又はヒドロキシから選択される、オプション4の化合物を含む。オプション6は、 R^{2b} 及び $R^{2b'}$ がそれぞれ $-(CH_2)_k-Z$ であり、Zがクロリド又はヒドロキシから選択される、オプション1の化合物を含む。オプション7は、mが整数2である、オプション1~6のいずれか1つの化合物を含む。オプション8は、mが整数3である、オプション1~6のいずれか1つの化合物を含む。オプション9は、n及びkがそれぞれ整数2である、オプション1~8のいずれか1つの化合物を含む。オプション10は、 R^{3a} 、 R^{4a} 、 R^{5a} 、 R^{3b} 、 R^{4b} 、 R^{5b} がそれぞれ水素である、オプション1~9のいずれか1つの化合物を含む。オプション11は、官能基X又はYを介して免疫原性ポリマー又は担体に共有結合しているオプション1~10のいずれか1つの化合物含む免疫原を含む。オプション12は、免疫原性ポリマー又は担体が、免疫学的に活性なタンパク質又はポリペプチドから選択される、オプション11の免疫原を含む。オプション13は、実質的に選択的にシクロホスファミド及び/又はイホスファミドに結合する抗体を含む。オプション14は、オプション11又は12の免疫原由来である、オプション13の抗体を含む。

10

【0065】

オプション15は、サンプル中のシクロホスファミド又はイホスファミドの存在をサンプル内で検出するための、アッセイ接合体を含むイムノアッセイであって、前記アッセイ接合体が、官能基X又はYを介して担体に共有結合しているオプション1~10のいずれか1つの化合物を含む、前記イムノアッセイを含む。オプション16は、担体がタンパク質又はポリペプチドから選択される、オプション15のイムノアッセイを含む。

オプション17は、サンプル中のシクロホスファミド及び/又はイホスファミドの存在をサンプル内で検出するための、オプション13又は14の抗体を含むイムノアッセイを含む。

20

オプション18は、サンプル中のシクロホスファミド及び/又はイホスファミドの存在を検出するための、試薬を含むキットであって、前記試薬の1つが、官能基X又はYを介してオプション1~10のいずれか1つの化合物に共有結合した担体の接合体である、前記キットを含む。オプション19は、担体がタンパク質又はポリペプチドから選択される、オプション18のキットを含む。オプション20は、オプション13又は14の抗体をさらに含む、オプション18又は19のキットを含む。オプション21は、Xに共有結合した担体をさらに含み、この担体が、アルブミン若しくはそのフラグメント、血清タンパク質、リボタンパク質、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)、オボアルブミン、ウシチログロブリン(BTG)、合成ポリ(アミノ酸)、ポリアミノ-多糖、ポリ核酸、ポリアミノ酸、多糖、又は固体粒子の少なくとも1つを含む、オプション1~10のいずれか1つの化合物を含む。

30

【0066】

オプション22は、Yに共有結合した担体をさらに含み、この担体が、アルブミン若しくはそのフラグメント、血清タンパク質、リボタンパク質、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)、オボアルブミン、ウシチログロブリン(BTG)、合成ポリ(アミノ酸)、ポリアミノ-多糖、ポリ核酸、ポリアミノ酸、多糖、又は固体粒子の少なくとも1つを含む、オプション1~10又は21のいずれか1つの化合物を含む。

オプション23は、オプション21~22のいずれか1つの化合物に特異的に結合する抗体を含む。オプション24は、式(III)の非環式シクロホスファミドに対する解離定数(K_d)の数値的に $1/10$ 未満である解離定数で環式シクロホスファミドに結合する、オプション23の抗体を含む。オプション25は、式(III)の非環式シクロホスファミドに対する解離定数(K_d)の数値的に $1/1000$ 未満である解離定数で環式シクロホスファミドに結合する、オプション24の抗体を含む。オプション26は、モノクロナール抗体を含む、オプション23~25のいずれか1つの抗体を含む。オプション27は、ポリクロナール抗体を含む、オプション23~25のいずれか1つの抗体を含む。

40

【0067】

オプション28は、シクロホスファミドに特異的に結合する抗体の作製方法であって、オプション11~12のいずれかの免疫原又はオプション21~22のいずれか1つの化合物を宿主生物に投与すること；宿主生物から抗体産生細胞又抗体を単離すること；及び前記抗体産

50

生細胞に由来する抗体又は前記宿主生物に由来する抗体をシクロホスファミドへの親和性についてスクリーニングすることを含む方法を含む。オプション29は、宿主生物がマウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ロバ、又はヤギを含む、オプション28の方法を含む。オプション30は、担体がKLHを含む、オプション28～29のいずれか1つの方法を含む。オプション31は、抗体産生細胞を単離し、該抗体産生細胞に由来する抗体をシクロホスファミドへの親和性についてスクリーニングし、かつシクロホスファミドに特異的に結合する抗体がモノクロナールである、オプション28～29のいずれか1つの方法を含む。オプション32は、単離した抗体産生細胞からハイブリドーマを構築することをさらに含む、オプション31の方法を含む。オプション33は、単離した抗体産生細胞からの核酸をファージディスプレイ法によってスクリーニングすることをさらに含む、オプション31又は32の方法を含む。オプション34は、式(III)の非環式代謝物に比べてシクロホスファミドに特異的に結合する抗体についてスクリーニングすることをさらに含む、オプション28～33のいずれか1つの方法を含む。オプション35は、宿主細胞内で抗体をコードする核酸を発現させることをさらに含む、オプション31～34のいずれか1つの方法を含む。オプション36は、宿主生物からの抗体をシクロホスファミドへの親和性についてスクリーニングし、かつシクロホスファミドに特異的に結合する抗体がポリクロナールである、オプション28～29のいずれか1つの方法を含む。

10

【0068】

オプション37は、イホスファミドに特異的に結合する抗体の作製方法であって、オプション11～12のいずれかの免疫原又はオプション21～22のいずれか1つの化合物を宿主生物に投与すること；宿主生物から抗体産生細胞又は抗体を単離すること；及び前記抗体産生細胞に由来する抗体又は前記宿主生物に由来する抗体をイホスファミドへの親和性についてスクリーニングすることを含む方法を含む。オプション38は、宿主生物がマウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ロバ、又はヤギを含む、オプション37の方法を含む。オプション39は、担体がKLHを含む、オプション37～38のいずれか1つの方法を含む。オプション40は、抗体産生細胞を単離し、該抗体産生細胞に由来する抗体をイホスファミドへの親和性についてスクリーニングし、かつシクロホスファミドに特異的に結合する抗体がモノクロナールである、オプション37～39のいずれか1つの方法を含む。オプション41は、単離した抗体産生細胞からハイブリドーマを構築することをさらに含む、オプション40の方法を含む。オプション42は、単離した抗体産生細胞からの核酸をファージディスプレイ法によってスクリーニングすることをさらに含む、オプション40又は41の方法を含む。オプション43は、式(III)の非環式代謝物に比べてシクロホスファミドに特異的に結合する抗体についてスクリーニングすることをさらに含む、オプション37～42のいずれか1つの方法を含む。オプション44は、宿主細胞内で抗体をコードする核酸を発現させることをさらに含む、オプション40～43のいずれか1つの方法を含む。オプション45は、宿主生物からの抗体をシクロホスファミドへの親和性についてスクリーニングし、かつシクロホスファミドに特異的に結合する抗体がポリクロナールである、オプション37～39のいずれか1つの方法を含む。

20

30

【実施例】

【0069】

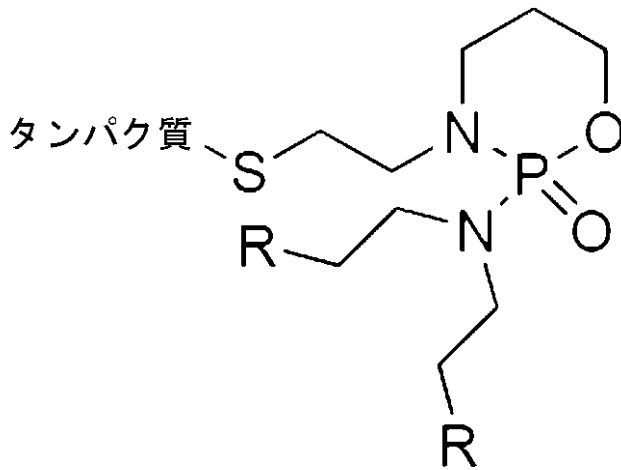
40

実施例I

XがKLHに共有結合している式(II)の化合物を合成して、以下に示す接合体を調製する。

【0070】

【化 1 0】



(IV)

【 0 0 7 1】

式中、タンパク質はKLHである。特に、マレイミド活性化KLHタンパク質がR^{1b}のチオール基に共有結合して、式(IV)（式中、「タンパク質」はKLHを含む）に示す接合体を形成している。

この接合体を筋肉注射によりBALB/cマウス宿主に注入し、5日間インキュベートしてから、接合体の2回目の投与によってマウス宿主をブーストする。マウス宿主からB細胞を収集し、B細胞クローンを骨髄腫細胞と融合させてハイブリドーマを構築する。ハイブリドーマを培養し、上清を採取する。ELISAアッセイを用いて上清をスクリーニングして、イホスファミドへの親和性を有するハイブリドーマを同定する。シクロホスファミドへの親和性を有するモノクローナル抗体の可変領域配列を得るために当該ハイブリドーマを増やし、抗体可変領域をコードするDNAの配列を決定する。モノクローナル抗体を構築し、式(III)の非環式代謝物を上回るシクロホスファミドへの特異性についてさらにスクリーニングする。

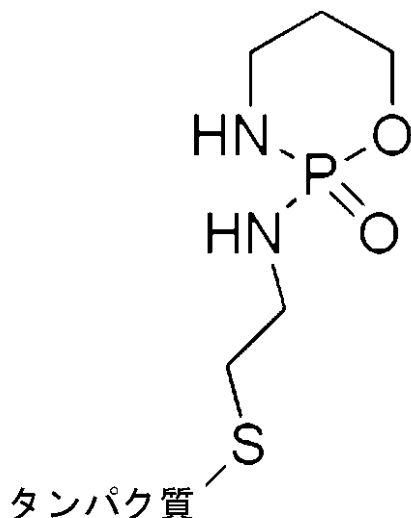
【 0 0 7 2】

実施例II

Yがヒト血清アルブミンに共有結合している式(I)の化合物からチオール選択的カップリング反応経路で以下に示す接合体を調製する。

【 0 0 7 3】

【化 1 1】



10

20

30

40

50

(V)

【 0 0 7 4 】

式中、タンパク質はヒト血清アルブミンである。

この接合体を筋肉注射によりウサギ宿主に注入し、7日間インキュベートしてから、接合体の2回目の投与によってウサギ宿主をブーストする。次にウサギから免疫血清を採取する。イホスファミドが固相に固定化されるアフィニティークロマトグラフィーを用いて、イホスファミドに特異的に結合する免疫グロブリンについて血清をアフィニティー精製する。カラムを洗浄してから、イホスファミドへの親和性を有する抗体をカラムから溶出して、イホスファミドへの親和性を有するポリクロナール抗体を得る。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US16/50495

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61P 37/06; A61K 36/31 (2016.01) CPC - A61K 31/664, 39/395 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): A61P 37/06; A61K 36/31 (2016.01) CPC: A61K 31/664, 39/395 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC Data); EBSCO; PubMed; Google Scholar; cyclophosphamide, analog, derivative, immunogen, conjugate, ifosfamide, bind, antibody, affinity, polyclonal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2012/0148611 A1 (BRODSKY, RA et al.) 14 June 2012; abstract; paragraphs [0015], [0018]	13
Y	WO 00/52015 A2 (METABASIS THERAPEUTICS, INC.) 08 September 2000; page 7, lines 11-26; page 8, lines 1-28; page 11, lines 8-11, 26-30; page 15, lines 7-11	1-6, 7/1-6, 8/1-6
A	WO 97/22614 A1 (CHIROSCIENCE LIMITED) 26 June 1997; entire document	1-6, 7/1-6, 8/1-6, 13
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 October 2016 (14.10.2016)		Date of mailing of the international search report 03 NOV 2016
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/50495

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 9-12, 14-45
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

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

(74)代理人 100088694

弁理士 弟子丸 健

(74)代理人 100103610

弁理士 ▲吉▼田 和彦

(74)代理人 100084663

弁理士 箱田 篤

(74)代理人 100093300

弁理士 浅井 賢治

(74)代理人 100119013

弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796

弁理士 服部 博信

(74)代理人 100111501

弁理士 滝澤 敏雄

(72)発明者 ドワイヤー ブライアン ピー

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 07417 フランクリン レイクス ベクトン ドライ
ヴ 1

Fターム(参考) 4H050 AA01 AA03 AB20

专利名称(译)	环磷酰胺和异环磷酰胺免疫测定的免疫原和免疫测定用作结合物的环磷酰胺类似物		
公开(公告)号	JP2018529681A	公开(公告)日	2018-10-11
申请号	JP2018512880	申请日	2016-09-07
[标]申请(专利权)人(译)	贝克顿·迪金森公司		
申请(专利权)人(译)	碧迪公司		
[标]发明人	ドワイヤーブライアンピー		
发明人	ドワイヤー ブライアン ピー		
IPC分类号	C07F9/6584 G01N33/53 G01N33/531		
CPC分类号	A61K39/0013 C07F9/65846 G01N33/94 G01N33/9493 A61K47/555 A61K47/6843 A61K47/6897 C07K16/065 C12N5/163 G01N33/531		
FI分类号	C07F9/6584.CSP G01N33/53.J G01N33/531.A		
F-TERM分类号	4H050/AA01 4H050/AA03 4H050/AB20		
代理人(译)	田中真一郎 ▲▼吉尔场和彦 山崎 一夫 服部博信		
优先权	62/216943 2015-09-10 US		
其他公开文献	JP2018529681A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本申请涉及与小分子例如环磷酰胺，异环磷酰胺及其类似物特异性结合的抗体，并检测样品和/或环磷酰胺中环磷酰胺和/或异环磷酰胺的存在。本发明涉及用于定量磷酰胺和/或异环磷酰胺的量的免疫学测定。例如，免疫学测定可以用于环境测试。[选择图]无

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 公表特許公報(A)	(11) 特許出願公表番号 特表2018-529681 (P2018-529681A)
	(43) 公表日	平成30年10月11日(2018.10.11)
(51) Int. Cl.	FI	テーマコード(参考) 4H050
C07F 9/6584 (2006.01)	C07F 9/6584 CSP	
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 J	
G01N 33/531 (2006.01)	G01N 33/531 A	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁)		
(21) 出願番号 特願2018-512880(P2018-512880)	(71) 出願人 595117091	
(92) (22) 出願日 平成28年9月7日(2016.9.7)		
(93) 翻訳文提出日 平成30年4月2日(2018.4.2)		
(94) 国際出願番号 PCT/US2016/050495		
(95) 国際公開番号 WO2017/044453		
(96) 国際公開日 平成29年3月16日(2017.3.16)		
(31) 優先権主張番号 62/216,943		
(32) 優先日 平成27年9月10日(2015.9.10)		
(33) 優先権主張国 米国(US)		
	(74) 代理人 100094569 弁理士 田中 伸一郎	
		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】 シクロホスファミド及びイホスファミドのイムノアッセイ用の免疫原及びアッセイ接合体として用いるシクロホスファミド類似体		