

(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2005-97252

(P2005-97252A)

(43) 公開日 平成17年4月14日(2005.4.14)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C07D 317/58</b>	C O 7 D 317/58	4 B O 6 5
<b>C07K 16/44</b>	C O 7 K 16/44	4 C O 2 2
<b>C12N 5/10</b>	G O 1 N 33/53	G 4 H O 4 5
<b>GO1N 33/53</b>	C I 2 N 5/00	B

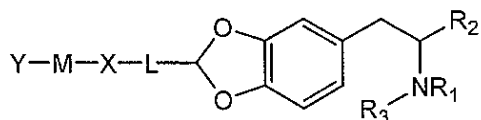
審査請求 有 請求項の数 12 O L 外国語出願 (全 34 頁)

(21) 出願番号 特願2004-207694 (P2004-207694)	(71) 出願人 591003013
(22) 出願日 平成16年7月14日 (2004. 7. 14)	エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(31) 優先権主張番号 10/622, 254	F. HOFFMANN-LA ROCH
(32) 優先日 平成15年7月18日 (2003. 7. 18)	E AKTIENGESELLSCHAF
(33) 優先権主張国 米国 (US)	T
(特許庁注：以下のものは登録商標)	スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
I. Macintosh	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 100125508
	弁理士 藤井 愛
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エクスタシークラス誘導体、免疫原、および抗体ならびにエクスタシークラス薬物の検出におけるそれらの使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 エクスタシークラス化合物の検出のためのモノクローナル抗体の提供。  
 【解決手段】 式1で示すメチレンジオキシ位置で結合した、すなわち誘導体化されたエクスタシークラス化合物の新規な類似体および新規なエクスタシークラス免疫原を含む。本発明はまた、MDO-結合MDMA免疫原を用いて生成されたユニークなモノクローナル抗体ならびにユニークなコンジュゲートおよびトレーサーを含む。これらの抗体、コンジュゲート、およびトレーサーは生物学的流体におけるエクスタシークラス化合物の検出のための免疫アッセイにおいて有用である。



(式中、LはCO又はCH<sub>2</sub>、XはNH又はO、Mは脂肪族、芳香族の炭素原子、Yは活性エステル、イソシアネート等、R<sub>1</sub>はH、CH<sub>3</sub>等、R<sub>2</sub>はCH<sub>3</sub>又はC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>、R<sub>3</sub>は保護基又はHである)

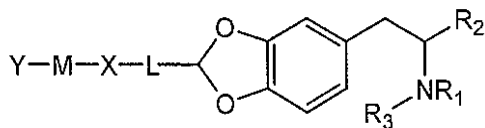
【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

下記構造：

## 【化 1】



(式中、LはCOまたはCH<sub>2</sub>であり、XはNHまたはOであり、Mは飽和もしくは不飽和、脂肪族もしくは芳香族、置換もしくは非置換の、0~10個の炭素原子もしくはヘテロ原子の直鎖もしくは分枝鎖であり、Yは活性エステル、イソシアネート、イソチオシアネート、チオール、イミドエステル、アンヒドリド、マレイミド、チオラクトン、ジアゾニウム基、およびアルデヒドからなる群より選択される活性化された官能基であり、R<sub>1</sub>はH、CH<sub>3</sub>、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>、またはC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>であり、R<sub>2</sub>はCH<sub>3</sub>またはC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>であり、ならびにR<sub>3</sub>は保護基またはHである)を有する化合物。

10

## 【請求項 2】

XがNHであり、Yが活性化されたエステルであり、R<sub>1</sub>がCH<sub>3</sub>であり、R<sub>2</sub>がCH<sub>3</sub>であり、およびR<sub>3</sub>が保護基である、請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 3】

XがNHであり、Yが活性化されたエステルであり、R<sub>1</sub>がC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>であり、R<sub>2</sub>がCH<sub>3</sub>であり、R<sub>3</sub>が保護基である、請求項 1 に記載の化合物。

20

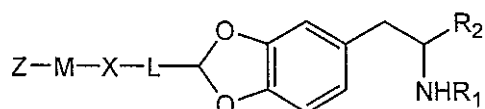
## 【請求項 4】

XがNHであり、Yが活性化されたエステルであり、R<sub>1</sub>がHであり、R<sub>2</sub>がCH<sub>3</sub>であり、R<sub>3</sub>が保護基である、請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 5】

下記構造：

## 【化 2】



(式中、LはCOまたはCH<sub>2</sub>であり、XはNHまたはOであり、Mは飽和もしくは不飽和、脂肪族もしくは芳香族、置換もしくは非置換の、0~10個の炭素原子もしくはヘテロ原子の直鎖もしくは分枝鎖であり、Zは担体分子であり、R<sub>1</sub>はH、CH<sub>3</sub>、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>、またはC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>であり、R<sub>2</sub>はC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>またはC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>である)を有する化合物。

30

## 【請求項 6】

XがNHであり、ZがKLH、BSA、およびアミノデキストランからなる群より選択され、R<sub>1</sub>がH、CH<sub>3</sub>、またはC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>であり、ならびにR<sub>2</sub>がCH<sub>3</sub>またはC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>である、請求項 5 に記載の化合物。

40

## 【請求項 7】

MDEAに対して100%を超える交叉反応性を有するモノクローナル抗体を産生する、細胞系MDMA 8.3、ATCC命名PTA-5340。

## 【請求項 8】

MDEAに対して100%を超える交叉反応性を有する、細胞系MDMA 8.3、ATCC命名PTA-5340から産生されるモノクローナル抗体。

## 【請求項 9】

MDEAに対して100%を超える交叉反応性を有し、細胞系MDMA 8.3、ATCC命名PTA-5340に由来する抗体と等価な様式で結合するモノクローナル抗体。

50

## 【請求項 1 0】

MBDBおよびd-MAMPIに対して90%を超える交叉反応性を有するモノクローナル抗体を産生する、細胞系MDMA 6.1、ATCC命名PTA-5339。

## 【請求項 1 1】

MBDBおよびd-MAMPIに対して90%を超える交叉反応性を有する、細胞系MDMA 6.1、ATCC命名PTA-5339から産生されるモノクローナル抗体。

## 【請求項 1 2】

MBDBおよびd-MAMPIに対して90%を超える交叉反応性を有し、細胞系MDMA 6.1、ATCC命名PTA-5339に由来する抗体と等価な様式で結合するモノクローナル抗体。

## 【請求項 1 3】

MDMAおよびMBDBに対して100%を超える交叉反応性を有するモノクローナル抗体を産生する、細胞系MDEA 2.2、ATCC命名PTA-5338。

## 【請求項 1 4】

MDMAおよびMBDBに対して100%を超える交叉反応性を有する、細胞系MDEA 2.2、ATCC命名PTA-5338から産生されるモノクローナル抗体。

## 【請求項 1 5】

MDMAおよびMBDBに対して100%を超える交叉反応性を有し、細胞系MDEA 2.2、ATCC命名PTA-5338に由来する抗体と等価な様式で結合するモノクローナル抗体。

## 【請求項 1 6】

請求項 5 に記載の化合物に応答して生成される抗体。

## 【請求項 1 7】

LがCH<sub>2</sub>であり、XがNHであり、MがOC(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COであり、ZがKLHであり、R<sub>1</sub>がCH<sub>3</sub>またはC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>であり、およびR<sub>2</sub>がCH<sub>3</sub>である、請求項 1 6 に記載の抗体。

## 【請求項 1 8】

免疫原としての請求項 5 に記載の化合物の使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

本発明は、一般的には、生物学的サンプルにおける乱用薬物の測定方法の分野、ならびに、より具体的には、3,4-メチレンジオキシメタアンフェタミン(MDMA)および誘導体およびMDMA、すなわち、エクスタシークラス化合物の代謝物の検出のための免疫アッセイ方法の分野に関する。

## 【背景技術】

## 【0 0 0 2】

メチレンジオキシフェニルアルキルアミンのアンフェタミン類似体は、デザイナーアンフェタミンとしばしば呼ばれる一連の化合物である。これらの向精神薬は、メスカリンと化学的に関連する環式置換誘導体である。これらのものとしては、3,4-メチレンジオキシアンフェタミン(MDA)、3,4-メチレンジオキシメタアンフェタミン(MDMA、エクスタシー)、3,4-メチレンジオキシエタアンフェタミン(MDE、イブ)、3,4-メチレンジオキシエチルアンフェタミン(MDEA)、3,4-メチレンジオキシ-N-プロピルアンフェタミン(MDPA)、3,4-メチレンジオキシ-N-メチルブタンアミン(MBDB)、および3,4-メチレンジオキシブタンアミン(BDB)が挙げられ、これらのうち最も一般的なものはMDMAである。

## 【0 0 0 3】

これらのデザイナーアンフェタミンの乱用は世界中で増加しており、スクリーニング法によるその検出はより重要な問題になってきている。Zhao, H.ら、J. Anal. Toxicology, Vol. 25, pp. 258-269 (2001)は、乱痴気パーティーの参加者からの尿サンプルの71%がMDMAもしくはMDAのみ、またはそれと共にアンフェタミンもしくはMDEAなどの他のデザイナーアンフェタミンを含んでいることを見出した。

## 【0 0 0 4】

ガスクロマトグラフィー/質量スペクトル測定(GC/MS)は高度に特異的であり、MDMA、M

10

20

30

40

50

DA、アンフェタミン、メタアンフェタミン、MDEAおよびその代謝物の同時検出について記載されてきた。GC/MS分析は通常、免疫アッセイまたは疑われる診断の結果の確認および検証のために必要とされる。この技術においては、MDMAまたはデザイナー薬物を固相中に抽出した後、誘導体化し、GC/MSを介して分析する。しかしながら、いくつかの医学施設は、それらに必要とされる高性能の高価な器具を欠いているため、エクスタシークラス薬物を検出することができない。

#### 【0005】

乱用薬物の試験においては、免疫アッセイ、具体的には競合的結合免疫アッセイが特に有利であると証明されている。競合的結合免疫アッセイにおいては、生物学的サンプル中のアナライトは、アナライトおよびアナライト類似体に特異的な抗体上の限定された数の受容体結合部位について、標識された試薬、もしくはアナライト類似体、もしくはトレーサーと競合する。 -ガラクトシダーゼおよびペルオキシダーゼなどの酵素、フルオレセイン化合物などの蛍光分子、<sup>125</sup>Iなどの放射性化合物、ならびに微粒子がトレーサーとして使用される一般的な標識物質である。サンプル中のアナライトの濃度は前記抗体に結合するアナライト類似体の量を決定する。結合するアナライト類似体の量はサンプル中のアナライトの濃度と反比例するが、これはアナライトおよびアナライト類似体がそれぞれの濃度に比例して抗体と各々結合するためである。次いで、遊離の、または結合したアナライト類似体の量を、用いる特定の標識にとって適当な方法により決定することができる。

10

#### 【0006】

最近まで、エクスタシークラス薬物の検出に特異的に設計された市販の免疫アッセイはなく、従ってその検出は用いるアンフェタミンまたはメタアンフェタミンのスクリーニング方法においてそれらが示す相対的な交叉反応性に依存していた。一般的には、これらの化合物の多くを対象とする市販のアンフェタミンおよびメタアンフェタミンアッセイの交叉反応性は低く、これは、このアッセイが低い濃度のエクスタシークラス化合物を検出することができないことを意味し、いくつかの陽性サンプルが未検出となる可能性を示唆している。さらに、アンフェタミンおよびメタアンフェタミンのための既存の免疫アッセイは、エフェドリン、プソイドエフェドリンおよびフェニルプロパノールアミンなどのアレルギーおよびカゼ用の薬剤、ならびにフェンテルミンなどのダイエット用薬剤とのそれらの交叉反応性により制限される。この交叉反応因子は、アンフェタミンおよびメタアンフェタミンの検出のためのカットオフレベルが低下するのを妨害し、従って、より低い濃度でのエクスタシークラス薬物の検出を妨害する。従って、エクスタシークラス化合物に対する特異性が増加したアッセイが、エクスタシークラス化合物のみを検出するアッセイまたはエクスタシークラス化合物ならびにアンフェタミンおよびメタアンフェタミンを検出するアッセイとして必要である。

20

30

#### 【0007】

1種以上のメンバーのエクスタシークラス薬物に対して有意な交叉反応性を有するアンフェタミンおよびメタアンフェタミン抗体は公知である(Cody, J., J. Anal. Toxicology 14: 321, 1990)。

#### 【0008】

置換メチレンジオキシ(MDO)結合芳香族化合物の合成は文献中で公知である(欧州特許出願第329,326号、1989年8月23日公開)。

40

#### 【0009】

2001年10月24日に公開された英国特許第2,361,473号は、生物学的サンプル中でのエクスタシークラス化合物の検出のためのエクスタシークラス類似体を記載している。記載されたコンジュゲートおよび免疫原はMDAの窒素位置で誘導体化されている。本出願は、この問題に対する代替的な解決策、すなわち、エクスタシークラス化合物のMDO部分の炭素位置で誘導体化されるコンジュゲートおよび免疫原を記載する。

#### 【0010】

#### 発明の概要

本発明は、エクスタシークラス化合物のMDO部分の炭素位置で結合した、すなわち誘導

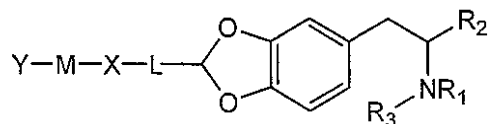
50

体化された新規なエクスタシークラス化合物の類似体および新規なエクスタシークラス免疫原を含む。本発明はまた、MDO結合MDMA免疫原を用いて作製されたユニークなモノクローナル抗体ならびにユニークなコンジュゲートおよびトレーサーをも含む。これらの抗体、コンジュゲート、およびトレーサーは、生物学的流体中のエクスタシークラス化合物の検出のための免疫アッセイにおいて有用である。

## 【0011】

本発明は、下記式：

## 【化1】



10

## 【0012】

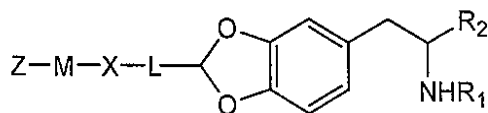
(式中、LはCOまたはCH<sub>2</sub>であり、XはNHまたはOであり、Mは飽和もしくは不飽和、脂肪族もしくは芳香族、置換もしくは非置換の、0~10個の炭素原子もしくはヘテロ原子の直鎖もしくは分枝鎖であり、Yは活性エステル、イソシアネート、イソチオシアネート、チオール、イミドエステル、アンヒドリド、マレイミド、チオラクトン、ジアゾニウム基、およびアルデヒドからなる群より選択される活性化された官能基であり、R<sub>1</sub>はH、CH<sub>3</sub>、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>、またはC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>であり、R<sub>2</sub>はCH<sub>3</sub>またはC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>であり、ならびにR<sub>3</sub>は保護基またはHである)で表されるメチレンジオキシ位置において連結基を有するエクスタシークラス化合物の新規な誘導体を記載する。

20

## 【0013】

本発明はまた、下記式：

## 【化2】



30

## 【0014】

(式中、R<sub>1</sub>はH、CH<sub>3</sub>、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>、またはC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>であり、R<sub>2</sub>はCH<sub>3</sub>またはC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>であり、Zは担体分子であり、LはCOまたはCH<sub>2</sub>であり、XはNHまたはOであり、Mは飽和もしくは不飽和、脂肪族もしくは芳香族、置換もしくは非置換の、0~10個の炭素原子もしくはヘテロ原子の直鎖もしくは分枝鎖である)

で表されるエクスタシークラス化合物のMDO部分の炭素位置において連結基を有する新規なコンジュゲートをも記載する。

## 【0015】

## 発明の詳細な説明

エクスタシークラス化合物に特異的な抗体の製造において有用な化合物、例えば、ハブテン、中間体、および免疫原、エクスタシークラス化合物に特異的な抗体、エクスタシークラス化合物に特異的な抗体を含む試薬キット、エクスタシークラス化合物に特異的な抗体の製造方法、ならびにエクスタシークラスの化合物のメンバーを含むアナライトの検出方法を開発し、本明細書に記載する。

40

## 【0016】

本明細書および添付の特許請求の範囲を通して、以下の定義を理解されたい。

## 【0017】

「メチレンジオキシアンフェタミン」、「MDクラス化合物」または「エクスタシークラス化合物」は、3,4-メチレンジオキシアンフェタミン(MDA)、3,4-メチレンジオキシメタンフェタミン(MDMA、エクスタシー)、3,4-メチレンジオキシエタンフェタミン(MDEA、イブ)、3,4-メチレンジオキシ-N-プロピルアンフェタミン(MDPA)、3,4-メチレンジオキ

50

シ-N-メチルブタンアミン(MBDB)、および3,4-メチレンジオキシブタンアミン(BDB)を含む縮合メチレンジオキシ-フェニル環系を有するメチレンジオキシフェニルアルキルアミンのアンフェタミン類似体群を意味する。薬物デザイナーはエクスタシークラスに含まれる新規化合物を合成し続けているので、このクラスは増え続けている。従って、本明細書で用いるエクスタシークラス化合物は、既に合成または同定された化合物、ならびにまだ合成または同定されていないものを含む。

【0018】

用語「免疫原」および「免疫原性」は、生物において免疫応答を引き出し、産生し、または生成することができる物質を指す。

【0019】

用語「コンジュゲート」は、2つの部分を一緒に連結することから形成される任意の物質を指す。本発明に従う代表的なコンジュゲートとしては、小分子とタンパク質などの大分子を一緒に連結することにより形成されるものが挙げられる。用語「コンジュゲート」は用語「免疫原」を包含する。

【0020】

「ハプテン」は部分的または不完全な抗原である。これらは、タンパク質を含まない物質、大部分は低分子量の物質であり、抗体形成を刺激することができないが、抗体と反応する。後者はハプテンを高分子量の担体とカップリングさせた後、このカップリングさせた生成物、すなわち免疫原をヒトまたは動物の被験体に注射することにより形成される。MDA、MDMA、MDEA、MBDB、BDB、およびMDPAはハプテンである。

【0021】

用語「活性化されたハプテン」は、例えば、ハプテンを担体、免疫原、標識、トレーサーまたは他の部分に接続するのに用いることができる反応性部分を担持する連結基の結合により、利用可能な反応部位を提供されたハプテンを指す。

【0022】

本明細書で用いる「連結基」または「リンカー」は、ハプテン、担体、免疫原、標識、トレーサーまたは他のリンカーなどの、2個以上のサブ構造物を接続する化学構造の一部を指す。連結基は前記サブ構造物間に伸びる、少なくとも1個の遮断されない水素(または他の1価原子)以外の原子の鎖を有する。連結基の原子および連結基内の鎖の原子はそれ自身、化学結合により接続されている。リンカーは直鎖もしくは分枝鎖、飽和もしくは不飽和の炭素鎖であってもよい。これらはまた、鎖内または鎖の末端に、1個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より選択される炭素以外の原子を意味する。連結基はまた、鎖の一部として、または鎖中の1個の原子上の置換基として、環状基または芳香族基を含んでいてもよい。

【0023】

連結基またはリンカー中の原子数は、水素以外の原子を計数することにより決定される。連結基内の鎖中の原子数は、接続される構造物間の最も短いルートに沿った水素以外の原子数を計数することにより決定される。連結基を用いて、ハプテンと標識または担体とのコンジュゲートを合成するためにハプテン上の利用可能な部位を活性化、例えば、提供することができる。

【0024】

「担体」または「免疫原性担体」は、本明細書で用いる場合、ハプテンと結合することによって、該ハプテンに免疫応答を誘導させ、抗原(ハプテン)と特異的に結合し得る抗体の産生を引き出させることができる免疫原性物質、一般的にはタンパク質である。担体物質としては、外来物として認識され、それによって宿主から免疫応答を引き出すタンパク質、糖タンパク質、複合多糖、粒子、および核酸が挙げられる。

【0025】

種々のタンパク質型を、ポリ(アミノ酸)免疫原性担体として用いることができる。これらの型としては、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、リボタンパク質などが挙げられる。例示的なタンパク質としては、ウシ血清アルブミ

10

20

30

40

50

ン(BSA)、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、卵白アルブミン、ウシ $\gamma$ -グロブリン(BGG)などが挙げられる。あるいは、合成ポリ(アミノ酸)を用いることができる。

【0026】

免疫原性担体は、単糖の反復縮合により作られた高分子量ポリマーである多糖であってもよい。多糖の例は、スターチ、グリコーゲン、セルロース、アラビアゴムなどの炭水化物ゴム、寒天などである。この多糖はポリアミノ酸残基および/または脂質残基を含んでいてもよい。

【0027】

免疫原性担体は、単体であっても、上記のポリ(アミノ酸)もしくは多糖の一つとコンジュゲートされていてもよいポリ(核酸)であってもよい。

10

【0028】

免疫原性単体は粒子であってもよい。この粒子は一般的には、直径で少なくとも約0.02ミクロン( $\mu\text{m}$ )であり、約100 $\mu\text{m}$ 以下であり、通常は約0.05 $\mu\text{m}$ ~10 $\mu\text{m}$ である。この粒子は、有機性または無機性、膨張性または非膨張性、多孔性または非多孔性であってもよく、必要に応じて水に近似した密度を有し、一般的には約0.7~1.5 g/mLであり、透明、部分的に透明、または不透明であってもよい材料から構成されていてもよい。粒子は、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(*Streptococcus*)、スタフィロコッカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*)、大腸菌およびウイルスなどの非限定例を含む、細胞および微生物などの生物学的材料であってもよい。粒子はまた、有機性および無機性ポリマー、リポソーム、ラテックス、リン脂質ベシクル、またはリポタンパク質から構成されていてもよい。

20

【0029】

「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)は一般的には、約2,000分子量から、上限分子量を有しないが、正常には10,000,000ダルトン未満、通常には約600,000ダルトン以下の範囲であろう。これらは通常、免疫原性担体または酵素が含まれるかどうかに応じて、異なる範囲となる。

【0030】

「ペプチド」はアミド(ペプチド)結合による2個以上のアミノ酸の連結によって形成される任意の化合物であり、通常は各アミノ酸残基の $\alpha$ -アミノ基( $\text{NH}_2$ 末端を除く)が線状の鎖中で次の残基の $\beta$ -カルボキシル基に連結されている $\alpha$ -アミノ酸のポリマーである。用語「ペプチド」、「ポリペプチド」および「ポリ(アミノ酸)」は、サイズに限定されないこのクラスの化合物を指すのに本明細書では同義的に用いられる。このクラスの最も大きいメンバーをタンパク質と呼ぶ。

30

【0031】

「標的」、「検出用分子」、または「トレーサー」は、検出可能なシグナルを産生するか、または産生することを誘導され得る任意の分子である。この標識を、アナライト、免疫原、抗体、または受容体もしくはリガンド、特にハプテンなどの受容体に結合し得る分子などの別の分子にコンジュゲートさせることができる。標識の非限定例としては、放射性同位体、酵素、酵素断片、酵素基質、酵素阻害剤、共酵素、触媒、蛍光団、染料、化学ルミネッセサー、ルミネッセサー、または感光剤；非磁性もしくは磁性粒子、固相支持体、リポソーム、リガンド、または受容体が挙げられる。

40

【0032】

用語「抗体」は、抗原に対する特異的タンパク質結合パートナーを指し、他の物質を排除して、ある抗原に対して特異的結合親和性を有する任意の物質、または物質群である。一般的用語「抗体」はポリクローナル抗体、モノクローナル抗体および抗体フラグメントを包含する。

【0033】

用語「アナライト」は、その存在もしくは量を決定しようとする任意の物質または物質群を指す。本明細書で用いる場合、用語「アナライト」は、抗体に結合することができる任意の化合物を指す用語「抗原」を包含する。さらに、本明細書で用いる場合、用語「ア

50

ナライト」は限定されるものではないが、コンジュゲート、免疫原、薬物、薬物誘導体、ホルモン、タンパク質、抗原、オリゴヌクレオチドなどを含む全ての様式の化学物質を指す。代表的なエクスタシークラスのアナライトとしては、限定されるものではないが、MDA、MDMA、MDEA、MDPA、BDB、MBDBなどが挙げられる。

【0034】

用語「誘導体」は、1つ以上の化学反応により親化合物から作られた化合物または分子を指す。

【0035】

用語「アナライト類似体」は、競合的免疫アッセイにおいて用いることができ、抗体との結合親和性に関してアナライトと同様に振舞う任意の物質または物質群を指す。代表的なアナライト類似体としては、薬物およびその異性体、薬物誘導体、ホルモン、ポリペプチド、ヌクレオチドなどが挙げられる。

10

【0036】

語句「アナライトの検出」は、一般的にはアナライト、および特にエクスタシークラス薬物を検出するための任意の定量的、半定量的または定性的方法、ならびに全ての他の方法を指す。例えば、サンプル中のエクスタシークラス薬物の存在または非存在を単に検出する方法は本発明の範囲内にあり、該サンプル中の該薬物の量または濃度に関するデータを提供する方法も同様である。用語「検出」、「測定」、「同定」などは、本明細書では同義的に用いられ、かつ全て本発明の範囲内にある。

【0037】

用語「試薬キット」または「試験キット」は、アッセイを実施するのに用いる材料の集合を指す。試薬は、その交叉反応性および安定性に応じて、液体または凍結乾燥した形態で、同一または別の容器中にパッケージングされた組合せで提供することができる。キット中に提供される試薬の量および割合を、特定の用途に対して最適な結果を提供するように選択することができる。本発明の特徴を具現化する試薬キットは、エクスタシークラス化合物に特異的な抗体を含んでいてもよい。このキットはさらに、アナライトのリガンドおよび補正材料および対照材料を含む。この試薬は液体の形態のままであってもよく、または凍結乾燥してもよい。

20

【0038】

語句「補正材料および対照材料」は、任意の標準物または測定するアナライトの既知量を含む参照材料を指す。アナライトおよび対応する補正材料を含むと考えられるサンプルを同様の条件下でアッセイする。未知の標本について得られた結果と、標準物について得られた結果とを比較することにより、アナライトの濃度を算出する。一般的には、これを、補正曲線を構築することにより行う。

30

【0039】

用語「アルキル基」は任意の直鎖状、分枝状、環式、非環式、飽和または不飽和の炭素鎖を指す。代表的なアルキル基としては、アルカン、アルケン、アルキン、シクロアルカン、シクロアルケン、シクロアルキン、アリールなど、およびその組合せが挙げられる。

【0040】

語句「置換されていてもよい」は、アルキル基上への1個以上の置換基の任意的な結合を指す。

40

【0041】

用語「脱離基」は、それと共に反応した試薬により置換され得る基質の任意の化学部分を指す。好適な脱離基としては、限定されるものではないが、ハライド、メシラート、トシラート、アルコキシ、第4級アンモニウム塩などが挙げられる。本発明の好ましい実施形態に従う使用にとって好ましい脱離基を、活性化エステル、例えば、トリフルオロエトキシエステル、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、p-ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、イミダゾリルエステル、およびN-ヒドロキシベンゾトリアゾリルエステルにより提供し、それによって該エステルのカルボニル炭素に結合した酸素含有部分を反応の過程において置換する。

50

## 【0042】

用語「保護基」は、その通常の反応性を変化させるために反応性原子または反応中心に結合された任意の部分を目指す。好適な保護基としては、限定されるものではないが、Theodor W. GreeneおよびPeter G.M. Wuts (John Wiley & Sons, Inc., New York, 1999)によるProtective Groups in Organic Synthesis, 第3版という表題の論文に記載されたものが挙げられる。アミンの窒素のための種々の保護基は当業界で公知であり、特にトリフルオロアセチルが本発明で好ましい窒素保護基である。

## 【0043】

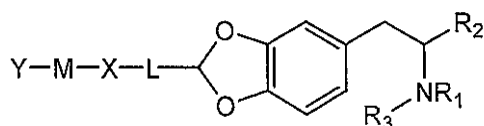
用語「生物学的サンプル」は、限定されるものではないが、生きている物またはかつては生きていた物に由来する任意の量の物質を含む。そのような生きている物としては、限定されるものではないが、ヒト、マウス、サル、ラット、ウサギ、ウマ、および他の動物が挙げられる。そのような物質としては、限定されるものではないが、血液、血清、尿、涙、細胞、器官、組織、骨、骨髄、リンパ、リンパ節、滑液組織、軟骨細胞、滑液マクロファージ、内皮細胞、および皮膚が挙げられる。

10

## 【0044】

本発明の特徴を具現化する化合物は、エクスタシークラス薬物に特異的な抗体の製造における中間体、ハプテンまたは免疫原として有用である。本発明の特徴を具現化する第1のシリーズの化合物は、下記構造：

## 【化3】



20

## 【0045】

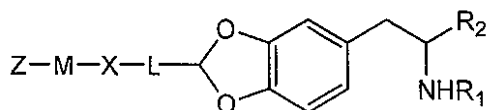
(式中、LはCOまたはCH<sub>2</sub>であり、XはNHまたはOであり、Mは飽和もしくは不飽和、脂肪族もしくは芳香族、置換もしくは非置換、0~10個の炭素原子もしくはヘテロ原子の直鎖もしくは分枝鎖であり、Yは活性エステル、イソシアネート、イソチオシアネート、チオール、イミドエステル、アンヒドリド、マレイミド、チオラクトン、ジアゾニウム基、およびアルデヒドからなる群より選択される活性化された官能基であり、ならびにR<sub>1</sub>はH、CH<sub>3</sub>、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>、またはC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>であり、R<sub>2</sub>はCH<sub>3</sub>またはC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>であり、R<sub>3</sub>は保護基またはHである)を有する。

30

## 【0046】

本発明の特徴を具現化する第2のシリーズの化合物は、下記構造：

## 【化4】



40

## 【0047】

(式中、R<sub>1</sub>はH、CH<sub>3</sub>、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>、またはC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>であり、R<sub>2</sub>はCH<sub>3</sub>またはC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>であり、Zは担体分子であり、LはCOまたはCH<sub>2</sub>であり、XはNHまたはOであり、Mは飽和もしくは不飽和、脂肪族もしくは芳香族、置換もしくは非置換、0~10個の炭素原子もしくはヘテロ原子の直鎖もしくは分枝鎖である)を有する。

## 【0048】

免疫原ならびにMDMA、MDEA、MDA、MBDB、およびBDBのスクリーニング用コンジュゲートの合成スキームを図1~13に示す。これらの図面においては、反応を順次実行する。下線の太字の番号は図面中の対応する構造を指す。

50

## 【0049】

一般的には、3,4-ジメトキシフェニルアセトンの還元的アミノ化(図1を参照)を、還元剤、好ましくは水素化ホウ素ナトリウムまたは水素化シアノホウ素ナトリウムの存在下、0~25の温度で、好適なアミン(アンモニア、メチルアミン、またはエチルアミン)を用いることにより行って、所望の3,4-ジメトキシフェニルプロピルアミン(1A)を得る。次いで、後者の中間体を脱メチル化して、3,4-ジヒドロキシフェニルプロピルアミンを得る。典型的には、フェノール性誘導体の脱メチル化を、-70~室温にて、ジクロロメタン中の三臭化ホウ素との反応により行う。種々の脱メチル化反応が当業界で公知であり、例えば、トリメチルシリル-ヨウ化物、ナトリウムチオエトキシド、カリウムチオフェノキシド、DMSO中のシアニ化ナトリウム、エタンチオール中の三臭化アルミニウム、および臭化水素酸(Greene, T.およびWuts, P., "Protective groups in organic synthesis", 第2版, Wiley-Intersciences, 1991)が挙げられる。好ましくは、3,4-ジメトキシフェニルプロピルアミン誘導体(1A)の脱メチル化を、還流条件下で3~4時間、48% HBrの存在下で行って1Bを得る。次いで、3,4-ジヒドロキシフェニルプロピルアミン1Bのアミノ基を保護する。

10

## 【0050】

遊離フェノール性ヒドロキシ基の存在下でのアミノ基の保護は当業界で公知である。保護基および反応条件の適切な選択により、これらの反応を行うことができる。温和な塩基性条件下で除去されるN-保護基の例はフルオレニルメチルオキシカルボニル(FMOC)である。酸により容易に除去されるN-保護基の例はt-ブチルオキシカルボニル(BOC)である。3,4-ジヒドロキシフェニルプロピルアミン誘導体(1B)のアミノ基のための好ましい保護は、この反応工程においてはBOCである。好ましくは遊離フェノール性基の存在下、3,4-ジヒドロキシフェニルプロピルアミン誘導体(1B)のアミノ基のBOCとしての選択的保護を、温和な塩基、好ましくは炭酸水素ナトリウムを含むTHF水溶液中でジ-t-ブチル-ジカーボネートと反応させることにより実行する。次いで、3,4-ジヒドロキシフェニルN-BOCプロピルアミン中間体(1C)を、無水条件下、120で、好ましくは塩基および双極性非プロトン性溶媒の存在下、最も好ましくはDMF中の炭酸カリウムの存在下で、アルキルジハロ酢酸(RCOOCHX<sub>2</sub>、式中X=I, Br, またはClであり、R=1~5個の炭素原子を有する低級アルキル)、好ましくはエチルジプロモアセテートを用いたアルキル化反応により、3,4-メチレンジオキシフェニルN-BOCプロピルアミン誘導体(1D)に変換する。得られた主要なエトキシカルボニル置換3,4-メチレンジオキシフェニルN-BOC-プロピルアミン誘導体(1D)のエステル官能基を改変して、異なるリンカー結合を介して種々の官能基を導入することができる。最も好ましくは、後者のエチルエステルを、当業界で公知の条件下でメタノール中のアンモニアを用いて、最初にアミド(1E)に変換する。この後、還元剤、好ましくは水素化アルミニウムリチウムを用いて、-70~室温にて前記アミド(1E)を還元する。得られたアミノメチル3,4-メチレンジオキシフェニルN-BOCプロピルアミン誘導体(1F)のアミノ基は、当業界で公知の種々のカルボキシル活性化リンカー伸長または標識とのアシル化反応を受けやすい。末端が活性化された基を作製するために、リンカー伸長を実施することが多い。例えば、ある好ましい実施形態においては、アミノメチル修飾3,4-メチレンジオキシフェニルN-BOCプロピルアミン誘導体(1F)を、マレイミドアルカン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル型の市販のリンカーと反応させて、それに続くポリペプチドおよび標識上のチオール基とのコンジュゲート化のための末端マレイミド基を作製した(図7を参照)。得られたマレイミド誘導体(2N)のN-BOC基を、トリフルオロ酢酸の存在下で脱保護する。次いで、脱保護されたマレイミド付加物(20)はチオール含有タンパク質と容易に反応してチオールエーテルコンジュゲートを形成する。タンパク質上のチオール基を、天然のシステイン残基から誘導することができ、またはチオール化試薬との反応を介して導入することができる。チオール化試薬のいくつかの例は、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ジル2-ピリジルジチオプロピオネート(SPDP)である。初期のチオール基は、マレイミド誘導体(20)とのコンジュゲーションのためのSATP(またはSPDP)修飾タンパク質の適切な脱保護の後に利用可能となる。あ

20

30

40

50

るいは、アミノメチル置換3,4-メチレンジオキシフェニル誘導体(1F)のアミノ末端リンカーを、一方の末端でアミド結合を形成し、他方の末端で遊離もしくは保護されたチオールを形成するように反応するヘテロ二官能性チオール化剤を用いて伸長させ、続いてマレイミド修飾タンパク質とコンジュゲートさせる。あるいは、テレフタル酸などの二カルボン酸のN-ヒドロキシスクシンイミドエステルなどのホモ二官能性リンカーを用いたリンカー伸長を用いて、前記アミノ誘導体との反応により単一の工程で活性化エステルを形成することができる。リンカーの対象に関する良い論文については、Hermanson, Greg T., "Bio conjugate Techniques", Academic Press Inc., 1996がある。リンカー伸長に関するさらに別の好ましい実施形態においては、アミノメチル3,4-メチレンジオキシフェニルN-トリフルオロアセチルプロピルアミン誘導体(1J)のアミノ基のスクシニル化を、塩基の存在下で無水コハク酸を用いて行う(図2参照)。好ましい塩基は、ピリジン、トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、4-ジメチルアミノピリジンであり、最も好ましくは、トリエチルアミン、4-ジメチルアミノピリジン、または前記塩基の両方の組合せである。この反応を、酢酸エチル、THF、1,2-ジクロロエタン、好ましくは1,2-ジクロロエタンなどの無水溶媒中、40~60にて行う。得られた酸を、カルボジイミド、好ましくは1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(EDC)、およびN-ヒドロキシスクシンイミドとの反応により、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に変換することにより活性化する。この活性化されたエステルを用いて、当業界で公知の標準的な手順に従って合成ポリペプチドまたはアミノデキストランとコンジュゲートさせる。該コンジュゲート中のハプテン部分のN-トリフルオロアセチル基の脱保護を、塩基、好ましくは10%水酸化アンモニウムまたはpH11の炭酸カリウムを用いた処理により実施する。あるいは、BOCなどの酸に不安定な保護基を、同じ反応工程中で用いて、トリフルオロ酢酸による処理によって前記コンジュゲートから除去することができる。

10

20

30

40

#### 【0051】

タンパク質コンジュゲートの調製については、ハプテン誘導体上の塩基感受性保護基がタンパク質の安定性のためには好ましい。酸性条件はタンパク質を変性させることが知られている。種々の塩基感受性保護基を選択することができるが、好ましいものはトリフルオロアセチル基である。BOCメチレンジオキシフェニルアミノ誘導体(1F)を、カルボベンズオキシ(CBz)基を用いて保護する。アミノ官能基のCBz保護は当業界で公知であり、0~25の温度、好ましくは室温で試薬CBz塩化物を用いる。この後、酸性条件下で、好ましくはトリフルオロ酢酸を用いて、BOC基の脱保護を行う。遊離のアミノ基(第1級または第2級アミン、1Hまたは2H)を、トリフルオロアセトアミドとして保護する。この反応は当業界で公知であり、任意のトリフルオロアセチル化剤、エチルトリフルオロアセテート、または無水トリフルオロ酢酸、好ましくは無水トリフルオロ酢酸を用いる。トリフルオロアセトアミド化合物(1I)のCBz保護基を、大気圧下で10% Pd-Cを用いて、水素化条件下で脱保護する。遊離のアミノ基(1J)を、前記のスクシニル化反応を介してカルボキシル基に伸長する。このカルボキシル基(1K)の活性化を、N-ヒドロキシスクシンイミドの存在下で、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)またはEDC、好ましくはEDCなどのカルボジイミドを用いる活性化工程により達成する。タンパク質とのコンジュゲーションにより、保護された免疫原およびスクリーニング用コンジュゲートが得られる。このタンパク質コンジュゲートのトリフルオロアセトアミド基の脱保護を、塩基水溶液を用いた処理、好ましくは炭酸カリウム(pH11)水溶液または10%水酸化アンモニウム(pH11.5)に対する透析により達成して、免疫原(1P)およびBSAスクリーニング用コンジュゲート(10)を得る。

#### 【0052】

エトキシカルボニル置換3,4-メチレンジオキシフェニルN-BOC-プロピルアミン(1D)のエステル基の、その加水分解された酸生成物(1M)への変換の後、アミド結合を用いて連結基を介する伸長を行うが、これはタンパク質とのコンジュゲーションのための活性化エステルを調製するための経路であってもよい。あるいは、エステル官能基(1D)を、還元剤、好ましくはリチウムアンモニウムヒドライドにより還元して、エステル、ウレタン、またはエーテル結合を介して伸長させることができるアルコール(1N)を得ることができ、同様に、

50

前記のように、タンパク質とのコンジュゲーションのための活性エステルに変換することができる。

【0053】

MDMA誘導体(図1~3)について記載したのと類似した方法を用いて、MDEA誘導体およびコンジュゲート(図4~9)、MDA誘導体およびコンジュゲート(図10および11)、ならびにBDBまたはMBDB誘導体およびコンジュゲート(図12および13)を合成する。

【0054】

本明細書に記載された仕事の予期しない結果は、いくつかの事例において、免疫原に対応する薬物に対してよりも、構造的に関連する分子に対してより高い結合性を有する抗体が得られたことである。MDMA-KLHを免疫原として用いた融合物から、MDMAに対する反応性よりもMDEAに対して非常に有意な選択性を示すクローンが得られた。クローンMDMA 8.2はMDEAに対して、MDMAに対するよりも約89倍の選択性を示した。エチル基の存在が、同じ位置でメチル基を有する分子に対する抗体に対して、そのような高い交叉反応性を与えることは予想されなかった。

10

【0055】

MDMA-KLH融合物から得られた別の驚くべき抗体は、d-メタアンフェタミンおよびMBDBに対する予想外に高い交叉反応性が観察されたMDMA 6.1であった。前者の薬物は免疫原構造におけるメチレンジオキシ部分を欠き、後者の薬物は該免疫原においてメチルの代わりにエチル基を有する。これはMDMA 8.2について認められたものと同じであるように見えるが、この置換は有意に異なる位置にあるため、それは同じではない。

20

【0056】

また、MDEA免疫原の使用は予想されない抗体を生じることが判明した。クローンMDEA 2.2は、免疫化ハプテンMDEAに対するよりも、MDMAに足して4倍およびMBDBに対しては44倍の選択性を示した。両方の反応性は、これらの薬物の構造的な差異に基づく予想外のものではあった。

【0057】

特定の実施形態

以下の実施例においては、太字の数字は図面中の対応する構造を指す。

【0058】

実施例1. [2-(3,4-ジメトキシ-フェニル)-1-メチル-エチル]-メチル-アミン(1A)

30

102 mLのメタノール中の15.1 g (78 mmol)の(3,4-ジメトキシフェニル)アセトン(1)の溶液を4 に冷却し、35 mLの40%メチルアミン水溶液で処理した。次いで、この反応混合物に、3.5 g (92.5 mmol)の水素化ホウ素ナトリウムを加え、反応物の温度を4 に維持した。反応混合物をさらに30分間攪拌した後、減圧下で濃縮した。残渣に、60 mLの水を加え、得られた反応混合物を6N HClを用いてpH1まで酸性化した。水相を5 x 50 mLのジクロロメタンで抽出し、6N NaOHを用いてpHをpH13に調整した。水相を4 x 75 mLのジクロロメタンで抽出した。有機相を合わせ、乾燥し、濃縮したところ、無色の油として15 g (72 mmol, 92%)の1A(M+H, 210)が得られた。

【0059】

実施例2. 臭化水素酸塩との4-(2-メチルアミノ-プロピル)-ベンゼン-1,2-ジオール化合物(1B)

40

20 mLの48% HBr中の2 g (9.5 mmol)の1Aの溶液をアルゴン雰囲気下で3.5時間、加熱して還流し、減圧下で濃縮したところ、暗褐色の油として1Bが得られた。これをさらに精製せずに次の工程で用いた。

【0060】

実施例3. [2-(3,4-ジヒドロキシ-フェニル)-1-メチル-エチル]-メチル-カルバミン酸tert-ブチルエステル(1C)

上記反応混合物に由来する1Bの全てに、水中の40 mLの50%テトラヒドロフラン(THF)を加えた。次いで、反応混合物に2.0 gの炭酸水素ナトリウムを加えた。10 mLのTHF中の2 g (9.2 mmol)のジ-t-ブチルジカーボネートの溶液を、30分間かけて攪拌しながら滴下して

50

添加し、混合物を12時間攪拌した。次いで、10 mLのTHF中のさらなる500 mg(2.29 mmol)のジ-*t*-ブチル-ジカーボネートを40分間かけて反応混合物に添加し、反応物をさらに20分間攪拌した後、減圧下で濃縮した。残渣に50 mLの水を加え、得られた混合物を4 x 50 mLの酢酸エチルで抽出した。有機相を合わせ、乾燥し(無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、減圧下で乾燥するまで濃縮した。ヘキサン中の30%酢酸エチルを用いたフラッシュカラムシリカゲルクロマトグラフィーにより残渣を精製したところ、無色の油として2.5 g (8.8 mmol, 1Aから93%)の1C(M+Na, 304)が得られた。

【0061】

実施例4. 5-[2-(*tert*-ブトキシカルボニル-メチル-アミノ)-プロピル]-ベンゾ[1,3]ジオキソール-2-カルボン酸エチルエステル(1D)

10

2.5 g (8.8 mmol)の1Cに、20 mLの無水N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)を加えた後、3.68 g(26 mmol)の無水K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>および3 mL(23 mmol)のエチルジブromoアセテートを加えた。反応混合物を4.5時間、100 °Cに加熱した後、室温まで冷却した。これを減圧下で乾燥するまで濃縮し、残渣に50 mLの水を加えた。1N HClを用いて混合物をpH3に調整し、4 x 50 mLのジクロロメタンで抽出した。有機相を合わせ、乾燥し(無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、乾燥するまで濃縮した。ヘキサン中の15%酢酸エチルを用いるフラッシュカラムシリカゲルクロマトグラフィーにより残渣を精製したところ、無色の油として1.1 g(3.01 mmol, 34%)の1D(M+Na, 388)が得られた。

【0062】

実施例5. [2-(2-ヒドロキシメチル-ベンゾ[1,3]ジオキソール-5-イル)-1-メチル-エチル]-メチル-カルバミン酸 *tert*-ブチルエステル(1N)

20

4 mLの新しく蒸留したTHF中の313 mg(8.24 mmol)の水素化アルミニウムリチウムの混合物を-25 ~ -35 °Cに冷却した。反応混合物に10 mLのTHF中の630 mg(1.72 mmol)の1Dの溶液を20分間滴下しながら添加した。混合物を-30 ~ -40 °Cで20分間攪拌し、10 mLの酢酸エチルでクエンチした。これを、CELITEを通して濾過し、濾液を乾燥するまで濃縮した。溶剤として酢酸エチルを用いるシリカゲルクロマトグラフィーにより残渣を精製したところ、濃密な無色のゴムとして480 mg(1.48 mmol, 86%)の1N(M+Na, 346)が得られた。

【0063】

実施例6. 5-[2-(*tert*-ブトキシカルボニル-メチル-アミノ)-プロピル]-ベンゾ[1,3]ジオキソール-2-カルボン酸(1M)

30

0.5 mLのTHF中の21 mg(0.06 mmol)の1D、0.5 mLのメタノール、および1 mLの水の混合物に、50 mg(1.19 mmol)の水酸化リチウム-水和物を固体として加えた。反応混合物を室温にて2.5時間攪拌し、乾燥するまで濃縮した。残渣に10 mLの水を加え、得られた混合物のpHをリン酸を用いて2に調整した。これを3 x 35 mLの酢酸エチルで抽出した。有機相を合わせ、乾燥し(無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、乾燥するまで濃縮したところ、10 mg(0.029 mmol, 53%)の1M(M+Na, 360)が得られた。

【0064】

実施例7. [2-(2-カルバモイル-ベンゾ[1,3]ジオキソール-5-イル)-1-メチル-カルバミン酸 *tert*-ブチルエステル(1E)

40

0.85 g(2.32 mmol)の1Dの溶液を10 mLの無水メタノール中で調製した。次いで、無水アンモニアガスを60分間、反応混合物を通して泡立たせ、得られた反応混合物を減圧下で乾燥するまで濃縮した。酢酸エチル中の15%ヘキサンを用いるフラッシュカラムシリカゲルクロマトグラフィーにより残渣を精製したところ、無色の油として0.76 g(2.25 mmol, 97%)の1E(M+H, 359)が得られた。

【0065】

実施例8. [2-(2-アミノメチル-ベンゾ[1,3]ジオキソール-5-イル)-1-メチル-エチル]-メチル-カルバミン酸 *tert*-ブチルエステル(1F)

500 mgの水素化アルミニウムリチウム(13.2 mmol)に10 mLの新しく蒸留したTHFを加え、反応フラスコを-30 °Cに冷却した。14 mLの新しく蒸留したTHF中の0.75 g(2.22 mmol)の1Eの溶液を滴下しながら加え、反応混合物を-30 °Cで1.5時間、0 °Cで1.5時間、攪拌した。

50

反応混合物を室温まで温め、室温にて1.5時間攪拌した。反応混合物に50 mLの酢酸エチルを加え、混合物をCELITE(Celite Corporation)を通して濾過した。濾液を乾燥するまで濃縮し、50 mLの水を加えた。乾燥した残渣を4 x 50 mLの酢酸エチルで抽出した。有機相を合わせ、乾燥し(無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、濃縮した。溶剤として酢酸エチルを用いる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残渣を精製したところ、濃密な無色の油として0.31 g(43%, 0.96 mmol)の1F(M+Na, 345)が得られた。

【0066】

実施例9. [2-[2-(ベンジルオキシカルボニルアミノ-メチル)-ベンゾ[1,3]ジオキソール-5-イル]-1-メチル-エチル]-メチル-カルバミン酸tert-ブチルエステル(1G)

5 mLのジクロロメタン中の0.31 g(0.96 mmol)の1Fの溶液に、0.2 mL(1.14 mmol)のN,N-ジイソプロピルエチルアミンおよび10 mg(0.08 mmol)の4-ジメチルアミノピリジン(4-DMAP)、次いで0.15 mLのベンジルクロロホルメート(1.04 mmol)を室温にて加えた。混合物を1時間攪拌し、減圧下で乾燥するまで濃縮した。ヘキサン中の40%酢酸エチルを用いる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残渣を精製したところ、濃密な無色のゴムとして0.41 g(0.89 mmol, 94%)の1G(M+Na, 479)が得られた。

10

【0067】

実施例10. トリフルオロ酢酸との[5-(2-メチルアミノ-プロピル)-ベンゾ[1,3]ジオキソール-2-イルメチル]-カルバミン酸ベンジルエステル化合物(1H)

2 mLのジクロロメタン中の0.41 g(0.89 mmol)の溶液に、2 mLのトリフルオロ酢酸を加えた。得られた溶液を室温にて90分間攪拌し、減圧下で濃縮した。酢酸エチル中の20%メタノールを用いる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残渣を精製したところ、無色の濃密なゴムとして0.29 g(0.64 mmol, 69%)の1H(M+Na, 357)が得られた。

20

【0068】

実施例11. (5-{2-[メチル-(2,2,2-トリフルオロ-アセチル)-アミノ]-プロピル}-ベンゾ[1,3]ジオキソール-2-イルメチル)-カルバミン酸ベンジルエステル(1I)

5 mLのジクロロメタン中の299 mg(0.64 mmol)の1Hの溶液を0 に冷却した。反応混合物に0.25 mL(1.43 mmol)のジイソプロピルエチルアミン、10 mg(0.08 mmol)の4-DMAP、次いで0.3 mL(2.12 mmol)の無水トリフルオロ酢酸を0 にて加えた。混合物を室温まで温め、1時間攪拌した。反応混合物を減圧下で濃縮し、ヘキサン中の20%酢酸エチルを用いる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残渣を精製したところ、無色の油として150 mg(0.33 mmol, 52%)の1I(M+Na, 453)が得られた。

30

【0069】

実施例12. N-[2-(2-アミノメチル-ベンゾ[1,3]ジオキソール-5-イル)-1-メチル-エチル]-2,2,2-トリフルオロ-N-メチル-アセトアミド(1J)

10 mLのメタノール中の150 mg(0.33 mmol)の1Iの溶液に、24 mgの10% Pd-Cを加え、混合物を、水素を充填した風船を用いて大気圧下、室温にて4時間水素化した。反応混合物を、CELITEを通して濾過し、20 mLのメタノールで残渣を洗浄した。濾液を合わせ、減圧下で乾燥するまで濃縮した。酢酸エチル中の10%メタノールを用いる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残渣を精製したところ、無色の油として95 mg(0.29 mmol, 86%)の1J(M+H, 319)が得られた。

40

【0070】

実施例13. N-(5-{2-[メチル-(2,2,2-トリフルオロ-アセチル)-アミノ]-プロピル}-ベンゾ[1,3]ジオキソール-2-イルメチル-スクシニアミド酸(1K)

20 mLのメタノール中の680 mg(2.13 mmol)の1Jの溶液に、0.6 mL(3.4 mmol)のジイソプロピルエチルアミン、次いで10 mg(0.08 mmol)の4-DMAPを加え、反応混合物を0 に冷却した。反応混合物に、800 mg(7.9 mmol)の無水コハク酸を加え、室温まで温めた。反応混合物を室温にて1.5時間攪拌し、減圧下で濃縮した。溶剤として酢酸エチルを用いる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これを精製したところ、白色のゴム状固体として400 mg(0.95 mmol, 45%)の1K(M+H, 419)が得られた。

【0071】

50

実施例 14. N-(5-{2-[メチル-(2,2,2-トリフルオロ-アセチル)-アミノ]-プロピル}-ベンゾ  
[1,3]ジオキソール-2-イルメチル)-スクシニアミド酸 2,5-ジオキソ-ピロリン-1-イルエス  
テル (1L)

40 mLのジクロロメタン中の400 mg(0.27 mmol)の1Kの溶液に、273 mg(2.37 mmol)のN-ヒドロキシスクシンイミド、次いで440 mg(2.29 mmol)の1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミドを加えた。混合物をアルゴン雰囲気下、室温にて11時間攪拌した。反応混合物を2 x 15 mLの水、4 x 15 mLの飽和炭酸水素ナトリウム、次いで15 mLの水で洗浄した。有機相を乾燥し(無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、減圧下で乾燥するまで濃縮した。フラッシュカラムクロマトグラフィーにより残渣を精製したところ、濃密なゴムとして250 mg(0.48 mmol, 51%)の1L(M+H, 516)が得られた。

10

【0072】

実施例 15. MDMA免疫原 (1P)

7 mLの50 mMリン酸カリウム(pH 7.5)中の173 mgのキーホールリンペットヘモシアニンの溶液を氷浴バス中で冷却した。この溶液に10.5 mLのジメチルスルホキシド(DMSO)を滴下しながら加え、反応温度を室温以下に維持した。タンパク質溶液に、1.5 mLのDMF中の40.2 mgの1Lの溶液を滴下しながら加えた。混合物を室温にて18時間攪拌した。得られたコンジュゲートを透析チューブ(10,000 MWカットオフ)中に入れ、1Lの50 mMリン酸カリウム中の70% DMSO(pH 7.5、3回交換、それぞれ少なくとも3時間)中、1Lの50 mMリン酸カリウム中の50% DMSO(少なくとも3時間)中、1Lの50 mMリン酸カリウム中の30% DMSO(少なくとも3時間)中、1Lの50 mMリン酸カリウム中の10% DMSO(少なくとも3時間)中で、室温にて透  
析した。コンジュゲートのトリフルオロアセトアミド基を、得られたコンジュゲートを10%水酸化アンモニウムに対して3日間(各々1L、各々約24時間)、次いで4 で50 mMリン酸カリウム(pH 7.5)を6回交換(各々1L、各々少なくとも6時間)して透析することにより脱保護した。タンパク質濃度を、BioRadのクマシーブルータンパク質アッセイ(Bradford, M., Anal. Biochem. 72:248, 1976)を用いて測定したところ、2.9 mg/mLであった。合計34 mLのコンジュゲートが得られた。利用可能なリジン修飾の程度を、2,4,6-トリニトロベンゼンスルホネート(TNBS)法(Habeeb AFSA, Anal. Biochem. 14:328-34, 1988)により測定したところ、72%であった。

20

【0073】

実施例 16. MDMA-BSAコンジュゲート (10)

8 mLの50 mMリン酸カリウム(pH 7.5)中の800 mgのウシ血清アルブミン(BSA)の溶液を氷浴バス中で冷却した。この溶液に12 mLのDMSOを滴下しながら加え、反応混合物を室温以下に維持した。タンパク質溶液に、1 mLの無水DMF中の15 mgのMDMA誘導体(1L)の溶液を滴下しながら加えた。反応混合物を室温にて48時間攪拌した。得られたコンジュゲートを透析チューブ(10,000 MWカットオフ)に入れ、1Lの50 mMリン酸カリウム中の70% DMSO(pH 7.5、3回交換、それぞれ少なくとも3時間)中、1Lの50 mMリン酸カリウム中の50% DMSO(少なくとも3時間)中、1Lの50 mMリン酸カリウム中の30% DMSO(少なくとも3時間)中、1Lの50 mMリン酸カリウム中の10% DMSO(少なくとも3時間)中で、室温にて透  
析した。コンジュゲートのトリフルオロアセトアミド基を、得られたコンジュゲートを10%水酸化アンモニウムに対して3日間(各々1L、各々約24時間)、次いで4 で50 mMリン酸カリウム(pH 7.5)を6回交換(各々1L、各々少なくとも6時間)して透析することにより脱保護した。タンパク質濃度を、BioRadのクマシーブルータンパク質アッセイ(Bradford, M., Anal. Biochem. 72:248, 1976)を用いて測定したところ、6.8 mg/mLであった。合計38 mLのコンジュゲートが得られた。

30

40

【0074】

実施例 17. [2-(3,4-ジメトキシ-フェニル)-1-メチル-エチル]-エチルアミン (2A)

50 mLのメタノール中の10 g(51.4 mmol)の3,4-ジメトキシフェニルアセトンの溶液を0に冷却し、メタノール中のエチルアミンの2M溶液50 mLで処理した。反応混合物に、11.5 g(0.183 mmol)の水素化シアノホウ素ナトリウムを加え、氷酢酸を添加することにより反応混合物のpHを6.5~7に調整した。混合物を室温にて4日間攪拌した。これを減圧下で

50

濃縮し、150 mLの水を加えた。得られた溶液のpHを、6N HClを用いて1に調整した。これを4 x 150 mLのエーテルで抽出し、有機相を廃棄した。水相のpHを14に調整し、溶液を6 x 100 mLのクロロホルムで抽出した。有機相を合わせ、乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、乾燥するまで濃縮したところ、淡黄色の油として10.6 g(47.4 mmol, 92%)の2A(M+H, 224)が得られた。

【0075】

実施例18. 臭化水素酸塩との4-(2-エチルアミノ-プロピル)-ベンゼン-1,2-ジオール化合物

10 mLの48% HBr中の1.1 g(4.92 mmol)の2Aの溶液をアルゴン雰囲気下で3.5時間、加熱して還流した後、減圧下で乾燥するまで濃縮した。これに50 mLのジクロロメタンを加え、減圧下で乾燥するまで濃縮したところ、暗褐色の粉末として粗2B(M+Na, 318)が得られた。

10

【0076】

実施例19. [2-(3,4-ジヒドロキシ-フェニル)-1-メチル-エチル]-エチル-カルバミン酸tert-ブチルエステル(2C)

上記反応混合物から得られた2Bの全てに、水中の50% THF 30 mLを加えた。反応混合物に、1.1 gの炭酸水素ナトリウムを固体として加えた後、7 mLのTHF中の1.35 g(6.18 mmol)のジ-t-ブチルジカーボネートを30分間かけて滴下しながら加えた。反応混合物を室温にて18時間攪拌した後、減圧下で濃縮した。これを50 mLの水で希釈し、溶液のpHを5に調整した。水相を3 x 100 mLの酢酸エチルで抽出した。有機相を合わせ、乾燥し(無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、乾燥するまで濃縮した。ヘキサン中の30%酢酸エチルを用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより残渣を精製したところ、透明なゴムとして764 mg(2.58 mmol, 2Aから53%)の2C(M+Na, 318)が得られた。

20

【0077】

実施例20. 5-[2-(tert-ブトキシカルボニル-エチル-アミノ)-プロピル]-ベンゾ[1,3]ジオキソール-2-カルボン酸エチルエステル(2D)

2 g(6.7 mmol)の2Cに、40 mLの無水DMF、次いで3.5 g(25 mmol)の無水K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、5 gの3分子篩、および3.2 mL(25 mmol)のエチルジプロモアセテートを加えた。反応混合物をアルゴン雰囲気下で3時間、120 °Cに加熱した後、減圧下で濃縮した。残渣に75 mLの酢酸エチルを加え、濾過した。濾液に75 mLの水を加え、分離漏斗に移した。有機相を分離し、水相を5 x 75 mLの酢酸エチルで抽出した。全ての有機相を合わせ、乾燥し(無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、乾燥するまで濃縮した。ヘキサン中の10%酢酸エチルを用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより残渣を精製したところ、無色のゴムとして954 mg(5.3 mmol, 37%)の2D(M+Na, 402)が得られた。

30

【0078】

実施例21. [2-(2-カルバモイル-ベンゾ[1,3]ジオキソール-5-イル)-1-メチル-エチル]-エチル-カルバミン酸tert-ブチルエステル(2E)

2.04 g(5.37 mmol)の2Dに、30 mLの無水メタノールを加え、この溶液にアンモニアガスを室温にて1時間通過させた。混合物を乾燥するまで濃縮し、酢酸エチル中の30%ヘキサンを用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより残渣を精製したところ、無色のゴムとして1.8 g(5.13 mmol, 96%)の2E(M+Na, 373)が得られた。

40

【0079】

実施例22. [2-(2-アミノメチル-ベンゾ[1,3]ジオキソール-5-イル)-1-メチル-エチル]-エチル-カルバミン酸tert-ブチルエステル(2F)

20 mLの新しく蒸留したTHFを含むフラスコを-60 °Cに冷却し、615 mg(16.2 mmol)の水素化アルミニウムリチウム(LAH)を加えた。反応混合物に、20 mLの新しく蒸留したTHF中の1.8 g(5.13 mmol)の2Eの溶液をアルゴン雰囲気下で滴下しながら加えた。反応混合物を-60 °Cで20分間、0 °Cで45分間、および室温で2時間攪拌した。反応を430 μLの15% NaOHおよび3 mLの水でクエンチし、室温にて10分間攪拌した。得られた溶液を、CELITEを通して濾過し、100 mLのTHFで残渣を洗浄した。濾液を減圧下で乾燥するまで濃縮し、溶剤として酢酸エチルを用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製したところ、無色のゴ

50

ムとして1.3 g(3.86 mmol, 75%)の2F(M+Na, 359)が得られた。

【0080】

実施例23. [2-[2-(ベンジルオキシカルボニルアミノ-メチル)-ベンゾ[1,3]ジオキソール-5-イル]-1-メチル-エチル}-エチル-カルバミン酸tert-ブチルエステル(2G)

40 mLのジクロロメタン(CaH<sub>2</sub>上で蒸留)中の1.3 g(3.86 mmol)の2Gの溶液に、1.52 mL(8.6 mmol)のジイソプロピルエチルアミン、30 mg(0.24 mmol)の4-DMAPおよび1.14 mL(7.9 mmol)のベンジルクロロホルメートを加えた。反応混合物をアルゴン雰囲気下で室温にて3時間攪拌し、減圧下で乾燥するまで濃縮した。ヘキササン中の20%酢酸エチルを用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより残渣を精製したところ、無色のゴムとして1.58 g(3.3 mmol, 71%)の2G(M+Na, 493)が得られた。

10

【0081】

実施例24. トリフルオロ酢酸との[5-(2-エチルアミノ-プロピル)-ベンゾ[1,3]ジオキソール-2-イルメチル]-カルバミン酸ベンジルエステル化合物(2H)

10 mLのジクロロメタン(CaH<sub>2</sub>上で蒸留)中の1.58 g(3.3 mmol)の2Gの溶液に、室温にてトリフルオロ酢酸を加え、混合物を室温にて30分間攪拌した。得られた反応混合物を減圧下で乾燥するまで濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製したところ、無色のゴムとして1.6 g(3.3 mmol, 98%)の2H(M+H, 371)が得られた。

【0082】

実施例25. (5-{2-[エチル-(2,2,2-トリフルオロ-アセチル)-アミノ]-プロピル}-ベンゾ[1,3]ジオキソール-2-イルメチル)-カルバミン酸ベンジルエステル(2I)

20

1.6 g(3.3 mmol)の2Hに、18 mLの無水DMFを加え、-10 °Cに冷却した。この溶液に3.0 mL(21 mmol)の無水トリフルオロ酢酸を加え、反応混合物をアルゴン雰囲気下、-10 °Cで3時間攪拌した。次いで、反応混合物を室温まで温め、減圧下で乾燥するまで濃縮した。ヘキササン中の30%酢酸エチルを用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより残渣を精製したところ、無色のゴムとして1 g(2.2 mmol, 65%)の2I(M+H, 467)が得られた。

【0083】

実施例26. N-[2-(2-アミノメチル-ベンゾ[1,3]ジオキソール-5-イル)-1-メチル-エチル]-N-エチル-2,2,2-トリフルオロ-アセトアミド(2J)

987 mg(2.1 mmol)の2Iに、50 mLの無水メタノール、次いで150 mgの10% Pd-Cを加えた。この混合物を大気圧下で18時間、水素化し、濾過し、残渣を50 mLのメタノールで洗浄した。合わせた濾液を乾燥するまで濃縮し、酢酸エチル中の5%メタノールを用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより残渣を精製したところ、無色のゴムとして558 mg(1.67 mmol, 79%)の2J(M+H, 333)が得られた。

30

【0084】

実施例27. N-(5-[2-[エチル-(2,2,2-トリフルオロ-アセチル)-アミノ]-プロピル]-ベンゾ[1,3]ジオキソール-2-イルメチル)-スクシンアミド酸(2K)

25 mLの1,2-ジクロロエタン中の558 mg(1.67 mmol)の2Jの溶液に、435 mg(4.34 mmol)の無水コハク酸、280 μL(2 mmol)のトリエチルアミンおよび112 mg(0.91 mmol)の4-DMAPを加えた。反応混合物をアルゴン雰囲気下で2.5時間、40 °Cで攪拌した。次いで、それを50 mLの酢酸エチルで希釈し、3 x 30 mLの5%塩化アンモニウム溶液で洗浄した。有機相を乾燥し(無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、減圧下で乾燥するまで濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより残渣を精製したところ、無色のゴムとして629 mg(1.45 mmol, 86%)の2K(M+H, 433)が得られた。

40

【0085】

実施例28. N-(5-{2-[エチル-(2,2,2-トリフルオロ-アセチル)-アミノ]-プロピル}-ベンゾ[1,3]ジオキソール-2-イルメチル)-スクシンアミド酸2,5-ジオキソ-ピロリジン-1-イルエステル(2L)

150 mg(0.34 mmol)の2Kに、15 mLのジクロロメタン(CaH<sub>2</sub>上で蒸留)、次いで99 mg(0.86 mmol)のN-ヒドロキシスクシンイミドおよび166 mg(0.86 mmol)の1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミドを加えた。反応混合物を、アルゴン雰囲気下、室温に

50

て18時間攪拌した。反応混合物をさらに40 mLのジクロロメタンで希釈し、2 x 25 mLの水、3 x 25 mLの飽和炭酸水素ナトリウム、および2 x 25 mLの水で洗浄した。有機相を乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、乾燥するまで濃縮したところ、白色の固体として154 mg(0.29 mmol, 84%)の2L(M+Na, 552)が得られた。

【0086】

実施例29. 5-[2-(tert-ブトキシカルボニル-エチル-アミノ)-プロピル]-ベンゾ[1,3]ジオキソール-2-カルボン酸(2M)

水中の50%メタノール中2mLの50 mg(0.13 mmol)の2Dの溶液に、50 mg(1.19 mmol)の水酸化リチウム一水和物を加えた。混合物を室温にて18時間攪拌し、減圧下で濃縮した。残渣に10 mLの水を加え、リン酸を用いてpHを6に調整した。得られた水性溶液を2 x 25 mLのクロロホルムで抽出した。合わせた有機相を乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、減圧下で濃縮したところ、濃密な無色のゴムとして41 mg(0.12 mmol, 82%)の2Mが得られた。

10

【0087】

実施例30. MDEA免疫原(2U)

5.5 mLの50 mMリン酸カリウム(pH 7.5)中の188 mgのキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)の溶液を氷浴バス中で冷却した。この溶液に6 mLのジメチルスルホキシドを滴下しながら加え、反応温度を室温以下に維持した。次いで、1.2 mLのDMF中の54 mg(0.10 mmol)の2Lの溶液をタンパク質溶液に滴下しながら加えた。混合物を室温にて18時間攪拌した。得られたコンジュゲートを透析チューブ(10,000 MWカットオフ)に入れ、1Lの50 mMリン酸カリウム中の70% DMSO(pH 7.5、3回交換、それぞれ少なくとも3時間)中、1Lの50 mMリン酸カリウム中の50% DMSO(少なくとも3時間)中、1Lの50 mMリン酸カリウム中の30% DMSO(少なくとも3時間)中、1Lの50 mMリン酸カリウム中の10% DMSO(少なくとも3時間)中で、室温にて透析した。コンジュゲートのトリフルオロアセトアミド基を、得られたコンジュゲートを10%水酸化アンモニウムに対して3日間(各々1L、各々約24時間)、次いで4で50 mMリン酸カリウム(pH 7.5)を6回交換(各々1L、各々少なくとも6時間)して透析することにより脱保護した。タンパク質濃度を、BioRadのクマシーブルータンパク質アッセイ(Bradford, M., Anal. Biochem. 72:248, 1976)を用いて測定したところ、2.1 mg/mLであった。合計34 mLのコンジュゲートが得られた。利用可能なリジン修飾の程度を、TNBS法(Habeeb AFSA, Anal. Biochem. 14:328-34, 1988)により測定したところ、60%であった。

20

30

【0088】

実施例31. MDEA-BSAコンジュゲート(2T)

6.7 mLの50 mMリン酸カリウム(pH 7.5)中の500 mgのウシ血清アルブミン(BSA)の溶液を氷浴バス中で冷却した。この溶液に8.5 mLのDMSOを滴下しながら加え、反応混合物を室温以下に維持した。タンパク質溶液に、1.5 mLの無水DMF中の12 mg(0.022 mmol)の2Lの溶液を滴下しながら加えた。反応混合物を室温にて48時間攪拌した。得られたコンジュゲートを透析チューブ(10,000 MWカットオフ)に入れ、1Lの50 mMリン酸カリウム中の70% DMSO(pH 7.5、3回交換、それぞれ少なくとも3時間)中、1Lの50 mMリン酸カリウム中の50% DMSO(少なくとも3時間)中、1Lの50 mMリン酸カリウム中の30% DMSO(少なくとも3時間)中、1Lの50 mMリン酸カリウム中の10% DMSO(少なくとも3時間)中で、室温にて透析した。コンジュゲートのトリフルオロアセトアミド基を、得られたコンジュゲートを10%水酸化アンモニウムに対して3日間(各々1L、各々約24時間)、次いで4で50 mMリン酸カリウム(pH 7.5)を6回交換(各々1L)して透析することにより脱保護した。タンパク質濃度を、BioRadのクマシーブルータンパク質アッセイ(Bradford, M., Anal. Biochem. 72:248, 1976)を用いて測定したところ、7.12 mg/mLであった。合計45 mLのコンジュゲートが得られた。

40

【0089】

実施例32. 2-(2-{[3-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-ピロール-1-イル)-プロピオニルアミノ]-メチル}-ベンゾ[1,3]ジオキソール-5-イル)-1-メチル-エチル]-エチル-カルバミン酸tert-ブチルエステル(2N)

100 μL(0.71 mmol)のトリエチルアミンを含む2 mLの無水DMF中に、150 mg(0.44 mmol)の2Eおよび130 mg(0.48 mmol)のスクシンイミジル3-マレイミドプロピオネートを含む混

50

合物を室温にて18時間攪拌した後、減圧下で乾燥するまで濃縮した。クロロホルム中の15%メタノールを用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより残渣を精製したところ、白色の固体として203 mg(0.41 mmol, 93%)の2N(M+Na, 510)が得られた。

【0090】

実施例33. トリフルオロ酢酸との3-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-ピロール-1-イル)-N-[5-(2-エチルアミノ-プロピル)-ベンゾ[1,3]ジオキソール-2-イルメチル]-プロピオンアミド化合物(20)

1 mLのジクロロメタン(CaH<sub>2</sub>上で蒸留)中の75 mg(0.15 mmol)の2Nに、1 mLのトリフルオロ酢酸を加えた。得られた反応混合物を室温にて30分間攪拌し、減圧下で乾燥するまで濃縮した。残渣に5 mLのジクロロメタンを加え、得られた溶液を再び乾燥するまで濃縮した。上記の手順をさらに3回繰り返したところ、白色の固体として75 mg(0.14 mmol, 97%)の20(M+Na, 410)が得られた。

【0091】

実施例34. MDEA-SATP-BSAコンジュゲート(2R)

ウシ血清アルブミン(0.5 g)を1 mMエチレンジアミン四酢酸(EDTA)を含む50 mLの50 mMリン酸カリウムに溶解した。反応混合物に、DMSO中の1.24 mLのスクシンイミジルS-アセチルチオプロピオネート(SATP)(DMSO中で15 mg/mL)を加えた。反応混合物を室温にて1時間静置した。次いで、得られた溶液を透析チューブ(10,000 MWカットオフ)に入れ、50 mMリン酸カリウム(pH 7.5)に対して3日間透析し、得られたBSA-SATPコンジュゲート(2P)を、先の使用のために-20 で保存した。タンパク質濃度を、BioRadのクマシーブルータンパク質アッセイ(Bradford, M., Anal. Biochem. 72:248, 1976)を用いて測定したところ、9 mg/mLであった。

【0092】

BSA-SATPコンジュゲートからのアセチル保護基の除去を、5 mLのBSA-SATP(9 mg/mL)に850 μL以下のヒドロキシルアミン含有バッファー：50 mMリン酸カリウム、25 mM EDTA、0.5 M NH<sub>2</sub>OH、pH 7.2を加えることにより達成した。混合物を激しく攪拌し、室温にて2時間静置した。

【0093】

得られた溶液を、PD-10カラム(Amersham Pharmacia Biotech)を用いて脱塩して、5.5 mLのプールされたタンパク質溶液を得た。この溶液を0 に冷却し、4 mLのDMSOを滴下しながら加えた。0.5 mLのDMSO中の7 mg(0.014 mmol)のMDEA-マレイミド誘導体(20)の溶液をタンパク質溶液に加えた。混合物を室温にて24時間攪拌した。タンパク質溶液に、DMSO中の5 mg/mLのエチルマレイミド400 μLを加えて、全ての未反応のチオール基をクエンチし、混合物を室温にて24時間攪拌した。得られたコンジュゲートを透析チューブ(10,000 MWカットオフ)に入れ、1Lの50 mMリン酸カリウム中の30% DMSO(pH 7.5、3回交換、それぞれ少なくとも3時間)中、1Lの50 mMリン酸カリウム中の20% DMSO(少なくとも3時間)中、1Lの50 mMリン酸カリウム中の10% DMSO(少なくとも3時間)中、次いで4 で50 mMリン酸カリウム(pH 7.5)を6回交換(各々1L、各々少なくとも6時間)して透析した。タンパク質濃度を、BioRadのクマシーブルータンパク質アッセイ(Bradford, M., Anal. Biochem. 72:248, 1976)を用いて測定したところ、0.9 mg/mLであった。合計15 mLのコンジュゲートが得られた。

【0094】

実施例35. MDEA 2IT-KLH(2S)

キーホールリンペットヘモシアニン(KLH, 60 mg)をpH 7.2の100 mMリン酸ナトリウムバッファー中で再構成した。2-イミノチオラン(2IT, 13.5 mg)を固体としてタンパク質溶液に加え、反応物を暗室中、アルゴン雰囲気下で1時間、室温にて攪拌した。活性化されたKLH-(SH)<sub>n</sub>を、pH 6.5の100 mMリン酸ナトリウムで予め平衡化させたSephadex PD-10カラム上で脱塩した。SH負荷を測定したところ(Ellmanの試薬)、KLH分子(MW 5,000,000)あたり886であった。6 mlのKLH-(SH)<sub>n</sub>, 4.7 mg/mLに、1 mLのDMF中の14 mg(0.027 mmol)のMDEA-マレイミド(20)の溶液を滴下しながら加え、混合物を室温にて18時間攪拌した。得られた

コンジュゲートを透析チューブ(10,000 MWカットオフ)に入れ、20% DMFを含む1Lのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)バッファー(180 mM NaCl, 10 mMリン酸ナトリウム, pH 7.2)中で透析した(3回、各々少なくとも6時間)。この後、1LのPBSバッファー、pH 7.2を4 で用いた。タンパク質濃度を、BioRadのクマシーブルータンパク質アッセイ(Bradford, M., Anal. Biochem. 72:248, 1976)を用いて測定したところ、2.08 mg/mLであった。合計20 mLのコンジュゲートが得られた。

【0095】

実施例36. 2-(3,4-ジメトキシ-フェニル)-1-メチル-エチルアミン(3A)

2 g(10.29 mmol)の3,4-ジメトキシフェニルアセトンに、10 mLのメタノール、7.9 g(102 mmol)の酢酸アンモニウム、844 mg(10.2 mmol)の酢酸ナトリウムおよび970 mg(15.4 mmol)の水素化シアノホウ素ナトリウムを加えた。反応物のpHを、氷酢酸を添加することにより6~7に調整した。反応混合物を室温にて18時間攪拌し、減圧下で濃縮した。残渣に100 mLの水を加え、6 N NaOHを用いて反応物のpHを14に調整した。水相を6 x 30 mLのクロロホルムで抽出した。有機相を合わせ、乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、減圧下で濃縮したところ、明黄色のゴムとして2 g(10.24 mmol, 99%)の3A(M+H 196)が得られた。

10

【0096】

実施例37. 臭化水素酸塩との4-(2-アミノ-プロピル)-ベンゼン-1,2-ジオール化合物(3B)

2.0 gの3A(2.01 mmol)に48% HBrを加え、混合物をアルゴン雰囲気下で予め加熱したオイルバス上で3時間加熱した。反応混合物を減圧下で濃縮したところ、濃密な油が得られた。残渣に、75 mLのジクロロメタンを加え、減圧下で乾燥するまで濃縮した。これをさらに4回繰り返したところ、明桃色の粉末として2.3 gの3B(M+H, 168)が得られた。

20

【0097】

実施例38. [2-(3,4-ジヒドロキシ-フェニル)-1-メチル-エチル]-カルバミン酸tert-ブチルエステル(3C)

上記反応混合物からの3Bの全てに、50 mLの水中の50% THFを加えた。反応混合物に、2.4 gの炭酸水素ナトリウムを固体として加えた後、7 mLのTHF中の3.02 g(13.8 mmol)のジ-t-ブチルジカーボネートを30分かけて滴下しながら加えた。反応混合物を室温にて18時間攪拌し、減圧下で濃縮した。これを50 mLの水で希釈し、溶液のpHを5に調整した。水相を3 x 100 mLの酢酸エチルで抽出した。有機相を合わせ、乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、濃縮した。ヘキサン中の40%酢酸エチルを用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより残渣を精製したところ、白色の粘着性気泡として1.3 g(4.6 mmol, 46%)の3C(M+Na, 290)が得られた。

30

【0098】

実施例39. 5-(2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-プロピル)-ベンゾ[1,3]ジオキソール-2-カルボン酸エチルエステル(3D)

1.30 g(4.6 mmol)の3Cに、40 mlの無水DMF、次いで2.5 g(18 mmol)の無水K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、2.5 gの3分子篩、および2.3 mL(17.7 mmol)のエチルジプロモアセテートを加えた。反応混合物をアルゴン雰囲気下、120 で3時間加熱し、減圧下で濃縮した。残渣に100 mLの水および75 mLの酢酸エチルを加え、濾過した。濾液を分離漏斗に移し、有機相を分離した。水相を4 x 50 mLの酢酸エチルで抽出した。有機相を全て合わせ、乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、濃縮した。ヘキサン中の20%酢酸エチルを用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより残渣を精製したところ、無色のゴムとして413 mg(1.17 mmol, 26%)の3D(M+Na, 374)が得られた。

40

【0099】

実施例40. 2(2-カルバモイル-ベンゾ[1,3]ジオキソール-5-イル)-1-メチル-エチル]-カルバミン酸tert-ブチルエステル(3E)

413 mg(1.17 mmol)の3Dに、30 mLの無水メタノールを加え、アンモニアガスを室温にて1時間、溶液に通した。混合物を濃縮し、酢酸エチル中の30%ヘキサンを用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製したところ、粗生成物が得られた。これを、ヘキサン中の30%酢酸エチルを用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製したと

50

ころ、無色のゴムとして356 mg(1.10 mmol, 94%)の3E(M+Na, 345)が得られた。

【0100】

実施例41. [2-(2-アミノメチル-ベンゾ[1,3]ジオキソ-5-イル)-1-メチル-エチル]-カルバミン酸 tert-ブチルエステル(3F)

7 mLの新しく蒸留したTHFを含むフラスコを-60 に冷却し、76 mg(2.0 mmol)の水素化アルミニウムリチウムを加えた。反応混合物に、7 mLの新しく蒸留したTHF中の214 mg(0.66 mmol)の3Eの溶液をアルゴン雰囲気下で滴下しながら加えた。反応混合物を室温まで温め、室温にて2時間攪拌した。反応混合物に70  $\mu$ Lの15% NaOHおよび570  $\mu$ Lの水を加え、室温にて10分間攪拌した。得られた溶液を、CELITEを通して濾過し、残渣を50 mLのTHFで洗浄した。濾液を減圧下で濃縮し、溶剤として最初に酢酸エチル、次いで酢酸エチル中の10%メタノールを用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製したところ、無色のゴムとして46 mg(0.15 mmol, 23%)の3F(M+Na, 331)が得られた。

10

【0101】

実施例42. N-[5-(2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-プロピル)-ベンゾ[1,3]ジオキソール-2-イルメチル]-スクシンアミド酸(3G)

4 mLの1,2-ジクロロエタン中の46 mg(0.15 mmol)の3Eの溶液に、46 mg(0.46 mmol)の無水コハク酸および22 mg(0.18 mmol)の4-DMAPを加えた。反応混合物をアルゴン雰囲気下、40 にて2.5時間攪拌した。これを50 mLの酢酸エチルで希釈し、3 x 30 mLの5%塩化アンモニウム溶液で洗浄した。有機相を乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、減圧下で濃縮した。溶剤として酢酸エチルを用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより残渣を精製したところ、無色のゴムとして36 mg(0.08 mmol, 60%)の3G(M+Na, 431)が得られた。

20

【0102】

実施例43. N-[5-(2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-プロピル)-ベンゾ[1,3]ジオキソール-2-イルメチル]-スクシンアミド酸2,5-ジオキソ-ピロリジン-1-イルエステル(3H)

32 mg(0.078 mmol)の3Gに、4 mLのジクロロメタン(CaH<sub>2</sub>上で蒸留)、次いで14 mg(0.12 mmol)のN-ヒドロキシスクシンイミドおよび30 mg(0.152 mmol)の1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミドを加えた。反応混合物をアルゴン雰囲気下、室温にて18時間攪拌した。反応混合物をさらに25 mLのジクロロメタンで希釈し、2 x 20 mLの水、2 x 20 mLの飽和炭酸水素ナトリウムおよび1 x 20 mLの水で洗浄した。有機相を乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、濃縮したところ、無色のゴムとして36 mg(0.071 mmol)の3Hが得られた。

30

【0103】

実施例44. MDA-アミノデキストランコンジュゲート(3I)

機械攪拌器を備えた3Lの三つ首フラスコに、700 mLの脱イオン水を加えた。37,500の分子量を有するデキストラン(70 g, 1.86 mmol)(Sigma Chemicals, Milwaukee, WI)を、混合物を攪拌し、室温にてデキストランを水に溶解しながら、徐々にフラスコに加えた。反応混合物に、140 mLの1N NaOHを加え、反応物を30~35 に加熱した。次いで、245 mLの1,4-ジオキサン中の79 mL(923 mmol)のエピプロモヒドリンの溶液を30~35 で45分間かけて滴下しながら加えた。得られた混合物を30~35 でさらに4時間、攪拌および加熱した。反応混合物を室温まで冷却した後、2Lの分離漏斗に移した。有機相を底の相としてゆっくり分離し、廃棄した。水性混合物を3Lフラスコに移し、氷浴バス中で冷却した。次いで、700 mLの25%水酸化アンモニウム溶液を反応フラスコに加え、1N HClを用いてpHをpH11に調整した。得られた溶液を一晚、室温まで温めた。反応混合物を透析チューブ(MWカットオフ2000)に移し、以下のスケジュールに従って、各工程につき20Lの溶媒を用いて、2個の12L容器中で透析した：1%酢酸で6時間、1%酢酸で24時間、1%酢酸で48時間、および脱イオン水で24時間(6回)。

40

【0104】

回転蒸発により溶液を3分の1容量に濃縮した後、凍結乾燥したところ、白色の固体として48 gの生成物が得られた。TNBSアッセイを用いることにより、生成物がアミノデキストラン1分子につき5.7個のアミノ基を含むことが判明した(Anal. Biochem. 64, 284-288, 1975)。このアミノデキストランを用いて、MDA-アミノデキストランコンジュゲートを調製

50

した。

【0105】

78 mgのアミノデキストランに、5 mLのDMSOを室温にて加えた。混合物を、全てのアミノデキストランが溶液になるまで、室温にて10分間攪拌した。MDA誘導体3H(9.6 mg, 0.2 mmol)を1 mLの無水DMSOに溶解し、攪拌したアミノデキストラン溶液に滴下しながら加えた。混合物を室温にて18時間攪拌し、Spectrapor透析チューブ(MWカットオフ2000)中に移し、以下のスケジュールに従って透析した(それぞれ1L容量を用いて透析)：室温にて40%の脱イオン水中の60% DMSO(3回、各々少なくとも3時間)；室温にて50%脱イオン水中の50% DMSO(2回、それぞれ少なくとも3時間)；70%脱イオン水中の30% DMSO(1回、少なくとも3時間)；90%脱イオン水中の10% DMSO(1回、少なくとも3時間)；および室温にて脱イオン水(6回、各々少なくとも6時間)。

【0106】

溶液を透析チューブから取り出し、凍結乾燥したところ、白色の粉末として64 mgの保護されたMDA-アミノデキストランコンジュゲートが得られた。この保護されたコンジュゲートは脱保護工程にすぐに使えた。

【0107】

上記の保護されたMDA-デキストランコンジュゲートの全部に、2 mLのジクロロメタンを加え、懸濁液を室温にて30分間攪拌した。反応混合物に2 mLのトリフルオロ酢酸をゆっくり加え、これを室温にて10分間攪拌した。反応混合物を減圧下で乾燥するまで濃縮し、残渣を10 mLの脱イオン水に溶解した。反応混合物を透析チューブ(MWカットオフ2000)に移し、1 Lの脱イオン水に対して透析した(4回、各々少なくとも6時間)。溶液を透析チューブから取り出し、凍結乾燥したところ、白色の粉末として53 mgのMDA-アミノデキストランコンジュゲート(31)が得られた。

【0108】

実施例45. MDMA 8.3クローンおよび抗体の製造  
免疫

16週齢以上の雌Balb/Cマウスを、以下のように免疫原の複数回注射により免疫した。マウス1匹あたり100 µgのMDMA免疫原1Pを等量のRIBI免疫原(Sigma Chemicals)と2~3分間混合し、37ゲージ皮下注射用針を備えた好適な大きさのシリンジに入れた。各マウスは腹膜内注射を介してアジュバントを含む100 µg用量の免疫原を受容した。39日後、同じマウスは最初と同一の別の注射を受けた。注射を60日目に繰返し、80日目に再び行った。192日目に、1匹のマウスに上記のように調製した150 µgの注射液を、同じ経路を介して与えた。この動物を4日後に融合のために用いた。

【0109】

融合およびモノクローナル抗体の開発

融合のために選択したマウスを眼窩部(retro-orbital)出血により放血して血清を回収し、続いて頸部を脱臼させた。無菌技術を用いて脾臓を取り出し、滅菌ペトリ皿中、10 mLの完全培養培地(Iscove's改変ダルベッコ培地(IMDM), Irvine Scientific)に入れた。次いで、脾臓を2つの滅菌凍結された顕微鏡スライド間で挽いた。得られた細胞懸濁液を15 mLの遠心チューブ中で1~2分間静置して大きな粒子を沈殿させた。得られた単一の細胞懸濁液を取り出し、血球計測器を用いて計数した。F0ミエローマ細胞(CRL-1646, American Type Culture Collection)を脾臓細胞中に1:5(F0ミエローマ細胞：脾臓細胞)の比で混合し、約800 x Gで15分間遠心分離した。上清の液体を取り出し、廃棄し、15 mLの無血清IMDM培養培地を加えた。細胞を再懸濁し、再び遠心分離した。得られた細胞ペレットを、Fazekas de St. Groth, J. Immunol. Meth. 35:1-21, 1980の方法に従ってポリエチレングリコール/DMSOを用いて融合した。

【0110】

融合後、10% ウシ胎児血清(Hyclone Labs)、10% Condimed HI (Roche Molecular Chemicals)、50 mM 2-メルカプトエタノール、20 mM エタノールアミン、ヒポキサンチン-メトトレキサート-チミジン(HMT, Sigma Chemicals, 使用のために1:50に希釈)、4 mMグル

タミンおよびPen/Strep抗体(Irvine Scientific)を補給した完全Iscove's改変ダルベッコ培地中、1 mLあたり $2 \times 10^5$ 個の脾臓リンパ球となるように細胞を希釈した。融合細胞のこの混合物を、滅菌した96穴マイクロ培養プレート中に200  $\mu$ L/ウェルで塗布した。被覆したプレートを5% CO<sub>2</sub>中、37 °Cで6日間、インキュベーターに入れた。6日目に、約150  $\mu$ Lの培地を、8箇所減圧マニホールドを介して除去し、150  $\mu$ LのHT-IMDMを加えた。この培地を、HMTをヒポキサンチン-チミジン(HT, Sigma, 1:50に希釈)で置換したこと以外は、上記のように調製した。視覚検査においてスクリーニングに好適な増殖が表れる、約50%の集密度になるまで以前に記載のようにプレートをインキュベートした。

#### 【0111】

##### スクリーニング

スクリーニングは、0.1 mLのMDMA-BSA(10)を1 mg/mLの濃度でプラスチックウェルに、37 °Cにて1時間吸着させる酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)で構成した。次いで、ウェルをPBS-TWEEN(0.05% TWEEN 20を含むリン酸緩衝生理食塩水)でリンスし、200  $\mu$ LのPost Coat溶液(1%ゼラチン加水分解物、0.15 M Tris中の2%スクロース、pH 7.2-7.4)を用いて、室温にて1時間ブロックした。次いで、プレートを2%スクロースでリンスし、空気乾燥し、使用するまで4 °Cにて乾燥密閉したプラスチックバッグ中で保存した。

#### 【0112】

スクリーニングアッセイを行うために、MDMA-BSAでコーティングした2つのプレートを、別々のウェルに25  $\mu$ LのPBS-TWEENおよびPBS-TWEEN中の遊離MDMAの400 ng/mL溶液25  $\mu$ Lをピペットで入れることにより調製した。少なくとも50%の細胞増殖集密度を示すウェルから取った細胞培養上清(25  $\mu$ L)を、可撓性マイクロタイタープレート(Falcon Plastics)中、PBS-TWEENで1:20に希釈した。25  $\mu$ Lの希釈上清を、4個のマイクロタイタープレートの各々のウェルに加え、37 °Cにて1時間、被覆してインキュベートした。次いで、Biotek Elx 300プレート洗浄器およびPBS-TWEENを用いて、プレートを洗浄した。ヤギ抗マウスIgG-HRP(西洋ワサビペルオキシダーゼ)コンジュゲート(Zymed Labs)を、使用直前にPBS-TWEEN中で1:5,000に希釈し、100  $\mu$ Lを4個全部のプレートの全ウェルに加えた。プレートを再び37 °Cにて1時間、被覆してインキュベートした。プレートを上記のように洗浄し、100  $\mu$ Lの1 N HClの添加により顕色を停止させ、マイクロプレートリーダー(Molecular Devices Corp.)を用いて450 nmで色を読み取った。データをMacintoshコンピュータ上で捕捉し、試験した培養ウェルあたり異なるプレートの各ウェルのOD<sub>450</sub>を示すようにまとめた。

#### 【0113】

MDMA-BSAとの良好な結合(高いOD)および遊離MDMAによる良好な競合(低いOD)を提供した抗体の産生を示す細胞系をさらなる研究のために選択した。選択したハイブリドーマを、上記の培養培地中で限界希釈することにより即時にストリンジентなサブクローニングにかけた。約50%の集密度に増殖したら、MDMA-BSAとの結合および遊離MDMAまたはMDEAによる競合を試験する上記の方法と同様の方法により、ハイブリドーマを再試験した。MDMA-BSAとの良好な結合およびいずれかの遊離薬物による競合を示すクローンを、特異性分析および細胞の堆積のために選択した。特定の細胞系の全サブクローンがほぼ等しく働かなかった場合、これを不安定の証拠として取り、3個のウェルを別のサイクルのサブクローニングのために用いた。この手順を、各系のハイブリドーマが安定になるまで繰り返した。安定性に際して、細胞を培養中で増殖させ、サンプルを保存のために蒸気相液体窒素中で-80 °Cにて凍結した。培養上清のサンプルを特異性分析のために保存した。

#### 【0114】

##### 特異性の決定

モノクローナル抗体の結合特異性を、薬物競合的ELISAアッセイを用いて決定した。0.1  $\mu$ g/mL(他の条件は上記の通り)のMDMA-BSAでコーティングしたプレートを用いた。抗体力価を、上記のハイブリドーマ培養上清から、コーティングされたプレート上でインキュベートした上清の連続希釈液のアッセイを介して決定した。各希釈液での各上清についてのOD<sub>450</sub>を、希釈因子に対してプロットした。そのデータから、最大OD<sub>450</sub>の50~60%を提供

10

20

30

40

50

する希釈因子を決定した。次いで、この希釈液を、力価決定のためのものと同じ型のプレートを用いる競合的阻害アッセイのために用いた。

【0115】

競合薬物を調製するために、以下の遊離薬物をメタノール中で1 mg/mLに溶解した：MDMA、MDEA、MDA、MBDB、BDB、d-アンフェタミン、d-メタアンフェタミン、l-アンフェタミン、およびl-メタアンフェタミン。これらの保存溶液をPBS-TWEEN中で1:333の比で希釈し、各々の100 µLをマイクロタイタープレートのA列に移した。これらの溶液を、A列からの50 µLを100 µLのPBS-TWEENを含むB列のウェルに移し、ピペットにより混合することにより連続希釈した。この希釈プロセスを、マイクロタイタープレートの7つの列が遊離薬物溶液の連続希釈液を含むようになるまで繰り返した。第8列は薬物なしのままにした。

10

【0116】

0.1 µg/mLのMDMA-BSAでコーティングしたプレートを上記のように調製した。各遊離薬物の各希釈液の25 µLアリコートを生鮮なコンジュゲートでコーティングしたプレートに移した。これらの溶液に25 µLの希釈したハイブリドーマ培養上清を加えた。この手順により、9個の交叉反応物、すなわち、薬物標準MDMAを含む上記の交叉反応物を、プレート1枚あたり1個の抗体上でスクリーニングした。競合アッセイを、37 °Cにて1時間インキュベートした。次いで、プレートをBiotek Elix 300プレート洗浄器およびPBS-TWEENを用いて洗浄した。ヤギ抗マウスIgG-西洋ワサビペルオキシダーゼ(IgG-HRP)コンジュゲート(Zymed Labs)を使用直前にPBS-TWEEN中で1:5,000に希釈し、100 µLを全部で4枚のプレートの全ウェルに加えた。プレートを37 °Cにて1時間、再び被覆してインキュベートした。プレートを上記のように洗浄し、100 µLのK Blue基質(Neogen)を加えた。暗室中で室温にて5分間、顕色させた。100 µLの1 N HClの添加により顕色を停止させ、Molecular Devices Corp.マイクロプレートリーダーを用いて450 nmで色を読み取った。データをMacintoshコンピュータ上で捕捉した。OD<sub>450</sub>値を、種々の濃度の遊離薬物競合剤(10<sup>-12</sup> ~ 10<sup>-14</sup> M)の各々についてグラフにした。

20

【0117】

この特異性決定方法からのデータを用いて、免疫化薬物、MDMAと比較した、異なる薬物に対する各抗体の交叉反応率を算出した。これを、各薬物についてのED<sub>50</sub>を決定するためのデータを分析することにより達成した。ED<sub>50</sub>は、コンジュゲートに結合したMDMAに対するモノクローナル抗体の結合を50%阻害するのに必要とされる遊離競合薬物(MDEA、MDAなど)の有効濃度の尺度である。標準のED<sub>50</sub>を考慮する薬物のED<sub>50</sub>で割ることにより交叉反応性を算出し、交叉反応性に100をかけることにより交叉反応率を算出した。この分析により、MDMA 8.3と命名した1個のクローンが、予想外にも、免疫化薬物MDMAに対するよりも薬物MDEAに対して89倍高い親和性を示すことが示された。このクローンはまた、予想外にも、MDMAに対するよりもMDAに対して4.6倍高い親和性を示した。これらの知見を以下の表1にまとめる。

30

【表1】

表1. MDMA 8.3の特異性決定(交叉反応率%)

クローン	MDMA	MDEA	MDA	MBDB	BDB	d-AMP	d-MAMP	l-AMP	l-MAMP
8.3	100	8,879	464	0	0	0	0	0	0

40

【0118】

マウスハイブリドーマ細胞系MDMA 8.3(XTCB 8.3と命名)を、2003年7月23日にAmerican Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)に寄託し、ATCC命名PTA-5340を割当てられた。

【0119】

実施例46. MDMA 6.1ハイブリドーマおよびモノクローナル抗体の製造  
免疫

50

16週齢以上の雌Balb/Cマウスを、以下のスケジュールに従って免疫原の複数回注射により免疫した。マウス1匹あたり100 $\mu$ gのMDMA免疫原1Pを等量のRIBI免疫原(Sigma Chemicals)と2~3分間混合し、37ゲージの皮下注射針を備えた好適な大きさのシリンジ中に入れた。各マウスは腹膜内注射を介して100 $\mu$ g用量のアジュバントを含む免疫原を受容した。39日後、同じマウスは最初と同一の別の注射を受けた。注射を60日目に繰返し、80日目に再び行った。1匹の動物を4日後に融合のために用いた。

【0120】

#### 融合およびモノクローナル抗体の開発

動物の取り扱い、細胞培養および融合の方法は全て、実施例45中に上記された通りとした。

10

【0121】

#### スクリーニング

実施例45に記載のものと同じ方法を用いた。

【0122】

#### 特異性

特異性の決定を実施例45に記載のように行った。本実施例で開発された抗体は、以前の知見とは対照的に、予想外にもd-メタアンフェタミンに対する高い程度の交叉反応性を示すことが判明した。MDMA 6.1と命名した、このクローンは、以下の表に示すように、d-メタアンフェタミンおよびMBDBに対して、MDMAに対する親和性と本質的に同等の親和性を示した。

20

【表2】

表2. MDMA 6.1の特異性決定(交叉反応率%)

クローン	MDMA	MDEA	MDA	MBDB	BDB	d-AMP	d-MAMP	l-AMP	l-MAMP
6.1	100	43.1	0.3	100	3.4	0.007	95.5	0	2.1

【0123】

マウスハイブリドーマ細胞系MDMA 6.1(XTCB 6.1と命名)を、2003年7月23日にAmerican Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)に寄託し、ATCC命名PTA-5339を割当てられた。

30

【0124】

#### 実施例47. クローンおよびモノクローナル抗体MDEA 2.2の製造 免疫

16週齢以上の雌Balb/Cマウスを、以下のスケジュールに従って免疫原の複数回注射により免疫した。マウス1匹あたり100 $\mu$ gのMDMA免疫原2Uを等量のRIBI免疫原(Sigma Chemicals)と2~3分間混合し、37ゲージの皮下注射針を備えた好適な大きさのシリンジ中に入れた。各マウスは腹膜内注射を介して100 $\mu$ g用量のアジュバントを含む免疫原を受容した。39日後、同じマウスは最初と同一の別の注射を受けた。注射を60日目に繰返し、80日目に再び行った。注射を137日目に繰返し、4日後に、1匹の動物を融合のために用いた。

40

【0125】

#### 融合およびモノクローナル抗体の開発

動物の取り扱い、細胞培養および融合の方法は全て、実施例45中に上記された通りとした。

【0126】

#### スクリーニング

いくつかの置換を用いた以外は実施例45に記載のものと同じ方法を用いた。実施例45におけるMDMA-BSA (10)の代わりに、MDEA-BSA (2T)をプレートコーティングとして用いた。競合的結合も、実施例45におけるMDMAに加えてMDEAを用いた。

【0127】

50

**特異性**

特異性の決定は、MDEA-BSA (2T)をMDMA-BSA (10)に置換した以外は実施例45で説明した通りに行った。この融合物から得られた2つの抗体について決定された交叉反応率を以下の表3に提示する。抗体MDEA 1.1は、マウスにおいて免疫応答を生じさせるのに用いた免疫原を与えられた、期待される交叉反応プロフィールを有する一例である。

【表3】

表3. MDEAモノクローナル抗体の特異性

クローン	MDEA	MDMA	MDA	MBDB	BDB	d-AMP	d-MAMP	l-AMP	l-MAMP
1.1	100	26	0	3.04	0	0	0.6	0	3.5
2.2	100	412	.1	4,360	2.3	0	30.7	0	2.5

10

## 【0128】

マウスハイブリドーマ細胞系MDEA 2.2(EVE A2.2と命名)を、2003年7月23日にAmerican Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)に寄託し、ATCC命名PTA-5338を割当てられた。

## 【0129】

融合に用いたマウスにおける免疫応答を生じさせるのに用いた刺激免疫原はMDEA-KLHであり、従って得られるモノクローナル抗体において観察される最も高い親和性はその部分に対するものであると予想される。これはクローンMDEA 1.1について認められたことであり、他の薬物との交叉反応性は比較的小さい。クローンMDEA 2.2は、その振舞いからのいくつかの予想外の逸脱を示した。MDMAに対する親和性はMDEAに対する親和性の412%であり、MBDBについては、非常に予想外のことに4,360%であった。

20

## 【図面の簡単な説明】

## 【0130】

【図1】図1はアミノ(1F)、ヒドロキシル(1N)およびカルボキシル官能化(1M)t-BOC保護MDMA誘導体の合成方法の模式図である。

【図2】図2はトリフルオロアセトアミド保護MDMA活性化ハプテン誘導体(1L)のN-ヒドロキシスクシンイミドエステルの合成方法の模式図である。

30

【図3】図3はMDMA活性化ハプテン誘導体(1L)からのMDMA免疫原(1P)およびMDMA-BSAコンジュゲート(10)の合成に関する模式図である。

【図4】図4はアミノ(2F)およびカルボキシル官能化(2M)t-BOC保護MDEA誘導体の合成方法の模式図である。

【図5】図5はトリフルオロアセトアミド保護MDEA活性化ハプテン誘導体(2L)のN-ヒドロキシスクシンイミドエステルの合成方法の模式図である。

【図6】図6はMDEA活性化ハプテン誘導体(2L)からのMDEA免疫原(2U)およびMDMA-BSAスクリーニングコンジュゲート(2T)の合成に関する模式図である。

【図7】図7はアミノ誘導体(2F)からのMDEAマレイミド誘導体(20)の合成に関する模式図である。

40

【図8】図8はMDEAマレイミド誘導体(20)およびチオール化BSAからのMDEA-マレイミド-BSAコンジュゲート(2R)の合成に関する模式図である。

【図9】図9はMDEAマレイミド誘導体(20)およびチオール化KLHからのMDEA-マレイミド-KLHコンジュゲート(2S)の合成に関する模式図である。

【図10】図10はMDA活性化ハプテン(3H)の合成に関する模式図である。

【図11】図11はMDAアミノデキストランコンジュゲート(3I)の合成に関する模式図である。

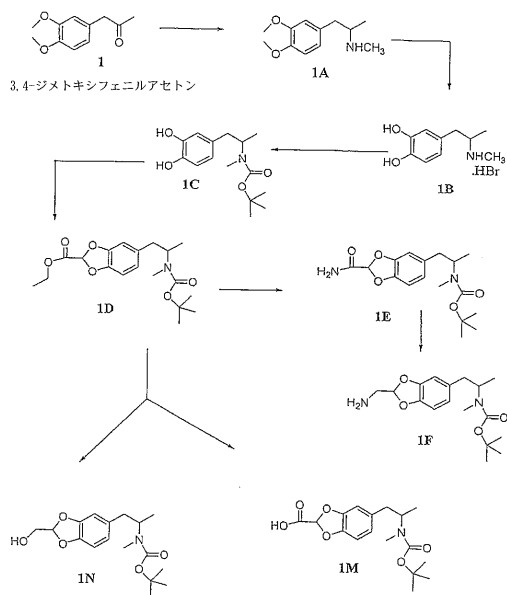
【図12】図12はカルボベンゾキシ保護BDB(4H)およびMBDB(5H)誘導体の合成方法の模式図である。

【図13】図13はBDB(4Mおよび4N)ならびにMBDB(5Mおよび5N)誘導体のKLHおよびアミノデ

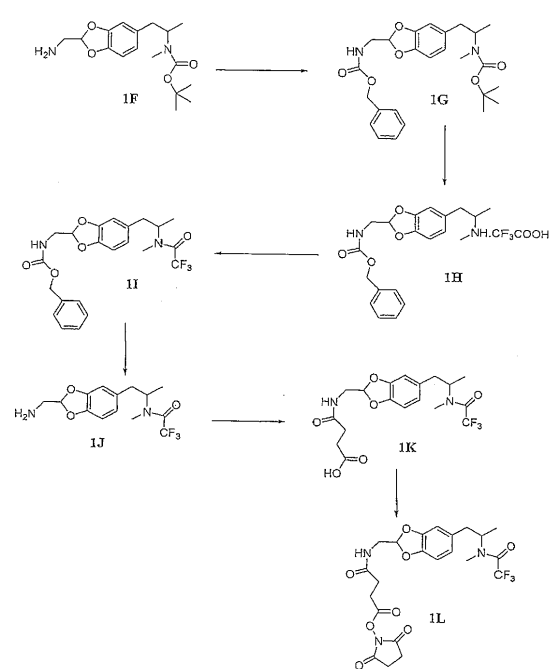
50

キストランコンジュゲートの合成方法の模式図である。

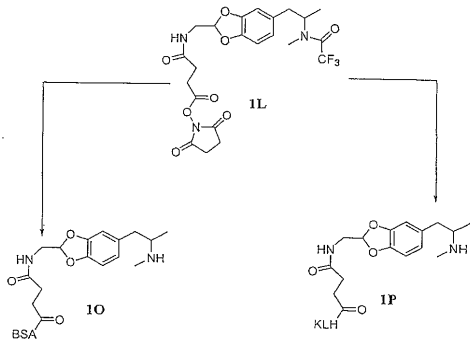
【 図 1 】



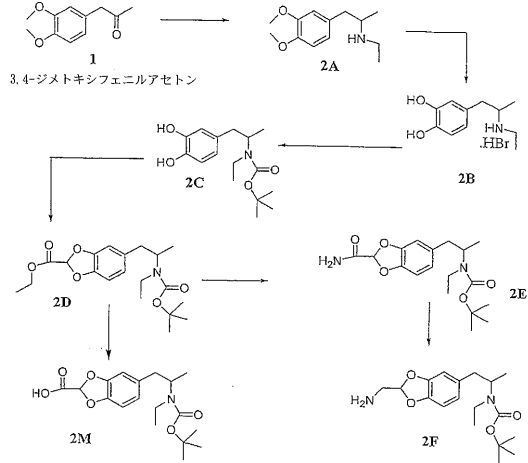
【 図 2 】



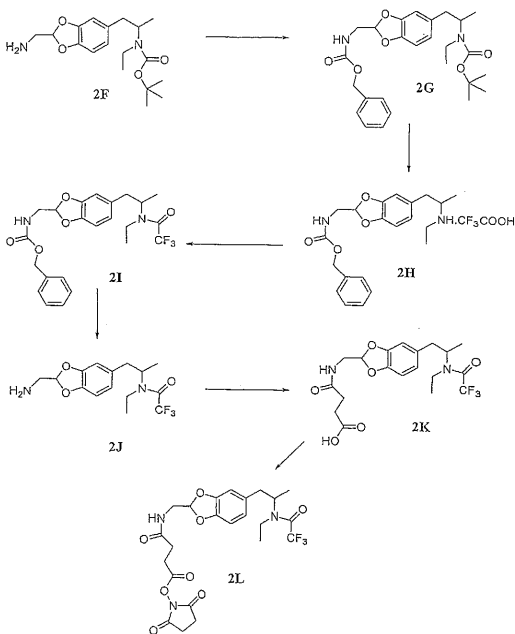
【 図 3 】



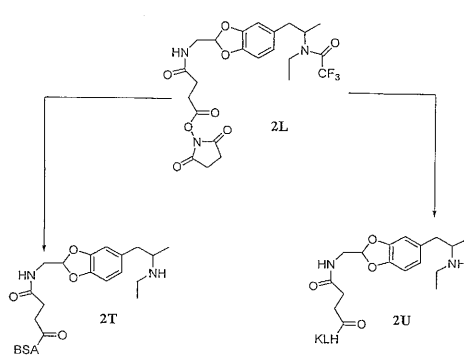
【 図 4 】



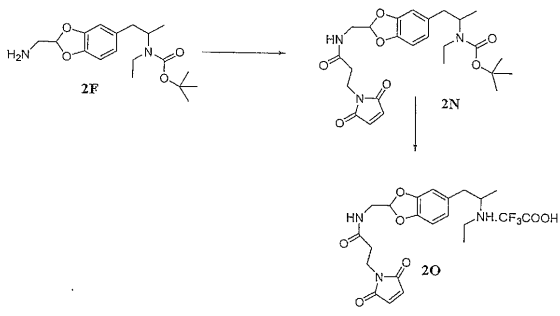
【 図 5 】



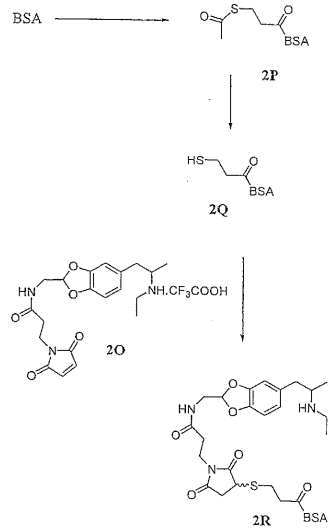
【 図 6 】



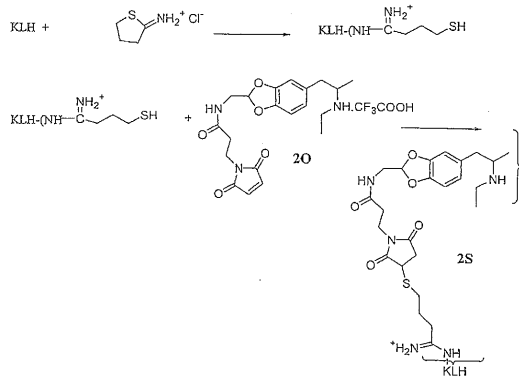
【 図 7 】



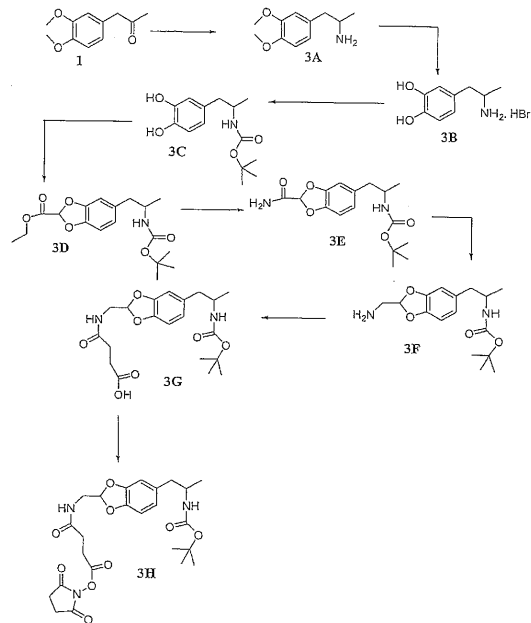
【 図 8 】



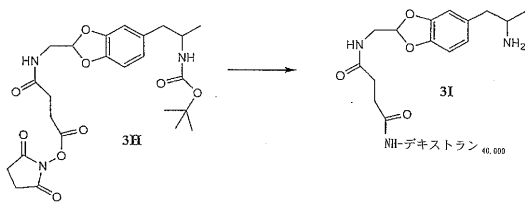
【 図 9 】



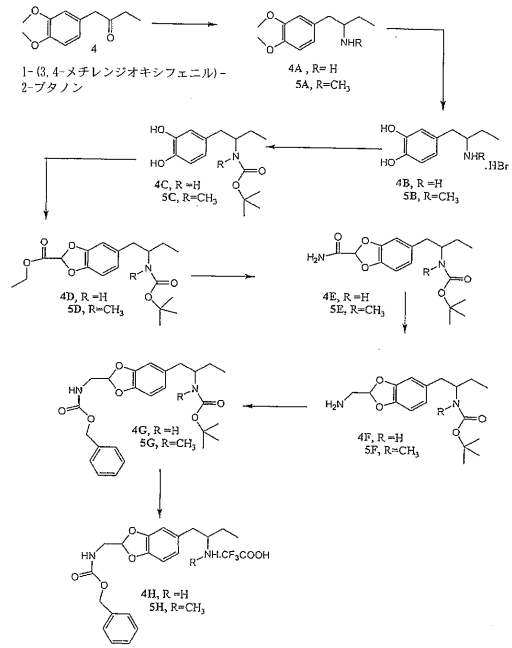
【 図 10 】



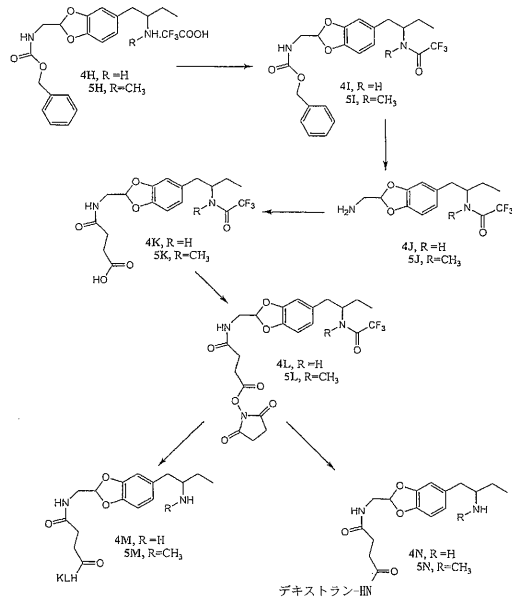
【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



## 【手続補正書】

【提出日】平成16年9月1日(2004.9.1)

## 【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

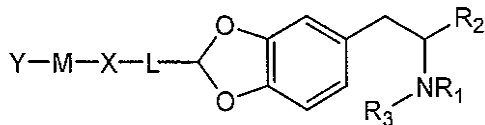
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記構造：

【化1】

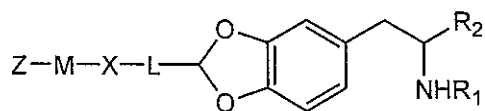


(式中、LはCOまたはCH<sub>2</sub>であり、XはNHまたはOであり、Mは飽和もしくは不飽和、脂肪族もしくは芳香族、置換もしくは非置換の、0~10個の炭素原子もしくはヘテロ原子の直鎖もしくは分枝鎖であり、Yは活性エステル、イソシアネート、イソチオシアネート、チオール、イミドエステル、アンヒドリド、マレイミド、チオラクトン、ジアゾニウム基、およびアルデヒドからなる群より選択される活性化された官能基であり、R<sub>1</sub>はH、CH<sub>3</sub>、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>、またはC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>であり、R<sub>2</sub>はCH<sub>3</sub>またはC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>であり、ならびにR<sub>3</sub>は保護基またはHである)を有する化合物。

【請求項2】

下記構造：

【化2】



(式中、LはCOまたはCH<sub>2</sub>であり、XはNHまたはOであり、Mは飽和もしくは不飽和、脂肪族もしくは芳香族、置換もしくは非置換の、0~10個の炭素原子もしくはヘテロ原子の直鎖もしくは分枝鎖であり、Zは担体分子であり、R<sub>1</sub>はH、CH<sub>3</sub>、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>、またはC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>であり、R<sub>2</sub>はC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>またはC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>である)を有する化合物。

【請求項3】

MDEAに対して100%を超える交叉反応性を有するモノクローナル抗体を産生する、細胞系MDMA 8.3、ATCC命名PTA-5340。

【請求項4】

MDEAに対して100%を超える交叉反応性を有する、細胞系MDMA 8.3、ATCC命名PTA-5340から産生されるモノクローナル抗体。

【請求項5】

MDEAに対して100%を超える交叉反応性を有し、細胞系MDMA 8.3、ATCC命名PTA-5340に由来する抗体と等価な様式で結合するモノクローナル抗体。

【請求項6】

MBDBおよびd-MAMPIに対して90%を超える交叉反応性を有するモノクローナル抗体を産生する、細胞系MDMA 6.1、ATCC命名PTA-5339。

【請求項7】

MBDBおよびd-MAMPIに対して90%を超える交叉反応性を有する、細胞系MDMA 6.1、ATCC命名PTA-5339から産生されるモノクローナル抗体。

**【請求項 8】**

MBDBおよびd-MAMPIに対して90%を超える交叉反応性を有し、細胞系MDMA 6.1、ATCC命名PTA-5339に由来する抗体と等価な様式で結合するモノクローナル抗体。

**【請求項 9】**

MDMAおよびMBDBに対して100%を超える交叉反応性を有するモノクローナル抗体を産生する、細胞系MDEA 2.2、ATCC命名PTA-5338。

**【請求項 10】**

MDMAおよびMBDBに対して100%を超える交叉反応性を有する、細胞系MDEA 2.2、ATCC命名PTA-5338から産生されるモノクローナル抗体。

**【請求項 11】**

MDMAおよびMBDBに対して100%を超える交叉反応性を有し、細胞系MDEA 2.2、ATCC命名PTA-5338に由来する抗体と等価な様式で結合するモノクローナル抗体。

**【請求項 12】**

免疫原としての請求項2に記載の化合物の使用。

## フロントページの続き

- (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 エフ. ジーグラ  
アメリカ合衆国 4 6 0 3 3 インディアナ州, カーメル, アイアンウッド ドライブ 8 8 8
- (72)発明者 リチャード テリー 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
- (72)発明者 アンロンガ オーヤング  
アメリカ合衆国 4 6 2 6 8 インディアナ州, インディアナポリス, ナンバー エー, サンタ  
バーバラ ドライブ 7 6 5 3
- (72)発明者 サルヴァトーレ ジェイ. サラモネ  
アメリカ合衆国 0 8 5 5 9 ニュージャージー州, ストックトン, ヤード ロード 6 5
- Fターム(参考) 4B065 AA90X AB04 AC14 BA08 CA25 CA46  
4C022 CA04 CA05  
4H045 AA11 CA40 DA76 EA50 FA72 FA74

【外国語明細書】

2005097252000001.pdf

专利名称(译)	迷魂药类衍生物，免疫原，以及它们在检测抗体和摇头丸类药物中的用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005097252A</a>	公开(公告)日	2005-04-14
申请号	JP2004207694	申请日	2004-07-14
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 ジェラルドエフジグラー リチャードテリールト アンロンガオーヤング サルヴァトーレジェイサラモネ		
发明人	ミタリゴージャル ジェラルドエフ.ジグラー リチャードテリールト アンロンガオーヤング サルヴァトーレジェイ.サラモネ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/00 C07D317/58 C07K16/44 C12N5/10 G01N33/94		
CPC分类号	C07D317/46 A61K39/0005 C07K16/44 G01N33/946 Y02P20/55 Y10S530/809		
FI分类号	C07D317/58 C07K16/44 G01N33/53.G C12N5/00.B C12N5/00.102 C12N5/16		
F-TERM分类号	4B065/AA90X 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4C022/CA04 4C022/CA05 4H045/AA11 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	藤井 爱		
优先权	10/622254 2003-07-18 US		
其他公开文献	JP4369814B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种用于检测摇头丸类化合物的单克隆抗体。本发明包括在式1所示的亚甲基二氧基位置连接的摇头丸类化合物的新类似物，即衍生的，和新的摇头丸类免疫原。本发明还包括使用MDO-缀合的MDMA免疫原产生的独特的单克隆抗体以及独特的缀合物和示踪剂。这些抗体，结合物和示踪剂可用于免疫分析中检测生物液体中的摇头丸类化合物。（式中，L为CO或CH<sub>2</sub>，X为NH或O，M为脂族或芳族碳原子，Y为活性酯，异氰酸酯等，R<sub>1</sub>为H，CH<sub>3</sub>等），R<sub>2</sub>是CH<sub>3</sub>或C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>，R<sub>3</sub>是保护基或H）[选择图]无

