

(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2014-517298

(P2014-517298A)

(43) 公表日 平成26年7月17日(2014.7.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53</b> (2006.01)	GO 1 N 33/53	S
<b>CO 7 D 243/38</b> (2006.01)	GO 1 N 33/53	G
	CO 7 D 243/38	C S P

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁)

(21) 出願番号	特願2014-512855 (P2014-512855)	(71) 出願人	511069507
(86) (22) 出願日	平成24年5月3日 (2012.5.3)		サラダックス バイオメディカル インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成26年1月22日 (2014.1.22)		アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 18015 ベスレヘム リサーチ ドライブ 116
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/036257	(74) 代理人	110000855
(87) 国際公開番号	W02012/161938		特許業務法人浅村特許事務所
(87) 国際公開日	平成24年11月29日 (2012.11.29)	(72) 発明者	サラモーン、サルヴァトーレ、ジェイ、
(31) 優先権主張番号	13/186, 147		アメリカ合衆国、ニュージャージー、スト
(32) 優先日	平成23年7月19日 (2011.7.19)	(72) 発明者	コートニー、ジョディ、ブレイク
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国、ペンシルヴァニア、ドイルズタウン、ヒッコリー ホロウ レイン 5859
(31) 優先権主張番号	13/114, 252		
(32) 優先日	平成23年5月24日 (2011.5.24)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 クロザピンイムノアッセイ

(57) 【要約】

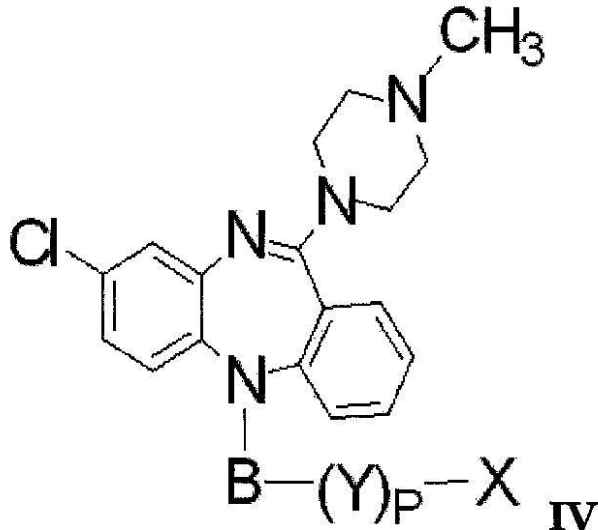
クロザピンから誘導される新規なコンジュゲート及び免疫原並びにこれらの免疫原により生じる抗体は、体液中のクロザピンの定量化及びモニタリングのためのイムノアッセイにおいて有用である。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

試料中のクロザピンを検出するためのイムノアッセイであって、a) 該試料、b) クロザピンと選択的に反応するが N - デスメチルクロザピン及びクロザピン - N - オキシドと実質的に交差反応しない抗体、並びに c) 反応性のチオール基又はアミノ基のいずれかを有する担体と、式

## 【化 1】



[ 式中、B は、 $-(C=O)-$ 、 $-(C=O)-NH-$ 、 $-(C=O)-O-$ 、 $-CH_2-$  であり、

Y は、有機スペーシング基であり、

X は、ポリアミンポリマーに結合できる末端官能基であり、

p は、0 から 1 の整数である ]

の化合物又はその塩とのコンジュゲートの混合物を準備し、

該試料中の該クロザピン及び該混合物中の該コンジュゲートを該抗体と結合させ、

その後、該抗体に結合している又は結合していない該混合物中の該コンジュゲートの量を測定し、それにより試料中のクロザピンの存在を決定する、イムノアッセイ。

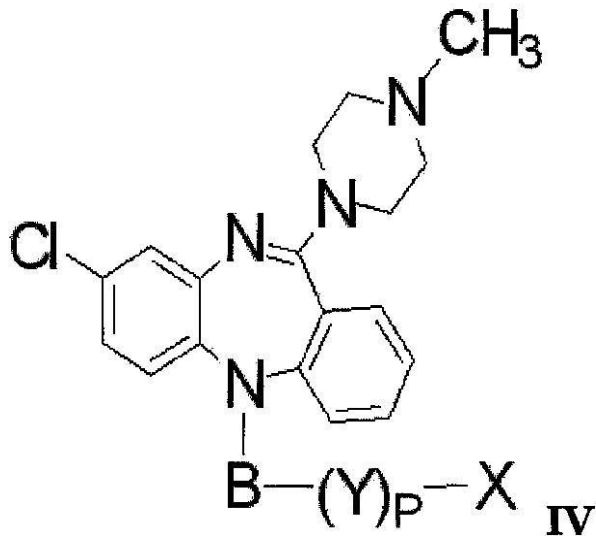
## 【請求項 2】

前記試料がヒト試料である、請求項 1 に記載のプロセス。

## 【請求項 3】

前記抗体が、式

## 【化 2】



10

[ 式中、B は、 $-(C=O)-$ 、 $-(C=O)-NH-$ 、 $-(C=O)-O-$ 、 $-CH_2-$  であり、

20

Y は、有機スペーシング基であり、

X は、ポリアミンポリマーに結合できる末端官能基であり、

p は、0 から 1 の整数である ]

の化合物又はその塩にコンジュゲートされた反応性のチオール基又はアミノ基を有する免疫原性担体を含む免疫原から生じる、請求項 2 に記載のイムノアッセイ。

## 【請求項 4】

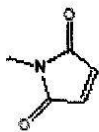
前記担体がチオール基を含有し、該免疫原性ポリマーに連結される化合物における X が、該チオールと反応できる官能基である、請求項 3 に記載のイムノアッセイ。

## 【請求項 5】

X が、

30

## 【化 3】



である、請求項 4 に記載のイムノアッセイ。

## 【請求項 6】

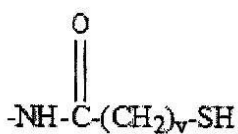
Y が低級アルキレンである、請求項 5 に記載のイムノアッセイ。

40

## 【請求項 7】

前記免疫原性担体が、前記官能基として

## 【化 4】



[ 式中、v は、1 から 6 の整数である ]

50

を含有する、請求項 6 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 8】

前記抗体が固体支持体に結合している、請求項 2 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 9】

前記固体支持体がマイクロタイタープレートである、請求項 8 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 10】

前記固体支持体がナノ粒子である、請求項 9 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 11】

選択的にクロザピンに結合し、N - デスメチルクロザピン及びクロザピン - N - オキシドに実質的に結合しない抗体。

10

【請求項 12】

前記抗体がマウス、ヒツジ、ウサギ又はラットに由来する、請求項 11 に記載の抗体。

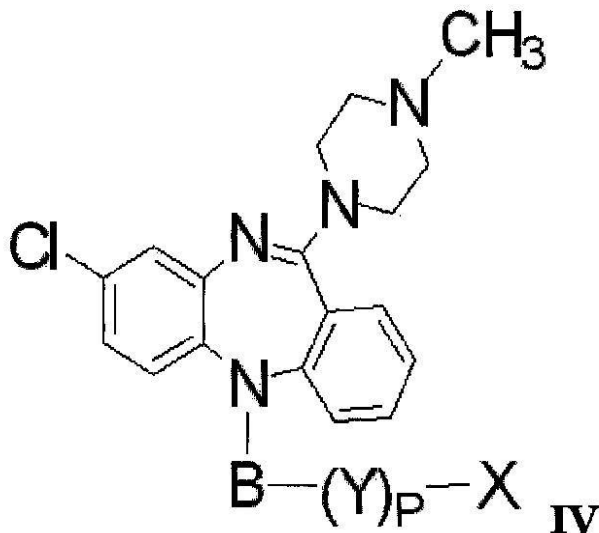
【請求項 13】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 13 に記載の抗体。

【請求項 14】

前記抗体が、式

【化 5】



20

30

[ 式中、B は、 $-(C=O)-$ 、 $-(C=O)-NH-$ 、 $-(C=O)-O-$ 、 $-CH_2-$  であり、

Y は、有機スペーシング基であり、

X は、ポリアミンポリマーに結合できる末端官能基であり、

p は、0 から 1 の整数である ]

40

の化合物又はその塩からなる群から選択される化合物にコンジュゲートされた反応性のアミノ基又はチオール基ポリマーを有する免疫原性担体から得られる、請求項 11 に記載の抗体。

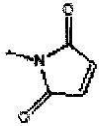
【請求項 15】

前記担体がチオール基を含有し、免疫原性ポリマーにコンジュゲートされた化合物における X が、該チオールと反応できる官能基である、請求項 14 に記載の抗体。

【請求項 16】

前記化合物における X が

【化 6】



である、請求項 15 に記載の抗体。

【請求項 17】

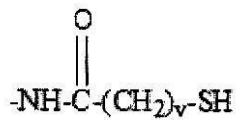
前記化合物における Y が低級アルキレンである、請求項 16 に記載の抗体。

10

【請求項 18】

前記免疫原性担体が、前記官能基として、

【化 7】



[ 式中、v は、1 から 6 の整数である ]

20

を含有する、請求項 17 に記載の抗体。

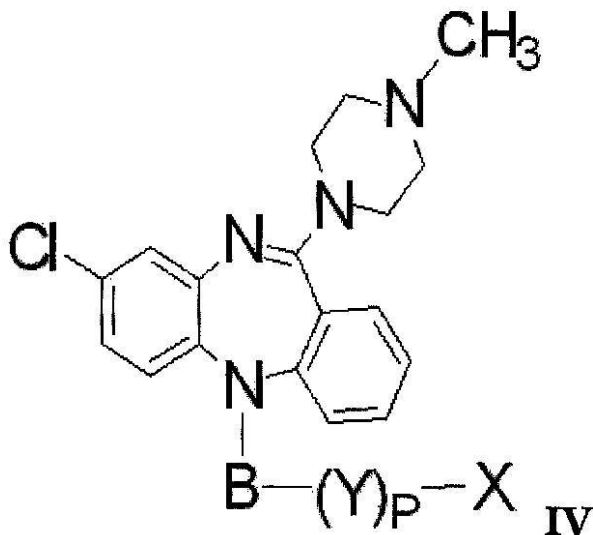
【請求項 19】

前記抗体がマウス、ヒツジ、ウサギ又はラットに由来する、請求項 18 に記載の抗体。

【請求項 20】

式

【化 8】



30

40

[ 式中、B は、 $-(C=O)-$ 、 $-(C=O)-NH-$ 、 $-(C=O)-O-$ 、 $-CH_2-$  であり、

Y は、有機スペーシング基であり、

X は、ポリアミンポリマーに結合できる末端官能基であり、

p は、0 から 1 の整数である ]

の化合物又はその塩。

【請求項 21】

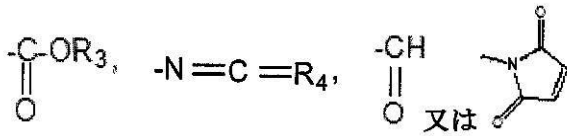
50

p が 0 である、請求項 20 に記載の化合物。

【請求項 22】

X が

【化 9】



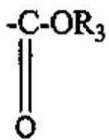
10

[ 式中、R<sub>3</sub> は水素であるか、又はその結合酸素原子と一緒に反応性エステルを形成し、R<sub>4</sub> は酸素又は硫黄である ]  
である、請求項 21 に記載の化合物。

【請求項 23】

X が

【化 10】



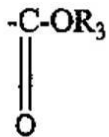
20

であり、R<sub>3</sub> が水素である、請求項 22 に記載の化合物。

【請求項 24】

X が

【化 11】



30

であり、OR<sub>3</sub> が反応性エステルを形成する、請求項 22 に記載の化合物。

【請求項 25】

前記形成されるエステルが低級アルキルエステル、イミドエステル又はアミドエステルである、請求項 24 に記載の化合物。

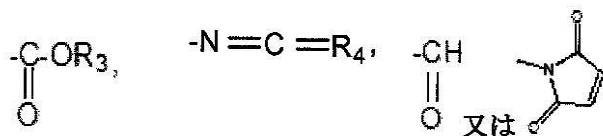
【請求項 26】

p が 1 である、請求項 20 に記載の化合物。

【請求項 27】

X が

【化 12】



40

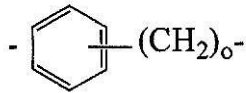
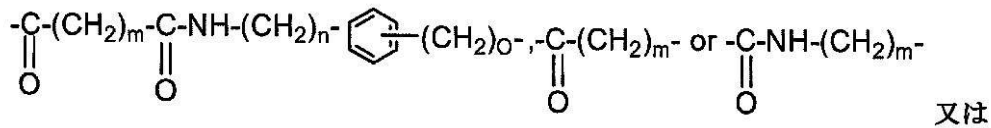
[ 式中、R<sub>3</sub> は水素であるか、又はその結合酸素原子と一緒に反応性エステルを形成し、R<sub>4</sub> は酸素又は硫黄である ]  
である、請求項 25 に記載の化合物。

50

## 【請求項 28】

Y が、1 個から 10 個の炭素原子を含有するアルキレン、

## 【化 13】



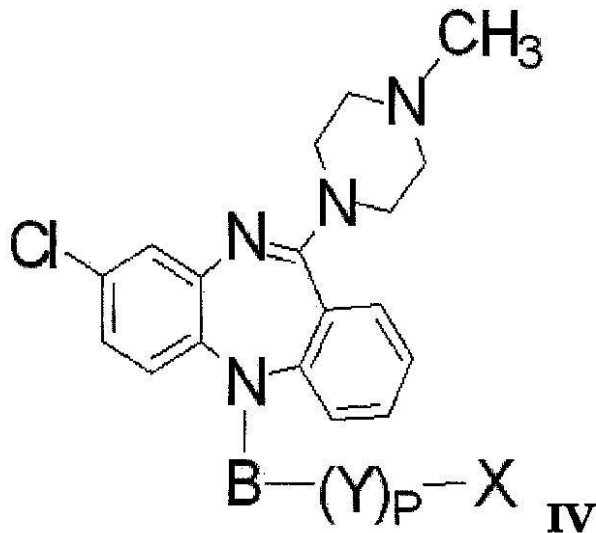
10

[ 式中、n 及び o は 0 から 6 の整数であり、m は 1 から 6 の整数である ]  
 である、請求項 26 に記載の化合物。

## 【請求項 29】

チオール又はアミン基を有する担体と、式

## 【化 14】



20

30

[ 式中、B は、 $-(\text{C}=\text{O})-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-$  であり、

Y は、有機スペーシング基であり、

X は、ポリアミンポリマーに結合できる末端官能基であり、

p は、0 から 1 の整数である ]

40

の化合物又はその塩とのコンジュゲート。

## 【請求項 30】

p が 0 である、請求項 29 に記載のコンジュゲート。

## 【請求項 31】

p が 1 である、請求項 30 に記載のコンジュゲート。

## 【請求項 32】

Y が、1 個から 10 個の炭素原子を含有するアルキレン、



の化合物からなる群から選択される化合物又はその塩とのコンジュゲートであり；第2の容器は、クロザピンと実質的に選択的に反応しN - デスメチルクロザピン及びクロザピン - N - オキシドと実質的に交差反応しない抗体を含有する、キット。

【請求項35】

前記コンジュゲートが前記第1の容器中に所定量で存在する、請求項34に記載のキット。

【請求項36】

前記試料中のクロザピンの量を決定するために使用される、請求項35に記載のキット。

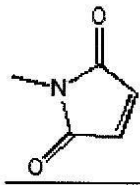
【請求項37】

前記担体が反応性末端官能性チオール基を有し、Xが該チオール基に結合できる末端官能基である、請求項37に記載のキット。

【請求項38】

Xが

【化18】



である、請求項38に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、治療中の最適な薬物濃度を迅速に決定するためにヒト体液中のクロザピンの存在を決定及び/又は量を定量するためのイムノアッセイの分野に関する。

【背景技術】

【0002】

統合失調症は、世界人口のおよそ1%が患う重度の精神障害である。統合失調症の臨床症状としては、妄想、幻聴、思考及び発話の混乱、引きこもり、意欲の欠如、並びに思索の混乱及び記憶障害などの認知機能障害が挙げられる。この障害は、ドーパミン及びセロトニンのレベルを含む神経学的欠陥(neurological defects)と阻害性介在ニューロン欠損(inhibitory interneuron deficiencies)との組合せによって引き起こされると考えられている。統合失調症は、一般的に抗精神病薬又は神経弛緩薬と称される、神経伝達物質及び受容体を標的とする薬物で治療することができる。

【0003】

「非定型抗精神病薬」、より一般的には「第二世代抗精神病薬」と呼ばれる抗精神病薬の1つのクラスに、三環式ジベンザゼピン誘導体であるクロザピン(I)がある。クロザピンは、米国でNovartisによってクロザリル(登録商標)で上市されており、ドーパミン受容体D<sub>1</sub>、D<sub>2</sub>、D<sub>3</sub>及びD<sub>5</sub>でドーパミンの結合に干渉し、D<sub>4</sub>受容体に対して高い親和性を有する(クロザリル 2009 添付文書)。クロザリルは、アドレナリン作動性、コリン作動性、ヒスタミン作動性及びセロトニン作動性の受容体でアンタゴニストとしても作用する。クロザピンは、ヒトではシトクロムP450によってほとんど完全に代謝されてN - 脱メチル及びN - オキシド誘導体になる。N - 脱メチル代謝物は制限された活性を有するだけであり、N - オキシド誘導体は不活性である。N - 脱メチル代謝物の活性は、クロザピンが活性である受容体以外の受容体に対するものである。

【0004】

クロザピンは、以下の式

10

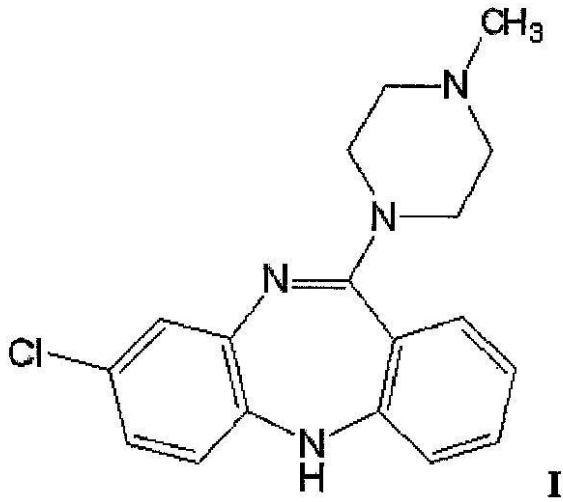
20

30

40

50

【化 1】



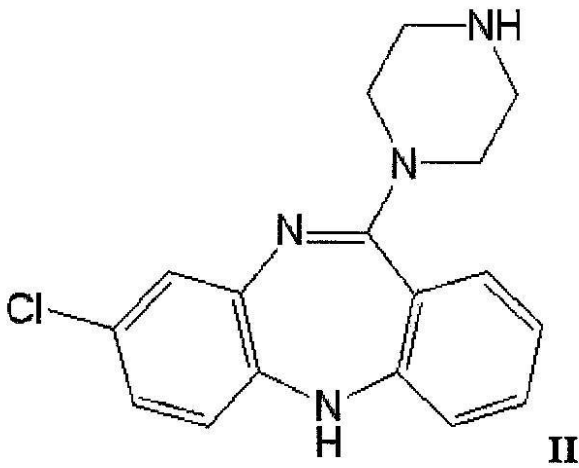
を有する。

【0005】

N - デスメチルクロザピンは、以下の式

【化 2】

20

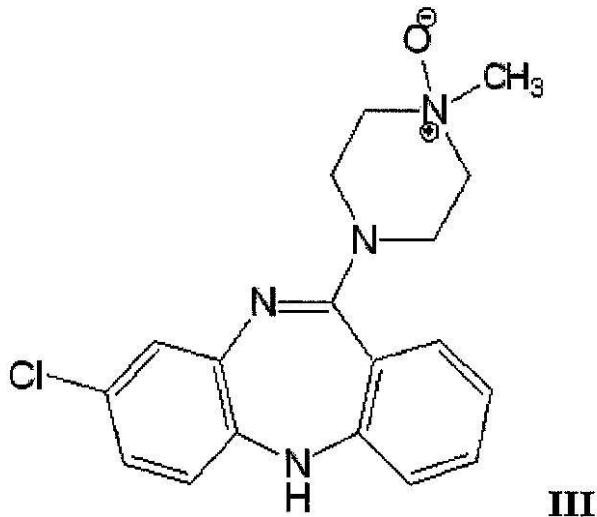


を有する。

【0006】

クロザピン - N - オキシドは、以下の式

## 【化3】



10

を有する。

## 【0007】

クロザピンの血漿濃度は、シトクロムP450活性の変動によって影響を受ける (Chetty、M及びM Murray、Curr Drug Metab、8、4、307~13 2007; Mauri、MC、ら、Clin Pharmacokinet、46、5、359~88 2007; Mendoza、MC及びJP Lindenmayer、Clin Neuropharmacol、32、3、154~7 2009)、年齢、性別、カフェイン使用及び喫煙 (Rostami-Hodjegan、A、ら、J Clin Psychopharmacol、24、1、70~8 2004)。

20

## 【0008】

クロザピンは、血漿定常状態濃度において患者間較差が大きいことが示されており、この変動性は生命の安全及び質に衝撃を与え得る (Mauri、MC、LS Volonteri、A Colasanti、A Fiorentini、IF De Gaspari及びSR Bareggi、Clin Pharmacokinet、46、5、359~88 2007)。

30

## 【0009】

クロザピンの効能は特定範囲内の血漿薬物濃度で改善され、この薬物は患者内の広い薬物動態学的な変動特性を呈するので、血中のこの薬物の濃度をモニタリングすること及び標的レベルに調整することは、効能を増大させ、毒性を最小化する点において価値がある (Mauri、MC、LS Volonteri、A Colasanti、A Fiorentini、IF De Gaspari及びSR Bareggi、Clin Pharmacokinet、46、5、359~88 2007)。

40

## 【0010】

この変動特性の結果として、異なる個体における同じ薬物の同じ投与量は、劇的に異なる臨床結果をもたらすことがある。クロザピンの同じ投与量の有効性は、患者における個々の薬物クリアランス及び最終的血清薬物濃度に基づいて顕著に変動する。治療薬物の管理は、薬物投与における患者変動に関する見識を臨床医に提供する。治療薬物の管理で、薬物投与量は患者に対して個別化することができ、望ましくない副作用なしに障害を有効に治療する可能性はずっと高くなる。

## 【0011】

加えて、クロザピンの治療薬物管理は、有効な血清濃度レベルを達成するための投与及び規定の投与量に従うことを確保するための優れたツールとして働く (Treur、M、ら、BMC Health Serv. Res.、9、9 2009; Valenste

50

in, M, 5, J. Clin. Psychiatry, 67, 10, 1542~1550 (2006)。クロザピンの治療薬物管理をルーチン的に行うには、一般の実験室装置に適應できる単純な自動試験を利用可能であることが要求される。ヒトの血液及び血漿におけるクロザピンの濃度を、紫外線(UV)又は質量分光で検出する液体クロマトグラフィー(LC)を使用して決定することが記載されている(Rosland, M, 5, Drug Dev Ind Pharm, 33, 10, 1158~66 (2007); Rao, L V, 5, J Clin Lab Anal, 23, 6, 394~8 (2009); Ming, DS及びJ Heathcote, J Anal Toxicol, 33, 4, 198~203 (2009); Niederlander, HA, 5, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 834, 1~2, 98~107 (2006)。これらの方法は、液-液又は-固相での抽出を必要とするため労働に依存し、高価な装置を使用し、ルーチン的な臨床検査室での使用へと改変することができない。現在まで、この抗精神病薬で処置される患者のヒト体液中のクロザピンを測定するためのイムノアッセイはない。

#### 【0012】

以上の通り、ヒト体液中のクロザピンの存在を決定及び/又は量を定量するためのイムノアッセイはない。イムノアッセイによるクロザピンのルーチン的な治療薬物の管理は、標準的な実験室装置に適應する単純な自動試験を提供する。しかしながら、こうしたイムノアッセイを提供するためには、クロザピンに特異的な抗体が生成されなければならない。このアッセイにおいて使用される誘導体及び免疫原は、これらに対応する生成抗体を通じて、クロザピンの検出に干渉する治療的又は薬理的に活性又は不活性なクロザピンの代謝物に対する実質的交差反応なしに、クロザピンに対する特異的反応性を付与しなければならない。これらの干渉性代謝物は、N-デスマチルクロザピン(式IIの化合物)及びクロザピン-N-オキシド(式IIIの化合物)である。クロザピンをモニタリングするためのイムノアッセイを行う際、使用される抗体は、薬学的活性代謝物のN-デスマチルクロザピン(式IIの化合物)に反応しないことが重要である。これは、N-デスマチルクロザピンとの反応性が患者試料中のクロザピンの検出に干渉し、検出可能なN-デスマチルクロザピンと臨床結果との間には相関関係がないので事実である。Y.-Q. Xiangら(Serum Concentrations of clozapine and norclozapine in the prediction of relapse of patients with schizophrenia)、Schizophrenia Research, 83(2006)201-並びにM.C. Mendosa及びJ.P. Lindenmayer、N-デスマチルクロザピン(N-Desmethyloclozapine): (Is there evidence for its antipsychotic potential?)、Clinical Neuropharmacology 32(3)154~157を参照されたい。

#### 【0013】

このように、イムノアッセイの手段によって薬物レベルをモニタリングする際に有効であるためには、抗体は、クロザピンに特異的であり、且つその主要な薬学的活性代謝物のN-デスマチルクロザピンと交差反応しないものでなければならない。

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0014】

本発明によれば、クロザピンに対して実質的に選択的に反応してクロザピンに選択的に結合する新たなクラスの抗体が生成される。選択的反応性は、この抗体がクロザピンだけと反応し、クロザピン代謝物のN-デスマチルクロザピン及びクロザピン-N-オキシドと実質的に反応又は交差反応しないことを意味する。これらのクロザピン代謝物との交差反応性は、ヒト体液中のクロザピンの存在及び量のイムノアッセイによる正確な決定を妨げる。これらの抗体によって、クロザピンレベルをモニタリングためにクロザピンで治療されるヒト患者の試料中のクロザピンの量を検出及び定量化して、無顆粒球症及びてんか

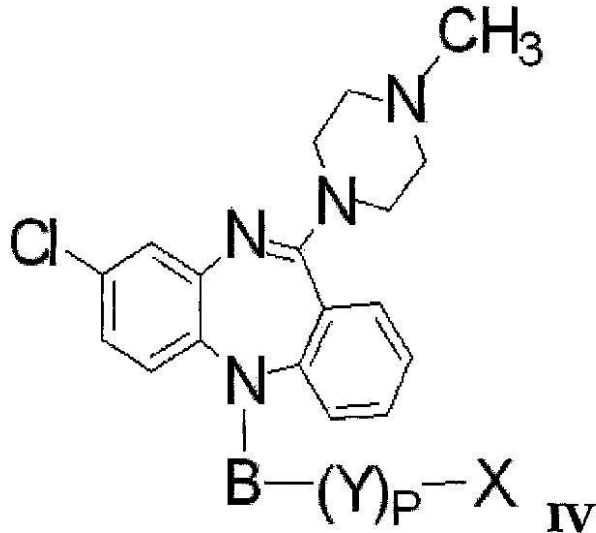
ん性発作などの重篤な副作用を引き起こし得る過剰投与を防止するためのイムノアッセイが提供される。

【課題を解決するための手段】

【0015】

免疫原性ポリアミンポリマーと、式

【化4】



10

20

【式中、Bは、 $-(C=O)-$ 、 $-(C=O)-NH-$ 、 $-(C=O)-O-$ 、 $-CH_2-$ であり、

Yは、有機スペーシング基であり、

Xは、ポリアミンポリマーに結合できる末端官能基であり、

pは、0から1の整数である】

の化合物又はその塩とのコンジュゲートである免疫原を使用することによって、クロザピンに特異的でありN-デスメチルクロザピン及びクロザピン-N-オキシドと実質的に反応又は結合しない抗体が生成されることが判明した。

30

【0016】

クロザピンと実質的に選択的に反応し、N-デスメチルクロザピン及びクロザピン-N-オキシドと交差反応しないこれらの抗体の提供は、特異的にクロザピンを検出及び定量化することができるイムノアッセイを生成して、クロザピンで治療されている患者の液体試料中のクロザピンをモニタリングすることを可能にする。本発明にはまた、当該イムノアッセイのための試薬及びキットも含まれる。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明によれば、上述の通り、クロザピンと実質的に選択的に反応し、N-デスメチルクロザピン又はクロザピン-N-オキシドと実質的に反応又は交差反応しない新たなクラスの抗体が提供される。式IVのクロザピンの誘導体又はそれらの塩を免疫原として使用することを通じて、本発明のこの新しいクラスの抗体が提供されることが見出された。血液、血漿又は他の体液試料中のクロザピンを検出及び/又は定量するためのイムノアッセイ(こうしたイムノアッセイのための試薬及びキットを含む)が、このような抗体の使用によって開発された。このイムノアッセイを使用すれば、この治療剤で治療されている患者の体液試料中のクロザピンの存在及び量を検出及び/又は定量し得る。このようにして、クロザピンで治療されている患者は、治療中及び前記モニタリングに従って調整される患者の処置中にモニタリングすることができる。本発明によって、治療剤としてクロザピンで処置されている統合失調症患者におけるクロザピンの治療薬物の管理が達成される。検出される治療剤は式Iのクロザピンである。

40

50

## 【0018】

本発明のアッセイにおいて利用される試薬は、高分子担体と式IVの化合物とのコンジュゲートである。このコンジュゲートは、本発明の抗体との結合について試料に存在するクロザピンと競合的な結合パートナーである。そのため、抗体に結合するコンジュゲート試薬の量は、試料中のクロザピンの量に反比例する。本発明において、このアッセイは、抗体に結合している又は結合していない前記コンジュゲートの量を検出及び測定するために任意の従来測定手段を利用する。

## 【0019】

この測定手段の使用により、結合又は非結合コンジュゲートの量が決定され得る。一般に、試料中のクロザピンの量は、試料中のクロザピンによって生成される結合又は非結合コンジュゲートの測定量と、クロザピンの既知量を含む試料で得られる標準又は検量線から決定される結合又は非結合コンジュゲートの値とを相関させることによって決定され、既知量は、試験されるべき試料について予想される範囲である。検量線を作成するための検討は、試料のために使用されるのと同じイムノアッセイ手順を使用して行われる。

## 【0020】

定義

本明細書を通じて、以下の定義が理解されるべきである。

## 【0021】

本願で使用される場合、「Ph」という用語はフェニル基を表す。「アルキレン」という用語は、1個から10個の炭素原子を含む二価の飽和直鎖又は分枝鎖の炭化水素置換基を表す。

## 【0022】

「免疫原」及び「免疫原性」という用語は、生物体における免疫応答を誘発、生成又は発生させることができる物質を指す。

## 【0023】

「コンジュゲート」という用語は、別々の部分を一緒に結合することで形成される任意の物質を指す。本発明による代表的なコンジュゲートとしては、式IVの化合物など小分子を担体又はポリアミンポリマー、特にタンパク質などの大分子と一緒に結合することによって形成されるものが挙げられる。コンジュゲートにおいて、小分子は、大分子上の1つ又は複数の活性部位で接合することができる。コンジュゲートという用語には、免疫原という用語が含まれる。

## 【0024】

「ハプテン」は、部分的又は不完全な抗原である。それらは、抗体形成を刺激できないが抗体と反応する無タンパク質物質、主に低分子量物質である。後者では、ハプテンを高分子量免疫原性担体にカップリングし、次いで、このカップリング生成物、即ち免疫原を、ヒト又は動物対象に注射することによって利用される。本発明のハプテンはクロザピンである。

## 【0025】

本明細書で使用される場合、「スペーシング基」又は「スペーサー」は、官能性連結基を介してハプテン、担体、免疫原、標識又はトレーサーなどの2つ以上のサブ構造を接続する化学構造の一部を指す。スペーサー基は、本願において後述する。スペーシング基の原子及びスペーシング基中の鎖の原子は、それら自体、化学結合によって接続されている。好ましいスペーサーは、直鎖又は分岐の飽和又は不飽和の炭素鎖である。また、これらの炭素鎖は、鎖内又は鎖の末端に1個又は複数のヘテロ原子を含み得る。「ヘテロ原子」は、酸素、窒素及び硫黄からなる群から選択される、炭素以外の原子を意味する。また、スペーシング基は、鎖の一部として、又は鎖における原子の1つに対する置換基として、環式基又は芳香族基を含み得る。

## 【0026】

スペーシング基における原子の数は、水素以外の原子をカウントすることによって決定される。スペーシング基中の鎖における原子の数は、接続されているサブ構造間の最も短

10

20

30

40

50

い経路に沿って水素以外の原子の数をカウントすることによって決定される。ハプテンと標識又は担体又はポリアミンポリマーとのコンジュゲートを合成するために、官能性連結基を使用して、ハプテン基又はスペーシング基を活性化すること、例えば、利用可能な官能性部位をハプテン基又はスペーシング基上に提供することができる。

【0027】

「免疫原性担体」は、この用語が本明細書において使用される場合、1つ又は複数の位置でハプテン（本願においてはクロザピン）と接続することができる免疫原性物質、一般的にタンパク質であり、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、ハプテンと特異的に結合できる抗体の生成を誘発することを可能にする。免疫原性担体及び連結基については、本願において後述する。免疫原性担体物質の中には、外来性と認識され、それによって宿主から免疫性応答を誘発する、タンパク質、糖タンパク質、ポリアミノ-多糖類複合体、粒子及び核酸が挙げられる。ポリアミノ-多糖類は、この調製で知られている従来の手段の何れかを使用して多糖類から調製することができる。

10

【0028】

また、様々なタンパク質系物質が、ポリ（アミノ酸）免疫原性担体として用いられ得る。このような種類には、アルブミン、血清タンパク質、リポタンパク質などがある。タンパク質の例としては、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）、オパルブミン、ウシチログロブリン（BTG）などが挙げられる。また、合成のポリ（アミノ酸）を利用することもできる。

【0029】

免疫原性担体としては、単糖類の反復縮合によって構築された高分子量ポリマーであるポリアミノ-多糖類も挙げることができる。多糖類の例は、デンプン、グリコーゲン、セルロース、アラビアガム等の炭水化物ガム、寒天などである。多糖類は、ポリ（アミノ酸）残基及び/又は脂質残基も含有する。

20

【0030】

免疫原性担体は、単独の又は上述したポリ（アミノ酸）又は多糖類の1つにコンジュゲートされているポリ（核酸）であってもよい。

【0031】

免疫原性担体としては、固体粒子も挙げることができる。粒子は、一般に、少なくとも約0.02ミクロン（ $\mu\text{m}$ ）で約100 $\mu\text{m}$ 以下の直径であり、通常約0.05 $\mu\text{m}$ から10 $\mu\text{m}$ の直径である。粒子は、最適には水に近似する密度、一般に約0.7から1.5g/mLの、有機又は無機の膨張可能又は非膨張可能な多孔質又は非多孔質の粒子であってよく、透明、部分的透明又は不透明な材料で構成されてもよい。粒子は、細胞及び微生物体などの生物学的材料であってよく、非限定的な例として赤血球、白血球、リンパ球、ハイブリドーマ、ストレプトコッカス属（*Streptococcus*）、スタフィロコッカス・アウレウス（*Staphylococcus aureus*）、大腸菌（*E. coli*）及びウイルスなどが挙げられる。粒子はまた、有機及び無機ポリマー、リポソーム、ラテックス、リン脂質小胞又はリポタンパク質で構成されてもよい。

30

【0032】

「ポリ（アミノ酸）」又は「ポリペプチド」は、アミノ酸から形成されるポリアミドである。ポリ（アミノ酸）は、一般に、約2,000分子量から上限のない範囲の分子量を有し、標準的には10,000,000未満で、多くの場合約600,000以下のダルトンである。通常、免疫原性担体又は酵素に関与するかどうかによって異なる範囲となる。

40

【0033】

「ペプチド」は、アミド（ペプチド）結合による2種以上のアミノ酸の結合によって形成される任意の化合物、通常、各アミノ酸残基（ $\text{NH}_2$ 末端を除く）の - アミノ基が隣接する残基の - カルボキシル基に連結されて線状鎖になっている - アミノ酸のポリマーである。ペプチド、ポリペプチド及びポリ（アミノ酸）という用語は、サイズに関する制限なくこのクラスの化合物を指すために本明細書において同義的に使用される。このクラス

50

の最も大きいメンバーはタンパク質と称される。

【0034】

「標識」、「検出分子」又は「トレーサー」は、検出可能なシグナルを生成する又は誘発されて生成することができる任意の分子である。標識は、分析物、免疫原、抗体に、又は受容体若しくはリガンド、特にハプテンなどの受容体に結合することができる分子などの別の分子にコンジュゲートすることができる。標識の非限定的な例としては、放射性同位元素、酵素、酵素断片、酵素基質、酵素阻害剤、コエンザイム、触媒、フルオロフォア、染料、化学発光体、発光体又は増感剤；非磁性若しくは磁性粒子、固体支持体、リポソーム、リガンド又は受容体が挙げられる。

【0035】

「抗体」という用語は、抗原に対する特異的タンパク質結合パートナーを指し、他の物質を除外して抗原に対する特異的結合親和性を有する任意の物質、又は物質の群である。抗体という総称は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体及び抗体断片を包含する。

【0036】

「誘導体」という用語は、1つ又は複数の化学反応によって親化合物から作られた化学物質又は分子を指す。

【0037】

「担体」という用語は、固体粒子、及び/又は上述した物等の免疫原性ポリマーなどの高分子ポリマーを指す。担体が固体粒子である場合、固体粒子は、ポリアミンポリマーと結合(bound)、コーティング又はそうでなければ付着(attached)することで、式IVの化合物における末端官能基Xに結合するための1つ又は複数の反応部位を提供することができる。

【0038】

「試薬キット」又は「試験キット」という用語は、アッセイを行う際に使用される材料のアセンブリを指す。試薬は、それら相互の反応性及び安定性に依りて同じ又は別々の容器で包装される組合せであり、液体で又は凍結乾燥形態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及び割合は、特別な用途のための最適な結果を提供するように選択される。本発明の特徴を具体化する試薬キットは、クロザピンに特異的な抗体を含む。キットは、分析物のリガンド並びに校正及び対照の材料をさらに含み得る。試薬は液状形態のままでもよく、凍結乾燥させてもよい。

【0039】

「校正及び対照の材料」という句は、測定されるべき薬物の既知量を含む任意の標準又は基準の材料を指す。薬物の濃度は、不明な試料について得られた結果を、標準物について得られた結果と比較することによって算出される。これは一般的に、検量線を作成することによって行われる。

【0040】

「生物学的試料」という用語には、これらに限定されないが、生物又は以前生存していた生物に由来するあらゆる性質の物質が含まれる。こうした生物としては、これらに限定されないが、ヒト、マウス、サル、ラット、ウサギ、ウマ及び他の動物が挙げられる。こうした物質としては、これらに限定されないが、血液、血清、血漿、尿、脳脊髄液、細胞、器官、組織、骨、骨髄、リンパ、リンパ節、滑膜組織、軟骨細胞、滑膜マクロファージ、内皮細胞及び皮膚が挙げられる。

【0041】

試薬及び免疫原

抗体に基づくイムノアッセイにおいて、クロザピンのコンジュゲートは、抗体の結合部位について試料中のクロザピンと競合するように作製される。本発明のイムノアッセイにおいて、式IVの試薬は、式Iのクロザピンの1-ニトロ基に形成される窒素置換を有するクロザピン誘導体である。式IVの化合物において、リンカー Spacer は、この分子の「Y-X」部分を成す。このリンカー X 及び Spacer 「Y」は、イムノアッセイのためのコンジュゲート及び抗体を生成するための免疫原を調製する際には一般的なものであ

10

20

30

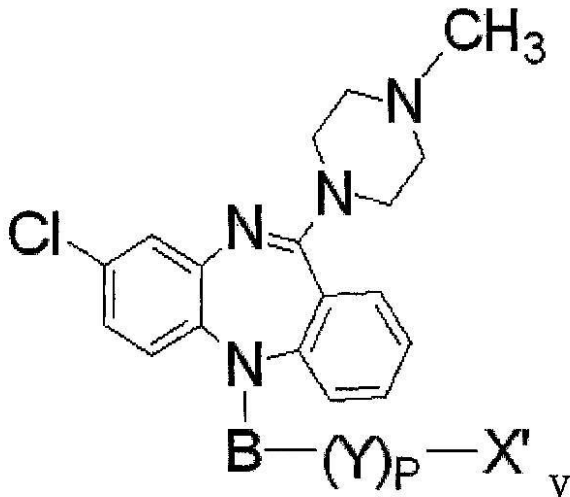
40

50

る。免疫アッセイのためのコンジュゲート及び抗体を生成するための免疫原を調製するのに利用される従来のスペーサー-連結基のいずれもが、式I Vの化合物で利用され得る。こうした従来のリンカー及びスペーサーは、米国特許第5,501,987号及び米国特許第5,101,015号に開示されている。

【0042】

コンジュゲート及び免疫原は、式Iの化合物から調製される。担体とハプテンとのコンジュゲート又は免疫原において、担体は、1つ又は複数の位置において、担体のポリマー部分によって含有されている1個又は複数の反応性チオアミノ基に連結されることで、式【化5】

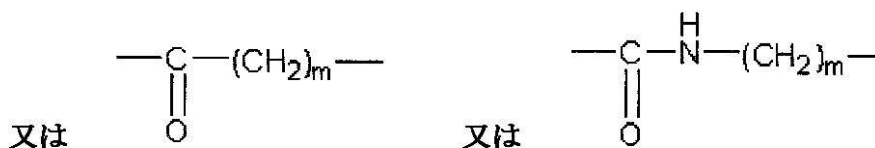
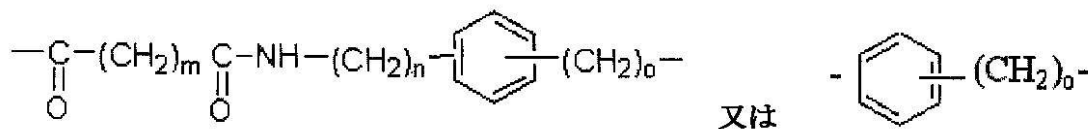


[式中、X'は官能性連結基であり、p及びYは上記の通りである]

を有するハプテンを形成する。好ましいスペーサー基の中には、前述したスペーサー基が挙げられる。特に好ましいスペーシング基は、1個から10個の炭素原子を含有するアルキレン、

【0043】

【化6】



[式中、n及びoは0から6の整数であり、mは1から6の整数である]などの基であり、アルキレンが特に好ましいスペーシング基である。

【0044】

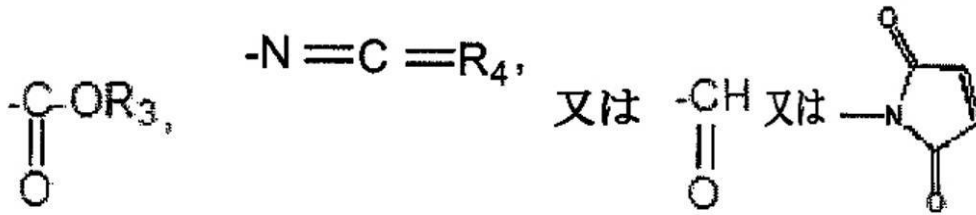
式Vの化合物において、X'は、好ましくは高分子担体の反応性アミノ基を介してスペーサーを連結する官能基である。X'基は、担体又は免疫原のポリアミンポリマーの反応性アミノ基に結合している式I Vの化合物における末端官能基Xの結果である。アミノ基と反応できる何れの末端官能基も、式I Vの化合物における官能基Xとして利用することができる。

50

【0045】

X内に好ましくは含まれるこれらの末端官能基は、

【化7】

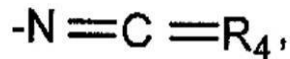


10

[式中、 $R_3$ は水素であるか、又はその結合酸素原子と一緒に反応性エステルを形成し、 $R_4$ は酸素又は硫黄である]  
である。

【0046】

【化8】



20

基は、イソシアナート又はイソチオシアナートであってよい。 $-\text{OR}_3$ によって形成される活性エステルとしては、N-ヒドロキシスクシンアミドなどのイミドエステル、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール及びp-ニトロフェニルエステルが挙げられる。しかしながら、アミン基又はチオール基と反応することができる活性エステルであれば何れも使用できる。

【0047】

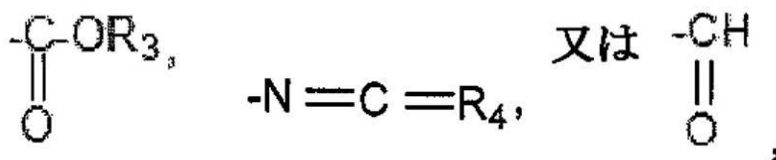
カルボン酸基及び活性エステルは、従来手段によって担体又は免疫原性ポリマーにカップリングされる。タンパク質などのポリアミンポリマーのアミン基は、高分子免疫原又は担体にスペーサーを連結して本発明のコンジュゲートを形成するアミド基を生成する。

30

【0048】

式IVの化合物におけるXが

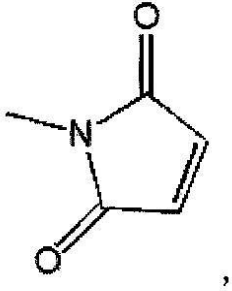
【化9】



40

である場合、これらの化合物は、好ましくは、高分子担体又は免疫原性担体の遊離アミノ基と反応する。他方で、式IVの化合物におけるXは、チオ基又はチオール基の両方と反応する式

【化 1 0】



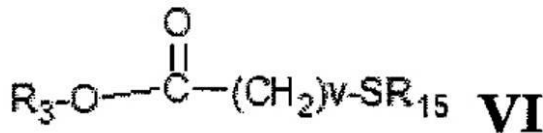
10

のマレイミド基であってよい。

【0049】

式 I V のこれらの化合物は、反応させて、修飾してアミノ基をチオール基に変換した高分子タンパク質に結合する。これは、高分子タンパク質担体の遊離アミノ基と、式

【化 1 1】



20

[ 式中、 $R_{15}$  は、チオール保護基であり、

$R_3$  は、上記の通りであり、

$v$  は、1 から 4 の整数である ]

の化合物とを反応させることによって行うことができる。

【0050】

この反応は、タンパク質含有担体と式 V I の化合物とを水性媒体中にて混合することによって、水性媒体中で実施される。この反応において、温度及び圧力は重要でなく、反応は室温及び大気圧で実施することができる。10 から 25 の温度が一般に好ましい。式 V I の化合物と反応させるタンパク質含有担体において、従来の何れのチオール保護剤も利用することができる。チオール保護基は当技術分野においてよく知られており、2 - ピリジルジチオ (2-pyridylthio) が好ましい保護基である。この反応によって、チオール基、 $S H -$  は、式 I V の化合物を担体の残部に結合する担体の官能基になる。

30

【0051】

チオール修飾担体を式 I V の化合物と反応させる前に、チオール修飾担体のチオール保護基は従来の手段によって除去される。チオール保護基を除去するための任意の従来の手段が、この反応を実施する際に利用され得る。しかしながら、チオール保護基を除去するための手段を利用する際に、反応剤が水性媒体中に可溶性であり、担体に含有されているポリアミンポリマーを決して破壊又は害することがないことに注意しなければならない。この保護基を除去するための好ましい手段は、生成される縮合物を還元するための物質としてジチオスレイトールを使用することによる。この還元は、より高い圧力又は温度を利用することなく、単純に還元剤を反応媒体に添加することによって実施することができる。この還元は室温及び大気圧で実施することができる。

40

【0052】

上記の方法は、ポリアミン高分子含有担体の反応性末端アミノ基をチオール基に変換するための 1 つの手段を表すが、この変換を実施するために従来の何れの手段も利用し得る。ポリアミン高分子含有担体の末端アミノ基をチオール基に変換するための方法は、当技術分野においてよく知られており、本発明により利用し得る。

50

## 【0053】

末端反応性チオール基を有する高分子ポリアミン含有担体と、Xが、担体によって保有されている末端チオール基に結合できる官能基である、式IVの化合物との反応は、従来の手段によって実施することができる。この実施形態において、Xがマレイミドである式IVの化合物は、ポリアミン高分子担体によって保有されているチオール基と反応する。マレイミド二重結合に対してチオールを付加するための何れの周知手段も、チオール架橋を介して担体にコンジュゲートされる式IVのコンジュゲートを生成する際に利用することができる。

## 【0054】

好ましい実施形態において、アミド結合、すなわちカルボキシル基含有クロザピンハプテンと担体又は免疫原のアミノ基との間の化学結合を介して結合される本発明の免疫原が含まれるコンジュゲートは、当業者に知られている様々な方法を使用して得ることができる。カルボキシ基と脱離基試薬（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及びp-ニトロフェノールなど）とを反応させることによって、最初に式IVの化合物又はそれらの薬学的に許容される塩におけるクロザピンハプテンのカルボン酸部分Xを活性化してアミド結合を形成することがしばしば好ましい。ジシクロヘキシルカルボジイミド及びジイソプロピルカルボジイミドなどの活性化試薬が使用され得る。式IVの化合物又はその薬学的に許容される塩のクロザピンハプテンにおけるカルボキシル基の活性化形態は、次いで、タンパク質担体を含有する緩衝溶液中で反応させる。

10

## 【0055】

式IVのクロザピン誘導体が第一級又は第二級アミノ基並びにカルボキシル基を含有するアミノ結合コンジュゲートを調製する際に、活性化及びカップリング反応中にアミン保護基を使用して、コンジュゲート同士が反応するのを防止する必要がある。典型的には、式IVのクロザピン誘導体のアミンは、対応するN-トリフルオロアセトアミド、N-tert-ブチルオキシカルボニルウレタン（N-t-BOCウレタン）、N-カルボベンジルオキシウレタン又は同様の構造を形成することによって保護される。上記の通り免疫原性ポリマー又は担体へのカップリング反応を達成したら、アミン保護基は、他に免疫原又はコンジュゲートの構造を変えない試薬を使用して除去することができる。こうした試薬及び方法は当業者に知られており、弱性又は強性の水性(aqueous)又は無水の酸、弱性又は強性の水性又は無水の塩基、水素化ホウ素ナトリウム又はシアノ水素化ホウ素ナトリウムなどの水素化物含有試薬、及び接触水素化(catalytic hydrogenation)が挙げられる。ハプテン及び担体をコンジュゲートする様々な方法は、米国特許第3,996,344号及び米国特許第4,016,146号にも開示されており、これらを本明細書において参照により組み込む。

20

30

## 【0056】

カルボン酸基及び活性エステルは、従来の手段によって担体又は免疫原性ポリマーにカップリングされる。タンパク質などのポリアミンポリマー上のアミノ基は、本発明のポリマー、免疫原又は担体、及び/又はコンジュゲートにスペーサーを連結するアミド基を生成する。

## 【0057】

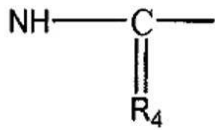
本発明の免疫原及びコンジュゲートにおいて、カルボキシル基含有クロザピンハプテンと、担体又は免疫原によって含有されているポリアミンポリマーの反応性アミノ基との間の化学結合は、当業者に知られている様々な方法を使用して確立することができる。アミド結合を形成することがしばしば好ましい。アミド結合は、最初にカルボキシ基と脱離基試薬（例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール及びp-ニトロフェノールなど）とを反応させることにより式IVの化合物におけるカルボン酸部分を活性化することによって形成される。ジシクロヘキシルカルボジイミド及びジイソプロピルカルボジイミドなどの活性化試薬が使用され得る。式Vのクロザピンハプテンにおけるカルボキシル基の活性化形態は、次いで、反応性アミノ基を有する担体を含有する緩衝溶液と反応させる。

40

50

## 【 0 0 5 8 】

他方で、Xが式I Vの化合物において末端イソシアナート又はチオイソシアナート基である場合、これらの基は、ポリアミンポリマーの遊離アミンと反応させると、X'が、  
【化12】



10

であり、ポリアミン担体又は免疫原性ポリペプチドがアミノ基を有する式Vのコンジュゲート又は免疫原を生成する。

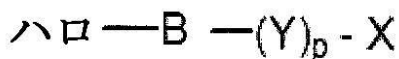
## 【 0 0 5 9 】

式I Vの化合物におけるXがアルデヒド基を含有する場合、これらの化合物は、還元的アミノ化によるアミン結合を介して担体上のポリアミンポリペプチドの遊離アミノ基に連結することができる。還元的アミノ化を介するなど、アルデヒドとアミンとを縮合する従来の何れの方法を使用してもこの結合を形成することができる。この場合において、式I Vのリガンド部分におけるX'は -CH<sub>2</sub>- である。

## 【 0 0 6 0 】

式I Vの化合物は、式Iのクロザピンと、式  
【化13】

20



[ 式中、p、B、Y及びXは上記の通りである ]  
のハロゲン化物とを反応させることによって形成される。

## 【 0 0 6 1 】

ハロゲン化物とアミン窒素とを反応させる従来の何れの手段も、式I Vの化合物を式Iのクロザピンの第二級アミン窒素位置に縮合する際に利用することができる。式I Vの化合物におけるハロゲン化物の使用は、ハロゲン化物と式Iの化合物上の第二級アミン基とを縮合することによって、こうした置換第三級アミンを形成するための効果的な手段を提供する。

30

## 【 0 0 6 2 】

式Iの化合物がその塩の形態である場合、式I Vの化合物と反応させる前にこの塩をその遊離塩基に変換することで、式I Vの化合物を形成することが望ましい。これは、塩の中和など従来の手段によって実施することができる。塩が塩基性塩である場合、中和は酸の添加によって水性媒体中で達成することができる。塩が酸付加塩である場合、中和は塩基の添加によって水性媒体中で達成される。

## 【 0 0 6 3 】

40

式I Vの化合物は、これらの化合物とポリアミン又はポリペプチドを含有する担体とを反応させることによって、本発明の免疫原及び/又はコンジュゲート試薬に変換することができる。このポリペプチドは、本発明の免疫原における担体として、及び免疫原性ポリマーとして利用することができるが、ポリアミン又はポリペプチドは免疫学的活性であることが条件となる。しかし、コンジュゲートを形成するためには、これらのポリマーは、免疫原に必要とされるような免疫学的応答を生成する必要がない。本発明によれば、式Vの化合物におけるX'によって表される様々な官能基は、ポリマー内に含有されているアミノ基に官能基を結合させる従来の手段によって、反応性アミノ基を有するポリマーを含有する担体にコンジュゲートすることができる。好ましい実施形態により、式I Vの化合物において、Xはカルボン酸基又はその活性エステルである。

50

## 【0064】

式IVの化合物は試薬として又はそれから調製される免疫原を含めたコンジュゲートのいずれかとして、本発明のイムノアッセイにおいてその塩形態で又は遊離塩基として存在又は使用することができる。式IVの化合物における及びそこから調製される免疫原を含めたコンジュゲートにおける遊離アミノ基は、酸、好ましくは薬学的に許容される酸を用いて塩を容易に形成する。式IVの化合物及びそれから調製される免疫原を含めたコンジュゲートの任意の酸性塩が、本発明において使用され得る。これらの塩には、無機酸及び有機酸の両方があり、例えば酢酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸、カンファースルホン酸、クエン酸、エテンスルホン酸、ジクロロ酢酸、ギ酸、フマル酸、グルコン酸、グルタミン酸、馬尿酸、臭化水素酸、塩酸、イセチオン酸、乳酸、マレイン酸、リンゴ酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、粘液酸、硝酸、シュウ酸、パモン酸、パントテン酸、リン酸、コハク酸、硫酸、酒石酸、シュウ酸及びp-トルエンスルホン酸などが挙げられる。特に好ましいのは、フマル酸、塩酸、臭化水素酸、リン酸、コハク酸、硫酸及びメタンスルホン酸である。

10

## 【0065】

## 抗体

本発明はまた、前述の免疫原を利用することによって生成されるクロザピンに対するモノクローナル抗体を含む、新規な抗体に関する。本発明によれば、本発明により生成される抗体はクロザピンと選択的に反応性であり、クロザピンのためのイムノアッセイに干渉するクロザピン-N-オキシド又はN-デスメチルクロザピンと反応又は交差反応しないことが判明した。N-デスメチルクロザピン又はクロザピン-N-オキシドと反応しない本発明の抗体の能力により、これらの抗体は、患者液体試料中のクロザピンの存在を検出及び/又は量を定量するためのイムノアッセイを提供する。

20

## 【0066】

本発明は、クロザピンに対する新規な抗体及びモノクローナル抗体に関する。発明の抗血清は、好都合には、本発明の免疫原で宿主動物を免疫化することによって生成することができる。適当な宿主動物としては、例えばマウス、ラット、ウサギ及びモルモットなどのげっ歯類、又はヤギ、ヒツジ及びウマなどの高等哺乳動物が挙げられる。初期の用量、出血及び効能促進投与(booster shot)は、動物において免疫応答を誘発するために認められているプロトコールに従って与えることができ、例えば、好ましい実施形態においてマウスは、100ugの免疫原/マウスの初期用量をi.p.(筋肉内)で、及び6ヶ月の期間にわたって50ugから100ugの間の免疫原/マウスの1つ又は複数の後続効能促進投与を受けた。周期的採血を通じて、従来イムノアッセイを利用して免疫化マウスの血液試料がクロザピン結合に対する免疫応答を生じるかを観察した。これらの方法は、所望の活性を有する抗血清を産生している宿主をスクリーニングするための好都合な方法を提供する。抗体もN-デスメチルクロザピン及びクロザピン-N-オキシドの主要な代謝物に対してスクリーニングされたが、これらの化合物への実質的な結合を示さなかった。

30

## 【0067】

モノクローナル抗体は、好都合には、上記のスケジュールに従ってBalb/cマウスを免疫化し、続いて、細胞融合より4日前から始めて100ugの免疫原をi.p.若しくは静脈内に3日連続でマウスに注射すること、又は400ugの免疫原をi.p.若しくは静脈内に、続いて毎日200ugを次の2日間マウスに注射することのいずれかによって産生される。抗体技術においてよく知られている他のプロトコールは、当然、同様に利用することができる。本明細書において詳述されている完全な免疫化プロトコールは、クロザピン又はその薬理学的活性塩への抗体に対する血清抗体応答のための最適なプロトコールを提供した。

40

## 【0068】

宿主の脾臓、末梢血液、リンパ節又は他の組織から得られるBリンパ球は、モノクローナル抗体産生細胞として使用することができる。最も好ましいのは、脾臓から得られるB

50

リンパ球である。本発明の所望のモノクローナル抗体を産生できるハイブリドーマは、こうしたBリンパ球と、ハイブリッド細胞上の長期の組織培養安定性を付与する細胞系である不死細胞系とを融合することによって得られる。本発明の好ましい実施形態において、不死細胞は、リンパ芽球様細胞、又はそれ自体抗体産生細胞だが悪性でもある骨髄腫細胞などのプラズマ細胞腫細胞であってよい。クロザピン又はその薬理的活性塩モノクローナル抗体を産生するマウスハイブリドーマは、クロザピン又はその薬理的活性塩-タンパク質コンジュゲートに対して免疫化されたマウス由来のマウス骨髄腫細胞及び脾臓細胞の融合によって形成される。キメラ及びヒト化モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞から遺伝子を発現する抗体をクローニングすること及び現在当技術分野においてよく知られている組換えDNA方法を採用することで、マウス可変領域の部分配列をヒト定常領域に接合するか、又はヒトフレームワーク領域と、供与体マウス若しくはラット免疫グロブリンからの相補性決定領域(CDR)とを組み合わせるかのいずれかによって生成される。増強された親和性の抗体を提供するマウスモノクローナル抗体のヒト化を実施するための改善方法は、国際特許出願WO92/11018において説明されている。

10

20

30

40

50

#### 【0069】

一次抗体構造の一部だけを含むポリペプチド断片が生成され得るが、該断片は1種又は複数の免疫グロブリン活性を持つ。これらのポリペプチド断片は、当技術分野においてよく知られている方法による無傷抗体のタンパク分解切断によって、又はFab断片又は(Fab')<sub>2</sub>断片を生成するための部位-定方向突然変異誘発を使用して抗体遺伝子を含む発現ベクター中の所望の位置で停止コドン挿入することによって生成することができる。単鎖抗体は、VL及びVH領域とDNAリンカーとを接合することによって生成することができる(Hustonら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、85:5879~5883(1988)及びBirdら、Science、242:423~426(1988)を参照のこと)。

#### 【0070】

本発明の抗体は、N-デスメチルクロザピン及びクロザピン-N-オキシドだけであるクロザピン代謝物との実質的交差反応性を有することなく、クロザピンに対して選択的である。実質的交差反応性を有しないことによって、本発明の抗体は、クロザピンとのそれらの反応性に比して反応性又は交差反応性を有せず、これらの代謝物、特にN-デスメチルクロザピン及びクロザピン-N-オキシドには5%未満、好ましくは2%未満、及び最も好ましくは1%未満であることが意味される。これらの百分率は、これらの抗体とクロザピンとの反応性に基づく。

#### 【0071】

##### イムノアッセイ

本発明により、コンジュゲート、及び式IVのこれらの化合物の免疫原から生じさせた抗体は、患者試料中のクロザピンの決定のための試薬として利用することができる。この決定は、イムノアッセイの手段によって行われる。式IVの化合物から形成される試薬コンジュゲートが、本発明により作製された抗体上の結合部位に関して試料中のクロザピンと競合する任意のイムノアッセイが利用されることで、患者試料中のクロザピンの存在を決定することができる。クロザピンを含有すると疑われる試料中のクロザピンのためのこうしたアッセイを行うための方式は、(a)水性媒体試料、(b)本発明により作製されたクロザピンに対する抗体、及び(c)式IVの化合物又はそれらの混合物から形成されるコンジュゲートを組み合わせることを含む。試料中のクロザピンの量は、試料及び抗体の混合物に添加されるコンジュゲート既知量の特定の抗体への結合の障害を測定することによって決定することができる。不明な試料によるコンジュゲート既知量のこうした結合の障害の結果は、クロザピンの既知標準溶液を利用することによって、同じアッセイにおいて得られる結果と比較される。不明な試料中のクロザピンの量を決定する際、該試料、式IVの化合物から形成されるコンジュゲート、及び抗体は、任意の順序で添加することができる。

#### 【0072】

様々な手段を利用して、抗体に結合される式IVの化合物から形成されるコンジュゲートの量を測定することができる。1つの方法は、コンジュゲートを抗体に結合することが、フルオロフォアコンジュゲートの回転速度の減少を引き起こす。液体混合物におけるフルオロフォアコンジュゲートの回転速度の減少量は、米国特許第4,269,511号及び米国特許第4,420,568号などに開示されている蛍光偏光技法によって検出することができる。

【0073】

他方で、抗体がナノ粒子上にコーティング又は吸収されることで、これらの粒子が、式Vの化合物から形成されるクロザピンコンジュゲートと反応する場合、これらのナノ粒子は凝集体を形成する。しかしながら、抗体コーティング又は吸収ナノ粒子が試料中のクロザピンと反応する場合、これらのナノ粒子に結合される試料のクロザピンは、抗体ナノ粒子の凝集を引き起こさない。凝集又は凝着の量は、吸光度によってアッセイ混合物中で測定することができる。

10

【0074】

他方で、これらのアッセイは、抗体又はクロザピンコンジュゲートのいずれかをマイクロタイプレートなどの固体支持体又は固体粒子を含めて任意の他の従来の固体支持体に付着させることによって実施することができる。抗体及びタンパク質をこうした固体粒子に付着させることは、当技術分野においてよく知られている。任意の従来の方法を利用することで、こうした付着を実施することができる。多くの場合、測定を補助するために、抗体と結合している又は結合していない式IVの化合物から形成されるコンジュゲートの量を検出する際の補助としての放射活性標識又は酵素標識などの標識を抗体、コンジュゲート又は固体粒子上に置くことができる。他の適当な標識としては、発色団、フルオロフォアなどが挙げられる。

20

【0075】

便宜上の問題として、本発明のアッセイ構成成分は、キット中で、クロザピンについてアッセイする際に用いられる新たな試薬の所定量との包装組合せで提供することができる。これらの試薬には、本発明の抗体、並びに式Vの化合物から形成されるコンジュゲートが含まれる。

【0076】

これらの必要な試薬に加えて、補助的試薬などの添加剤としては、例えば、安定剤及び緩衝剤などを挙げるることができる。様々な試薬の相対量は、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提供するために広く変動することができる。試薬は、溶液中、又は溶解するとアッセイを行うための適切な濃度を有する試薬溶液を提供する賦形剤を含めた通常凍結乾燥させる乾燥粉末として提供することができる。

30

【実施例】

【0077】

実施例において、以下の略語は、以下のものを表すために使用される。

M s C l	塩化メタンシルホニル	
D I P E A	N - N' - ジイソプロピルエチルアミン	
C H <sub>2</sub> C l <sub>2</sub>	クロロホルム	40
M e O H	メタノール	
N a <sub>2</sub> S O <sub>4</sub>	硫酸ナトリウム	
L i O H	水酸化リチウム	
E t O A c	酢酸エチル	
E t <sub>3</sub> N	トリエチルアミン	
T H F	テトラヒドロフラン	
T F A	トリフルオロ酢酸	
p T S A	p - トルエンスルホン酸	
H A T U	0 - (7 - アザベンソトリアゾール - 1 - イル) - N , N , N' , N' -	
テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート		50

DMF	ジメチルホルムアミド	
DMSO	ジメチルスルホキシド	
s - NHS	スルホ - N - ヒドロキシスクシンイミド	
EDC	1 - ( 3 - ジメチルアミノプロピル ) - 3 - エチルカルボジイミド塩酸塩	
KLH	キーホールリンペット ( Key hole Limpet ) ヘモシアニンBS	
Aウシ血清	アルブミン	
PBS	リン酸緩衝生理食塩水	
NaCl	塩化ナトリウム	
HRP	セイヨウワサビ - ペルオキシダーゼ	
ANS	8 - アニリノ - 1 - ナフタレンスルホン酸	10
TMB	3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジン	
TRIS	トリス ( ヒドロキシメチル ) アミノメタン塩酸塩	
diH <sub>2</sub> O	脱イオン水	

## 【 0 0 7 8 】

リン酸緩衝液組成物は、

15 . 4 m M の二塩基性リン酸ナトリウム (  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  )

4 . 6 m M の一塩基性リン酸ナトリウム (  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  )

pH = 7 . 2 ± 0 . 1 0

を含有する水溶液を有する。

## 【 0 0 7 9 】

以下の実施例において、下記のスキーム 1 ~ 2 により、実施例において調製され、数字によって言及される特定の化合物を説明する。スキームは以下の通りである。

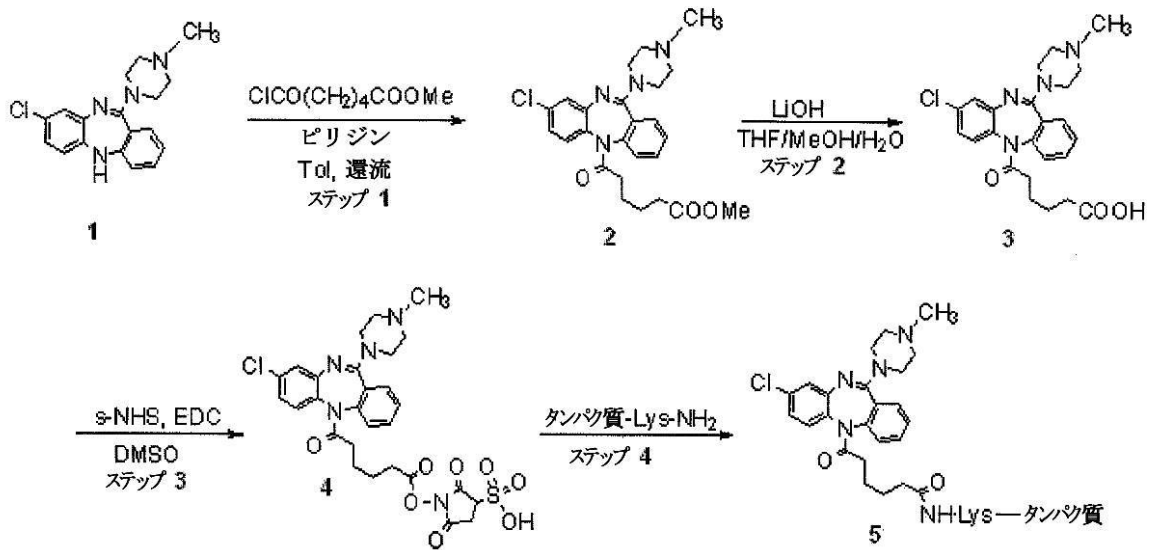
## 【 0 0 8 0 】

10

20

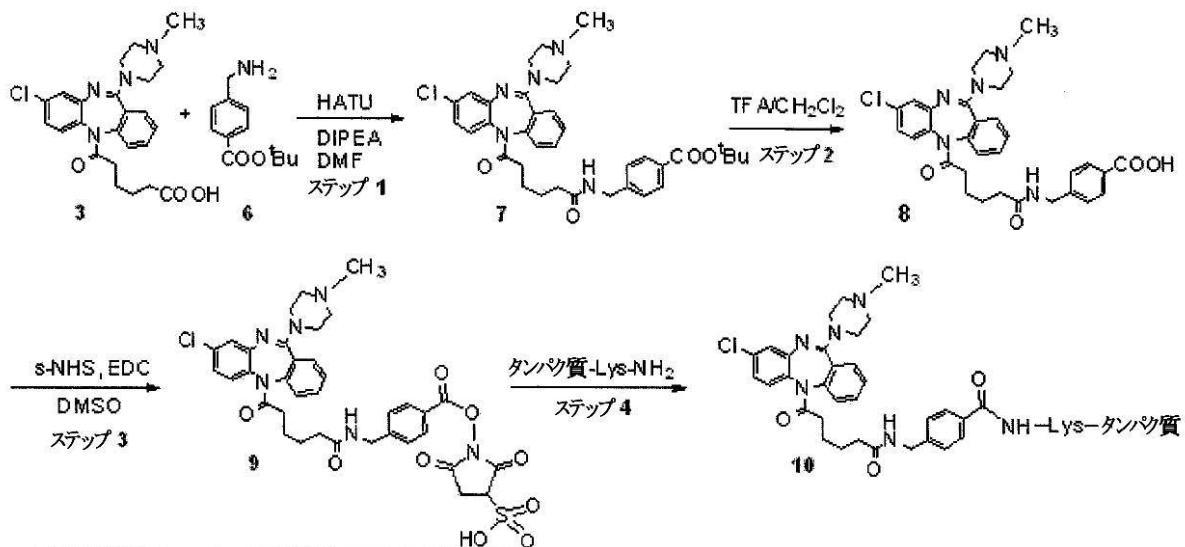
## 【化 1 4】

## スキーム 1



10

## スキーム 2



20

30

## 【 0 0 8 1】

(例 1)

6 - [ 8 - クロロ - 11 - ( 4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル ) - ジベンゾ [ b , e ] - [ 1 , 4 ] ジアゼピン - 5 - イル ] - 6 - オキソ - ヘキサノ酸の調製 (スキーム 1)

トルエン ( 60 mL ) 中の化合物 [ 1 ] ( 2 g 、 6 . 12 mmol ) の溶液に、ピリジン ( 0 . 49 mL 、 6 . 12 mmol ) 、続いてメチルアジピン酸クロリド ( 1 . 3 mL 、 7 . 95 mmol ) を添加した。反応混合物を還流で 3 . 5 時間の間加熱し、周囲温度に冷却し、10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  水溶液 ( 12 mL ) とともに 20 分間攪拌した。反応混合物をエーテルで希釈し、水で洗浄した。有機相を乾燥させ (  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ) 、濾過し、蒸発させた。0 . 1%  $\text{Et}_3\text{N}$  を含有する 98 : 2 から 97 : 3 の  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{MeOH}$  を使用するフラッシュクロマトグラフィーによる精製で、化合物 [ 2 ] ( 3 . 07 g 、定量的 ) を得た。

40

## 【 0 0 8 2】

50

化合物 [ 2 ] ( 3 . 0 6 g 、 6 . 1 2 m m o l ) 、 T H F ( 5 0 m L ) 、 M e O H ( 5 0 m L ) 及び H<sub>2</sub>O ( 1 9 m L ) の混合物に、 L i O H · H<sub>2</sub>O ( 1 . 8 g 、 4 2 . 8 4 m m o l ) を添加し、反応混合物を周囲温度にて窒素下で 3 時間の間攪拌し、この後、T L C は出発原料の非存在を示した。反応混合物を E t O A c で希釈し、0 . 1 N の H C l で洗浄した。水層を C H<sub>2</sub> C l<sub>2</sub> ( 3 × ) で再抽出した。E t O A c 層及び C H<sub>2</sub> C l<sub>2</sub> 層を別々に飽和ブラインで洗浄し、無水 N a<sub>2</sub> S O<sub>4</sub> を使用して乾燥させ、濾過し、蒸発させた。合わせた生成物を C H<sub>2</sub> C l<sub>2</sub> / ヘキサンで研和することで、6 - [ 8 - クロロ - 1 1 - ( 4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル ) - ジベンゾ [ b , e ] - [ 1 , 4 ] ジアゼピン - 5 - イル ] - 6 - オキソ - ヘキサン酸 ( 2 . 5 0 g 、 9 0 % ) である化合物 [ 3 ] が得られた。

10

## 【 0 0 8 3 】

( 例 2 )

4 - ( { 6 - [ 8 - クロロ - 1 1 - ( 4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル ) - ジベンゾ [ b , e ] - [ 1 , 4 ] ジアゼピン - 5 - イル ] 6 - オキソ - ヘキサノイルアミノ } - メチル ) - 安息香酸 t e r t - ブチルエステルの調製 ( スキーム 2 )

0 で、乾燥 D M F ( 1 3 m L ) 中の化合物 [ 3 ] 、 6 - [ 8 - クロロ - 1 1 - ( 4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル ) - ジベンゾ [ b , e ] - [ 1 , 4 ] ジアゼピン - 5 - イル ] - 6 - オキソ - ヘキサン酸 ( 6 0 0 m g 、 1 . 3 2 m m o l ) 、 化合物 [ 6 ] ( 4 3 0 m g 、 1 . 4 5 m m o l ) 、 D I P E A ( 0 . 7 8 m L 、 4 . 4 8 m m o l ) の混合物に、H A T U ( 6 0 1 m g 、 1 . 5 8 m m o l ) を添加し、反応混合物を終夜攪拌した。追加量の H A T U ( 6 0 1 m g 、 1 . 5 8 m m o l ) を添加し、反応混合物を周囲温度で 1 日間攪拌した。反応混合物を水と E t O A c との間で分配し、有機層を 1 N の H C l 、飽和 N a H C O<sub>3</sub> 、水及び飽和ブラインで順次洗浄し、無水 N a<sub>2</sub> S O<sub>4</sub> を使用して乾燥させ、濾過し、蒸発させた。C H<sub>2</sub> C l<sub>2</sub> / M e O H / E t<sub>3</sub> N ( 9 3 : 7 : 0 . 1 ) を使用するクロマトグラフィーによる精製で、化合物 [ 7 ] ( 6 3 8 m g 、 7 5 % ) を得た。

20

## 【 0 0 8 4 】

周囲温度で、C H<sub>2</sub> C l<sub>2</sub> ( 4 m L ) 中の化合物 [ 7 ] ( 6 3 5 m g 、 0 . 9 8 6 m m o l ) の溶液に、T F A ( 4 m L ) を添加し、反応混合物を周囲温度にて窒素下で 4 時間の間攪拌した。溶媒を蒸発させ、C H<sub>2</sub> C l<sub>2</sub> ( 2 × ) で共蒸発させ、真空下で乾燥させた。残渣をエーテルで研和すると、4 - ( { 6 - [ 8 - クロロ - 1 1 - ( 4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル ) - ジベンゾ [ b , e ] - [ 1 , 4 ] ジアゼピン - 5 - イル ] 6 - オキソ - ヘキサノイルアミノ } - メチル ) - 安息香酸 t e r t - ブチルエステル ( 5 6 3 m g 、 9 7 % ) である化合物 [ 8 ] を得た。

30

## 【 0 0 8 5 】

( 例 3 )

対応する酸 [ 3 ] 及び [ 8 ] から s - N H S 活性化薬物誘導体を調製するための一般的な方法

例 3 a 及び 3 b において、クロザピン酸誘導体 [ 3 ] 及び [ 8 ] を E D C 及び s - N H S で活性化することで、タンパク質への最終的なコンジュゲーションのための、クロザピン [ 4 ] 及び [ 9 ] の s - N H S 活性化エステルを生成した ( 例 4 及び 5 ) 。

40

## 【 0 0 8 6 】

( 例 3 a )

s - N H S 活性化 6 - [ 8 - クロロ - 1 1 - ( 4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル ) - ジベンゾ [ b , e ] - [ 1 , 4 ] ジアゼピン - 5 - イル ] - 6 - オキソ - ヘキサン酸 [ 4 ] の調製

クロザピン誘導体 [ 3 ] 、例 1 、スキーム 1 、( 5 6 . 8 m g ) を 5 . 6 8 m L の D M S O 中に溶解させ、ここに、s - N H S ( 6 6 . 5 6 m g ) 及び E D C ( 5 8 . 5 8 m g ) を添加した。反応混合物を 2 0 時間の間周囲温度にて窒素雰囲気下で攪拌することで、クロザピンの s - N H S 活性化エステル [ 4 ] を生成した。反応混合物を直接、例 4 及び

50

5 a で使用した。

【0087】

(例3b)

s-NHS 活性化 4 - ( { 6 - [ 8 - クロロ - 11 - ( 4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル ) - ジベンゾ [ b , e ] - [ 1 , 4 ] ジアゼピン - 5 - イル ] 6 - オキソ - ヘキサノイルアミノ } - メチル ) - 安息香酸 [ 9 ] の調製

クロザピン誘導体 [ 8 ]、例 2、スキーム 2 ( 25.0 mg ) を 2.5 mL の DMSO 中に溶解させ、ここに、s-NHS ( 19.9 mg ) 及び EDC ( 17.6 mg ) を添加した。反応混合物を 20 時間の間周囲温度にて窒素雰囲気下で攪拌することで、クロザピンの s-NHS 活性化エステル [ 9 ] を生成した。反応混合物を直接、例 5 b で使用した。

10

【0088】

(例4)

活性化ハプテン [ 4 ] を用いる K L H 免疫原 [ 5 ] の調製

300 mg の K L H をリン酸緩衝液 20 mL ( 50 mM、pH 7.5 ) 中に溶解させること、続いて、例 3 a で調製した 4.85 mL の s-NHS 活性化クロザピン誘導体 [ 4 ] を添加することによって、K L H のタンパク質溶液を調製した。K L H 及び活性化クロザピン誘導体 [ 4 ] の反応混合物を 20 時間の間室温で攪拌させておくことで、クロザピン - K L H コンジュゲート [ 5 ] を生成した。クロザピン - K L H コンジュゲート [ 5 ] を次いで、リン酸緩衝液 ( 50 mM、pH 7.5 ) 中の 30 % DMSO に対して室温で透析することによって精製した。その後、DMSO 割合を段階的に 20 %、10 % 及び 0 % と低減した。最後の透析をリン酸緩衝液に対して 4 で行った。クロザピン - K L H コンジュゲート [ 5 ] を紫外 - 可視 ( UV - VIS ) 分光法によって特徴付けた。コンジュゲートを 2 mg / mL の最終濃度までリン酸緩衝液 ( 50 mM、pH 7.5 ) 中にて希釈した。

20

【0089】

(例5a)

活性化ハプテン [ 4 ] を用いる B S A コンジュゲート [ 5 ] の調製

50 mg / mL の最終濃度のために 1 g の B S A をリン酸緩衝液 ( 50 mM、pH 7.5 ) 中に溶解させることによって、B S A のタンパク質溶液を調製した。このタンパク質溶液に、例 3 a で調製した s-NHS 活性化クロザピン誘導体 [ 4 ] 0.83 mL を添加した。B S A のタンパク質溶液に添加した s-NHS 活性化クロザピン誘導体 [ 4 ] の量は、クロザピン [ 4 ] の誘導体と B S A との間で 1 : 1 のモル比と算出された。B S A 及び活性化クロザピン誘導体 [ 4 ] の混合物を 18 時間の間室温で攪拌させておくことで、活性化クロザピンエステル及び B S A のコンジュゲートを生成した。このコンジュゲートを次いで、リン酸緩衝液 ( 50 mM、pH 7.5 ) 中の 20 % DMSO に対して室温で透析することによって精製した。その後、DMSO 割合を段階的に 10 % 及び 0 % と低減した。最後の透析をリン酸緩衝液に対して 4 で行った。精製クロザピン - B S A [ 5 ] コンジュゲートを UV / VIS 分光法によって特徴付けた。

30

【0090】

(例5b)

活性化ハプテン [ 9 ] を用いる B S A コンジュゲート [ 10 ] の調製

50 mg / mL の最終濃度のために 1 g の B S A をリン酸緩衝液 ( 50 mM、pH 7.5 ) 中に溶解させることによって、B S A のタンパク質溶液を調製した。B S A のタンパク質溶液 10.0 mL に、氷上で攪拌しながら、例 3 b で調製した s-NHS 活性化クロザピン誘導体 [ 9 ] 0.620 mL を添加した。B S A のタンパク質溶液に添加した s-NHS 活性化クロザピン誘導体 [ 9 ] の量は、クロザピンの誘導体 [ 9 ] と B S A との間で 1 : 1 のモル比と算出された。B S A 及び活性化クロザピン誘導体 [ 9 ] の混合物を 18 時間の間室温で攪拌させておくことで、活性化クロザピンエステル及び B S A [ 10 ] のコンジュゲートを生成した。このコンジュゲートを次いで、リン酸緩衝液 ( 50 mM、

40

50

pH 7.5) 中の 15% DMSO に対して室温で透析することによって精製した。その後、DMSO の割合を段階的に 10%、5% 及び 0% と低減した。最後の透析をリン酸緩衝液に対して 4 で行った。精製クロザピン - [9] - BSA コンジュゲートを UV/VIS 分光法によって特徴付けた。

【0091】

(例 6a)

クロザピン - KLH コンジュゲート [5] に対するポリクローナル抗体の調製

10匹の雌性 BALB/c マウスを、完全フロイントアジュバント中で乳化された、例 4 で調製した通りのクロザピン - KLH 免疫原 [5] 100 µg / マウスを用いて i.p. で免疫化した。初期の注射の 4 週後に、不完全フロイントアジュバント中に乳化された同じ免疫原 100 µg / マウスを用いて、マウスに 1 回ブーストした。ブーストの 20 日後、ポリクローナル抗体を含有する試験出血を各マウスから眼窩出血によって得た。クロザピン抗体を含有するこれらの試験出血からの抗血清を例 8 及び 9 で評価する。

10

【0092】

(例 6b)

クロザピン - KLH [5] に対するモノクローナル抗体の調製

例 4 で調製したクロザピン - [5] - KLH で免疫化した例 6a からのマウスを使用することで、モノクローナル抗体を生成した。融合の 3 日前に始めたモノクローナル抗体に関して、例 4 で調製した PBS / DMSO 中のクロザピン - KLH コンジュゲート [5] を 400 µg (融合の 3 日前)、200 µg (融合の 2 日前) 及び 200 µg (融合の 1 日前)、又は 100 µg (融合の 3 日前)、100 µg (融合の 2 日前) 及び 100 µg (融合の 1 日前) のいずれかで、マウスに i.p. 注射した。選択したマウスから脾臓細胞を単離し、50% ポリエチレングリコール 1500 を用いて Coligan、J.E. ら編集、免疫学における現在のプロトコール (Current Protocols in Immunology)、2.5.1 ~ 2.5.8、(1992)、Wiley & Sons、NY の方法に従って、 $2 \times 10^7$  の SP2/0 細胞と融合させた。融合細胞を 10 個の 96 ウェルプレート上にて、20% Fetal Clone I、2% L-グルタミン (100 mM) 及び 2% 50 X HAT を補充した DMEM / F12 中で平板培養した。2 週から 3 週後、ハイブリドーマ上澄みを、抗クロザピン抗の存在について ELISA (例 8 における通り) によってアッセイした。陽性の ELISA 結果 (例 8) が出たウェルからの細胞を 24 ウェルプレートに広げた。ELISA によって陽性のクローンを、Coligan、J.E. ら編集、免疫学における現在のプロトコール (Current Protocols in Immunology)、2.5.8 ~ 2.5.17、1992、Wiley & Sons、NY に開示されている方法に従って希釈を制限することによって、2 回サブクローンした。選択したサブクローンからのモノクローナル抗体を含有するハイブリドーマ培養上澄みを、クロザピン結合について、競合的 ELISA (例 9) によって確認した。これらのモノクローナル抗体を、クロザピン結合並びに主要なクロザピン代謝物、N-デスメチルクロザピン及びクロザピン - N-オキシドに対する交差反応性について、例 9 に記載した通りの間接的競合マイクロタイタープレートアッセイによって試験した。

20

30

40

【0093】

(例 7a)

クロザピン - BSA コンジュゲート [5] を用いるマイクロタイタープレート感作手順

クロザピン濃度を測定するための ELISA 方法を、タンパク質結合に関して最適化されているとともに 1 プレート当たり 96 ウェルを含有するポリスチレンマイクロタイタープレート (Nunc MaxiSorp F8 Immunomodules) 中で行った。各ウェルを、クロザピン - BSA コンジュゲート [5] 300 µL を、0.05 M 炭酸ナトリウム中 10 µg / mL、pH 9.6 で添加すること及び 3 時間の間室温でインキュベートすることによって、クロザピン - BSA コンジュゲート [5] (例 5a における通りに調製した) でコーティングした。ウェルを 0.05 M 炭酸ナトリウム、pH 9.6

50

で洗浄し、次いで、5%ショ糖375  $\mu$ L、0.2%カゼイン酸ナトリウム溶液を用いて30分間室温でブロックした。コーティング後の溶液を除去後、プレートを37で終夜乾燥させた。

【0094】

(例7b)

クロザピン - BSAコンジュゲート [10] を用いるマイクロタイタープレート感作手順  
 クロザピン濃度を測定するためのELISA方法を、タンパク質結合に関して最適化されているとともに1プレート当たり96ウェルを含有するポリスチレンマイクロタイタープレート (Nunc MaxiSorp F8 Immunomodules) 中で行った。各ウェルを、クロザピン - BSAコンジュゲート [10] 300  $\mu$ L を0.05 M炭酸ナトリウム中10  $\mu$ g/mL、pH 9.6で添加すること及び3時間の間室温でインキュベートすることによって、クロザピン - BSAコンジュゲート [10] (例5bにおける通りに調製した) でコーティングした。ウェルを0.05 M炭酸ナトリウム、pH 9.6で洗浄し、次いで、5%ショ糖375  $\mu$ L、0.2%カゼイン酸ナトリウム溶液を用いて30分間室温でブロックした。コーティング後の溶液の除去後、プレートを37で終夜乾燥させた。

10

【0095】

(例8)

抗体スクリーニング手順 - 力価

この手順は、例9における通り変位に関して試験されるべき抗体の希釈度を見つけるものである。クロザピン抗体をスクリーニングするためのELISA方法は、例7a及び7bで調製したクロザピン - BSAコンジュゲートで感作したマイクロタイタープレートを用いて行った。抗体スクリーニングアッセイは、ポリクローマルクロザピン抗体を含有する試験出血からのマウス血清を、0.1%BSA及び0.1%チメロサルを含有するリン酸緩衝生理食塩水中で1:10、1:100、1:1000及び1:10000 (体積/体積) まで希釈することによって行った。クロザピン - BSA感作ウェル (例7a及び7bで調製した) の各ウェルに、0.1%BSA及び0.01%チメロサルを含有する50  $\mu$ Lのリン酸緩衝生理食塩水及び希釈抗体50  $\mu$ Lを添加し、10分間室温で振盪しながらインキュベートした。このインキュベーション中に、抗体は、ウェル (例7a及び7b) に受動的に吸収されたクロザピン - BSAコンジュゲートに結合する。プレートのウェルを0.02 MのTRIS、0.9%NaCl、0.5%Tween-80及び0.001%チメロサル、pH 7.8で3回洗浄することで、任意の非結合抗体を除去した。ウェル中のクロザピン - BSAコンジュゲートに結合されたクロザピン抗体の量を検出するため、この例においてはTMBの基質でインキュベートした場合にマウス免疫グロブリンと特異的に結合でき、着色生成物を生成できる、0.1%BSA、0.05%ANS、0.01%チメロサルとともにPBS中比活性 (およそ1/3000) に希釈されたヤギ抗マウス抗体 - HRP酵素コンジュゲート (Jackson ImmunoResearch) 100  $\mu$ Lを各ウェルに添加した。ヤギ抗マウス抗体 - HRP酵素コンジュゲートがウェル中のクロザピン抗体に結合する、10分室温で振盪しながらのインキュベーション後、プレートを再び3回洗浄することで、非結合ヤギ抗マウス抗体 - HRP酵素コンジュゲートを除去した。ウェルにおける測定可能な色を発色させるため、洗浄に続いて、HRPのための基質のTMB (TMB Substrate, BioFex) 100  $\mu$ Lを添加することで、振盪しながら室温で10分のインキュベーション中に発色させた。発色のためのインキュベーションに続いて、停止溶液 (dH<sub>2</sub>O中の1.5%フッ化ナトリウム) 50  $\mu$ Lを各ウェルに添加することで発色現象を停止させ、振盪の20秒後に、吸光度を650 nmで決定した (Molecular Devices Plate Reader)。ウェルにおける抗体の量は測定した吸光度に比例しており、1.5の吸光度で生じる希釈度 (力価) として表した。測定された抗体の抗体希釈度 (x軸) 対吸光度650 nm (y軸) のグラフを作成すること、及び1.5の吸光度で力価を補間することによって力価を決定した。1.5の吸光度を生成した力価が、例9に記載されている

20

30

40

50

間接的競合マイクロタイタープレートアッセイにおいて使用される抗体の濃度（希釈度）を決定した。

【0096】

（例9）

クロザピンに対する抗体に関する  $IC_{50}$  及び交差反応性を決定する間接的競合マイクロタイタープレート免疫アッセイ手順

$IC_{50}$  値及び交差反応性を決定するための ELISA 方法を、例 7 a 及び 7 b に記載されている通りのクロザピン - BSA コンジュゲートで感作されたマイクロタイタープレートを用いて行った。分析物を以下の通りに希釈した。クロザピンを DMSO 中で系列希釈し、クロザピン - [5] - BSA 及びクロザピン - [10] - BSA のマイクロタイタープレート用に 0.01 ng/mL から 50 ng/mL の濃度範囲にわたり 1% DMSO までさらに希釈し、N - デスメチルクロザピンを DMSO 中で系列希釈しクロザピン - BSA コンジュゲート [5] 及びクロザピン - BSA コンジュゲート [10] のマイクロタイタープレート用に 0.24 ng/mL から 1,000 ng/mL の濃度範囲にわたり 1% DMSO までさらに希釈し、クロザピン - N - オキシドを DMSO 中で系列希釈し、クロザピン - BSA コンジュゲート [5] 及びクロザピン - BSA コンジュゲート [10] のマイクロタイタープレート用に 0.24 ng/mL から 1,000 ng/mL の濃度範囲にわたり 1% DMSO までさらに希釈した。アッセイの各々は、例 4 の免疫原を用いて例 6 で生成されたポリクローナル抗体から選択される抗体の 1 種 50  $\mu$ L で、分析物溶液 50  $\mu$ L をインキュベートすることによって行った。アッセイは全て、ウェルの各々における抗体の濃度を、例 8 において決定された力価まで希釈することによって行った。10 分のインキュベーション（室温で振盪しながら）中、ウェルにおけるクロザピン - BSA コンジュゲート（例 7 a 及び 7 b で生成された）及び溶液中の分析物に関する抗体結合の競合がある。このインキュベーションに続いて、プレートのウェルを 0.02 M の TRIS、0.9% NaCl、0.5% ツウィーン - 80 及び 0.001% チメロサル、pH 7.8 で 3 回洗浄することで、結合されなかった任意の材料を除去した。ウェルにおけるクロザピン - BSA コンジュゲート（例 7 a 及び 7 b で生成された）に結合されたクロザピン抗体の量を検出するため、マウス免疫グロブリンと特異的に結合でき、この例における TMB の基質でインキュベートされると着色生成物を生成できる、0.1% BSA、0.05% ANS、0.01% チメロサルとともに PBS 中所定の比活性（およそ 1/3000）まで希釈されたヤギ抗マウス抗体 - HRP 酵素コンジュゲート（Jackson ImmunoResearch）100  $\mu$ L を各ウェルに添加した。ヤギ抗マウス抗体 - HRP 酵素コンジュゲートがウェルにおけるクロザピン抗体に結合する、室温で振盪しながら 10 分のインキュベーション後、プレートを再び 3 回洗浄することで、非結合二次コンジュゲートを除去した。ウェルにおいて測定可能な色を発色させるため、洗浄に続いて、HRP のための基質の TMB（TMB Substrate, BioFex）100  $\mu$ L を添加することで、振盪しながら室温で 10 分のインキュベーションにおいて発色させた。発色のためのインキュベーションに続いて、吸光度を 650 nm で決定した（Molecular Devices Plate Reader）。ウェルにおける抗体の量は、測定された吸光度に比例し、試料中のクロザピンの量に反比例した。クロザピンの  $IC_{50}$  値を、ウェルにおける分析物濃度と対比してプロットされたウェルにおける吸光度を用いて用量応答曲線を作成することによって決定した。分析物を含有するウェルにおける色の吸光度を、分析物のないものと比較し、標準曲線を作成した。与えられた分析物に関する  $IC_{50}$  値を、分析物を含有しないウェルの吸光度の 50% を持つことを必要とされる分析物の濃度として定義した。交差反応性を、N - デスメチルクロザピン又はクロザピン - N - オキシドのいずれかに関する  $IC_{50}$  値に対するクロザピンに関する  $IC_{50}$  の比として算出し、パーセントとして表した。この方法を使用してモノクローナル抗体のライブラリーをスクリーニングした後、モノクローナル抗体を選択した。これらの選択された抗体を、それらのプレート及びウェルの数により、以下の通り：5B1 - 24 - 30、5H2 - 6 - 14、5H2 - 6 - 30、5G10 - 19 - 19、1G9 - 22 - 5、及

10

20

30

40

50

び 20A5-25-24 に分類した。測定すると、N-デスメチルクロザピン (NDMC) 及びクロザピン-N-オキシドのクロザピンとのこれらの抗体の反応性に対する該抗体のパーセント交差反応性は2%未満であった。クロザピンに対するモノクローナル抗体についての結果は、下記の表 I 及び I I に示されている。

【0097】

【表1】

表 I

クロザピンに対するモノクローナル抗体を使用する競合的イムノアッセイの交差反応性。

サブクローン#	クロザピン-BSAコンジュゲートでコーティングされたプレート [5] (例7A)				
	クロザピン IC <sub>50</sub> (ng/mL)	NDMC IC <sub>50</sub> (ng/mL)	クロザピン-N- オキシド IC <sub>50</sub> (ng/mL)	% 交差 反応性 NDMC	% 交差 反応性 N-オキシド
5B1-24-30	10	760	>1000	1.3	0.99
5H2-6-14	5	920	880	0.53	0.56
5H2-6-30	5	>1000	620	<0.45	0.73
5G10-19-19	0.8	150	170	0.49	0.44
1G9-22-5	0.6	280	40	0.22	1.39
20A5-25-24	0.7	>1000	100	<0.07	0.72

10

20

【0098】

【表2】

表 I I

クロザピンに対するモノクローナル抗体を使用する競合的イムノアッセイの交差反応性。

サブクローン#	クロザピン-BSAコンジュゲートでコーティングされたプレート [10] (例7B)				
	クロザピン IC <sub>50</sub> (ng/mL)	NDMC IC <sub>50</sub> (ng/mL)	クロザピン-N- オキシド IC <sub>50</sub> (ng/mL)	% 交差 反応性 NDMC	% 交差 反応性 N-オキシド
5B1-24-30	7	600	200	1.1	3.3
5H2-6-14	3	970	620	0.30	0.47
5H2-6-30	3	>1000	480	<0.27	0.57
5G10-19-19	2	180	280	1.2	0.78
1G9-22-5	0.5	220	60	0.23	0.86
20A5-25-24	2	>1000	150	<0.24	1.56

30

40

【0099】

これらの表から見られるように、本発明の抗体は、クロザピンの活性形態と実質的に選択的に反応性であり、活性代謝物 N-デスメチルクロザピン及びクロザピン-N-オキシドと実質的に交差反応性でない。

50



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 12/36257

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C12Q 1/00; A61P 25/18 (2012.01) USPC - 435/7.1; 514/220 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) -C12Q 1/00; A61P 25/18 (2012.01) USPC -435/7.1; 514/220 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) PubWest, Google Patents, Google Scholar, WIPO (clozapine, immunoassay, formula, polyamine, polymer, functional, terminal, spacing, group, antibody, rabbits, conjugate, clozapine, selective, desmethylclozapine, bind, spacer)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2009/0215082 A1 (SALAMONE, et al.) 27 August 2009 (27.08.2009) entire document, especially para[0018], [0022]-[0026], [0050]-[0051], [0053], [0055], [0069], [0090]-[0091], [0098]-[0100], claim 8.	1-38
Y	US 6,197,764 B1 (BRADLEY, et al.) 06 March 2001 (06.03.2001) entire document, especially col 2, ln 40-44; col 10, ln 25- col 11, ln 60.	1-38
Y	US 2006/0252744 A1 (BURSTEIN) 09 November 2006 (09.11.2006) entire document, especially para[0182], [0212].	1-19; 34-38
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
* 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 23 July 2012 (23.07.2012)		Date of mailing of the international search report 31 JUL 2012
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. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## 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, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA

(72)発明者 サード、 ハワード

アメリカ合衆国、 マサチューセッツ、 アーリントン、 ヒルサイド アヴェニュー 67

(72)発明者 スペダリーア、 クリストファー

アメリカ合衆国、 ペンシルヴァニア、 アレンタウン、 グレイス ストリート 1413

专利名称(译)	氯氮平免疫测定		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014517298A</a>	公开(公告)日	2014-07-17
申请号	JP2014512855	申请日	2012-05-03
[标]申请(专利权)人(译)	萨拉戴克斯生物医学公司		
申请(专利权)人(译)	莎拉·达克斯生物医学公司		
[标]发明人	サラモンサルヴァトーレジエイ コートニージョディブレイク サードハワード スベダリーアクリストファー		
发明人	サラモン、サルヴァトーレ、ジェイ. コートニー、ジョディ、ブレイク サード、ハワード スベダリーア、クリストファー		
IPC分类号	G01N33/53 C07D243/38		
CPC分类号	A61P25/18 C07D243/38 C07D403/12 C07K16/44 C07K2317/33 G01N33/94 G01N33/5308		
FI分类号	G01N33/53.S G01N33/53.G C07D243/38.CSP		
优先权	13/186147 2011-07-19 US 13/114252 2011-05-24 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

来自氯氮平的新型缀合物和免疫原以及由这些免疫原产生的抗体可用于免疫测定，用于定量和监测体液中的氯氮平。

