

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5778137号

(P5778137)

(45) 発行日 平成27年9月16日(2015.9.16)

(24) 登録日 平成27年7月17日(2015.7.17)

(51) Int.Cl.

F I

<b>GO 1 N 33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	G
<b>GO 1 N 33/543</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/543	5 4 1 Z
<b>GO 1 N 33/531</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/543	5 0 1 N
A 6 1 K 31/4015	(2006.01)	GO 1 N 33/531	A
C 0 7 D 207/27	(2006.01)	A 6 1 K 31/4015	

請求項の数 12 (全 55 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-515142 (P2012-515142)  
 (86) (22) 出願日 平成22年6月10日 (2010.6.10)  
 (65) 公表番号 特表2012-530245 (P2012-530245A)  
 (43) 公表日 平成24年11月29日 (2012.11.29)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2010/038185  
 (87) 国際公開番号 W02010/144712  
 (87) 国際公開日 平成22年12月16日 (2010.12.16)  
 審査請求日 平成25年5月14日 (2013.5.14)  
 (31) 優先権主張番号 61/268,339  
 (32) 優先日 平成21年6月11日 (2009.6.11)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 12/797,348  
 (32) 優先日 平成22年6月9日 (2010.6.9)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 511302297  
 セラダイン, インコーポレーテッド  
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州024  
 54, ウォルサム, ワイマン・ストリート  
 81  
 (74) 代理人 100140109  
 弁理士 小野 新次郎  
 (74) 代理人 100075270  
 弁理士 小林 泰  
 (74) 代理人 100080137  
 弁理士 千葉 昭男  
 (74) 代理人 100096013  
 弁理士 富田 博行  
 (74) 代理人 100126985  
 弁理士 中村 充利

最終頁に続く

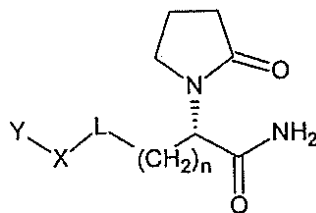
(54) 【発明の名称】 レベチラセタムを検出するための誘導体、試薬、およびイムノアッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

式2:

【化1】



式2

[式中、YはY<sub>1</sub>-Zである]

のレベチラセタム(LEV)誘導体を含む化学組成物であって、

式2のn、L、X、およびY<sub>1</sub>-Zが:n = 4、L = NHCO、X = Ph、およびY<sub>1</sub>-Z = CO-NHS;n = 4、L = NHCO、X = Ph、およびY<sub>1</sub>-Z = CO-KLH; およびn = 4、L = NHCO、X = Ph、およびY<sub>1</sub>-Z = CO-BSA;

からなる群より選択される、上記化学組成物。

【請求項2】

試料中の L E V の存在を検出するための免疫診断アッセイにおいて使用するためのキットであって：

請求項 1 に記載の L E V 誘導体；および

少なくとも 1 つの結合ドメインを有する抗 L E V 抗体であって、L E V および / または L E V 誘導体に結合可能な部分を有する該抗 L E V 抗体、ここで、抗体および L E V 誘導体間の相互作用は、L E V に対する抗体のアフィニティ、特異性、またはアビディティの少なくとも 1 つにおいて、少なくとも 5 0 % である；

を含む、上記キット。

【請求項 3】

L E V 誘導体または抗 L E V 抗体の一方が、粒子、磁気粒子、微粒子、微小球体、支持体、酵素ドナー、または酵素アクセプターの 1 つとカップリングしている、請求項 2 に記載のキット。

10

【請求項 4】

L E V を含む組成物；

請求項 1 に記載の L E V 誘導体を含む化学組成物；

異なる濃度の L E V を含有する一連の組成物、濃度勾配を形成する一連の組成物；

トレーサー・コンジュゲートを有する L E V 誘導体；

微粒子にカップリングした L E V 誘導体；

微粒子にカップリングした抗体；

酵素ドナーを有する L E V 誘導体、および対応する酵素アクセプター；

20

酵素アクセプターを有する L E V 誘導体、および対応する酵素ドナー；または

ろ過または沈降による分離に適した粒子上に装填された抗体；

の少なくとも 1 つをさらに含む、請求項 2 に記載のキット。

【請求項 5】

試料中の L E V の存在を検出するための免疫診断システムにおいて使用するための抗体組成物であって：

該抗体組成物が、請求項 1 に記載の化学構造を有する L E V 誘導体を含む免疫原性組成物によって産生される抗 L E V 抗体を含み、

ここで、該抗 L E V 抗体が、L E V と結合可能な、および / または L E V 誘導体と結合可能な少なくとも 1 つの結合ドメインを有し、そして抗体および L E V 誘導体間の相互作用が、L E V に対する抗体のアフィニティ、特異性、またはアビディティの少なくとも 1 つにおいて、少なくとも 5 0 % である、

30

上記抗体組成物。

【請求項 6】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項 5 に記載の抗体組成物。

【請求項 7】

抗体がポリクローナル抗体である、請求項 5 に記載の抗体組成物。

【請求項 8】

L E V に比較した L E V 誘導体に対する抗体のアフィニティ、特異性、またはアビディティの少なくとも 1 つが、均一または不均一免疫診断アッセイで使用するのに十分である、請求項 5 に記載の抗体組成物。

40

【請求項 9】

抗体および L E V 誘導体間の相互作用が、L E V に対する抗体のアフィニティ、特異性、またはアビディティの少なくとも 1 つにおいて、少なくとも 7 0 % である、請求項 8 に記載の抗体組成物。

【請求項 1 0】

抗体および L E V 誘導体間の相互作用が、L E V に対する抗体のアフィニティ、特異性、またはアビディティの少なくとも 1 つにおいて、少なくとも 9 0 % である、請求項 8 に記載の抗体組成物。

【請求項 1 1】

50

請求項 1 に記載の化学構造を有する L E V 誘導体を含む免疫原性組成物の少なくとも第一の用量を、非ヒト抗体を産生する被験体に投与し；

該非ヒト抗体を産生する被験体から抗体を収集し；そして

該非ヒト抗体を産生する被験体から収集した抗体を精製し、および/またはスクリーニングする；

工程を含む方法によって前記抗体が産生される、請求項 5 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

【請求項 1 2】

前記非ヒト抗体を産生する被験体が、ヒツジ、ヤギ、ウサギまたは他の哺乳動物の 1 つである、請求項 1 1 に記載の抗体組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願に対する相互参照

[0001]本出願は、2010年6月9日に出願された、「レベチラセタムを検出するための誘導体、試薬、およびイムノアッセイ」と題される米国特許出願第12/797,348号に優先権を主張する。本出願はまた、Ouyangらに対する、2009年6月11日に出願された、「レベチラセタムを検出するための誘導体、試薬、およびイムノアッセイ」と題される米国仮特許出願第61/268,339号に優先権の利益を主張し、該出願はその全体が本明細書に援用される。

20

【背景技術】

【0002】

[0002]レベチラセタム ( L E V ) ( ( - ) - ( S ) - - エチル - 2 - オキソ - 1 - ピロリジンアセトアミド、ケブラ (登録商標) ) は、ファースト・イン・クラスの抗癲癇薬剤 ( A E D ) として、2006年、FDAによって認可された。該化合物は、商標名ケブラ (登録商標) の下に、UCB Pharmaceuticals, Inc. によって市販されている。

【0003】

[0003]レベチラセタムは、4歳およびそれより年上の成人および小児における部分癲癇発作 ( partial onset seizures )、12歳およびそれより年上の成人および青年におけるミオクローヌス発作、ならびに6歳およびそれより年上の成人および小児における原発性全身性强直間代発作の治療において補助療法として指示されている。L E V は、脳において、シナプス小胞タンパク質 S V 2 A に結合することによって、シナプス神経伝達物質放出を調節することによって作用する ( 1 )。L E V に関する名目上の ( nominal ) 療法範囲は、6 ~ 20 μ g / m L である ( 2 )。L E V の療法薬剤監視 ( T D M ) は、個体の最適 L E V レベルを確立し ( 3 )、そしてノンコンプライアンスを検出するために重要である。

30

【0004】

[0004] L E V に関する最適トラフ血清 / 血漿濃度範囲は、10 ~ 60 m g / L である ( 4 ~ 6 )。L E V は、主に腎臓を通じて排出され、投与された用量のおよそ 64 % が変化せず尿中に排出される。該薬剤は、最小限の肝臓代謝を経るが、細胞質アミダーゼによるアセトアミド機能の加水分解が起こり、カルボン酸代謝物、2 - ピロリドン - N - 酪酸が生じる。酸代謝物は尿中に排出され、そして投与された用量のおよそ 27 % を占める。2 - オキソピロリジン環の 3 位および 4 位の酸化もまた、肝臓代謝によって生じて、用量の約 3 % を占める少量の代謝物を形成する。さらに、L E V および 2 - ピロリドン - N - 酪酸は 2 - オキソピロリジン環の 5 位で酸化され、そして次いで加水分解されて、開環を生じる可能性もある。L E V 薬物動態学においては、顕著な個体間変動がある。したがって、L E V の血清 / 血漿濃度の療法的監視が推奨される。

40

【0005】

[0005]現在まで、L E V の循環レベルを測定するために、液体またはガスクロマトグラ

50

フィー技術が使用されてきた。しかし、こうした方法は、試料調製時間が長く、アッセイ時間が長く、コストが高く、スループットが低く、そして労働集約的な方法であることを含む要因のため、定期的なTDMには非実用的である。したがって、有効なTDMのためには、LEV血漿レベルを測定するための迅速で経済的な分析法が必要である。

【0006】

[0006]イムノアッセイは、一般的に、試料中に存在する抗原レベルを定量化するための、迅速で、安価であり、そして高感度の手段と見なされている。イムノアッセイ技術は、生物学的試料中の多様な薬剤を検出するために開発されてきており、そしてこうした商業的分析適用によく適している。したがって、イムノアッセイを用いて、患者の血液、血清、尿、唾液または他の体液中の薬剤および/または薬剤代謝物の量を迅速に評価することも可能である。イムノアッセイの例には、限定されるわけではないが、均一(homogeneous)微粒子イムノアッセイ(例えば免疫比濁法)または定量的微小球体系(QMS(登録商標))、蛍光偏光イムノアッセイ(FPIA)、クローン化酵素ドナーイムノアッセイ(CEDIA)、化学発光微粒子イムノアッセイ(CMIA)等が含まれる。患者血液、血清、血漿、および/または他の生物学的液体または試料におけるLEVを検出するために設定されたイムノアッセイがあることが好適であろう。さらに、こうしたイムノアッセイで使用するためのLEV誘導体、および/または抗レベチラセタム抗体を産生する際に使用するための、LEVに基づく免疫原があることが好適であろう。

10

【0007】

[0007]典型的には、ターゲット抗原に特異的な少なくとも1つの抗体が、有用なイムノアッセイの基礎を形成するため、TDMは、大部分の療法薬剤が、元来、免疫原性ではなく、そしてしたがってマウス、ウサギ、ヤギ、ウマおよび他の哺乳動物などの、抗体産生に一般的に用いられる動物内に注射された際、免疫反応を誘発しない点で困難を提示する。また、ターゲット薬剤の活性型は、小用量であってさえ、レシピエント動物に対して有害でありうる。したがって、免疫原として作用する、療法薬剤の誘導体を作製しなければならない。しかし、免疫原に反応して産生される抗体は、患者試料中に存在すると予期される薬剤と交差反応可能でなければならず、そしてさらにより好ましくは、抗体は、試料中にも存在しうる、薬剤の不活性代謝性誘導体とは、あるとしてもわずかに測定可能な交差反応しか有してはならない。

20

【0008】

[0008]イムノアッセイは、典型的には、抗体産生に必要な免疫原に加えて、他のタイプの誘導体を使用する。限定されない例として、ターゲット抗原の標識誘導体を用いて、ターゲット抗原および標識誘導体の両方を認識可能な抗体上の結合部位に関して、ターゲット抗原と競合させてもよい。競合イムノアッセイは、現在の当該技術分野において周知である。他の誘導体は、イムノアッセイを較正するための対照または標準として働きうる。

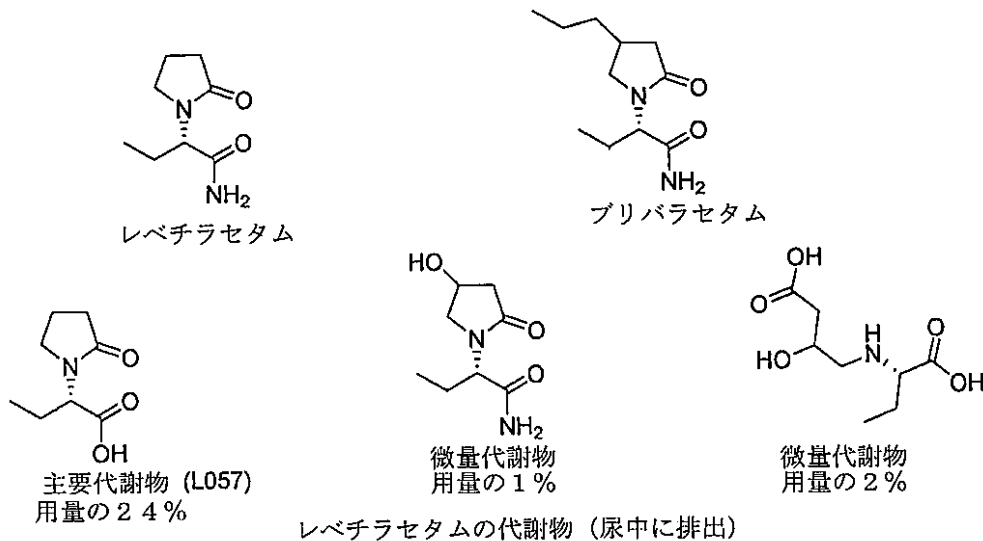
30

【0009】

[0009]レベチラセタム、その代謝物および構造的に類似な薬剤を以下に示す：

【0010】

## 【化1】



10

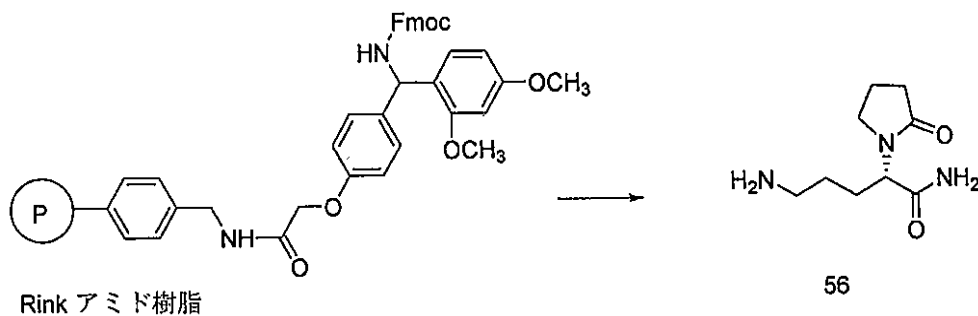
## 【0011】

[0010] Kendaらは、LEVよりもレベチラセタム結合部位に対してより高い結合アフィニティを持つ誘導体を同定する試みの中で、アルデヒド酸エステルの還元アミン化による固相合成を通じて産生される、5-アミノ-2-(2-オキソピロリジン-1-イル)ペンタン酸アミド (Kendaらによって「類似体56」とも称される)を含むLEV誘導体を記載する。記載されるように、反応は100グラムのrinkアミド樹脂および66mgの4-オキソ酪酸4-メトキシベンジルエステルを用いて、HPLCによって測定した際、65%の純度の類似体56がわずか2mgしか得られず、反応性収量は約0.1%であった。

20

## 【0012】

## 【化2】



30

## 【0013】

[0011] 類似体56は、多くの動物において、抗体産生を誘導し、そして抗体産生、結合特性および他の特性を監視するために、免疫アッセイで使用するためのLEV誘導体として有望でありうるが、免疫原性誘導体2mgをかなり超える量が必要である。同様に、対照または標準として用いられる誘導体、あるいはターゲット抗原と競合する標識誘導体を含む免疫アッセイの商業化には、商業的要求を満たすのに十分な量の誘導体(単数または複数)が必要である。したがって、薬剤発見目的には、Kendaらによって解説される固相合成法が適している可能性もあるが、該方法は、LEVに関する免疫アッセイを開発する目的のための誘導体を産生するには実用的な価値を持たない。

40

## 【発明の概要】

## 【0014】

[0012] 一般的に、本開示は、レベチラセタム(LEV)誘導体、LEV誘導体を合成するための方法、およびLEVに関する免疫診断アッセイ(immunodiagnostic assay)に関する。LEV誘導体には、作用基(operative

50

group)、例えば：抗LEV抗体を調製するのに使用可能な免疫原性部分；LEVに関する免疫診断アッセイで使用可能な抗原性部分；または免疫診断アッセイで使用可能なトレーサー部分が含まれてもよい。さらに、抗LEV抗体に関してLEVと競合させるため、免疫診断アッセイにおいて、LEV誘導体を用いてもよい。本明細書記載の合成法には、十分な特異性および感度で、LEVおよびLEV誘導体に結合可能な抗体の発展に成功する免疫プログラムに必要とされる、多量のLEV誘導体を産生するのに適したキラル選択性の液相合成工程が含まれる。

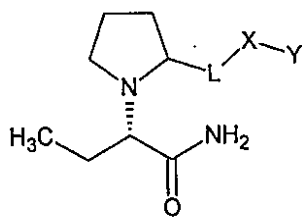
【0015】

[0013] 1つの態様において、式1または式2のLEV誘導体を含む化学組成物を開示する。

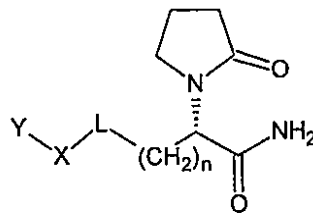
10

【0016】

【化3】



式1



式2

20

【0017】

[0014] 式2のn、ならびに式1および2のL、X、およびYは、以下のように定義される：

- a) nは、0～8の値を持つ整数であり；
- b) Lは、CH<sub>2</sub>、CO、NHCO、NHCOO、CONH、NH、O、またはS、およびその組み合わせからなる群の1つであり；
- c) Xは、末端基、芳香族基、アリール基、あるいは1～10の炭素原子および/またはヘテロ鎖原子を有する飽和、不飽和、置換、非置換、直鎖、または分枝鎖脂肪族基であって、ヘテロ鎖原子が、酸素、窒素、イオウ、またはリン、およびその組み合わせからなる群より選択される、前記脂肪族基であり；そして
- d) Yは場合により、そして存在する場合、アルコールアミン、アミド、カルボン酸、アルデヒド、エステル、イミノエステル、イソシアネート、イソチオシアネート、無水物、チオール、チオールアセトン(thiolactone)、ジアゾニウム、NHS、CO-NHS、O-NHS、マレイミドからなる群より選択される官能基の1つであり；または

30

e) YはY<sub>1</sub>-Zである、式中、Y<sub>1</sub>は、COO、CO、O、CONH、NHCO、またはNHからなる群より選択され、そしてZは作用基である。

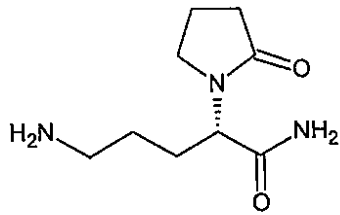
【0018】

[0015] 本明細書に提示する式2の定義には、多くのありうる化合物が含まれる。しかし、以下に示す、5-アミノ-2-(2-オキソピロリジン-1-イル)ペンタン酸アミド(式3)は、本明細書に請求する式2の化合物クラスから特に排除される。

40

【0019】

## 【化4】



式3

## 【0020】

10

[0016]方法の1つの態様において、Zの作用基は、検出可能標識、抗原性キャリアー、カップリング剤、末端基、タンパク質、リポタンパク質、糖タンパク質、ポリペプチド、多糖、核酸、ポリヌクレオチド、タイコ酸、放射性同位体、酵素、酵素断片、酵素ドナー断片、酵素アクセプター断片、酵素基質、酵素阻害剤、補酵素、蛍光部分、燐光部分、反ストークス上方制御部分、化学発光部分、発光部分、色素、増感剤、粒子、微粒子、磁気粒子、固体支持体、リポソーム、リガンド、受容体、ハプテン放射性同位体、およびその組み合わせからなる群より選択される。

## 【0021】

[0017]式1または式2のLEV誘導体を含む、特定の化学組成物例において、nは、0、1、2、または4の値を持つ整数であり、Lは、NHCOO、NH、NHCO、CH<sub>2</sub>、CO、S、またはCONHからなる群の1つであり、Xは、H、OCH<sub>2</sub>-Ph、NH、O、O-NHS、CH<sub>2</sub>-H、マレイミド-Ph、CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NHからなる群の1つであり、そしてYは場合により、そして存在する場合、Hであり、またはYは場合により、そして存在する場合、Y<sub>1</sub>-Zである、式中、Y<sub>1</sub>がCOであり、そしてZが、-NHS、-BSA、または-KLHである。

20

## 【0022】

[0018]特定の例において、式2のn、L、X、およびYまたはY<sub>1</sub>-Zは：

- a) n = 4、L = NHCOO、およびX = t-ブチル；
- b) n = 4、L = NH、およびX = H；
- c) n = 4、L = NHCO、およびX = OCH<sub>2</sub>-Ph；
- d) n = 4、L = NHCO、X = OCH<sub>2</sub>-Ph、およびY<sub>1</sub>-Z = CO-NHS；
- e) n = 4、L = NHCO、X = OCH<sub>2</sub>-Ph、およびY<sub>1</sub>-Z = CO-KLH；
- f) n = 4、L = NHCO、X = OCH<sub>2</sub>-Ph、およびY<sub>1</sub>-Z = CO-BSA；
- g) n = 4、L = CH<sub>2</sub>、X = NH、およびY<sub>1</sub>-Z = CO-BSA；
- h) n = 2、L = CO、およびX = OCH<sub>2</sub>-Ph；
- i) n = 2、L = CO、X = O、およびY = H；
- j) n = 2、L = CO、およびX = O-NHS；
- k) n = 0、L = CH<sub>2</sub>、X = CH<sub>2</sub>、およびY<sub>1</sub>-Z = CO-KLH；
- l) n = 0、L = CH<sub>2</sub>、X = CH<sub>2</sub>、およびY<sub>1</sub>-Z = CO-BSA；
- m) n = 1、L = S、およびX = CH<sub>2</sub>-Ph；
- n) n = 1、L = S、およびX = H；
- o) n = 1、L = S、X = マレイミド-Ph、およびY<sub>1</sub>-Z = CO-BSA；または
- p) n = 1、L = S、X = マレイミド-Ph、およびY<sub>1</sub>-Z = CO-KLH；

30

からなる群より選択される。

40

## 【0023】

[0019]別の特定の実施例において、式1のL、X、Y、およびY<sub>1</sub>-Zは：

- a) L = CONH、X = CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH、およびY = H；
- b) L = CONH、X = CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH、およびY<sub>1</sub>-Z = CO-KLH；または
- c) L = CONH、X = CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH、およびY<sub>1</sub>-Z = CO-BSA；

は

50

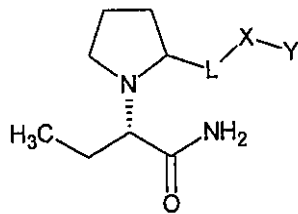
からなる群より選択される。

【0024】

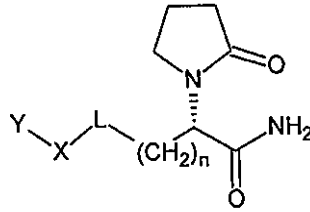
[0020]別の態様において、試料中のLEVの存在を検出するための免疫診断アッセイにおいて使用するためのキットを開示する。該キットには、式1または式2：

【0025】

【化5】



式1



式2

10

【0026】

の一方の化学構造を有するLEV誘導体；および

少なくとも1つの結合ドメインを有する抗LEV抗体であって、LEVおよび/またはLEV誘導体に結合可能な部分を有する、ここで抗体およびLEV誘導体間の相互作用は、LEVに対する抗体のアフィニティ、特異性、またはアビディティの少なくとも1つの少なくとも50%である、前記抗LEV抗体

20

が含まれる。n、L、X、およびYの定義は、化学組成物に関して上に定義したものと同じである。

【0027】

[0021]1つの態様において、LEV誘導体または抗LEV抗体は、粒子、磁気粒子、微粒子、微小球体、支持体、酵素ドナー、または酵素アクセプターの1つとカップリングしている。

【0028】

[0022]1つの態様において、キットにはさらに、以下：

- a) LEVのストック組成物；
- b) 異なる濃度のLEVを含有する一連の組成物、濃度勾配を形成する一連の組成物；
- c) トレーサー・コンジュゲートを有するLEV誘導体；
- d) 微粒子にカップリングしたLEV誘導体；
- e) 微粒子にカップリングした抗体；
- f) 酵素ドナーを有するLEV誘導体、および対応する酵素アクセプター；
- g) 酵素アクセプターを有するLEV誘導体、および対応する酵素ドナー；または
- h) ろ過または沈降による分離に適した粒子上に装填された抗体

30

の少なくとも1つが含まれる。

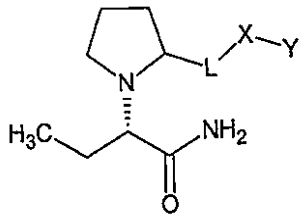
【0029】

[0023]さらに別の態様において、試料中のLEVの存在を検出するための免疫診断システムにおいて使用するための抗体組成物を開示する。該抗体組成物には、LEV誘導体を含む免疫原性組成物によって産生される抗LEV抗体であって、該LEV誘導体が、式1または式2：

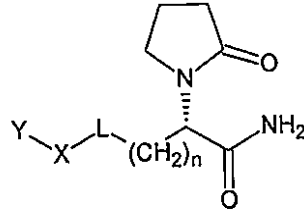
40

【0030】

## 【化6】



式1



式2

10

## 【0031】

[式中:]

a) nは、0～8の値を持つ整数であり；

b) Lは、CH<sub>2</sub>、CO、NHCO、NHCOO、CONH、NH、O、またはS、およびその組み合わせからなる群の1つであり；

c) Xは、末端基、芳香族基、アリール基、あるいは1～10の炭素原子および/またはヘテロ鎖原子を有する飽和、不飽和、置換、非置換、直鎖、または分枝鎖脂肪族基であって、ヘテロ鎖原子が、酸素、窒素、イオウ、またはリン、およびその組み合わせからなる群より選択される、前記脂肪族基であり；そして

d) YはY<sub>1</sub>-Zである、式中、Y<sub>1</sub>は、COO、CO、O、CONH、NHCO、またはNHからなる群より選択され、そしてZは作用基である]

20

の化学構造を有する、前記抗LEV抗体が含まれる。

## 【0032】

[0024] 1つの態様において、LEVに比較したLEV誘導体に対する抗体のアフィニティ、特異性、またはアビディティの少なくとも1つは、均一または不均一免疫診断アッセイで使用するのに十分である。1つの態様において、抗体およびLEV誘導体間の相互作用は、LEVに対する抗体のアフィニティ、特異性、またはアビディティの少なくとも1つの少なくとも50%、少なくとも70%、または少なくとも90%である。

## 【0033】

[0025] 1つの態様において、免疫原性部分は、タンパク質、ポリペプチド、糖タンパク質、多糖、粒子、微粒子、核酸、ポリヌクレオチド、およびその組み合わせからなる群より選択される。別の態様において、免疫原性部分は、ウシ血清アルブミン(BSA)、キーホールリンペット(keyhole limpet)・ヘモシアニン(KLH)、卵オボアルブミン、ウシ・ガンマ-グロブリン(BGG)、およびその組み合わせからなる群より選択されるタンパク質である。

30

## 【0034】

[0026] 1つの態様において、抗体はモノクローナル抗体である。別の態様において、抗体はポリクローナル抗体である。

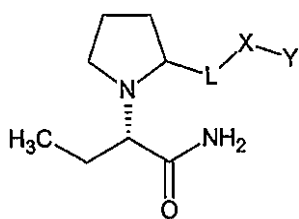
[0027] 抗LEV抗体は：

a) 式1または式2：

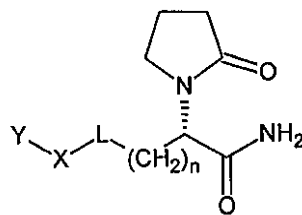
40

## 【0035】

## 【化7】



式1



式2

50

## 【 0 0 3 6 】

の化学構造を有する L E V 誘導体を含む免疫原性組成物の少なくとも第一の用量を、抗体を産生する被験体に投与し；

b) 抗体を産生する被験体から抗体を収集し；そして

c) 抗体を産生する被験体から収集した抗体を精製し、および/またはスクリーニングする；

工程を含む方法によって産生可能である。

## 【 0 0 3 7 】

[0028] 1つの態様において、抗 L E V 抗体を産生するための方法には、抗体を産生する被験体から抗体を収集する前に、少なくとも第二の用量の免疫原性組成物を、抗体を産生する被験体に投与する工程がさらに含まれる。

## 【 0 0 3 8 】

[0029] 1つの態様において、収集工程には、血液、血清、血漿、または他の生物学的試料の少なくとも1つを、抗体を産生する被験体から得る工程が含まれる。

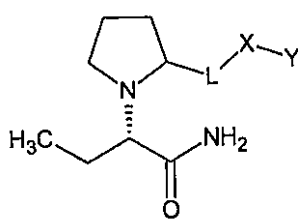
[0030] 1つの態様において、スクリーニング工程には、E L I S A アッセイが含まれる。

## 【 0 0 3 9 】

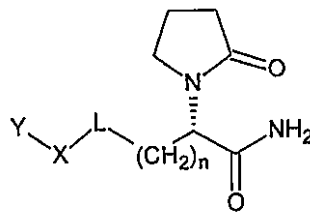
[0031] さらに別の態様において、本発明には、式1または式2のレベチラセタム ( L E V ) 誘導体を合成するための液相合成法が含まれる。

## 【 0 0 4 0 】

## 【 化 8 】



式1



式2

## 【 0 0 4 1 】

[0032] 該方法には、(1) 保護されたアミノ酸出発物質を提供し、そして(2) 保護されたアミノ酸出発物質を修飾して、式1または式2の L E V 誘導体を生じる工程が含まれる。式2の n、ならびに式1および式2の L、X、および Y は、以下のように定義される：

a) n は、0 ~ 8 の値を持つ整数であり；

b) L は、C H <sub>2</sub>、C O、N H C O、N H C O O、C O N H、N H、または S、およびその組み合わせからなる群の1つであり；

c) X は、末端基、芳香族基、アリール基、あるいは1 ~ 10の炭素原子および/またはヘテロ鎖原子を有する飽和、不飽和、置換、非置換、直鎖、または分枝鎖脂肪族基であって、ヘテロ鎖原子が、酸素、窒素、イオウ、またはリン、およびその組み合わせからなる群より選択される、前記脂肪族基であり；そして

d) Y は場合により、そして存在する場合、アルコールアミン、アミド、カルボン酸、アルデヒド、エステル、イミノエステル、イソシアネート、イソチオシアネート、無水物、チオール、チオールアセトン、ジアゾニウム、N H S、C O - N H S、O - N H S、マレイミドからなる群より選択される官能基の1つであり；または

e) Y は場合により、そして存在する場合、Y<sub>1</sub> - Z である、式中、Y<sub>1</sub> は、C O O、C O、O、C O N H、N H C O、または N H からなる群より選択され、そして Z は作用基である。

## 【 0 0 4 2 】

[0033] 保護されたアミノ酸出発物質の適切な例には、側鎖上に誘導体化可能な官能基を有する天然および非天然アミノ酸の保護された誘導体が含まれる。本明細書に記載する方法において、LEV誘導体を作製するために誘導体化可能な側鎖官能基を有する天然存在アミノ酸の例示的な例には、限定されるわけではないが、アルギニン、ヒスチジン、リジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、システイン、フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンの保護された誘導体が含まれる。1つの態様において、保護されたアミノ酸誘導体には、出発物質、中間体、および生成物を監視するのに使用可能な追跡可能な部分、例えば限定されるわけではないが、蛍光部分が含まれる。

【0043】

10

[0034] 保護されたアミノ酸出発物質の特定の例には、H-Lys(Boc)-NH<sub>2</sub>、H-Lys(Boc)-OMe、H-Lys(Z)-OtBu、H-Glu(OBzl)-OtBu、H-Cys(Bzl)-OMe、FMOC-Pro-OH、およびBoc-Pro-OHが含まれる。好ましくは、式2の化合物の合成のための、保護されたアミノ酸出発物質は、H-Lys(Z)-OtBu、H-Glu(OBzl)-OtBu、およびH-Cys(Bzl)-OMeからなる群より選択される。好ましくは、式1の化合物の合成のための、保護されたアミノ酸出発物質は、FMOC-Pro-OHおよびBoc-Pro-OHからなる群より選択される。

【0044】

[0035] 1つの態様において、式1または式2のレベチラセタム(LEV)誘導体に関する合成収率は、約10%~約40%の範囲である。別の態様において、式1または式2のLEV誘導体に関する合成収率は、約5%~約25%の範囲である。さらに別の態様において、式1または式2のLEV誘導体に関する収率は、約1%~約10%の範囲である。本明細書において、用語「合成収率」は、反応工程における生成物の収率(すなわち生成物/出発物質)、または多工程合成における各工程由来の合成収率の積を指す。すなわち、3工程合成反応の合成収率は、以下のように定義される: 合成収率 = 工程1収率% × 工程2収率% × 工程3収率%。類似の方法を用いて、より多いまたはより少ない工程を有する合成スキームに関する合成収率を計算してもよい。

20

【0045】

[0036] 本明細書記載の合成反応は、液相で行われるため、出発物質、中間体、および生成物を追跡可能であることが重要である。こうしたものとして、本明細書記載の方法には、追跡可能部分を用いて、出発物質、合成中間体、あるいは式1または式2のLEV誘導体の少なくとも1つの合成を監視する工程がさらに含まれる。1つの態様において、追跡可能物質には、蛍光部分が含まれる。

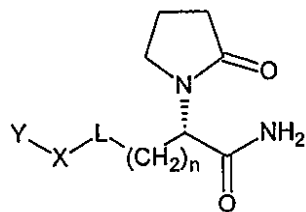
30

【0046】

[0037] さらにさらなる別の態様において、本発明には、式2のレベチラセタム(LEV)誘導体を合成するための液相合成法が含まれる。

【0047】

【化9】



40

式2

【0048】

[0038] 該方法には、(1) 保護されたアミノ酸出発物質を提供し、そして保護されたアミノ酸出発物質を修飾して、式2のLEV誘導体を生じる工程が含まれる。式2のn、L

50

、X、およびYは、以下のように定義される：

a) nは、0～8の値を持つ整数であり；

b) Lは、 $\text{CH}_2$ 、CO、NHCO、NHCOO、NH、またはS、およびその組み合わせからなる群の1つであり；

c) Xは、末端基、芳香族基、アリール基、あるいは1～10の炭素原子および/またはヘテロ鎖原子を有する飽和、不飽和、置換、非置換、直鎖、または分枝鎖脂肪族基であって、ヘテロ鎖原子が、酸素、窒素、イオウ、またはリン、およびその組み合わせからなる群より選択される、前記脂肪族基であり；そして

d) Yは場合により、そして存在する場合、アルコールアミン、アミド、カルボン酸、アルデヒド、エステル、イミノエステル、イソシアネート、イソチオシアネート、無水物、チオール、チオールアセトン、ジアゾニウム、NHS、CO-NHS、O-NHS、マレイミドからなる群より選択される官能基の1つであり；または

e) Yは $Y_1-Z$ である、式中、 $Y_1$ は、COO、CO、O、CONH、NHCO、またはNHからなる群より選択され、そしてZは作用基である。

【0049】

[0039] 1つの態様において、式2の化合物を合成するための方法には、さらに、(1) 保護されたアミノ酸出発物質の単一の立体異性体を提供し、ここで、保護されたアミノ酸出発物質の単一の立体異性体は、アミン官能基を含む少なくとも1つの立体中心周囲に選択された立体化学配向を有する、(2) アルキル化剤を用いて、保護されたアミノ酸出発物質上のアミン官能基にアルキル基を付加して、そして(3) アルキル基の少なくとも一部を環化して、LEV誘導体の単一の立体異性体を産生する、ここで、LEV誘導体の単一の立体異性体は、保護されたアミノ酸出発物質における立体化学配向と同じ、少なくとも1つの共有結合周囲の選択された立体化学配向を有する、工程が含まれる。

【0050】

[0040] 1つの態様において、アルキル化剤は、4-置換ブチレート誘導体であり、ここで、誘導体化基は、電子吸引力/脱離基であり、ブチレートを求核攻撃に感受性にする。4-置換ブチレート誘導体の適切な例には、限定されるわけではないが、ハロブチレート、例えば4-フルオロ酪酸エチル、4-クロロ酪酸エチル、4-プロモ酪酸エチル、および4-ヨード酪酸エチルが含まれる。

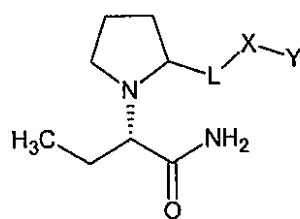
【0051】

[0041] さらにさらなる別の態様において、本発明には、あらかじめLEVを投与されている被験体から得られる試料中のLEVの存在を検出するための免疫診断アッセイを行う方法が含まれる。該方法には：

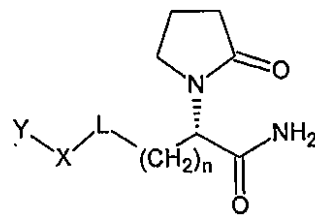
a) 抗LEV抗体およびLEV誘導体を試料と合わせて、第一の組成物を形成し、前記抗体はLEVおよびLEV誘導体と結合可能であり、ここで、抗体およびLEV誘導体間の相互作用は、LEVに対する抗体のアフィニティ、特異性、またはアビディティの少なくとも1つの少なくとも50%であり、そしてLEV誘導体は、式1または式2：

【0052】

【化10】



式1



式2

【0053】

の1つの化学構造を有する；

b) 試料由来の任意の未結合LEVおよびLEV誘導体が、抗体との結合に関して競合

するのを可能にし；そして

c) L E V 誘導体および抗体間の結合を検出する；  
工程が含まれる。

【 0 0 5 4 】

[0042] 1つの態様において、L E Vをあらかじめ投与された被験体から得られる試料中のL E Vの存在を検出するための免疫診断アッセイを実行する方法には、さらに：

a) L E V 誘導体を得て、前記L E V 誘導体には蛍光部分が含まれ；  
b) 第一の量の偏光を有する偏光を用いて蛍光コンジュゲートを励起させ；  
c) 第二の量の偏光を有する蛍光コンジュゲートから放出される偏光を検出し；  
d) 第一の量の偏光と第二の量の偏光を比較し；そして  
e) L E V が試料中に存在するかどうかを決定する、ここで、第二の量の偏光が第一の量の偏光と異なるならば、L E V が試料中に存在する指標となる；  
工程が含まれる。

10

【 0 0 5 5 】

[0043] 上記方法にはさらに：

a) 既知の量のL E VとL E V 誘導体および抗体を合わせて、対照結合組成物を形成し；  
b) 第三の量の偏光を有する対照結合組成物中の蛍光コンジュゲートから放出される偏光を検出し；  
c) 第三の量の偏光と第二の量の偏光を比較して；そして  
d) 試料中に存在するL E Vの量を決定する；

20

工程が含まれる。

【 0 0 5 6 】

[0044] 別の態様において、あらかじめL E Vを投与されている被験体から得られる試料中のL E Vの存在を検出するための免疫診断アッセイを実行する方法には、さらに：

a) L E V 誘導体および抗体を得て、ここで、L E V 誘導体および抗体の一方は、微粒子にカップリングしている；  
b) 第一の組成物に入射光を照射し；  
c) 第一の組成物から透過される光の第一の強度を検出し；  
d) L E V 誘導体および抗体を有し、そして遊離L E Vを持たない対照結合組成物から透過される光の最低限の強度を同定し；  
e) 透過光の最小限の強度と透過光の第一の強度を比較し；そして  
f) L E V が試料中に存在するかどうかを決定する、ここで、最小限の強度と第一の強度が異なるならば、L E V が試料中に存在する指標となる；  
工程が含まれる。

30

【 0 0 5 7 】

[0045] 上記方法にはさらに：

a) 既知の量のL E VとL E V 誘導体および抗体を合わせて、対照結合組成物を形成し；  
b) 対照結合組成物に入射光を照射し；  
c) 対照結合組成物から透過される光の第二の強度を検出し；そして  
d) 試料中に存在するL E Vの量を決定する、ここで、第一の強度および第二の強度間の比較が、試料中に存在するL E Vの量の指標となる；  
工程が含まれる。

40

【 0 0 5 8 】

[0046] さらに別の態様において、あらかじめL E Vを投与されている被験体から得られる試料中のL E Vの存在を検出するための免疫診断アッセイを実行する方法には、さらに：

a) L E V 誘導体を得て、ここで、L E V 誘導体には酵素ドナーが含まれる；  
b) 第一の組成物と酵素アクセプターを合わせ；

50

c) 基質と第一の組成物を合わせ、ここで、基質は、酵素ドナーおよび酵素アクセプターと相互作用することによって切断可能であり；そして

d) 酵素活性を検出する；

工程が含まれる。

【0059】

[0047]上記方法にはさらに：

a) 既知の量のLEVとLEV誘導体および抗体を合わせて、対照結合組成物を形成し；

b) 酵素アクセプターと対照結合組成物を合わせ；

c) 基質と対照結合組成物を合わせ、ここで、基質は、酵素ドナーおよび酵素アクセプターと相互作用することによって切断可能である；

d) 対照酵素活性を検出し；そして

e) 試料中に存在するLEVの量を決定する、ここで、酵素活性および対照酵素活性間の比較は、試料中に存在するLEVの量の指標となる；

工程が含まれる。

【0060】

[0048]さらにさらなる別の態様において、あらかじめLEVを投与されている被験体から得られる試料中のLEVの存在を検出するための免疫診断アッセイを実行する方法には、さらに：

a) LEV誘導体を得て、ここで、LEV誘導体にはトレーサー部分が含まれる；

b) 抗体を競合結合組成物から分離し；

c) 未結合LEV誘導体を抗体から分離させ；そして

d) 抗体と結合した類似体のトレーサー部分を検出する；

工程が含まれる。

【0061】

[0049]上記方法には、さらに：

a) 既知の量のLEVとLEV誘導体および抗体を合わせて、対照結合組成物を形成し；

b) 抗体を対照結合組成物から分離し；

c) 競合結合組成物由来の抗体と結合したトレーサー・コンジュゲートの第一の量を検出し；

d) 対照結合組成物由来の抗体と結合したトレーサー・コンジュゲートの第二の量を検出し；そして

e) 試料中に存在するLEVの量を決定する、ここで、第一の量のトレーサー・コンジュゲートおよび第二の量のトレーサー・コンジュゲート間の比較は、試料中に存在するLEVの量の指標となる；

工程が含まれる。

【0062】

[0050]本発明のこれらのおよび他の目的および特徴は、以下の説明および付随する特許請求の範囲からより詳細に明らかになるであろうし、または以下に示すように、本発明の実施によって学習されうる。

【発明を実施するための形態】

【0063】

I. 序論

[0051]一般的に、本発明は、レベチラセタム(LEV)誘導体、LEV誘導体を合成するための方法、およびLEVに関する免疫診断アッセイに関する。LEV誘導体には、作用基、例えば：抗LEV抗体を調製するのに使用可能な免疫原性部分；LEVに関する免疫診断アッセイで使用可能な抗原性部分；または免疫診断アッセイで使用可能なトレーサー部分が含まれてもよい。さらに、免疫診断アッセイにおいて、抗LEV抗体に関してLEVと競合させるため、LEV誘導体を用いてもよい。本明細書記載の合成法には、十分

10

20

30

40

50

な特異性および感度で、LEVおよび/またはLEV誘導体に結合可能な抗体の発展に成功する免疫プログラムに必要とされる、多量のLEV誘導体を産生するのに適したキラル選択性の液相合成工程が含まれる。

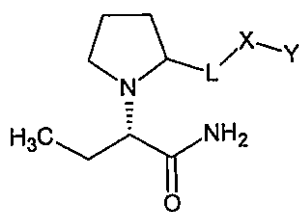
【0064】

II. レベチラセタム誘導体

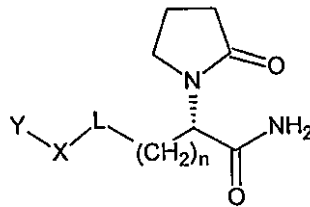
[0052]本発明の1つの態様において、式1または式2に基づく構造を有するLEV誘導体が提供される。

【0065】

【化11】



式1



式2

10

【0066】

[0053]式1および/または式2の前述の化学構造は、それにコンジュゲート化された多様な部分を含んでもよい骨格である。こうしたものとして、骨格はさらに、以下によって定義可能である：

20

(a) nは、0～8の値を持つ整数であり；

(b) Lは、CH<sub>2</sub>、CO、NHCO、NHCOO、CONH、NH、O、またはS、およびその組み合わせからなる群の1つであり；

(c) Xは、末端基（例えばH）、芳香族基、アリール基、あるいは1～10の炭素原子および/またはヘテロ鎖原子を有する飽和、不飽和、置換、非置換、直鎖、または分枝鎖脂肪族基であって、ヘテロ鎖原子が、酸素、窒素、イオウ、またはリン、およびその組み合わせからなる群より選択される、前記脂肪族基であり；そして

(d) Yは場合により、そして存在する場合、アルコールアミン、アミド、カルボン酸、アルデヒド、エステル、イミノエステル、イソシアネート、イソチオシアネート、無水物、チオール、チオールアセトン、ジアゾニウム、NHS、CO-NHS、O-NHS、マレイミドからなる群より選択される官能基の1つであり；または

30

(e) YはY<sub>1</sub>-Zである、式中、Y<sub>1</sub>は、COO、CO、O、CONH、NHCO、またはNHからなる群より選択され、そしてZは作用基である。

【0067】

[0054]芳香族およびアリールX基の適切な例には、限定されるわけではないが、ベンゼン、フェニル、ベンジル、トルエン、トルイル、キシレン等が含まれる。芳香族基にはまた、ピリジン、フラン、テトラヒドロフラン等のヘテロ芳香族であるためのヘテロ原子も含まれてもよい。また、芳香族は、多環芳香族、例えばナフタレン、アントラセン、フェナントレン、多環芳香族炭化水素、インドール、キノリン、イソキノリン等であってもよい。用語「アリール」には、6～14炭素原子を持つ芳香族環系が含まれ、芳香族環系には、少なくとも1つの環が芳香族である6～14の環原子を有する1またはそれより多い環が含まれる。C<sub>6-14</sub>アリール基の例には、フェニル(C<sub>6</sub>)、インデニル(C<sub>9</sub>)、ナフチル(C<sub>10</sub>)、フルオレニル(C<sub>13</sub>)、アントラシル(C<sub>14</sub>)、およびフェナントリル(C<sub>14</sub>)が含まれる。上述のアリール基において、別に言及しない限り、1またはそれより多い水素原子が、場合によって他の置換基によって置換されていてもよい。例えば、アリール基は、以下の置換基によって置換されていてもよい：OH；NO<sub>2</sub>；CN；NH<sub>2</sub>；ハロゲン、例えばフッ素または塩素；場合によって置換されたC<sub>1-10</sub>アルキル、例えばメチル、エチル、またはプロピル；場合によって置換された-O-C<sub>1-</sub>

40

50

<sub>3</sub> アルキル、例えば - OMe、- OEt、- COOH、- COO - C<sub>1-4</sub> アルキル、例えば - COOMe または - COOEt、または - CONH<sub>2</sub>。

【0068】

[0055] 脂肪族 X 基の適切な例には、限定されるわけではないが、CH<sub>2</sub>; (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>; (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>; (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>; (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>; (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>; COCH<sub>2</sub>; CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>; CO(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>; CO(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>; CO(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>; CO(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>; CH<sub>2</sub>NH、(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH、(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH、(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH、(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>NH、(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH、マレイミド - Ph、t - ブチル、Ph、OCH<sub>2</sub> - Ph、NH、CH<sub>2</sub> - Ph、その組み合わせ等が含まれる。

【0069】

[0056] Y<sub>1</sub> - Z における Z の適切な例には、限定されるわけではないが、検出可能標識、抗原性キャリアー、あるいはタンパク質、酵素、酵素断片、蛍光化合物、化学発光物質、電気化学仲介因子、粒子、レポーター基、酵素阻害剤、および/または核酸からなる群より選択される末端基が含まれる。

【0070】

[0057] 1 つの例示的实施例において、Z 作用基の適切な例には、限定されるわけではないが、作用基が、検出可能標識、抗原性キャリアー、カップリング剤（例えば、NHS、CO - NHS、O - NHS、マレイミド等）、末端基、タンパク質、リポタンパク質、糖タンパク質、ポリペプチド、多糖、核酸、ポリヌクレオチド、タイコ酸、放射性同位体、酵素、酵素断片、酵素ドナー断片、酵素アクセプター断片、酵素基質、酵素阻害剤、補酵素、蛍光部分、燐光部分、反ストークス上方制御部分、化学発光部分、発光部分、色素、増感剤、粒子、微粒子、磁気粒子、固体支持体、リポソーム、リガンド、受容体、ハプテン放射性同位体、およびその組み合わせからなる群より選択される、請求項 11 の方法が含まれる。別の例示的な例において、Z は、以下のコンジュゲート基のいずれであってもよい：(a) BSA；(b) KLH；(c) 蛍光トレーサー；および (d) その他。

【0071】

[0058] 以下に示す表 1 および 2 は、いくつかの特定の LEV 誘導体および対応する L、X、Y、および Y<sub>1</sub> - Z 基を例示する。多くの LEV 誘導体に関する合成収率もまた示す。

【0072】

表 1：式 2 の LEV 誘導体

【0073】

10

20

30

【表 1】

LEV 誘導体	n	L	X	Y	Y <sub>1</sub> -Z	収率
2	4	NHCOO	t-ブチル	--	--	
3	4	NH	H	--	--	~5-26%
15	4	NHCO	OCH <sub>2</sub> -Ph	--	--	~10-38%
17	4	NHCO	OCH <sub>2</sub> -Ph	CO- NHS	--	~1-10%
18a	4	NHCO	OCH <sub>2</sub> -Ph	--	CO- KLH	
18b	4	NHCO	OCH <sub>2</sub> -Ph	--	CO- BSA	
19	4	CH <sub>2</sub>	NH	--	CO- BSA	
24	2	CO	OCH <sub>2</sub> -Ph	--	--	~7-26%
25	2	CO	O	H	--	~3.5-18.5%
26	2	CO	O-NHS	--	--	~2-13%
27	0	CH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub>	--	CO- KLH	
28	0	CH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub>	--	CO- BSA	
33	1	S	CH <sub>2</sub> -Ph	--	--	~9-26%
34	1	S	H	--	--	~4.5-19%
37	1	S	マレイミド- Ph	--	CO- BSA	
38	1	S	マレイミド- Ph	--	CO- KLH	

10

20

【0074】

表 2 : 式 1 の L E V 誘導体

30

【0075】

【表 2】

LEV 誘導体	L	X	Y	Y <sub>1</sub> -Z	収率
43	CONH	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH	H	--	~8-18%
44	CONH	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH	--	CO-KLH	
45	CONH	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH	--	CO-BSA	

【0076】

表 1 および 2 中の各 L E V 誘導体の構造を以下のセクションに示す。さらに、L E V 誘導体の合成スキームを以下のセクションに示し、そして付随する実施例に詳細に論じる。

III. 式 2 の L E V 誘導体

[0059] 式 2 に基づく誘導体を合成するためのいくつかのスキームを設計した。一般的に、出発物質が商業的に入手可能であり、そして各工程での反応生成物の検出を介して、反応進行を監視可能であれば、合成は容易になる。任意の適切な手段によって反応生成物の検出を実行してもよく、蛍光部分、例えば紫外光感受性発色団を介した検出などの迅速法が好ましい。例えば、反応物および生成物を高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) または薄層クロマトグラフィー (TLC) によって分離してもよく、そして反応物、中間体、および生成物の 1 またはそれより多くに付着する発色団などの検出可能標識を用いて

40

50

、反応物、中間体、および生成物の存在を監視してもよい。

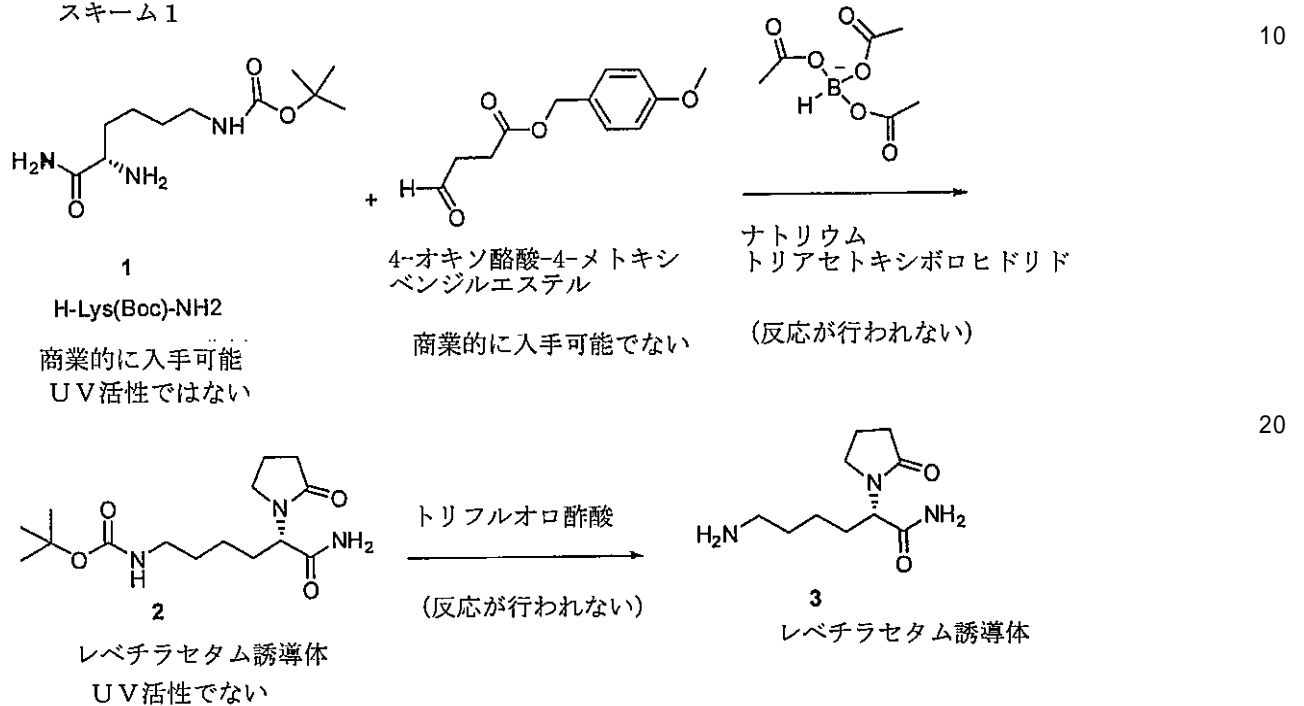
【0077】

[0060]以下に示すスキーム1は、既知の合成法に基づき、そして商業的に入手可能な出発物質、H-Lys(Boc)-NH<sub>2</sub>を利用する。しかし、4-オキシ酪酸は、容易に入手可能ではなく、そして入手可能であったとしても、出発物質または生成物上に検出可能部分、例えば発色団がなく、反応の監視が困難である：

【0078】

【化12】

スキーム1



【0079】

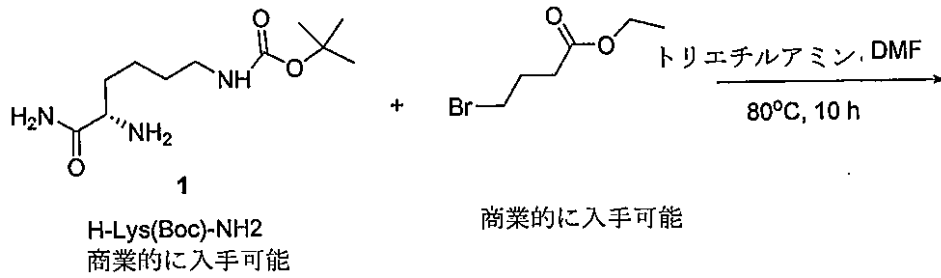
[0061]スキーム2および2'は、商業的に入手可能な出発物質H-Lys(Boc)-NH<sub>2</sub>を用いる、2つの新規合成経路に基づく。しかし、出発物質または生成物上に発色団がないことから、単離、精製および性質決定が困難であったため、環化生成物は単離されなかった。同様に、反応進行を監視するために、TLC、HPLCおよびLC/MSなどの分析技術は有用ではない。染色技術(ヨウ素、アニスアルデヒド、リン酸)は、比較用の参照生成物が入手可能でないため、信頼性がない。さらに、反応性末端アミド-CO-NH<sub>2</sub>は、環化反応に干渉する可能性があった。

【0080】

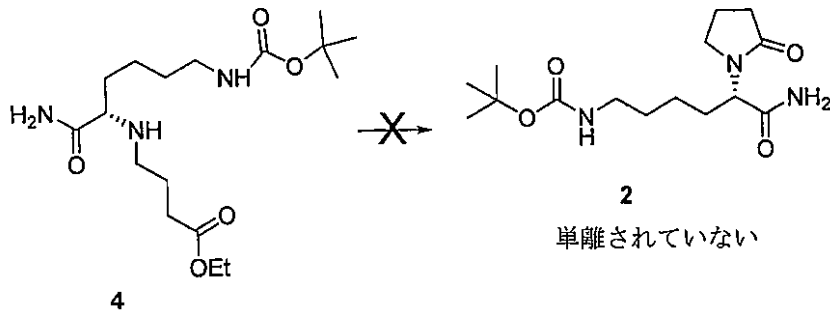
30

## 【化13】

スキーム2

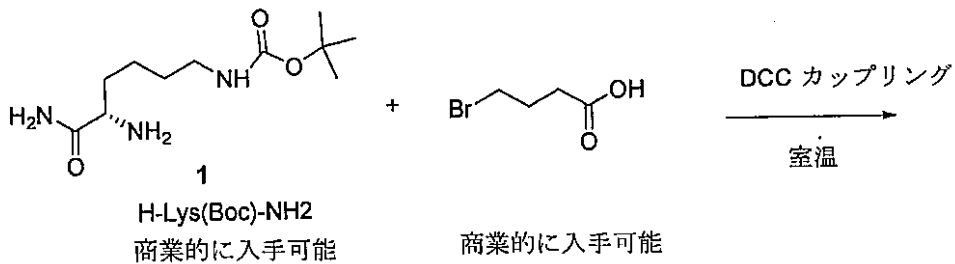


10

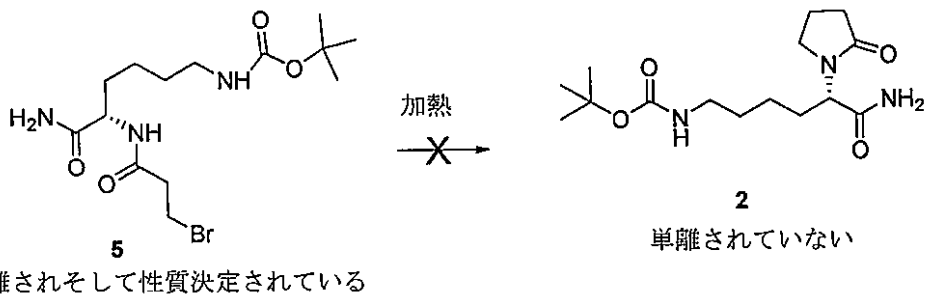


20

スキーム2'



30



## 【0081】

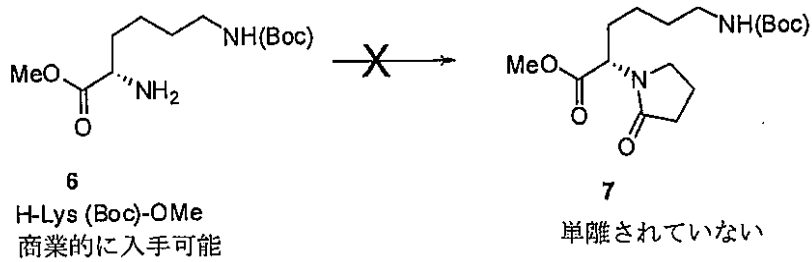
40

[0062]以下に示す、スキーム3のための出発物質として、H-Lys(Boc)-OMeを用いる。唯一の反応基、NH<sub>2</sub>は誘導体化されるが、検出可能発色団がないため、環化生成物は単離が困難である。

## 【0082】

## 【化14】

スキーム3



10

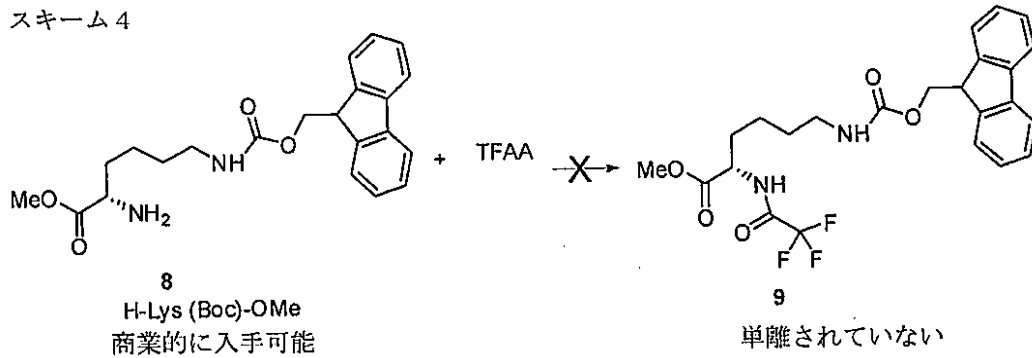
## 【0083】

[0063]スキーム4は、UV検出可能部分、FMOCを含有する、商業的に入手可能な出発物質、H-Lys(FMOC)-OMeを利用する。しかし、FMOC部分は不安定であり、そして溶液に塩基を添加すると除去される。環化生成物は単離されなかった。

## 【0084】

## 【化15】

スキーム4



20

## 【0085】

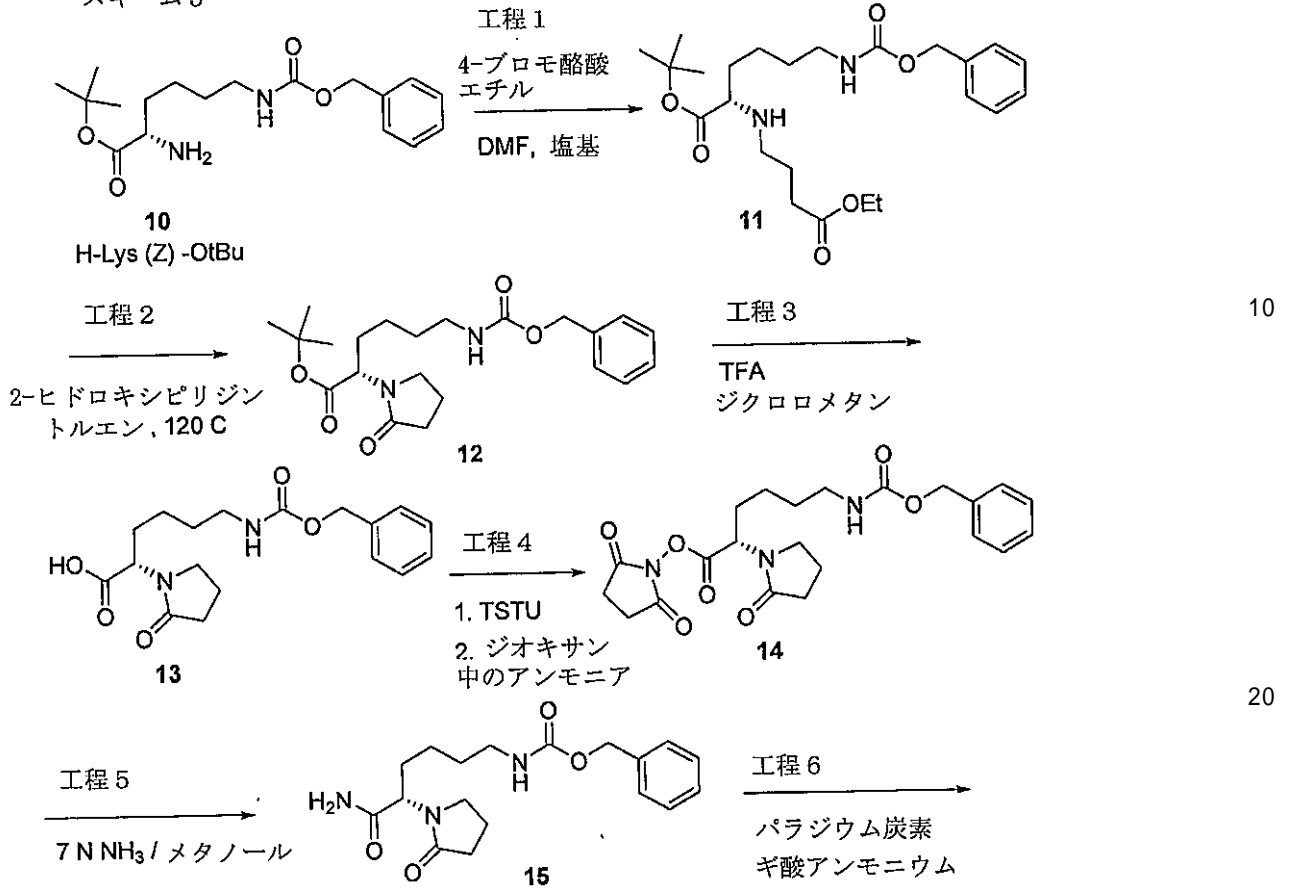
[0064]スキーム5は、UV検出可能部分を含有する、商業的に入手可能な出発物質、H-Lys(Z)-OtBuを利用する。TLCまたはHPLCを介してアルキル化および環化反応を監視する。カラムクロマトグラフィーを介して、精製および単離を達成する。環化化学反応は、反応基(アルファアミン)および化学的に安定な保護基(ベンジル)によって容易となる。

30

## 【0086】

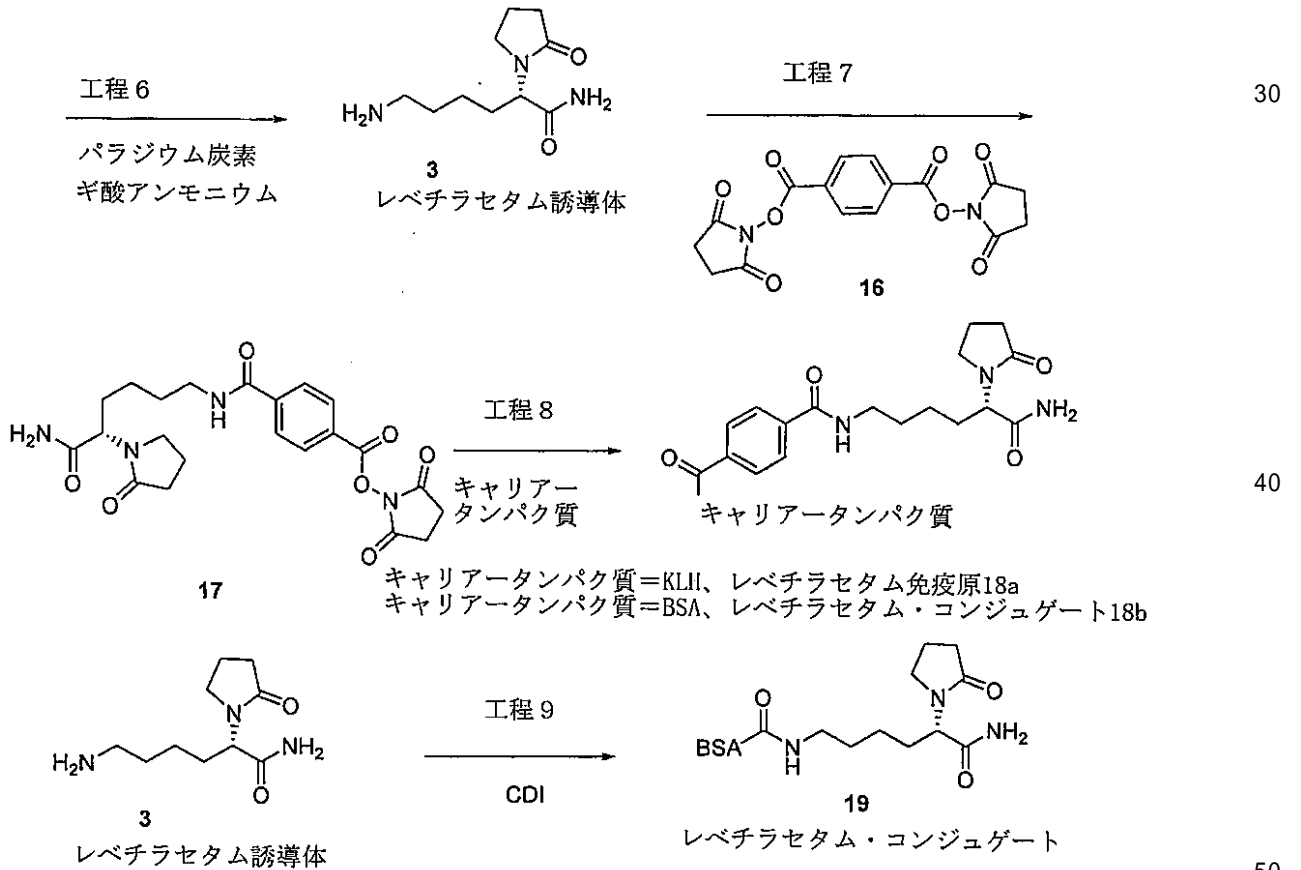
【化16】

スキーム5



【0087】

【化17】



10

20

30

40

50

## 【 0 0 8 8 】

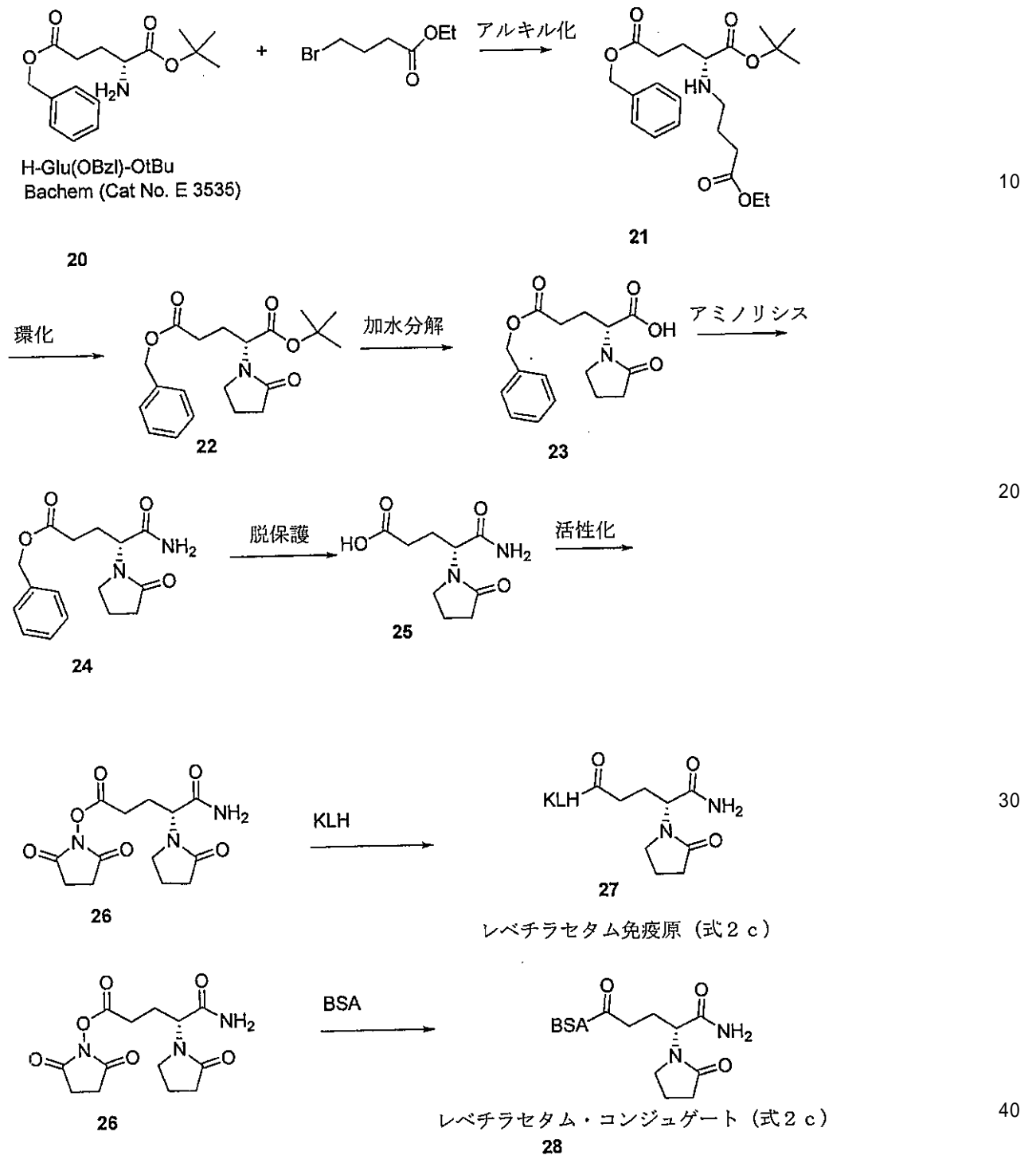
[0065]化合物 18 a を免疫原として用いて、商業的 L E V イムノアッセイのため、望ましい特異性、感受性および交差反応性を持つ適切な抗体を産生した。

[0066]スキーム 6 は、商業的に入手可能な U V 検出可能出発物質、H - G l u ( O b z l ) - O t B u を利用する。T L C または H P L C を介して、アルキル化および環化反応を監視する。カラムクロマトグラフィーを介して、生成物の精製および単離を実行する。環化化学反応は、反応性アルファアミン基および化学的に安定な保護ベンジル基によって容易となる。スキーム 6 は、免疫原性誘導体を含む L E V 誘導体を産生するため、スキーム 5 に対する適切な代替物である。

## 【 0 0 8 9 】

## 【化18】

## スキーム6



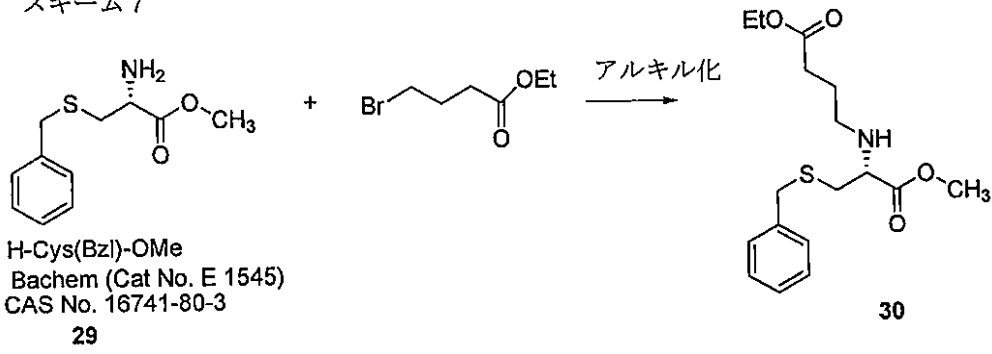
## 【0090】

[0067]スキーム7は、検出可能な発色団を含有する、商業的に入手可能な物質、H-Cys(Bzl)-OMeを使用する。スキーム7は、免疫原性誘導体を含むLEV誘導体を産生するため、スキーム5に対する有用な代替物として働く。

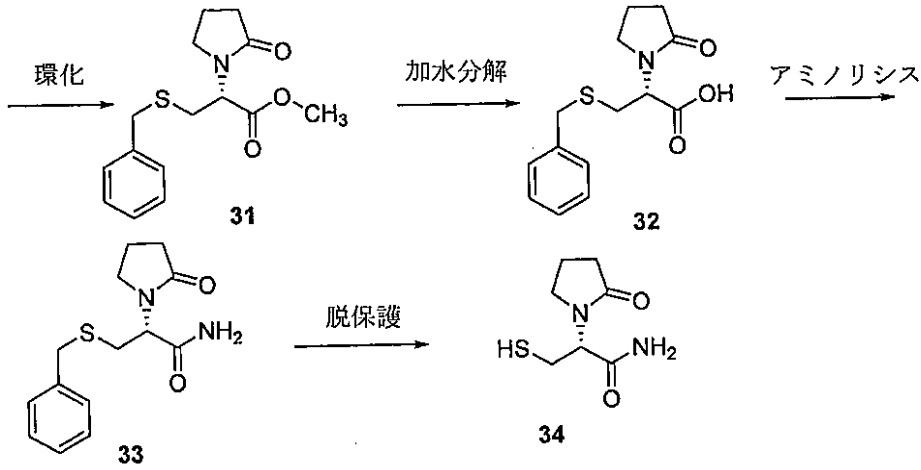
## 【0091】

【化19】

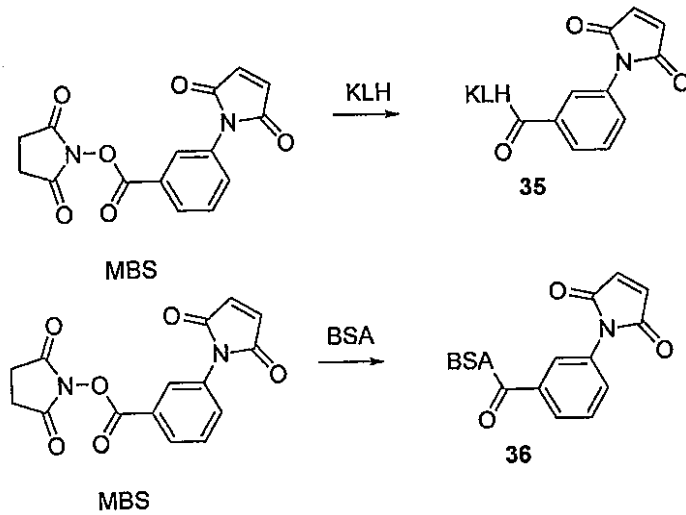
スキーム7



10



20

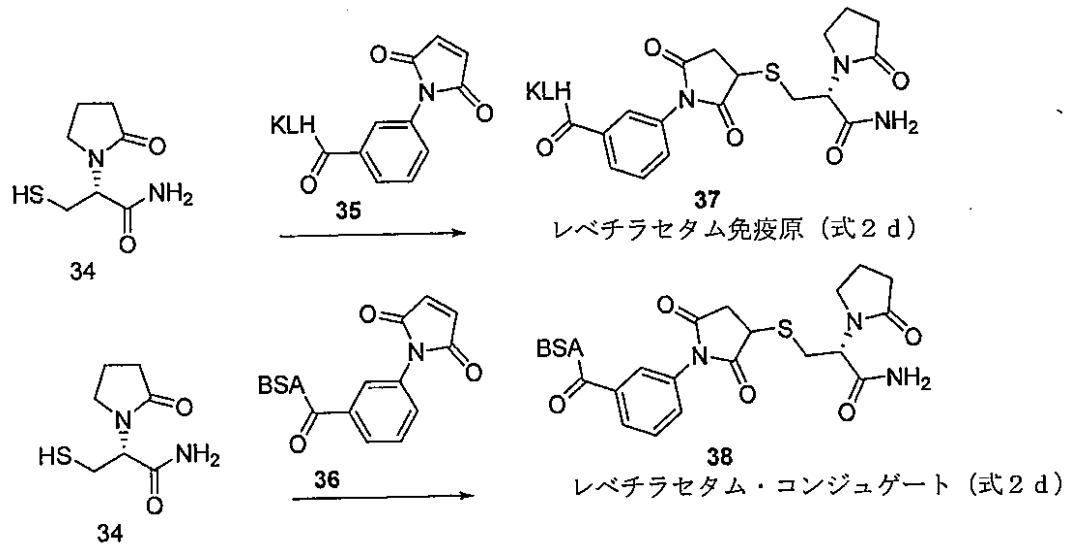


30

【0092】

40

【化20】



10

【0093】

I V . 式 1 の L E V 誘 導 体

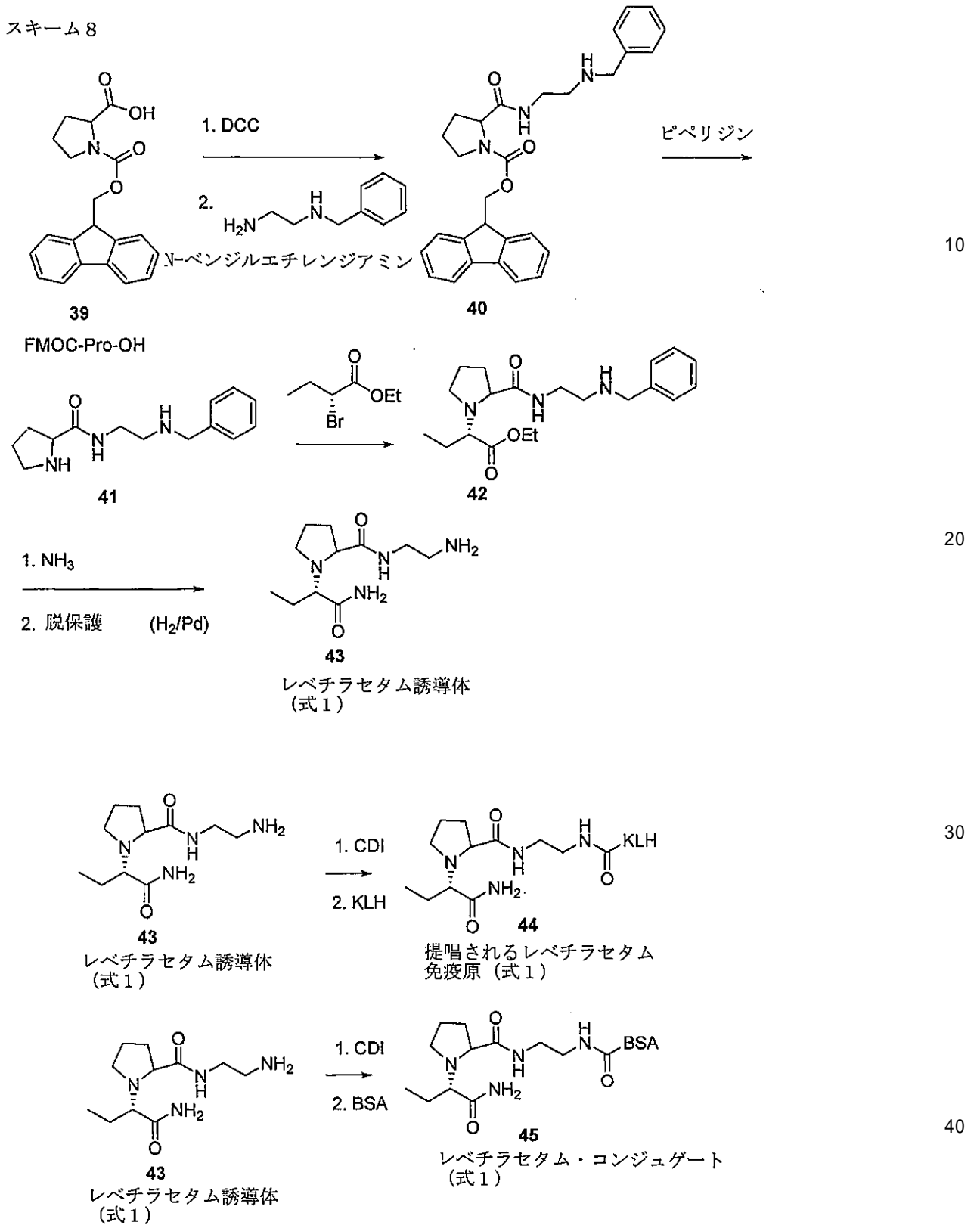
[0068]式1にしたがって、LEVの他の誘導体を作製してもよい。式1にしたがって適切な量の誘導体を産生する1つの方法を以下のスキーム8に示す。商業的に入手可能な出発物質は、FMOC-Pro-OHである。スキーム4におけるのと同様に、FMOC部分は不安定であり、そして保護基として最適には機能しない可能性もある。

20

【0094】

## 【化 2 1】

スキーム 8



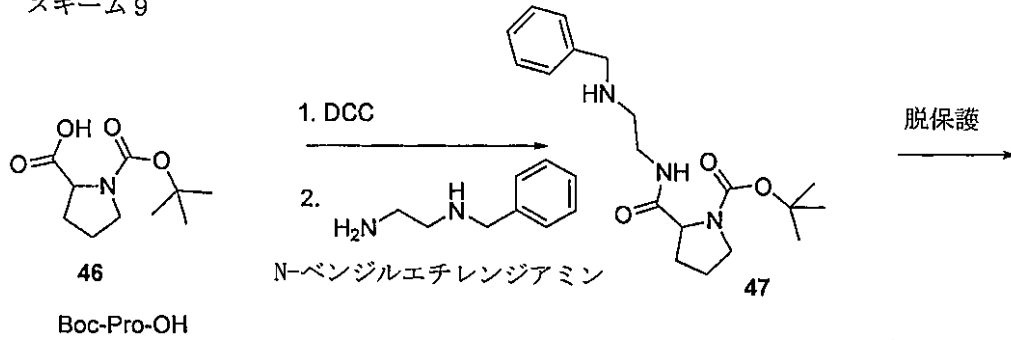
## 【 0 0 9 5】

[0069]スキーム 9 は、商業的に入手可能な UV 検出可能出発物質、Z-Pro-OH を使用する。ベンジル保護基は安定であり、そしてルーチンの有機合成に適している。

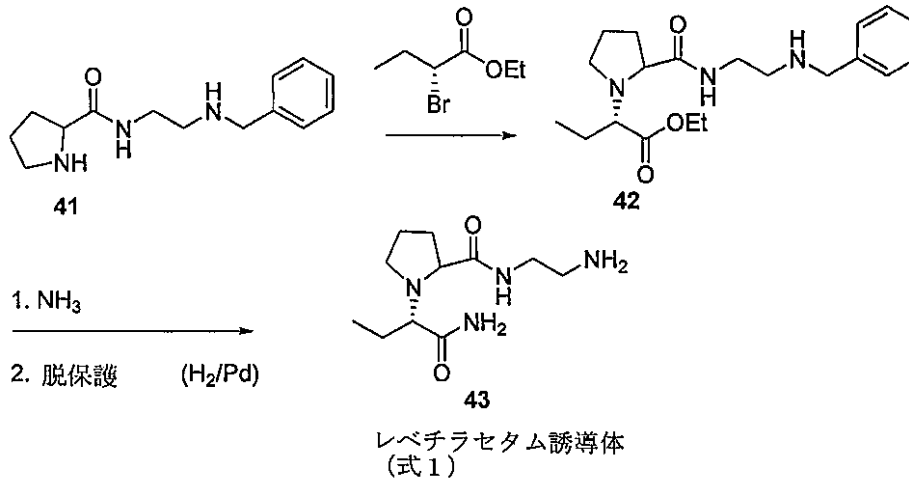
## 【 0 0 9 6】

## 【化22】

スキーム9



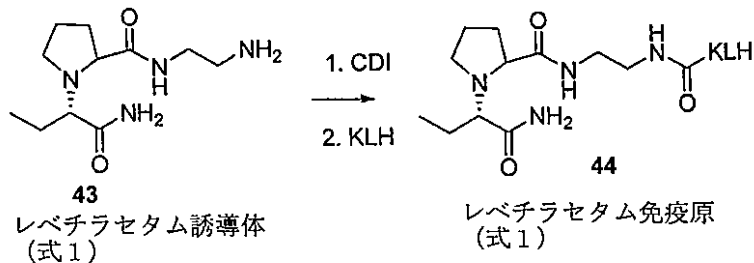
10



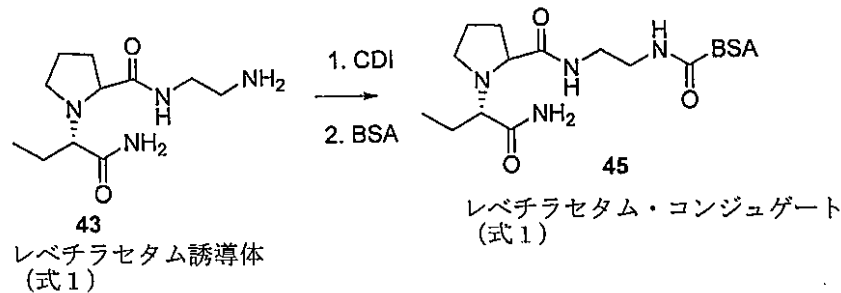
20

## 【0097】

## 【化23】



30



40

## 【0098】

[0070]スキーム8および9は、LEVに関するイムノアッセイを発展させるために有用な免疫原性誘導体を含む、LEV誘導体を産生するのに適している。

## V. イムノアッセイにおけるLEV誘導体の使用

[0071]免疫原性誘導体、例えば、限定されるわけではないが、化合物18a、27、37または44のいずれかは、以下にさらに詳細に記載するような抗LEV抗体産生を誘導するのに有用である。他の誘導体、例えば限定されるわけではないが、化合物18b、28、38、または44のいずれかは、標本中のLEVと競合するための抗原(競合抗原)を作製するのに有用である。

## 【0099】

50

[0072]当該技術分野に知られるように、競合抗原および/または抗L E V抗体を検出可能標識とコンジュゲート化してもよい。検出可能標識には、限定なしに、色素、ラテックス粒子、コロイド金、フルオロフォア、発色団、酵素、酵素断片、放射性同位体等が含まれる。

【0100】

[0073]共有または非共有結合を介して、競合抗原および/または抗L E V抗体を固体表面上に固定してもよい。固体表面には、限定なしに：粒子；膜およびフィルターを含む多孔物質；ガラス、金属、および非孔プラスチックを含む非孔物質；等が含まれる。

【0101】

[0074]抗L E V抗体、および場合によって競合抗原は、レベチラセタム濃度を測定するための定量的イムノアッセイに必須の試薬を構成する。イムノアッセイには、限定されるわけではないが、当該技術分野に知られるような、均一微粒子イムノアッセイ（例えば免疫比濁法）または定量的微小球体系（QMS（登録商標））、蛍光偏光イムノアッセイ（FPIA）、化学発光微粒子イムノアッセイ（CMIA）、クローン化酵素ドナーイムノアッセイ（CEDIA）、酵素連結イムノアッセイ（ELISA）等が含まれてもよい。

【実施例】

【0102】

VI. 実施例

[0075]以下の実施例は、本発明の態様を例示するために提供され、そして限定することを意図されない。したがって、実施例のいくつかは実験を通じて行われており、そしていくつかは当該技術分野に周知の技術、標準、および結果に基づいて、予言的である。また、本発明には、例によっては例示されない、さらなる態様が含まれうるということが明らかであるはずである。さらに、本発明にしたがって調製されたL E V誘導體、抗原、免疫原、および抗L E V抗体を用いて、当該技術分野に周知の実験プロトコルで、多くの例が実行されてきている。

【0103】

実施例1：スキーム5、工程1：アルキル化

[0076]化合物10、H - L y s ( Z ) - O t - B u · H C l ( N o v a B i o c h e m 、カタログ番号04 - 12 - 5122)、20.0065gを、清浄な500mL 一口丸底フラスコ内に入れた。磁気攪拌バーを反応フラスコに添加し、そしてフラスコにゴムのセプタムで蓋をし、そしてアルゴンを15分間パージした。清浄なシリンジ、例えばH a m i l t o n G a s t i g h t (登録商標)シリンジを用い、セプタムを通じて、80mLの無水N,N - ジメチルホルムアミドを反応フラスコに添加した。反応混合物を、アルゴン下、周囲温度で、さらに15分間攪拌した。反応混合物をアルゴン下、周囲温度で10分間攪拌した。清浄なシリンジを用い、セプタムを通じて、1滴ずつ、7.68mLの4 - プロモ酪酸エチルをフラスコに添加した。反応混合物をアルゴン下、周囲温度で10分間攪拌した。冷たい流水の水道水を伴うコンデンサーを反応フラスコ上に乗せ、そしてアルゴンラインをコンデンサーの最上部に設置した。70 にあらかじめ加熱した油槽内に反応フラスコを浸し、そしてアルゴン下で40時間攪拌した。

【0104】

[0077]反応混合物を室温に冷却した。溶媒トラップを通じて真空ポンプに連結したロータリーエバポレーターを用いて、溶媒（DMF）を除去した。1：3アセトン：クロロホルムを溶出液として用いたカラム液体クロマトグラフィーを用いて、所望の生成物、化合物11を精製した。単離された化合物11収率は62～74%であった。

【0105】

実施例2：スキーム5、工程2：ラクタム化/環化

[0078]化合物11、18.818gを清浄な250mL 一口丸底フラスコ（反応フラスコ）に移した。フラスコにゴムのセプタムで蓋をし、そしてアルゴンをおよそ15分間パージした。清浄なシリンジを用い、セプタムを通じて、61mLの無水トルエンを反応フラスコ内に添加した。反応混合物を、アルゴン下、周囲温度で約10分間攪拌し、次い

10

20

30

40

50

で、1.169 gの2-ヒドロキシピリジンを固体粉末として反応フラスコ内に添加した。反応混合物をアルゴン下、周囲温度でおよそ10分間攪拌した。冷たい流水の水道水を伴うコンデンサーを反応フラスコ上に乗せた。アルゴンラインをコンデンサーの最上部に設置した。120 にあらかじめ加熱した油槽内に反応フラスコを浸し、そして2-ヒドロキシピリジンが完全に溶解するまで、アルゴン下で約15分間攪拌した。

**【0106】**

[0079]反応混合物を室温に冷却した。吸引装置に連結したロータリーエバポレーター上で、溶媒(トルエン)を除去した。1:3ヘキサン:酢酸エチルを溶出液として用いたカラム液体クロマトグラフィーを用いて、所望の生成物、化合物12を精製した。化合物12収率は49~83%の範囲であった。

10

**【0107】**

実施例3:スキーム5、工程3:加水分解

[0080]14.019 gの化合物12を清浄な250 mL 一口丸底反応フラスコ内に移した。清浄なメスシリンダーを用いて、反応フラスコに50 mLのジクロロメタンを添加した。反応混合物を周囲温度で約5分間攪拌し、清浄なメスシリンダーを用いて、102 mLのトリフルオロ酢酸を反応フラスコ内に添加した。反応フラスコにゴムのセプタムで蓋をし、そして周囲温度でおよそ4分間攪拌した。

**【0108】**

[0081]吸引装置に連結したロータリーエバポレーターを用いて、溶媒(ジクロロメタン)を除去した。1:1アセトン:酢酸エチルを溶出液として用いたカラム液体クロマトグラフィーを用いて、所望の生成物、化合物13を精製した。化合物13収率は66~92%の範囲であった。

20

**【0109】**

実施例4:スキーム5、工程4:活性化

[0082]化合物13、11.074 gを、あらかじめ0 に設定した循環サーモスタットに連結したジャケット型250 mL 一口丸底反応フラスコに移した。反応フラスコにゴムのセプタムで蓋をし、そしてアルゴンをおよそ15分間パージした。清浄なシリンジを用い、セプタムを通じて、30 mLの無水アセトニトリルを反応フラスコに添加した。反応混合物を、アルゴン下、0 で、さらに約15分間攪拌した。清浄なシリンジを用い、セプタムを通じてゆっくりと、反応フラスコ内に7.2 mLのN,N-ジイソプロピルエチルアミンを添加した。反応混合物をアルゴン下、0 で約10分間攪拌した。

30

**【0110】**

[0083]11.15 gのTSTU(O-(N-スクシンイミジル)-1,1,3,3-テトラメチルウランテトラフルオロボレート; 98%, Fluka、カタログ番号85972)を50 mLの無水アセトニトリル中に完全に溶解した。清浄なシリンジを用い、セプタムを通じて、生じた溶液を反応フラスコ内に添加した。反応混合物をアルゴン下、0 でおよそ2.5分間攪拌した。

**【0111】**

[0084]吸引装置に連結したロータリーエバポレーターを用いて、溶媒(アセトニトリル)を除去した。1:9ヘキサン:酢酸エチルを溶出液として用い、フリットディスクを備えた迅速分離カラム/漏斗(ChemGlassカタログ番号CG-1412)を用い、フラッシュクロマトグラフィーを用いて、所望の生成物、化合物14を精製した。生成物収率は85~93%であった。

40

**【0112】**

実施例5:スキーム5、工程5:アミノリシス

[0085]12.241 gの化合物14を、あらかじめ0 に設定した循環サーモスタットに連結した清浄なジャケット型250 mL 一口丸底反応フラスコに移した。反応フラスコにゴムのセプタムで蓋をし、そしてアルゴンを約15分間パージした。110 mLのメタノール中の7Nアンモニア(約-20 にあらかじめ冷却)を添加した際、白色固体(N-ヒドロキシスクシンイミド)の形成が観察された。隔離された条件下(ゴムセプタム

50

で蓋、アルゴンは含まない)、0 で2.5時間、反応混合物を攪拌した。反応混合物をゆっくりと周囲温度にした。

【0113】

[0086]吸引装置に連結したロータリーエバポレーターを用いて、未反応アンモニアおよび溶媒(メタノール)を除去した。溶媒を除去した際、N-ヒドロキシスクシンイミドがフラスコ中で結晶化した。テトラヒドロフラン(THF)を反応混合物に添加し、そして結晶化したN-ヒドロキシスクシンイミドは、溶液から沈殿した。フリット・バックナー漏斗を通じてろ過することによって、結晶を除去した。吸引装置に連結したロータリーエバポレーターを介して、ろ過した溶液からTHFを除去した。1:9メタノール:酢酸エチルを溶出液として用いた、カラム液体クロマトグラフィーを用いて、所望の生成物、化合物15を精製し、収率は約60~70%であった。

10

【0114】

実施例6:スキーム5、工程6:脱保護

[0087]化合物15、1.5gを清浄な200mL 一口丸底反応フラスコ内に移した。反応フラスコにゴムのセプタムで蓋をし、そして低流量のアルゴンでおよそ15分間パーズした。清浄なシリンジを用いて、反応フラスコ内に40mLの無水エタノールを添加した。混合物を、アルゴン下、周囲温度で、約5分間攪拌し、そして次いで、1.373gのギ酸アンモニウムを固体粉末として反応フラスコ内に添加した。反応混合物をアルゴン下、周囲温度で5分間攪拌し、その後、11mLの脱イオン水を添加した。ギ酸アンモニウムが完全に溶解するまで、アルゴン下、周囲温度でおよそ5分間、攪拌を続けた。110 にあらかじめ加熱した油槽内に反応フラスコを浸し、そしてアルゴン下で約7時間攪拌した。

20

【0115】

[0088]1:9メタノール:酢酸エチルを溶出液として用いたBiotage(登録商標)カラム液体クロマトグラフィーを用いて、所望の生成物、化合物3を精製した。化合物3の単離収率は50~70%であった。

【0116】

実施例7:スキーム5、工程7:アミノリシス

[0089]70mgの化合物15を、10mLコニカルフラスコ中の3mLのアセトン中に均一に溶解した。2mLの溶液を抜き取り、そしてシリンジを用いて、空の清浄な5mLコニカルフラスコ内に移した。ロータリーエバポレーターを用いて、5mLフラスコからアセトンを蒸発させた。

30

【0117】

[0090]3mLの無水N,N-ジメチルホルムアミドを、化合物15を含有するフラスコに添加した。清浄なシリンジを用い、セプタムを通じてゆっくりと、0.164mLのN,N-ジイソプロピルエチルアミンを5mLコニカルフラスコ内に添加した。

【0118】

[0091]別個に、760mgの化合物16を200mL 一口丸底フラスコ(反応フラスコ)内に入れた。磁気攪拌バーを反応フラスコ内に入れた。反応フラスコにゴムのセプタムで蓋をし、そしてアルゴンを15分間パーズした。45mLの無水N,N-ジメチルホルムアミドを反応フラスコ内に添加した。22を完全に攪拌し、そして超音波槽中で加熱を伴わず穏やかな超音波処理で溶解させた。1:1水:エチレングリコールを満たしたジャケット型ビーカー内に反応フラスコを浸し、そしてあらかじめ0 に設定した循環サーモスタットに連結した。0、アルゴン下での攪拌をさらに10分間続けた。

40

【0119】

[0092]Hamilton Gastight(登録商標)シリンジを用いて、化合物16を含有する反応フラスコ内に、10分間に渡って1滴ずつ、化合物15溶液を添加した。2つの1mL部分の無水N,N-ジメチルホルムアミドでシリンジをリンスし、そしてリンス液を反応フラスコ内に添加した。反応混合物をアルゴン下、0 で1時間攪拌した。冷却槽から反応フラスコを除去し、そして室温に到達させた。反応混合物をアルゴン下、

50

室温で6時間攪拌した。

【0120】

[0093] 2つの溶媒トラップを通じて真空ポンプに連結したロータリーエバポレーターを用いて、溶媒(N, N-ジメチルホルムアミド)を除去した。ジクロロメタン:アセトン(100%ジクロロメタンから開始して、そして100%アセトンで終了する)を溶出液として用いたBiotage(登録商標)カラム液体クロマトグラフィーを用いて、所望の生成物、化合物17を精製した。化合物17の収率は23~39%であった。

【0121】

実施例8: スキーム5、工程8: レベチラセタム免疫原の調製

[0094] 8 mL pH 7.2 PBS (0.1 M リン酸ナトリウム、0.15 M 塩化ナトリウム) 中の 160 mg のキーホールリンペット・ヘモシアニン (KLH) の溶液を氷槽中で冷却した。約 11.8 mL の DMSO を KLH 溶液に 1 滴ずつ添加して、そして室温未満で維持した。1.0 mL DMSO 中の 30 mg の化合物 17 の溶液を KLH 溶液に 1 滴ずつ添加して、反応混合物を形成し、そして混合物をおよそ 40 時間、周囲温度で攪拌させた。生じた免疫原 (化合物 18a) を透析チューブ (10,000 MW カットオフ) に入れて、そして 1 L の pH 7.2 PBS 中の 30% DMSO、その後、1 L の pH 7.2 PBS 中の 10% DMSO、次いで、1 L の pH 7.2 PBS 中の 5% DMSO 中で、室温で連続透析し、そして次いで、4 で、pH 7.2 PBS と 4 回交換した (各 1 L で少なくとも各 6 時間)。

【0122】

実施例9: スキーム5、工程9: レベチラセタム・コンジュゲートの調製

[0095] 25 mL pH 7.2 PBS (0.1 M リン酸ナトリウム、0.15 M 塩化ナトリウム) 中の 400 mg のウシ血清アルブミン (BSA) の溶液を氷槽中で冷却した。約 16 mL の DMSO を BSA 溶液に 1 滴ずつ添加して、そして室温未満で維持した。

【0123】

[0096] 1.0 mL 無水 DMF 中の 28 mg の化合物 3 の溶液に 0.2 mL 無水 N, N-ジイソプロピルエチルアミンを添加した。異なる丸底フラスコに、48 mg のカルボニルジミダゾール (CDI) および 1 mL 無水 DMF を添加した。

【0124】

[0097] 約 10 分間の期間に渡って、シリンジを介して、化合物 3 を含有する溶液を DMF 中の CDI の溶液に 1 滴ずつ添加して、そして生じた混合物を氷槽中でおよそ 5 時間攪拌した。

【0125】

[0098] 約 20 分間の期間に渡って、シリンジを用いて、化合物 3 / CDI の溶液を BSA 溶液に 1 滴ずつ添加した。生じた混合物を 2~8 で一晩攪拌した。生じた化合物 18b を透析チューブ (10,000 MW カットオフ) に入れて、そして 1 L の pH 7.2 PBS 中の 30% DMSO、次いで、1 L の pH 7.2 PBS 中の 10% DMSO 中で、4 で連続透析し、その後、pH 7.2 PBS と 4 回交換した (各 1 L で少なくとも各 6 時間)。

【0126】

実施例10: スキーム6、工程1: アルキル化

[0099] 化合物 20、H-Glu(OBzl)-OtBu (Bachem、カタログ番号 E3535、CAS 番号 105590-97-4)、5 g を、清浄な 100 mL 一口丸底フラスコ内に入れた。磁気攪拌バーを反応フラスコ内に入れ、そして反応フラスコにゴムのセプタムで蓋をし、そしてアルゴンを 15 分間パージした。清浄なシリンジを用い、セプタムを通じて、20 mL の無水 N, N-ジメチルホルムアミドを反応フラスコに添加した。反応混合物を、アルゴン下、周囲温度で、さらに 15 分間攪拌し、そして次いで、清浄なシリンジを用い、セプタムを通じて、1 滴ずつ、2 mL の 4-プロモ酪酸エチルをフラスコに添加した。反応混合物をアルゴン下、周囲温度で約 10 分間攪拌した。冷たい流水の水道水を伴うコンデンサーを反応フラスコ上に乗せ、そしてアルゴンラインをコン

10

20

30

40

50

デンサーの最上部に設置した。70 にあらかじめ加熱した油槽内に反応フラスコを浸し、そしてアルゴン下でおよそ40時間攪拌した。

【0127】

[00100] 反応混合物を室温に冷却した。溶媒トラップを通じて真空ポンプに連結したロータリーエバポレーターを用いて、溶媒(DMF)を除去した。蒸発装置コンデンサーコイル冷却剤(1:1エチレングリコール:水)をおよそ-15 にあらかじめ冷却した。1:3アセトン:クロロホルムを溶出液として用いたカラム液体クロマトグラフィーを用いて、所望の生成物、化合物21を精製した。単離された化合物21収率は50~70%であった。

【0128】

実施例11:スキーム6、工程2:ラクタム化/環化

[00101] 化合物21、4gを清浄な100mL 一口丸底フラスコ(反応フラスコ)に移した。フラスコにゴムのセプタムで蓋をし、そしてアルゴンをおよそ15分間パージした。清浄なシリンジを用い、セプタムを通じて、15mLの無水トルエンを反応フラスコに添加した。反応混合物を、アルゴン下、周囲温度で、約10分間攪拌し、次いで、0.3gの2-ヒドロキシピリジン固体粉末として反応フラスコ内に添加した。反応混合物をアルゴン下、周囲温度でおよそ10分間攪拌した。冷たい流水の水道水を伴うコンデンサーを反応フラスコ上に乗せた。アルゴンラインをコンデンサーの最上部に設置した。120 にあらかじめ加熱した油槽内に反応フラスコを浸し、そして2-ヒドロキシピリジンが完全に溶解するまで、アルゴン下で15時間攪拌した。

【0129】

[00102] 反応混合物を室温に冷却した。吸引装置に連結したロータリーエバポレーター上で溶媒(トルエン)を除去した。1:3ヘキサン:酢酸エチルを溶出液として用いたカラム液体クロマトグラフィーを用いて、所望の生成物、化合物22を精製した。化合物22収率は40~70%の範囲であった。

【0130】

実施例12:スキーム6、工程3:加水分解

[00103] 2gの化合物22を清浄な100mL 一口丸底反応フラスコに移した。清浄なメスシリンダーを用いて、反応フラスコに10mLのジクロロメタンを添加した。反応混合物を周囲温度で約5分間攪拌し、そして次いで、清浄なメスシリンダーを用いて、10mLのトリフルオロ酢酸を反応フラスコ内に添加した。反応フラスコにゴムのセプタムで蓋をし、そして周囲温度でおよそ4時間攪拌した。

【0131】

[00104] 吸引装置に連結したロータリーエバポレーターを用いて、溶媒(ジクロロメタン、トリフルオロ酢酸)を除去した。1:1アセトン:酢酸エチルを溶出液として用いたカラム液体クロマトグラフィーを用いて、所望の生成物、化合物23を精製した。化合物23収率は70~90%の範囲であった。

【0132】

実施例13:スキーム6、工程4:アミノリシス

[00105] 化合物23、1.75gを、あらかじめ0 に設定した循環サーモスタットに連結したジャケット型100mL 一口丸底反応フラスコに移した。反応フラスコにゴムのセプタムで蓋をし、そしてアルゴンをおよそ15分間パージした。清浄なシリンジを用い、セプタムを通じて、5mLの無水アセトニトリルを反応フラスコに添加した。反応混合物を、アルゴン下、0 で、さらに約15分間攪拌した。清浄なシリンジを用い、セプタムを通じてゆっくりと、反応フラスコ内に2mLのN,N-ジイソプロピルエチルアミンを添加した。反応混合物は淡黄色からより深い黄色に変化した。反応混合物をアルゴン下、0 で約10分間攪拌した。

【0133】

[00106] 1.80gのTSTU(O-(N-スクシンイミジル)-1,1,3,3-テトラメチルウランテトラフルオロボレート)を10mLの無水アセトニトリル中に完全に

10

20

30

40

50

溶解した。清浄なシリンジを用い、セプタムを通じて、生じた溶液を反応フラスコ内に添加した。反応混合物をアルゴン下、0 でおよそ2.5時間攪拌した。

【0134】

[00107]吸引装置に連結したロータリーエバポレーターを用いて、溶媒(アセトニトリル)を除去した。迅速分離を用いたフラッシュクロマトグラフィーを用いて、中間体を精製した。

【0135】

[00108]1.6gの中間体を、あらかじめ0 に設定した循環サーモスタットに連結した清浄なジャケット型100mL 一口丸底反応フラスコに移した。反応フラスコにゴムのセプタムで蓋をし、そしてアルゴンを約15分間パージした。20mLのメタノール中の7Nアンモニア(約-20 にあらかじめ冷却)を添加した際、白色固体(N-ヒドロキシスクシンイミド)の形成が観察された。隔離された条件下(ゴムセプタムで蓋、アルゴンは含まない)、0 で約2.5時間、反応混合物を攪拌した。反応混合物をゆっくりと周囲温度にした。

10

【0136】

[00109]吸引装置に連結したロータリーエバポレーターを用いて、未反応アンモニアおよび溶媒(メタノール)を除去した。溶媒を除去した際、N-ヒドロキシスクシンイミドがフラスコ中で結晶化した。テトラヒドロフラン(THF)を反応混合物に添加し、そして結晶化したN-ヒドロキシスクシンイミドは、溶液から沈殿した。フリット・バックナー漏斗を通じてろ過することによって、結晶を除去した。吸引装置に連結したロータリーエバポレーターを介して、ろ過した溶液からTHFを除去した。1:9メタノール:酢酸エチルを溶出液として用いた、カラム液体クロマトグラフィーを用いて、所望の生成物、化合物24を精製し、収率は約50~60%であった。

20

【0137】

実施例14:スキーム6、工程5:脱保護

[00110]化合物24、1.5gを清浄な200mL 一口丸底反応フラスコ内に移した。反応フラスコにゴムのセプタムで蓋をし、そして低流量のアルゴンでおよそ15分間パージした。清浄なシリンジを用いて、反応フラスコ内に40mLの無水エタノールを添加した。混合物を、アルゴン下、周囲温度で、約5分間攪拌し、そして次いで、1.4gのギ酸アンモニウムを固体粉末として反応フラスコ内に添加した。反応混合物をアルゴン下、周囲温度で5分間攪拌し、その後、10mLの脱イオン水を添加した。ギ酸アンモニウムが完全に溶解するまで、アルゴン下、周囲温度でおよそ5分間、攪拌を続けた。110 にあらかじめ加熱した油槽内に反応フラスコを浸し、そしてアルゴン下で約7時間攪拌した。

30

【0138】

[00111]1:9メタノール:酢酸エチルを溶出液として用いたカラム液体クロマトグラフィーを用いて、所望の生成物、化合物25を精製した。化合物25の収率は50~70%であった。

【0139】

実施例15:スキーム6、工程6:活性化

[00112]化合物25、1.90gを、あらかじめ0 に設定した循環サーモスタットに連結したジャケット型100mL 一口丸底反応フラスコに移した。反応フラスコにゴムのセプタムで蓋をし、そしてアルゴンをおよそ15分間パージした。清浄なシリンジを用い、セプタムを通じて、5mLの無水DMFを反応フラスコに添加した。反応混合物を、アルゴン下、0 で、さらに約15分間攪拌した。清浄なシリンジを用い、セプタムを通じてゆっくりと、反応フラスコ内に2mLのN,N-ジイソプロピルエチルアミンを添加した。反応混合物をアルゴン下、0 で約10分間攪拌した。

40

【0140】

[00113]1.95gのTSTU(O-(N-スクシンイミジル)-1,1,3,3-テトラメチルウランテトラフルオロボレート)を5mLの無水DMF中に完全に溶解した。

50

清浄なシリンジを用い、セプタムを通じて、生じた溶液を反応フラスコ内に添加した。反応混合物をアルゴン下、0 でおよそ2.5時間攪拌した。

【0141】

[00114]吸引装置に連結したロータリーエバポレーターを用いて、溶媒(DMF)を除去した。フラッシュクロマトグラフィーを用いて、所望の生成物、化合物26を精製した。化合物26収率は60~70%であった。

【0142】

実施例16：スキーム6、工程7：レベチラセタム免疫原の調製

[00115] 8 mL pH 7.2 PBS (0.1 Mリン酸ナトリウム、0.15 M塩化ナトリウム)中の160 mgのキーホールリンペット・ヘモシアニン(KLH)の溶液を氷槽中で冷却した。約11.8 mLのDMSOをKLH溶液に1滴ずつ添加して、そして室温未満で維持した。1.0 mL DMSO中の32 mgの化合物26の溶液をKLH溶液に1滴ずつ添加して、反応混合物を形成した。反応混合物をおよそ40時間、室温で攪拌させた。生じたKLH免疫原27を透析チューブ(10,000 MWカットオフ)に入れて、そして1 LのpH 7.2 PBS中の30% DMSO、次いで、1 LのpH 7.2 PBS中の10% DMSO、次いで、1 LのpH 7.2 PBS中の5% DMSO中で、室温で連続透析し、その後、4 で、pH 7.2 PBSと4回交換した(各1 Lで少なくとも各6時間)。

10

【0143】

実施例17：スキーム6、工程7：レベチラセタム・コンジュゲートの調製

[00116] 8 mL pH 7.2 PBS (0.1 Mリン酸ナトリウム、0.15 M塩化ナトリウム)中の400 mgのウシ血清アルブミン(BSA)の溶液を氷槽中で冷却した。約11.8 mLのDMSOをBSA溶液に1滴ずつ添加して、そして室温未満で維持した。1.0 mL DMSO中の32 mgの化合物26の溶液を、BSA溶液に1滴ずつ添加して、反応混合物を形成した。反応混合物を40時間、室温で攪拌させた。生じたBSAコンジュゲート、化合物28を透析チューブ(10,000 MWカットオフ)に入れて、そして1 LのpH 7.2 PBS中の30% DMSO、次いで、1 LのpH 7.2 PBS中の10% DMSO、次いで、1 LのpH 7.2 PBS中の5% DMSO中で、室温で連続透析し、そして次いで、4 で、pH 7.2 PBSと4回交換した(各1 Lで少なくとも各6時間)。

20

30

【0144】

実施例18：スキーム7、工程1：アルキル化

[00117]化合物29、H-Cys(OBzl)-OMe(Bachem、カタログ番号E1545、CAS番号16741-80-3)、4.5 gを、清浄な100 mL 一丸底フラスコ内に入れた。反応フラスコにゴムのセプタムで蓋をし、そしてアルゴンを15分間パージした。清浄なシリンジを用い、セプタムを通じて、20 mLの無水N,N-ジメチルホルムアミドを反応フラスコに添加した。反応混合物を、アルゴン下、周囲温度で、およそ15分間攪拌した。清浄なシリンジを用い、セプタムを通じて、1滴ずつ、2 mLの4-ブロモ酪酸エチルをフラスコに添加した。反応混合物をアルゴン下、周囲温度で10分間攪拌した。冷たい流水の水道水を伴うコンデンサーを反応フラスコ上に乗せ、そしてアルゴンラインをコンデンサーの最上部に設置した。70 にあらかじめ加熱した油槽内に反応フラスコを浸し、そしてアルゴン下で40時間攪拌した。

40

【0145】

[00118]反応混合物を室温に冷却した。溶媒トラップを通じて真空ポンプに連結したロータリーエバポレーターを用いて、溶媒(DMF)を除去した。蒸発装置コンデンサーコイル冷却剤(1:1エチレングリコール:水)をおよそ-15 にあらかじめ冷却した。1:3アセトン:クロロホルムを溶出液として用いたカラム液体クロマトグラフィーを用いて、所望の生成物、化合物30を精製した。単離された化合物30収率は50~70%であった。

【0146】

50

## 実施例 19 : スキーム 7、工程 2 : ラクタム化 / 環化

[00119] 化合物 30、3.9 g を清浄な 100 mL 一口丸底フラスコ (反応フラスコ) に移した。フラスコにゴムのセプタムで蓋をし、そしておよそ 15 分間パージし、次いで、清浄なシリンジを用い、セプタムを通じて、15 mL の無水トルエンを反応フラスコ内に添加した。反応混合物を、アルゴン下、周囲温度で、約 10 分間攪拌し、次いで、0.31 g の 2 - ヒドロキシピリジン を固体粉末として反応フラスコ内に添加した。反応混合物をアルゴン下、周囲温度でおよそ 10 分間攪拌した。冷たい流水の水道水を伴うコンデンサーを反応フラスコ上に乗せた。アルゴンラインをコンデンサーの最上部に設置した。120 にあらかじめ加熱した油槽内に反応フラスコを浸し、そして 2 - ヒドロキシピリジンが完全に溶解するまで、アルゴン下で 15 時間攪拌した。

10

## 【0147】

[00120] 反応混合物を室温に冷却した。吸引装置に連結したロータリーエバポレーターを用いて、溶媒 (トルエン) を除去した。1 : 3 ヘキサン : 酢酸エチルを溶出液として用いたカラム液体クロマトグラフィーを用いて、所望の生成物、化合物 31 を精製した。化合物 31 収率は 50 ~ 70 % の範囲であった。

## 【0148】

## 実施例 20 : スキーム 7、工程 3 : 加水分解

[00121] 2.1 g の化合物 31 を清浄な 100 mL 一口丸底反応フラスコ内に移した。反応フラスコに 10 mL のメタノールおよび 10 mL の脱イオン水を添加した。200 mg の LiOH をフラスコに添加した。反応混合物を周囲温度で約 4 時間攪拌した。

20

## 【0149】

[00122] 吸引装置に連結したロータリーエバポレーターを用いて、溶媒 (メタノール、水) を除去した。1 : 1 アセトン : 酢酸エチルを溶出液として用いたカラム液体クロマトグラフィーを用いて、所望の生成物、化合物 32 を精製した。化合物 32 収率は 70 ~ 90 % の範囲であった。

## 【0150】

## 実施例 21 : スキーム 7、工程 4 : アミノリシス

[00123] 化合物 32、1.80 g を、あらかじめ 0 に設定した循環サーモスタットに連結したジャケット型 100 mL 一口丸底反応フラスコに移した。反応フラスコにゴムのセプタムで蓋をし、そしてアルゴンをおよそ 15 分間パージした。清浄なシリンジを用い、セプタムを通じて、5 mL の無水アセトニトリルを反応フラスコに添加した。反応混合物を、アルゴン下、0 で、さらに約 15 分間攪拌した。清浄なシリンジを用い、セプタムを通じてゆっくりと、反応フラスコ内に 2 mL の N, N - ジイソプロピルエチルアミンを添加した。反応混合物は、淡黄色からより深い黄色に変化した。反応混合物をアルゴン下、0 で約 10 分間攪拌した。

30

## 【0151】

[00124] 1.85 g の TSTU (O - (N - スクシンイミジル) - 1, 1, 3, 3 - テトラメチルウランテトラフルオロボレート) を 10 mL の無水アセトニトリル中に完全に溶解した。清浄なシリンジを用い、セプタムを通じて、生じた溶液を反応フラスコ内に添加し、そしてアルゴン下、0 でおおよそ 2.5 時間攪拌した。

40

## 【0152】

[00125] 吸引装置に連結したロータリーエバポレーターを用いて、溶媒 (アセトニトリル) を除去した。迅速分離を用いたフラッシュクロマトグラフィーを用いて、中間体を精製した。

## 【0153】

[00126] 1.62 g の中間体を、あらかじめ 0 に設定した循環サーモスタットに連結した清浄なジャケット型 100 mL 一口丸底反応フラスコに移した。反応フラスコにゴムのセプタムで蓋をし、そしてアルゴンを約 15 分間パージした。20 mL のメタノール中の 7 N アンモニア (約 - 20 にあらかじめ冷却) を添加した際、白色固体 (N - ヒドロキシスクシンイミド) の形成が観察された。隔離された条件下 (ゴムセプタムで蓋、ア

50

ルゴンは含まない)、0 で2.5時間、反応混合物を攪拌した。反応混合物をゆっくりと周囲温度にした。

【0154】

[00127]吸引装置に連結したロータリーエバポレーターを用いて、未反応アンモニアおよび溶媒(メタノール)を除去した。1:9メタノール:酢酸エチルを溶出液として用いた、カラム液体クロマトグラフィーを用いて、所望の生成物、化合物33を精製し、収率は約50~60%であった。

【0155】

実施例22:スキーム7、工程5:脱保護

[00128]化合物33、1.51gを清浄な200mL 一口丸底反応フラスコ内に移した。反応フラスコにゴムのセプタムで蓋をし、そして低流量のアルゴンでおよそ15分間パージした。清浄なシリンジを用いて、反応フラスコ内に40mLの無水エタノールを添加した。混合物を、アルゴン下、周囲温度で、約5分間攪拌し、そして次いで、1.4gのギ酸アンモニウムを固体粉末として反応フラスコ内に添加した。反応混合物をアルゴン下、周囲温度で5分間攪拌し、その後、10mLの脱イオン水を添加した。ギ酸アンモニウムが完全に溶解するまで、アルゴン下、周囲温度でおよそ5分間、攪拌を続けた。110 にあらかじめ加熱した油槽内に反応フラスコを浸し、そしてアルゴン下で約7時間攪拌した。

10

【0156】

[00129]1:9メタノール:酢酸エチルを溶出液として用いたカラム液体クロマトグラフィーを用いて、所望の生成物、化合物34を精製した。化合物34の収率は50~70%であった。

20

【0157】

実施例23:スキーム7、工程7:レベチラセタム免疫原の調製

[00130]3mL pH7.2 PBS(0.1Mリン酸ナトリウム、0.15M塩化ナトリウム)中の60mgのキーホールリンペット・ヘモシアニン(KLH)の溶液を氷槽中で冷却した。一方の端にNHSEステルおよびもう一方の端にマレイミド基を含有するヘテロ二官能性架橋剤である10.2mgのm-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)を、0.5mL DMSO中に溶解し、そしてMBS溶液を氷槽中で冷却しながらKLH溶液に1滴ずつ添加した。反応混合物を氷槽中で4時間攪拌した。PD-10脱塩カラムを介してKLH-MBSコンジュゲートを精製した(過剰なMBSを除去するため)。

30

【0158】

[00131]10.2mgの化合物34を0.5mL DMSO中に溶解し、そして生じた溶液を氷槽中で冷却しながら、精製KLH-MBS溶液に1滴ずつ添加した。混合物を室温で2時間攪拌した。生じた免疫原、化合物37を透析チューブ(10,000MWカットオフ)に入れて、そして1LのpH7.2 PBS中の30%DMSO、次いで、1LのpH7.2 PBS中の10%DMSO、次いで、1LのpH7.2 PBS中の5%DMSO中で、室温で連続透析し、その後、4 で、pH7.2 PBSと4回交換した(各1Lで少なくとも各6時間)。

40

【0159】

実施例24:スキーム7、工程8:レベチラセタム・コンジュゲートの調製

[00132]5mL pH7.2 PBS(0.1Mリン酸ナトリウム、0.15M塩化ナトリウム)中の100mgのウシ血清アルブミン(BSA)の溶液を氷槽中で冷却する。10.2mgのMBSを、0.5mL DMSO中に溶解し、そして次いでMBS溶液を氷槽中で冷却しながらBSA溶液に1滴ずつ添加した。反応混合物を氷槽中で4時間攪拌させた。PD-10脱塩カラムを介してBSA-MBSコンジュゲートを精製した(過剰なMBSを除去するため)。

【0160】

[00133]12.3mgの化合物34を0.5mL DMSO中に溶解し、そして生じた

50

溶液を氷槽中で冷却しながら、精製BSA-MBS溶液に1滴ずつ添加した。混合物を室温で2時間攪拌した。生じたコンジュゲート、化合物38を透析チューブ(10,000 MWカットオフ)に入れて、そして1LのpH7.2 PBS中の30% DMSO、次いで、1LのpH7.2 PBS中の10% DMSO、次いで、1LのpH7.2 PBS中の5% DMSO中で、室温で連続透析し、その後、4 で、pH7.2 PBSと4回交換した(各1Lで少なくとも各6時間)。

## 【0161】

実施例25：スキーム8、工程1：求核アシル付加

[00134] 210 mgの化合物39、FMOC-Pro-OH(N-9-フルオレニルメトキシカルボニル)-L-プロリン、Aldrichカタログ番号33834-6)、70 mg N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)および2 mL無水DMFを、磁気スターラーとともに100 mL丸底フラスコ中に入れた。混合物を氷冷メタノール槽上で冷却し、そして0.2 mLの3.5 M DCC(DMF中のジシクロヘキシルカルボジイミド)で処理した。反応混合物をアルゴン下で15分間、氷冷メタノール槽中で攪拌し、そしてさらに0.1 mLのDCC溶液を添加した。混合物をゆっくりと室温にしながら、そして次いで、アルゴン下、室温で一晩、攪拌した。

10

## 【0162】

[00135] 1 mLのN-ベンジルエチレンジアミンおよび5 mL無水DMFを、磁気スターラーとともに反応フラスコ中に入れた。フラスコにゴムのセプタムで蓋をし、そしてアルゴンを約15分間パージした。DMF溶液中の活性化されたFMOC-Pro-OHを、シリンジを介して、DMF溶液中のN-ベンジルエチレンジアミンにゆっくりと添加した。反応混合物をアルゴン下、周囲温度でさらに6時間攪拌した。

20

## 【0163】

[00136] 溶媒トラップを通じて真空ポンプに連結したロータリーエバポレーターを用いて、溶媒(DMF)を除去した。蒸発装置コンデンサーコイル冷却剤(1:1エチレングリコール:水)をおよそ-15 にあらかじめ冷却した。1:9ヘキサン:クロロホルムを溶出液として用いたカラム液体クロマトグラフィーを用いて、所望の生成物、化合物40を精製した。単離された化合物40収率は60~70%であった。

## 【0164】

実施例26：スキーム8、工程2：脱保護

[00137] 化合物40、200 mgを清浄な100 mL 一口丸底フラスコ(反応フラスコ)に移した。10 mLの無水DMFおよび5 mLピペリジンを反応フラスコ内に添加して、そして反応混合物をアルゴン下、周囲温度で4時間攪拌した。

30

## 【0165】

[00138] 吸引装置に連結したロータリーエバポレーターを用いて、溶媒(DMF、ピペリジン)を除去した。2:8メタノール:塩化メチレン(ジクロロメタン)を溶出液として用いたカラム液体クロマトグラフィーを用いて、所望の生成物、化合物41を精製した。化合物41収率は50~70%の範囲であった。

## 【0166】

実施例27：スキーム8、工程3：アルキル化

[00139] 化合物41を、清浄な100 mL 一口丸底フラスコに入れた。反応フラスコにゴムのセプタムで蓋をし、そしてアルゴンを15分間パージした。清浄なシリンジを用い、セプタムを通じて、20 mLの無水N,N-ジメチルホルムアミドを反応フラスコに添加し、そして反応混合物を、アルゴン下、周囲温度で、さらに15分間攪拌した。清浄なシリンジを用い、セプタムを通じて、1滴ずつ、2 mLの2-プロモ酪酸エチルをフラスコに添加した。反応混合物をアルゴン下、周囲温度で10分間攪拌した。冷たい流水の水道水を伴うコンデンサーを反応フラスコ上に乗せ、そしてアルゴンラインをコンデンサーの最上部に設置した。70 にあらかじめ加熱した油槽中に反応フラスコを浸し、そしてアルゴン下で40時間攪拌した。

40

## 【0167】

50

[00140] 反応混合物を室温に冷却した。溶媒トラップを通じて真空ポンプに連結したロータリーエバポレーターを用いて、溶媒(DMF)を除去した。蒸発装置コンデンサーコイル冷却剤(1:1エチレングリコール:水)をおよそ-15℃にあらかじめ冷却した。1:3アセトン:クロロホルムを溶出液として用いたカラム液体クロマトグラフィーを用いて、所望の生成物、化合物42を精製した。単離された化合物42収率は50~70%であった。

【0168】

実施例28: スキーム8、工程4: 脱保護

[00141] 20 mLの濃水酸化アンモニウムに、2.0 gの化合物42および0.1 g塩化アンモニウムを添加した。混合物を100℃で攪拌しながらおよそ7時間加熱し、そして次いで室温に冷却した。生じた沈殿物をろ過し、そして水およびジエチルエーテルを洗浄した。中間体の収率は60~70%であった。

10

【0169】

[00142] 1.0 gの中間体を、清浄な100 mLの一口丸底反応フラスコ内に移した。反応フラスコにゴムのセプタムで蓋をし、そして低流量のアルゴンでおよそ15分間バージした。清浄なシリンジを用いて、反応フラスコに20 mLの無水エタノールを添加した。混合物を、アルゴン下、周囲温度で、約5分間攪拌し、そして次いで、0.8 gのギ酸アンモニウムを固体粉末として反応フラスコ内に添加した。反応混合物をアルゴン下、周囲温度で5分間攪拌し、その後、5 mLの脱イオン水を添加した。ギ酸アンモニウムが完全に溶解するまで、アルゴン下、周囲温度でおよそ5分間、攪拌を続けた。110℃にあらかじめ加熱した油槽内に反応フラスコを浸し、そしてアルゴン下で約7時間攪拌した。

20

【0170】

[00143] 1:9メタノール:酢酸エチルを溶出液として用いたカラム液体クロマトグラフィーを用いて、所望の生成物、化合物43を精製した。単離された所望の生成物の収率はおよそ50%であった。

【0171】

実施例29: スキーム8、工程5: レベチラセタム免疫原の調製

[00144] 8 mL pH 7.2 PBS (0.1 Mリン酸ナトリウム、0.15 M塩化ナトリウム)中の160 mgのKLHの溶液を氷槽中で冷却した。約12 mLのDMSOをKLH溶液に1滴ずつ添加し、そして室温未満に維持した。

30

【0172】

[00145] 1.0 mL無水DMF中の29 mgの化合物43の溶液を0.2 mL無水N,N-ジイソプロピルエチルアミンに添加した。別個の丸底フラスコに、48 mgのCDI (カルボニルジイミダゾール)および1 mL無水DMFを添加した。

【0173】

[00146] 約10分間の期間に渡って、シリンジを介して1滴ずつ、化合物43を含有する溶液をCDI/DMF溶液に添加し、そして次いで、氷槽中でおよそ5時間攪拌した。

[00147] シリンジを用いて、化合物43/CDI溶液をKLH溶液に1滴ずつ20分間に渡って添加した。混合物を2~8℃で一晩攪拌した。生じた免疫原、化合物44を透析チューブ(10,000 MWカットオフ)に入れて、そして1 LのpH 7.2 PBS中の30% DMSO、次いで、1 LのpH 7.2 PBS中の10% DMSO中で、4℃で連続透析し、その後、pH 7.2 PBSと4回交換した(各1 Lで少なくとも各6時間)。

40

【0174】

実施例30: スキーム8、工程6: レベチラセタム・コンジュゲートの調製

[00148] 25 mL pH 7.2 PBS (0.1 Mリン酸ナトリウム、0.15 M塩化ナトリウム)中の400 mgのウシ血清アルブミン(BSA)の溶液を氷槽中で冷却した。約16 mLのDMSOをKLH溶液に1滴ずつ添加して、そして室温未満で維持した。

【0175】

[00149] 1.0 mL無水DMF中の28 mgの化合物43の溶液を0.2 mL無水N,N-

50

N - ジイソプロピルエチルアミンに添加した。別個の丸底フラスコに、48 mg の C D I (カルボニルジイミダゾール) および 1 mL 無水 D M F を添加した。

【0176】

[00150] 10 分間の期間に渡って、シリンジを介して 1 滴ずつ、化合物 4 3 を含有する溶液を C D I / D M F 溶液に添加し、そして次いで、水槽中で約 5 時間攪拌した。

[00151] 次いで、シリンジを用いて、溶液をタンパク質溶液に 1 滴ずつ 20 分間に渡って添加した。混合物を 2 ~ 8 で一晩攪拌した。生じたレベチラセタム・コンジュゲート、化合物 4 5 を透析チューブ (10, 000 MW カットオフ) に入れて、そして 1 L の pH 7.2 P B S 中の 30% D M S O、次いで、1 L の pH 7.2 P B S 中の 10% D M S O 中で、4 で連続透析し、その後、pH 7.2 P B S と 4 回交換した (各 1 L で少なくとも各 6 時間)。

10

【0177】

実施例 3 1 : スキーム 9、工程 1 : 求核アシル付加

[00152] 205 mg の化合物 4 6、B O C - P r o - O H (N - 9 - フルオレニルメトキシカルボニル) - L - プロリン、B a c h e m カタログ番号 A - 2 2 3 5、70 mg N - ヒドロキシスクシンイミド (N H S) および 2 mL 無水 D M F を、磁気スターレーとともに 100 mL 丸底フラスコ中に入れた。混合物を氷冷メタノール槽上で冷却し、そして 0.2 mL の 3.5 M D C C (D M F 中のジシクロヘキシルカルボジイミド) で処理し、そして次いで、アルゴン下で 15 分間氷冷メタノール槽中で攪拌し、その後、さらに 0.1 mL の D C C 溶液を添加した。反応混合物をゆっくりと室温にしながら攪拌を続けた。反応混合物を、アルゴン下、室温で一晩、攪拌した。

20

【0178】

[00153] 1 mL の N - ベンジルエチレンジアミンおよび 5 mL 無水 D M F を、磁気スターレーとともに反応フラスコ中に入れた。フラスコにゴムのセプタムで蓋をし、そしてアルゴンを 15 分間パージした。D M F 溶液中の活性化された F M O C - P r o - O H を、シリンジを介して、D M F 溶液中の N - ベンジルエチレンジアミンにゆっくりと添加した。反応混合物をアルゴン下、周囲温度でさらに 6 時間攪拌した。

【0179】

[00154] 溶媒トラップを通じて真空ポンプに連結したロータリーエバポレーターを用いて、溶媒 (D M F) を除去した。蒸発装置コンデンサーコイル冷却剤 (1 : 1 エチレングリコール : 水) をおよそ - 15 にあらかじめ冷却した。1 : 9 ヘキサン : クロロホルムを溶出液として用いたカラム液体クロマトグラフィーを用いて、所望の生成物、化合物 4 7 を精製した。単離された化合物 4 7 収率は 65 ~ 75% であった。

30

【0180】

実施例 3 2 : スキーム 9、工程 2 : 脱保護

[00155] 200 mg の化合物 4 7 を清浄な 100 mL 一口丸底反応フラスコ内に移した。清浄なメスシリンダーを用いて、反応フラスコに 25 mL のジクロロメタンを添加した。反応混合物を周囲温度で約 5 分間攪拌し、清浄なメスシリンダーを用いて、25 mL のトリフルオロ酢酸を反応フラスコ内に添加した。反応フラスコにゴムのセプタムで蓋をし、そして周囲温度でおよそ 4 時間攪拌した。

40

【0181】

[00156] 吸引装置に連結したロータリーエバポレーターを用いて、溶媒 (ジクロロメタン) を除去した。2 : 8 メタノール : 塩化メチレン (ジクロロメタン) を溶出液として用いたカラム液体クロマトグラフィーを用いて、所望の生成物、化合物 4 1 を精製した。化合物 4 1 収率は 50 ~ 70% の範囲であった。

【0182】

実施例 3 3 : スキーム 8、工程 3 : アルキル化

[00157] 化合物 4 1 を、清浄な 100 mL 一口丸底フラスコ中に入れた。反応フラスコにゴムのセプタムで蓋をし、そしてアルゴンを 15 分間パージした。清浄なシリンジを用い、セプタムを通じて、20 mL の無水 N, N - ジメチルホルムアミドを反応フラスコ

50

に添加し、そして反応混合物を、アルゴン下、周囲温度で、さらに15分間攪拌した。清浄なシリンジを用い、セプタムを通じて、1滴ずつ、2 mLの2-プロモ酪酸エチルをフラスコに添加した。反応混合物をアルゴン下、周囲温度で10分間攪拌した。冷たい流水の水道水を伴うコンデンサーを反応フラスコ上に乗せ、そしてアルゴンラインをコンデンサーの最上部に設置した。70℃にあらかじめ加熱した油槽中に反応フラスコを浸し、そしてアルゴン下で40時間攪拌した。

【0183】

[00158]反応混合物を室温に冷却した。溶媒トラップを通じて真空ポンプに連結したロータリーエバポレーターを用いて、溶媒(DMF)を除去した。蒸発装置コンデンサー-オイル冷却剤(1:1エチレングリコール:水)をおよそ-15℃にあらかじめ冷却した。1:3アセトン:クロロホルムを溶出液として用いたカラム液体クロマトグラフィーを用いて、所望の生成物、化合物42を精製した。単離された化合物42収率は50~70%であった。

10

【0184】

実施例34:スキーム8、工程4:脱保護

[00159]20 mLの濃水酸化アンモニウムに、2.0 gの化合物42および0.1 g塩化アンモニウムを添加した。混合物を100℃で攪拌しながらおよそ7時間加熱し、そして次いで室温に冷却した。生じた沈殿物をろ過し、そして水およびジエチルエーテルで洗浄した。中間体の収率は60~70%であった。

【0185】

20

[00160]1.0 gの中間体を、清浄な100 mL一口丸底反応フラスコ内に移した。反応フラスコにゴムのセプタムで蓋をし、そして低流量のアルゴンでおよそ15分間バージした。清浄なシリンジを用いて、反応フラスコに20 mLの無水エタノールを添加した。混合物を、アルゴン下、周囲温度で、約5分間攪拌し、そして次いで、0.8 gのギ酸アンモニウムを固体粉末として反応フラスコ内に添加した。反応混合物をアルゴン下、周囲温度で5分間攪拌し、その後、5 mLの脱イオン水を添加した。ギ酸アンモニウムが完全に溶解するまで、アルゴン下、周囲温度でおよそ5分間、攪拌を続けた。110℃にあらかじめ加熱した油槽内に反応フラスコを浸し、そしてアルゴン下で約7時間攪拌した。

【0186】

[00161]1:9メタノール:酢酸エチルを溶出液として用いたカラム液体クロマトグラフィーを用いて、所望の生成物、化合物43を精製した。単離された所望の生成物の収率はおよそ50%であった。

30

【0187】

実施例35:スキーム8、工程5:レベチラセタム免疫原の調製

[00162]8 mL pH 7.2 PBS(0.1 Mリン酸ナトリウム、0.15 M塩化ナトリウム)中の160 mgのKLHの溶液を氷槽中で冷却した。約12 mLのDMSOをKLH溶液に1滴ずつ添加し、そして室温未満に維持した。

【0188】

[00163]1.0 mL無水DMF中の29 mgの化合物43の溶液を0.2 mL無水N,N-ジイソプロピルエチルアミンに添加した。別個の丸底フラスコに、48 mgのCDI(カルボニルジイミダゾール)および1 mL無水DMFを添加した。

40

【0189】

[00164]約10分間の期間に渡って、シリンジを介して1滴ずつ、化合物43を含有する溶液をCDI/DMF溶液に添加し、そして次いで、氷槽中でおよそ5時間攪拌した。

[00165]シリンジを用いて、化合物43/CDI溶液をKLH溶液に1滴ずつ20分間に渡って添加した。混合物を2~8℃で一晩攪拌した。生じた免疫原、化合物44を透析チューブ(10,000 MWカットオフ)に入れて、そして1 LのpH 7.2 PBS中の30% DMSO、次いで、1 LのpH 7.2 PBS中の10% DMSO中で、4℃で連続透析し、そしてその後、pH 7.2 PBSと4回交換した(各1 Lで少なくとも各6時間)。

50

## 【0190】

実施例36：スキーム8、工程6：レベチラセタム・コンジュゲートの調製

[00166] 2.5 mL pH 7.2 PBS (0.1 M リン酸ナトリウム、0.15 M 塩化ナトリウム) 中の 400 mg のウシ血清アルブミン (BSA) の溶液を氷槽中で冷却した。約 1.6 mL の DMSO を K L H 溶液に 1 滴ずつ添加して、そして室温未満で維持した。

## 【0191】

[00167] 1.0 mL 無水 DMF 中の 28 mg の化合物 43 の溶液を 0.2 mL 無水 N, N - ジイソプロピルエチルアミンに添加した。別個の丸底フラスコに、48 mg のカルボニルジイミダゾール (CDI) および 1 mL 無水 DMF を添加した。

## 【0192】

[00168] 10 分間の期間に渡って、シリンジを介して 1 滴ずつ、化合物 43 を含有する溶液を CDI / DMF 溶液に添加し、そして次いで、氷槽中で約 5 時間攪拌した。

[00169] 次いで、シリンジを用いて、溶液をタンパク質溶液に 1 滴ずつ 20 分間に渡って添加した。混合物を 2 ~ 8 で一晩攪拌した。生じたレベチラセタム・コンジュゲート、化合物 45 を透析チューブ (10,000 MW カットオフ) に入れて、そして 1 L の pH 7.2 PBS 中の 30% DMSO、次いで、1 L の pH 7.2 PBS 中の 10% DMSO 中で、4 で連続透析し、その後、pH 7.2 PBS と 4 回交換した (各 1 L で少なくとも各 6 時間)。

## 【0193】

実施例37：抗体産生

[00170] 上述のように、免疫原を用いて、LEV と特異的に結合するポリクローナル抗体を調製する。より具体的には、K L H 免疫原性部分を有する免疫原 18a、27、37、および 44 を用いて、抗レベチラセタム・ポリクローナル抗体を生成する。約 0.5 mL の免疫原含有組成物を、約 0.5 mL のフロイントのアジュバントと混合することによって、免疫原性組成物を調製する。次いで、生じた 1 mL 免疫原性カクテルを動物、例えばヒツジ、ヤギ、ウサギまたは他の哺乳動物に注射する。抗レベチラセタム・ポリクローナル抗体産生を誘導するため、同様の免疫原性カクテルを用いた続く免疫原性注射を、およそ 4 週間ごとに動物に投与する。

## 【0194】

[00171] 抗体組成物には、少なくとも 1 つの結合ドメインを有する抗レベチラセタム抗体が含まれてもよく、ここで、抗体は、患者標本中に存在する LEV に結合可能であるか、または LEV 誘導体に結合可能である。また、抗体は、少なくとも約 1 : 5,000、または少なくとも約 1 : 10,000、または少なくとも約 1 : 50,000、または少なくとも約 1 : 100,000、または少なくとも約 1 : 300,000 の力価で存在しうる。アッセイ条件に応じて、1 : 5,000 程度に低いかまたは 1 : 300,000 程度に高い抗体力価を有することが好ましい可能性もある。

## 【0195】

[00172] さらに、抗体はモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体であってもよい。抗体は、均一、不均一、またはその他の免疫診断アッセイで使用するのに十分である、LEV に比較した LEV 誘導体に対するアフィニティ、特異性、またはアビディティの少なくとも 1 つを有してもよい。こうしたものとして、抗体および LEV 誘導体間の相互作用は、患者標本中に存在する LEV に対する抗体のアフィニティ、特異性、またはアビディティの少なくとも 1 つの少なくとも 50%、さらにより好ましくは、LEV に対する抗体のアフィニティ、特異性、またはアビディティの少なくとも 1 つの少なくとも 70%、最も好ましくは、LEV に対する抗体のアフィニティ、特異性、またはアビディティの少なくとも 1 つの少なくとも 90% であってもよい。場合によって、LEV 誘導体に対する抗体のアフィニティ、特異性、またはアビディティの少なくとも 1 つは、LEV に対するものと実質的に同じである。

## 【0196】

実施例38：抗体力価の決定

【00173】当該技術分野に知られるようなELISAイムノアッセイにおける成績によって、抗体をスクリーニングした。ELISAアッセイに用いるためのマルチウェルプレートを調製して、実施例37に記載するように調製したポリクローナル抗体を試験した。抗レベチラセタム抗体に曝露する前に、異なるマルチウェルプレート中のウェルの底にLEV誘導体をコーティングすることによって、レベチラセタム誘導体、すなわち化合物18bおよび19を、抗体に結合するための抗原として用いた。より具体的には、レベチラセタム誘導体をコーティング緩衝液中で希釈し、そして次いでマルチウェルプレートのウェルに添加した。37で約60分間インキュベーションした後、コーティング緩衝液中の溶媒をデカントし、そしてBSAまたはカゼインを含有するブロッキング緩衝液をプレートに添加した。プレートを再び37で60分間インキュベーションし、そしてブロッキング緩衝液中の溶媒をプレートからデカントした。いくつかのELISAプレートは、調製後、数時間以内に使用されたが、他のものは、ウェル中にブロッキング溶液を含んだまま、2~8で最長1週間保存された。

10

## 【0197】

【00174】上記のように調製したELISAプレートを用いて、実施例37にしたがって、特に免疫原18aを用いて調製したポリクローナル抗体に関する抗体力価を決定した。1:10~1:2000の間、10倍増分の抗体の連続希釈を、pH7.4であり、そして0.1%BSAを含有するPBS中で調製した。100 $\mu$ L体積の各希釈をELISAプレート上の別個のウェルに添加した。プレートを37でおおよそ60分間インキュベーションし、そしてpH7.4で0.05% Tween 20を含む250 $\mu$ LのPBSで3回洗浄した。次に、pH7.4であり、そして0.1%BSAを含有する125 $\mu$ LのPBS中の酵素コンジュゲート化二次抗体(抗ヒツジIgG抗体)をプレートの各ウェルに添加した。あるいは、抗レベチラセタム抗体を酵素または他の検出可能標識に直接コンジュゲート化してもよく、そして酵素標識二次抗体を添加する工程を除いてもよい。プレートを37でおおよそ60分間インキュベーションした。プレートのウェルを上述のように洗浄した。洗浄後、約125 $\mu$ LのABTS基質を各ウェルに添加し、そしてマルチウェルプレートを再び20分間インキュベーションした。405nmの波長でマルチウェルプレート読み取り装置を用いて吸光度値を得て、そして力価値を計算した。力価結果を表3に提供する。

20

## 【0198】

表3

30

## 【0199】

## 【表3】

ELISA 力価			
ヒツジ番号	免疫原	抗原 18b	抗原 19
5433	18a	62000	75600
5478	18a	151000	147000
5479	18a	73500	68200

40

## 【0200】

実施例39:抗体アビディティの決定

【00175】結合阻害研究によって、免疫原18aを用いて調製した抗レベチラセタム抗体の、多様なレベチラセタム誘導体に対するアビディティを決定した。pH7.4で0.1%BSAを含む1mLのPBS中で試料を調製した。30%Bmax力価または50%Bmax力価を有する組成物を用いて、実施例38で得られるような力価値を、おおよそ半分力価値にした。30%Bmaxを用いて、試料調製段階中、1:10000の抗体力価を1:5000に希釈した。異なる濃度またはキャリブレーター値(0.5、10、20、40、80 $\mu$ g/ml)の約50 $\mu$ Lのレベチラセタムを実施例38にしたがって調製されるようなプレートに適用した。約50 $\mu$ Lの希釈抗体をプレート内に分配して、そし

50

てプレート中の組成物を水平プレート振盪装置上で1分間混合した。プレートの第一列には、レベチラセタムもまた抗レベチラセタム抗体も添加せず、これは陰性対照として働いた。抗レベチラセタム抗体を含むがレベチラセタムを含まない第二列を陽性対照として用いた。プレートを60分間インキュベーションし、そしてpH7.4で0.05% Tween 20を含む250 $\mu$ LのPBSで3回洗浄した。約125 $\mu$ Lの例えばpH7.4のPBS中の希釈誘導体、例えば18bまたは19をプレートの各ウェルに添加した。プレートを37 $^{\circ}$ Cで60分間インキュベーションし、そして上述のように洗浄した。およそ125 $\mu$ LのABTS基質をプレートの各ウェルに添加し、そして20分間インキュベーションした。405nmでマルチウェルプレート読み取り装置を用いて、吸光度値を得て、そして結果を表4に提供する。

10

【0201】

表4

【0202】

【表4】

ヒツジ番号 5479	抗原 18b		抗原 19	
レベチラセタム ( $\mu$ g/mL)	Abs.	B/Bo	Abs.	B/Bo
0	0.83	1.00	0.86	1.00
5	0.80	0.96	0.84	0.98
10	0.81	0.98	0.78	0.91
20	0.75	0.90	0.74	0.86
40	0.73	0.88	0.67	0.78
80	0.72	0.87	0.66	0.77

20

【0203】

[00176]本明細書において、用語「ハプテン」は、部分的または不完全抗原を指すよう意味され、そして小分子または薬剤であることも可能である。また、ハプテンは、タンパク質不含またはポリペプチド不含物質である低分子量分子であることも可能である。通常、ハプテンは、単独で抗体形成を刺激することは不可能であるが、抗体と相互作用することは可能でありうる。したがって、本発明にしたがったLEVおよびLEV誘導体はハプテンであることも可能である。

30

【0204】

[00177]本明細書において、用語「類似体」または「誘導体」は、1またはそれより多い化学反応によって、親化合物または分子から作製される化学化合物または分子を指すよう意味される。こうしたものとして、類似体は、LEVの構造に類似であるかまたはLEV骨格に基づくが、特定の構成要素または構造的組み立てに関して、LEVと異なる構造を持つ化合物であってもよく、代謝的に類似の作用または反対の作用を有することも可能である。本発明記載のLEVの類似体または誘導体を用いて、類似体およびLEVの両方を認識する抗体との結合に関して競合させることも可能である。また、類似体には、リンカー基を通じて、LEVにカップリングした作用基が含まれることも可能である。

40

【0205】

[00178]本明細書において、用語「抗原」は、抗体または別の免疫系構成要素によって認識されることが可能な分子を指すよう意味される。

[00179]本明細書において、用語「免疫原」および「免疫原性」は、生物において、免疫応答を産生するかまたは生成することが可能な物質を指すよう意味される。免疫原は、一般的に、特定のタイプの抗原であると見なされる。別の言い方をすると、免疫原は免疫応答を誘導可能であり、一方、抗原は、ひとたび作製されたならば、免疫応答の生成物と組み合わせることが可能である。こうしたものとして、免疫原はまた、抗原でもありうる。通常、免疫原は、かなり高い分子量(例えば10,000ダルトンより大きい)を有し、したがって、本発明記載の免疫原を形成するため、タンパク質、リポタンパク質、多糖

50

、いくつかの核酸、および特定のタイコ酸などの多様な巨大分子をハプテンにカップリングしてもよい。

【0206】

[00180]本明細書において、用語「免疫原性」は、分子が免疫応答を誘導する能力を指すよう意味され、これは、注射される分子に固有の化学構造によって、そして宿主動物が化合物を認識可能であるかどうかによっての両方で決定される。抗原の構造における小さい変化が、化合物の免疫原性を非常に改変することも可能であり、そしてこうした変化は、特に、よく保存されている抗原に対する抗体が作製される見込みを増加させる一般的な方法として、広範囲に用いられてきた。例えば、これらの修飾技術は、免疫原の領域を改変して、T細胞結合のためによりよい部位を提供するか、またはB細胞結合のために新規のエピトープを暴露するかいずれかである。

10

【0207】

[00181]本明細書において、用語「キャリアー」、「免疫原性部分」、または「免疫原性キャリアー」は、ハプテンにカップリング可能な免疫原性物質、一般的にはタンパク質である、作用基を指すよう意味される。ハプテンにカップリングした免疫原性部分は、免疫応答を誘導可能であり、そしてハプテンと特異的に結合可能な抗体の産生を誘発可能である。免疫原性部分は、異質(foreign)と認識され、そしてしたがって宿主から免疫学的応答を誘発する、タンパク質、ポリペプチド、糖タンパク質、複合多糖、粒子、核酸、ポリヌクレオチド等を含む作用基である。さらに、リンカーは、修飾または非修飾ヌクレオチド、ヌクレオシド、ポリマー、糖および他の炭水化物、例えばポリエチレングリコールなどのポリエーテル、ポリアルコール、ポリプロピレン、プロピレングリコール、エチレンおよびプロピレングリコールの混合物、ポリアルキルアミン、スペルミジンなどのポリアミン、ポリ(アクリル酸エチル)などのポリエステル、ポリホスホジエステル、およびアルキレンを含むことも可能である。作用基およびそのリンカーの例は、コレステロール-TEG-ホスホロアミダイトであり、ここでコレステロールは作用基であり、そしてテトラエチレングリコールおよびホスフェートがリンカーとして働く。

20

【0208】

[00182]1つの例において、作用基は、免疫原性を刺激し、そしてハプテンに対する抗体形成を刺激するため、ハプテンにカップリングさせることが可能な、免疫原性キャリアーである。通常、免疫原性キャリアーは、非常に免疫原性であり、そしてハプテンに対して免疫原性を与えることが可能な、巨大分子である。例えば、異質のタンパク質は、こうした免疫学的応答を誘発可能であるため、タンパク質を免疫原性キャリアーとして使用することも可能である。タンパク質キャリアーは高溶解性であることも可能であり、そしてハプテン分子との容易なコンジュゲート化を促進可能な官能基を含むことも可能である。今日用いられている最も一般的なキャリアータンパク質のいくつかは、キーホールリンペット・ヘモシアニン(KLH; MW 450,000~13,000,000)およびウシ血清アルブミン(BSA; MW 67,000)である。キーホールリンペット・ヘモシアニンは、海生キーホールリンペットの酸素運搬タンパク質であり、そして非常に巨大であり、そして解離させてサブユニットにすると、増加した免疫原性を示すが、これはおそらく、さらなるエピトープ部位が免疫系に曝露されるためである。BSAは、コンジュゲート化に適した多くの官能基を含有する、高溶解性のタンパク質である。

30

40

【0209】

[00183]本明細書において、用語「抗体」は、体における異質の分子の存在に反応して産生されるタンパク質を指すよう意味される。これらは、抗原、および特殊化細胞または免疫系のタンパク質の両方に結合する能力によって、特徴付け可能である。抗体は、5つのクラス、IgG、IgM、IgA、IgE、およびIgDに分けられ、そして形質細胞によって産生される免疫グロブリンである。

【0210】

[00184]本明細書において、用語「エピトープ」は、抗体と相互作用する抗原の領域を定義するよう意味される。したがって、抗原である分子または他の物質には、抗体活性を

50

伴う少なくとも1つのエピトープが含まれる。これは、抗原が、同じ抗体または異なる抗体によって認識される多様なエピトープを有することを許容する。また、エピトープは任意の特定の構造の固有の特性ではないが、抗体と相互作用する結合部位として定義することも可能である。

【0211】

[00185]本明細書において、用語「アフィニティ」は、エピトープおよび抗体間の結合の強度の測定値を指すよう意味される。したがって、単一の抗体は、多様なエピトープに対して、異なるアフィニティを有することも可能である。これは、単一の抗体が、1つのエピトープに強く結合し、そして別のエピトープにより弱く結合することを許容する。こうしたものとして、抗体は、LEVなどの薬剤に対する第一のアフィニティを有し、そしてLEV誘導体に対する第二のアフィニティを有することも可能である。しかし、抗体が、LEVおよびLEV誘導体の両方に実質的に同等なまたは類似のアフィニティを有することが可能であり、これは、類似体を用いて、LEVに対する抗体を生成し、そして競合的結合研究において使用することを許容する。したがって、本発明記載のLEV誘導体を用いて、LEVに対するアフィニティを持つ抗体を生成することも可能である。

10

【0212】

[00186]本明細書において、用語「アビディティ」は、抗体および抗原間の複合体の全体の安定性の測定値を指すよう意味される。抗体-抗原相互作用の全体の安定性は、以下のような3つの主な要因によって支配される：(a) エピトープに対する抗体の固有のアフィニティ；(b) 抗体および抗原の価数；および(c) 相互作用構成要素の幾何学的配置。こうしたものとして、前述のパラメーターならびに他のパラメーターを変化させることによって、抗体-抗原複合体のアビディティを調節することも可能である。

20

【0213】

[00187]本明細書において、用語「特異性」は、他の利用可能なエピトープと比較した、エピトープと抗体の優先的な結合を指すよう意味される。すなわち、抗体の特異性は、LEV代謝物ではなく、LEVおよび/または類似体に優先的に結合可能である。これを用いて、不都合な抗体-代謝物結合が混入しないようにして、LEVの真の濃度を評価可能であるように、代謝物よりもLEVと優先的に結合する、抗LEV抗体を生成することも可能である。また、LEVとの結合に関する抗体の特異性を用いて、LEVと類似かまたは実質的に同じ特異性を持つ類似体を仕立てることも可能である。

30

【0214】

[00188]本明細書において、用語「ポリクローナル抗体」は、所定の抗原またはエピトープに対して、広い範囲の特異性およびアフィニティを持つ抗体の異種混合物を指すよう意味される。したがって、ポリクローナル抗体には、各々他のものと区別可能であり、抗原と結合するかまたは別の方式で相互作用する、複数の抗体が含まれる。エピトープを有する免疫原を動物内に注射し、そして適切な時間が経過した後、関心対象の抗体を含有する血液分画を収集し、そして場合によって精製することによって、ポリクローナル抗体を含む異なる抗体を産生するかまたは生成することも可能である。抗体を産生する際、ポリクローナル抗体に関して、最終的な使用について、いくつかのパラメーターを考慮してもよい。これらのパラメーターには以下のものが含まれる：(1) 抗体の特異性(すなわち抗原間を区別する能力)；(2) 抗体のアビディティ(すなわちエピトープに結合する強度)；および(3) アッセイ系における抗体の最適な希釈を決定する、抗体の力価。

40

【0215】

[00189]本明細書において、用語「モノクローナル抗体」は、通常の抗体産生細胞および1つの前駆細胞の培養物から単離された抗体を指すよう意味される。モノクローナル抗体は、均一な結合定数を有することが可能であり、そして当該技術分野に周知である。

【0216】

[00190]本明細書において、「抗体力価」は、血清希釈の逆数を指すよう意味される。より好適な報告および形式化のため、この方式で力価を報告する。1/50000の力価は、抗原が1:50000の希釈である場合に、抗体が、一緒に結合した抗原のエピトー

50

プを有効に検出することを意味する。力価は、最大O.D.の約10%を有する終点力価によって計算される。

【0217】

[00191]本明細書において、用語「イムノアッセイ」または「免疫診断」は、生物学的試料における特定の抗原または特定の抗体の少なくとも1つを同定し、および/または定量化するため、抗原および抗体間の結合を利用する実験技術を指すよう意味される。現在、3種のイムノアッセイがあり、以下のように説明される：(1)抗体捕捉アッセイ；(2)抗原捕捉アッセイ；および(3)2抗体サンドイッチアッセイ。さらに、新規イムノアッセイが開発され、そしてこうしたアッセイが本発明の類似体および抗体を使用可能であろうことが意図される。

10

【0218】

[00192]本明細書において、用語「競合的イムノアッセイ」は、既知の量の同定可能な抗原が、抗体との結合に関して、別の抗原と競合する、実験プロトコルを指すよう意味される。すなわち、既知の抗体と結合する既知の抗原を、その既知の抗体とも結合する別の抗原を含有すると推測される試料と合わせる。これは、該抗体上の結合部位に関して、既知の抗原および別の抗原の両方が競合することを許容する。例えば、抗LEV抗体と結合するLEV誘導体を、LEVを含有すると推測される試料と合わせることも可能であり、そして類似体およびLEVが、抗LEV抗体との結合に関して競合することも可能である。次いで、抗体との結合に関する競合を用いて、試料中にLEVが存在するかどうかを決定することも可能であり、そしてさらに、競合を用いて、試料中のLEVの量を定量化することも可能である。

20

【0219】

[00193]本明細書において、用語「比濁検出」は、凝集した粒子によって散乱される光による、入射光の透過における強度の減少、または吸光度の増加の測定値を指すよう意味される。透過光の強度の減少は、より高い透過光出発バックグラウンド強度に対して測定される。通常、読み取りは、光源と一列になった検出装置で行われ、粒子の凝集が透過光を阻害する。したがって、LEVなどのターゲット分析物の存在を評価するための手段として、凝集の阻害または促進を用いることも可能である。比濁アッセイは、多様な臨床分析装置に容易に適応可能である。

【0220】

[00194]本明細書において、用語「微粒子凝集アッセイ」は、ターゲット分析物による微粒子の凝集を阻害する原理を用いるイムノアッセイを指すよう意味される。すなわち、凝集の減少は、ターゲット分析物の存在に起因する。例えば、ターゲット薬剤の誘導体が微粒子表面に共有結合し、および/または増感粒子はモノクローナル抗体によって凝集する。試料が遊離薬剤を含有する場合、凝集は薬剤濃度に比例して阻害され、これによって、薬剤濃度を吸光度と関連させる古典的な阻害曲線が導かれる。

30

【0221】

[00195]本明細書において、用語「作用基」は、リンカー基を通じてLEVにカップリングした分子または巨大分子を指すよう意味される。作用基には、免疫原性部分、抗原部分、トレーサー部分等が含まれることも可能である。さらに、本明細書記載の化学的骨格中のZ基が作用基である。こうしたものとして、作用基をYリンカー基にカップリングさせて、そしてLEV誘導体にさらなる官能性を提供することも可能である。

40

【0222】

[00196]本明細書において、用語「活性エステル」または「活性化エステル」は、例えばペプチドおよびタンパク質などの化合物の遊離アミノ基と反応可能なエステル基を指すよう意味される。活性エステルには、活性脱離基に連結されたカルボキシル基が含まれることも可能である。しばしば、活性脱離基には、エステル酸素が含まれ、したがって活性脱離基はエステル酸素を取り除く。例えば活性エステルは、一級アミンによる置換に感受性であり、これによって、エステル酸素の除去およびアミド基の形成が生じる。活性エステルを形成する活性脱離基の例には、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)、p-ニ

50

トロフェニル、ペンタフルオロフェニル、N - ヒドロキシベンゾトリアゾリル等が含まれる。したがって、用語「NHS」の使用は、N - ヒドロキシスクシンイミドとして定義されるよう意味される。

#### 【0223】

[00197]本明細書において、用語「標識」、「検出分子」または「トレーサー」は、検出可能シグナルを生じるかまたは生じるように誘導可能ないかなる作用基も指すよう意味される。標識をLEV、LEV誘導体合成系出発物質および/または中間体、LEV誘導体、ハプテン、分析物、免疫原、抗体、あるいは受容体または受容体に結合可能な分子などの別の分子にコンジュゲート化することも可能である。トレーサーの限定されない例には、放射性同位体、酵素、酵素断片、酵素基質、酵素阻害剤、補酵素、触媒、フルオロフォア、色素、化学発光剤、発光剤、増感剤、非磁気または磁気粒子、固体支持体、リポソーム、リガンド、受容体、ハプテン放射性同位体等が含まれる。本明細書に記載するように、例えば、LEV誘導体合成出発物質および/または合成中間体を多様なトレーサー部分（例えばフルオロフォア）にカップリングして、これを、合成反応において、出発物質および生成物を追跡するために使用してもよい。また、本明細書にも記載するように、当該技術分野に周知の方法によって、LEV誘導体を多様な標識にカップリングして、多様なイムノアッセイ形式において有用な多様な試薬を提供することもまた可能である。イムノアッセイの結果を検出するため、フルオロフォア、例えばフルオレセイン、放射標識、または化学発光基などの検出分子を、類似体にカップリングしてトレーサーを産生することも可能である。

10

20

#### 【0224】

[00198]本明細書において、用語「連結基」または「リンカー」は、例えばLEV、LEV誘導体、ハプテン、および作用基、例えば免疫原性部分、キャリアー、免疫原、標識、トレーサー等の2またはそれより多い下部構造を連結する化学構造部分を指すよう意味される。連結基は、下部構造間に渡る、水素（または他の一価の原子）以外の原子の少なくとも1つの中断されない鎖を有しうる。通常、連結基には、置換されていてもまたは置換されていなくてもよい炭素原子またはヘテロ原子の鎖が含まれる。連結基の原子および連結基内の鎖の原子は、化学的結合によって相互連結可能である。例えば、リンカーは直鎖または分枝鎖、置換または非置換、飽和または不飽和鎖であることも可能であり、鎖の原子には炭素および/またはヘテロ原子が含まれることも可能である。これには、鎖内または鎖末端の1またはそれより多いヘテロ原子も含まれうる。さらに、連結基にはまた、鎖の一部として、または鎖中の原子の1つに対する置換として、環状基および/または芳香族基も含まれてもよい。連結されている下部構造間の最短経路である、鎖の主鎖において、水素以外の原子の数を数えることによって、連結基またはリンカー中の原子の数を決定する。ハプテンをトレーサー、標識、キャリアー、免疫原性部分等とコンジュゲート化するため、連結基を用いて、利用可能な部位をハプテン上に提供することも可能である。

30

#### 【0225】

[00199]本明細書において、用語「ヘテロ原子」は、酸素、窒素、イオウ、リン等の炭素原子以外の原子を指すよう意味される。通常、連結基または他の部分で使用可能な、少なくとも2つの共有結合を形成するために、ヘテロ原子は多価である。

40

#### 【0226】

[00200]本明細書において、用語「生物学的試料」は、生物学的実体から得られる固体または液体試料を指すよう意味される。こうしたものとして、生物学的試料には、限定されるわけではないが、ヒトおよび他の動物などの、生物、または以前生存していたものに由来する、いかなる量の物質も含まれうる。こうした物質には、限定されるわけではないが、血液、血清、血漿、尿、涙、細胞、臓器、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、皮膚等が含まれうる。

#### 【0227】

[00201]本明細書において、用語「患者」は、ヒトおよび他の動物被験体を指すよう意味される。より詳細には、患者は、LEVなどの抗癲癇薬剤を必要としているヒトまたは

50

他の動物被験体である。

【0228】

[00202]LEV誘導体には、リンカー部分にカップリングしたLEV分子が含まれることも可能であり、そして場合によって作用基が含まれる。リンカー部分および作用基は、LEVの物理化学的特性を修飾可能な、広い範囲の任意の化学化合物であってもよい。したがって、リンカー部分は、アルキル、脂肪族、直鎖脂肪族、分枝鎖脂肪族、置換脂肪族、環状脂肪族、複素環脂肪族、芳香族、複素環芳香族、多環芳香族等で構成されることも可能である。

【0229】

[00203]本明細書において、用語「脂肪族」は、直鎖または分枝鎖、飽和または不飽和、および/または置換または非置換であることも可能であり、主鎖中に20またはそれより少ない炭素またはヘテロ原子を有する、アルキル基などのヒドロカルビル部分を指すよう意味される。さらに、脂肪族には、主鎖中に10またはそれより少ない炭素またはヘテロ原子が含まれることも可能である。脂肪族基は、直鎖、分枝鎖、環状および/または複素環である部分を含むことも可能であり、そしてエステル、ケトン、アルデヒド、カルボキシレート等の官能基を含有することも可能である。例示的な脂肪族基には、限定されるわけではないが、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、トリデシル、テトラデシル、ペンタデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシル、ノナデシル、エイコシル、より多数の炭素のアルキル基等、ならびに2-メチルプロピル、2-メチル-4-エチルブチル、2,4-ジエチルプロピル、3-プロピルブチル、2,8-ジブチルデシル、6,6-ジメチルオクチル、6-プロピル-6-ブチルオクチル、2-メチルブチル、2-メチルペンチル、3-メチルペンチル、2-エチルヘキシル等の置換および/または非置換基が含まれる。用語、脂肪族またはアルキルはまた、アルケニル基、例えばビニル、アリル、アラルキルおよびアルキニル基も含む。

【0230】

[00204]脂肪族基内の置換には、脂肪族部分において許容されうる任意の原子または基が含まれることも可能であり、これらには、限定されるわけではないが、ハロゲン、イオウ、チオール、チオエステル、アミン(一級、二級、または三級)、アミド、エーテル、エステル、アルコール、酸素等が含まれる。脂肪族基は、例えばまた、アゾ基、ケト基、アルデヒド基、カルボニル基、カルボキシル基、ニトロ、ニトロソまたはニトリル基、イミダゾールなどの複素環、ヒドラジノまたはヒドロキシルアミノ基、イソシアネートまたはシアネート基、ならびにスルホキシド、スルホン、スルフィド、およびジスルフィドなどのイオウ含有基などの修飾も含むことも可能である。さらに、置換は、適切であるかまたは可能である場合、単結合、二重結合、または三重結合を介してもよい。

【0231】

[00205]さらに、脂肪族基はまた、炭素原子の、例えば窒素、酸素、リン、またはイオウなどのヘテロ原子による置換である、ヘテロ置換も含有してもよい。こうしたものとして、置換脂肪族で構成されるリンカーは、炭素、窒素、酸素、イオウ、リン、および/または同様のもので構成される主鎖を有しうる。複素環置換は、1またはそれより多いヘテロ原子を有するアルキル環を指す。複素環部分の例には、限定されるわけではないが、モルホリノ、イミダゾール、およびピロリジノが含まれる。

【0232】

[00206]本明細書において、用語「芳香族」は、電子が原子の円形または環状配置周囲を自由に循環し、互いに交互に単結合および二重結合する分子を指すよう意味される。より適切には、これらの結合が単結合および二重結合のハイブリッドであり、環中の各結合が他のすべてと同一であるとして、理解することも可能である。

【0233】

[00207]本明細書において、用語「アミン」は、1つ、2つ、または3つの水素原子を、例えばアルキル基などの他の基によって置換することによって、アンモニアに直接また

10

20

30

40

50

は間接的に由来しうる部分を指すよう意味される。一級アミンは、 $RNH_2$  の一般構造を有し、そして二級アミンは  $R_2NH$  の一般構造を有する。用語、アミンには、限定されるわけではないが、メチルアミン、エチルアミン、プロピルアミン、イソプロピルアミン、アニリン、シクロヘキシルアミン、ベンジルアミン、多環アミン、ヘテロ原子置換アリールおよびアルキルアミン、ジメチルアミン、ジエチルアミン、ジイソプロピルアミン、ジブチルアミン、メチルプロピルアミン、メチルヘキシルアミン、メチルシクロプロピルアミン、エチルシクロヘキシルアミン、メチルベンジルアミン、メチルシクロヘキシルメチルアミン、ブチルシクロヘキシルアミン、モルホリン、チオモルホリン、ピロリジン、ピペリジン、2,6-ジメチルピペリジン、ピペラジン、およびヘテロ原子置換アルキルまたはアリール二級アミンが含まれる。

10

## 【0234】

[00208]本明細書において、用語「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、約200~2,000分子量または約2,000を超える分子量の範囲であり、あるいは分子量上限がなく、そして通常、10,000,000未満の分子量であり、そして通常、約600,000ダルトンを超えないであろう。通常、免疫原性キャリアーまたは酵素が関与するかどうかに応じて、異なる範囲があるであろう。

## 【0235】

[00209]本明細書において、用語「ペプチド」は、アミド(ペプチド)結合による2またはそれより多いアミノ酸の連結によって形成される任意の化合物を指すよう意味され、通常、直鎖において、各アミノ酸残基の -アミノ基( $NH_2$ 末端を除く)が、次の残基の -カルボキシル基に連結されている -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、本明細書において、サイズに関する制約なしに、このクラスの化合物を指すよう、同義に用いられる。このクラスの最大のメンバーは、定義されるポリペプチド配列を有し、タンパク質と称される。

20

## 【0236】

[00210]さらに、本発明を記載するため、本明細書に用いる用語は、前述の定義および/または当該技術分野に周知の定義を用いて解釈可能である。こうしたものとして、前述の命名法は、本発明を説明するよう意味され、そして限定するよう意図されない。

## 【0237】

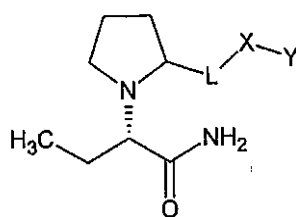
[00211]本発明の精神または本質的な特性から逸脱することなく、他の特定の形式で、本発明を具現することも可能である。記載する態様は、すべての観点で、単に例示的であり、そして限定的ではないと見なされる。したがって、本発明の範囲は、前述の説明によるのではなく、付随する特許請求の範囲によって示される。特許請求の範囲の意味および等価の範囲内に属するすべての変化が、その範囲内に含まれるものとする。

30

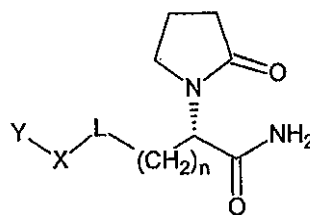
これらに限定されるものではないが、本発明は以下の態様の発明を包含する。

[1] 式1または式2:

## 【化24】



式1



式2

40

[式中:

nは、0~8の値を持つ整数であり;

50

Lは、 $\text{CH}_2$ 、 $\text{CO}$ 、 $\text{NHCO}$ 、 $\text{NHCOO}$ 、 $\text{CONH}$ 、 $\text{NH}$ 、 $\text{O}$ 、または $\text{S}$ 、およびその組み合わせからなる群の1つであり；

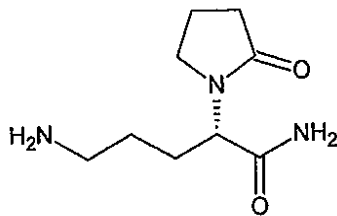
Xは、末端基、芳香族基、アリール基、あるいは1～10の炭素原子および/またはヘテロ鎖原子を有する飽和、不飽和、置換、非置換、直鎖、または分枝鎖脂肪族基であって、ヘテロ鎖原子が、酸素、窒素、イオウ、またはリン、およびその組み合わせからなる群より選択される、前記脂肪族基であり；そして

Yは場合により、そして存在する場合、アルコールアミン、アミド、カルボン酸、アルデヒド、エステル、イミノエステル、イソシアネート、イソチオシアネート、無水物、チオール、チオールアセトン、ジアゾニウム、 $\text{NHS}$ 、 $\text{CO-NHS}$ 、 $\text{O-NHS}$ 、マレイミドからなる群より選択される官能基の1つであり；または

Yは $Y_1-Z$ である、式中、 $Y_1$ は、 $\text{COO}$ 、 $\text{CO}$ 、 $\text{O}$ 、 $\text{CONH}$ 、 $\text{NHCO}$ 、または $\text{NH}$ からなる群より選択され、そしてZは作用基である；

但し、式2の化合物は、5-アミノ-2-(2-オキソピロリジン-1-イル)ペンタン酸アミド(式3)：

【化25】



式3

ではない]

のレベチラセタム(LEV)誘導体を含む化学組成物。

[2]作用基が、検出可能標識、抗原性キャリアー、カップリング剤、末端基、タンパク質、リポタンパク質、糖タンパク質、ポリペプチド、多糖、核酸、ポリヌクレオチド、タイコ酸、放射性同位体、酵素、酵素断片、酵素ドナー断片、酵素アクセプター断片、酵素基質、酵素阻害剤、補酵素、蛍光部分、燐光部分、反ストークス上方制御部分、化学発光部分、発光部分、色素、増感剤、粒子、微粒子、磁気粒子、固体支持体、リポソーム、リガンド、受容体、ハプテン放射性同位体、およびその組み合わせからなる群より選択される、[1]の方法。

[3]nが、0、1、2、または4の値を持つ整数であり；

Lが、 $\text{NHCOO}$ 、 $\text{NH}$ 、 $\text{NHCO}$ 、 $\text{CH}_2$ 、 $\text{CO}$ 、 $\text{S}$ 、または $\text{CONH}$ からなる群の1つであり；

Xが、 $\text{H}$ 、 $\text{OCH}_2-\text{Ph}$ 、 $\text{NH}$ 、 $\text{O}$ 、 $\text{O-NHS}$ 、 $\text{CH}_2$ 、 $\text{H}$ 、マレイミド- $\text{Ph}$ 、 $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$ からなる群の1つであり；そして

Yが場合により、そして存在する場合、 $\text{H}$ であり；または

Yが場合により、そして存在する場合、 $Y_1-Z$ である、式中、 $Y_1$ が $\text{CO}$ であり、そしてZが、 $-\text{NHS}$ 、 $-\text{BSA}$ 、または $-\text{KLH}$ からなる群の1つである；

[1]の化学組成物。

[4]式2のn、L、X、およびYまたは $Y_1-Z$ が：

n = 4、L =  $\text{NHCOO}$ 、およびX = t-ブチル；

n = 4、L =  $\text{NH}$ 、およびX =  $\text{H}$ ；

n = 4、L =  $\text{NHCO}$ 、およびX =  $\text{OCH}_2-\text{Ph}$ ；

n = 4、L =  $\text{NHCO}$ 、X =  $\text{OCH}_2-\text{Ph}$ 、および $Y_1-Z = \text{CO-NHS}$ ；

n = 4、L =  $\text{NHCO}$ 、X =  $\text{OCH}_2-\text{Ph}$ 、および $Y_1-Z = \text{CO-KLH}$ ；

n = 4、L =  $\text{NHCO}$ 、X =  $\text{OCH}_2-\text{Ph}$ 、および $Y_1-Z = \text{CO-BSA}$ ；

n = 4、L =  $\text{CH}_2$ 、X =  $\text{NH}$ 、および $Y_1-Z = \text{CO-BSA}$ ；

n = 2、L =  $\text{CO}$ 、およびX =  $\text{OCH}_2-\text{Ph}$ ；

10

20

30

40

50

- n = 2、L = CO、X = O、および Y = H；
- n = 2、L = CO、および X = O - NHS；
- n = 0、L = CH<sub>2</sub>、X = CH<sub>2</sub>、および Y<sub>1</sub> - Z = CO - KLH；
- n = 0、L = CH<sub>2</sub>、X = CH<sub>2</sub>、および Y<sub>1</sub> - Z = CO - BSA；
- n = 1、L = S、および X = CH<sub>2</sub> - Ph；
- n = 1、L = S、および X = H；
- n = 1、L = S、X = マレイミド - Ph、および Y<sub>1</sub> - Z = CO - BSA；または
- n = 1、L = S、X = マレイミド - Ph、および Y<sub>1</sub> - Z = CO - KLH；

からなる群より選択される、[ 1 ] の化学組成物。

[ 5 ] 式 1 の L、X、Y、および Y<sub>1</sub> - Z が：

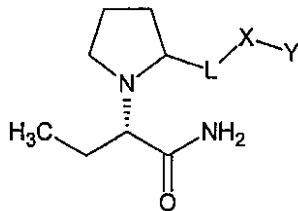
- L = CONH、X = CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - NH、および Y = H；
- L = CONH、X = CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - NH、および Y<sub>1</sub> - Z = CO - KLH；または
- L = CONH、X = CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - NH、および Y<sub>1</sub> - Z = CO - BSA；

からなる群より選択される、[ 1 ] の化学組成物。

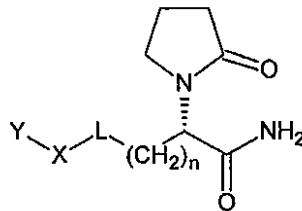
[ 6 ] 試料中の LEV の存在を検出するための免疫診断アッセイにおいて使用するためのキットであって：

式 1 または 式 2 ；

【化 2 6】



式 1



式 2

[ 式中：

- n は、0 ~ 8 の値を持つ整数であり；
- L は、CH<sub>2</sub>、CO、NHCO、NHCOO、CONH、NH、O、または S、およびその組み合わせからなる群の 1 つであり；
- X は、末端基、芳香族基、アリール基、あるいは 1 ~ 10 の炭素原子および / またはヘテロ鎖原子を有する飽和、不飽和、置換、非置換、直鎖、または分枝鎖脂肪族基であって、ヘテロ鎖原子が、酸素、窒素、イオウまたはリン、およびその組み合わせからなる群より選択される、前記脂肪族基であり；そして
- Y は場合により、そして存在する場合、アルコールアミン、アミド、カルボン酸、アルデヒド、エステル、イミノエステル、イソシアネート、イソチオシアネート、無水物、チオール、チオールアセトン、ジアゾニウム、NHS、CO - NHS、O - NHS、マレイミドからなる群より選択される官能基の 1 つであり；または
- Y は Y<sub>1</sub> - Z である、式中、Y<sub>1</sub> は、COO、CO、O、CONH、NHCO、または NH からなる群より選択され、そして Z は作用基である ]

の 1 つの化学構造を有する LEV 誘導体；および

少なくとも 1 つの結合ドメインを有する抗 LEV 抗体であって、LEV および / または LEV 誘導体に結合可能な部分を有する、ここで、抗体および LEV 誘導体間の相互作用は、LEV に対する抗体のアフィニティ、特異性、またはアビディティの少なくとも 1 つの少なくとも 50 % である、前記抗 LEV 抗体；を含む、前記キット。

[ 7 ] 作用基が、検出可能標識、抗原性キャリアー、カップリング剤、末端基、タンパク質、リポタンパク質、糖タンパク質、ポリペプチド、多糖、核酸、ポリヌクレオチド、タ

10

20

30

40

50

イコ酸、放射性同位体、酵素、酵素断片、酵素ドナー断片、酵素アクセプター断片、酵素基質、酵素阻害剤、補酵素、蛍光部分、燐光部分、反ストークス上方制御部分、化学発光部分、発光部分、色素、増感剤、粒子、微粒子、磁気粒子、固体支持体、リポソーム、リガンド、受容体、ハプテン放射性同位体、およびその組み合わせからなる群より選択される、[ 6 ]のキット。

[ 8 ] L E V 誘導体または抗 L E V 抗体の一方が、粒子、磁気粒子、微粒子、微小球体、支持体、酵素ドナー、または酵素アクセプターの 1 つとカップリングしている、[ 6 ]のキット。

[ 9 ] L E V のストック組成物；

異なる濃度の L E V を含有する一連の組成物、濃度勾配を形成する一連の組成物；

トレーサー・コンジュゲートを有する L E V 誘導体；

微粒子にカップリングした L E V 誘導体；

微粒子にカップリングした抗体；

酵素ドナーを有する L E V 誘導体、および対応する酵素アクセプター；

酵素アクセプターを有する L E V 誘導体、および対応する酵素ドナー；または  
過または沈降による分離に適した粒子上に装填された抗体；

の少なくとも 1 つをさらに含む、[ 6 ]のキット。

[ 10 ] 式 2 の  $n$ 、 $L$ 、 $X$ 、および  $Y$  または  $Y_1 - Z$  が：

$n = 4$ 、 $L = \text{NHCOO}$ 、および  $X = t\text{-ブチル}$ ；

$n = 4$ 、 $L = \text{NH}$ 、および  $X = \text{H}$ ；

$n = 4$ 、 $L = \text{NHCO}$ 、および  $X = \text{OCH}_2\text{-Ph}$ ；

$n = 4$ 、 $L = \text{NHCO}$ 、 $X = \text{OCH}_2\text{-Ph}$ 、および  $Y_1 - Z = \text{CO-NHS}$ ；

$n = 4$ 、 $L = \text{NHCO}$ 、 $X = \text{OCH}_2\text{-Ph}$ 、および  $Y_1 - Z = \text{CO-KLH}$ ；

$n = 4$ 、 $L = \text{NHCO}$ 、 $X = \text{OCH}_2\text{-Ph}$ 、および  $Y_1 - Z = \text{CO-BSA}$ ；

$n = 4$ 、 $L = \text{CH}_2$ 、 $X = \text{NH}$ 、および  $Y_1 - Z = \text{CO-BSA}$ ；

$n = 2$ 、 $L = \text{CO}$ 、および  $X = \text{OCH}_2\text{-Ph}$ ；

$n = 2$ 、 $L = \text{CO}$ 、 $X = \text{O}$ 、および  $Y = \text{H}$ ；

$n = 2$ 、 $L = \text{CO}$ 、および  $X = \text{O-NHS}$ ；

$n = 0$ 、 $L = \text{CH}_2$ 、 $X = \text{CH}_2$ 、および  $Y_1 - Z = \text{CO-KLH}$ ；

$n = 0$ 、 $L = \text{CH}_2$ 、 $X = \text{CH}_2$ 、および  $Y_1 - Z = \text{CO-BSA}$ ；

$n = 1$ 、 $L = \text{S}$ 、および  $X = \text{CH}_2\text{-Ph}$ ；

$n = 1$ 、 $L = \text{S}$ 、および  $X = \text{H}$ ；

$n = 1$ 、 $L = \text{S}$ 、 $X = \text{マレイミド-Ph}$ 、および  $Y_1 - Z = \text{CO-BSA}$ ；または

$n = 1$ 、 $L = \text{S}$ 、 $X = \text{マレイミド-Ph}$ 、および  $Y_1 - Z = \text{CO-KLH}$ ；

からなる群より選択される、[ 6 ]のキット。

[ 11 ] 式 1 の  $L$ 、 $X$ 、 $Y$ 、および  $Y_1 - Z$  が：

$L = \text{CONH}$ 、 $X = \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$ 、および  $Y = \text{H}$ ；

$L = \text{CONH}$ 、 $X = \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$ 、および  $Y_1 - Z = \text{CO-KLH}$ ；または

$L = \text{CONH}$ 、 $X = \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$ 、および  $Y_1 - Z = \text{CO-BSA}$ ；

からなる群より選択される、[ 6 ]のキット。

[ 12 ] 試料中の L E V の存在を検出するための免疫診断システムにおいて使用するための抗体組成物であって：

L E V 誘導体を含む免疫原性組成物によって産生される抗 L E V 抗体であって、L E V 誘導体が、式 1 または式 2：

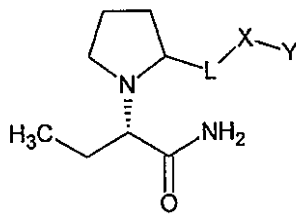
10

20

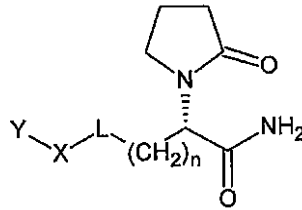
30

40

## 【化27】



式1



式2

10

[ 式中 :

n は、0 ~ 8 の値を持つ整数であり ;

L は、CH<sub>2</sub>、CO、NHCO、NHCOO、CONH、NH、O、またはS、およびその組み合わせからなる群の1つであり ;

X は、末端基、芳香族基、アリール基、あるいは1 ~ 10 の炭素原子および / またはヘテロ鎖原子を有する飽和、不飽和、置換、非置換、直鎖、または分枝鎖脂肪族基であって、ヘテロ鎖原子が、酸素、窒素、イオウ、またはリン、およびその組み合わせからなる群より選択される、前記脂肪族基であり ; そして

Y はY<sub>1</sub> - Zである、式中、Y<sub>1</sub> は、COO、CO、O、CONH、NHCO、またはNHからなる群より選択され、そしてZは免疫原性部分である ]

20

の化学構造を有し ; そして

該抗LEV抗体が、LEVと結合可能な、および / またはLEV誘導体と結合可能な少なくとも1つの結合ドメインを有し、そして抗体およびLEV誘導体間の相互作用が、LEVに対する抗体のアフィニティ、特異性、またはアビディティの少なくとも1つの少なくとも50%である ;

前記抗LEV抗体を含む、前記抗体組成物。

[ 13 ] 免疫原性部分が、タンパク質、ポリペプチド、糖タンパク質、多糖、粒子、微粒子、核酸、ポリヌクレオチド、およびその組み合わせからなる群より選択される、[ 12 ] の抗体組成物。

30

[ 14 ] 免疫原性部分が、ウシ血清アルブミン (BSA)、キーホールリンペット・ヘモシアニン (KLH)、卵オボアルブミン、ウシ・ガンマ - グロブリン (BGG)、およびその組み合わせからなる群より選択されるタンパク質である、[ 13 ] の抗体組成物。

[ 15 ] 抗体がモノクローナル抗体である、[ 12 ] の抗体組成物。

[ 16 ] 抗体がポリクローナル抗体である、[ 12 ] の抗体組成物。

[ 17 ] LEVに比較したLEV誘導体に対する抗体のアフィニティ、特異性、またはアビディティの少なくとも1つが、均一または不均一免疫診断アッセイで使用するのに十分である、[ 12 ] の抗体組成物。

[ 18 ] 抗体およびLEV誘導体間の相互作用が、LEVに対する抗体のアフィニティ、特異性、またはアビディティの少なくとも1つの少なくとも70%である、[ 17 ] の抗体組成物。

40

[ 19 ] 抗体およびLEV誘導体間の相互作用が、LEVに対する抗体のアフィニティ、特異性、またはアビディティの少なくとも1つの少なくとも90%である、[ 17 ] の抗体組成物。

[ 20 ] 抗体が :

式1または式2の化学構造を有するLEV誘導体を含む免疫原性組成物の少なくとも第一の用量を投与し ;

抗体を産生する被験体から抗体を収集し ; そして

抗体を産生する被験体から収集した抗体を精製し、および / またはスクリーニングする ;

50

工程を含む方法によって産生される、[ 1 2 ] の抗体組成物。

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
A 6 1 P 25/08 (2006.01) C 0 7 D 207/27 Z  
A 6 1 P 25/08

(74)代理人 100173635

弁理士 吉田 樹里

(72)発明者 ウーヤン, アンロン

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 5 3 6, フレモント, スターニントン・テラス 3 8 8 1 3

(72)発明者 パトワーダン, アニルツダ

アメリカ合衆国インディアナ州 4 6 0 3 7, フィッシャーズ, ウェザーレッド・エッジ・ドライブ  
1 1 8 8 7

(72)発明者 アラブシャヒ, リリ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 5 3 8, フレモント, フレモント・ブルバード 4 6 3 6  
0

審査官 草川 貴史

(56)参考文献 特表 2 0 0 6 - 5 1 6 3 9 0 ( J P , A )

国際公開第 2 0 1 0 / 0 4 8 4 2 3 ( W O , A 1 )

特表 2 0 0 8 - 5 1 8 2 3 3 ( J P , A )

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

专利名称(译)	用于检测左乙拉西坦的衍生物，试剂和免疫测定		
公开(公告)号	<a href="#">JP5778137B2</a>	公开(公告)日	2015-09-16
申请号	JP2012515142	申请日	2010-06-10
申请(专利权)人(译)	Seradain公司		
当前申请(专利权)人(译)	Seradain公司		
[标]发明人	ウーヤンアンロン パトワーダンア Nil ッダ アラブシャヒリリ		
发明人	ウーヤン, アンロン パトワーダン, アン Nil ッダ アラブシャヒ, リリ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/531 A61K31/4015 C07D207/27 A61P25/08		
CPC分类号	A61P25/08 C07D207/16 C07D207/27 C07D403/12 C07K16/44 G01N33/9473		
FI分类号	G01N33/53.G G01N33/543.541.Z G01N33/543.501.N G01N33/531.A A61K31/4015 C07D207/27.Z A61P25/08		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫 中村光俊 吉田树里		
优先权	61/268339 2009-06-11 US 12/797348 2010-06-09 US		
其他公开文献	JP2012530245A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

**摘要(译)**  
左乙拉西坦 ( LEV ) 衍生物，合成LEV衍生物的方法和LEV的免疫诊断测定。本文所述的合成方法包括手性选择性液相合成步骤，以高产率生产选定的LEV衍生物。LEV衍生物可包括操作组，例如：可用于制备抗LEV抗体的免疫原性部分；抗原部分，可用于LEV的免疫诊断分析；或可用于免疫诊断测定的示踪剂部分。另外，LEV衍生物可用于免疫诊断测定以与LEV竞争抗LEV抗体。

(21) 出願番号	特願2012-515142 (P2012-515142)	(73) 特許権者	511302297
(86) (22) 出願日	平成22年6月10日 (2010.6.10)		
(65) 公表番号	特表2012-530245 (P2012-530245A)		セラダイン, インコーポレーテッド
(43) 公表日	平成24年11月29日 (2012.11.29)		アメリカ合衆国マサチューセッツ州024
(86) 国際出願番号	PCT/US2010/038185		54, ウォルサム, ワイマン・ストリート
(87) 国際公開番号	W02010/144712	(74) 代理人	100140109
(87) 国際公開日	平成22年12月16日 (2010.12.16)		弁理士 小野 新次郎
	審査請求日	平成25年5月14日 (2013.5.14)	(74) 代理人
(31) 優先権主張番号	61/268,339		100075270
(32) 優先日	平成21年6月11日 (2009.6.11)		弁理士 小林 泰
(33) 優先権主張国	米国 (US)		(74) 代理人
(31) 優先権主張番号	12/797,348		100080137
(32) 優先日	平成22年6月9日 (2010.6.9)		弁理士 千葉 昭男
(33) 優先権主張国	米国 (US)		(74) 代理人
			100096013
			弁理士 富田 博行
			(74) 代理人
			100126985
			弁理士 中村 充利