

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002 - 3500

(P2002 - 3500A)

(43)公開日 平成14年1月9日(2002.1.9)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 0 7 K 14/765		C 0 7 K 14/765	4 B 0 6 4
C 0 7 D457/06		C 0 7 D457/06	4 C 0 6 4
C 0 7 K 14/435		C 0 7 K 14/435	4 C 0 9 0
14/795		14/795	4 H 0 4 5
16/44		16/44	

審査請求 未請求 請求項の数 17 O L (全 16数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 108813(P2001 - 108813)

(22)出願日 平成13年4月6日(2001.4.6)

(31)優先権主張番号 60/196030

(32)優先日 平成12年4月7日(2000.4.7)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 09/733534

(32)優先日 平成12年12月8日(2000.12.8)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 591186073

ロシュ ダイアグノスティックス コーポ
レーション

アメリカ合衆国 46250 - 0457 インディア
ナ州 インディアナポリス ハーグ ロー
ド 9115

(72)発明者 ミタリ ゴーシャル

アメリカ合衆国 46038 インディアナ州
フィッシャーズ, ウィンドソー イースト
ドライブ 12257

(74)代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 LSDと2 - オキシ - 3 - ヒドロキシ - LSDのイムノアッセイ

(57)【要約】

【課題】新規LSDおよびイソ-LSD、酸化LSDの新規ハプテンおよび免疫原、該免疫原から誘導される抗体、ならびに該抗体を利用するイムノアッセイ法を提供する。

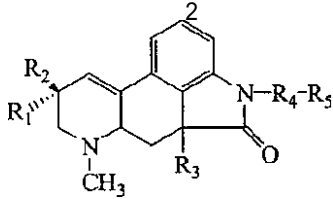
【解決手段】LSDと2-オキシ-3-ヒドロキシ-LSDの検出のためのイムノアッセイで使用される抗原、抗体および試薬の調製に有用なハプテン誘導体を提供する。2-オキシLSD核をインドール窒素から誘導体化し、アミノアルキル誘導体を形成する。続いて生じたハプテンを適当な免疫原性基または標識基に連結するための官能基化位置でさらに修飾し、LSDと2-オキシ-3-ヒドロキシ-LSDの両方に対して実質的に同等の特異性を有するイムノアッセイ用の試薬を提供する。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次式で示される化合物。

【化1】



【式中、

R_1 と R_2 は、Hと $\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ よりなる群から独立に選択されるが、ただし、 R_1 と R_2 の少なくとも1つはHであり、

R_3 はHまたはOHであり、

R_4 は、0~2個の不飽和結合と0~6個のヘテロ原子とともに1~10個の炭素原子を有する分枝状または直鎖状連結基であり、

R_5 は、 COR_6 と NHR_7 よりなる群から選択され、ここで R_6 は、OH、LまたはLXであり、 R_7 は、H、LまたはLXであり、Lは、連結基であり、Xは、Lを介して結合した検出体分子または担体分子である]

【請求項2】 R_1 は $\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ であり、 R_2 はHである、請求項1に記載の化合物。

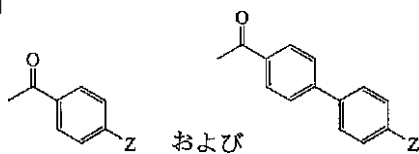
【請求項3】 R_3 はOHである、請求項2に記載の化合物。

【請求項4】 R_5 は COR_6 であり、 R_6 はOHである、請求項3に記載の化合物。

【請求項5】 R_5 は NHR_7 であり、 R_7 はHである、請求項3に記載の化合物。

【請求項6】 R_5 は NHR_7 であり、 R_7 は、

【化2】



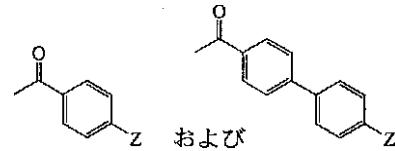
【式中、Zは、 COOH 、 SCN およびN-ヒドロキシスクシンイミドエステルよりなる群から選択される]よりなる群から選択される連結基Lである、請求項2に記載の化合物。

【請求項7】 R_5 は NHR_7 であり、 R_7 はLXであり、Xは、ウシチログロブリン、キーホールリンペットヘモシアニン、およびウシ血清アルブミンよりなる群から選択される担体分子である、請求項2に記載の化合物。

【請求項8】 R_5 は NHR_7 であり、 R_7 はLXであり、Xは検出体分子である、請求項2に記載の化合物。

【請求項9】 R_1 は $\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ であり、 R_2 はHであり、 R_3 はOHであり、 R_4 は $(\text{CH}_2)_3$ であり、 R_5 は NHR_7 であり、 R_7 は、

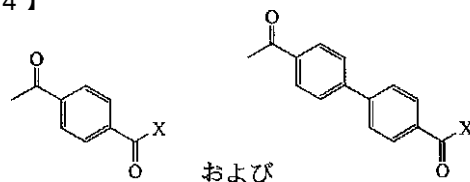
【化3】



【式中、Zは、 COOH 、 NCS およびN-ヒドロキシスクシンイミドエステルよりなる群から選択される]よりなる群から選択される連結基Lである、請求項1に記載の化合物。

10 【請求項10】 R_1 は $\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ であり、 R_2 はHであり、 R_3 はOHであり、 R_4 は $(\text{CH}_2)_3$ であり、 R_5 は NHR_7 であり、 R_7 は、

【化4】



20 【式中、Xは、検出体分子または担体分子である]よりなる群から選択される連結基Lである、請求項1に記載の化合物。

【請求項11】 Xは、ウシチログロブリン、キーホールリンペットヘモシアニン、およびウシ血清アルブミンよりなる群から選択される担体分子である、請求項10に記載の化合物。

【請求項12】 LSDに対して50%を超える交差反応性を有することを特徴とする、2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDに対して特異性を有する抗体。

30 【請求項13】 2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDに対して50%を超える交差反応性を有することを特徴とする、LSDに対して特異性を有する抗体。

【請求項14】 LSDと2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDに対して実質的に同等の交差反応性を有することを特徴とする、2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDの担体分子コンジュゲートから作成される抗体。

40 【請求項15】 Xが担体分子である請求項10に記載の化合物で免疫することにより産生される、LSDと2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDに対して実質的に同等の交差反応性を有することを特徴とする、2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDの担体分子コンジュゲートから作成される抗体。

【請求項16】 LSDと2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDを含有することが疑われるサンプル中のLSDと2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDを測定する方法であって、

a. 該サンプル、LSDと2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDに対して実質的に同等の交差反応性を有する抗体、ならびにLSDハプテンまたは2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDハプテンおよび検出可能な標識を含むコンジュゲートを含んでなる反応混合物を、該抗体が該LSD、該2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSD、および該コンジュゲートに結合するのに好ま

3

しい条件下で形成させる工程、

b. 該検出可能な標識の量を測定することにより、該抗体に結合した該コンジュゲートの量を測定する工程、

c. あらかじめ決められた量のLSDと2-オキシ-3-ヒドロキシ-LSDを含有するサンプルを使用した場合に該抗体に結合した該標識の量と工程(b)で測定された量を比較する工程、

とを含んでなる方法。

【請求項17】 サンプル中のLSDおよび/または2-オキシ-3-ヒドロキシ-LSDを検出するための、請求項12～15のいずれか1項に記載の抗体の使用。

【発明の詳細な説明】

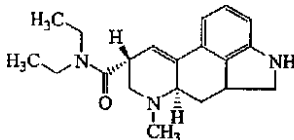
【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、2-オキシ-3-ヒドロキシ-リセルグ酸ジエチルアミド(LSD)のカルボキシル誘導体と、抗体産生の刺激用の免疫原を調製するためのこれらの誘導体の使用とに関する。本発明により産生される抗体は、LSDと2-オキシ-3-ヒドロキシ-LSDを測定するためのイムノアッセイにおいて有用である。本発明はまた、抗体スクリーニング法に関する。

【0002】

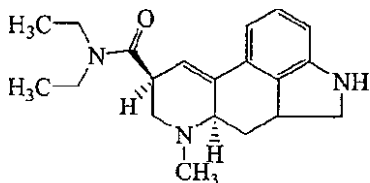
【従来の技術および発明が解決しようとする課題】LSDの化学構造は、9,10-ジデヒドロ-N,N-ジエチル-6-メチルエルゴリン-8-カルボキサミドであり、次式：

【化5】



で示される。LSDは、非常に強力な幻覚剤であり、典型的な投与範囲は25～150μgである。この薬物は、急速かつ広範な代謝を受け、実際にヒトの尿では親薬物の約1%が排泄されるのみである(Poch, G.K.ら、J. Chromatogr. B724, 23-33, 1999)。可能な代謝的変換は、リセルグ酸への加水分解、N-デスメチル-LSD(ノル-LSD)へのN-脱メチル化、および2-オキシ-LSDおよび2-オキシ-3-ヒドロキシ-LSDへの酸化である。イソリセルギックジエチルアミド(イソ-LSD)は、LSD合成の副産物であり、街で売られているLSD中の混入物質として存在するために、しばしばLSD使用者の尿中に検出される。イソ-LSDの構造は、次式：

【化6】



で示される。

4

【0003】LSDは尿中に排出される親薬物の濃度が非常に低いため、尿で検出することが最も困難な濫用薬物の1つである。2-オキシ-3-ヒドロキシ-LSDは、LSDより4～40倍高い濃度でLSD使用者の尿中に存在することがわかり、薬物摂取後LSDより長期にわたり検出する、最近同定されたLSDの代謝産物である(Reuschel, S. A.ら、J. Anal. Toxicol. 23, 306-312, 1999; Verstraete, A. G., Van de Velde, E. J., Annual Society of Forensic Toxicologists Meeting Scientific Session, Albuquerque, NM, October 5-9, 1998)。

【0004】他の濫用薬物の試験において、イムノアッセイ、特に競合的結合イムノアッセイが、特に有利であることが証明されている。競合的結合イムノアッセイでは、生物サンプル中のアナライトが、アナライトおよびアナライト類似体に対して特異的な抗体上の限定された数の受容体結合部位について、標識試薬、またはアナライト類似体、またはトレーサーと競合する。ガラクトシダーゼやペルオキシダーゼのような酵素、フルオレセイン化合物のような蛍光性分子、および¹²⁵Iのような放射性化合物が、トレーサーとして使用される常用標識物質である。サンプル中のアナライトの濃度は、抗体に結合するアナライト類似体の量を決定する。アナライトとアナライト類似体は、それぞれの濃度に比例して抗体に結合するため、結合するアナライト類似体の量は、サンプル中のアナライト濃度に反比例する。次に遊離のまたは結合したアナライト類似体の量を、使用した特定の標識に適した方法により測定できる。

【0005】現在利用可能なLSDの市販のイムノアッセイ法では、LSDに特異的であって2-オキシ-3-ヒドロキシ-LSDとの交差反応性が低いモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を使用する。例えば、EMIT(Syva Company)、CEDIA(Microgenics Corporation)およびKIMS(Roche Diagnostics)イムノアッセイ中の2-オキシ-3-ヒドロキシ-LSDの交差反応性は、それぞれ1.7、1.8および11%である(Verstraete, A. G., 同上)。また本発明者らの知る限り、本明細書に記載した本発明よりも前に報告された、2-オキシ-3-ヒドロキシ-LSDに特異的なモノクローナル抗体は存在しない。

【0006】ハプテンは、部分的または不完全な抗原である。これらは、タンパク質を含まない物質であり、主に低分子量物質からなり、これらは抗体形成を刺激することができないが、抗体と反応する。抗体は、ハプテンを高分子量担体に結合させ、この結合産物をヒトまたは動物に注入することにより形成される。ハプテンの例は、ジゴキシンやテオフィリンのような治療薬、モルヒネやLSDのような濫用薬物、ゲンタマイシンやバンコマイシンのような抗生物質、エストロゲンやプロゲステロンのようなホルモン、ビタミンB12や葉酸のようなビタミン、チロキシン、ヒスタミン、セロトニン、アドレナリンなどを含む。

【0007】

【課題を解決するための手段】活性化ハプテンとは、誘導体コンジュゲートを合成するための連結基の結合などにより、反応のために利用し得る部位が提供されたハプテン誘導体を意味するものである。

【0008】本明細書において担体という用語は、ハプテンと結合することにより該ハプテンを免疫応答を刺激し得るものとする免疫原性物質（通常、タンパク質）である。担体物質には、外来として認識され宿主の免疫応答を誘発するタンパク質、糖タンパク質、複合多糖、および核酸がある。

【0009】本明細書で使用される免疫原および免疫原性であるという用語は、生物中で免疫応答を起こし得る物質を意味する。

【0010】誘導体という用語は、1以上の化学反応により親化合物または分子から作成される化学的化合物または分子を意味する。

【0011】連結基は活性化のため、すなわちハプテンを合成するために利用し得る薬物誘導体上の部位を提供するために使用される。連結基の使用は、具体的なハプテンと担体との組合せに依存して、有利または必要である場合も、そうではない場合もある。リンカーという用語は、ハプテンを担体、免疫原、標識、トレーサー、または別のリンカーに連結する化学的部分を意味する。リンカーは、直鎖状または分枝状、飽和または不飽和の炭素鎖でもよい。これらはまた、鎖内または鎖の末端で1以上のヘテロ原子を含有してもよい。ヘテロ原子とは、酸素、窒素およびイオウよりなる群から選択される炭素以外の原子を意味する。

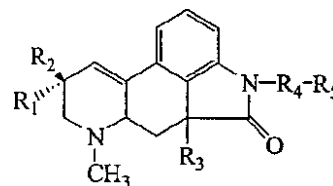
【0012】本明細書において検出体分子、標識またはトレーサーとは、担体物質または分子に結合させてアナライズの検出に使用できる同定用のタグをいう。標識は直接的に、または連結部分もしくは架橋部分により間接的に担体物質に結合してもよい。標識の例には、
- ガラクトシダーゼやペルオキシダーゼのような酵素、ローダミンやフルオレセインイソチオシアネート（FITC）のような蛍光性化合物、ジオキセタンやルシフェリンのような発光物質、および¹²⁵Iのようなラジオアイソトープがある。

【0013】ペプチドは、アミド（ペプチド）結合による2個以上のアミノ酸の結合によって生成されるあらゆる化合物であり、通常、線状の鎖中でNH₂末端を除いた各アミノ酸残基の - アミノ基が次の残基の - カルボキシル基に結合している - アミノ酸のポリマーである。ペプチド、ポリペプチドおよびポリ（アミノ酸）という用語は、大きさについては限定せずにこのクラスの化合物を同義に意味するのに使用される。このクラスの最も大きいメンバーは、タンパク質と呼ばれる。

【0014】本明細書において、酸化LSDとは、2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDおよび2-オキソ-LSDを意味する。

【0015】本発明は、次式：

【化7】



[式中、R₁とR₂は、独立してHとCON(CH₂CH₃)₂よりなる群から選択されるが、ただし、R₁とR₂の少なくとも1つはHであり；R₃はHまたはOHであり；R₄は、0~2個の不飽和結合と0~6個のヘテロ原子とともに1~10個の炭素原子を有する分枝状または直鎖状連結基であり；R₅は、COR₆とNHR₇よりなる群から選択され、ここでR₆は、OH、LまたはLXであり、R₇は、H、LまたはLXであり、ここでLは、連結基であり、Xは、Lを介して結合した検出体分子または担体分子である]で示される新規LSDおよびイソ-LSDハプテンを提供する。

【0016】本発明はまた、LSDおよびLSDコンジュゲートと高い交差反応性を示す2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSD免疫原から誘導される新規抗体を開示する。本発明の別の態様において、該新規抗体およびLSDコンジュゲートを使用して、尿中の2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDとLSDを検出するための競合的イムノアッセイ法が提供される。

【0017】

【発明の実施の形態】本発明は、酸化LSDの新規ハプテンおよび免疫原、該免疫原から誘導される抗体、ならびに該抗体を利用するイムノアッセイ法に関する。LSDから2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDへの酸化は、当該分野で公知の方法を修飾して達成される（Troxlér, F., Hofmann, A., *Helv. Chim. Acta* 42, 793, 1959）。これらの方法において、LSD塩は、2当量の次亜塩素酸塩、好ましくは次亜塩素酸カルシウムを用いて、水と水混溶性有機溶媒（好ましくはアセトニトリル）の混合物中で処理される。反応は、-10~30、好ましくは0~5の温度で0.5~2時間行われる。反応混合物を塩基性pHに調整し、生成物を有機溶媒中に抽出する。好ましくは中性アルミナ上でのカラムクロマトグラフィーにより精製する。2-オキソ-LSDは、2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDを酢酸中で亜鉛で還元する（Troxlér, F.同上）か、またはLSDをN-プロモスクシンイミドで制御酸化すること（Siddik, Z.ら、*Biochemical Pharmacology* 28, 3081, 1979）により得ることができる。

【0018】インドール窒素（すなわち、N-1位）でアルキル化した酸化LSDの新規ハプテン誘導体は、ハロゲン原子の反対側の末端に保護された官能基を含む2官能性ハロアルキルリンカーを使用して、穏やかな条件下で調製される。好適な保護官能基の例は、保護されたアミンおよびカルボン酸である。2官能性ハロアルキルリンカーのいくつかの好適な例は、ヨード酪酸エチルおよび

N-ヨードプロピルフルイミドである。2官能性ハロアルキルリンカーの他の例は、当業者には容易に明らかであろう。塩基の存在下で酸化LSDのピロリドン窒素でハロゲン原子を置換することにより、アルキル化が容易に行われる。クラウンエーテルの存在下でアルカリ金属炭酸塩を塩基として使用するこのアルキル化について、驚くほど穏やかな反応条件が見いだされている。好適なアルカリ金属炭酸塩/クラウンエーテルの組合せは、炭酸カリウムおよび18-クラウン-6である。この反応は、添加するクラウンエーテルの量が、炭酸カリウムの量と等モルであるかまたはそれ以上である場合に最も好ましいことが見出されている。すなわち、触媒的な量以上が必要である。この反応は、両性非プロトン性溶媒、好ましくはジメチルホルムアミド (DMF) 中で、20~100、好ましくは50~70の温度範囲で1~24時間行われる。次に、アルキル化生成物は単離され、保護基は、酸化LSDに副作用を及ぼさない条件下で、連結基から除去される。そのような条件の例は、水酸化リチウムでケン化して、アルキルエステルを除去して遊離カルボン酸を生成するか、またはメチルアミン処理を行ってフルイミド保護基を除去して遊離アミンを生成する。

【0019】遊離カルボキシル基またはアミン末端を有する脱保護したN-1-アルキル化酸化LSDIは、コンジュゲートの調製に直接使用し得る。例えばカルボキシル連結基を有する酸化LSDIは、アミド結合の形成のための当該分野で公知の縮合試薬を使用して、担体、標識またはトレーサー上のアミンに結合してもよい。同様にアミン基は、担体、標識またはトレーサー上のカルボキシル基に結合してもよい。しかし、遊離カルボキシルまたはアミン末端を有するN-1-アルキル化酸化LSDを、第2の連結基に結合させることが特に好ましい。この第2の連結基は、当該分野で公知の種々のヘテロ2官能性またはホモ2官能性リンカーでもよい。例えば、カルボキシル基で終わる第1の連結基の場合、第2の連結基の例は、PCT公報W090/15798に記載のマレイミドアルキルアミン、およびアミノ酸である。これらのアミンを含有する第2の連結基は、典型的にはアミド結合の形成のために当該分野で公知の多くの縮合試薬の任意の1つを使用して、第1のリンカー上のカルボキシル基と反応させる。第1のリンカーがアミンで終わる場合、好適な第2のリンカーの例は、テレフタル酸ジ-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、1,1'-ピフェニル-4,4'-ジ-N-ヒドロキシスクシンイミド、4'-イソチオシアネート-ベンゾイルクロリド、3-マレイミドプロピオン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (MPS)、S-アセチルチオプロピオン酸-N-ヒドロキシスクシンイミド (SATP) である。N-ヒドロキシスクシンイミドエステル第2リンカーは、典型的には第1のリンカーを含有するアミンと、穏やかな条件下で直接反応させる。

【0020】ジ-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル

の場合、ジ置換生成物よりモノ置換生成物の形成を促進する条件下で反応が行われる。例えば酸化LSD N-1-リンカーアミンをジ-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルに滴下して加えると、モノ置換が促進される。酸化LSDに第2のリンカーを結合させると、第2のリンカー上に新しい末端官能基が現れる。ジ-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル第2リンカーの場合は、新しい末端官能基は、単にモノ置換により得られる未反応N-ヒドロキシスクシンイミドエステルである。この後者の基は、直接縮合により担体、標識およびトレーサー上のアミン基に結合し、アミド結合を形成することができる。同様に末端リンカー基がイソチオシアネートである場合、担体、標識およびトレーサー上のアミン基への直接結合はこの段階で行われて、チオ尿素結合を形成する。

【0021】MPSと同様に新しい末端官能基がマレイミドである場合、担体、標識およびトレーサー上のチオール基への付加により結合が達成されてチオエーテル結合が形成される。チオール基は、担体、標識およびトレーサーに存在するものであっても、SATPのようなチオール化剤により導入されてもよい。

【0022】新しい官能基がSATPと同様にチオールまたは保護されたチオールである場合、チオールを直接結合するか、脱保護の後でマレイミド修飾免疫原または標識と結合する。当業者にはさらに多くのリンカーの化学が明らかであろうが、これらは単に例示のために示したものである。ホモ2官能性およびヘテロ2官能性連結基の総括的な処理、ならびにアミンおよびカルボン酸への結合のための反応条件については、Bioconjugate Techniques, G. Hermanson, Academic Press (1995)を参照されたい。

【0023】好適な実施形態において、本発明の免疫原を調製する場合、免疫原性を有する担体ポリ(アミノ酸)または他の物質を、活性化ハプテンに結合させる。ウシチログロブリンは特に好適な抗原性ポリ(アミノ酸)または担体タンパク質であるが、任意のタンパク質担体(アルブミン、血清タンパク質、例えばグロブリン、水晶体タンパク質、リボタンパク質などを含む)が利用できることを理解されたい。タンパク質担体の例には、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、ウシ血清アルブミン、卵オボアルブミン、ウシガンマグロブリンなどがある。あるいは合成ポリ(アミノ酸)が利用でき、反応性官能基を有する他の合成または天然のポリマー性物質も利用できる。特に、炭水化物、酵母、または多糖をハプテンに結合させて免疫原を産生してもよい。

【0024】ハプテン誘導体はまた、当該分野で公知の方法により多様なトレーサー、検出体分子または標識分子に結合して、種々のイムノアッセイフォーマットで有用な多様な試薬を提供することができる。検出のためには、蛍光団(例えば、フルオレセイン)のような検出体

分子を結合させて、トレーサー、または放射性標識もしくは化学発光基を産生することができる。ハプテンは、分光測光法または直接の光学的検出フォーマット（例えば、ラテックス凝集またはクロマトグラフィーストリップ試験）で使用される微粒子（着色ラテックスを含む）に結合させることができる。結合した基はまた、間接的検出体分子（例えば、エネルギー転移パートナー、酵素またはさらなる化学反応により検出される他の基）でもよい。

【0025】本発明において2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSD 10 Dハプテン誘導体は活性化され、タンパク質（例えば、BSAまたはBTGのような担体タンパク質）に結合されて、免疫原を生成する。さらにこれらの担体基は、イムノアッセイのための試薬（すなわち、ハプテンを固体マトリックスに結合するためのつなぎ鎖）を生成するか、または標識-コンジュゲートを生成する標識基（微粒子、放射性標識など）を生成するのに使用される。標識-コンジュゲートは、抗体への結合に関して薬物と競合するイムノアッセイまたはELISAマイクロタイタープレートアッセイの試薬として使用される。標識-コンジュゲート 20 は、例えば特定のアッセイフォーマットではマイクロタイターアッセイプレートを被覆するために使用できる。

【0026】抗体を作成するために、凍結乾燥した免疫原を再水和して免疫原の溶液または懸濁液を形成することにより、免疫原を宿主動物への注射用に都合よく調製する。次に免疫原溶液を、フロイントアジュバントのようなアジュバントと合わせる。免疫原は、多くの部位に、複数回用量で、1回またはそれ以上の回数、数週間にわたって投与しうる。

【0027】免疫原を使用するポリクローナル抗体の調 30 製は、当業者に公知の任意の従来法に従って行う。通常、ウサギ、ヤギ、マウス、モルモット、またはウマのような宿主動物に免疫原混合物を注射する。最適の力価に達するまで血清の抗体力価を評価しながら、さらに注射を行う。次に宿主動物から採血し、適量の特異的抗血清を得る。所望の場合は精製工程を行って、抗血清がアッセイの実施に使用するのに適するとみなされるまで、好ましくない物質（例えば、非特異的抗体）を除去する。

【0028】モノクローナル抗体は、例えばMethods in 40 Enzymology 73 (パートB), pp. 3-46, 1981に記載の方法のようなポリエチレングリコール法を使用して、前記のように免疫したマウスリンパ球とミエローマ細胞とをハイブリダイズさせて得ることができる。

【0029】本発明の免疫原を使用して産生した抗体は、好ましくは、LSDおよび2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSD に対して実質的に同等の交差反応性を有する。実質的に同等の交差反応性とは、2つの成分のうちの1つ（すなわちLSDまたは2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSD）に対する抗体の反応性を100%に設定する場合、もう一方の化合物 50

（すなわち、2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDまたはLSD）に対する交差反応性は50%を超え、好ましくは70%を超えることを意味する。例えば2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSD に対して100%の反応性を有する抗体は、LSDに対して好ましくは50%を超え、さらに好ましくは70%を超える交差反応性を有するであろう。同抗体の反応性を100%に設定すると、2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDに対する交差反応性は100%を超える（故に好ましい場合は150%までとなる）であろう。

【0030】これらの抗体は好ましくは、サンプル中のLSDおよび/または2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDの検出に使用しうる。

【0031】

【実施例】以下の例で使用されるローマ数字は、図1、2および3の対応する化学構造模式図を意味する。

【0032】実施例1 . D-リセルグ酸ジエチルアミド (I) の合成

500mlの無水ジメチルホルムアミド (DMF) 中の10.0g (0.037mol) のd-リセルグ酸の混合物を、9.0gのカルボニルジイミダゾールでアルゴン下で処理し、室温で1時間攪拌した。次に反応物を38mlのジエチルアミンで処理して室温で一晩攪拌した。反応物を減圧下で濃縮した。残渣を500mlの塩化メチレンに取り、500mlの水で洗浄した。不溶性物質をろ過して除去し、層を分離させた。有機部分を250mlの飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で濃縮した。残渣を、800gのシリカゲルで塩化メチレン中3%メタノールを使用してクロマトグラフィーを行って、溶媒を留去後9.0g (75%) のd-リセルグ酸ジエチルアミド (LSD) を淡褐色の無定形固体として得た。

【0033】実施例2 . 2-オキソ-3-ヒドロキシ-d-リセルグ酸ジエチルアミド (II) の合成

5mlのアセトニトリル中の500mg (1.55mmol) のLSDの溶液を氷浴で冷却し、25mlの水中の354mgのL-酒石酸溶液で処理した。442mgの次亜塩素酸カルシウムを25mlの水で処理し激しく攪拌して、次亜塩素酸カルシウムの溶液を調製した。白濁した溶液を0.45μmのMilllex-HVフィルターでろ過し、次に氷浴で冷却した。これをLSD-酒石酸溶液に加え、反応物を0 ~ 5 で45分間攪拌した。反応物を200mlの飽和重炭酸ナトリウム溶液で希釈し、6×250mlのクロロホルムで抽出した。クロロホルム抽出物を合わせ、減圧下で濃縮した。残渣を500gの中性アルミナで1リットルの塩化メチレン中5%メタノールを使用してクロマトグラフィーを行って前面に移動する不純物を除去し、次に塩化メチレン中10%のメタノールで生成物を溶出して、溶媒を留去後160mg (29%) の褐色固体を得た。

【0034】実施例3 . N-(3-ヨードプロピル) フタルイミド (III) の合成

1.2リットルのアセトン中50.0g (0.187mol) のN-(3-

プロモプロピル)フタルイミドの溶液を、208.5gのヨウ化カリウムで処理し、室温で4日間攪拌した。反応物をろ過し、ろ液を4リットルのエーテルで希釈した。次にこれをセライトでろ過した。ろ液を減圧下で濃縮して黄色の固体とした。これをヘキサンから再結晶して、46.5g(79%)のオフホワイトの固体を得た。

【0035】実施例4 . N-1-(3-フタルイミドプロピル)-2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSD (IV) の合成

30mlの無水DMF中の2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDの600mg(1.69mmol)の溶液を、600mg(4.34mmol)の無水炭酸カリウム、600mg(1.9mmol)のN-(3-ヨードプロピル)フタルイミド、および1.9g(7.19mmol)の18-クラウン-6で処理した。反応物を60分で45分間攪拌した。反応物を減圧下で濃縮し、塩化メチレンに溶解し、8×200mlの水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で濃縮した。残渣を100gのシリカゲルで塩化メチレン中5%メタノールを使用してクロマトグラフィーを行って前面に移動する不純物を除去し、次に塩化メチレン中10%メタノールで生成物を溶出して、溶媒を留去後467mg(51%)の黄色の固体を得た。

【0036】実施例5 . N-1-(3-アミノプロピル)-2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSD (V) の合成

367mg(0.68mmol)の1-(3-フタルイミドプロピル)-2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDをアルゴン下で、30mlの2Mメチルアミンのメタノール液で処理し、室温で3時間攪拌した。反応物を減圧下で濃縮した。残渣を30gのシリカゲルで塩化メチレン中30%メタノールを使用してクロマトグラフィーを行って前面に移動する不純物を除去し、次に2%トリエチルアミン/30%メタノール/68%塩化メチレンを使用して生成物を溶出して、溶媒を留去後138mg(49%)の黄色の無定形の固体を得た。

【0037】実施例6 . テレフタル酸ジ-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (VI) の合成

15g(73.8mmol)のテレフタロイルクロリドに300mlの塩化メチレンを加え、溶液を約10分間0で冷却した。この溶液に、30gのN-ヒドロキシスクシンイミド、次に30mlのトリエチルアミンを滴下して加えた。混合物を0で1時間攪拌し、室温で48時間攪拌した。反応混合物をろ過し、残渣を200mlの塩化メチレンで洗浄した。洗浄後の固形分を300mlの塩化メチレンに再懸濁し、室温で10分間攪拌した。さらにその固形分をろ過し真空下で乾燥して、24.1g(67mmol、90%)の生成物を得た。

【0038】実施例7 . N-1-(3-[4-(スクシンイミドキカルボニル)-フェニル-1-カルボニルアミノ]-プロピル)-2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSD (VII) の合成

20mlの無水テトラヒドロフラン中の41mg(0.114mmol)のテレフタル酸ジ-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルの溶液を、アルゴン下で、10mlの無水テトラヒドロフランと0.2mlのトリエチルアミン中の47mg(0.114mmol)の1-(3-アミノプロピル)-2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSD

の溶液を30分かけて滴下して加えて処理した。反応物を室温で一晩攪拌した。反応物を減圧下で濃縮した。残渣を5gのシリカゲルで酢酸エチルを使用してクロマトグラフィーを行って前面に移動する不純物を除去し、次に蒸留したテトラヒドロフランを使用して生成物を溶出して、溶媒を留去後40mg(53%)の黄褐色の固体を得た。

【0039】実施例8 . 2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSD免疫原 (VIII) の合成

4.5mlの50mMリン酸カリウム(pH7.5)中の270mgのウシチログロブリン(BTG)の溶液を氷浴中で冷却した。この溶液に15mlのジメチルスルホキシド(DMSO)を滴下して加え、反応温度を室温以下に維持した。このタンパク質溶液に、1mlのDMF中の40mg(0.062mmol)の2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDモノフェニルNHSエステル誘導体(VI1)の溶液を滴下して加えた。混合物を室温で18時間攪拌した。生じたコンジュゲートを透析チューブ(カットオフ50,000MW)に入れ、50mMリン酸カリウム(pH7.5)中の2リットルの70%DMSO[3回交換、各少なくとも3時間]、50mMリン酸カリウム中の2リットルの50%DMSO[少なくとも3時間]、50mMリン酸カリウム中の2リットルの30%DMSO[少なくとも3時間]、50mMリン酸カリウム中の10%DMSO[少なくとも3時間]で室温で透析し、次に4の50mMリン酸カリウム(pH7.5)で6回交換して透析した(各2リットルで、各少なくとも6時間)。Bioradクマシーブループロテインアッセイ(Bradford, M., Anal. Biochem., 72, 248 (1976))を使用して、タンパク質濃度は6.84mg/mlと測定された。総量35mlの2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSD BTG免疫原を調製した。利用可能なリジン修飾の程度は、TNBS法により60%であると測定された。Habeb AFSA, Anal. Biochem. 14, 328-34 (1988)。

【0040】実施例9 . 1,1'-ビフェニル-4,4'-ジ-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (IX) の合成

480mlの無水テトラヒドロフラン中の24.0g(0.1mol)の1,1'-ビフェニル-4,4'-ジカルボン酸の混合物を、60mlの塩化オキザリルで処理し、次に0.24mlの無水DMFで処理し、室温で10分間攪拌し、次に90分加熱還流した。反応物を減圧下で濃縮して黄色の固体を得た。これを200mlの無水テトラヒドロフラン中に取り、減圧下で濃縮した。この工程をさらに2回繰り返し、残存する塩化オキザリルを排除した。生成物をエーテルで粉碎し、吸引ろ過して25.6g(93%)の1,1'-ビフェニル-4,4'-ジカルボニルクロリドを黄色の固体として得た。

【0041】500mlの無水塩化メチレン中の11.5g(0.04mol)の1,1'-ビフェニル-4,4'-ジカルボニルクロリドを、25.0g(0.22mol)のN-ヒドロキシスクシンイミドで処理し、次に25mlのトリエチルアミンで処理し、室温で一晩攪拌した。生じた固体を吸引ろ過して集めて、1.58gの白色の固体を得た。ろ液を減圧下で濃縮して褐色の固体とした。これを塩化メチレンで1時間攪拌して

粉碎し、次に5.56 gの白色の固体を集めた。こうして17.14 g (95%)の複合収率を得た。

【0042】実施例10. 4-イソチオシアネートベンゾイルクロリドの合成

500mg (2.79mmol)の4-カルボキシフェニルイソチオシアネートと5mlの塩化チオニルの混合物を、6時間還流した。反応混合物を減圧下で濃縮し、生じた黄褐色の固体を、ポンプで一晩高真空下にした。この固体を少量のヘキサンで粉碎して、吸引ろ過して集めて516mg (93%)の生成物をオフホワイトの固体として得た。

【0043】実施例11. N-1-(3-[4-イソチオシアネートフェニル-1-カルボニルアミノ]-プロピル)-2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDの合成

15mlの無水テトラヒドロフラン中の1.0mmolの4-イソチオシアネートベンゾイルクロリドの溶液を、アルゴン下で0℃に冷却し、10mlの無水テトラヒドロフラン中の1.0mmolの1-(3-アミノプロピル)-2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDの溶液で処理した。反応物を1.0mmolのトリエチルアミンで処理し、0℃で30分間、次に室温で一晩攪拌した。反応物を減圧下で濃縮した。残渣を塩化メチレンに溶解し、水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルで塩化メチレン中10%メタノールでクロマトグラフィーを行って、所望の生成物を得た。

【0044】実施例12. N-1-(3-[4'-スクシンイミドオキシカルボニル-1,1'-ビフェニル-4-カルボニルアミノ]-プロピル)-2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSD (XII)の合成

70mlの無水テトラヒドロフラン中の146mg (0.33mmol)の1,1'-ビフェニル-4,4'-ジ-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (XI)の溶液をアルゴン下で、25mlの無水テトラヒドロフランと0.55mlのトリエチルアミン中の138mg (0.33mmol)の1-(3-アミノプロピル)-2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDの溶液を30分かけて滴下して加えて処理した。反応物を室温で一晩攪拌した。反応物を減圧下で濃縮した。残渣を20gのシリカゲルで酢酸エチルを使用してクロマトグラフィーを行って、前面に移動する不純物を除去し、次に蒸留テトラヒドロフランで生成物を溶出して、溶媒を留去後90mg (37%)の黄褐色の固体を得た。

【0045】実施例13. 1-(3-フタルイミドプロピル)-2-オキソ-LSDの合成

20mlの無水DMF中の1.0mmolの2-オキソ-LSDの溶液を、2.6mmolの無水炭酸カリウム、1.2mmolのN-(3-ヨードプロピル)フタルイミドおよび4.0mmolの18-クラウン-6で処理する。反応物を60℃で45分間攪拌する。反応物を減圧下で濃縮し、塩化メチレンに溶解し、10×100mlの水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で濃縮する。残渣をシリカゲルで塩化メチレン中5%メタノールでクロマトグラフィーを行って前面に移動する不純物を

除去し、次に塩化メチレン中10%メタノールで生成物を溶出して所望の生成物を得る。

【0046】実施例14. 1-(3-アミノプロピル)-2-オキソ-LSDの合成

1.0mmolの1-(3-フタルイミドプロピル)-2-オキソ-LSDをアルゴン下で、メタノール中50mlの2Mメチルアミンで処理し、室温で3時間攪拌する。反応物を減圧下で濃縮する。残渣を50gのシリカゲルで塩化メチレン中30%メタノールを使用してクロマトグラフィーを行って前面に移動する不純物を除去し、次に2%トリエチルアミン/30%メタノール/68%塩化メチレンを使用して、溶媒を留去後所望の生成物を得る。

【0047】実施例15. N-1-(3-[4-スクシンイミド-オキシカルボニル]フェニル-1-カルボニルアミノ]-プロピル)-2-オキソ-LSDの合成

200mlの無水テトラヒドロフラン中の1.0mmolのテレフタル酸ジ-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルの溶液をアルゴン下で、75mlの無水テトラヒドロフランと2.0mlのトリエチルアミン中の1.0mmolの1-(3-アミノプロピル)-2-オキソ-LSDの溶液を30分かけて滴下して加えて処理する。反応物を室温で一晩攪拌する。反応物を減圧下で濃縮する。残渣をシリカゲルで酢酸エチルを使用してクロマトグラフィーを行って前面に移動する不純物を除去し、次に蒸留テトラヒドロフランで、溶媒を留去後所望の生成物を得る。

【0048】実施例16. N-1-(3-[4'-スクシンイミド-オキシカルボニル-1,1'-ビフェニル-4カルボニルアミノ]-プロピル)-2-オキソ-LSDの合成

200mlの無水テトラヒドロフラン中の1.0mmolの1,1'-ビフェニル-4,4'-ジ-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルの溶液をアルゴン下で、75mlの無水テトラヒドロフランと2.0mlのトリエチルアミン中の1.0mmolの1-(3-アミノプロピル)-2-オキソ-LSDの溶液を30分かけて滴下して加えて処理する。反応物を室温で一晩攪拌する。反応物を減圧下で濃縮する。残渣をシリカゲルで酢酸エチルを使用してクロマトグラフィーを行って前面に移動する不純物を除去し、次に蒸留テトラヒドロフランで、溶媒を留去後所望の生成物を得る。

【0049】実施例17. N-1-(3-[4-イソチオシアネートフェニル-1-カルボニルアミノ]-プロピル)-2-オキソ-LSDの合成

15mlの無水テトラヒドロフラン中の1.0mmolの4-イソチオシアネートベンゾイルクロリドの溶液をアルゴン下0℃に冷却し、10mlの無水テトラヒドロフラン中1.0mmolの1-(3-アミノプロピル)-2-オキソ-N,N-ジエチル-d-リセルグアミドの溶液で処理する。反応物を1.0mmolのトリエチルアミンで処理し、0℃で30分間攪拌し、次に室温で一晩攪拌する。反応物を減圧下で濃縮する。残渣を塩化メチレンに溶解し、水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で濃縮する。残存物をシリカゲル

で塩化メチレン中10%メタノールを使用してクロマトグラフィーを行って、溶媒を留去後所望の生成物を得る。

【0050】実施例18. N-1-(3-カルボキシプロピル)-2-オキソ-LSDの合成

20mlの無水DMF中の1.0mmolの2-オキソ-LSDの溶液を、2.6mmolの無水炭酸カリウム、1.2mmolのヨード酪酸エチルおよび4.0mmolの18-クラウン-6で処理する。反応物を60

で45分間攪拌する。反応物を減圧下で濃縮し、塩化メチレンに溶解し、10×100mlの水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で濃縮する。残渣をシリカゲルで塩化メチレン中のメタノールでクロマトグラフィーを行って、生成物のエチルエステルを得る。THFとメタノールの1:1混合物10ml中の1.0mmolのエチルエステル溶液を、10mmolの水酸化リチウム1水和物の溶液で処理し、室温で一晩攪拌する。反応混合物を減圧下で濃縮する。水性残渣をpH6に調整し、塩化メチレンで抽出し、硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で濃縮する。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで9:1の塩化メチレン/メタノールを溶出液として使用して精製する。

【0051】実施例19. N-1-(3-カルボキシプロピル)-2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDの合成

20mlの無水DMF中の1.0mmolの2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDの溶液を、2.6mmolの無水炭酸カリウム、1.2mmolのヨード酪酸エチルおよび4.0mmolの18-クラウン-6で処理する。反応物を60で45分間攪拌する。反応物を減圧下で濃縮し、塩化メチレンに溶解し、10×100mlの水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で濃縮する。残渣をシリカゲルで塩化メチレン中のメタノールでクロマトグラフィーを行って、生成物のエチルエステルを得る。THFとメタノールの1:1混合物10ml中の1.0mmolのエチルエステル溶液を、10mmolの水酸化リチウム1水和物の溶液で処理し、室温で一晩攪拌する。反応混合物を減圧下で濃縮する。水性残渣をpH6に調整し、塩化メチレンで抽出し、硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で濃縮する。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで9:1の塩化メチレン/メタノールを溶出液として使用して精製する。

【0052】実施例20. N-1-(3-フタルイミドプロピル)-LSD(X)の合成

160mlの無水テトラヒドロフラン中の8.0g(24.7mmol)の溶液を-78に冷却した。この反応混合物に11mlの2.5M n-ブチルリチウム、次に80mlのN,N'-ジメチルプロピレン尿素(DMPU)を加え、反応物を20分間攪拌した。25mlのDMPU中の12g(38mmol)のヨードプロピルフルタルイミドの溶液を加え、混合物を-78で90分間攪拌した。反応物を2時間攪拌して室温まで暖めた。テトラヒドロフランを真空下で除去し、油状残渣を500mlの酢酸エチルで希釈した。これを5×250mlの水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、濃縮して黒い油状物を得た。こ

れを、シリカゲルカラムで溶出液としてジクロロメタン中3%メタノールを使用して精製して、6.65g(13mmol、53%)の生成物を得た。

【0053】実施例21. N-1-(3-フタルイミドプロピル)-2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSD(IV)とN-1-(3-フタルイミドプロピル)-2-オキソ-LSD(XI)の合成

25mg(0.048mmol)のN-1-(3-フタルイミドプロピル)-LSDの溶液に、1mlのHPLCグレードのアセトニトリルを加えた。反応混合物を4に冷却した。1mlの水中のL-酒石酸(12mg、0.079mmol)の溶液を4に冷却し、LSD-N-アミノプロピルフルタルイミド溶液に加えた。

【0054】1mlの水中の11mg(0.076mmol)の次亜塩素酸カルシウムの懸濁液をMillex HVフィルター(4.5μm)でろ過し、4に冷却し、冷却し磁気攪拌したLSD-N-アミノプロピルフルタルイミド酒石酸溶液に加えた。反応混合物を4で10分間攪拌し、15mlの飽和重炭酸ナトリウム溶液を加えた。反応混合物を室温に加熱し、5×30mlのクロロホルムで抽出した。合わせた有機層を乾燥(無水硫酸ナトリウム)し濃縮した。残渣をクロロホルム中10%メタノールを使用して分取用シリカゲルクロマトグラフィーで精製して、5mg(0.009mmol、20%)のN-1-(3-フタルイミドプロピル)-2-オキソ-LSDと8mg(0.014mmol、30%)のN-1-(3-フタルイミドプロピル)-2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDを得た。

【0055】実施例22. 2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSD-BSA ELISAスクリーニングコンジュゲートの合成

6mlの50mMリン酸カリウム(pH7.5)中の400mgのウシ血清アルブミン(BSA)の溶液を、氷浴中で冷却した。この溶液に、6mlのDMSOを滴下して加え、反応温度を室温以下に維持した。このタンパク質溶液に、1mlの無水DMF中の10mg(0.015mmol)の2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDモノフェニルNHSエステル誘導体(VII)の溶液を滴下して加えた。反応混合物を室温で18時間攪拌した。生じたコンジュゲートを透析チューブ(カットオフ10,000MW)の中に入れ、50mMリン酸カリウム中の2リットルの60%DMSO[3回交換、各少なくとも3時間]、50mMリン酸カリウム中の2リットルの50%DMSO(少なくとも3時間)、50mMリン酸カリウム中の2リットルの30%DMSO(少なくとも3時間)、50mMリン酸カリウム中の10%DMSO(少なくとも3時間)で室温で逐次透析し、次に4の50mMリン酸カリウム(pH7.5)で6回交換して透析した(各2リットルで、各少なくとも6時間)。総量30mlの2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSD BSAコンジュゲートが得られた。Bioradクマシーブループロテインアッセイを使用して、タンパク質濃度は8.8mg/mlと測定された。

【0056】実施例23. LSD-BSA ELISAスクリーニングコンジュゲートの合成

N-1-[(4-イソチオシアネートフェニル-カルボニル)アミノブチル]-LSDを、EP0816364A1の実施例7に記載の方法により合成した。16mlの50mMリン酸カリウム(KP

1) pH7.5緩衝液中の1.0gのBSAの溶液を氷浴で冷却し、1.5mlのDMF中のN-1-[(4-イソチオシアネートフェニル)カルボニル]アミノブチル]-LSDの溶液をゆっくり加えて処理し、次に室温で一晩攪拌した。反応混合物を透析チューブ(カットオフ15,000MW)に入れ、2リットルの10%DMF-90%50mM KPI (pH7.5)で室温で3時間、次に2リットルの100%50mM KPI (pH7.5)で室温で4時間、そして最後に2リットルの100%50mM KPI (pH7.5)で4で5回(各少なくとも6時間)交換して透析した。最終のコンジュゲート容量は24mlであった。クマシーブループロテインアッセイを使用して、タンパク質濃度は38.2mg/mlであった。タンパク質の回収率は916.8mg(92%)であった。

【0057】実施例24. ハイブリドーマの作成

マウスを2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSD-BTGコンジュゲートで3回免疫した。最初の免疫は、完全フロイントアジュバントで乳化した100 μ gで、後ろ足の足蹠と腹腔内投与により行った。4週間後、(不完全フロイントアジュバント中の)同じ量と経路で2回目の免疫を行った。14日後、マウスを眼窩後方から放血させて、分析用の血液サンプルを得た。清澄化した血清のELISA分析により、4匹のマウスのうちの3匹が 4×10^5 より高い抗体力価(血清希釈系列の50%変曲点で定義)を示した。血液採取の14日後、マウスを上記のように再度免疫した。

【0058】融合を計画した時、最も高い抗体血清力価を示すマウスに、リン酸緩衝溶液中の50 μ gの免疫原を両方の経路で注射して追加免疫した。4日後、マウスを屠殺し、脾臓と鼠蹠および膝窩リンパ節を採取した。これらの細胞を、常法に従ってF0ミエローマ株に融合させた(St Groth, D. E.ら, J. Immunol. Meth. 35, 1-21, 1980)。融合した細胞を、無菌の96ウェルプレート中に 4×10^4 リンパ球/ウェルの濃度で標準的ハイブリドーマ選択培地に分散させた。濃度を測定して、プレート中で増殖を示す任意のウェル中の単一のクローンを高い確率で得た。約12~14日後に、増殖はスクリーニングするのに充分であった。

【0059】実施例25. ハイブリドーマのスクリーニング

無菌条件下で160 μ lの培地を取り出して、十分な増殖を示すウェルを試験した。このアリコート50 μ lずつの3つの部分に分けた。アリコートはLSD-BSA、2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSD-BSA、またはノル-LSD-BSAであらかじめ被覆したウェルに入れ、37で1時間インキュベートした。インキュベーション後、ウェルをリン酸緩衝溶液(PBS)-ツイーン20乳化剤溶液で洗浄し、各ウェルに、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP, Zymed, サンジエゴ、カリフォルニア州)に結合したあらかじめ最適化希釈した50 μ lのヤギ抗マウスIgG抗体を加えた。プレートを再度37で1時間インキュベートした。インキュベーション後プレートを充分洗浄し、100 μ lの酵素基質溶液

(K-BLUE, Neogen Corp, レキシントン、ケンタッキー州)を加えた。暗所で15分間発色させた後、100 μ lの2Mリン酸を加えて反応を停止させた。光学密度は450ナノメートルで読んだ。

【0060】3つの基質についての反応物の光学密度を、試験した各ウェルについて比較した。こうして、各モノクローナル抗体の交差特性性を迅速に推定することができた。データは、このために設計したコンピュータプログラムにより比較した。決定的に重要な点は、試験した任意のウェル中の細胞の増殖が単一のクローンによるものであることを確認することである。1つのウェルに複数のクローンがあると擬交差反応性プロフィールが得られるため、これは重要な性質である。従ってこの研究で使用したスクリーニングプロトコルは、モノクローナル性増殖が実際に得られる統計的証拠を提供する点まで、融合細胞混合物をあらかじめ希釈することを含む。次に、別々ではあるが同時にすべての3つの薬物-BSAコンジュゲートからなるスクリーニング法を行った。

【0061】結果は、16個のクローンが、LSDと2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDの両方に実質的に同等の反応を示した。さらに7つは、LSD、2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDに同等の反応を示し、ノル-LSDに有意な反応を示した。これらの23個のクローンを選択して、限界希釈法からなるさらなる研究を行って、抗体産生、液体窒素フリーザー中の保存のための細胞を提供する増殖培養物、および正確な交差反応性プロフィールを確立するために使用する大量の抗体含有培地の安定性を確認した。

【0062】安定化クローンから得られた抗体を用いる以後の交差反応性試験は、融合スクリーニングにより推定されたものと本質的に同じプロフィールを示した。

【0063】実施例26. 抗体の交差反応性

LSD、ノル-LSDおよび2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDについての3つのクローンの交差反応性を、ELISA法を使用して測定した。マイクロタイタープレートを、100 μ lの0.325mg/ml LSD-BSAまたは100 μ lの0.325 μ g/ml 2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDで37で1時間被覆し、PBS中200 μ lの1%BSAで室温で1時間、後ブロックした。プレートを400 μ lのPBS-0.1%ツイーン20で3回洗浄した。遊離のLSD、ノル-LSDおよび2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDを、PBSで1000ng/mlに希釈した。抗体を8,000倍希釈した。薬物の溶液(1000ng/ml溶液の200 μ l)を、ELISAプレートの第1のカラムに入れた。残りのウェルに100 μ lのPBSを満たした。100 μ lの薬物溶液を第1のカラムから取りプレートの第2のカラムに入れることにより、薬物の連続希釈物を調製した。溶液をピペットで5回上下させて、ウェルの内容物を完全に混合した。第2のカラムの100 μ lを第3のカラムに入れ、上記のように混合した。この方法を、ELISAプレートのすべての12カラムについて繰り返した。最後のウェルの溶液100 μ lを捨て

た。8,000倍希釈した抗体100 μ lを各ウェルに加えた。生じた薬物濃度は、500ng/ml、250ng/ml、125ng/ml、62.5ng/ml、31.2ng/ml、15.6ng/ml、7.81ng/ml、3.90ng/ml、1.95ng/ml、0.976ng/ml、0.488ng/ml、0.244ng/mlである。最終の抗体希釈は16,000倍であった。プレートを37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートして、PBS-ツイーン20で3回洗浄した。ウサギ抗マウスHRP結合IgGを5,000倍希

クローン1.1:

希釈	A ₄₅₀	A ₄₅₀	A ₄₅₀
	LSD ウェル	ノル-LSD ウェル	2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSD ウェル
0.2	3.797	4.019	3.913
0.5	4.085	4.074	3.928
1.0	3.962	4.100	4.033
2.0	3.905	3.884	4.015
3.9	3.951	4.035	3.908
7.8	3.831	3.805	3.914
15.6	3.519	3.740	3.310
31.3	3.390	3.735	3.108
62.5	2.633	3.601	2.278
125.0	2.050	3.512	1.768
250.0	1.433	3.340	1.425
500.0	0.831	2.968	0.871

*釈し、100 μ lをELISAプレートに加えた。プレートを37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートし、PBS-ツイーン20で3回洗浄した。100 μ lのK-BLUE基質を各ウェルに入れた。プレートを暗所で室温で30分間インキュベートした。100 μ lの2Mリン酸を加えて反応を停止させ、450nmで吸光度を読んだ。3つのクローンの結果は以下の通りである:

【表1】

【表2】

クローン2.1:

希釈	A ₄₅₀	A ₄₅₀	A ₄₅₀
	LSD ウェル	ノル-LSD ウェル	2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSD ウェル
0.2	0.831	0.900	0.846
0.5	0.738	0.859	0.690
1.0	0.579	0.842	0.552
2.0	0.523	0.792	0.531
3.9	0.435	0.786	0.372
7.8	0.339	0.696	0.321
15.6	0.303	0.648	0.294
31.3	0.294	0.504	0.309
62.5	0.252	0.444	0.243
125.0	0.240	0.384	0.256
250.0	0.234	0.318	0.297
500.0	0.236	0.276	0.243

【表3】

クローン20.2:

希釈	A ₄₅₀ LSD ウェル	A ₄₅₀ フル-LSD ウェル	A ₄₅₀ 2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSD ウェル
0.2	0.833	0.908	0.838
0.5	0.658	0.866	0.704
1.0	0.587	0.853	0.430
2.0	0.328	0.799	0.372
3.9	0.284	0.722	0.316
7.8	0.204	0.656	0.272
15.6	0.160	0.584	0.220
31.3	0.126	0.464	0.148
62.5	0.126	0.416	0.142
125.0	0.124	0.292	0.143
250.0	0.188	0.228	0.144
500.0	0.122	0.288	0.142

2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDに対する特異性に基づいて、3つのクローンについて算出した交差反応性パーセントは以下の通りである：

【表4】

	クローン1.1	クローン2.1	クローン20.2
LSD	74.9%	76.1%	84.4%
フル-LSD	1.9	1.8	4.6
2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSD	100.0	100.0	100.0

LSDに対する特異性に基づいて、3つのクローンについて算出した交差反応性パーセントは以下の通りである：

【表5】

	クローン1.1	クローン2.1	クローン20.2
LSD	100.0%	100.0%	100.0%
フル-LSD	2.6	2.3	5.5
2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSD	133.6	131.4	118.5

実施例27. アミノデキストランコンジュゲート (XVII) の調製

機械スターラーを取り付けた3リットルの三ツ首丸底フラスコに、700mlの脱イオン水を加えた。室温でデキストランを水に攪拌溶解しながら、70g (1.86mmol) のデキストラン (Sigma、分子量37,500) を反応フラスコに少しずつ加えた。反応混合物に140mlの1N NaOHを加え、反応物を30~35℃に加熱した。反応混合物に、245mlの1,4-ジオキサン中の79ml (923mmol) のエピプロモヒドリンの溶液を、30~35℃で45分間かけて滴下して加えた。生じた反応混合物を攪拌し、さらに4時間30~35℃で加熱した。反応混合物を室温まで冷却し、2リットルの分液ロートに移した。有機層をゆっくり分離させ、多量の蓄積物が見えなくなるまで底の層を捨てた。この水性の溶液は3リットルの丸底フラスコに移し、氷浴で冷却した。25%の水酸化アンモニウム700mlの溶液を反応フラスコに加え、1N塩酸でpHを11に調整した。生じた

溶液を一晩室温まで暖めた。反応溶液を、分子量カットオフ (MWCO) が2,000ダルトンの20個の透析チューブに移し、2つの12リットルのバケツで以下の交換スケジュールに従って透析を行った：1%の酢酸で6時間、1%の酢酸で24時間、1%の酢酸で48時間、および脱イオン水で24時間×6 (容量=20リットル)。

【0064】透析溶液をまず、ロータリーエバポレーターで濃縮し、次に凍結乾燥して48gの生成物を白色の固体として得た。TNBSアッセイ (Goldfarb, A. R., Biochem. 5, 2570-2574, 1966およびSnyder, S. L.ら, Anal. Biochem. 64, 284-288, 1975) を使用すると、生成物はアミノデキストラン1モルについて5.7個のアミノ基を含有していた。

【0065】アミノデキストランコンジュゲートを以下のように調製した。25mlのDMSO中のアミノデキストラン (236mg, 0.0063mmol) の攪拌溶液に、1mlの無水DMF中の2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSD NHSエステルXII (36.7m

g、0.05mmol)を加え、次に室温でトリエチルアミン(0.008ml、0.058mmol)を加えた。溶液を室温で一晩攪拌した。溶液を透析バッグ(カットオフ2000MW)に移し、2リットルの以下の液に対して透析した：脱イオン水中80%のDMSOで4時間、脱イオン水中60%のDMSOで4時間、脱イオン水中40%のDMSOで一晩、脱イオン水中20%のDMSOで4時間、脱イオン水で一晩、脱イオン水で4時間、および脱イオン水で一晩。バッグ中の溶液を一晩凍結乾燥して、225mgの生成物を白色の泡状物として得た。

【0066】実施例28. LSDのアッセイ

0.1%BSAと0.1%アジ化ナトリウムを含有する0.175M PIPES緩衝液(pH7.0)を作成することにより、第1の使用試薬を調製した。ここに、2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDアミノデキストランコンジュゲートを加えて、50ng/mlの濃度にした。ここにまた、ポリアクリル酸を加えて1.4%の濃度を得た。

【0067】0.09%アジ化ナトリウムと0.1%BSAを含有する0.05M MOPS緩衝液(pH7.2)を作成することにより、第2の使用試薬を調製した。

【0068】微粒子を調製するために、0.09%アジ化ナトリウムを含有する0.05M MES緩衝液(pH6.5)中の等量の1%微粒子溶液と15μg/ml抗体溶液を合わせ、一晩インキュベートした。次に微粒子を0.09%アジ化ナトリウムと0.05%BSAを含有する0.01Mリン酸緩衝化生理食塩水溶液(pH7.4)で洗浄した。

【0069】微粒子を第2の使用試薬で0.15%の粒子濃度に希釈して微粒子試薬を調製した。使用した抗体は、2.1と呼ぶクローンであり、微粒子への添加量は約15μg/mlであった。

【0070】まず尿中1000ng/mlの濃度でLSDのストック溶液を作成して、カリプレーターを調製した。このこの*

*ストック溶液から、尿で希釈して0.5、1.0、2.0、5.0および10ng/mlのLSD濃度を有する溶液を作成した。

【0071】19μlのサンプル量、180μlの第1の使用試薬および80μlの第2の使用試薬を用い、Hitachi917オートアナライザー(Roche Diagnostics Corporation, インディアナポリス)を使用してアッセイを行った。結果を図7に示すが、ここでHIはHitachi単位の略である(10,000Hitachi単位=1吸光度単位=10D)。

【0072】本発明を詳細に説明したが、明細書および実施例は例示のためであり、決して本発明を限定するものではなく、当業者が考え得るその修飾および変更は、添付の請求の範囲の精神と範囲から逸脱するものではない。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の活性化2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDハプテンおよび2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSD免疫原の合成を示す。

【図2】2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSD誘導体および2-オキソ-LSD誘導体の別の合成を示す。

【図3】本発明の好適なコンジュゲートの合成を示す。

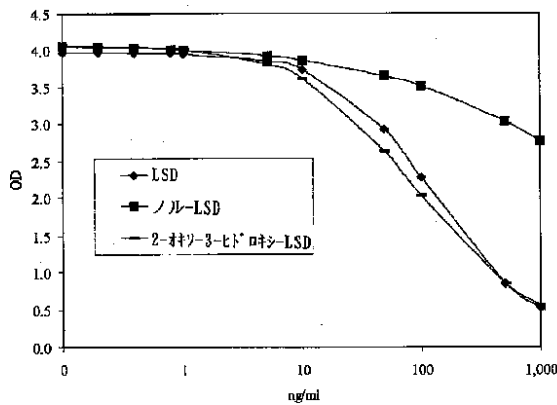
【図4】クローン1.1と、LSD、ノル-LSD、および2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDとの反応性を示すデータのプロットである。

【図5】クローン2.1と、LSD、ノル-LSD、および2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDとの反応性を示すデータのプロットである。

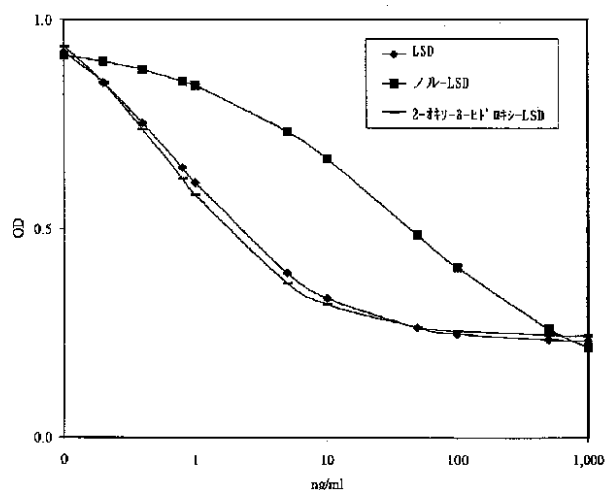
【図6】クローン20.2と、LSD、ノル-LSD、および2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSDとの反応性を示すデータのプロットである。

【図7】実施例28に記載のように作成した較正(用量応答)曲線である。LSDの濃度をX軸にプロットし、660nmでの吸光度をY軸にプロットする。

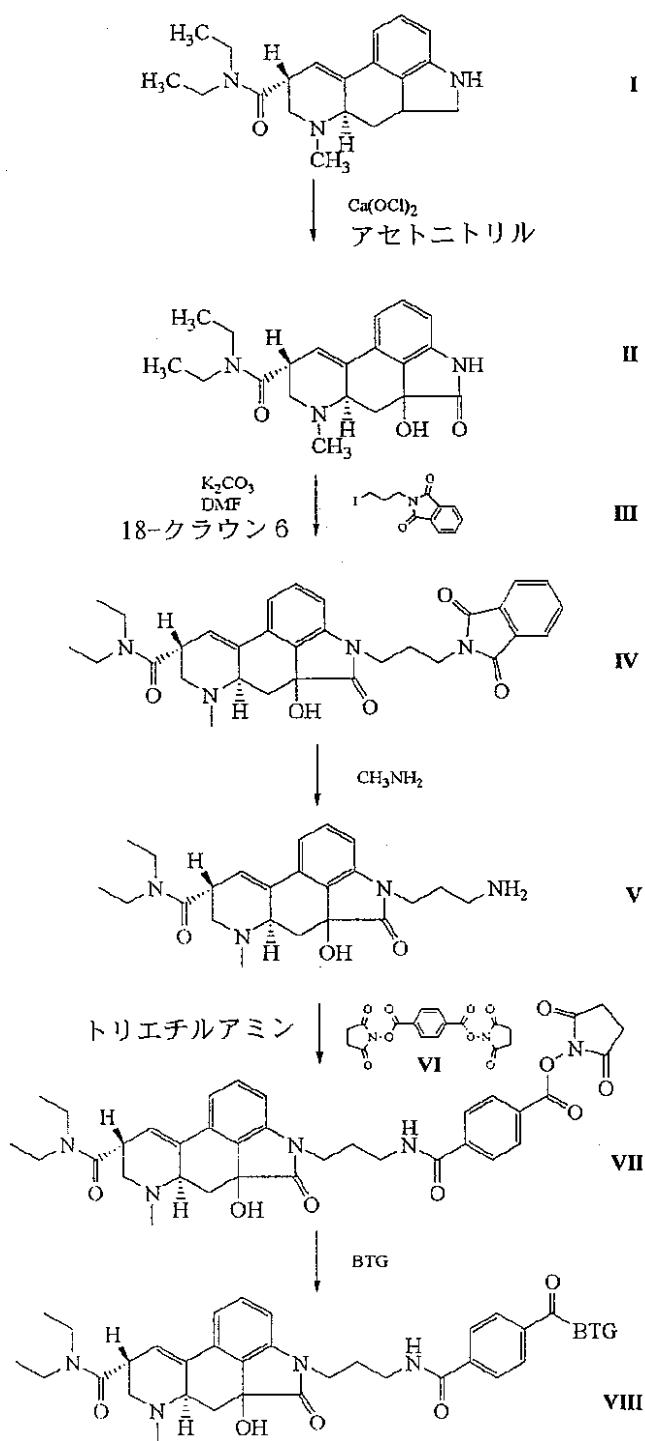
【図4】



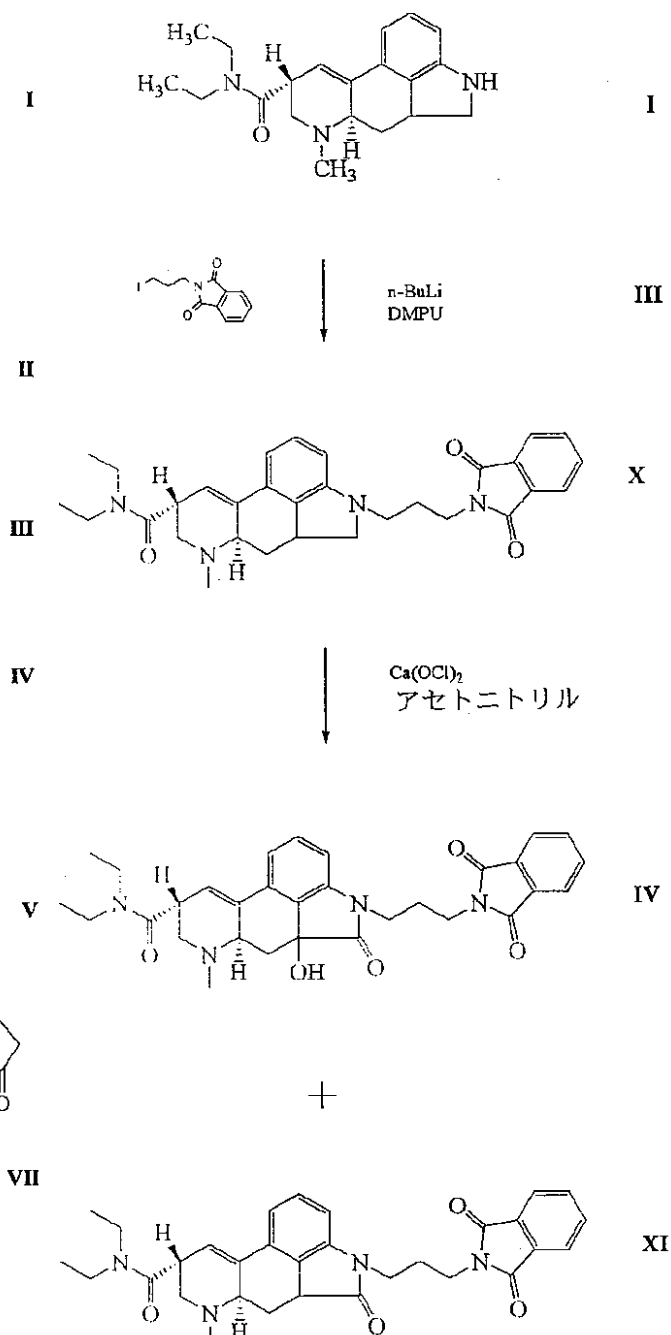
【図5】



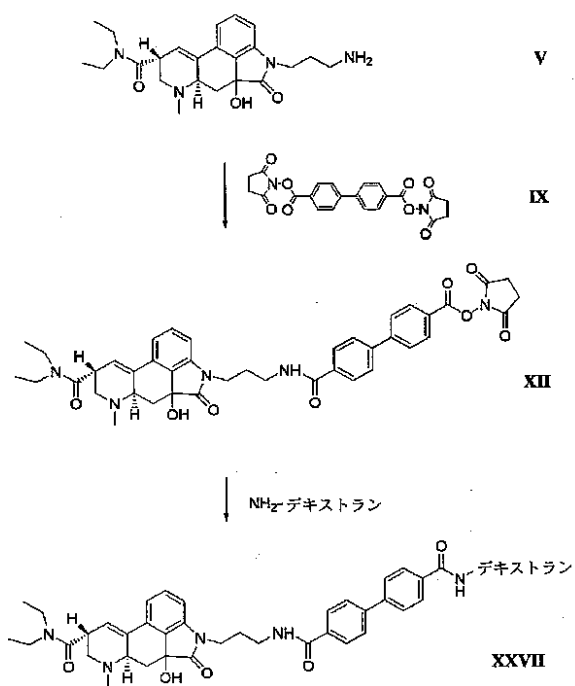
【図1】



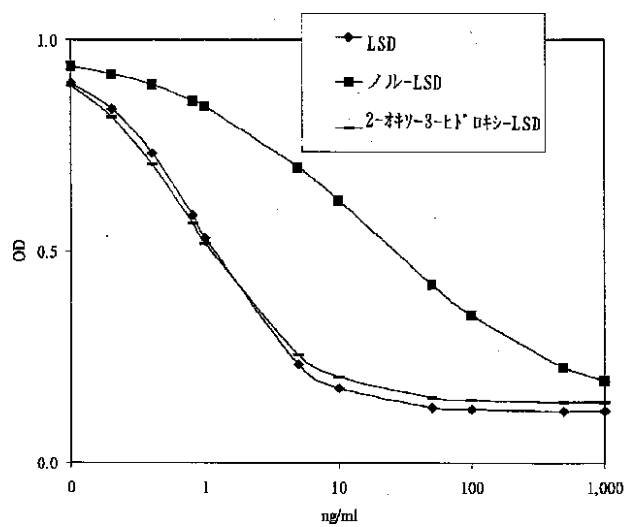
【図2】



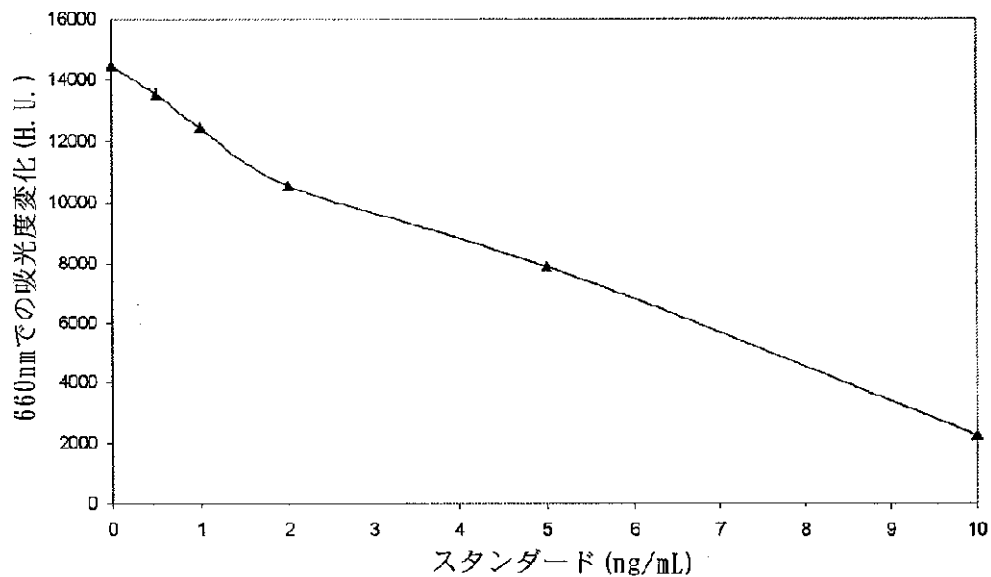
【図3】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

C 0 8 B 30/18
 G 0 1 N 33/53
 33/531
 // C 1 2 P 21/08

識別記号

F I

C 0 8 B 30/18
 G 0 1 N 33/53
 33/531
 C 1 2 P 21/08

テマコード (参考)

G
A

(C 1 2 P 21/08
C 1 2 R 1:91)

- (72)発明者 ステファン ブイトン
アメリカ合衆国 46060 インディアナ州
ノブレスビル, パークシャイア レーン
209
- (72)発明者 ゲラルド エフ. シグラール
アメリカ合衆国 46033 インディアナ州
カーメル, アイロンウッド ドライブ
888

(C 1 2 P 21/08
C 1 2 R 1:91)

- (72)発明者 アラン ジェー. マクナリー
アメリカ合衆国 46033 インディアナ州
カーメル, マラリス ドライブ 2767
- F ターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
4C064 AA30 CC01 DD08 EE04 FF03
FF04 GG18 HH05
4C090 AA02 AA09 BA08 BB77 BB98
BD41 CA41 DA25
4H045 AA11 AA40 BA51 CA40 CA42
CA50 DA76 DA86 EA50 FA52
FA72 GA10

专利名称(译)	LSD和2-氧代-3-羟基-LSD的免疫测定		
公开(公告)号	JP2002003500A	公开(公告)日	2002-01-09
申请号	JP2001108813	申请日	2001-04-06
[标]申请(专利权)人(译)	罗氏诊断公司		
申请(专利权)人(译)	罗氏诊断公司		
[标]发明人	ミタリゴージャル ステファンピトン ゲラルドエフシグラー アランジェーマクナリー		
发明人	ミタリゴージャル ステファンピトン ゲラルドエフシグラー アランジェーマクナリー		
IPC分类号	G01N33/53 C07D457/06 C07K14/435 C07K14/765 C07K14/795 C07K16/44 C08B30/18 C12P21/08 C12R1/91 G01N33/531 G01N33/94		
CPC分类号	C07D457/06 C07K16/44 G01N33/946 Y10S436/815 Y10S436/901 Y10T436/13		
FI分类号	C07K14/765 C07D457/06 C07K14/435 C07K14/795 C07K16/44 C08B30/18 G01N33/53.G G01N33/531.A C12P21/08 C12R1/91		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4C064/AA30 4C064/CC01 4C064/DD08 4C064/EE04 4C064/FF03 4C064/FF04 4C064/GG18 4C064/HH05 4C090/AA02 4C090/AA09 4C090/BA08 4C090/BB77 4C090/BB98 4C090/BD41 4C090/CA41 4C090/DA25 4H045/AA11 4H045/AA40 4H045/BA51 4H045/CA40 4H045/CA42 4H045/CA50 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA52 4H045/FA72 4H045/GA10		
优先权	60/196030 2000-04-07 US 09/733534 2000-12-08 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：获得新的麦角酰二乙胺（LSD）和异LSD，新的半抗原和氧化LSD的新免疫原以及来自免疫原的抗体，并提供利用该抗体的免疫测定方法。解决方案：该半抗原衍生物可用于制备抗原，抗体和用于检测LSD和2-氧代-3-羟基-LSD的免疫测定的试剂。2-氧-LSD核从吲哚氮衍生化以形成氨基烷基衍生物。随后在官能化位置进一步修饰所得半抗原，以使其与合适的免疫原性基团或标记基团连接，得到免疫测定试剂，其对LD和2-氧代-3-羟基-LSD具有基本相同的特异性。

