

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5782501号  
(P5782501)

(45) 発行日 平成27年9月24日(2015.9.24)

(24) 登録日 平成27年7月24日 (2015.7.24)

(51) Int. Cl.

1

GO 1 N 33/53 (2006.01)

GO1N 33/53

6

GO 1N 33/531

GO 1 N 33/531

8

GO 1 N 33/543 (2006.01)

GO 1 N 33/543

511D

請求項の数 18 (全 34 頁)

(21) 出願番号	特願2013-500059 (P2013-500059)
(86) (22) 出願日	平成23年2月23日 (2011. 2. 23)
(65) 公表番号	特表2013-522620 (P2013-522620A)
(43) 公表日	平成25年6月13日 (2013. 6. 13)
(86) 國際出願番号	PCT/US2011/025893
(87) 國際公開番号	W02011/115733
(87) 國際公開日	平成23年9月22日 (2011. 9. 22)
審査請求日	平成25年11月27日 (2013. 11. 27)
(31) 優先権主張番号	12/724, 780
(32) 優先日	平成22年3月16日 (2010. 3. 16)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者 511069507  
サラダックスバイオメディカル インコ  
一ポレイテッド  
アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 18  
015 ベスレヘム リサーチ ドライブ  
116  
(74) 代理人 110000855  
特許業務法人浅村特許事務所  
(72) 発明者 サラモネ、サルヴァトーレ、ジェイ。  
アメリカ合衆国、ニュージャージー、スト  
ックトン、ヤード ロード 65  
(72) 発明者 コートニー、ジョディ、ブレイク  
アメリカ合衆国、ペンシルヴァニア、ドイ  
ルズタウン、ヒッコリー ホロウ レイン  
5859

(54) 【発明の名称】 リスペリドンイムノアッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

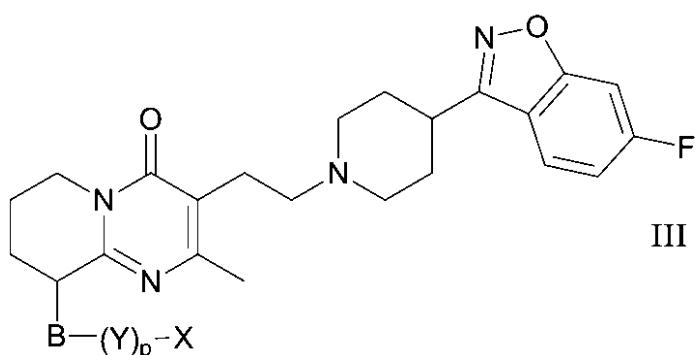
### 【請求項 1】

リスペリドン、パリペリドン及びこれらの混合物からなる群から選択される薬学的に活性な抗精神病薬を検出するためのイムノアッセイであって、

試料・

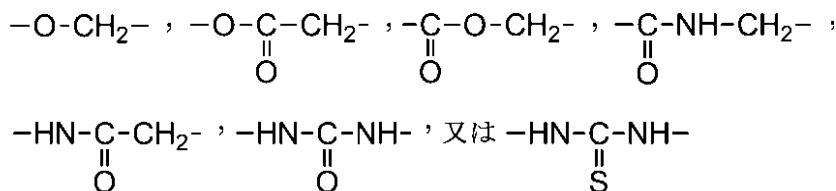
### 次式を有するリガンド・

【化 1】



10

〔式中、Bは、  
【化2】



10

であり、

Yは、有機スペーサー基であり、

Xは、担体に結合することができる末端官能基であり、

$p$  は、0 から 1 までの整数である] を含む担体；及び

前記薬学的に活性な抗精神病薬と選択的に反応性がある抗体であって、

反応性及び交差反応性が抗体のリスペリドン及びパリペリドンの双方との合計の反応性を基準にして、

薬理学的に不活性なリスペリドン及びパリペリドンの代謝産物である、7-ヒドロキシリスペリドンとの反応性が40%未満であり、

薬理学的に不活性なリスペリドン及びパリペリドンの他の代謝産物である、N-デアルキルリスペリドンとの反応性が、5%未満である抗体；  
を含有する混合物を用意するステップと、

前記試料中の薬学的に活性な抗精神病薬及び前記コンジュゲートを前記抗体と結合させるステップと、その後、前記試料中の、前記抗体に結合している又は結合していない前記コンジュゲートの量を測定し、それによって前記試料中の抗精神病薬の存在が検出可能となるステップとを含む上記イムノアッセイ。

## 【請求項2】

p が 0 である、請求項 1 に記載のイムノアッセイ。

### 【請求項 3】

p が 1 である、請求項 1 に記載のイムノアッセイ。

#### 【請求項4】

Yが、1個から10個までの炭素原子を含むアルキレン、

【化 3】

$-(CH_2)_m-$  ,  $-(CH_2CH_2O)_m-CH_2CH_2-$  ,  $-(CH_2)_m-C(=O)-N(H)-CH_2-$  , 又は  
 $-\overline{C_6H_4}-CH_2-$  , 又は

20

[式中、n及びoは、0から6までの整数であり、mは、1から6までの整数である]である、請求項3に記載のイムノアッセイ。

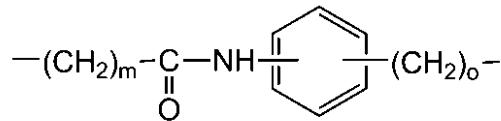
### 【請求項 5】

Yが、1個から6個までの炭素原子を含むアルキレンである、請求項4に記載のイムノアッセイ。

### 【請求項 6】

50

Y が  
【化 4】

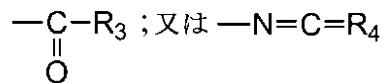


[式中、m 及び o は、請求項 4 に記載の定義の通りである]  
である、請求項 4 に記載のイムノアッセイ。

10

【請求項 7】

X が  
【化 5】

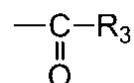


20

[式中、R<sub>3</sub> は、水素、ハロゲン、ヒドロキシルであるか、又はそれに結合した酸素原子と共に反応性エステルを形成しており、R<sub>4</sub> は、酸素又は硫黄である]  
である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のイムノアッセイ。

【請求項 8】

X が  
【化 6】



30

であり、

R<sub>3</sub> が H、C<sub>1</sub>、Br 又は OH であるか、或いは、R<sub>3</sub> が反応性エステルを形成している、請求項 7 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 9】

形成されるエステルが低級アルキルエステル、イミドエステル又はアミドエステルである、請求項 8 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 10】

40

B が -O-C<sub>1</sub>H<sub>2</sub>- である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のイムノアッセイ。

【請求項 11】

前記試料がヒト試料である、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のイムノアッセイ。

【請求項 12】

前記薬学的に活性な抗精神病薬の存在が、前記抗体に結合している又は結合していないコンジュゲートの量を測定することによって定量される、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のイムノアッセイ。

【請求項 13】

前記ヒト試料が、リスペリドンで治療した患者から採取された試料であり、前記イムノアッセイが、前記試料中のリスペリドン及びパリペリドンの量を測定する、請求項 12 に

50

記載のイムノアッセイ。

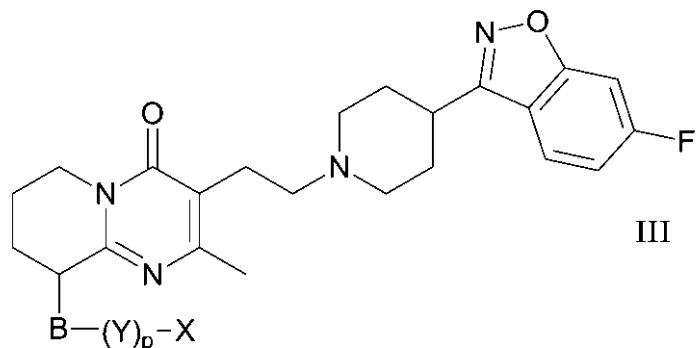
【請求項 14】

前記ヒト試料が、パリペリドンで治療した患者から採取された試料であり、イムノアッセイが、前記試料中のパリペリドンの量を測定する、請求項 12 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 15】

前記抗体が、次式のリガンド：

【化 7】



10

20

[式中、B、Y、X 及び p は、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の定義の通りである]

とコンジュゲートしたポリアミンポリマーを含む免疫原性担体を含む免疫原から作製される、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載のイムノアッセイ。

【請求項 16】

前記抗体が固体支持体に結合されている、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載のイムノアッセイ。

【請求項 17】

固体支持体がマイクロタイタープレート又はナノ粒子である、請求項 16 に記載のイムノアッセイ。

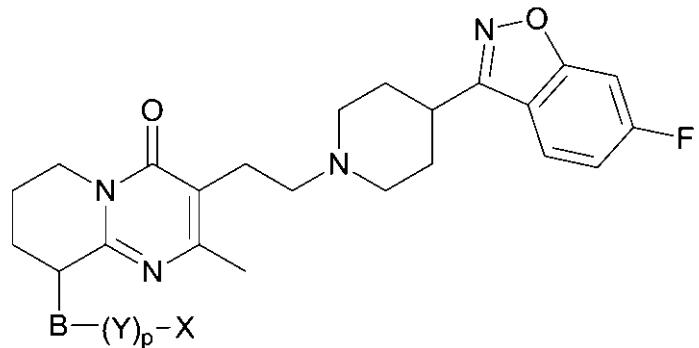
30

【請求項 18】

患者の試料中のリスペリドン及びパリペリドンからなる群から選択される薬学的に活性な抗精神病薬の存在を決定するためのキットであって、別々の容器中にパッケージングされた別々の試薬を含み、

前記試薬のうちの一方が、次式のリガンド：

【化 11】



40

50

[式中、B、Y、X及びpは、請求項1～10のいずれか1項に記載の定義の通りである]との担体のコンジュゲートであり、

他方の試薬が、前記薬学的に活性な抗精神病薬と選択的に反応性があり、

反応性及び交差反応性が抗体のリスペリドン及びパリペリドンの双方との合計の反応性を基準にして、

薬理学的に不活性なリスペリドン及びパリペリドンの代謝産物である、7-ヒドロキシリスペリドンとの反応性が40%未満であり、

薬理学的に不活性なリスペリドン及びパリペリドンの他の代謝産物である、N-デアルキルリスペリドンとの反応性が5%未満である、

抗体である、

10

上記キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、治療期間中の最適薬物濃度を迅速に決定するためにヒト体液においてリスペリドン及び薬理学的に活性なその代謝産物であるパリペリドンの存在の決定及び/又は量の定量をするためのイムノアッセイの分野に関する。

【背景技術】

【0002】

統合失調症は、世界の人口の約1%に影響を及ぼしている重症の精神医学的障害である。統合失調症の臨床症状としては、妄想、幻聴、支離滅裂な思考及び発言、社会的離脱、意欲の欠如、及び、例えは支離滅裂な思考及び記憶障害のような認知機能障害等が挙げられる。この障害は、ドーパミン及びセロトニンのレベルを含む神経学的欠損と、抑制性介在ニューロン欠損との組合せによって惹起されると考えられている(Freedman, 2003, New Eng. J. Med., 349(18): 1738-1749)。統合失調症は、一般に抗精神病薬又は神経遮断薬と呼ばれる、神経伝達物質及び受容体を標的とする薬剤で治療することができる。

20

【0003】

「非定型抗精神病薬」又は「第二世代抗精神病薬」と呼ばれる一クラスの抗精神病薬には、ベンゾイソオキサゾール誘導体である、リスペリドン(I)が含まれる。リスペリドンは、米国にあるJanssen-CilagによってRisperdal(登録商標)の下で販売されており、セロトニン(5-HT<sub>2A</sub>)及びドーパミン(D<sub>2</sub>)の受容体を標的として、そのそれぞれの神経伝達物質の取り込みを阻害する(Package-Insert-Risperdal, 2009, Janssen Cilag)。リスペリドンは、ヒトにおいてチトクロームP450アイソフォームCYP2D6によって生物学的に活性な9-ヒドロキシ代謝産物であるパリペリドン(II)に代謝される。双方が同様のin vitro効力を有することが示されているので、共にこれらは「活性部分」を構成し、ひとまとめにしてモニタリングしなければならない(Mannens et al., 1993, Drug Met. & Disp., 21(6): 1134-1141)。パリペリドン自体は、近年、FDAによって統合失調症の治療薬として承認されており、Janssen PharmaceuticaによってInvega(登録商標)のもとで販売されている(Package-Insert-Invega, 2009, Janssen Pharmaceutica)。

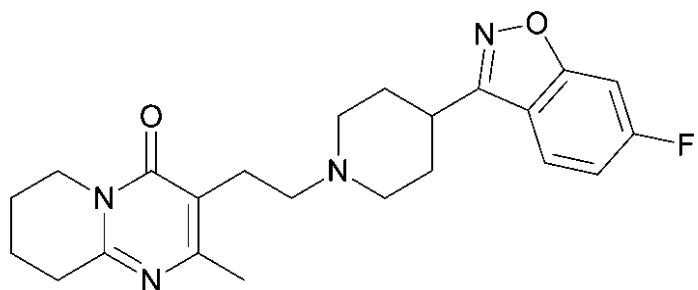
30

【0004】

40

リスペリドンは、以下の式を有する：

【化1】



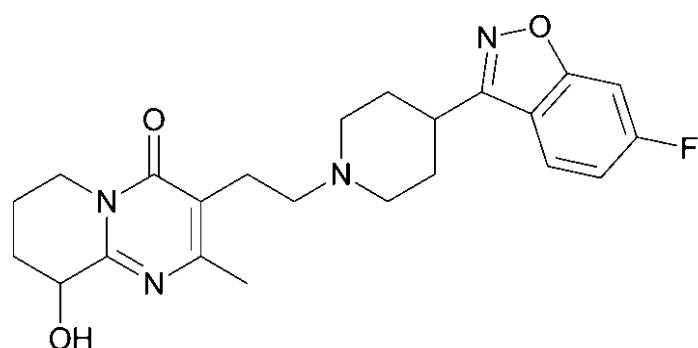
I

10

【0005】

パリペリドンは、以下の式を有する：

【化2】



II

20

【0006】

リスペリドン及びパリペリドンの「活性部分」は定常状態血漿中濃度において最高で13倍の患者間変動性を有すること並びにこの変動性が効力及び安全性に影響を与えることが示されている (Spina et al., 2001, Psychopharmacology, 153 (2) : 238 - 243; Aravagiri et al., 2003, Ther. Drug Monitor., 25 (6) : 657 - 664; Riedel et al., 2005, Eur. Arch. Psych. and Clin. Neurosci., 255 (4) : 261 - 268)。

30

【0007】

リスペリドン及びパリペリドンの効力はより高いトラフ値レベルで増大し、この薬剤は広範囲にわたる患者内薬物動態学的変動を示すので、血液中のこの薬剤の濃度をモニタリングして目標レベルに調整することは、効力を増大させて毒性を最小限に抑えるのに重要なはずである (Raggi et al., 2004, Med. Chem. Rev., 1 : 299 - 316; Musenga et al., 2009, Curr. Med. Chem., 16 (12) : 1463 - 1481)。リスペリドン及びその誘導体の、個体内及び個体間の薬物動態学的変動の程度は、13倍になることが報告されており、以下を含む、多くの因子によって影響される：

40

年齢

体重

臓器機能

薬剤 - 薬剤相互作用

遺伝的調節

コンプライアンス

【0008】

50

この変動の結果として、異なる個体における等用量の同一薬剤によって臨床転帰が劇的に異なる結果となり得る。同一投与量のリスペリドン及びパリペリドンの有効性は、患者における個々の薬物クリアランス及び最終的な血清中薬物濃度に基づいて著しく変化する。治療薬管理により、臨床医が薬剤投与の際の患者の変化を洞察できるようになるはずである。治療薬管理を行えば、薬剤投与量を患者に合わせて個別化することができ、望ましくない副作用なく該障害を有効に治療する可能性がかなり高くなるであろう。

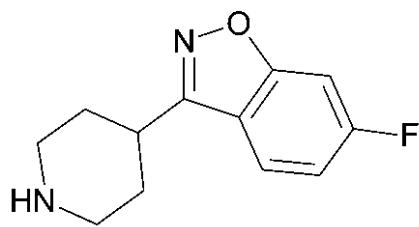
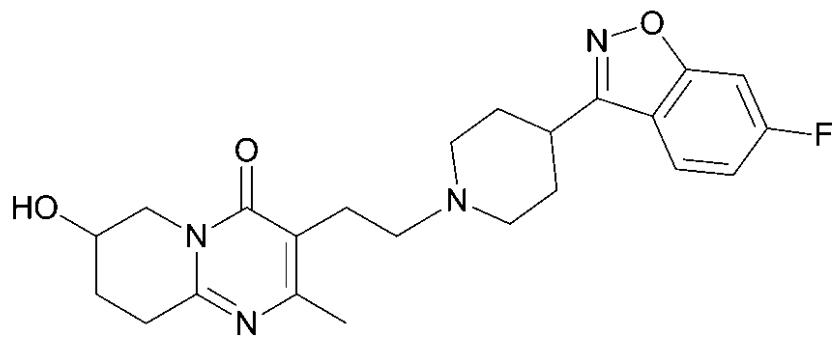
#### 【0009】

さらに、リスペリドン及びパリペリドンの治療薬管理は、実際の所定投与量のある抗精神病薬を投与する際のコンプライアンス (Valeenstein et al., 2006, J. Clin. Psych., 67(10): 1542-1550; Treuer et al., 2009, BMC Health Serv. Res., 9: 9) 及び有効な血清中濃度レベルの達成を確実にする優れた手段として役立つはずである。リスペリドン及びパリペリドンの日常的な治療薬管理には、一般実験機器に適合可能な簡単な自動化された試験を利用できることが必要とされるであろう。ヒトの血液中及び血漿中のリスペリドン及びパリペリドンの濃度を決定するための、UV検出又はマススペクトロスコメトリ検出を用いた液体クロマトグラフィー (LC) の使用は、記載されている (Balan-Gorgia, et al., 1999, Ther. Drug Monitor., 21(1): 105-115; Schatz et al., 2000, Pharmacol., 60(1): 51-56; Frahnert et al., 2003, J. Chrom. B, 794(1): 35-47; Zhang et al., 2008, Biomed. Chrom., 22(7): 671-687)。これらの方法は、労働集約的であり、液液抽出又は固相抽出を必要とするので、高価な装置を使用し、日常的な臨床検査での使用に受け入れられるものではない。現在までのところ、リスペリドン及び/又はパリペリドンを、これらの抗精神病薬で治療した患者のヒト体液中で測定するためのイムノアッセイはない。

#### 【0010】

上記からわかるように、ヒト体液においてリスペリドン及び/又はパリペリドンの存在の決定及び/又は量の定量をするためのイムノアッセイはない。イムノアッセイによるリスペリドン及びパリペリドンの日常的な治療薬管理により、標準実験機器に適合した簡単な自動化された試験が可能となるはずである。しかし、こうしたイムノアッセイを可能にするためには、リスペリドン及びパリペリドンに選択的な抗体を作製する必要がある。このアッセイにおいて使用される誘導体及び免疫原は、作製された対応するそれらの抗体を通して、治療的に活性若しくは不活性な、又は薬理学的に活性若しくは不活性な、リスペリドン及びパリペリドンの他の代謝産物に対するいかなる実質的な交差反応性もなく、リスペリドン及びパリペリドンに対する選択的反応性を付与しなければならない。薬剤レベルのモニタリングにおいて有効であるためには、該抗体は、リスペリドン及びパリペリドンに選択的でなければならず、薬学的又は薬理学的に不活性なリスペリドン及びパリペリドンの代謝産物と交差反応性であってはならない。主要な薬学的又は薬理学的に不活性な代謝産物は、7-ヒドロキシリスペリドン (V) 又はN-デアルキルリスペリドン (VI) であり (Mannens, et al., 1993, Drug Met. & Disp., 21(6): 1134-1141; He et al., 1995, Int. Clin. Psychopharmacol., 10(1): 19-30)、これらの代謝産物は以下の式を有する：

【化3】



【0011】

イムノアッセイにおいて有効であるためには、これらの抗体は、薬学的又は薬理学的に不活性な代謝産物である、7-ヒドロキシリスペリドンVに対して実質的に低い反応性を有すると同時に、薬学的又は薬理学的に不活性な他の代謝産物、特に、N-デアルキルリスペリドンVIに対しては反応性を実質的に全く又は少しも有していない必要がある。これは、該代謝産物、7-ヒドロキシリスペリドンVが、リスペリドン及びパリペリドンからきわめて少ない量で生成されるのみであるためである。

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明によれば、リスペリドン及びパリペリドンに対して選択的に反応性であり、薬理学的又は薬学的に不活性なこれらの代謝産物である7-ヒドロキシリスペリドンに対してはほとんど実質的に反応性でなく、N-デアルキルリスペリドン等の薬理学的又は薬学的に不活性なこれらの他の代謝産物に対してはいかなる実質的な交差反応性もないように、リスペリドン及びパリペリドンに対して実質的に選択的に反応性である、新しい一クラスの抗体が作製されている。選択的に反応性とは、この抗体がリスペリドン及びパリペリドンと反応し、薬理学的に不活性なリスペリドン及びパリペリドンの代謝産物である7-ヒドロキシリスペリドンとの実質的な反応性をほとんど有しておらず、薬理学的に不活性なリスペリドン及びパリペリドンの他の代謝産物、特に、N-デアルキルリスペリドンとの実質的な交差反応性を有していないことを意味する。該代謝産物、7-ヒドロキシリスペリドンVは、リスペリドン及びパリペリドンから、この代謝産物を形成するのに使用されるリスペリドン及びパリペリドンの重量を基準として、5重量%未満の、きわめて少ない量で生成されるのであるので、これらの特性は、本発明のイムノアッセイを可能にするために重要である (Mannens, et al., 1993, Drug Met. & Disp., 21 (6): 1134-1141)。したがって、ヒト体液試料において、これらのイムノアッセイを行う際に、リスペリドン及びパリペリドンで治療した患者のヒト試料中の7-ヒドロキシリスペリドンは、たとえるとしても、ほとんどないことにな

40

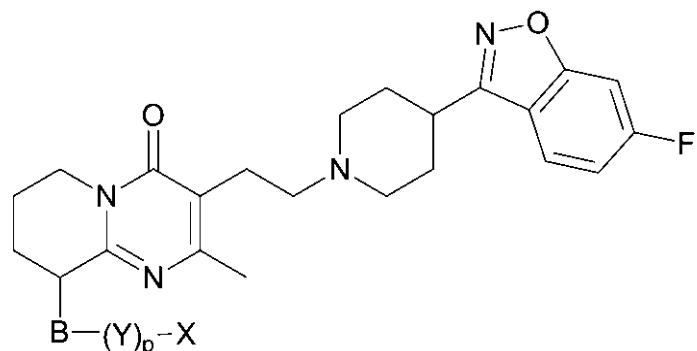
50

る。これらの抗体には薬学的又は薬理学的に活性でないリスペリドン及びパリペリドンのこれらの代謝産物に対するこうした反応性及び交差反応性があるので、これらの代謝産物が、ヒトの体液中のリスペリドン及びパリペリドンの存在及び量の、イムノアッセイによる、正確な決定を妨げることはない。

## 【0013】

次式の化合物：

## 【化4】

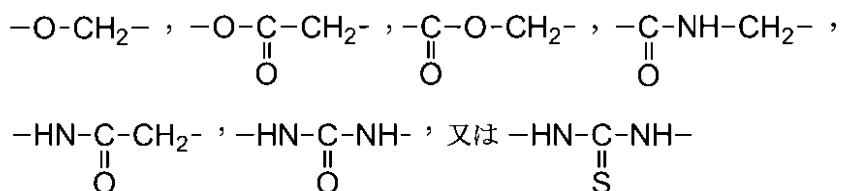


III

10

〔式中、Bは、

## 【化5】



20

であり、

Yは、有機スペーサー基であり、

Xは、担体に結合することができる末端官能基であり、

pは、0から1までの整数である】

との免疫原性ポリアミンポリマーのコンジュゲートである免疫原を使用することによって、薬理学的に不活性なリスペリドン及びパリペリドンの代謝産物である7-ヒドロキシリスペリドンとの反応性を実質的にほとんど有しておらず、薬理学的に不活性なリスペリドン及びパリペリドンの他の代謝産物、特に、N-デアルキルリスペリドンと実質的に交差反応しないという点でリスペリドン及びパリペリドンに選択的な抗体が產生されることが見出されている。

## 【0014】

上記のような、リスペリドン及びパリペリドンと実質的に選択的に反応し、薬理学的に不活性なリスペリドン及びパリペリドンの代謝産物とはほとんど又は全く交差反応性を有していない、これらの抗体の提供により、リスペリドン及びパリペリドンで治療している患者の体液試料中のリスペリドン及びパリペリドンをモニタリングするために特異的に検出及び定量することができるイムノアッセイを行うことが可能となる。本発明にさらに含まれるのは、前記イムノアッセイ用の試薬及びキットである。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0015】

40

50

本発明によれば、リスペリドン及びパリペリドンと実質的に選択的に反応し、本明細書中で上述したような代謝産物との実質的な反応性又は交差反応性を有していない又はほとんど有していない、新しい一クラスの抗体が得られる。式ⅠⅡⅢのリスペリドンのこれらの誘導体を免疫原として使用することによって本発明の新しい一クラスの抗体が得られることが発見された。これらの抗体を使用することにより、血液、血漿又は他の体液の試料中のリスペリドン及びパリペリドンを検出及び／又は定量するためのこうしたイムノアッセイ用の試薬及びキットを含めて、イムノアッセイが開発された。このイムノアッセイを使用することにより、リスペリドン及びパリペリドンの、これらの治療薬で治療した患者の体液試料中での存在及び量を検出及び／又は定量することができる。この方法では、リスペリドン又はパリペリドンで治療している患者を療法期間中にモニタリングすることができ、前記モニタリングに従ってその患者の治療を調整する。本発明により、治療用抗精神病薬としてリスペリドン又はパリペリドンで治療している精神病患者、特に、統合失調症患者におけるリスペリドン及び／又はパリペリドンの治療薬管理が実現する。検出される治療用抗精神病薬は、式Ⅰのリスペリドン及び／又は薬理学的に活性なその代謝産物である式ⅠⅡのパリペリドンである。

#### 【0016】

本発明の抗体は、薬学的に活性な抗精神病薬であるリスペリドン及びパリペリドンを検出する方法を可能にする。本発明の抗体は、リスペリドン及びパリペリドンの双方と反応性であるので、リスペリドン及びパリペリドンの双方の検出に利用され得る。したがって、リスペリドンで治療する患者のイムノアッセイ並びにパリペリドンで治療する患者のイムノアッセイのいずれにおいても、これらの抗精神病薬のうちいずれか1種の投与をモニタリングするためにこれらを使用することができる。パリペリドンはリスペリドンの薬学的に活性な代謝産物であるので、これは本當である。このような方法で、リスペリドンで治療する患者をモニタリングして、その患者の試料中のリスペリドン若しくはパリペリドン又は双方の存在を決定することができる。患者をリスペリドンで治療する場合に患者の試料中のこれらの薬剤の双方の量を定量することにより、どのくらいのリスペリドンを患者に投与するべきか、及びどのようにリスペリドン療法を調節するかを決定することになる。パリペリドンについては、リスペリドンの代謝産物であるので、リスペリドンは、パリペリドンで治療した患者のヒト試料中に、たとえあるとしても、ほとんどないであろう。したがって、このイムノアッセイにより、パリペリドンで治療した患者をモニタリングして患者の試料中のパリペリドンの存在を決定することもできる。同様の方法で、患者をパリペリドンで治療する場合に患者の試料中のパリペリドンの量を定量することにより、どのくらいのパリペリドンを患者に投与するべきか、及びどのようにパリペリドン療法を調節するかを決定することになる。

#### 【0017】

本発明のイムノアッセイは、これらの抗精神病薬の一方又は双方で治療した患者の試料を含有する混合物を用意し、この試料を本発明の抗体及び式ⅠⅡⅢのリガンドと担体のコンジュゲートと共に含有する混合物を用意することによって行われる。この方法において、薬学的に活性な抗精神病薬及び前記試料中の該コンジュゲートは抗体と結合することになり、この結合から、コンジュゲートの量を決定することから、患者の試料中の抗精神病薬の量を算出することができる。

#### 【0018】

あらゆる患者の試料を使用することができる。一般に、患者の試料は、これらの薬剤の一方又は双方で治療した患者から採取された血液試料であり得ることが好ましい。これにより、これらの抗精神病薬を用いた患者の治療を継続的にモニタリングする簡単な方法が可能となるであろう。

#### 【0019】

本発明のアッセイにおいて利用される試薬は、ポリマー担体と式ⅠⅡⅢの化合物とのコンジュゲートである。これらのコンジュゲートは、本発明の抗体との結合について、試料中に存在するリスペリドン及びパリペリドンと競合的な結合パートナーである。したがつ

10

20

30

40

50

て、該抗体に結合するコンジュゲート試薬の量は、試料中のリスペリドン及びパリペリドンの量に反比例することになる。本発明によれば、該アッセイは、該抗体に結合している又は結合していない前記コンジュゲートの量を検出及び測定するための従来の任意の測定方法を利用する。前記方法の使用により、結合している又は結合していないコンジュゲートの量を測定することができる。一般に、試料中のリスペリドン及びパリペリドンの量は、試料中のリスペリドン及びパリペリドンによって得られる、結合している又は結合していないコンジュゲートの測定量を、既知量のリスペリドン及び/又はパリペリドンを含有する試料で得られた標準曲線又は較正曲線から決定された、結合している又は結合していないコンジュゲートの値と関連付けることによって決定され、この既知量は、試験する試料について予想される範囲内にある。較正曲線を作成するためのこれらの試験は、試料に使用したのと同様のイムノアッセイ法を使用して決定される。

10

#### 【0020】

##### 定義

本明細書の全体にわたり、以下の定義を理解しておくべきである：

#### 【0021】

本出願の全体にわたり、「Ph」という用語は、フェニル基を意味する。「アルキレン」という用語は、1から10個までの炭素原子を含む2価の飽和した直鎖又は分岐鎖の炭化水素置換基を意味する。

#### 【0022】

「免疫原」及び「免疫原性」という用語は、生物において免疫応答を誘発、生成、又は発生させることができる物質を指す。

20

#### 【0023】

「コンジュゲート」という用語は、別々の部分を結合させて一緒にすることから形成されるあらゆる物質を指す。本発明による代表的なコンジュゲートとしては、式IIIの化合物のような小分子と、担体又はポリアミンポリマー、特に、タンパク質のような大分子とを結合させて一緒にすることによって形成されるものが挙げられる。該コンジュゲートにおいて、小分子は、大分子上の1つ又は複数の活性部位で結合され得る。コンジュゲートという用語には、免疫原という用語も含まれる。

#### 【0024】

「ハプテン」は、部分的又は不完全な抗原である。これらは、タンパク質を含んでいない物質、大抵は低分子量の物質であり、抗体形成を刺激することはできないが、抗体と反応する。後者は、ハプテンを高分子量の免疫原性担体にカップリングさせることと、次いで、このカップリングされた生成物、すなわち、免疫原をヒト又は動物の対象に注射することによって形成される。本発明のハプテンは、リスペリドンである。

30

#### 【0025】

本明細書において、「スペーサー基」又は「スペーサー」とは、ハプテン、担体、免疫原、標識、又はトレーサーのような2つ以上の部分構造を官能リンカー基を通して連結する化学構造の一部を指す。これらのスペーサー基については、本出願において以下に列挙することになる。スペーサー基の原子及びスペーサー基中の鎖の原子は、それら自体が化学結合によって連結されている。中でも好ましいスペーサーは、直鎖又は分岐状の、飽和又は不飽和の炭素鎖である。これらの炭素鎖は、鎖中又は鎖の末端に1つ又は複数のヘテロ原子も含み得る。「ヘテロ原子」とは、酸素、窒素及び硫黄からなる群から選択される炭素以外の原子を意味する。スペーサー基は、鎖の一部として又は鎖中の原子のうちの1個の上にある置換基として環状又は芳香族の基も含み得る。

40

#### 【0026】

該スペーサー基中の原子の数は、水素以外の原子を計数することによって決定される。スペーサー基中の鎖中の原子の数は、連結されている部分構造間の最短経路に沿った水素以外の原子の数を計数することによって決定される。官能リンカー基は、ハプテンと標識又は担体若しくはポリアミンポリマーとのコンジュゲートを合成するためのハプテン又はスペーサー基を活性化するために、例えば、その上に利用可能な官能部位を提供するため

50

に、使用され得る。

【0027】

本明細書において、「免疫原性担体」という用語は、この場合にはリスペリドンである、ハプテンと1つ又は複数の部位で結合することができ、それによってこれらのハプテン誘導体が免疫応答を誘導してこれらのハプテンと特異的に結合できる抗体の産生を誘発するのを可能にする、一般的にはタンパク質である、免疫原性物質である。免疫原性担体及びリンカー基について、本出願において以下に列挙することになる。免疫原性担体物質には、異物として認識され、それによって宿主からの免疫応答を誘発する、タンパク質、糖タンパク質、複合ポリアミノ-多糖、粒子、及び核酸が含まれる。ポリアミノ-多糖は、その調製で知られている従来の方法のうちの任意のものを使用して多糖から調製することができる。

10

【0028】

多様なタンパク質の型も、ポリ(アミノ酸)免疫原性担体として用いられ得る。こうした型としては、アルブミン、血清タンパク質、リボタンパク質等が挙げられる。例示的なタンパク質としては、ウシ血清アルブミン(BSA)、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、卵黄アルブミン、ウシサイログロブリン(BTG)等が挙げられる。代替的に、合成ポリ(アミノ酸)が利用され得る。

【0029】

免疫原性担体には、単糖の繰り返し縮合によって構築された高分子量ポリマーである、ポリアミノ-多糖も含まれ得る。多糖の例は、デンプン、グリコーゲン、セルロース、アラビアガムのような炭水化物ガム、及び寒天等である。多糖には、ポリ(アミノ酸)残基及び/又は脂質残基も含まれる。

20

【0030】

免疫原性担体は、単独のポリ(核酸)、又は上述のポリ(アミノ酸)若しくは多糖のうちの一方とコンジュゲートしたポリ(核酸)のいずれかであってもよい。

【0031】

免疫原性担体は、固体粒子も含み得る。該粒子は、一般に、直径が、少なくとも約0.02ミクロン(μm)であり、約100μmを超えず、通常は、約0.05μmから10μmまでである。該粒子は、有機又は無機、膨潤性又は非膨潤性、多孔性又は非多孔性であってもよく、最適には、水に近い、一般に約0.7から1.5g/mLまでの密度を有し、透明、部分的に透明、又は不透明であり得る物質を含んでいてもよい。該粒子は、赤血球、白血球、リンパ球、ハイブリドーマ、連鎖球菌(*Streptococcus*)、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)、大腸菌(*E. coli*)、及びウイルス等の非限定的な例を含む、細胞及び微生物のような生体物質であってもよい。該粒子は、有機及び無機のポリマー、リポソーム、ラテックス、リン脂質小胞、又はリボタンパク質も含み得る。

30

【0032】

「ポリ(アミノ酸)」又は「ポリペプチド」は、アミノ酸から形成されたポリアミドである。ポリ(アミノ酸)は、分子量の上限を有さず、一般に約2,000の分子量からの範囲に及ぶことになり、普通は10,000,000未満、通常は約600,000ダルトン未満である。免疫原性担体又は酵素が含まれているかどうかによって、通常は異なる範囲もある。

40

【0033】

「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形成されたあらゆる化合物であり、通常は、(NH<sub>2</sub>末端以外の)各アミノ酸残基の-NH基が隣の残基の-C(=O)基に直鎖状に結合している-NH-C(=O)アミノ酸のポリマーである。ペプチド、ポリペプチド及びポリ(アミノ酸)という用語は、本明細書において、大きさについて限定することなくこのクラスの化合物を言及するのに同義的に使用される。このクラスの中で最も大きなものはタンパク質と呼ばれる。

【0034】

50

「標識」、「ディテクター分子」、又は「トレーサー」は、検出可能なシグナルを生成するか、又はその生成を誘導することができるあらゆる分子である。標識は、検体、免疫原、抗体に、又は別の分子、例えば受容体若しくは受容体に結合可能な分子、例えばリガンド、特にハプテン等にコンジュゲートさせることができる。標識の非限定的な例としては、放射性同位体、酵素、酵素断片、酵素基質、酵素阻害剤、補酵素、触媒、フルオロフオア、色素、化学発光体、発光体、又は増感剤；非磁性粒子若しくは磁性粒子、固体支持体、リポソーム、リガンド、又は受容体等が挙げられる。

【0035】

「抗体」という用語は、抗原の特異的タンパク質結合パートナーを指し、他の物質を排除して抗原に対して特異的な結合親和性を有する、あらゆる物質、又は物質群である。抗体という総称には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体及び抗体フラグメントが含まれる。

10

【0036】

「誘導体」という用語は、1つ又は複数の化学反応によって親化合物から生成された化学的な化合物又は分子を指す。

【0037】

「担体」という用語は、固体粒子及び／又は、例えば、上述のもののような免疫原性ポリマー等の、高分子ポリマーを指す。担体が固体粒子の場合には、式IIIの化合物中の末端官能基Xに結合するための1つ又は複数の反応部位を提供するために、ポリアミンポリマーが、固体粒子に結合、コーティング、又はそれ以外では付加されていてもよい。

20

【0038】

「試薬キット」、又は「試験キット」という用語は、アッセイを行う際に使用される材料の集合体を指す。試薬は、それらの交差反応性及び安定性に依存して、同一又は別々の容器中に、液体又は凍結乾燥された形態でパッケージングされた組合せで提供されてもよい。キットで提供する試薬の量及び比率は、特定の用途で最適の結果が得られるように選択することができる。本発明の特徴を実現する試薬キットは、リスペリドン及びパリペリドンに特異的な抗体を含む。キットは、検体のリガンド並びに較正物質及び対照物質を更に含んでいてもよい。試薬は、液体の形態のままであってもよく、又は凍結乾燥されていてもよい。

【0039】

30

「較正物質及び対照物質」という語句は、既知量の測定する薬剤を含有するあらゆる標準物質又は参照物質を指す。薬剤の濃度は、未知の試料で得られた結果を標準物質で得られた結果と比較することによって算出される。これは、一般的には、較正曲線を作成することによって行われる。

【0040】

「生体試料」という用語は、生物又は元生物からの任意の量の物質を含むが、これらに限定されない。こうした生物としては、ヒト、マウス、サル、ラット、ウサギ、ウマ、及び他の動物等が挙げられるが、これらに限定されない。こうした物質としては、血液、血清、血漿、尿、細胞、臓器、組織、骨、骨髄、リンパ液、リンパ節、滑膜組織、軟骨細胞、軟骨細胞、滑膜マクロファージ、内皮細胞、及び皮膚等が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0041】

試薬及び免疫原

抗体に基づいたイムノアッセイにおいて、リスペリドンのコンジュゲートは、試料中でその抗体上の結合部位についてリスペリドン及びパリペリドンと競合するように構築される。本発明のイムノアッセイにおいて、式IIIの試薬は、式IIのパリペリドンの9-ヒドロキシル基上に形成された、酸素置換されたリスペリドン誘導体である。式IIIの化合物において、リンカースペーサーは、この分子の「Y-X」部分を構成する。これらのリンカーX及びスペーサーYは、イムノアッセイ用のコンジュゲート及び抗体産生用の免疫原を調製する際の従来型である。イムノアッセイ用のコンジュゲート及び抗体産生用

50

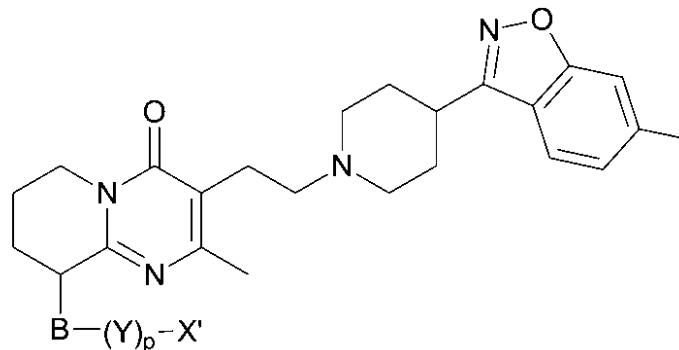
の免疫原を調製するのに利用される従来のスペーサー-リンカー基のうちの任意のものを、式 I II の化合物において利用することができる。こうした従来のリンカー及びスペーサーは、米国特許 5,501,987 及び米国特許 5,101,015 に開示されている。

【0042】

該コンジュゲート並びに該免疫原は、式 I I の化合物から調製される。ハプテンを有する担体のコンジュゲート又は免疫原において、該担体は、該担体のポリアミンポリマー部分が含む 1 個又は複数の反応性アミノ基に対して、1 つに又は複数の位置で、次式を有するハプテン：

【化 6】

10



20

IV

[式中、X' は、-CH<sub>2</sub> 又は官能リンカー基であり、B、p 及び Y は、上記の通りである]

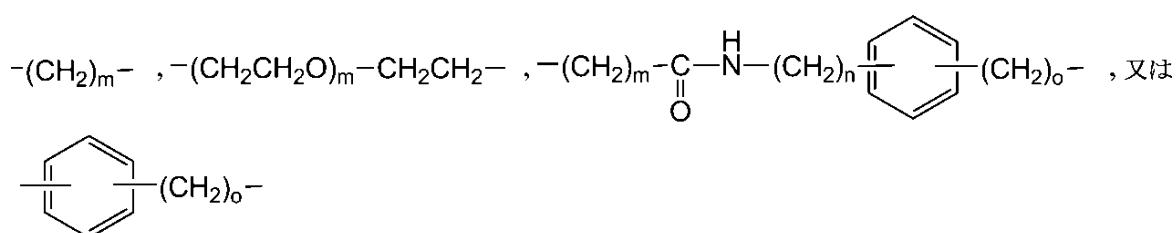
に結合される。

【0043】

好ましいスペーサー基の中には、本明細書中で前述したスペーサー基が含まれる。特に好ましいスペーサー基は、1 から 10 までの炭素原子を含むアルキレン、

【化 7】

30



40

[式中、n 及び o は、0 から 6 までの整数であり、m は、1 から 10 までの整数であり、アルキレンがあれば特に好ましいスペーサー基となる]

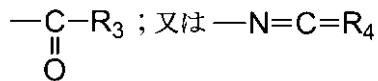
等の基である。

【0044】

式 I V の化合物において、式中、X' は、好ましくは高分子担体上の反応性アミン基を通して、スペーサーを結合している官能基である。基 X' は、式 I II の化合物中の末端官能基 X が、担体又は免疫原のポリアミンポリマー中の反応性アミノ基に結合した結果である。アミノ基と反応することができるいずれの末端官能基も、式 I II の化合物中の官能基 X として利用することができる。X 中に含まれていることが好ましいこれらの末端官能基は、以下のものである：

50

## 【化8】



[式中、 $\text{R}_3$ は、水素、ハロゲン、ヒドロキシルであるか、又は結合した酸素原子と共に反応性エステルを形成しており、 $\text{R}_4$ は、酸素又は硫黄である]。基 $-\text{N}=\text{C}=\text{R}_4$ は、イソシアネート又はイソチオシアネートであってもよい。 $\text{R}_3$ によって形成される活性エステルとしては、例えばN-ヒドロキシスクシンイミド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール及びp-ニトロフェニルエステルのような、イミドエステル等が挙げられる。しかし、アミン基と反応可能なあらゆる活性エステルを使用することができる。

## 【0045】

カルボン酸基及び活性エステルは、従来の方法によって担体又は免疫原性ポリマーに結合される。タンパク質等の、ポリアミンポリマー上のアミン基は、本発明のポリマー、免疫原又は担体及び/又はコンジュゲートにスペーサーを連結するアミド基を生成する。

## 【0046】

本発明の免疫原及びコンジュゲートにおいて、カルボキシル基を含む式I-IIのハプテンと、担体又は免疫原が含むポリアミンポリマー上の反応性アミノ基との間の化学結合は、当業者に知られている多様な方法を使用して形成され得る。アミド結合の形成が好ましいことが多い。アミド結合は、まず、式I-IIの化合物中のXを形成するカルボン酸部分を活性化し、次いで、このカルボキシ基を脱離基試薬（例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、p-ニトロフェノール等）と反応させることによって形成される。ジシクロヘキシルカルボジイミド、及びジイソプロピルカルボジイミド等の任意の活性化試薬を使用することができる。式I-IIの化合物中のXを形成するカルボン酸部分は、塩化チオニル、及び臭化チオニル等を使用してそれぞれの酸ハロゲン化物に変換することによって活性化することができる。次いで、式I-IIのリスペリドンハプテン中の活性化型のカルボキシル基を、反応性アミノ基を有する担体を含有する緩衝溶液と反応させる。

## 【0047】

式I-IIの化合物中の、Xがアルデヒド基を含む場合、これらの化合物を、還元的アミノ化によるアミン結合を通して担体上のポリアミンポリペプチドの遊離アミノ基に連結することもできる。アルデヒドをアミンと縮合させるあらゆる従来法、例えば還元的アミノ化を通したものなどを、この結合を形成するのに使用することができる。この場合には、式IVのリガンド部分中のX'は、 $-\text{CH}_2-$ である。

## 【0048】

一方、Xが、式I-IIの化合物中の、末端のイソシアネート基又はチオイソシアネート基 $-\text{N}=\text{C}=\text{R}_4$ である場合、これらの基は、ポリアミンポリマーの遊離アミンと反応して、X'がポリアミン担体又は免疫原性ポリペプチド上にアミノ基を有する式IVのコンジュゲート又は免疫原を生成する。

## 【0049】

式I-IIの化合物は、これらの化合物を、ポリアミン又はポリペプチドを含む担体と反応させることによって本発明の免疫原及び/又はコンジュゲート試薬に変換することができる。ポリアミン又はポリペプチドが免疫学的に活性であるならば、同一のポリペプチドを、本発明の免疫原において担体として、また免疫原性ポリマーとして利用することができる。しかし、コンジュゲートを形成するために、これらのポリマーは、免疫原に必要とされるような免疫学的応答を生成する必要はない。本発明によれば、式I-IIの化合物中でXによって表される多様な官能基は、ポリマー中に含まれるアミノ基に官能基を付加する従来の方法によって、反応性アミノ基を有するポリマーを含む担体にコンジュゲートさ

10

20

30

40

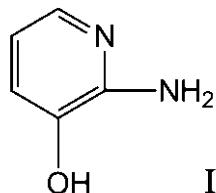
50

せることができる。好ましい一実施形態によれば、式 I I I の化合物において、X は、カルボン酸基又はその活性エステルである。

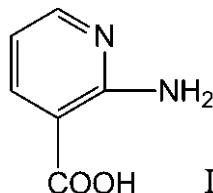
【0050】

式 I I I の化合物は、次式の化合物：

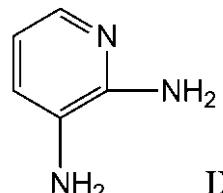
【化9】



IX-A



IX-B



IX-C

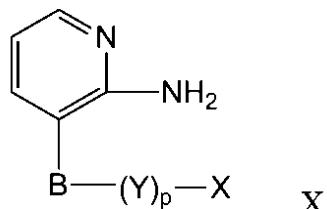
10

から形成され得る。

【0051】

式 I I I の化合物は、次式の化合物

【化10】



20

から形成される。

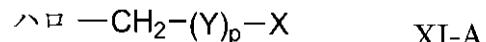
式中、B、Y及びXは、上記の通りである。

30

【0052】

式 I X - A の化合物を、式中の B が - O - C H <sub>2</sub> - である式 X の化合物の誘導体に変換する際には、式 I X - A の化合物を、次式の化合物

【化11】



XI-A

【式中、p、Y及びXは、上記の通りである】  
と反応させる。

40

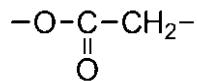
【0053】

これらの誘導体を形成する際に、アルコールを反応させてエーテルを形成するあらゆる従来の方法を、式 X I - A のハロ化合物を式 I X - A の化合物上のヒドロキシ基と縮合させることに利用することができる。式 X I - A の化合物中のハロゲン化物を使用することにより、アルコールと縮合させることによってエーテルを形成する効率的な方法が可能になる。一方、式 X I - A の化合物が、これらの誘導体を形成するためのこの反応を妨げる可能性のある官能基を含む場合には、これらの官能基を、本明細書中で上記したような反応の後に除去することができる好適な保護基によって保護することもできる。

【0054】

50

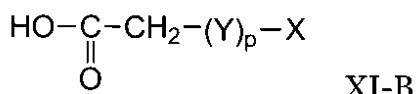
式中の B が  
【化 1 2】



である式 X の化合物では、任意の従来のエステル化の方法を利用して、式 IX - A の化合物中の遊離ヒドロキシ基を、次式の化合物

10

【化 1 3】



[式中、Y、X 及び p は、上記の通りである]

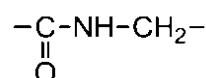
と反応させる。エステル化の前に、式 IX - A の化合物上のアミノ基を、任意の従来のアミノ保護基を利用して保護することもできる。

20

【0055】

式中の B が

【化 1 4】



である式 X の化合物の誘導体は、本明細書中で上述したカルボキシレート活性化の任意の従来の方法を使用して式 IX - C の化合物上のカルボキシル基を最初に活性化した後に、式 IX - B の化合物上のカルボキシル基を、次式のアミノ化合物：

30



[式中、X、Y 及び p は、上記の通りである]

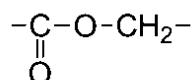
と反応させることによって生成される。この反応の前に、式 XI - C の化合物上の反応基を、本明細書中で上記したように従来の保護基で保護することもできる。これらの保護基は、本明細書中で前記したような従来の方法によってこのアミド化の後に除去することができる。アミノ基を保護するあらゆる方法を、式 X の化合物について使用することができる。このアミノ保護基は、従来の方法によって除去することができる。

40

【0056】

式中の B が

【化 1 5】



である式 X の化合物の誘導体は、本明細書中で上述したカルボキシレート活性化の任意の従来の方法を使用して式 IX - B の化合物上のカルボキシル基を最初に活性化した後に、

50

式 I X - B の化合物上のカルボキシル基を、次式のヒドロキシ化合物：



[ 式中、 X 、 Y 及び p は、上記の通りである ]

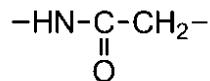
と反応させることによって生成される。この反応の前に、式 X I - D の化合物上の反応基を、本明細書中で上記したように従来の保護基で保護することもできる。これらの保護基は、本明細書中で前記したような従来の方法によってこのエステル化の後に除去することができる。アミノ基を保護するあらゆる方法を、式 X の化合物について使用することができる。このアミノ保護基は、従来の方法によって除去することができる。

【 0 0 5 7 】

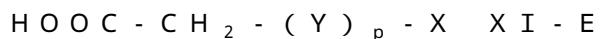
式中の B が

【 化 1 6 】

10



である式 X の化合物の誘導体は、式 I X - C の化合物上のアミン基を、カルボキシレートを含む次式の化合物：



20

[ 式中、 X 、 Y 及び p は、上記の通りである ]

と反応させることによって生成される。

【 0 0 5 8 】

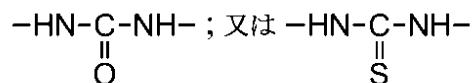
式 I X - C の化合物上のオルト位のアミンは、反応の前に従来の保護基で本明細書中で上記したように選択的に保護されなければならない。このアミド化反応は、本明細書中で上述したカルボキシレート活性化の任意の従来の方法を使用した式 X I - E のカルボキシレートの活性化の後に行われる。この反応の前に、式 X I - E の化合物上の反応基を、本明細書中で上記したように従来の保護基で保護することもできる。これらの保護基は、本明細書中で前記したような従来の方法によってこのアミド化の後に除去することができる。

30

【 0 0 5 9 】

式中の B が

【 化 1 7 】



である式 X の化合物の誘導体は、式 I X - C の化合物上のアミン基を、イソシアネート ( isocyanate ) 又はイソチオシアネート ( isothiocyanate ) を含む次式の化合物：

【 化 1 8 】

40



[ 式中、 X 、 Y 及び p は、上記の通りであり、 R <sub>4</sub> は、 O 又は S である ]

50

と反応させることによって生成される。

【0060】

式IX-Cの化合物上のオルト位のアミンは、反応の前に従来の保護基で本明細書上で上記したように選択的に保護されなければならない。この縮合反応は、式XI-Fを化合物IX-Cの緩衝溶液に添加した後に行われる。この反応の前に、式XI-Fの化合物上の反応基を、本明細書上で上記したように従来の保護基で保護することもできる。これらの保護基は、本明細書上で前記したような従来の方法によってこの濃縮の後に除去することができる。

【0061】

式Xの化合物は、式IXの化合物からパリペリドンを合成する方法のうちの任意のものをを利用して式IIIの化合物に変換することができる。この方法において、式Xの化合物中の官能基Xは、好適な保護基によって保護され、式IIIの化合物の形成の後に、この保護基を従来の方法によって除去することができる。

10

【0062】

抗体

本発明は、上述の免疫原を利用することによって產生される、リスペリドン及びパリペリドンに対するモノクローナル抗体を含む新規な抗体にも関する。本発明によれば、本発明に従って作製されたこれらの抗体は、リスペリドン及びパリペリドンと選択的に反応することが見出されている。選択的に反応性であることとは、その抗体が、リスペリドン及びパリペリドンと反応し、薬理学的に不活性なリスペリドン及びパリペリドンの代謝産物である7-ヒドロキシリスペリドンとの実質的な反応性をほとんど有しておらず、その反応性は、リスペリドン及びパリペリドンの双方との反応性に基づき、40%未満、好ましくは25%未満であり、その抗体が、薬理学的に不活性なリスペリドン及びパリペリドンの他の代謝産物、特に、N-デアルキルリスペリドンと実質的に交差反応せず、他の代謝産物に対するその実質的な非交差反応性は、リスペリドン及びパリペリドンの双方との反応性に基づき5%未満であることを意味する。患者の体液試料中のリスペリドン及びパリペリドンの存在の検出及び/又は量の定量を正確に行うためのイムノアッセイを行うための抗体が得られるのは、これらの選択的な反応特性による。

20

【0063】

本発明は、リスペリドン及びパリペリドンに対する新規抗体及びモノクローナル抗体に関する。本発明の抗血清は、本発明の免疫原で宿主動物を免疫化することによって都合よく作製することができる。好適な宿主動物としては、例えば、マウス、ラット、ウサギ、モルモット等のげっ歯動物、又はヤギ、ヒツジ、ウマ等の高等哺乳動物等が挙げられる。初回投与、採血及び追加抗原注射は、動物において免疫応答を誘発するための受け入れられているプロトコルに従って行うことができ、例えば、好ましい一実施形態において、マウスに100μg免疫原/マウス、腹腔内の初回投与及び6ヶ月間にわたり2回以上の50~100μg免疫原/マウスの間のその後の追加抗原注射を行った。定期的な採血を通して、免疫化したマウスの血液試料で、従来のイムノアッセイを利用してリスペリドン及びパリペリドン結合に対する免疫応答の獲得が認められた。これらの方法により、所望の活性を有する抗血清を產生する宿主動物をスクリーニングする便利な方法が可能となる。該抗体は、リスペリドンの主な代謝産物であるパリペリドンに対してもスクリーニングされ、この化合物に対して実質的に結合することが示された。

30

【0064】

リスペリドン及びパリペリドンと選択的に反応し、薬理学的に不活性なリスペリドン及びパリペリドンの代謝産物である7-ヒドロキシリスペリドンとの実質的な反応性をほとんど有しておらず、リスペリドン及びパリペリドンの双方との反応性に基づき、40%未満、好ましくは25%未満の反応性を有し、薬理学的に不活性なリスペリドン及びパリペリドンの他の代謝産物、特に、N-デアルキルリスペリドンと実質的に交差反応せず、他の代謝産物に対する実質的な非交差反応性は、リスペリドン及びパリペリドンの双方との反応性に基づき、5%未満である、該抗体は、式IIIの免疫原を利用して、以下に開示

40

50

しているスクリーニング法によって作製することができる。このスクリーニング法を使用して、リスペリドン及びパリペリドンの化学療法剤の双方と反応性がある抗体を得ることができ、これは、これらの化学療法剤について任意の望ましい相対反応性を有するこれらの化学療法剤に対して特異的且つ選択的である。

【0065】

これらの抗体の調製において、免疫原性担体を、式I I Iの免疫原とコンジュゲートさせることができ、例えば、マウス、ラット、ウサギ、モルモット等のげっ歯動物、又はヤギ、ヒツジ、ウマ等の高等哺乳動物等宿主動物の免疫化に使用することができる。式I I Iの化合物に対する免疫応答の獲得は、B S Aと式I I Iの化合物とのコンジュゲートをコーティングしたマイクロタイタープレートを利用してE L I S Aによってモニタリングすることができる。一度免疫応答が十分に獲得されれば、宿主動物の脾細胞を単離して、不死化された細胞系と融合させることができる。モノクローナル抗体の作製に関して、この融合細胞を、96ウェルプレート上に播種して、ハイブリドーマ細胞を選択するための選択培地の存在下で培養することができる。ハイブリドーマ上清及び抗血清を、E L I S Aによって抗リスペリドン抗体の存在について試験することができる。陽性のE L I S A結果が得られたウェルからの抗体を、間接的競合マイクロタイタープレートアッセイによってリスペリドン及びパリペリドンの結合について試験することができる。リスペリドン、パリペリドン及びこれらの代謝産物等の検体のI C<sub>50</sub>値を、このアッセイから算出することができる。アッセイにおける検体のI C<sub>50</sub>(50%での阻害濃度)は、阻害アッセイにおいてアッセイでのシグナルが検体の存在しないアッセイでの総シグナルの50%であるときの試料中のその検体の濃度である。検体の選択的反応性は、%としてI C<sub>50</sub>の表される以下の比率から算出される: 100% - ([I C<sub>50</sub> - 検体] / (I C<sub>50</sub> - リスペリドン + I C<sub>50</sub> - パリペリドン)] × 100)。I C<sub>50</sub>の計算は、D. Wildによって編集され、Elsevier, Amsterdamによって2005に出版された、The Immunoassay Handbook, pp 108 - 110, 3rd edition中で見出される方法に従って行われる。該式からわかるように、検体のI C<sub>50</sub>は、検体の反応性に反比例する。100%又は100%付近を示したウェルからの細胞を限界希釈によってサブクローニングして、モノクローナル抗リスペリドン抗体を產生している個々のクローンを単離することができる。リスペリドン及びパリペリドンについて望ましい相対反応性を有するウェルからの細胞を限界希釈によってサブクローニングして、パリペリドンと十分に交差反応性であってこの薬剤にも選択的となるモノクローナル抗リスペリドン抗体を產生している個々のクローンを単離することもできる。

【0066】

モノクローナル抗体は、上記のスケジュールに従ってB a 1 b / cマウスを免疫化し、その後、このマウスに100μgの免疫原を、細胞融合の3日前又は4日前から始めて連続して3日間、腹腔内又は静脈内に注射することによって作製するのが好都合である。抗体の技術分野においてよく知られている他のプロトコルも、当然同様に利用することができる。本明細書中で詳述している完全な免疫化プロトコルは、リスペリドン又は薬理学的に活性なその代謝産物であるパリペリドンに対する抗体の血清抗体応答に最適なプロトコルを実現した。

【0067】

宿主の脾臓、末梢血、リンパ節又は他の組織から得られるBリンパ球を、モノクローナル抗体産生細胞として使用することもできる。最も好ましいのは、脾臓から得られるBリンパ球である。本発明の所望のモノクローナル抗体を產生することができるハイブリドーマは、こうしたBリンパ球を、ハイブリッド細胞に長期間の組織培養安定性を付与する細胞系である不死細胞系と融合することによって得られる。本発明の好ましい実施形態において、不死細胞は、それ自体抗体産生細胞であるが悪性でもある、リンパ芽球腫細胞又は形質細胞腫細胞、例えば、骨髄腫細胞等であってもよい。リスペリドン又は薬理学的に活性なその代謝産物であるパリペリドンに対するモノクローナル抗体を產生する、ネズミ科動物のハイブリドーマは、マウスの骨髄腫細胞と、リスペリドン - タンパク質コンジュゲ

10

20

30

40

50

ートに対して免疫化されたマウスからの脾細胞との融合によって形成される。キメラなヒト化モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞からの遺伝子を発現する抗体をクローン化し、当技術分野で現在よく知られている組換えDNA法を用いて、マウスの可変領域の部分配列をヒトの定常領域に結合するか、又はヒトのフレームワーク領域をドナーのマウス又はラットの免疫グロブリンからの相補性決定領域(CDR)と結合するかのいずれかによって作製することができる。親和性が高められた抗体を提供する、ネズミ科動物のモノクローナル抗体をヒト化するための改良された方法は、国際特許出願WO92/11018に記載されている。

【0068】

一次抗体構造の一部のみを含むポリペプチド断片を作製することもでき、この断片は1種又は複数の免疫グロブリン活性を有する。これらのポリペプチド断片は、当技術分野においてよく知られている方法により、完全な抗体をタンパク分解で切断することによって、又はFabフラグメント又は(Fab')<sub>2</sub>フラグメントを作製するための部位特異的変異生成を使用して、抗体遺伝子を含む発現ベクター内の所望の位置に終止コドンを挿入することによって作製することができる。単鎖抗体は、VL領域及びVH領域をDNAリンクマーと結合することによって作製することができる(Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 85: 5879-5883及びBird et al., 1988, Science, 242: 423-426を参照されたい)。

【0069】

本発明の抗体は、リスペリドン及びパリペリドンに対して実質的に選択的に反応性であり、薬理学的又は薬学的に不活性なこれらの代謝産物である7-ヒドロキシリスペリドンとの実質的な反応性をほとんど有しておらず、N-デアルキルリスペリドン等の薬理学的又は薬学的に不活性なこれらの他の代謝産物に対してはいかなる実質的な交差反応性もない。薬理学的又は薬学的に不活性なこれらの代謝産物である7-ヒドロキシリスペリドンとの実質的な反応性をほとんど有していないこととは、本発明の抗体が、リスペリドン及びパリペリドンの双方に対するその合計の反応性に相対して、40%未満、好ましくは25%未満の、7-ヒドロキシリスペリドンに対する反応性を有することを意味する。7-ヒドロキシリスペリドン以外の薬理学的又は薬学的に不活性な代謝産物に対して実質的な交差反応性を全く有さないこと又はいかなる実質的な交差反応性もないこととは、本発明の抗体が、リスペリドン及びパリペリドンの双方に対するその合計の反応性に相対して、5%未満、好ましくは2%未満の、N-デアルキルリスペリドン等の薬理学的又は薬学的に不活性なこれらの他の代謝産物に対する交差反応性を有することを意味する。

【0070】

イムノアッセイ

本発明によれば、該コンジュゲート及び式IIIの化合物の免疫原から產生される該抗体は、患者の試料中のリスペリドン及びパリペリドンの決定のための試薬として利用することができる。この決定は、イムノアッセイによって行われる。患者の試料中のリスペリドン及びパリペリドンの存在を決定するために、式IIIの化合物から形成される試薬コンジュゲートが、本発明に従って作製された抗体上の結合部位について、試料中のリスペリドン及びパリペリドンと競合するあらゆるイムノアッセイを利用することができる。リスペリドン及びパリペリドンを含有すると考えられる試料においてリスペリドン及びパリペリドンについてのこうしたアッセイを行う方法には、(a)水性媒体試料、(b)本発明に従って作製された、リスペリドン及びパリペリドンに対する抗体、(c)式IIIの化合物から形成される該コンジュゲート、又はこれらの混合物を組み合わせることが含まれる。試料中のリスペリドン及びパリペリドンの量は、該試料と抗体との混合物に添加された既知量のコンジュゲートの特異的抗体に対する結合の阻害を測定することによって決定することができる。既知量のコンジュゲートのこうした結合の、未知の試料による阻害の結果を、同様のアッセイにおいてリスペリドンの既知の標準溶液を利用することによって得られる結果と比較する。未知の試料中のリスペリドン及びパリペリドンの量を決定す

10

20

30

40

50

る際には、該試料、式ⅠⅠⅠの化合物から形成される該コンジュゲート、及び該抗体を、任意の順序で添加することができる。

【0071】

抗体に結合した、式ⅠⅠⅠの化合物から形成されたコンジュゲートの量を測定するためには、多様な方法を利用することができる。1つの方法は、コンジュゲートが抗体に結合することにより、フルオロフォアコンジュゲートの回転速度の低下が引き起こされるものである。液体混合物中のフルオロフォアコンジュゲートの回転速度の低下量は、米国特許4,269,511及び米国特許4,420,568に開示されているような蛍光偏光技術によって検出することができる。

【0072】

一方、該抗体は、ナノ粒子上にコーティング又は吸収されていてもよく、その結果、これらの粒子が式Vの化合物から形成されるリスペリドンコンジュゲートと反応するときにこれらのナノ粒子が集合体を形成するようになる。しかし、抗体をコーティング又は吸収したナノ粒子が試料中のリスペリドン及びパリペリドンと反応するときには、これらのナノ粒子に結合した試料からのリスペリドン及びパリペリドンは抗体ナノ粒子の集合を引き起こさない。この集合または凝集の量は、アッセイ混合物において吸光度によって測定することができる。

【0073】

一方、これらのアッセイは、抗体又はリスペリドンコンジュゲートのいずれかを、固体支持体、例えばマイクロタイタープレート、又は固体粒子等の他の従来の固体支持体に結合させることによって行うことができる。抗体及びタンパク質をこうした固体粒子に結合させることは、当技術分野においてよく知られている。こうした結合の実施には、任意の従来の方法を使用することができる。多くの場合、測定を補助するために、該抗体と結合している又は結合していない、式ⅠⅠⅠの化合物から形成されるコンジュゲートの量を検出する際の補助として、抗体、コンジュゲート又は固体粒子上に、放射性標識又は酵素標識のような標識をつけることもできる。他の好適な標識としては、発色団、フルオロフォア等が挙げられる。

【0074】

便宜上、本発明のアッセイ構成材料は、リスペリドン及びパリペリドンについてのアッセイに使用される所定量の新規試薬を含むパッケージングされた組合せである、キットで提供される。これらの試薬には、本発明の抗体、並びに、式Vの化合物から形成されたコンジュゲートが含まれる。

【0075】

これらの必要な試薬に加えて、補助的な試薬のような添加物、例えば、安定剤、緩衝液等が含まれていてもよい。種々の試薬の相対量は、アッセイの感度を実質的に最適にする試薬の溶液中濃度を得るために幅広く変えることもできる。試薬は、溶液で又は、溶解時に、アッセイを行うのに適切な濃度を有する試薬溶液を提供することになる添加剤を含む、通常は凍結乾燥した、乾燥粉末として提供され得る。

【実施例】

【0076】

実施例において、以下のものを指すのに以下の略語を使用する：

MSC1 メタンスルホニルクロリド

DIPSEA N-N' - ジイソプロピルエチルアミン

THF テトラヒドロフラン

TFA トリフルオロ酢酸

pTSA p - トルエンスルホン酸

HATU O - (7 - アザベンゾトリアゾル - 1 - イル) - N, N, N', N' - テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート

DMF ジメチルホルムアミド

DMSO ジメチルスルホキシド

10

20

30

40

50

s - N H S スルホ - N - ヒドロキシスクシンイミド  
 E D C 1 - ( 3 - ジメチルアミノプロピル ) - 3 - エチルカルボジイミドヒドロクロ  
 リド

K L H キーホールリンペットヘモシアニン

B S A ウシ血清アルブミン

P B S リン酸緩衝生理食塩水

N a C l 塩化ナトリウム

H R P ホースラディッシュペルオキシダーゼ

A N S 8 - アニリノ - 1 - ナフタレンスルホン酸

T M B 3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジン

T R I S トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンヒドロクロリド

d i H <sub>2</sub> O 脱イオン水

リン酸緩衝液の組成には、

15.4 mM 二塩基性リン酸ナトリウム ( N a <sub>2</sub> H P O <sub>4</sub> )

4.6 mM 一塩基性リン酸ナトリウム ( N a H <sub>2</sub> P O <sub>4</sub> )

p H = 7.2 ± 0.10

を含有する水溶液がある。

【 0 0 7 7 】

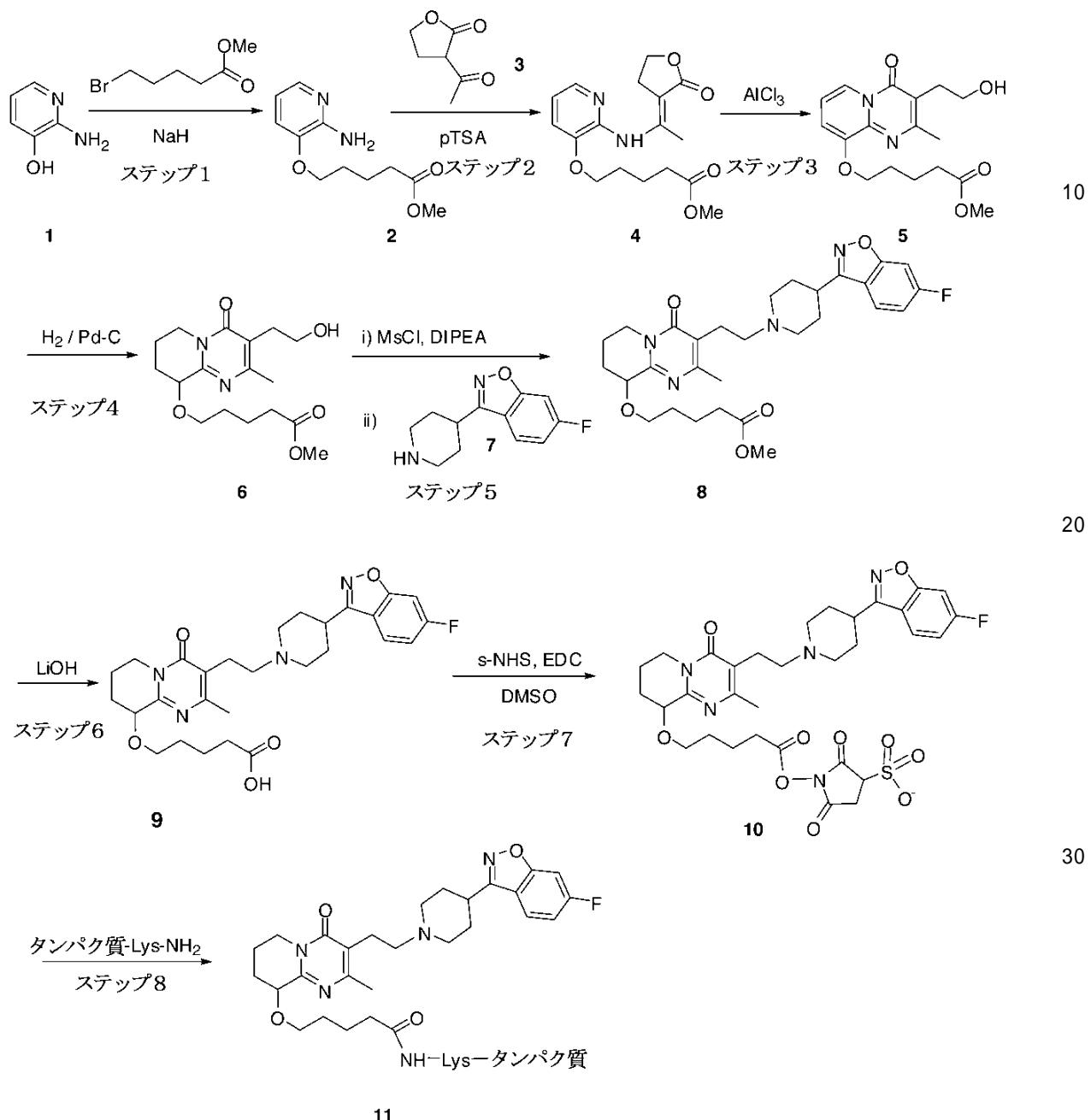
実施例において、以下のスキーム 1 ~ 2 は、実施例における番号によって参照される、  
 調製した特定の化合物を示している。これらのスキームは、以下の通りである：

10

20

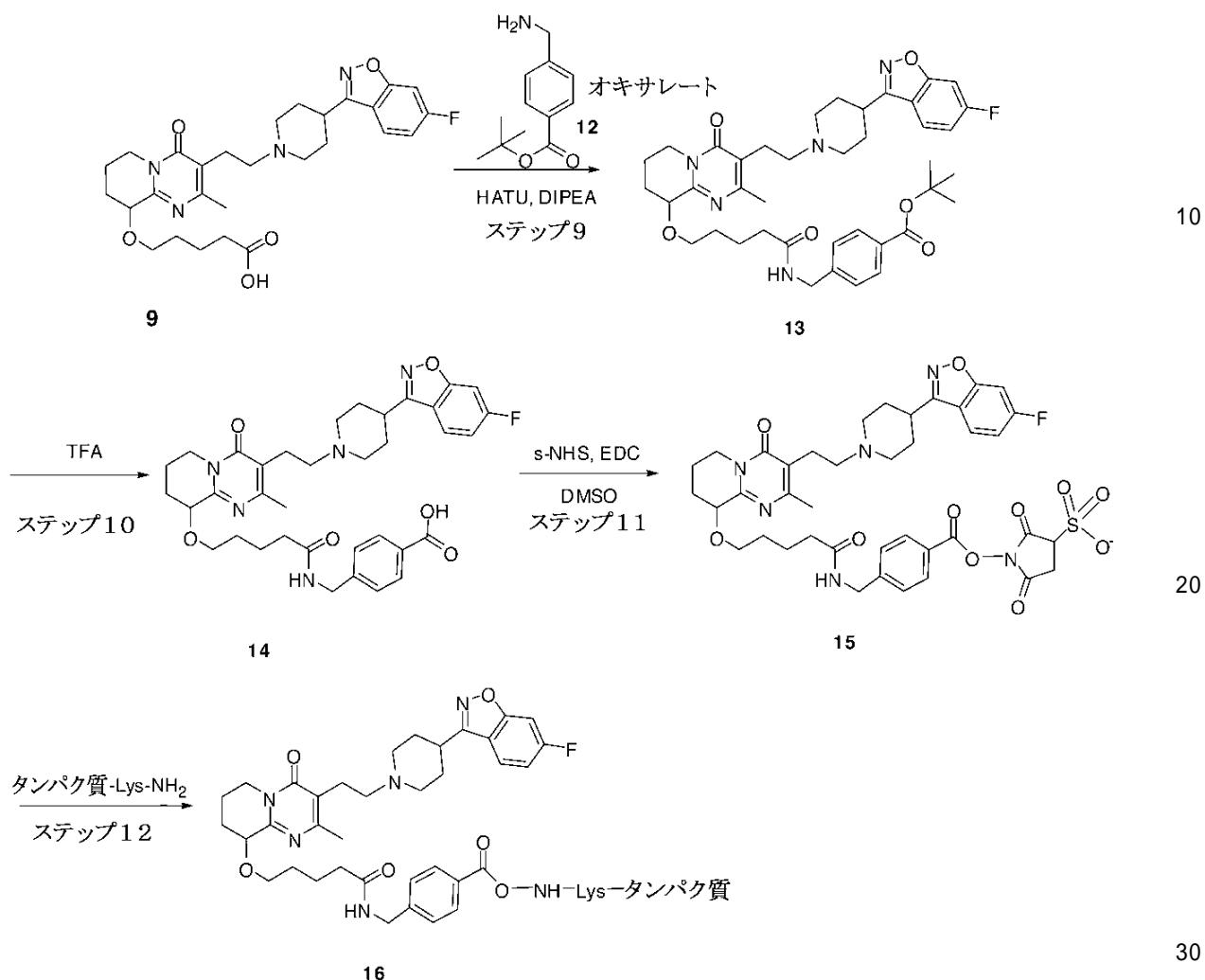
【化19】

スキーム1



## 【化20】

## スキーム2



## 【0078】

## (例1)

リスペリドン(9-イルオキシ)ペンタン酸誘導体[9]の調製(スキーム1)

化合物[1](10.0g、90.8mmol)を、N<sub>2</sub>雰囲気下0で無水DME(200mL)中に溶解した。攪拌しながら、NaH(60%、3.62g、90.8mmol)を添加して、この混合物を1時間で周囲温度まで温度上昇させた。次いで、この反応混合物にメチル5-プロモペンタノエート(17.72g、90.80mmol)を添加して、攪拌を一晩継続した。この反応混合物を水で希釈して、EtOAcで抽出した。この抽出物を、水、次いで、ブラインで洗浄し、乾燥させ(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、溶媒を蒸発させて粗生成物[2]を単離した。20~90%のEtOAc/ヘキサンを使用してフラッシュクロマトグラフィーによって不純物を除去して、純化合物[2](12.80g、63%)を単離した。

## 【0079】

化合物[2](12.80g、57.14mmol)、化合物[3](8.80g、68.57mmol)、及びpTSA·H<sub>2</sub>O(2.0g、10.5mmol)をキシレン(300mL)中に溶解して、得られた混合物をディーン-スターク条件下で12時間加熱還流した。12時間後、キシレンを減圧下で除去し、残留物に飽和NaHCO<sub>3</sub>を添加して、スラリーをEtOAcで抽出した。この有機相を、ブラインで洗浄し、乾燥させ(

$\text{Na}_2\text{SO}_4$  )、蒸発させて粗生成物 [ 4 ] を単離した。この物質を、エーテル / ヘキサンの 1 : 1 混合物で粉末にして純化合物 [ 4 ] ( 10.40 g、55% ) を単離した。

【 0 0 8 0 】

化合物 [ 4 ] ( 9.90 g、29.64 mmol ) 及び  $\text{AlCl}_3$  ( 1.98 g、14.85 mmol ) の無水ジクロロエタン中の混合物を  $\text{N}_2$  下 95 度で 6 時間加熱し、その後、この混合物に別の  $\text{AlCl}_3$  ( 1.0 g、7.40 mmol ) を添加して、攪拌をさらに 5 時間継続した。フラスコの内容物を周囲温度まで冷却して、氷冷した水で注意深くクエンチした。飽和  $\text{NaHCO}_3$  を添加して、その水相を 5% の  $\text{MeOH}$  / クロロホルムで抽出した。得られた有機相を、ブラインで洗浄し、乾燥させ ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )、蒸発させて粗生成物 [ 5 ] を単離した。この粗物質を、エーテル / ヘキサンの 1 : 1 混合物で粉末にして純化合物 [ 5 ] ( 5.80 g、58% ) を単離した。

【 0 0 8 1 】

化合物 [ 5 ] ( 2.0 g、6.0 mmol ) を  $\text{MeOH}$  ( 70 mL ) 及び 6N の  $\text{HCl}$  ( 10 mL ) の混合物中に溶解して、 $\text{Pd-C}$  ( 10 重量%、0.57 g ) を添加した。 $(\text{MS}$  によってモニタリングされるように) この反応が完了するまで、攪拌している混合物を通して水素ガスを吹き出させた。次いで、この反応混合物を、セライトのパッドに通して濾過して、パラジウム触媒を除去した。この濾液を蒸発させてメタノールを除去して、この酸性水性混合物を飽和  $\text{NaHCO}_3$  に添加してクエンチし、次いで、10% の  $\text{MeOH}$  / クロロホルムで抽出した。この有機相を、ブラインで洗浄し、乾燥させ ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )、蒸発させて所望の生成物 [ 6 ] ( 1.80 g、89% ) を単離した。

【 0 0 8 2 】

化合物 [ 6 ] ( 1.80 g、5.32 mmol ) を、 $\text{N}_2$  下 0 度で無水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( 30 mL ) 中に溶解した。この攪拌中の溶液に  $\text{DIP EA}$  ( 1.38 g、10.64 mmol ) を添加し、その後、メタンスルホニルクロリド ( 0.67 g、5.85 mmol ) を滴下して添加した。この反応混合物を、0 度で 40 分間攪拌し、その後、溶媒を除去して粗メシレート中間体を得た。このメシレート中間体を無水  $\text{MeOH}$  ( 50 mL ) 中に溶解し、この溶液に化合物 [ 7 ] ( 1.76 g、7.95 mmol ) を、その後、 $\text{DIP EA}$  ( 1.80 g、5.32 mmol ) を添加した。この混合物を 1.5 時間加熱還流し、次いで、メタノール溶媒を減圧下で除去し、その残留物をクロロホルム中に溶解した。このクロロホルム有機相を、水、ブラインで洗浄し、乾燥させ ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )、蒸発させて粗生成物 [ 8 ] を単離し、これを、2~5% の  $\text{MeOH}$  /  $\text{CHCl}_3$  を溶離液として使用してフラッシュクロマトグラフィーによって精製して純生成物 [ 8 ] ( 2.02 g、70% ) を単離した。

【 0 0 8 3 】

エステル [ 8 ] ( 2.0 g、3.70 mmol ) を、 $\text{MeOH}$  /  $\text{THF}$  の混合物 ( 1 : 3、24 mL ) 中に 0 度で溶解して、 $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$  ( 0.46 g、11.10 mmol ) の水 ( 6 mL ) 中の溶液を添加した。この混合物を、周囲温度まで温度上昇させて 2 時間攪拌した。この反応溶液を、 $\text{EtOAc}$  で希釈し、0.1N の  $\text{HCl}$  で洗浄した。この有機相を除去して置いておき、残りの水相を 10% の  $\text{MeOH}$  /  $\text{CHCl}_3$  で抽出した。この抽出物を、置いておいた有機相と合わせて、合わせた有機相を、ブラインで洗浄し、乾燥させ ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )、蒸発させて化合物 [ 9 ] ( 1.91 g、99% ) を白色泡沫として得た。

【 0 0 8 4 】

( 例 2 )

リスペリドン ( 9 - イルオキシペタンカルバモイル ) - メチル - 安息香酸誘導体 [ 14 ] の調製 ( スキーム 2 )

化合物 [ 9 ] ( 700 mg、1.33 mmol )、化合物 [ 12 ] ( 440 mg、1.46 mmol )、及び  $\text{DIP EA}$  ( 0.86 g、1.2 mL、6.65 mmol ) を、0 度  $\text{DMF}$  ( 10 mL ) 中に溶解した。 $\text{HATU}$  ( 1.21 g、3.19 mmol ) を添加し、その後、この反応混合物を、周囲温度まで温度上昇させ、一晩攪拌した。その翌日

10

20

30

40

50

、この反応混合物を E t O A c で希釈して、得られた有機相を、1 M の H C l 、飽和 N a H C O<sub>3</sub> 、水で洗浄し、乾燥させた ( N a<sub>2</sub> S O<sub>4</sub> )。溶媒の除去によって粗生成物 [ 1 3 ] が得られ、これを 2 ~ 8 % の M e O H / C H C l<sub>3</sub> を用いたフラッシュクロマトグラフィーによって精製して、純生成物 [ 1 3 ] ( 0 . 5 2 g 、 5 5 % ) を白色固体として得た。

【 0 0 8 5 】

化合物 [ 1 3 ] ( 0 . 5 0 g 、 0 . 7 m m o l ) を、 N<sub>2</sub> 下 0 で無水 C H<sub>2</sub> C l<sub>2</sub> ( 1 0 m L ) 中に溶解し、その攪拌中の溶液に T F A ( 1 0 m L ) を添加した。攪拌を、 0 で 3 時間、次いで、周囲温度でさらに 2 0 時間継続した。この時間の後に、溶媒を減圧下で除去して、得られた残留物を水中に懸濁し、乾燥状態まで凍結乾燥させて粗酸 [ 1 4 ] を得た。この乾燥物質を、 2 % の M e O H / C H C l<sub>3</sub> ( 5 m L ) で溶解し、 2 0 0 m L のエーテルに添加して、酸 [ 1 4 ] を溶液から沈澱させた。沈澱した固体を、濾過して、エーテルで洗浄し、 4 0 で乾燥させて所望の化合物 [ 1 4 ] ( 0 . 3 8 g 、 7 2 % ) をオフホワイトの粉末として得た。

【 0 0 8 6 】

( 例 3 )

s - N H S で活性化された薬剤誘導体を、対応する酸 [ 9 ] 及び [ 1 4 ] から調製する一般的な方法

リスペリドン酸誘導体 [ 9 ] 及び [ 1 4 ] を E D C 及び s - N H S で活性化して、タンパク質に対する最終的な結合 ( 例 4 及び 5 ) のための、 s - N H S で活性化されたリスペリドンのエステル [ 1 0 ] 及び [ 1 5 ] を作製した。

【 0 0 8 7 】

( 例 3 a )

s - N H S で活性化されたエステルリスペリドン ( 9 - イルオキシ ) ペンタン酸誘導体 [ 1 0 ] の調製

リスペリドン誘導体 [ 9 ] 、例 1 、スキーム 1 、 ( 5 6 . 8 m g ) を、 5 . 6 8 m L の D M S O 中に溶解し、これに、 s - N H S ( 6 6 . 5 6 m g ) 及び E D C ( 5 8 . 5 8 m g ) を添加した。この反応混合物を、窒素雰囲気下、周囲温度で 2 0 時間攪拌して、 s - N H S で活性化されたリスペリドンのエステル [ 1 0 ] を作製した。この反応混合物を、例 4 及び 5 a において直接使用した。

【 0 0 8 8 】

( 例 3 b )

s - N H S で活性化されたエステルリスペリドン ( 9 - イルオキシペタンカルバモイル ) - メチル - 安息香酸誘導体 [ 1 5 ] の調製

リスペリドン誘導体 [ 1 4 ] 、例 2 、スキーム 2 ( 2 5 . 0 m g ) を、 2 . 5 m L の D M S O 中に溶解し、これに、 s - N H S ( 1 9 . 9 m g ) 及び E D C ( 1 7 . 6 m g ) を添加した。この反応混合物を、窒素雰囲気下、周囲温度で 2 0 時間攪拌して、 s - N H S で活性化されたリスペリドンのエステル [ 1 5 ] を作製した。この反応混合物を、例 5 b において直接使用した。

【 0 0 8 9 】

( 例 4 )

活性化ハプテン [ 1 0 ] を有する K L H 免疫原の調製

3 0 0 m g の K L H を 2 0 m L のリン酸緩衝液 ( 5 0 m M 、 p H 7 . 5 ) 中に溶解することによって K L H のタンパク質溶液を調製し、その後、例 3 a において調製した、 s - N H S で活性化されたリスペリドン誘導体 [ 1 0 ] を 4 . 8 5 m L 添加した。 K L H と、活性化されたリスペリドン誘導体 [ 1 0 ] とのこの反応混合物を、室温で 2 0 時間攪拌させてリスペリドン [ 9 ] - K L H コンジュゲートを作製した。次いで、このリスペリドン [ 9 ] - K L H コンジュゲートを、リン酸緩衝液 ( 5 0 m M 、 p H 7 . 5 ) 中の 3 0 % D M S O に対する透析によって室温で精製した。その後、 D M S O の割合を、 2 0 % 、 1 0 % 及び 0 % と段階的に低下させた。最後の透析は、 4 でリン酸緩衝液に対して行った。

10

20

30

40

50

このリスペリドン [ 9 ] - K L H コンジュゲートを、紫外 - 可視分光法によって特徴付けした。このコンジュゲートを希釈して、リン酸緩衝液 ( 5 0 m M 、 p H 7 . 5 ) 中 2 m g / m L の最終濃度にした。

【 0 0 9 0 】

( 例 5 a )

活性化ハプテン [ 1 0 ] を有する B S A コンジュゲートの調製

1 g の B S A をリン酸緩衝液 ( 5 0 m M 、 p H 7 . 5 ) 中に溶解して 5 0 m g / m L の最終濃度にすることによって B S A のタンパク質溶液を調製した。このタンパク質溶液に、例 3 a において調製した、 s - N H S で活性化されたリスペリドン誘導体 [ 1 0 ] を 0 . 8 3 m L 添加した。 B S A のタンパク質溶液に添加する、 s - N H S で活性化されたりスペリドン誘導体 [ 1 0 ] の量は、リスペリドン [ 1 0 ] の誘導体と B S A との間で 1 : 1 のモル比で算出した。 B S A と、活性化されたリスペリドン誘導体 [ 1 0 ] とのこの混合物を、室温で 1 8 時間攪拌させて、活性化されたリスペリドンエステル [ 1 0 ] と B S A とのコンジュゲートを作製した。次いで、このコンジュゲートを、リン酸緩衝液 ( 5 0 m M 、 p H 7 . 5 ) 中の 2 0 % D M S O に対する透析によって室温で精製した。その後、 D M S O の割合を、 1 0 % 及び 0 % と段階的に低下させた。最後の透析は、 4 でリン酸緩衝液に対して行った。精製したリスペリドン [ 9 ] - B S A コンジュゲートを、 U V / V I S 分光法によって特徴付けした。

【 0 0 9 1 】

( 例 5 b )

活性化されたハプテン [ 1 5 ] を有する B S A コンジュゲートの調製

1 g の B S A をリン酸緩衝液 ( 5 0 m M 、 p H 7 . 5 ) 中に溶解して 5 0 m g / m L の最終濃度にすることによって B S A のタンパク質溶液を調製した。この B S A のタンパク質溶液 1 0 . 0 m L に、氷上で攪拌しながら、例 3 b において調製した、 s - N H S で活性化されたリスペリドン誘導体 [ 1 5 ] を 0 . 6 2 0 m L 添加した。 B S A のタンパク質溶液に添加する、 s - N H S で活性化されたリスペリドン誘導体 [ 1 5 ] の量は、リスペリドン [ 1 5 ] の誘導体と B S A との間で 1 : 1 のモル比で算出した。 B S A と、活性化されたリスペリドン誘導体 [ 1 5 ] とのこの混合物を、室温で 1 8 時間攪拌させて、活性化されたリスペリドンエステル [ 1 5 ] と B S A とのコンジュゲートを作製した。次いで、このコンジュゲートを、リン酸緩衝液 ( 5 0 m M 、 p H 7 . 5 ) 中の 1 5 % D M S O に対する透析によって室温で精製した。その後、 D M S O の割合を、 1 0 % 、 5 % 、及び 0 % と段階的に低下させた。最後の透析は、 4 でリン酸緩衝液に対して行った。精製したリスペリドン [ 1 4 ] - B S A コンジュゲートを、 U V / V I S 分光法によって特徴付けした。

【 0 0 9 2 】

( 例 6 a )

リスペリドン [ 9 ] に対するポリクローナル抗体の調製

1 0 匹の雌の B A L B / c マウスを、完全フロイントアジュバント中に乳化させた、例 4 において調製したような、 1 0 0  $\mu$  g / マウスのリスペリドン [ 9 ] - K L H 免疫原で腹腔内に免疫化した。これらのマウスに、初回注射の 4 週間後に、不完全フロイントアジュバント中に乳化させた 1 0 0  $\mu$  g / マウスの同一の免疫原で追加免疫を 1 回行った。追加免疫の 2 0 日後に、ポリクローナル抗体を含有する、各マウスからの試験採血を眼窩出血によって得た。この試験採血を、遠心分離によって分画して抗血清を得た。リスペリドン [ 9 ] - K L H 免疫原に対するポリクローナル抗体を含有する、これらの試験採血からの抗血清を、例 8 a 及び 9 において評価した。

【 0 0 9 3 】

( 例 6 b )

リスペリドン [ 9 ] に対するモノクローナル抗体の調製

4 において調製したリスペリドン [ 9 ] - K L H で免疫化した例 6 a からのマウスを、モノクローナル抗体の產生に使用した。モノクローナル抗体の場合は、融合の 3 日前から

10

20

30

40

50

始めて、例 4において調製した、P B S / D M S O中の4 0 0  $\mu$  g (融合の3日前)、2 0 0  $\mu$  g (融合の2日前)、及び2 0 0  $\mu$  g (融合の1日前)のリスペリドン[9] - K L Hを該マウスに腹腔内注射した。脾細胞を、選択したマウスから単離して、*Coligan, J. E. et al., eds., Current Protocols in Immunology, 2.5.1 - 2.5.8, (1992), Wiley & Sons, NY*の方法に従って、50%のポリエチレングリコール1 5 0 0を用いて2  $\times$  1 0 <sup>7</sup>のS P 2 / 0細胞で融合させた。この融合細胞を、1 0枚の9 6 ウエルプレート上の、2 0%のF et a l C l o n e I、2%のL - グルタミン(1 0 0 mM)及び2%の5 0 X H A Tを補ったD M E M / F 1 2中に播種した。2週間から3週間後に、このハイブリドーマ上清を、(例 8 bにおけるような)E L I S Aによって抗リスペリドン抗体の存在について試験した。陽性のE L I S A結果(例 8 b)が得られたウェルからの細胞を、2 4 ウエルプレートに展開した。E L I S Aによって陽性のクローンを、*Coligan, J. E. et al., eds., Current Protocols in Immunology, 2.5.8 - 2.5.17, 1992, Wiley & Sons, NY*中に開示されている方法に従って、限界希釈によって2回サブクローン化した。選択したサブクローンからのモノクローナル抗体を含有するハイブリドーマ培養液上清を、競合E L I S A(例 9)によってリスペリドンの結合について確認した。これらのモノクローナル抗体を、例 9に記載のような間接的競合マイクロタイタープレートアッセイによって、リスペリドン結合及び主なリスペリドン代謝産物である7 - ヒドロキシリスペリドンに対する交差反応性について試験した。

## 【0 0 9 4】

(例 7 a)

## リスペリドン[9] - B S Aコンジュゲートでのマイクロタイタープレート感作方法

リスペリドン濃度を測定するためのE L I S A法を、タンパク質結合用に最適化されており、プレートあたり9 6個のウェルを含む、ポリスチレンマイクロタイタープレート(*Nunc MaxiSorp F 8 Immunomodules*)中で行った。各ウェルを、0. 0 5 Mの炭酸ナトリウム、p H 9. 6中に1 0  $\mu$  g / m Lのリスペリドン[9] - B S Aコンジュゲートを3 0 0  $\mu$  L添加して、室温で3時間インキュベートすることによって、(例 5 aにおけるように調製した)リスペリドン[9] - B S Aコンジュゲートでコーティングした。これらのウェルを0. 0 5 Mの炭酸ナトリウム、p H 9. 6で洗浄し、次いで、3 7 5  $\mu$  Lの5%ショ糖、0. 2%カゼインナトリウム溶液で室温で3 0 分間ブロッキングした。後からコーティングした溶液を除去した後に、このプレートを3 7 で一晩乾燥させた。

## 【0 0 9 5】

(例 7 b)

## リスペリドン[1 4] - B S Aコンジュゲートでのマイクロタイタープレート感作方法

リスペリドン濃度を測定するためのE L I S A法を、タンパク質結合用に最適化されており、プレートあたり9 6個のウェルを含む、ポリスチレンマイクロタイタープレート(*Nunc MaxiSorp F 8 Immunomodules*)中で行った。各ウェルを、0. 0 5 Mの炭酸ナトリウム、p H 9. 6中に1 0  $\mu$  g / m Lのリスペリドン[1 4] - B S Aコンジュゲートを3 0 0  $\mu$  L添加して、室温で3時間インキュベートすることによって、(例 5 bにおけるように調製した)リスペリドン[1 4] - B S Aコンジュゲートでコーティングした。これらのウェルを0. 0 5 Mの炭酸ナトリウム、p H 9. 6で洗浄し、次いで、3 7 5  $\mu$  Lの5%ショ糖、0. 2%カゼインナトリウム溶液で室温で3 0 分間ブロッキングした。後からコーティングした溶液を除去した後に、このプレートを3 7 で一晩乾燥させた。

## 【0 0 9 6】

(例 8 a)

## 抗体スクリーニング法 - 力価(タイター)

この方法は、例 9におけるような置換について試験する抗体又は抗血清の希釈率を見出

10

20

30

40

50

すためのものである。（例6において作製した）リスペリドン抗体をスクリーニングするためのELISA法を、例7a及び7bにおいて調製したリスペリドン-BSAコンジュゲートで感作したマイクロタイタープレートを用いて行った。抗体スクリーニングアッセイは、ポリクローナルリスペリドン抗体を含有する、（例6におけるような）試験採血からのネズミ科動物の血清を、0.1%のBSA及び0.01%のチメロサールを含有するリン酸緩衝生理食塩水中で1:2,000、1:6,000、1:15,000及び1:54,000（容積/容積）に希釈することによって行った。モノクローナル抗体の評価では、例8bの方法によって抗体の存在について陽性であることが見出された、例6bのハイブリドーマ上清を、0.1%のBSA及び0.01%のチメロサールを含有するリン酸緩衝生理食塩水中で1:2、1:4、1:16等（容積/容積）に希釈した。（例7a及び7bにおいて調製した）リスペリドン-BSAで感作したウェルの各ウェルに、0.1%のBSA及び0.01%のチメロサールを含有する50μLのリン酸緩衝生理食塩水及び50μLの希釈した抗体を添加し、振盪しながら室温で10分間インキュベートした。このインキュベート中に、抗体が、ウェル中に受動的に吸収されたリスペリドン-BSAコンジュゲート（例7a及び7b）に結合する。プレートのウェルを、0.02MのTRIS、0.9%のNaCl、0.5%のTween-80及び0.001%のチメロサール、pH7.8で3回洗浄し、結合していない抗体をすべて除去した。ウェル中でリスペリドン-BSAコンジュゲートに結合したリスペリドン抗体の量を検出するために、ネズミ科動物の免疫グロブリンと特異的に結合することができ、基質（本例ではTMB）と共に培養したときに着色生成物を生成することができる、ヤギの抗マウス抗体-HRP酵素コンジュゲート（Jackson Immunoresearch）を、0.1%のBSA、0.05%のANS、0.01%のチメロサールを含むPBS中で特定の活性（約1/3000）まで希釈して、これを各ウェルに100μL添加した。振盪しながら室温で10分間インキュベートし、この間にヤギ抗マウス抗体-HRP酵素コンジュゲートがウェル中でリスペリドン抗体に結合し、その後、これらのプレートを再び3回洗浄して、結合していないヤギ抗マウス抗体-HRP酵素コンジュゲートを除去した。ウェル中で測定可能な発色をさせるために、洗浄後に、HRPの基質であるTMB（TMB Substrate、BioFx）を100μL添加して、振盪しながら室温で10分間インキュベートしている間に発色させた。発色のためのインキュベート後に、50μLの停止液（diH<sub>2</sub>O中1.5%のフッ化ナトリウム）を各ウェルに添加して発色を停止させ、20秒間振盪した後に、650nmにおいて吸光度を決定した（Molecular Devices Plate Reader）。1ウェル中の抗体の量は、測定された吸光度に比例し、希釈率（力価）として表され、1.5の吸光度という結果になった。力価は、測定された抗体の抗体希釈率（x軸）対吸光度650nm（y軸）をグラフ化して、1.5の吸光度における力価を補間することによって決定した。1.5の吸光度が得られたこの力価により、例9に記載の間接的競合マイクロタイタープレートアッセイにおいて使用する抗体の濃度（希釈率）を決定した。

## 【0097】

(例8b)

## 抗体スクリーニング法 - モノクローナルスクリーニング

（例6bにおいて作製した）リスペリドンモノクローナル抗体をスクリーニングするためのELISA法を、例7aに記載のリスペリドン-BSAで感作したマイクロタイタープレートを用いて行った。（例7において調製した）リスペリドン-BSAで感作したウェルの各ウェルに、0.1%のBSA及び0.01%のチメロサールを含有する50μLのリン酸緩衝生理食塩水及び次いで50μLのモノクローナル培養液上清を添加し、振盪しながら室温で10分間インキュベートした。このインキュベート中に、抗体が、ウェル中でリスペリドン-コンジュゲートに結合する。プレートのウェルを、0.02MのTRIS、0.9%のNaCl、0.5%のTween-80及び0.001%のチメロサール、pH7.8で3回洗浄し、結合していない抗体をすべて除去した。ウェル中のリスペリドン-BSAコンジュゲートに結合したリスペリドン抗体の量を検出するために、ネズ

10

20

30

40

50

ミ科動物の免疫グロブリンと特異的に結合することができ、基質（本例ではTMB）と共に培養したときに着色生成物を生成することができる、ヤギの抗マウス抗体 - HRP酵素コンジュゲート（Jackson Immunoresearch）を、0.1%のBSA、0.05%のANS、0.01%のチメロサールを含むPBS中で1/3000に希釈して、これを各ウェルに100μL添加した。振盪しながら室温で10分間インキュベートし、この間にヤギ抗マウス抗体 - HRP酵素コンジュゲートがウェル中でリスペリドン抗体に結合し、その後、これらのプレートを再び3回洗浄して、結合していないヤギ抗マウス抗体 - HRP酵素コンジュゲートを除去した。ウェル中で測定可能な発色をさせるために、洗浄後に、HRPの基質であるTMB（TMB Substrate、BioFx）を100μL添加して、振盪しながら室温で10分間インキュベートしている間に発色させた。発色のためのインキュベート後に、50μLの停止液（diH<sub>2</sub>O中1.5%のフッ化ナトリウム）を各ウェルに添加して発色を停止させ、10秒間振盪した後に、650nmにおいて吸光度を決定した（Molecular Devices Plate Reader）。1ウェル中の抗体の量は、測定された吸光度に比例した。バックグラウンドの3倍より大きい吸光度を有する試料が陽性であるとされた。例6bに記載のように、最大吸光度を有する50試料を24ウェルプレートに展開した。

## 【0098】

（例9）

間接的競合マイクロタイタープレートイムノアッセイ法

リスペリドンに対する抗体のIC<sub>50</sub>及び交差反応性の決定

IC<sub>50</sub>値及び交差反応性を決定するためのELISA法を、例7a及び7bに記載のリスペリドン - BSAコンジュゲートで感作したマイクロタイタープレートを用いて行った。検体、すなわちリスペリドン及びパリペリドン、並びにこれらの不活性な代謝産物である7-ヒドロキシリスペリドン及びN-デアルキルリスペリドンを、（例7aにおけるように）リスペリドン[9]-BSAマイクロタイタープレートを使用するときには1から10,000ng/mLの濃度範囲にわたって、又は（例7bにおけるように）リスペリドン[14]-BSAマイクロタイタープレートを使用するときには0.5から1,000ng/mLにわたって、diH<sub>2</sub>O中に希釈した。それぞれのアッセイは、50μLの検体溶液を、例4の免疫原で例6aにおいて産生されたポリクローナル抗体から選択される抗血清のうちの1種の50μL又は例6bにおいて産生されたモノクローナル抗体から選択されるうちの1種の50μLと共にインキュベートすることによって行った。これらのアッセイは全て、ウェルのそれぞれにおいて、抗血清又はモノクローナル抗体の濃度を、例8aにおいて決定されたタイターに希釈することによって行った。（振盪しながら室温で）10分間のインキュベート中に、（例7a及び7bにおいて作製した）ウェル中のリスペリドン - BSAコンジュゲートと、溶液中の検体とに対する抗体結合の競合が生じる。このインキュベート後に、プレートのウェルを、0.02MのTRIS、0.9%のNaCl、0.5%のTween-80及び0.001%のチメロサール、pH7.8で3回洗浄し、結合しなかった物質をすべて除去した。（例7a及び7bにおいて作製した）ウェル中のリスペリドン - BSAコンジュゲートに結合したリスペリドン抗体の量を検出するために、ネズミ科動物の免疫グロブリンと特異的に結合することができ、基質（本例ではTMB）と共に培養したときに着色生成物を生成することができる、ヤギの抗マウス抗体 - HRP酵素コンジュゲート（Jackson Immunoresearch）を、0.1%のBSA、0.05%のANS、0.01%のチメロサールを含むPBS中で予め決定された特定の活性（約1/3000）まで希釈して、これを各ウェルに100μL添加した。振盪しながら室温で10分間インキュベートし、この間にヤギ抗マウス抗体 - HRP酵素コンジュゲートがウェル中でリスペリドン抗体に結合し、その後、これらのプレートを再び3回洗浄して、結合していない二次コンジュゲートを除去した。ウェル中で測定可能な発色をさせるために、洗浄後に、HRPの基質であるTMB（TMB Substrate、BioFx）を100μL添加して、振盪しながら室温で10分間のインキュベートにおいて発色させた。発色のためのインキュベート後に、50μLの停

10

20

30

40

50

止液 (d i H<sub>2</sub>O 中 1 . 5 % のフッ化ナトリウム) を各ウェルに添加して発色を停止させ、20秒間振盪した後に、650 nmにおいて吸光度を決定した (Molecular Devices Plate Reader)。1ウェル中の抗体の量は、測定された吸光度に比例し、試料中のリスペリドンの量に反比例した。リスペリドン及びパリペリドンの IC<sub>50</sub> 値は、ウェル中の吸光度をウェル中の検体濃度に対してプロットした、用量反応曲線を構築することによって決定した。検体を含有するウェルにおける色の吸光度を検体を含まないものと比較して、標準曲線を作成した。所与の検体の IC<sub>50</sub> 値は、検体を含有しないウェルの吸光度の 50 % を有するのに必要な検体の濃度として定義された。交差反応性は、パリペリドンの IC<sub>50</sub> に対するリスペリドンの IC<sub>50</sub> の比として算出してあり、百分率として表した。このプールの抗体で測定したときには、リスペリドンと相対したパリペリドンについての百分率での交差反応性は、100 ± 20 % であった。下記の表 I に、リスペリドンに対するポリクローナル抗体についての結果がある。表 II に、リスペリドンに対するモノクローナル抗体についての結果がある。

【表 1】

表 I

リスペリドンに対するポリクローナル抗体を使用した競合イムノアッセイの交差反応性(例6a)。

10

20

	採血番号	G1M1	G1M3	G2M1	G2M5
検体	リスペリドン	100%	100%	100%	100%
	パリペリドン	81%	80%	98%	81%
	7-ヒドロキシリスペリドン	50%	66%	65%	69%
	N-デアルキルリスペリドン	0.02%	0.07%	0.09%	0.1%

30

【表 2】

表 II

リスペリドンに対するモノクローナル抗体を使用した競合的イムノアッセイの交差反応性(例6b)。

40

検体	モノクローナル抗体番号	
	4B9-21	5D5-3
リスペリドン	100%	100%
7-ヒドロキシリスペリドン	30%	39%

【0099】

これらの表からわかるように、本発明の抗体は、活性型のリスペリドンと実質的に選択

50

的に反応性であり、同様に、活性な代謝産物であるパリペリドンと実質的に交差反応性であり、不活性な代謝産物である7-ヒドロキシリスペリドン及びN-デアルキルリスペリドンとの低い交差反応性を有する。

---

フロントページの続き

(72)発明者 クライン、ダニエル、ジェイ .

アメリカ合衆国、ペンシルヴァニア、アレンタウン、ホーソーン ロード 1052

(72)発明者 サード、ハワード

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

(72)発明者 ヘグデ、ヴィシュヌマーシー

アメリカ合衆国、マサチューセッツ、チエルムスフォード、リトルトン ロード 175、ナンバ

- エイ4

審査官 伊藤 裕美

(56)参考文献 特表2007-514157(JP, A)

特表2008-534927(JP, A)

特表2008-537110(JP, A)

国際公開第2011/061155(WO, A1)

特開平02-191276(JP, A)

特表平09-505574(JP, A)

山下知寛, リスペリドンの生体内動態(第1報), 基礎と臨床, 1993年, 27/8, 133-15

0

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

Caplus/REGISTRY(STN)

专利名称(译)	利培酮免疫分析		
公开(公告)号	<a href="#">JP5782501B2</a>	公开(公告)日	2015-09-24
申请号	JP2013500059	申请日	2011-02-23
[标]申请(专利权)人(译)	萨拉戴克斯生物医学公司		
申请(专利权)人(译)	莎拉·达克斯生物医学公司		
当前申请(专利权)人(译)	莎拉·达克斯生物医学公司		
[标]发明人	サラモネサルヴァトーレジェイ コートニー、ジョディ、ブレイク クライインダニエルジェイ サードハワード ヘグデヴィッシュヌマーシー		
发明人	サラモネ、サルヴァトーレ、ジェイ。 コートニー、ジョディ、ブレイク クライイン、ダニエル、ジェイ。 サード、ハワード ヘグデ、ヴィッシュヌマーシー		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/543		
CPC分类号	A61P25/18 C07D471/04 C07K16/44 G01N33/94 Y10S436/815 C07K14/001		
FI分类号	G01N33/53.G G01N33/531.A G01N33/543.511.D		
审查员(译)	伊藤弘美		
优先权	12/724780 2010-03-16 US		
其他公开文献	JP2013522620A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

## 摘要(译)

来自利培酮的新型缀合物和免疫原以及由这些免疫原产生的抗体可用于免疫测定，用于定量和监测生物体液中的利培酮和帕潘立酮。

(21)出願番号	特願2013-500059 (P2013-500059)	(73)特許権者	511069507
(86)(22)出願日	平成23年2月23日 (2011.2.23)	サラダックス バイオメディカル インコ	ーポレイテッド
(65)公表番号	特表2013-522620 (P2013-522620A)	アメリカ合衆国 ペンシルバニア州	18
(43)公表日	平成25年6月13日 (2013.6.13)	015 ベスレム リサーチ ドライブ	
(86)国際出願番号	PCT/US2011/025893	116	
(87)国際公開番号	W02011/115733	(74)代理人	110000855
(87)国際公開日	平成23年9月22日 (2011.9.22)	特許業務法人浅村特許事務所	
審査請求日	平成25年11月27日 (2013.11.27)	(72)発明者	サラモネ、サルヴァトーレ、ジェイ。
(31)優先権主張番号	12/724,780	アメリカ合衆国、ニュージャージー、スト	ックトン、ヤード ロード 65
(32)優先日	平成22年3月16日 (2010.3.16)	(72)発明者	コートニー、ジョディ、ブレイク
(33)優先権主張国	米国 (US)	アメリカ合衆国、ペンシルバニア、ドイルズタウン、ヒッコリー ホロウ レイン	
		5859	
		最終頁に続く	