

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-323522

(P2004-323522A)

(43) 公開日 平成16年11月18日(2004.11.18)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C07D 265/18</b>	C O 7 D 265/18	4 C O 5 6
<b>C07D 413/06</b>	C O 7 D 413/06	4 C O 6 3
<b>C07D 413/12</b>	C O 7 D 413/12	4 C O 8 6
<b>C07K 16/44</b>	C O 7 K 16/44	4 H O 4 5
<b>// A61K 31/536</b>	A 6 1 K 31/536	
審査請求 有 請求項の数 3 O L 外国語出願 (全 18 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-124770 (P2004-124770)	(71) 出願人	591003013
(22) 出願日	平成16年4月20日 (2004. 4. 20)		エフ・ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(31) 優先権主張番号	10/420, 196		F. HOFFMANN-LA ROCH
(32) 優先日	平成15年4月22日 (2003. 4. 22)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(33) 優先権主張国	米国 (US)		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
			グレンツアーヘルストラツセ124
		(74) 代理人	100091096
			弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100096183
			弁理士 石井 貞次
		(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100122389
			弁理士 新井 栄一
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 エファビレンツを検出するための試薬

(57) 【要約】

【課題】

本発明は、エファビレンツ誘導体およびエファビレンツ誘導体の製造方法を提供する。

【解決手段】

該誘導体には、エファビレンツおよびラベルされたエファビレンツトレーサーに対する抗体を生成するための免疫原性化合物が含まれる。これらの化合物は、エファビレンツを測定するためのイムノアッセイ法に有用である。

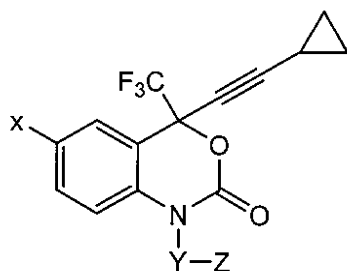
【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

下記構造式を有する化合物。

## 【化 1】



10

式中、Yは20までの炭素原子およびヘテロ原子を含む飽和または不飽和、置換または無置換、直鎖または分岐鎖であり、

Zは活性エステル、NH<sub>2</sub>、イミダゾール、マレイミド、チオール、イソチオシアネート、イソシアネート、またはW（Wは免疫原性キャリアまたはラベル）であり、

Xはハロゲン、NO<sub>2</sub>、NH<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>、およびOCH<sub>3</sub>からなる群から選択される。

## 【請求項 2】

XがClである、請求項 1 記載の化合物。

## 【請求項 3】

Wがポリ（アミノ酸）、多糖、ポリ（核酸）、および粒子からなる群から選択されるキャリアである、請求項 1 記載の化合物。

20

## 【請求項 4】

Wが酵素、酵素フラグメント、放射性同位体元素、酵素基質、酵素阻害剤、補酵素、蛍光発生化合物、化学発光物質、電気化学介在物質、レポーター基、核酸および粒子からなる群から選択されるラベルである、請求項 1 記載の化合物。

## 【請求項 5】

ZがN-ヒドロキシスクシンイミジル、p-ニトロフェニル、ペンタフルオロフェニル、およびN-ヒドロキシベンゾトリアゾリルエステルからなる群から選択される活性エステルである、請求項 1 記載の化合物。

30

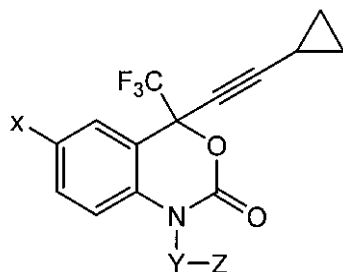
## 【請求項 6】

ZがNH<sub>2</sub>である、請求項 1 記載の化合物。

## 【請求項 7】

下記構造を有する化合物に応答して産生される抗体。

## 【化 2】



40

Yは20までの炭素原子およびヘテロ原子を含む飽和または不飽和、置換または無置換、直鎖または分岐鎖であり、

Zは活性エステル、NH<sub>2</sub>、イミダゾール、マレイミド、チオール、イソチオシアネート、イソシアネート、またはW（Wは免疫原性キャリア）であり、

Xはハロゲン、NO<sub>2</sub>、NH<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>、およびOCH<sub>3</sub>からなる群から選択される。

## 【請求項 8】

XがClである、請求項 7 記載の抗体。

50

## 【請求項9】

Wがポリ(アミノ酸)、多糖、ポリ(核酸)、および粒子からなる群から選択されるキャリアである、請求項7記載の抗体。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、エファビレンツを含む免疫原およびエファビレンツの検出のためのイムノアッセイに用いられるエファビレンツ誘導体に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

ヒト免疫不全ウイルスタイプ-1(HIV-1)は、後天性免疫不全症候群(AIDS)の発症に導くレトロウイルスである。米国のHIV感染率は、新規感染が年に約40,000と推定されている。HIV感染の現在の治療では、HIVプロテアーゼまたはHIV逆転写酵素(RT)を阻害することによって、ウイルスの複製能力を妨げるように設計されている。

## 【0003】

エファビレンツ(SUSTIVA(登録商標), Bristol-Meyers Squibb)は、HIVに感染した患者の治療において使用されるFDA認可薬のうちの1つである。エファビレンツによって、血液中のHIV量(「ウイルス量」)が低下することが判明している。エファビレンツを他の抗HIV薬と同時に摂取すると、患者のウイルス量が低減し、CD4細胞数が増加することが判明している。

## 【0004】

臨床試験の結果、HIVは、エファビレンツを始めとしてHIV療法で使用される薬に対して耐性をもつようになり得ることが示された。このような薬剤耐性は、治療の不成功の主たる原因であると考えられる。HIVの薬剤耐性の獲得は、ウイルスの速い複製速度の結果であり得る。その効力にもかかわらず、エファビレンツは遺伝的障壁(genetic barrier)が低い。単一の突然変異(多くはRT遺伝子中のリジン-103で起こるK103N)により、高レベルの表現型耐性(phenotypic resistance)が生じ得る。エファビレンツ耐性HIV変異体の出現は、効力のない、すなわち有効治療量以下の薬物に繰り返しさらされた結果であり得る。

## 【0005】

治療の不成功は、エファビレンツの血清濃度が低い患者で一層頻繁に観察される。例えば、Marzoliniら、AIDS 15(London)、71-75、2001では、エファビレンツの血漿レベルが低い(例えば、1000 $\mu$ g/L未満)患者(全85人の患者)の50%においてウイルス学的不具合(virological failure)があることが報告されている。1000-4000 $\mu$ g/Lまたは4000 $\mu$ g/Lを超える範囲にあるエファビレンツの血漿レベルを有する患者においては、患者の18-22%でウイルス学的不具合が観察された。さらに、エファビレンツを接種している患者の20-40%では、めまい、幻覚、悪夢および不眠症を含む中枢神経系(CNS)副作用が報告されている。これらの徴候は通常軽~中程度であり、エファビレンツ療法の開始後2、3週で次第におさまることが報告されているが、これらの副作用が重症であるかまたは持続するために患者の約4%で治療を中断することが報告されている。CNS毒性は、1000-4000 $\mu$ g/Lの範囲のレベルにある患者と比較して高いエファビレンツレベル(例えば、4000 $\mu$ g/Lを超える)にある患者においてはおよそ3倍の高い頻度で存在していた。このことは、治療の不成功およびCNS副作用が、エファビレンツ血漿レベルの高低と関係していることを意味する。個体におけるエファビレンツレベルの変化は、CNS副作用を最小にする一方で有益な治療効果を最適化するためには、治療薬物モニタリング(TDM)に基づいて用量調整しなければならないことを強く支持している。

## 【0006】

患者間の薬理的な違いにより、抗ウイルス物質療法に対する応答に大きな変化が生じるので、薬物レベルのモニタリングは、HIV感染ならびにHIV感染と関連する障害および疾患の管理に有用となり得る。高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)法(Marzoliniら、

10

20

30

40

50

同上)を使用する、HIV療法に有用な抗ウイルス剤の正規の治療薬物モニタリングは公知である。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

HPLC法を用いて血漿中のエファビレンツレベルを測定することができるが、このような方法は、例えば、長い試料調製時間、長い分析時間、高コストおよび労働集約型手法のために、商業的な使用に対しては非実用的である。従って、エファビレンツの血漿レベル測定のための簡単で迅速な分析法が、効率的なTDMには必要である。免疫アッセイ技術は、このような分析応用に好適である。

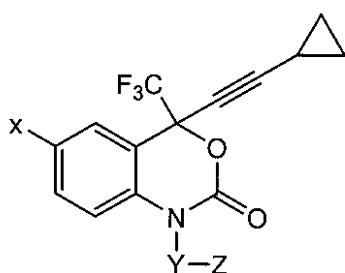
10

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、下記構造を有する化合物を提供する。

【化1】



20

【0009】

式中、Yは20までの炭素原子およびヘテロ原子を有する飽和または不飽和、置換または無置換、直鎖または分岐鎖であり、Zは活性エステル、NH<sub>2</sub>、イミダゾール、マレイミド、チオール、イソチオシアネート、イソシアネート、またはW(Wは免疫原性キャリアまたはラベル)であり、Xはハロゲン、NO<sub>2</sub>、NH<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>、およびOCH<sub>3</sub>からなる群から選択される。

【0010】

本発明のある実施態様において、キャリアはポリ(アミノ酸)である。該ラベルは、酵素、蛍光発生化合物、化学発光物質、電気化学介在物質、粒子、レポーター基、酵素阻害剤、および核酸であり得る。

30

【発明を実施するための最良の形態】

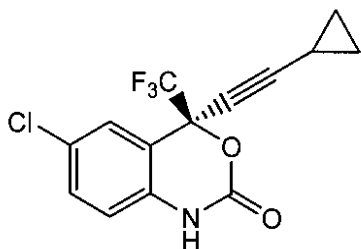
【0011】

特定の実施態様の説明をする前に、多数の用語を定義する。

【0012】

「エファビレンツ」は、HIV(AIDSを発症し得るウイルス)感染患者の治療に用いられるFDA認定薬SUSTIVA(登録商標)(Bristol-Meyers Squibb)中の活性成分である化合物である。エファビレンツは下記化学構造式により示すことができる。

【化2】



40

【0013】

「エファビレンツ」の用語は、上記構造のキラルおよびラセミ混合物の双方を含めて同一の実質構造を有する化合物、その代謝物、およびその類似体を包含すると考えることが

50

できる。例えば、塩素は、ある程度の効能を有する分子が得られる限りにおいて、他のハロゲン、ニトロ基、アミノ基、メチル基、またはメトキシ基と置換し得るものと理解される。この塩素原子と置換し得る他の基またはエファビレンツ分子上の置換され得る他の原子は、製薬化学の分野において公知であるか、または公知となるであろう。本発明は、エファビレンツと実質的に類似のあらゆる公知の分子または将来発見される分子を包含することを意図している。

【0014】

「ハプテン」は部分的な、または不完全な抗原である。それはタンパク質を含まない物質であり、たいてい低分子量の物質で、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のキャリアと結合させ、その後この結合産物、すなわち免疫原をヒトまたは動物被験者に注射することにより形成される。エファビレンツはハプテンである。

10

【0015】

「誘導体」の用語は、1以上の化学反応により親化合物または分子から生成される化学物質または分子をいう。

【0016】

「活性化ハプテン」とは、結合基の結合等により、ハプテン誘導体コンジュゲートを合成するための反応に利用可能なサイトを付与されているハプテン誘導体をいう。

【0017】

本明細書において、「結合基」または「リンカー」とは、ハプテン、キャリア、免疫原、ラベル、トレーサーその他のリンカー等の2以上の基礎構造体をつなぐ化学構造体の一部分をいう。結合基は、基礎構造体間に伸びる、水素（または他の一価原子）以外の原子の少なくとも1の中断されていない連続鎖を有する。結合基の原子および結合基内の鎖の原子はそれ自体、化学結合により結合されている。リンカーは線状または分岐で、飽和または不飽和の炭素鎖であり得る。また、鎖内または該鎖の終端に1以上のヘテロ原子を含んでいてもよい。「ヘテロ原子」は、酸素、窒素および硫黄からなる群から選択される炭素以外の原子を意味する。結合基はまた、鎖の1部としてまたは鎖中の1つの原子上の置換基として環状または芳香族の基を含んでいてもよい。

20

【0018】

結合基またはリンカーにおける原子数は、水素以外の原子の数を数えることにより決定される。結合基内の鎖における原子数は、結合される基礎構造間の最短ルートに沿って水素以外の原子数を数えることにより決定される。

30

【0019】

結合基は活性化するために、例えば、ハプテンとラベルまたはキャリアとのコンジュゲートを合成するためのハプテン上の利用可能なサイトを提供するために使用し得る。

【0020】

本明細書で用いる「免疫原」および「免疫原性」の用語は、生物中で免疫応答を誘発するかまたは生じ得る物質をいう。

【0021】

「活性エステル」は、例えば、ペプチドおよびタンパク質等の化合物の遊離アミノ基と反応し得るエステル基をいう。活性エステルの例としては、N-ヒドロキシスクシンイミド、p-ニトロフェニル、ペンタフルオロフェニル、およびN-ヒドロキシベンゾトリアゾリルがある。

40

【0022】

本明細書で用いる用語の「キャリア」または「免疫原性キャリア」は、ハプテンと結合し得、これによりハプテンが免疫応答を誘発し、抗原（ハプテン）と特異的に結合し得る抗体の産生を誘発することができる免疫原性物質、一般にタンパク質である。キャリア物質には、異物として認識されることにより宿主から免疫応答を誘発するタンパク質、糖タンパク質、複合多糖、粒子、および核酸が含まれる。

【0023】

50

種々のタンパク質のタイプを、ポリ(アミノ酸)免疫原性キャリアとして用いることができる。これらのタイプには、アルブミン、血清タンパク質、例えば、グロブリン、眼レンズタンパク質、リポタンパク質等が含まれる。事例となるタンパク質には、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)、卵オバルブミン、ウシガンマグロブリン(BGG)等が含まれる。また、合成ポリ(アミノ酸)を利用し得る。

【0024】

免疫原性キャリアはまた多糖であることもでき、これは単糖の縮合が繰り返されることにより構築される高分子量ポリマーである。多糖の例としては、澱粉、グリコーゲン、セルロース、炭水化物ゴム、例えばアラビアゴム、寒天等がある。多糖はまた、ポリアミノ酸残基および/または脂質残基を含んでいることもできる。

10

【0025】

免疫原性キャリアはまた、ポリ(核酸)単独、または上記ポリ(アミノ酸)もしくは多糖の1つとコンジュゲートされたポリ(核酸)であることもできる。

【0026】

免疫原性キャリアはまた粒子であることもできる。該粒子は一般に、直径が少なくとも約0.02ミクロン( $\mu\text{m}$ )で約100 $\mu\text{m}$ 以下であり、通常約0.05から10 $\mu\text{m}$ である。該粒子は有機または無機、膨潤可能または膨潤不可能、多孔性または非多孔性であり、所望によりほぼ水の密度、一般には約0.7~1.5g/mLであり、透明、部分的に透明または不透明であり得る物質からなる。該粒子は、細胞および微生物等の生物学的物質であり得、例えば、赤血球、白血球、リンパ球、ハイブリドーマ、ストレプトコッカス、スタフィロコッカス・アウレウス、大腸菌、および、ウイルス等の非限定的な例を含む。該粒子はまた、有機および無機ポリマー、リポソーム、ラテックス、リン脂質小胞またはリポタンパク質からなり得る。

20

【0027】

「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)は一般に、分子量が約2,000から、無限の分子量、通常10,000,000未満、普通は約600,000ダルトン以下の範囲にある。免疫原性キャリアまたは酵素が関与するかどうかにより通常異なる範囲となる。

【0028】

「ペプチド」は、アミド(ペプチド)結合による2以上のアミノ酸の結合により形成されるあらゆる化合物であり、通常、( $\text{NH}_2$ 末端以外の)各アミノ酸残基の  $\alpha$ -アミノ基が直鎖中の次の残基の  $\beta$ -カルボキシル基に結合している  $\alpha$ -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)の用語は、大きさに関して制限することなくこの種の化合物を意味するとして本明細書において同義的に用いられる。この種の中で最大のものはタンパク質と称される。

30

【0029】

「ラベル」、「検出分子」、または「トレーサー」は検出可能な信号を生じるかまたは生じるように誘起され得るいずれかの分子である。該ラベルは、分析物、免疫原、抗体または他の分子(例えばレセプター若しくはリガンド、特にハプテンのようにレセプターに結合し得る分子)にコンジュゲートし得る。ラベルの非限定的な例としては、放射性同位元素、酵素、酵素フラグメント、酵素基質、酵素阻害剤、補酵素、触媒、蛍光団、染料、化学発光物質(chemiluminescer)、発光物質(luminescer)もしくは感光剤、非磁性もしくは磁性粒子、固体支持体、リポソーム、リガンド、レセプターまたはハプテン放射性同位元素がある。

40

【0030】

「生物学的サンプル」の用語には、生物または生物であったもの由来のある量の物質が含まれるが、これに制限されるわけではない。このような生物には、ヒト、マウス、猿、ネズミ、ウサギ、ウマその他の動物が含まれるが、これに制限されるわけではない。このような物質には、血液、血清、尿、涙、細胞、器官、組織、骨、骨髄、リンパ、リンパ節、滑液組織、軟骨細胞、滑液大食細胞、内皮細胞および皮膚が含まれるが、これに限定さ

50

れるものではない。

【0031】

「患者」の用語には、ヒトと動物の被験者が含まれる。

【0032】

本発明は、エファビレンツの検出用のイムノアッセイに用いるための免疫原およびコンジュゲートの調製に有用なエファビレンツハプテン誘導体を提供する。

【0033】

本発明のエファビレンツ誘導体を免疫原性キャリア物質に結合させることにより、エファビレンツ検出のためのイムノアッセイ用の有用な試薬となる抗血清およびポリクローナル抗体ならびにモノクローナル抗体を製造し、単離することができる。

10

【0034】

該誘導体はまた、当技術分野で周知の方法により種々のラベルに結合させて、種々のイムノアッセイフォーマットに有用な種々の試薬を提供することもできる。検出のためには3つの可能性があり、発色団（例えば、フルオレセイン）のような検出分子に結合したり、ハプテン自体を放射性標識したり、または化学発光基を結合したりすることができ、これら3つのいずれでもこの分子の検出に有用なトレーサーが生成する。ハプテンは、ラテックス凝集およびクロマトグラフィーストリップテストのような分光測光法または直接光学検出フォーマットに用いる着色ラテックスを始めとする微粒子に結合することができる。この結合した基は、エネルギー伝達相手、酵素または、更なる化学反応により検出される他の基等の間接的検出分子であってもよい。

20

【0035】

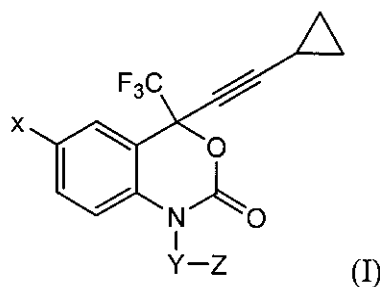
結合は、該ラベルまたはキャリアを結合させるいずれかの化学反応により実施することができる。この結合には、多くの化学的なメカニズム、例えば、共有結合、アフィニティ結合、挿入、配位結合、および複合体形成が含まれ得る。ほとんどの場合、該結合は、共有結合を介して生成される。共有結合は、存在する側鎖と直接縮合するか、または外部の架橋分子を取り込むことによりなされ得る。多くの2価または多価結合剤はキャリア等のタンパク質分子を他の分子に結合する際に有用である。代表的な結合剤には、チオエステル、カルボジイミド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、ジイソシアネート、グルタルアルデヒド、ジアゾベンゼン、およびヘキサメチレンジアミン等の有機化合物が含まれる。このリストは、本技術分野で公知の種々の結合剤を網羅したのではなく、より一般的な結合剤の代表例である。(KillenおよびLindstrom, "Specific killing of lymphocytes that cause experimental autoimmune myasthenia gravis by toxin-acetylcholine receptor conjugates," J. Immunol. 133:1335-2549, 1984; Jansen, F. K., Blythman, H. E., Carriere, D., Casella, P., Gros, O., Gros, P., Laurent, J. C., Paolucci, F., Pau, B., Poncelet, P., Richer, G., Vidal, H., およびVoisin, G. A., "Immunotoxins: Hybrid molecules combining high specificity and potent cytotoxicity." Immunological Reviews 62:185-216, 1982; およびHermanson, G., "Bioconjugate Techniques", Academic Press, 1995を参照のこと)

30

ある態様において、本発明は、下記構造式の化合物を提供する。

【化3】

40



【0036】

50

式中、Yは20までの炭素原子およびヘテロ原子を含む飽和または不飽和、置換または無置換、直鎖または分岐鎖であり、Zは活性エステル、NH<sub>2</sub>、イミダゾール、マレイミド、チオール、イソチオシアネート、イソシアネート、またはW (Wは免疫原性キャリアまたはラベル) であり、Xはハロゲン、NO<sub>2</sub>、NH<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>、およびOCH<sub>3</sub>からなる群から選択される。

#### 【0037】

ある態様において、エファビレンツ誘導体の合成では、エファビレンツを直接アルキル化する。該アルキル化は、活性化エファビレンツを得るために修飾または伸長し得る適切な官能基を有するハロアルキルエステルまたはハロアルキル化合物を用いて達成することができる。上記式を有する非限定的な代表化合物の合成を、図1及び図2に示す。

#### 【0038】

アルキル化エファビレンツのような新規ハプテン誘導体は、ハロゲン原子と反対側の末端に保護された官能基を有する二官能性ハロアルキルリンカーを用いて穏やかな条件下で調製され得る。保護された官能基は、例えば、保護されたアミン及びカルボン酸である。カルボン酸官能基を有する二官能性ハロアルキルリンカーのいくつかの例には、アルキル(ハロ)ブチレート(該アルキルがメチル、エチル、プロピルまたはt-ブチルであり、該ハロ(ゲン)はクロロ、プロモ、または、ヨードである)が含まれる。二官能性ハロアルキルリンカーの他の例は、当業者にとって容易に想到し得るであろう。アミン官能基を有する二官能性ハロアルキルリンカーのいくつかの例には、t-BOC(酸に対して不安定)、フタルイミド、またはFMOC(塩基に対して不安定)の保護基を伴うハロアルキル鎖が含まれる。フタルイミドアルキル化試薬の1例は、N-ヨードプロピル-フタルイミド(実施例6)である。図1は、t-BOCで保護されたハロアルキルアミンを用いたアルキル化を示している。

#### 【0039】

アルキル化は、相間移動触媒(例えば、クラウンエーテルおよびヨウ化ナトリウム)の存在下で塩基としてアルカリ金属の炭酸塩を用いる反応によって行うことができる。ある態様において、アルカリ金属カーボネート/クラウンエーテルの組み合わせは、炭酸カリウムと18-クラウン-6である。該反応は、例えば、ジメチルホルムアミド(DMF)のような双極性非プロトン性溶媒中、60-150の温度範囲、通常約120で、1-24時間行う。その後、アルキル化生成物を単離し、エファビレンツに対して副反応が生じない条件下で保護基を結合基から除去する。このような条件の例は、アルキルエステルを除去し遊離カルボン酸を生成させる水素化リチウムでの鹼化およびt-ブチルエステル保護基を除去し遊離アミンを生成させるトリフルオロ酢酸処理である。種々の保護基を用いた反応は、"Protective Groups in Organic Synthesis," T. GreenおよびP. Wuts, eds., Wiley-Interscience, 1991に記載されており、本文献は引用によりその全体が本明細書中に組み込まれる。

#### 【0040】

もう1つの態様において、エファビレンツのN-アルキル化生成物は、塩基の存在下、エファビレンツとアクリル酸アルキルとのマイケル反応によって得ることができる。例えば、Chemical and Pharmaceutical Bulletin 38 (6), 1575-78, 1990を参照のこと。本文献は引用によりその全体が本明細書に組み込まれる。

#### 【0041】

遊離カルボキシル基またはアミン末端を有するアルキル化エファビレンツはコンジュゲートの調製に直接用いることができる。例えば、カルボキシル結合基を有するエファビレンツは、アミド結合の形成のために本技術分野で周知の縮合剤を用いて、キャリア、ラベルまたはトレーサー上のアミンにコンジュゲートすることができる。同様に、アミン基は、キャリア、ラベル、トレーサー上のカルボキシル基にコンジュゲートすることができる。さらに、本発明のある態様においては、遊離カルボキシルまたはアミン末端を有するアルキル化エファビレンツを第2の結合基に結合して、末端活性基、例えば、活性エステル、イソシアネート、イミダゾリド、イソチオシアネート、チオールおよびマレイミド等を生成させる。これらの第2結合基はまた、本技術分野で周知の種々の不均一二官能性または均一二官能性リンカーであり得る。例えば、カルボキシル基を末端に有する第1結合基

10

20

30

40

50

の場合、第2結合基には、例えば、国際公開W0 90/15798に記載されているマレイミドアルキルアミンおよびアミノ酸が含まれる。これらのアミン含有第2結合基は一般に、アミド結合の形成用として本技術分野で公知の多数の縮合剤のうちのいずれか1つを用いて第1リンカー上のカルボキシル基と反応させる。第1リンカーがアミンを末端に有する場合、第2リンカーには、例えば、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-イソチオシアナト-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)、および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エステル(SATP)が含まれる。該N-ヒドロキシスクシンイミドエステル第2リンカーは一般に、穏やかな条件(例えば、双極子非プロトン性溶媒中トリエチルアミンの存在下室温以下の条件)で、アミン含有第1リンカーと直接反応する。例えば、図1はトリエチルアミンの存在下で、第2リンカーが第1リンカーのアミノ末端と反応することを示している。

10

**【0042】**

ジ-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルの場合、該反応は、2置換生成物よりもむしろ1置換生成物の形成に有利な条件下で行われる。例えば、ジ-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルにエファビレンツリンカーアミンを滴下すると1置換に有利である。該エファビレンツに第2リンカーを結合させた後は、第2リンカー上に新しい末端官能基が存在する。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、この新しい末端官能基は、単に、1置換から得られる未反応の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、直接縮合によりキャリア、ラベルおよびトレーサー上のアミン基に容易にコンジュゲートして、アミド結合を生成する。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、キャリア、ラベルおよびトレーサー上のアミン基に直接コンジュゲートしてチオウレア結合を生成し得る。

20

**【0043】**

MPSと同様に、新しい末端官能基がマレイミドである場合、キャリア、ラベルおよびトレーサー上のチオール基への付加によりコンジュゲートしてチオエーテル結合を生成する。該チオール基は、キャリア、ラベルおよびトレーサーに元々存在しているものでもよいし、または、2-イミノチオラン(2-IT)、スクシンイミジルアセチルチオプロピオネート(SATP)およびスクシンイミド2-ピリジルジチオプロピオネート(SPDP)のようなチオール化剤により導入してもよい。その後、初期のチオール基は、マレイミドと共にチオールエーテルを形成するために利用可能である。もう1つの態様においては、プロモアセチル化された修飾キャリアまたはラベルがチオールエーテルを形成する。

30

**【0044】**

SATPと同様に新しい官能基がチオールまたは保護されたチオールである場合、該チオールは、マレイミド修飾された免疫原またはラベルと直接コンジュゲートするかまたは、脱保護された後にコンジュゲートする。リンカー化学のバリエーションが多いことは当業者にとって明白であり、以上は説明のための例示に過ぎない。均一官能性および不均一官能性結合基の広範囲の取り扱いおよびアミンとカルボン酸に結合させるための反応条件は、「Bioconjugate Techniques」, G. Hermanson, Academic Press, 1995」に記載されており、この文献は引用によりその全体が本明細書中に組み込まれる。

40

**【0045】**

他の態様において、アミノ結合されたエファビレンツへの結合点にウレアまたはチオウレア結合を有するアシル化誘導体は、エファビレンツ誘導体のアミノ官能基を、4-ニトロフェニルクロロホルメート、ホスゲン、またはチオホスゲンと反応させることにより生成する。後者の中間体はアミン(アミノデキストラン、タンパク質、またはペプチド由来)と容易に反応して、ウレアまたはチオウレアを生成する。カルボニルジイミダゾールまたはジスクシンイミジルカーボネートのような他のホスゲン等価体は同様に反応する。

**【0046】**

活性エステルを有するリンカーを含むエファビレンツ誘導体は、種々の水性和非水性溶媒の混合液中で比較的低温にて求核剤、特に第1級アミンと反応性である。図1および2

50

に示したように、エファビレンツ活性化エステル誘導体とキャリア上のアミノ基との反応は一般に、水と水混和性有機溶媒との緩衝混合溶液（例えば、リン酸カリウム緩衝液（KPi）中のDMSO等）中で、0.5-5日間、室温で行われる。活性エステル、イソシアネート、およびイソチオシアネートの場合該緩衝液のpHは一般に6と8の間にある。

#### 【0047】

本発明の免疫原の調製においては、免疫原性を有するキャリアのポリ（アミノ酸）その他の物質を活性化エファビレンツ誘導体に結合させる。ある態様においては、例えば、アルブミン、血清タンパク質（例えばグロブリン）、眼レンズタンパク質、リポタンパク質等を始めとするタンパク質キャリアを使用し得る。具体的なタンパク質キャリアには、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（BSA）、卵オバルブミン、ウシガンマグロブリン（BGG）等が含まれる。また、反応性官能基を有する他の合成または天然のポリマー物質と同様に、合成ポリ（アミノ酸）を使用してもよい。抗体を生成するためには、該免疫原を宿主動物に注射する。免疫原は、種々の部位に、いくつかの用量で、1以上の回数で、何週間にもわたり投与し得る。

#### 【0048】

ハプテン誘導体はまた、本技術分野で周知の方法により、種々のトレーサー、検出またはラベル分子に結合させて、いろいろなイムノアッセイフォーマットに有用な種々の試薬を提供することもできる。検出のためには、発色団のような検出分子、例えばフルオレセインを結合したり、ハプテン自体を放射性同位元素でラベルしたり、または化学発光性の基を結合したりすることができ、これによりこの分子の検出に有用なトレーサーが生成する。該ハプテンは、例えば、ラテックス凝集およびクロマトグラフィーストリップテストの分光測光法または直接光学検出フォーマットに用いるための着色ラテックス等の微粒子に結合することができる。結合した基はまた、エネルギー伝達相手、酵素または更なる化学反応により検出されるその他の基等の間接的な検出分子であってもよい。

#### 【実施例】

#### 【0049】

下記の実施例は、本発明の特定の態様を単に例示するためのものであり、本発明の範囲または精神を制限するものとしてみなされるべきではない。

#### 【0050】

##### 実施例 1

4-(6-クロロ-4-シクロプロピルエチニル-2-オキソ-4-トリフルオロメチル-4H-ベンゾ[d][1,3]オキサジン-1-イル)-酪酸 tert-ブチル エステル (2)の合成

250mg (0.79mmol) のエファビレンツ1に10mLの無水DMF、600mg (4.34mmol) の炭酸カリウム、120mg (0.80mmol) のヨウ化ナトリウムおよび492mg (2.2mmol) の4-プロモ酪酸 tert-ブチルエステル、続いて5mgの18-crown-6を添加した。該混合物をアルゴン雰囲気下、2時間で125℃まで加熱し、減圧下で濃縮した。残渣に50mLのクロロホルムを添加し、固体を濾別した。ろ液に50mLの水を添加した。有機層を分離し、50mLの水で洗浄し、乾燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)し、濃縮した。残渣を、70%の酢酸エチル/30%のヘキサンを用いてシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーによって精製して、327 mg (0.721 mmol, 90%収率)の2を得た(M+Na, 480)。

#### 【0051】

##### 実施例 2

4-(6-クロロ-4-シクロプロピルエチニル-2-オキソ-4-トリフルオロメチル-4H-ベンゾ[d][1,3]オキサジン-1-イル)-酪酸 (3)の合成

290mg (0.63mmol) の2に、6mLのジクロロメタンおよび6mLのトリフルオロ酢酸を添加した。該反応混合物を、30分間室温で攪拌し、減圧下で濃縮した。残渣に40mLのジクロロメタンを添加し、その後、減圧下で濃縮した。ジクロロメタンの添加および減圧下での濃縮の上記プロセスをさらに4回繰り返して、240mg(0.59 mmol, 94%収率)の3を濃厚なゴムとして得た(M+H, 402)。

#### 【0052】

10

20

30

40

50

### 実施例3

4-(6-クロロ-4-シクロプロピルエチニル-2-オキソ-4-トリフルオロメチル-4H-ベンゾ[d][1,3]オキサジン-1-イル)-酪酸 N-ヒドロキシスクシンイミド エステル (4)の合成

200mg (0.49mmol) の3の30mLジクロロメタン (CaH<sub>2</sub>にて蒸留)溶液に、225mg (1.2mmol) の1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド (EDC) および102mg (0.88mmol) のN-ヒドロキシスクシンイミド (NHS)を添加した。該反応混合物を室温にて、18時間、アルゴン雰囲気下で攪拌した。この反応混合物に、40mLのジクロロメタンを添加し、該有機層を50mLの水で2回、50mLの飽和重炭酸ナトリウムで2回、その後75mLの水にて洗浄した。有機層を乾燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)し、濃縮して、粗活性化エステルを得た。これを50%の酢酸エチル/50%のヘキサンを用いてシリカゲル・クロマトグラフィーによって精製して、98 mg (0.19 mmol, 39%収率)の4を白色粉末として得た (M+H, 499)。

10

【0053】

### 実施例4

[2-(6-クロロ-4-シクロプロピルエチニル-2-オキソ-4-トリフルオロメチル-4H-ベンゾ[d][1,3]オキサジン-1-イル)-エチル]-カルバミン酸 tert-ブチルエステル 7の合成

250mgのエファピレンツの10mL無水DMF溶液に、600mgの無水K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、120mgのNaI、490mgの2-(BOC-アミノ)エチルプロミドおよび5mgの18-クラウン-6を添加した。該反応混合物を2時間、125 °Cで加熱した。該反応混合物を室温まで冷却し、1gの2-(BOC-アミノ)エチルプロミドおよび20mgのヨウ化テトラブチルアンモニウムを添加し、室温で、18時間攪拌した。該反応混合物を、0.1%のトリフルオロ酢酸を含む水-アセトニトリル混合溶液勾配 (0-100% AcCN-0.1% TFA, 20分)を用いる逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC, C-18 Vydac 218TP54 (4.6 mm x 250 mm))により分析した。これは反応混合物中、実質的なエファピレンツ量の生成物の形成を示した。更なる1gの2-(BOC-アミノ)エチルプロミドを添加し、反応混合物を18時間、60 °Cで加熱した。反応混合物を室温まで冷却し、濾過した。濾液を濃縮し、残渣を、勾配 (0.1%のトリフルオロ酢酸を含むCH<sub>3</sub>CN/水)を用いた分取RP-HPLCにより精製した。使用したカラムは、Rainin C-18 (ODS) 60 (21.4 x 250 mm)であった。所望の画分を組み合わせ、ロータリー・エバポレーターで濃縮し、その後25mgの所望の生成物7を白色固体として得た (M+Na, 481)。

20

【0054】

### 実施例5

1-(2-アミノ-エチル)-6-クロロ-4-シクロプロピルエチニル-4-トリフルオロメチル-1,4-ジヒドロ-ベンゾ[d][1,3]オキサジン-2-オン トリフルオロアセテート 8の合成

2.5mgの7に500 μLのジクロロメタンおよび500 μLのトリフルオロ酢酸を添加した。該混合物を30分間室温で攪拌し、減圧下で濃縮して、3mgの8を濃厚な油として得た (M+H, 359)。

30

【0055】

### 実施例6

2-[3-(6-クロロ-4-シクロプロピルエチニル-2-オキソ-4-トリフルオロメチル-4H-ベンゾ[d][1,3]オキサジン-1-イル)-プロピル]-イソインドール-1,3-ジオンの合成

50mg(0.15mmol)のエファピレンツの2mL無水DMF溶液に、120mgの炭酸カリウムおよび1mgの18-クラウン-6、その後50mg(0.15mmol)の3-ヨードプロピルフタルイミドを添加した。得られた反応混合物を18時間、60 °Cで加熱し、減圧下で濃縮した。残渣に10mLのジクロロメタンを添加し、濾過した。該濾液を濃縮し、残渣に75mLのCHCl<sub>3</sub>および50mLの水を添加した。有機層を分離し、水層を40mLのCHCl<sub>3</sub>で2回抽出した。合わせた有機層を乾燥し、濃縮して、40mgの所望の生成物を濃厚なゴムとして得た。これを勾配 (0.1%トリフルオロ酢酸を含むCH<sub>3</sub>CN/水)を用いた分取RP-HPLCにより精製した。使用したカラムは、Rainin C-18 (ODS) 60 °A (21.4 x 250 mm)であった。所望の画分を合わせ、ロータリー・エバポレーターで濃縮し、その後凍結乾燥することで10mgの所望の生成物を得た (M+H, 503)。

40

【0056】

### 実施例7

50

N-[2-(6-クロロ-4-シクロプロピルエチニル-2-オキソ-4-トリフルオロメチル-4H-ベンゾ[d][1,3]オキサジン-1-イル)-エチル]-テレフタルアミド酸 N-ヒドロキシスクシンイミド エステル 9の合成

15g(73.8mmol)のテレフタルイルクロリドに、300mLのメチレンクロリドを添加し、該溶液を約10分間、0 に冷却した。この溶液に30gのN-ヒドロキシスクシンイミドを添加し、その後に30mLのトリエチルアミンを滴下した。該混合物を1時間0 で攪拌し、48時間室温で攪拌した。反応混合物を濾過し、残渣を200mLのメチレンクロリドで洗浄した。該固体を300mLのメチレンクロリド中で再懸濁し、10分間室温で攪拌した。該固体を濾過し真空乾燥して、24.1g(67mmol, 90%)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 (10)を得た。

10

【0057】

1.0mmolのテレフタル酸1,4-ジ-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(10)に、100mLの乾燥THFを添加した。別のフラスコに、1.0mMエファビレンツアミン8の60mL乾燥THFおよび2.0mLトリエチルアミンを添加した。このエファビレンツアミン溶液をジ-NHSエステル溶液に、アルゴン雰囲気下、30分かけて滴下した。反応を一晩室温で攪拌した。反応液を減圧下で濃縮した。残渣を、THFおよび酢酸エチルの混合液を用いたシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製し、所望の生成物9を得た。

【0058】

#### 実施例8

エファビレンツ-BSAコンジュゲート (5)

500mgウシ血清アルブミン (BSA)の7mLの50mMフタル酸カリウム溶液 (pH 7.5)を氷浴中で冷却した。該溶液に、反応混合物温度を室温未満に保持して、7mLのDMSOを滴下した。該タンパク質溶液に、9.4mg(0.019mmol)の4の1.5mL無水DMF溶液を添加(滴下)した。反応混合液を室温で48時間攪拌した。得られたコンジュゲートを透析管(10,000MW カットオフ)中に入れ、1Lの50mMリン酸カリウムの70% DMSO溶液 (pH 7.5、3回の交換、それぞれ少なくとも3時間)、1Lの50mMリン酸カリウムの50% DMSO溶液(少なくとも3時間)、1Lの50mMリン酸カリウムの30% DMSO溶液(少なくとも3時間)、1Lの50mMリン酸カリウムの10% DMSO溶液(少なくとも3時間)にて室温で透析し、その後4 にて50mMリン酸カリウムを6回替える(各1L)ことにより透析をした。タンパク質の濃度を、Biorad Coomassie blue protein assay(Bradford, M., Anal Biochem. 72, 248, 1976)を用いて23.2mg/mLと決定した

20

30

【0059】

#### 実施例9

エファビレンツ-KLHコンジュゲート (6)

151mgのキーホールリンペットヘモシアニンの7mLの50mMフタル酸カリウム溶液 (pH 7.5)を氷浴中で冷却した。該溶液に8.5mLのDMSOを滴下し、反応温度を室温未満に保持した。タンパク質溶液に、44mg(0.88mmol)の4の1.5mLDMF溶液を滴下した。該混合物を室温で18時間攪拌した。得られたコンジュゲートを、透析管(10,000MW カットオフ)中に入れ、1Lの50mMリン酸カリウムの70% DMSO溶液 (pH 7.5、3回の交換、それぞれ少なくとも3時間)、1Lの50mMリン酸カリウムの50% DMSO溶液(少なくとも3時間)、1Lの50mMリン酸カリウム中の30% DMSO溶液(少なくとも3時間)、1Lの50mMリン酸カリウムの10% DMSO溶液(少なくとも3時間)にて室温で透析し、その後4 にて50mMリン酸カリウムを6回(各1L)交換することで透析をした。タンパク質の濃度を、Biorad Coomassie blue protein assayを用いて4.2mg/mLと決定した。全体で28mLのコンジュゲートを得た。利用できるリジン変更態様の範囲は、TNBS法(Habeeb AFSA, Anal. Biochem. 14, 328-34, 1988)にて74%と決定した。

40

【0060】

#### 実施例10

エファビレンツに対する抗血清の生成

免疫化

50

少なくとも20週齢の雌のBalb/cマウスを、下記の手順によりエファビレンツN結合KLHコンジュゲート6で最初に免疫した。該コンジュゲート6を、生理食塩水で0.2mg/mLに希釈した。0.3mLの希釈コンジュゲートを、0.5mLのシリンジ中に入れた。0.3mLのComplete Freund's Adjuvant (Sigma Chemicals)を、別の0.5mLのシリンジ中に入れた。この2つのシリンジをダブルハブ25gaステンレス鋼針により連結した。混合物中の硬さが明確に感じとれるまで1のシリンジからもう1つのシリンジへ内容物を何度も押し込むことでエマルジョンを調製した。その後、全内容物を1のシリンジに押し込んだ。27gaの針を、該エマルジョンを含む該シリンジに取り付けた。マウスに、得られたエマルジョンの合計100 $\mu$ Lを皮下および腹膜内の部位に分割して注射した。

【0061】

30日後と60日後、Complete Freund's AdjuvantをIncomplete Freund's Adjuvant (Sigma)に置換して上記手順を繰り返した。

【0062】

競争阻害試験

最後の免疫の14日後、マウスの眼窩後方から血液採取することで血清サンプルを取り出した。遠心分離による細胞物質の分離後およそ15-20 $\mu$ Lの浄化された血清を得た。該血清を、微生物の成長を阻害するために0.02%のチメロサルを含むリン酸塩緩衝食塩水 (PBS, H 7.4) (PBS-T) で1:10に即座に希釈した。

【0063】

血清を、抗原特異的ELISAを介して抗体活性について滴定した。スチレン96穴プレートの穴を、エファビレンツN結合BSAコンジュゲート5でコーティングした。このためには、0.1Mの炭酸カリウム, pH9.2中に0.1 $\mu$ g/mLエファビレンツBSAコンジュゲートを含む50 $\mu$ Lの溶液を穴に入れ、37 $^{\circ}$ Cで1時間、覆われたプレートをインキュベートした。該溶液を除き、該穴を、後コート溶液 (1%のゼラチン加水分解物、2%のショ糖、0.1Mのトリス緩衝液, pH 7.4および0.15%のTWEEN 20 (全てSigma Chemical社由来の試薬)) で即座に満たし、上記のように覆い、インキュベートした。その後、該プレートを2%のショ糖で1度洗浄し、空気乾燥した。乾燥すると、該プレートを乾燥剤入りの、アルミ箔で覆われたプラスチック袋に封入し、使用するまで4 $^{\circ}$ Cで貯蔵した。

【0064】

滴定のために、まず、1:100血清PBS-T希釈液、その後7回の連続的な1:3の希釈液を調製した。各血清サンプルの50 $\mu$ Lの連続希釈液をコーティングされたマイクロタイタープレートの穴に移し、該プレートを覆い、37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした。該血清希釈液をPBS-Tで穴から洗い流した後、ヤギ抗マウスIgG-HRPコンジュゲート (Zymed社) をPBS-Tで1:5,000に希釈した希釈液を50 $\mu$ Lずつ各穴に添加した。プレートを覆い、1時間37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。インキュベーション後、該プレートをPBS-Tで洗浄し、50 $\mu$ LのK Blue 基質 (Neogen) を添加した。室温で6分間発色させ、その後、該反応を50 $\mu$ Lの1N HClを添加することにより停止した。生じた色を450nmのフィルターを装備したマイクロプレートリーダーで読み取った。色強度を最終的な血清希釈度に対しプロットし、最大読み値の50%が得られた希釈点を記録した。

【0065】

競争阻害を測定するために、上記のように処置したプレートを用いた。最初に1:300にPBS-Tで希釈した後、遊離エファビレンツ (ストック濃度1mg/mL) の1:4の連続希釈液を調製した。25 $\mu$ Lの遊離薬の各希釈液を、コーティングされたプレートの1列の穴中へピペットで移した。次に、上記で決定した濃度の2倍に血清希釈液を調製し、25 $\mu$ Lを該カラムの各穴に入れた。各カラムに、別々のマウス血清サンプルを入れた。該プレートを覆い、37 $^{\circ}$ C、1時間インキュベートし、その後PBS-Tで洗浄した。その後、各穴に、50 $\mu$ Lの1:5,000ヤギ抗マウスIgG-HRPコンジュゲートの希釈液を入れ、覆い、1時間インキュベートした。インキュベーション後、上記と同様に、該プレートを洗浄し、11分間発色させ、その後、停止した。OD<sub>450</sub>を、最終薬濃度の関数としてプロットした。

【0066】

10

20

30

40

50

あるマウスから得られた結果を図3に示す。遊離薬の添加は、マイクロプレートに吸着した該薬コンジュゲートへの血清抗体の結合の競争阻害を示す。該データは、生成した抗体がエファビレンツに対して特異的であることを示している。注目すべきは、抗血清はキラル薬のコンジュゲートを用いて生じ、キラルBSAコンジュゲートへの結合に対して検査し、該競争薬はキラルであったことである。この結果は、エファビレンツ-KLHコンジュゲートの投与が該薬部に特異的な抗体を生成するのに十分であったことを示している。

【図面の簡単な説明】

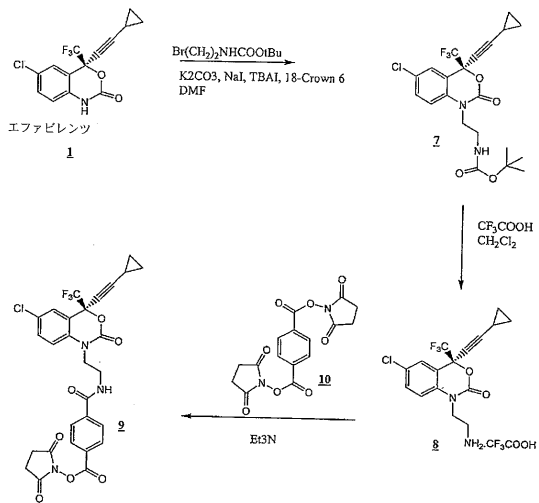
【0067】

【図1】図1は本発明によるN-ヒドロキシスクシンイミドエステル誘導体の合成法の略図である。

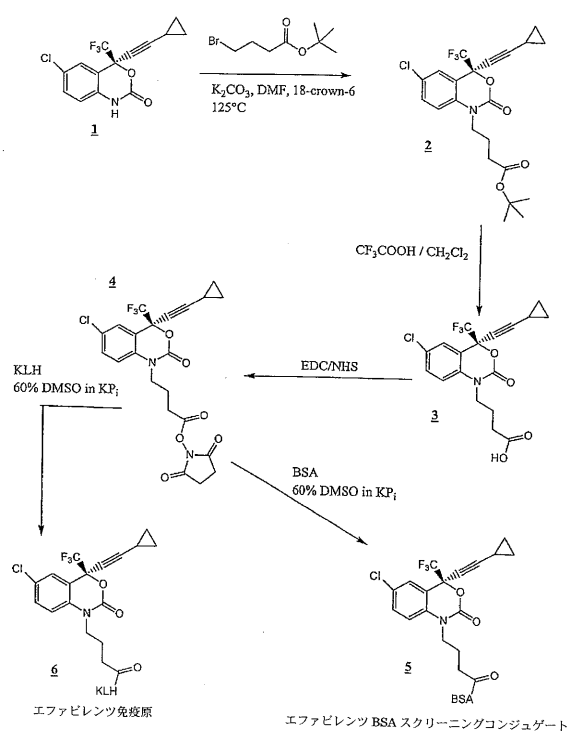
【図2】図2は本発明による免疫原およびコンジュゲートの合成法の略図である。

【図3】図3は遊離エファビレンツによるN結合BSA-エファビレンツに対する血清抗体の結合の競争阻害を示している。

【図1】

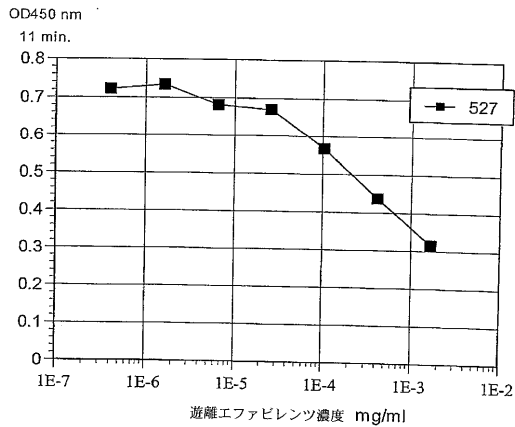


【図2】



【 図 3 】

遊離エフェピレンツによるエファピレンツ-BSA (N結合) への  
血清抗体 (マウス#527) の結合の競争阻害



## 【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成16年5月19日 (2004.5.19)

## 【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

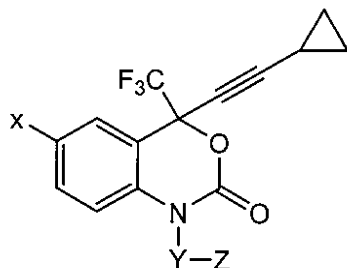
【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

下記構造式を有する化合物。

【 化 1 】



式中、Yは20までの炭素原子およびヘテロ原子を含む飽和または不飽和、置換または無置換、直鎖または分岐鎖であり、  
Zは活性エステル、NH<sub>2</sub>、イミダゾール、マレイミド、チオール、イソチオシアネート、イソシアネート、またはW (Wは免疫原性キャリアまたはラベル) であり、  
Xはハロゲン、NO<sub>2</sub>、NH<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>、およびOCH<sub>3</sub>からなる群から選択される。

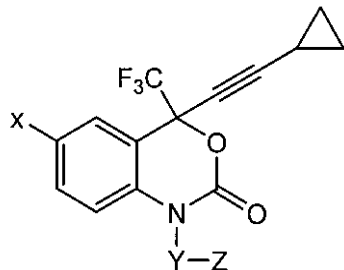
【 請求項 2 】

ZがN-ヒドロキシスクシンイミジル、p-ニトロフェニル、ペンタフルオロフェニル、およびN-ヒドロキシベンゾトリアゾリルエステルからなる群から選択される活性エステルである、請求項1記載の化合物。

【請求項3】

下記構造を有する化合物に応答して産生される抗体。

【化2】



Yは20までの炭素原子およびヘテロ原子を含む飽和または不飽和、置換または無置換、直鎖または分岐鎖であり、

Zは活性エステル、NH<sub>2</sub>、イミダゾール、マレイミド、チオール、イソチオシアネート、イソシアネート、またはW (Wは免疫原性キャリア) であり、

Xはハロゲン、NO<sub>2</sub>、NH<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>、およびOCH<sub>3</sub>からなる群から選択される。

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 31/18	
C 0 7 K 14/435	C 0 7 K 14/435	
C 0 7 K 14/765	C 0 7 K 14/765	
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	S

(72)発明者 ジェラルド エフ . ジーグラ  
 アメリカ合衆国 4 6 0 3 3 インディアナ州 , カーメル , アイアンウッド ドライブ 8 8 8

(72)発明者 ミタリ ゴーシャル  
 アメリカ合衆国 4 6 0 6 0 インディアナ州 , ノーブルズヴィル , パークショアー ドライブ  
 1 0 1 5 3

(72)発明者 リリー アラブシャヒ  
 アメリカ合衆国 4 6 0 3 2 インディアナ州 , カーメル , ペピン プレイス 1 4 1 5 7

F ターム(参考) 4C056 AA02 AB01 AC02 AD03 AE03 AF05 DB04 DC05 DC07  
 4C063 AA01 BB03 BB07 BB08 CC54 DD04 EE10  
 4C086 BC72 NA20 ZB09 ZB33 ZC55  
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA51 CA40 CA50 DA70 DA76  
 DA86 EA53 FA72

【外国語明細書】

2004323522000001.pdf

专利名称(译)	用于检测依法韦仑的试剂		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004323522A</a>	公开(公告)日	2004-11-18
申请号	JP2004124770	申请日	2004-04-20
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	ジェラルドエフジグラー ミタリゴージャル リリーアラブシャヒ		
发明人	ジェラルド エフ.ジグラー ミタリ ゴージャル リリー アラブシャヒ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/536 A61K47/48 A61P31/18 C07D265/18 C07D413/06 C07D413/12 C07K14/435 C07K14/765 C07K16/44		
CPC分类号	C07D265/18 A61K47/643 A61K47/646 C07K16/44		
FI分类号	C07D265/18 C07D413/06 C07D413/12 C07K16/44 A61K31/536 A61P31/18 C07K14/435 C07K14/765 G01N33/53.S		
F-TERM分类号	4C056/AA02 4C056/AB01 4C056/AC02 4C056/AD03 4C056/AE03 4C056/AF05 4C056/DB04 4C056/DC05 4C056/DC07 4C063/AA01 4C063/BB03 4C063/BB07 4C063/BB08 4C063/CC54 4C063/DD04 4C063/EE10 4C086/BC72 4C086/NA20 4C086/ZB09 4C086/ZB33 4C086/ZC55 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA51 4H045/CA40 4H045/CA50 4H045/DA70 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA53 4H045/FA72		
代理人(译)	荒井英一		
优先权	10/420196 2003-04-22 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

[问题] 本发明提供了一种依非韦仑衍生物及其制备方法。[解决方案] 衍生物包括免疫原性化合物，以产生抗依非韦仑和依法韦仑示踪剂的抗体。这些化合物可用于免疫测定方法以测定依非韦仑。[选择图]无

