

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-527005
(P2010-527005A)

(43) 公表日 平成22年8月5日(2010.8.5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	4 C 0 8 4
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/53 V	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 37/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-507595 (P2010-507595)
 (86) (22) 出願日 平成20年5月6日 (2008.5.6)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年12月17日 (2009.12.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/062739
 (87) 国際公開番号 W02008/137885
 (87) 国際公開日 平成20年11月13日 (2008.11.13)
 (31) 優先権主張番号 60/928,144
 (32) 優先日 平成19年5月7日 (2007.5.7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/928,438
 (32) 優先日 平成19年5月8日 (2007.5.8)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

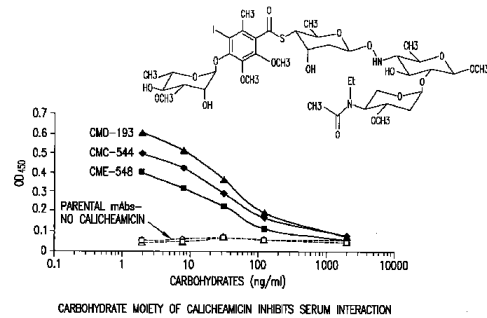
(71) 出願人 309040701
 ワイス・エルエルシー
 アメリカ合衆国 07940 ニュージャ
 ージー州 マジソン、ファイブ ジラルダ
 ファームズ (番地なし)
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 ウェンセル, デイビッド リロイ
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01
 845, ノース アンドーバー, ヘリ
 ック ロード 53

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗炭水化物抗体によって生じるイムノアッセイにおける妨害の除去

(57) 【要約】

本発明は、一般には、抗薬物抗体の検出のためのアッセイ、特に、抗薬物抗体の検出に関し、ここで上記薬物は、炭水化物部分を有する。本発明はまた、一般に、薬物の検出のためのアッセイ、特に、薬物の検出に関し、ここで上記薬物は、炭水化物部分を有する。本発明はさらに、炭水化物部分を含む薬物での処置に適した被験体を同定するための方法に関する。一局面において、本発明は、抗体を含む流体サンプル中の炭水化物部分を含む薬物に対する抗体の存在を検出するためのアッセイを提供し、上記アッセイは、以下の工程：(i) 上記サンプルと、(ii) 上記炭水化物部分を含む薬物、および (iii) さらに炭水化物とを合わせる工程；ならびに上記サンプル中の抗体と、上記炭水化物部分を含む薬物との間に特異的結合が存在するか否かを検出する工程；を包含し、ここで上記炭水化物部分を含む薬物は、糖タンパク質を含まない。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体に由来する抗体を含む流体サンプル中で、炭水化物部分を含む薬物に対する抗体の存在を検出するためのアッセイであって、該アッセイは、以下の工程：

(a) 以下：

(i) 該流体サンプルと、

(i i) 該炭水化物部分を含む薬物；および

(i i i) さらなる炭水化物

とを合わせる工程；ならびに

(b) 該サンプル中の抗体と、該炭水化物部分を含む薬物との間で特異的結合が生じるか否かを検出する工程；

を包含し、

ここで該さらなる炭水化物は、該サンプル中の抗体と該炭水化物部分を含む薬物との間に特異的結合が生じるか否かを検出する工程の前に、該流体サンプルと予め混合されない、アッセイ。

【請求項 2】

被験体由来の抗体を含む流体サンプル中で、炭水化物部分を含む薬物に対する抗体の存在を検出するためのアッセイであって、該アッセイは、以下の工程：

(a) 以下：

(i) 該流体サンプルと、

(i i) 該炭水化物部分を含む薬物；および

(i i i) さらなる炭水化物、

とを合わせる工程；

(b) 該サンプル中の抗体と、該炭水化物部分を含む薬物との間で特異的結合が生じるか否かを検出する工程；

を包含し、

ここで該炭水化物部分を含む薬物は、糖タンパク質を含まない、アッセイ。

【請求項 3】

前記アッセイは、前記炭水化物部分を含む薬物に前記被験体を曝した後に行われる、請求項 1 または 2 に記載のアッセイ。

【請求項 4】

前記アッセイは、前記炭水化物部分を含む薬物に前記被験体を曝す前に行われる、請求項 1 または 2 に記載のアッセイ。

【請求項 5】

前記さらなる炭水化物は、前記サンプルと前記炭水化物部分を含む薬物とが合わされた後に添加される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のアッセイ。

【請求項 6】

前記被験体に由来する流体サンプルは、全血；血清；粘液、唾液、初乳および血漿のうちの少なくとも 1 種を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のアッセイ。

【請求項 7】

前記検出する工程は、サンドイッチアッセイ、架橋アッセイおよび競合結合アッセイのうちの少なくとも 1 種を含む、請求項 6 に記載のアッセイ。

【請求項 8】

前記検出する工程は、前記サンプルと接触させた状態での固体光学要素表面の屈折率変化を検出する工程；ルミネッセンスの変化を検出する工程；色の変化を測定する工程；放射能の変化を検出する工程；生体層干渉法を使用して測定する工程；カンチレバー検出を使用して測定する工程；標識なしの内因性画像化を使用して測定する工程；および音波検出を使用して測定する工程のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のアッセイ。

10

20

30

40

50

【請求項 9】

前記検出する工程は、酵素結合イムノソルベントアッセイ (E L I S A) ; 電気化学発光アッセイ (E C L) ; ラジオイムノアッセイ (R I A) ; 固相ラジオイムノアッセイ (S P R I A) ; イムノプロットイング ; 免疫沈降法 ; 蛍光活性化セルソーティング (F A C S) からなる群より選択されるアッセイを含む、請求項 8 に記載のアッセイ。

【請求項 10】

前記検出する工程は、架橋アッセイを含む、請求項 9 に記載のアッセイ。

【請求項 11】

前記検出する工程は、E L I S A を含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のアッセイ。

10

【請求項 12】

前記さらなる炭水化物は、細菌リポポリサッカリド (L P S) もしくはそのフラグメント、デキストランもしくはそのフラグメント、レバンもしくはそのフラグメント、肺炎球菌ポリサッカリドもしくはそのフラグメント、アガロースもしくはそのフラグメント、セルロースもしくはそのフラグメント、カラギーナンもしくはそのフラグメント、およびメチルグリコシドもしくはそのフラグメントである、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のアッセイ。

【請求項 13】

前記さらなる炭水化物は、約 10 n g / m l ~ 約 1 m g / m l の間の濃度において、工程 a) の組み合わせで存在する、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のアッセイ。

20

【請求項 14】

前記炭水化物部分を含む薬物は、前記薬物に結合体化されたキャリアをさらに含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載のアッセイ。

【請求項 15】

前記キャリアは、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体、ならびにこれらの化学的もしくは遺伝的に操作された対応物 ; これらの抗原認識フラグメントおよびこれらの化学的もしくは遺伝的に操作された対応物 ; 小モジュラー免疫医薬 (S M I P) およびこれらの化学的もしくは遺伝的に操作された対応物 ; ナノ抗体およびこれらの化学的もしくは遺伝的に操作された対応物 ; 可溶性レセプターおよびこれらの化学的もしくは遺伝的に操作された対応物 ; 増殖因子およびこれらの化学的もしくは遺伝的に操作された対応物 ; アプタマー ; リポソーム ; 非グリコシル化タンパク質 ; およびナノ粒子からなる群より選択される、請求項 14 に記載のアッセイ。

30

【請求項 16】

前記キャリアは、癌細胞の表面上で発現される抗原に特異的に結合する、請求項 14 または 15 に記載のアッセイ。

【請求項 17】

前記癌細胞の表面上で発現される抗原は、5 T 4 ; C D 1 9 ; C D 2 0 ; C D 2 2 ; C D 3 3 ; ルイス Y ; H E R - 2 ; 免疫グロブリン G の I 型 F c レセプター (F c R 1) ; C D 5 2 ; 上皮増殖因子レセプター (E G F R) ; 血管内皮増殖因子 (V E G F) ; D N A / ヒストン複合体 ; 癌胎児抗原 (C E A) ; C D 4 7 ; V E G F R 2 (血管内皮増殖因子レセプター 2 もしくはキナーゼ挿入ドメイン含有レセプター, K D R) ; 上皮細胞接着分子 (E p - C A M) ; 線維芽細胞活性化タンパク質 (F A P) ; T r a i l レセプター - 1 (D R 4) ; プロゲステロンレセプター ; 腫瘍胎児抗原 C A 1 9 . 9 ; ならびにフィブリンからなる群より選択される、請求項 16 に記載のアッセイ。

40

【請求項 18】

前記キャリアは、モノクローナル抗体である、請求項 15 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のアッセイ。

【請求項 19】

前記モノクローナル抗体は、抗 C D 2 2 モノクローナル抗体 ; 抗 5 T 4 モノクローナル抗体 ; 抗ルイス Y モノクローナル抗体 ; および抗 C D 3 3 モノクローナル抗体からなる群よ

50

り選択される、請求項 18 に記載のアッセイ。

【請求項 20】

前記炭水化物部分を含む薬物は、細胞傷害性薬剤；放射線療法剤；免疫調節剤；抗血管新生剤；抗増殖剤；アポトーシス促進因子；化学療法剤；および治療的核酸からなる群より選択される、請求項 1～19 のいずれか 1 項に記載のアッセイ。

【請求項 21】

前記炭水化物部分を含む薬物は細胞傷害性薬剤である、請求項 20 に記載のアッセイ。

【請求項 22】

前記細胞傷害性薬剤は、チューブリンポリマー化のインヒビター；DNA に結合しかつこれを破壊するアルキル化剤；タンパク質合成のインヒビター；またはチロシンキナーゼインヒビターである。請求項 21 に記載のアッセイ。

10

【請求項 23】

前記細胞傷害性薬剤は、カリチアマイシン、チオテパ、タキサン、ビンクリスチン、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、エピルピシン、アクチノマイシン、オースラマイシン、アザセリン、プレオマイシン、タモキシフェン、イダルピシン、ドラスタチン/オーリスタチン、ヘミアスタリン、およびマイタンシノイドから選択される、請求項 21 に記載のアッセイ。

【請求項 24】

前記細胞傷害性薬剤はカリチアマイシンである、請求項 23 に記載のアッセイ。

【請求項 25】

前記カリチアマイシンは、N - アセチル ジメチルヒドラジドカリチアマイシンである、請求項 24 に記載のアッセイ。

20

【請求項 26】

前記 N - アセチル ジメチルヒドラジドカリチアマイシンは、キャリアモノクローナル抗体に結合体化され、該モノクローナル抗体は、5T4；CD19；CD20；CD22；CD33；ルイス Y；HER-2；免疫グロブリン G の I 型 Fc レセプター (FcR1)；CD52；上皮増殖因子レセプター (EGFR)；血管内皮増殖因子 (VEGF)；DNA / ヒストン複合体；癌胎児抗原 (CEA)；CD47；VEGFR2 (血管内皮増殖因子レセプター 2 もしくはキナーゼ挿入ドメイン含有レセプター, KDR)；上皮細胞接着分子 (EPCAM)；線維芽細胞活性化タンパク質 (FAP)；Trail レセプター - 1 (DR4)；プロゲステロンレセプター；腫瘍胎児抗原 CA19.9；およびフィブリンからなる群より選択される抗原に特異的に結合する、請求項 25 に記載のアッセイ。

30

【請求項 27】

前記さらなる炭水化物は、S - [(2R, 4S, 6S) - 6 - ({ [(2R, 4S, 5R) - 5 - ({ (2S, 4S, 5S) - 5 - [アセチル (エチル) アミノ] - 4 - メトキシテトラヒドロ - 2H - ピラン - 2 - イル} オキシ) - 4 - ヒドロキシ - 6 - メトキシ - 2 - メチルテトラヒドロ - 2H - ピラン - 3 - イル] アミノ} オキシ) - 4 - ヒドロキシ - 2 - メチルテトラヒドロ - 2H - ピラン - 3 - イル] 4 - { [(2S, 3R, 4R, 5S, 6S) - 3, 5 - ジヒドロキシ - 4 - メトキシ - 6 - メチルテトラヒドロ - 2H - ピラン - 2 - イル] オキシ} - 3 - ヨード - 5, 6 - ジメトキシ - 2 - メチルベンゼンカルボチオエート) である、請求項 22～24 のいずれか 1 項に記載のアッセイ。

40

【請求項 28】

前記検出する工程は、前記炭水化物部分を含む薬物に特異的に結合する前記サンプル中の抗体に対する捕捉試薬の特異的結合をさらに含む、請求項 1～27 のいずれか 1 回に記載のアッセイ。

【請求項 29】

前記炭水化物部分を含む薬物に特異的に結合する抗体の存在は、該炭水化物部分を含む薬物に特異的に結合する抗体に対する化合物の特異的結合によって検出される、請求項 28 に記載のアッセイ。

50

【請求項 30】

前記化合物は、検出可能な標識をさらに含む前記捕捉試薬；および検出可能な標識をさらに含む第2の抗体からなる群より選択され、該第2の抗体は、前記結合した抗体に特異的に結合する、請求項29に記載のアッセイ。

【請求項 31】

前記検出可能な標識は、酵素標識；ルミネッセント標識；タンパク質標識；ビタミン標識；放射性同位体標識からなる群より選択される少なくとも1種の標識を含む、請求項30に記載のアッセイ。

【請求項 32】

前記捕捉試薬は、カリチアマイシンを含む、請求項28～31のいずれか1項に記載のアッセイ。

10

【請求項 33】

前記捕捉試薬は、カリチアマイシンもしくはその機能的フラグメントの炭水化物部分である、請求項32に記載のアッセイ。

【請求項 34】

前記カリチアマイシンの炭水化物部分は、カリチアマイシンに存在するS - [(2 R , 4 S , 6 S) - 6 - ({ [(2 R , 4 S , 5 R) - 5 - ({ (2 S , 4 S , 5 S) - 5 - [アセチル (エチル) アミノ] - 4 - メトキシテトラヒドロ - 2 H - ピラン - 2 - イル } オキシ) - 4 - ヒドロキシ - 6 - メトキシ - 2 - メチルテトラヒドロ - 2 H - ピラン - 3 - イル] アミノ } オキシ) - 4 - ヒドロキシ - 2 - メチルテトラヒドロ - 2 H - ピラン - 3 - イル] 4 - { [(2 S , 3 R , 4 R , 5 S , 6 S) - 3 , 5 - ジヒドロキシ - 4 - メトキシ - 6 - メチルテトラヒドロ - 2 H - ピラン - 2 - イル] オキシ } - 3 - ヨード - 5 , 6 - ジメトキシ - 2 - メチルベンゼンカルボチオエート) である、請求項33に記載のアッセイ。

20

【請求項 35】

請求項1に記載の、および実施例5、6、もしくは7のいずれかにさらに記載のアッセイ。

【請求項 36】

抗体を含む流体サンプル中の炭水化物部分を含む薬物の存在を検出するためのアッセイであって、該アッセイは、以下の工程：

30

(a) 以下；

(i) 該流体サンプルと、

(i i) 該炭水化物部分を含む薬物に特異的に結合する捕捉試薬；および

(i i i) さらに炭水化物；

とを合わせる工程；

(b) 該サンプル中の炭水化物部分を含む薬物と、該捕捉試薬との間に特異的結合が存在するか否かを検出する工程；

を包含し、

ここで該さらに炭水化物は、該捕捉試薬と該炭水化物部分を含む薬物との間に特異的結合が存在するか否かを検出する前に、該流体サンプルと予め混合されていない、アッセイ。

40

【請求項 37】

抗体を含む流体サンプル中の炭水化物部分を含む薬物の存在を検出するためのアッセイであって、該アッセイは、以下の工程：

(a) 以下；

(i) 該流体サンプルと、

(i i) 該炭水化物部分を含む薬物に特異的に結合する捕捉試薬；および

(i i i) さらに炭水化物

とを合わせる工程；ならびに

b) 該サンプル中の該炭水化物部分を含む薬物と、該捕捉試薬との間に特異的結合が存

50

在するか否かを検出する工程；

を包含し、

ここで該炭水化物部分を含む薬物は、糖タンパク質を含まない、アッセイ。

【請求項 38】

前記捕捉試薬に結合した前記薬物の存在は、同様に該薬物に特異的に結合する化合物で検出される、請求項 36 または 37 に記載のアッセイ。

【請求項 39】

前記捕捉試薬は、前記炭水化物部分を含む薬物に特異的に結合する抗体もしくはそのフラグメント、ならびに該炭水化物部分を含む薬物に特異的に結合する標的分子のうちの少なくとも 1 種である、請求項 38 に記載のアッセイ。

10

【請求項 40】

前記薬物に特異的に結合する化合物は標識されており、そして検出可能な標識をさらに含む前記捕捉試薬；および検出可能な標識をさらに含む抗体からなる群より選択され、ここで該抗体は、該炭水化物部分を含む薬物に特異的に結合する、請求項 38 または 39 に記載のアッセイ。

【請求項 41】

同様に前記薬物に特異的に結合する化合物は、1 種以上の逐次的中間化合物 (s e q u e n t i a l i n t e r m e d i a t e c o m p o u n d) の結合によって検出され、ここで該逐次的中間化合物のうちの 1 種以上は、検出可能な標識を含む、請求項 38 または 39 に記載のアッセイ。

20

【請求項 42】

前記検出可能な標識は、酵素標識；ルミネッセント標識；タンパク質標識；ビタミン標識；および放射性同位体標識からなる群より選択される少なくとも 1 種の標識を含む、請求項 40 または 41 に記載のアッセイ。

【請求項 43】

前記流体サンプルは、全血；血清；粘液、唾液；初乳および血漿のうちの少なくとも 1 種を含む、請求項 36 ~ 42 のいずれか 1 項に記載のアッセイ。

【請求項 44】

前記検出する工程は、サンドイッチアッセイ；架橋アッセイ；および競合結合アッセイからなる群より選択されるアッセイを含む、請求項 36 ~ 43 のいずれか 1 項に記載のアッセイ。

30

【請求項 45】

前記検出する工程は、前記サンプルと接触させた状態での固体光学要素表面の屈折率変化を測定する工程；ルミネッセンスの変化を検出する工程；色の変化を測定する工程；および放射能の変化を検出する工程；生体層干渉法を使用して測定する工程；カンチレバー検出を使用して測定する工程；標識なしの内因性画像化を使用して測定する工程；および音波検出を使用して測定する工程のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 44 に記載のアッセイ。

【請求項 46】

前記検出する工程は、E L I S A ； E C L ； R I A ； S P R I A ； イムノプロットティング；免疫沈降法；および免疫染色法からなる群より選択されるアッセイを含む、請求項 45 に記載のアッセイ。

40

【請求項 47】

前記検出する工程は、架橋アッセイを含む、請求項 46 に記載のアッセイ。

【請求項 48】

前記検出する工程は、E L I S A を含む、請求項 47 に記載のアッセイ。

【請求項 49】

前記さらなる炭水化物は、約 10 n g / m l ~ 約 1 m g / m l の間の濃度において、前記サンプル中に存在する、請求項 36 ~ 48 のいずれか 1 項に記載のアッセイ。

50

【請求項 50】

前記サンプルに添加される炭水化物は、細菌リポポリサッカリド (L P S)、デキストラン、レバン、肺炎球菌ポリサッカリド、アガロース、セルロース、カラギーナンもしくはメチルグリコシドである、請求項 49 に記載のアッセイ。

【請求項 51】

前記炭水化物部分を含む薬物は、該薬物に結合体化したキャリアをさらに含む、請求項 36 ~ 50 のいずれか 1 項に記載のアッセイ。

【請求項 52】

前記キャリアは、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体およびこれらの化学的もしくは遺伝的に操作された対応物；これらの抗原認識フラグメントおよびこれらの化学的もしくは遺伝的に操作された対応物；小モジュラー免疫医薬 (S M I P) およびこれらの化学的もしくは遺伝的に操作された対応物；ナノ抗体およびこれらの化学的もしくは遺伝的に操作された対応物；可溶性レセプターおよびこれらの化学的もしくは遺伝的に操作された対応物；増殖因子およびこれらの化学的もしくは遺伝的に操作された対応物；アプタマー；リポソーム；非グリコシル化タンパク質；ならびにナノ粒子からなる群より選択される、請求項 51 に記載のアッセイ。

10

【請求項 53】

前記キャリアは、前記癌細胞の表面に発現される抗原に特異的に結合する、請求項 51 または 52 に記載のアッセイ。

【請求項 54】

前記癌細胞上に発現される抗原は、5 T 4；C D 1 9；C D 2 0；C D 2 2；C D 3 3；ルイス Y；H E R - 2；免疫グロブリン G の I 型 F c レセプター (F c R 1)；C D 5 2；上皮増殖因子レセプター (E G F R)；血管内皮増殖因子 (V E G F)；D N A / ヒストン複合体；癌胎児抗原 (C E A)；C D 4 7；V E G F R 2 (血管内皮増殖因子レセプター 2 もしくはキナーゼ挿入ドメイン含有レセプター，K D R)；上皮細胞接着分子 (E p - C A M)；線維芽細胞活性化タンパク質 (F A P)；T r a i l レセプター - 1 (D R 4)；プロゲステロンレセプター；腫瘍胎児抗原 C A 1 9 . 9；ならびにフィブリンからなる群より選択される、請求項 53 に記載のアッセイ。

20

【請求項 55】

前記キャリアはモノクローナル抗体である、請求項 53 または 54 に記載のアッセイ。

30

【請求項 56】

前記モノクローナル抗体は、5 T 4；C D 1 9；C D 2 0；C D 2 2；C D 3 3；ルイス Y；H E R - 2；免疫グロブリン G の I 型 F c レセプター (F c R 1)；C D 5 2；上皮増殖因子レセプター (E G F R)；血管内皮増殖因子 (V E G F)；D N A / ヒストン複合体；癌胎児抗原 (C E A)；C D 4 7；V E G F R 2 (血管内皮増殖因子レセプター 2 もしくはキナーゼ挿入ドメイン含有レセプター，K D R)；上皮細胞接着分子 (E p - C A M)；線維芽細胞活性化タンパク質 (F A P)；T r a i l レセプター - 1 (D R 4)；プロゲステロンレセプター；腫瘍胎児抗原 C A 1 9 . 9；ならびにフィブリンからなる群より選択される抗原に特異的に結合する、請求項 55 に記載のアッセイ。

【請求項 57】

前記炭水化物部分を含む薬物は、細胞傷害性薬剤；放射線療法剤；免疫調節剤；抗血管新生剤；抗増殖剤；アポトーシス促進因子；化学療法剤；および治療的核酸からなる群より選択される、請求項 36 ~ 56 のいずれか 1 項に記載のアッセイ。

40

【請求項 58】

前記炭水化物部分を含む薬物は細胞傷害性薬剤である、請求項 57 に記載のアッセイ。

【請求項 59】

前記細胞傷害性薬剤は、チューブリンポリマー化のインヒビター；D N A に結合しかつこれを破壊するアルキル化剤；タンパク質合成のインヒビター；またはチロシンキナーゼインヒビターである、請求項 58 に記載のアッセイ。

【請求項 60】

50

前記細胞傷害性薬剤は、カリチアマイシン、チオテパ、タキサン、ピンクリスチン、ダウノルビシン、ドキシソルビシン、エピルビシン、アクチノマイシン、オースラマイシン、アザセリン、プレオマイシン、タモキシフェン、イダルビシン、ドラスタチン/オーリスタチン、ヘミアスタリン、およびマイタンシノイドから選択される、請求項59に記載のアッセイ。

【請求項61】

前記細胞傷害性薬剤はカリチアマイシンである、請求項57に記載のアッセイ。

【請求項62】

前記カリチアマイシンは、N-アセチルジメチルヒドラジドカリチアマイシンである、請求項61に記載のアッセイ。

10

【請求項63】

前記N-アセチルジメチルヒドラジドカリチアマイシンは、キャリアモノクローナル抗体に結合体化され、該キャリア-薬物結合体は、CMC-544；CME-548；CMD-193；およびゲムツズマブオゾガマイシンからなる組成の群から選択される、請求項62に記載のアッセイ。

【請求項64】

前記さらなる炭水化物がメチルグリコシドである、請求項61～63のいずれか1項に記載のアッセイ。

【請求項65】

前記捕捉試薬は、5T4；CD19；CD20；CD22；CD33；ルイスY；HER-2；免疫グロブリンGのI型Fcレセプター（FcR1）；CD52；上皮増殖因子レセプター（EGFR）；血管内皮増殖因子（VEGF）；DNA/ヒストン複合体；癌胎児抗原（CEA）；CD47；VEGFR2（血管内皮増殖因子レセプター2もしくはキナーゼ挿入ドメイン含有レセプター，KDR）；上皮細胞接着分子（EPCAM）；線維芽細胞活性化タンパク質（FAP）；Trailレセプター-1（DR4）；プロゲステロンレセプター；腫瘍胎児抗原CA19.9；ならびにフィブリンからなる群より選択される、請求項36～64のいずれか1項に記載のアッセイ。

20

【請求項66】

前記捕捉試薬は抗カリチアマイシン抗体である、請求項36～64のいずれか1項に記載のアッセイ。

30

【請求項67】

請求項36～66のいずれか1項に記載のアッセイおよび実施例7にさらに記載されるアッセイ。

【請求項68】

前記炭水化物部分を含む薬物に特異的に結合する抗体に結合する前記化合物は、1種以上の逐次的中間化合物の結合によって検出され、該逐次的中間化合物のうちの1種以上は、検出可能な標識を含む、請求項29または30に記載のアッセイ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

40

（発明の分野）

本発明は、一般に、抗薬物抗体の検出のためのアッセイ、特に、抗薬物抗体の検出に関し、ここで上記薬物は、炭水化物部分を有する。本発明はまた、一般に、薬物の検出のためのアッセイ、特に、薬物の検出に関し、ここで上記薬物は、炭水化物部分を有する。本発明はさらに、炭水化物部分を含む薬物での処置に適した被験体を同定するための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

（発明の背景）

糖タンパク質は、癌、感染、および免疫学的疾患の処置および診断のためにますます使

50

用されつつある。特に、種々の種由来のモノクローナル抗体、およびキメラ抗体もしくは「ヒト化」抗体は、臨床的用途が増えつつあることが見いだされている糖タンパク質の種である。被験体に投与されると、ときおり、患者がこれら抗体に対して免疫応答を生成する。この応答は、処置前の血清もしくは血漿の反応性と、注入された抗体での処置後の血清もしくは血漿の反応性との間の差異によって定義される。

【0003】

規制機関は、処置された患者における薬物および/もしくはタンパク質に対するヒト免疫応答のモニタリングおよび定量を求めている。しかし、いくつかの場合において、モノクローナル抗体に対するヒト血清もしくは血漿の投与後反応性は高く、そして上記糖タンパク質に対する特異的免疫応答のモニタリングおよび定量を妨害し得る。さらに、治療剤として使用される特定の抗体への曝露を受けたことがない被験体は、しばしば、治療的タンパク質との処置前血清反応性を示すことが注目されてきた。この反応性は、ヒト血清もしくは血漿中に、上記抗体と、特に、投与された糖タンパク質の炭水化物部分と反応性の「自然抗体」が存在することに原因があり得る（例えば、非特許文献1）；「Hamilton」を参照のこと）。さらに、抗炭水化物抗体が、イムノアッセイにおける妨害の原因として作用し得ることが観察されてきた（非特許文献2）。

10

【0004】

Hamiltonは、ヒト血清のイムノアッセイ分析において、炭水化物に対するこれら自然抗体によって引き起こされる妨害が、上記自然抗体と反応性の可溶性もしくは固体の炭水化物での、上記被験体血清の予備吸着によって除去され得ることを開示している。また、特許文献1は、糖タンパク質処置の後に個体から得られた体液サンプルと、酸化された炭水化物部分を有するように改変された上記糖タンパク質とを接触させることによって、上記糖タンパク質で処置されている個体における上記糖タンパク質に対する特異的免疫応答性のレベルを決定するための方法を開示している。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】米国特許第5,856,106号明細書

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Robert G. Hamilton and N. Franklin Adkinson. Naturally Occurring Carbohydrate Antibodies: Interference in Solid-Phase Immunoassays. Journal of Immunological Methods (1985) 7795-108

30

【非特許文献2】Justus Adedoyin, S. G. O. Johansson, Hans Groenlund, Marianne van Hage. Interference in immunoassays by human IgM with specificity for the carbohydrate moiety of animal proteins. Journal of Immunological Methods (2006) 310, 117-125

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

糖タンパク質での処置前血清反応性は、治療剤として投与した場合に、上記糖タンパク質に対する真の免疫応答を隠し得るかまたは増大させ得るかのいずれかであるので、この反応性の低下が、可能性のある治療的糖タンパク質の免疫反応性を評価する前に望まれる。

【課題を解決するための手段】

【0008】

50

(発明の要旨)

本開示は、炭水化物部分を有する薬物との処置前血清反応性の存在を報告し、ここで上記炭水化物部分は、糖タンパク質と直接会合しない。カリチアマイシンを特定の細胞タイプへ向ける、モノクローナル抗体に結合体化された薬物カリチアマイシンを含む薬物-キャリア結合体は、処置前もしくは未処置(native)のヒトおよびサル血清と反応することが見いだされた。上記処置前反応性は、上記薬物-キャリア結合体のカリチアマイシン(calicheamicin)部分に特異的であり、特に、上記カリチアマイシンの炭水化物部分に指向される。さらなる炭水化物を処置前血清に提供すると、上記血清と、カリチアマイシンとのバックグラウンド反応性が除去されることがさらに見いだされた。

10

【0009】

従って、一局面において、本発明は、抗体を含む流体サンプル中の炭水化物部分を含む薬物に対する抗体の存在を検出するためのアッセイを提供し、上記アッセイは、以下の工程：(i)上記サンプルと、(ii)上記炭水化物部分を含む薬物、および(iii)さらなる炭水化物とを合わせる工程；ならびに上記サンプル中の抗体と、上記炭水化物部分を含む薬物との間に特異的結合が存在するか否かを検出する工程；を包含し、ここで上記炭水化物部分を含む薬物は、糖タンパク質を含まない。

【0010】

別の局面において、本発明は、抗体を含む流体サンプル中の炭水化物部分を含む薬物の存在を検出するためのアッセイを提供し、上記アッセイは、(i)上記サンプルと、(ii)上記炭水化物部分を含む薬物に特異的に結合する捕捉試薬および(iii)さらなる炭水化物を合わせる工程；ならびに上記サンプル中の上記炭水化物部分を含む薬物と、上記捕捉試薬との間に特異的結合が存在するか否かを検出する工程；を包含し、ここで上記炭水化物部分を含む薬物は、糖タンパク質を含まない。

20

【0011】

別の局面において、本発明は、抗体を含む流体サンプル中の炭水化物部分を含む薬物に対する抗体の存在を検出するためのアッセイを提供し、上記アッセイは、a)(i)上記流体サンプルと、(ii)上記炭水化物部分を含む薬物および(iii)さらなる炭水化物とを合わせる工程；ならびにb)上記サンプル中の抗体と、上記炭水化物部分を含む薬物との間に特異的結合が存在するか否かを検出する工程を包含し；ここで上記さらなる炭水化物は、上記サンプル中の抗体と、上記炭水化物部分を含む薬物との間に特異的結合が存在するか否かを検出する前に、上記流体サンプルで予め吸着されていない。

30

【0012】

別の局面において、本発明は、抗体を含む流体サンプル中の炭水化物部分を含む薬物の存在を検出するためのアッセイを提供し、上記アッセイは、(i)上記サンプルと、(ii)上記炭水化物部分を含む薬物に特異的に結合する捕捉試薬、および(iii)さらなる炭水化物とを合わせる工程；ならびに上記サンプル中の上記炭水化物部分を含む薬物と、上記捕捉試薬との間に特異的結合が存在するか否かを検出する工程；を包含し、ここで上記さらなる炭水化物は、上記捕捉試薬と上記炭水化物部分を含む薬物との間に特異的結合が存在するか否かを検出する前に、上記流体サンプルで予め吸着されていない。

40

一実施形態において、本発明は、本明細書において記載されるアッセイのうちのいずれか1種以上を提供し、ここで上記アッセイは、上記被験体を、上記炭水化物部分を含む薬物に曝した後の被験体に由来する流体サンプルに対して行われる。

【0013】

別の実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるアッセイのうちのいずれか1種以上を提供し、ここで上記アッセイは、上記被験体を、上記炭水化物部分を含む薬物に曝す前(すなわち、未処置の被験体)の流体サンプルに対して行われる。このような実施形態において、上記アッセイは、上記炭水化物部分を含む薬物に特異的に結合する内因性の既存の抗体が、未処置の被験体に存在するか否かについての情報を提供する。

【0014】

50

いくつかの実施形態において、上記炭水化物部分を含む薬物に特異的に結合する内因性の既存の抗体が未処置被験体において存在するか否かについての情報は、上記炭水化物部分を含む薬物での処置に応答する可能性が高い被験体を同定するために使用され得る。

【0015】

上記アッセイが未処置被験体に由来する流体サンプルに対して行われるいくつかの実施形態において、上記アッセイは、上記被験体が薬物に曝される前の被験体に由来するサンプルと、上記被験体が上記薬物に曝された後の同じ被験体に由来するサンプルとの間の比較分析をさらに包含し得、ここで曝された後のサンプル中の炭水化物部分を含む薬物に対する抗体の量は、上記薬物に対する免疫応答を示す。

【0016】

上記アッセイが未処置被験体に由来する流体サンプルに対して行われるいくつかの実施形態において、上記さらなる炭水化物は、上記未処置被験体の血清中に存在する内因性処置前抗炭水化物抗体の結果である、炭水化物部分を含む薬物との任意の反応性を除去する最終濃度にまで添加される。

【0017】

別の実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるアッセイのうちのいずれか1種を提供し、ここで上記被験体に由来する流体サンプルが、全血；血清；粘液、唾液、初乳および血漿のうちの少なくとも1種を含む。

【0018】

別の実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるアッセイのうちのいずれか1種を提供し、ここで上記検出する工程が、サンドイッチアッセイ、架橋アッセイおよび競合結合アッセイのうちの1種以上を含む。

【0019】

別の実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるアッセイのうちのいずれか1種を提供し、ここで上記検出する工程は、上記サンプルと接触した状態で固体光学要素表面の屈折率の変化を検出もしくは測定する工程；ルミネッセンスの変化を検出もしくは測定する工程；色の変化を検出もしくは測定する工程；放射能の変化を検出もしくは測定する工程；生体層干渉法 (biolayer interferometry) を使用して検出もしくは測定する工程；カンチレバー検出を使用して検出もしくは測定する工程；標識なしの内因性画像化 (label-free intrinsic imaging) を使用して検出もしくは測定する工程；および音波検出を使用して検出もしくは測定する工程のうちの少なくとも1つを包含する。

【0020】

別の実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるアッセイのうちのいずれか1種を提供し、ここで上記検出する工程は、酵素結合イムノソルベントアッセイ (ELISA)；電気化学発光アッセイ (ECL)；ラジオイムノアッセイ (RIA)；固相ラジオイムノアッセイ (SPRIA)；イムノプロットイング；免疫沈降法；蛍光活性化セルソーティング (FACS)；および免疫染色法からなる群より選択されるアッセイを含む。

【0021】

別の実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるアッセイのうちのいずれか1種を提供し、ここで上記さらなる炭水化物は、細菌リポポリサッカリド (LPS)、デキストラン、レバン、肺炎球菌ポリサッカリド、アガロース、セルロース、カラギーナン、およびメチルグリコシドもしくは前述の炭水化物のうちのいずれか1種の機能的フラグメントのうちの1種以上である。

【0022】

別の実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるアッセイのうちのいずれか1種を提供し、ここで上記さらなる炭水化物は、約 10 ng/ml ~ 約 1 mg/ml の間の濃度において、上記組み合わせで存在する。別の実施形態において、上記さらなる炭水化物は、約 10 ng/ml ~ 約 0.5 mg/ml の間の濃度において、上記組み合わせで存在する。別の実施形態において、上記さらなる炭水化物は、約 100 ng/ml ~ 約 $0.$

10

20

30

40

50

5 mg / ml の間の濃度において、上記組み合わせで存在する。別の実施形態において、上記さらなる炭水化物は、約 100 ng / ml ~ 約 0.75 mg / ml の間の濃度において、上記組み合わせで存在する。別の実施形態において、上記さらなる炭水化物は、約 100 ng / ml ~ 約 0.25 mg / ml の間の濃度において、およびその間の任意の範囲（その有理数を含む）において、上記組み合わせで存在する。

【0023】

別の実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるアッセイのうちのいずれか1種を提供し、ここで上記炭水化物部分を含む薬物は、上記薬物に結合体化したキャリアをさらに含む。いくつかの実施形態において、上記キャリアは、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体およびこれらの化学的もしくは遺伝的に操作された対応物；これらの抗原認識フラグメントおよびこれらの化学的もしくは遺伝的に操作された対応物；小モジュラー免疫医薬（small modular immunopharmaceutical）（SMIP）およびこれらの化学的もしくは遺伝的に操作された対応物；ナノ抗体（nanobody）およびこれらの化学的もしくは遺伝的に操作された対応物；可溶性レセプターおよびこれらの化学的もしくは遺伝的に操作された対応物；増殖因子およびこれらの化学的もしくは遺伝的に操作された対応物；アプタマー；リポソーム；非グリコシル化タンパク質；ならびにナノ粒子からなる群より選択される。いくつかの実施形態において、上記キャリアは、癌細胞上もしくは癌細胞内で発現される抗原に特異的に結合する。いくつかの実施形態において、上記癌細胞上もしくは癌細胞内で発現される抗原は、5T4；CD19；CD20；CD22；CD33；ルイスY；HER-2；免疫グロブリンのI型Fcレセプター（FcR1）；CD52；上皮増殖因子レセプター（EGFR）；血管内皮増殖因子（VEGF）；DNA/ヒストン複合体；癌胎児抗原（CEA）；CD47；VEGFR2（血管内皮増殖因子レセプター2もしくはキナーゼ挿入ドメイン含有レセプター（kinase insert domain-containing receptor），KDR）；上皮細胞接着分子（Ep-CAM）；線維芽細胞活性化タンパク質（FAP）；Trailレセプター-1（DR4）；プロゲステロンレセプター；腫瘍胎児抗原 CA 19.9；ならびにフィブリンからなる群より選択される。

【0024】

別の実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるアッセイのうちのいずれか1種を提供し、ここで上記キャリアは、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態において、上記モノクローナル抗体は、抗CD22モノクローナル抗体；抗5T4モノクローナル抗体；抗CD33抗体；および抗ルイスYモノクローナル抗体からなる群より選択される。

【0025】

別の実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるアッセイのうちのいずれか1種を提供し、ここで上記炭水化物部分を含む薬物は、細胞傷害性薬剤；放射線療法剤；免疫調節剤；抗血管新生剤（anti-angiogenic agent）；抗増殖剤；アポトーシス促進因子（pro-apoptotic agent）；化学療法剤；治療的核酸；チューブリンポリマー化のインヒビター；DNAに結合しかつこれを破壊するアルキル化剤；タンパク質合成のインヒビター；およびチロシンキナーゼインヒビターからなる群より選択される。本明細書に記載されるアッセイは、1種より多くの炭水化物部分を含む薬物を含むかまたはこれら薬物に曝された流体サンプルで行われ得る。本明細書に記載されるアッセイは、上記炭水化物部分を含む薬物の一部分もしくは機能的フラグメントを含み得る。

【0026】

他の実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるアッセイのうちのいずれか1種を提供し、ここで上記炭水化物部分を含む薬物は、細胞傷害性薬剤であり、カリチアマイシン、チオテパ、タキサン、ピンクリスチン、ダウノルビシン、ドキシソルビシン、エビルピシン、アクチノマイシン、オースラマイシン（authramycin）、アザセリン、プレオマイシン、タモキシフェン、イダルビシン、ドラスタチン/オーリスタチン（

auristatin)、ヘミアスタリン(hemiassterlin)、およびマイタンシノイドから選択される。いくつかの好ましい実施形態において、上記細胞傷害性薬剤は、カリチアマイシンであり、いくつかの実施形態において、N-アセチルジメチルヒドラジンカリチアマイシンであり得る。

【0027】

別の実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるアッセイを提供し、ここで上記炭水化物部分を有する薬物に対する抗体もしくは上記炭水化物部分を含む薬物は、捕捉薬剤に結合することによって検出される。

【0028】

いくつかの実施形態において、上記抗薬物抗体に特異的に結合する上記捕捉薬剤は、上記炭水化物部分を有する薬物または上記炭水化物部分を含む薬物の一部分もしくは機能的フラグメントを含む。

10

【0029】

いくつかの実施形態において、上記抗薬物抗体に特異的に結合する上記捕捉薬剤は、上記炭水化物部分を含む薬物の炭水化物部分または上記炭水化物部分を含む薬物の機能的フラグメントもしくは一部分である。

【0030】

いくつかの実施形態において、上記炭水化物部分を含む薬物および上記捕捉試薬は、S-[(2R, 4S, 6S) - 6 - ({ [(2R, 4S, 5R) - 5 - ({ (2S, 4S, 5S) - 5 - [アセチル(エチル)アミノ] - 4 - メトキシテトラヒドロ - 2H - ピラン - 2 - イル } オキシ) - 4 - ヒドロキシ - 6 - メトキシ - 2 - メチルテトラヒドロ - 2H - ピラン - 3 - イル] アミノ } オキシ) - 4 - ヒドロキシ - 2 - メチルテトラヒドロ - 2H - ピラン - 3 - イル] 4 - { [(2S, 3R, 4R, 5S, 6S) - 3, 5 - ジヒドロキシ - 4 - メトキシ - 6 - メチルテトラヒドロ - 2H - ピラン - 2 - イル] オキシ } - 3 - ヨード - 5, 6 - ジメトキシ - 2 - メチルベンゼンカルボチオエートである。

20

【0031】

いくつかの実施形態において、上記炭水化物部分を有する薬物に特異的に結合する上記捕捉薬剤は、上記炭水化物部分を含む薬物に対する抗体を含む。上記炭水化物部分を含む薬物がキャリア-薬物結合体を含むいくつかの実施形態において、上記炭水化物部分を有する薬物に特異的に結合する上記捕捉薬剤は、上記キャリア-薬物結合体のキャリア部分に特異的に結合する標的を含む。

30

【0032】

炭水化物部分を含む薬物がキャリア-薬物結合体を含むいくつかの実施形態において、上記炭水化物部分を有する薬物に特異的に結合する上記捕捉薬剤は、5T4; CD19; CD20; CD22; CD33; ルイスY; HER-2; 免疫グロブリンGのI型Fcレセプター(FcR1); CD52; 上皮増殖因子レセプター(EGFR); 血管内皮増殖因子(VEGF); DNA/ヒストン複合体; 癌胎児抗原(CEA); CD47; VEGFR2(血管内皮増殖因子レセプター2もしくはキナーゼ挿入ドメイン含有レセプター, KDR); 上皮細胞接着分子(Ep-CAM); 線維芽細胞活性化タンパク質(FAP); Trailレセプター-1(DR4); プロゲステロンレセプター; 腫瘍胎児抗原CA19.9; ならびにフィブリンの少なくとも一部分を含み、ここで上記一部分は、上記キャリア-薬物結合体のキャリア部分に特異的に結合する。

40

【0033】

別の実施形態において、上記炭水化物部分を含む薬物に結合した抗体は、上記抗体に対する標識化合物の結合によって検出される。いくつかの好ましい実施形態において、上記標識化合物は、検出可能な標識をさらに含む上記捕捉試薬; または検出可能な標識をさらに含む第2の抗体もしくは抗体フラグメントを含み、ここで上記第2の抗体は、上記結合した抗体に特異的に結合する。いくつかの実施形態において、上記検出可能な標識は、酵素標識、ルミネッセント標識および放射性同位体標識のうちの少なくとも1種を含む。

【0034】

50

いくつかの実施形態において、本発明は、実施例 1 ~ 8 のいずれか 1 つ以上において本明細書に記載されるアッセイを提供する。

【0035】

いくつかの実施形態において、上記捕捉試薬に結合した炭水化物部分を含む薬物の存在は、同様に上記薬物に特異的に結合する標識化合物で検出される。いくつかの実施形態において、上記標識化合物は、検出可能な標識をさらに含む上記捕捉試薬；および検出可能な標識をさらに含む抗体からなる群より選択され、ここで上記抗体は、上記薬物に特異的に結合する。いくつかの実施形態において、上記検出可能な標識は、酵素標識；ルミネッセント標識；および放射性同位体標識からなる群より選択される少なくとも 1 種の標識を含む。

10

【0036】

いくつかの実施形態において、抗体を含む流体サンプル中で、炭水化物部分を含む薬物に対する抗体の存在または炭水化物部分を含む薬物の存在を検出するためのアッセイは、上記サンプルと接触させた状態で固体光学要素表面の屈折率の変化を測定する工程；ルミネッセンスの変化を測定する工程；色の変化を測定する工程；および放射能の変化を測定する工程のうち少なくとも 1 種を含む。

【0037】

いくつかの実施形態において、抗体を含む流体サンプル中で、炭水化物部分を含む薬物に対する抗体の存在もしくは炭水化物部分を含む薬物の存在を検出するためのアッセイは、ELISA；ECL；RIA；SPRIA；イムノプロットング；免疫沈降法；および免疫染色法からなる群より選択されるアッセイを含む。

20

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図 1】図 1 は、カリチアマイシンに対する結合特異性を有する未処理血清中の妨害因子の存在のグラフ表示である。

【図 2】図 2 は、抗体に結合体化した場合のカリチアマイシンの模式的表示を示す。

【図 3】図 3 は、解毒した LPS の種々の濃度で力価測定した血清中のカリチアマイシン特異的結合の低下のグラフ表示である。

【図 4】図 4 は、カリチアマイシンの炭水化物部分、メチルグリコシドの種々の濃度で力価測定した血清中のカリチアマイシン特異的結合の低下のグラフ表示である。

30

【図 5】図 5 は、解毒した LPS の種々の濃度で力価測定した血清中のカリチアマイシン特異的結合の低下を示すグラフ表示である。

【図 6】図 6 は、カリチアマイシン特異的血清結合 IgM からのカリチアマイシン特異的 IgM のグラフ表示を示す。

【図 7】図 7 は、カリチアマイシンに結合するカリチアマイシン特異的血清からの IgM のグラフ表示を示す。

【図 8】図 8 は、未処置ヒト血清中のカリチアマイシン特異的結合因子の存在のグラフ表示を示す。

【図 9】図 9 は、S - [(2 R , 4 S , 6 S) - 6 - ({ [(2 R , 4 S , 5 R) - 5 - ({ (2 S , 4 S , 5 S) - 5 - [アセチル (エチル) アミノ] - 4 - メトキシテトラヒドロ - 2 H - ピラン - 2 - イル } オキシ) - 4 - ヒドロキシ - 6 - メトキシ - 2 - メチルテトラヒドロ - 2 H - ピラン - 3 - イル] アミノ } オキシ) - 4 - ヒドロキシ - 2 - メチルテトラヒドロ - 2 H - ピラン - 3 - イル] 4 - { [(2 S , 3 R , 4 R , 5 S , 6 S) - 3 , 5 - ジヒドロキシ - 4 - メトキシ - 6 - メチルテトラヒドロ - 2 H - ピラン - 2 - イル] オキシ } - 3 - ヨード - 5 , 6 - ジメトキシ - 2 - メチルベンゼンカルボチオエート) の化学的構造を示す。

40

【発明を実施するための形態】

【0039】

全身薬物療法のために開発された薬物結合体は、標的的特異的細胞傷害性薬剤である。この構想は、規定された標的細胞集団に対する特異性で、治療剤をキャリア分子に連結する

50

ことを包含する。本明細書において使用される場合、このような薬物結合体はまた、「キャリア - 薬物結合体」といわれる。

【0040】

抗原に対して高い親和性を有する抗体は、標的部分としてまたは上記キャリア - 薬物結合体の「キャリア」部分として当然の選択である。高親和性モノクローナル抗体のアベイラビリティに関して、抗体標的化治療の見通しは、有望なものになってきた。モノクローナル抗体に結合体化されてきた毒性物質としては、毒素、低分子量細胞傷害性薬物、生物学的応答改変剤 (biological response modifier)、および放射性核種が挙げられる。抗体 - 毒素結合体は、しばしば免疫毒素といわれるのに対して、抗体および低分子量薬物 (例えば、メトトレキサートおよびアドリアマイシン) からなる免疫結合体は、化学免疫結合体 (chemoimmun conjugate) といわれる。免疫調節剤は、調節機能を有することが公知の生物学的応答改変剤 (例えば、リンホトキシン、増殖因子、および補体活性化コブラヘビ毒因子 (CVF)) を含む。放射性免疫結合体は、それらの放射線によって細胞を死滅させるために治療剤として使用され得るか、または画像化のために使用され得る放射能同位体からなる。腫瘍細胞への細胞傷害性薬物の抗体媒介性特異的送達は、それらの抗腫瘍効力を増すだけでなく、正常組織による非標的化取り込みを防止することも期待されるので、それらの治療指数を高める。

10

【0041】

癌および関節リウマチを含む種々の疾患を処置するための多くの抗体ベースの治療剤は、臨床用途について承認されたか、または種々の悪性疾患 (B細胞悪性疾患 (例えば、非ホジキンリンパ腫) が挙げられる) についての治験中である。1つのこのような抗体ベースの治療剤は、リツキシマブ (Rituxan, TM.)、非標識キメラヒト 1 (+ m 1 V - 領域) 抗体であり、これは、B細胞上で発現される細胞表面抗原 CD 20 に対して特異的である。これら抗体ベースの治療剤は、B細胞に対する補体媒介性細胞傷害性 (CDC) もしくは抗体依存性細胞性細胞傷害性 (ADCC) に依存するか、または放射性核種 (例えば、 ^{131}I もしくは ^{90}Y) の使用に依存するかのいずれかであり、これらは、臨床医および患者の準備および使用問題に関連している。結果的に、種々の悪性疾患 (非ホジキンリンパ腫 (NHL) のような造血性悪性疾患が挙げられる) を処置するための現在の抗体ベースの治療剤の欠点を克服することができる、容易にかつ効率的に製造され得、かつ免疫応答を誘導することなく反復して使用できる免疫結合体の生成が必要である。

20

30

【0042】

カリチアマイシンもしくは LL - E 3 3 2 8 8 複合体としてまとめて公知の抗細菌剤および抗腫瘍剤の多くの強力なファミリーを含む免疫結合体 (米国特許第 4, 970, 198 号 (1990) を参照のこと) は、骨髄腫の処置において使用するために開発された。カリチアマイシンの最も強力なものの中の1つは、 1 と称され、これは、本明細書中では単に 1 といわれる。これら化合物は、適切なチオールと反応して、官能基 (例えば、ヒドラジド) もしくはカリチアマイシン誘導体をキャリアに結合させるに有用な他の官能基を導入すると同時にジスルフィドを結合し得るメチルトリスルフィドを含む (米国特許第 5, 053, 394 号を参照のこと)。

40

【0043】

上記炭水化物部分を含む薬物もしくはキャリア薬物結合体 (上記結合体の薬物部分が、炭水化物部分を含む) の炭水化物部分に特異的に結合する未処置血清中の抗体の存在は、以下を検出するためのイムノアッセイを妨害し得る: (i) 上記キャリア薬物結合体に対する応答において生成された抗体、または (ii) 上記炭水化物を有する薬物もしくはキャリア薬物結合体。このような妨害によって、いまや糖タンパク質もしくはキャリア薬物結合体の糖タンパク質部分と会合しない炭水化物に対して特異的に結合する内因性抗体を含むことが決定された。

【0044】

例として、ある薬物が、その薬物に対して特異的な抗体を捕捉するための標的として使

50

用される場合、内因性抗炭水化物部分抗体が上記捕捉薬剤に結合すれば、擬陽性反応（または増大した量）が存在し得る。また、上記薬物の捕捉試薬が、血清中で上記薬物を検出するために標識化合物とともに使用されるアッセイにおいて、上記薬物に結合する抗炭水化物抗体に起因して、偽陰性（または量の低下）が存在し得、上記抗炭水化物抗体は、上記結合した抗体が、上記標識化合物の結合を妨害すれば、上記薬物に対する標識化合物の特異的結合を防止もしくは低下させる。

【0045】

抗体を含む流体サンプル中で抗キャリア-薬物結合体抗体と、上記キャリア-薬物結合体との間の特異的結合を検出するためのアッセイにおいて、さらなる炭水化物の存在が、被験体の、上記キャリア-薬物結合体への曝露に反応して生成された抗キャリア-薬物結合体抗体の特異的検出を可能にすることを、本明細書において報告する。上記さらなる炭水化物は、上記抗キャリア-薬物結合体抗体と、上記キャリア-薬物結合体との間の特異的結合を検出する前に、上記流体サンプルで予め吸着される必要はない。上記特異的検出は、上記アッセイに添加されるさらなる炭水化物が、上記薬物への曝露の前に存在する可能性のあるいかなる活性をも除去するので、可能である。

10

【0046】

同様に、抗体を含む流体サンプル中で、捕捉試薬と、キャリア-薬物結合体との間の特異的結合を検出するためのアッセイにおいて、さらなる炭水化物の存在は、上記キャリア-薬物結合体抗体の特異的検出を可能にする。上記さらなる炭水化物は、上記捕捉試薬と、上記キャリア-薬物結合体との間の特異的結合を検出する前に、上記流体サンプルで予め吸着される必要はない。上記特異的検出は可能である。なぜなら上記アッセイに添加されるさらなる炭水化物は、上記サンプル中に存在する既存の抗薬物抗体のいかなるマスキング活性をも除去するからである。

20

【0047】

上記さらなる炭水化物は、上記血清中の内因性抗体の、上記炭水化物部分を含む薬物への結合の効果を打ち消すために、上記血清に添加される。さらなる炭水化物の例は、バックグラウンドを低下させることが求められる場合に添加される最適量を決定するために、未処置血清で力価測定され得る。上記炭水化物部分を含む薬物の分析および検出が、上記炭水化物部分に結合しない捕捉試薬に依存する場合、さらなる炭水化物が過剰になるように添加され得る。

30

【0048】

特異的結合アッセイ技術の開発は、非常に低濃度で種々の液体もしくは固体（例えば、組織）中に発生する診断的、医学的、環境的および産業的に重要な種々の内容を決定するために極めて有用な分析法を提供してきた。特異的結合アッセイは、決定中の結合可能分析物と、結合パートナー（従って、すなわち、分析物特異的部分）との間の特異的相互作用に基づく。上記分析物特異的部分の結合、および必要であれば、任意のさらなる試薬の相互作用は、結合した標識分析物および結合していない標識分析物の機械的分離をもたらすか、または検出可能シグナルを変化させるような方法で上記標識に影響を及ぼす。前者の状況は、通常不均一（heterogeneous）といわれ、後者は、後者が分離工程を要しないという点で均一（homogeneous）といわれる。

40

【0049】

MYLOTARG（登録商標）（Sievers, E. L.ら（1999）Blood: 93, 3678-3684）（CMA-676もしくはCMAともいわれる）は、キャリアとしてのモノクローナル抗体に結合したカリチアマイシンを含む、市販の薬物である。MYLOTARG（登録商標）（ゲムツズマブ オゾガマイシン）は、年配の患者における急性骨髄性白血病の処置について現在認可されている。上記薬物は、酸加水分解可能リンカーによってカリチアマイシンに結合した、CD33に対する抗体からなる。上記半合成N-アセチルカリチアマイシンのジスルフィドアナログが結合体化のために使用された（米国特許第5,606,040号および同第5,770,710号）。

【0050】

50

従来の標識結合体特異的結合アッセイ技術において、アッセイされるべき液体媒体のサンプルは、種々の試薬組成物と合わされる。このような組成物としては、標識に組み込まれた結合成分を含む標識結合体が挙げられる。上記結合体中の結合成分は、あるとすれば、上記試薬組成物の他の構成要素およびアッセイ中の上記媒体中のリガンドと関係して、上記結合体の2つの種もしくは形態（例えば、結合種（結合体複合体）および遊離種）を生成する結合反応系を形成する。上記結合種では、上記結合体の結合成分は、対応する結合パートナーによって結合されるのに対して、上記遊離種では、上記結合成分は、そのように結合されない。上記遊離種と比較して、上記結合種を生じる上記結合体の量もしくは割合は、上記試験サンプル中で検出されるべき分析物の存在（もしくは量）の関数である。

10

【0051】

特異的結合アッセイについての代替形式は、「サンドイッチ」アッセイプロトコルである。このプロトコルにおいて、標的分析物は、直接もしくは連結基を介して、固体マトリクスへ固定される第1の特異的結合パートナーと、シグナル生成系もしくは標識系と会合される第2の特異的結合パートナーとの間で結合される。

【0052】

さらなるイムノアッセイ形式およびプロトコルはまた、当該分野で公知であり、本発明における使用に適用可能である。標識試薬の上記結合形態および遊離形態の望ましい分離を達成するために、結合アッセイ反応における結合関係物のうちの1つの直接固定化のための固定化物質もしくは固定可能な物質（例えば、固定化抗原もしくは抗体）を使用する種々の結合アッセイが、提唱されてきた。特に、検出されるべき抗原に対する抗体が、固定化物質（例えば、試験管内壁またはプラスチックビーズもしくは磁性ビーズ）に結合される多くのこのような結合アッセイが、記載されてきた。

20

【0053】

米国特許第4,243,749号は、試験管内壁に不溶化もしくは固定化された、決定中のハプテンに対する特異的抗体を有する試験管中で反応が行われる競合結合アッセイを開示している。上記反応は、上記試験管壁に結合した上記標識ハプテン結合体の量が、上記決定中のハプテンの量に逆比例する、標識ハプテン結合体を含む。

【0054】

このような結合アッセイのもう1つのものは、抗原もしくは抗体が結合した6mmポリスチレンビーズを使用する方法を開示する米国特許第4,230,683号によって記載されており、ここで上記抗原もしくは抗体は、上記抗原もしくは抗体に対するハプテン結合体化抗体と反応させられる。上記結合したハプテン結合体化抗体は、試験サンプル中の抗原もしくは抗体の量を決定するために、標識抗ハプテン抗体とさらに反応させられる。

30

【0055】

このような結合アッセイのさらにもう1つのものは、特異的結合プロセスにおいて酵素標識アビジンおよびビオチン標識試薬を使用して、液体媒体中のリガンドの検出および決定のための方法を開示する米国特許第4,228,237号によって記載されている。この方法において、上記検出されるべきリガンドは、上記リガンドの特異的結合物質を含む不溶相と接触させられる。

40

【0056】

本明細書においてこれまで記載されてきた直接固定化に加えて、第1の結合物質で固定化されるべき結合アッセイ反応関係物をマークするもしくは標識し、次いで、固定化した第2の結合物質を添加することによる間接的固定化が、提唱されてきた。

【0057】

例えば、米国特許第4,298,685号は、酵素イムノアッセイを開示している。ここで決定中の生物学的物質を含むサンプルは、ビオチンでタグ化された生物学的物質に対する抗体と、およびアッセイ中の上記物質の酵素標識形態と混合される。次いで、アビジンの固定化形態が添加され、ここで上記アビジンは、ビオチンタグ化抗体に結合して、上記酵素標識試薬の上記抗体結合画分を固定化する。同様に、英国特許出願第GB 2,0

50

84, 317A号は、固体物質に結合したアビジンおよびビオチン標識抗原を使用する抗原連結競合酵素イムノアッセイを開示している。放射性標識イムノアッセイおよび酵素タグ化イムノアッセイは、あるタイプの分離工程を要する。近年、分離工程を要せず、よって、分離が必須である不均一系とは対照的に均一系といわれる異なるアプローチが開示された。米国特許第3, 817, 837号は、上記アッセイされるべき液体と、上記検出されるべきリガンドに共有結合される標識物質としての酵素からなる可溶性複合体と、上記リガンドの可溶性レセプター（通常は、抗体）とを合わせる工程；ならびに上記複合体中の酵素の酵素活性に対する上記アッセイされるべきリガンドの効果を分析する工程を包含する競合結合アッセイ方法を開示している。

【0058】

さらになお、上記標識試薬は、他の従来を検出可能な化学物質群を含み得る。このような検出可能な化学物質群は、検出可能な物理的特性もしくは化学的特性を有する任意の物質であり得る。このような物質は、イムノアッセイの分野で十分に開発されてきており、一般に、このような方法において有用な任意の標識は、本発明に適用され得る。特に有用なものは、酵素的に活性な群（例えば、酵素（Clin. Chem. (1976) 22: 1243）を参照のこと）、酵素基質（米国特許第4, 492, 751号を参照のこと）、プロテゼ群（prosthetic group）もしくは補酵素（米国特許出願第4, 230, 797号および同第4, 238, 565号を参照のこと）、ならびに酵素インヒビター（米国特許第4, 134, 792号を参照のこと）；スピン標識；蛍光物質（Clin. Chem. (1979) 25: 353を参照のこと）；発色団；ルミネッセー（luminescer）（例えば、ケミルミネッセーおよびバイオオルミネッセー）（米国特許第4, 380, 580号を参照のこと）；特異的に結合可能なリガンド（例えば、ビオチンおよびハプテン）；電子活性（electroactive）種；ならびに放射性同位体（例えば、³H、³⁵S、³²P、¹²⁵I、および¹⁴C）である。このような標識および標識対は、それら自体の物理的特性（例えば、蛍光物質、発色団および放射性同位体）またはそれらの反応性特性もしくは結合特性（例えば、酵素、基質、補酵素およびインヒビター）に基づいて検出される。

【0059】

（定義）

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「1つの、ある（a）」、「1つの、ある（an）」および「上記、この、その（the）」は、文脈が明らかに別のものを示さない限り、複数形への言及を含む。従って、例えば、「ある（1つの）抗体」への言及は、複数のこのような組成物（すなわち、「抗体（antibodies）」）を含む。

【0060】

用語「約」とは、示された測定値もしくは濃度の20%以内、より好ましくは、10%以内、およびより好ましくは、5%以内を意味する。

【0061】

用語「さらなる炭水化物」とは、本明細書において使用される場合、血清中の内因性抗体に結合する炭水化物と競合し得る炭水化物をいう。イムノアッセイにおける細菌リポポリサッカリド（LPS）、メチルグリコシド、デキストラン、レバン、肺炎球菌ポリサッカリド、アガロース、セルロース、もしくはカラギーナンの使用は、抗体の結合、一般に、炭水化物への結合をブロックし得る。これら炭水化物のうちのいずれかの添加は、上記アッセイにおける他の成分の特異的結合が、単独もしくはキャリア-薬物結合体の一部としてのN-アセチルジメチルヒドラジドの非炭水化物領域に結合することを可能にし、従って、血清中の抗炭水化物抗体から生じる非特異的バックグラウンドシグナルを低下させる。さらに、上記適切な炭水化物の選択は、上記薬物-キャリア結合体に特異的に結合する炭水化物を要し得る。

【0062】

文脈が具体的に別のものを示さない限り、用語「抗体」とは、本明細書において使用さ

10

20

30

40

50

れる場合、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体およびこれらの化学的もしくは遺伝的に操作された対応物；これらの抗原認識フラグメントおよびこれらの化学的もしくは遺伝的に操作された対応物；ならびにこれらの抗原認識フラグメントを含む合成分子のうち1種以上を含むことを意味する。

【0063】

本明細書において使用される場合、語句「さらなる炭水化物」とはまた、炭水化物部分を含む薬物もしくはそのフラグメント、ならびに上記炭水化物部分を含む薬物の炭水化物部分を特異的に模倣する他の炭水化物もしくはそのフラグメントに結合した同じ炭水化物を包含することを意味する。炭水化物部分を含む薬物の炭水化物部分を特異的に模倣するために、上記炭水化物もしくはそのフラグメントは、上記薬物の炭水化物部分に結合する

10

【0064】

「架橋アッセイ」とは、その捕捉系が、溶液中で形成されるそのサンプル分析物を含む免疫複合体であり、その後、上記免疫複合体を固相に連結する架橋要素によって捕捉されるイムノアッセイをいう。検出可能な標識は、結合事象の検出に使用される架橋要素に結合する要素に共有結合される。

【0065】

本明細書において使用される場合、用語「捕捉試薬」とは、対応する標的に特異的に結合する任意の組成物を含むことを意味する。例えば、炭水化物部分を含む薬物である対応する標的のための捕捉試薬としては、上記炭水化物部分を含む薬物に特異的に結合する抗体および上記炭水化物部分を含む薬物の任意の特異的結合パートナーが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、炭水化物部分を含む薬物が、上記薬物に結合体化した抗体をさらに含む場合、上記抗体の抗原結合ドメインの標的はまた、炭水化物部分を含む薬物についての捕捉試薬である。さらに、上記炭水化物部分を含む薬物が、対応するレセプター結合パートナーを有するか、または対応する結合パートナーを有するレセプターの可溶性形態を含む場合、上記レセプターおよびレセプター結合パートナーは、互いについての捕捉試薬である。

20

【0066】

用語「競合アッセイ」とは、不均一サンプル中の非標識分析物が、検出可能な標識に共有結合されたある要素（主に、抗体もしくは抗原）と競合する能力によって測定されるアッセイをいう。上記非標識分析物および上記標識分子は、固相に固定化された捕捉試薬への結合について互いと競合する。上記非標識分析物は、上記標識分子が結合能力をブロックする。なぜなら、上記捕捉試薬上の結合部位が既に占有されているからである。従って、競合的イムノアッセイにおいて、アッセイ中で測定された標識が少ないほど、より多くの上記非標識分析物が存在することを意味する。不均一サンプル (heterogeneous sample) 中の抗原の量は、測定される標識の量に逆に関連する。

30

【0067】

用語「細胞毒素」もしくは「細胞傷害性薬剤」とは、一般に、細胞の機能を阻害もしくは妨げ、そして/または細胞の破壊を生じる薬剤をいう。代表的な細胞毒素としては、抗生物質、チューブリンポリマー化のインヒビター、チロシンキナーゼインヒビター、DNAに結合しかつこれを破壊するアルキル化剤、およびタンパク質合成もしくは必須細胞タンパク質（例えば、プロテインキナーゼ、ホスファターゼ、トロポイソメラーゼ、酵素、およびサイクリン）の機能を破壊する薬剤が挙げられる。代表的な細胞毒素としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ドキソルビシン、ダウノルビシン、イダルビシン、アクリルビシン、ゾルビシン、ミトキサントロン、エビルビシン、カルビシン、ノガラマイシン、メノガリル、ピラルビシン (pitavirubin)、バルルビシン (valrubicin)、シタラビン、ゲムシタピン、トリフルリジン、アンシタピン、エノシタピン、アザシチジン、ドキシフルリジン、ペントスタチン、プロクスウリジン、カペシタピン、クラドリピン、デシタピン、フロクスウリジン、フルダラビン、ゲウゲロチン、ピューロマイシン、テガフル、チアゾフリン、アドリアマイシン、シスプラチン

40

50

、カルボプラチン、シクロホスファミド、ダカルバジン、ピンブラスチン、ピンクリスチン、ミトキサントロン、プレオマイシン、メクロレタミン、プレドニゾン、プロカルバジン、メトトレキサート、フルオロウラシル、エトポシド、タキソール、タキソールアナログ、プラチン (platin) (例えば、シス-プラチンおよびカルボ-プラチン)、マイトマイシン、チオテパ、タキサン、ピンクリスチン、ダウノルビシン、エビルビシン、アクチノマイシン、オースラマイシン、アザセリン、プレオマイシン、タモキシフェン、イダルビシン、ドラスタチン/オーリスタチン、ヘミアスタリン、エスペラミシンおよびマイタンシノイド。

【0068】

本明細書において使用される場合、用語「キャリア」もしくは「キャリア分子」としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体およびこれらの化学的もしくは遺伝的に操作された対応物；これらの抗原認識フラグメントおよびこれらの化学的もしくは遺伝的に操作された対応物；小モジュラー免疫医薬 (SMIP) およびこれらの化学的もしくは遺伝的に操作された対応物；ナノ抗体およびこれらの化学的もしくは遺伝的に操作された対応物；可溶性レセプターおよびこれらの化学的もしくは遺伝的に操作された対応物；増殖因子およびこれらの化学的もしくは遺伝的に操作された対応物；アプタマー；リボソーム；非グリコシル化タンパク質；ならびにナノ粒子；アプタマー；リボソーム；非グリコシル化タンパク質；およびナノ粒子。

【0069】

「検出可能な標識」とは、検出可能シグナルの生成に直接的もしくは間接的に関与する任意の物質もしくは物質の群であり、そして本発明のイムノアッセイのうちのいずれかにおいて使用される任意の抗体もしくは抗原に共有結合され得る。従来から使用されている検出可能な標識は、例えば、酵素標識、放射能標識、蛍光標識、ケミルミネッセント標識、もしくは燐光 (phosphorescent) 標識である。好ましい標識は酵素標識であり、さらになお好ましいのは、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) であり、西洋ワサビペルオキシダーゼは、酵素基質を添加すると、比色アッセイを生じる。上記酵素基質は、HRPの場合、過酸化水素および 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン (tetramethylbenzidine) - 2HCl (TMB) の溶液である。HRPは、既に結合した捕捉分析物に特異的に結合する抗体もしくは抗原に共有結合される場合に、直接的様式で使用され得る。HRPはまた、第2の試薬として添加される場合に、間接的様式でイムノアッセイに添加され得る。例えば、抗体もしくは抗原がビオチンで標識されている場合、アビジン-HRPが、その後添加される。

【0070】

用語「炭水化物部分を含む薬物」とは、本明細書において使用される場合、生物学的活性もしくは検出可能活性 (例えば、治療剤、検出可能な標識、結合剤など) およびインビボで活性薬剤に代謝されるプロドラッグを有する任意の物質をいう。用語、炭水化物部分を含む薬物はまた、薬物誘導体を含み、ここで炭水化物部分を含む薬物は、抗体もしくは別のキャリア分子との結合体化を可能にするように官能化されている。一般に、これらタイプの結合体は、免疫結合体といわれる。さらに、上記用語は、上記薬物もしくはキャリア-薬物結合体の一部である場合に、上記炭水化物部分に特異的に結合する抗体に結合することができる、炭水化物部分を含む薬物の一部分もしくは機能的フラグメントをいうことを意味する。従って、本明細書において使用される場合、用語、炭水化物部分を含む薬物とは、キャリア-薬物結合体 (例えば、カリチアマイシンに結合したモノクローナルキャリア) ならびに上記薬物のカリチアマイシン部分もしくは上記カリチアマイシンのメチルグリコシド部分 (すなわち、S - [(2R, 4S, 6S) - 6 - ({ [(2R, 4S, 5R) - 5 - ({ (2S, 4S, 5S) - 5 - [アセチル (エチル) アミノ] - 4 - メトキシテトラヒドロ - 2H - ピラン - 2 - イル } オキシ) - 4 - ヒドロキシ - 6 - メトキシ - 2 - メチルテトラヒドロ - 2H - ピラン - 3 - イル] アミノ } オキシ) - 4 - ヒドロキシ - 2 - メチルテトラヒドロ - 2H - ピラン - 3 - イル] 4 - { [(2S, 3R, 4R, 5S, 6S) - 3, 5 - ジヒドロキシ - 4 - メトキシ - 6 - メチルテトラヒドロ - 2H -

10

20

30

40

50

ピラン - 2 - イル } オキシ } - 3 - ヨード - 5 , 6 - ジメトキシ - 2 - メチルベンゼンカルボチオエート)) の薬物部分に適用される。

【 0 0 7 1 】

抗体との結合体化を可能にするように官能かされた炭水化物部分を含む薬物はまた、本明細書において使用される場合、「キャリア - 薬物結合体」の「薬物」部分を含むことを意味する。キャリア - 薬物結合体の一部としての上記抗体の例は、CD 2 2、5 T 4、CD 3 3 およびリス - Y 抗原に対して特異的である。これら抗体は、癌細胞上で発現される抗原に特異的に結合するレセプターに対して特異的である。「糖タンパク質を含まない」炭水化物部分を含む薬物に対して言及される場合、このような言及は、上記キャリア - 薬物結合体の上記キャリア部分が糖タンパク質を含み得る状況を含むことを意味する。

10

【 0 0 7 2 】

キャリア - 薬物結合体の一部として有用な治療薬物の代表的な非限定的例としては、細胞毒素、放射性同位体、化学療法剤、免疫調節剤、抗血管新生剤、抗増殖剤、アポトーシス促進因子、および細胞増殖抑制酵素 (c y t o s t a t i c e n z y m e) および細胞溶解酵素 (c y t o l y t i c e n z y m e) (例 えば、R N A s e s) が挙げられる。薬物はまた、治療的核酸 (例 えば、免疫調節剤、抗血管新生剤、抗増殖剤、もしくはアポトーシス促進因子をコードする遺伝子) を含み得る。これら薬物の記述子は、実質的には網羅的でなく、従って、治療剤は、上記の用語のうちの一つ以上を使用して記載され得る。例 えば、選択された放射性同位体はまた、細胞毒素である。治療剤は、上記のうちのいずれかの薬学的に受容可能な塩、酸もしくは誘導体として調製され得る。一般に、上記薬物として放射性同位体を有する結合体は、放射性免疫結合体といわれ、そして上記薬物として化学療法剤を有するものは、化学免疫結合体といわれる。免疫結合体において使用するために適した薬物の例としては、上記タキサン、マイタンシン、CC - 1 0 6 5 および上記デュオカルマイシン、上記カリチアマイシンおよび他のエンジン、ならびに上記オーリスタチンが挙げられる。他の例としては、同様に免疫結合体において使用され得る葉酸代謝拮抗剤 (a n t i - f o l a t e)、ピンカアルカロイド、およびアントラサイクリンが挙げられる。植物毒素、他の生体活性タンパク質、酵素 (すなわち、A D E P T)、放射性同位体、増感物質 (すなわち、光線力学療法のため) が挙げられる。さらに、結合体は、上記細胞傷害性薬剤としての二次的キャリア (例 えば、リボソームもしくはポリマー) を使用して作製され得る。

20

30

【 0 0 7 3 】

「免疫応答」とは、体液性免疫応答 (例 えば、抗原特異的抗体の生成) および細胞媒介性免疫応答 (例 えば、リンパ球増殖) を含む、脊椎動物被験体の免疫系による、抗原もしくは抗原決定基に対する任意の応答をいうことを意味する。代表的免疫調節剤としては、サイトカイン、キサンチン、インターロイキン、インターフェロン、および増殖因子 (例 えば、T N F、C S F、G M - C S F および G - C S F)、ならびにホルモン (例 えば、エストロゲン (ジエチルスチルベストール、エストラジオール)、アンドロゲン (テストステロン、H A L O T E S T I N (登録商標) (フルオキシメステロン))、プロゲステロン (M E G A C E (登録商標) (酢酸メゲステロール)、P R O V E R A (登録商標) (酢酸メドロキシプロゲステロン))、およびコルチコステロイド (プレドニゾン、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン) が挙げられる。

40

【 0 0 7 4 】

「ルミネッセント」標識としては、燐光、ケミルミネッセンスおよび蛍光を含む標識が挙げられる。「蛍光」標識とは、タンパク質 (もしくは他の化合物) に共有結合された場合、短い波長で励起すると、蛍光物質の間で最適なエネルギー移行を示し、かつ特定の波長 (主に紫外線) で読み取られ得る蛍光物質をいう。最も一般的な蛍光標識は、フルオレセインおよびローダミンの誘導体、それぞれ、F I T C および T R I T C である。これら蛍光物質は、抗体もしくは抗原に共有結合され、そして特異的結合事象の検出のために使用される。ケミルミネッセント標識は、減少し、それによって、検出可能な光を発する励起状態分子の形成を引き起こす発色試薬によって光を発するように誘導されるものである

50

。最も一般的に使用されるケミルミネッセント標識は、以下である：アクロジニウム、ルミノールおよびジオキセタン。アクロジニウムおよびルミノールは、ペルオキシダーゼ酵素反応によって励起され、HRP標識を使用するイムノアッセイにおいて使用され得る。燐光標識は、放射に曝された物質から光が発せられ、かつ励起的照射が除去された後に白熱 (glow) として残っているものである。燐光検出可能な標識の例は、p-イソチオシアナトフェニルPt (II) - コプロポルフィリンIおよびPd (II) - コプロポルフィリンIの誘導体である。

【0075】

放射能標識とは、タンパク質に共有結合された場合に転生し、次いで、結合事象の存在が、発せられる放射線の検出によって決定される放射性核種をいう。検出可能な標識として使用される一般的な放射性核種は、以下である： ^3H 、 ^{125}I および ^{35}S 。上記標識は、上記標識のうちの各々の性質に特異的な検出系を使用して検出される。

10

【0076】

本明細書において使用される場合、用語「その一部分もしくは機能的フラグメント」とは、捕捉試薬、抗体、もしくは炭水化物部分を含む薬物を同定するために使用される場合、親分子と同じもしくは類似の様式で、標的パートナーとの特異的結合を受けうる問題の化合物の任意の一部を意味する。

【0077】

本明細書において使用される場合、用語「予め混合」もしくは「予め混合される」とは、アッセイを始める前に、アッセイの2種以上の成分を混合することをいう。例えば、「血清およびさらなる炭水化物の予備吸着 (pre-adsorption of sera and additional carbohydrate)」(もしくは「血清およびさらなる炭水化物の予備吸着 (preadsorption of the sera and additional carbohydrate)」)とは、本明細書に記載されるアッセイにおいて使用される場合、血清もしくはさらなる炭水化物のいずれかと、上記炭水化物部分を含む薬物とを混合する前に、血清およびさらなる炭水化物を予め混合することもしくは予備インキュベーションすることを意味する。

20

【0078】

用語「サンドイッチアッセイ」とは、高レベルの感受性および特異性を提供する非競合的アッセイ形式をいう。上記形式は、上記分析物(種々の抗体および抗原の不均一サンプルを含む)が、2つの非常に特異的な試薬の間で結合される(サンドイッチされる)という事実に起因して、サンドイッチといわれる。上記第1の特異的な試薬は、固相に結合された(代表的にはプレートウェルの底に結合された)、精製抗体もしくは抗原である捕捉試薬である。上記不均一分析物は、上記捕捉試薬に曝され、上記捕捉試薬に対して親和性を有する分析物の任意の構成成分が、上記捕捉試薬に特異的に結合する。第2の非常に特異的に結合する要素が添加される。上記結合要素は、共有結合された検出可能な標識を有する。次いで、上記複合体(通常、抗体-抗原)は、検出され得る。非競合的サンドイッチアッセイにおいて、上記標識結合事象の測定は、上記サンプル中に存在する抗原の量に対して直接比例する。

30

【0079】

用語「特異的結合」とは、上記分子およびその結合パートナーおよび1種以上の異なる分子を含む不均一サンプル中での優先的な結合を生じる2つの分子の間の親和性(例えば、ある分子とその結合パートナーとの間の特異的結合)をいう。例えば、IgG抗体における結合は、一般に、少なくとも約 10^{-7}M 以上(例えば、少なくとも約 10^{-8}M 以上、もしくは少なくとも約 10^{-9}M 以上、もしくは少なくとも約 10^{-10} 以上、もしくは少なくとも約 10^{-11}M 以上、もしくは少なくとも約 10^{-12}M 以上)の親和性によって特徴づけられる。IgM分子は、 10^{-4} 程度の低い親和性を有することが、いくつかの場合において公知である。

40

【0080】

代表的な抗血管新生剤としては、血管形成のインヒビター(例えば、ファルネシルトラ

50

ンスフェラーゼインヒビター、COX-2インヒビター、VEGFインヒビター、bFGFインヒビター、ステロイドスルファターゼインヒビター（例えば、2-メトキシエストラジオールビス-スルファメート（2-MeOE2bisMATE））、インターロイキン-24、トロンボスポンジン、メタロスポンジタンパク質、クラスEインターフェロン、インターロイキン12、プロタミン、アンジオスタチン、ラミニン、エンドスタチン、およびプロラクチンフラグメント）が挙げられる。

【0081】

抗増殖剤およびアポトーシス促進因子としては、PPAR- の活性化因子（例えば、シクロペンテノンプロスタグランジン（cyPG））、レチノイド、トリテルペノイド（triterpenoid）（例えば、シクロアルタン、ルパン（lupane）、ウルサン、オレアナン、フリエデラン（friedelane）、ダンマラン（dammarane）、ククルピタシン、およびリモノイドトリテルペノイド）、EGFレセプターのインヒビター（例えば、HER4）、ラパマイシン（rampamycin）、CALCIOTRIOL.RTM.（1,25-ジヒドロキシコレカルシフェロール（ビタミンD））、アロマターゼインヒビター（FEMARA.RTM.（レトロゾン（letrozone））、テロメラゼインヒビター、鉄キレート化剤（例えば、3-アミノピリジン-2-カルボキシアリデヒドチオセミカルバゾン（トリアピン））、アポプチン（ニワトリ貧血ウイルス由来のウイルスタンパク質3-Vp3）、Bcl-2およびBcl-X（L）のインヒビター、TNF-、FASリガンド、TNF関連アポトーシス誘導リガンド（TRAIL/Apo2L）、TNF- / FASリガンド/TNF関連アポトーシス誘導リガンド（TRAIL/Apo2L）シグナル伝達の活性化因子、およびPI3K-Akt生存経路シグナル伝達のインヒビター（例えば、UCN-01およびゲルダマイシン）が挙げられる。

10

20

30

40

【0082】

本発明の特定の実施形態において、炭水化物部分を有する細胞傷害性薬物は、カリチアマイシン（LL-E33288複合体、例えば、₁-カリチアマイシン₁ともいわれる）のような抗生物質である。米国特許第4,970,198号を参照のこと。カリチアマイシンヒドラジド誘導体の抗体結合体を用いた初期の研究は、インビトロで抗原ベースの細胞傷害性および異種移植片実験において活性を示した。ジメチル置換基を付加することによって全てのカリチアマイシン結合体に存在するジスルフィド結合を安定化すると、さらなる改善がなされた。本発明の抗体/薬物結合体を調製することにおいて使用するのに適したカリチアマイシンのさらなる例としては、米国特許第4,671,958号；同第5,053,394号；同第5,037,651号；同第5,079,233号；および同第5,108,912号；これらは、その全体が本明細書に参考として援用されるに開示されている。これら化合物は、適切なチオールと反応させて、ジスルフィドを形成し得ると同時に、官能基（例えば、ヒドラジド）もしくはカリチアマイシンを抗体に結合体化するために有用な他の官能基を導入し得るメチルトリスルフィドを含む。ジメチル置換基を付加することによって全てのカリチアマイシン結合体に存在するジスルフィド結合を安定化すると、さらなる改善がなされた。このことは、結合体化のために最適化した誘導体のうちの1つとしてN-アセチルカリチアマイシンジメチルヒドラジド（またはNac-DMH）の選択をもたらした。カリチアマイシンのジスルフィドアナログがまた、使用され得る（例えば、米国特許第5,606,040号および同第5,770,710号（これらは、その全体が本明細書に参考として援用される）に記載されるアナログ）。

40

50

【0083】

抗体/薬物結合体を調製するための代表的な方法は、米国特許出願公開第2004-0082764A1号および米国特許出願公開第2004-0192900号（これらは、その全体が本明細書に参考として援用される）において、CMC-544の調製のために記載されるものを含む。結合体化は、以下の条件を使用して行われ得る：10mg/ml抗体、8.5%（w/w）カリチアマイシン誘導体、37.5mMデカン酸ナトリウム、9%（v/v）エタノール、50mM HEPBS（N-（2-ヒドロキシエチル）

ピペラジン - N' - (4 - ブタンスルホン酸))、pH 8.5、32、1時間。疎水性相互作用クロマトグラフィー (H I C) は、ブチルセファロース F F 樹脂、0.65 M リン酸カリウムローディング緩衝液、0.49 M リン酸カリウム洗浄緩衝液、および 4 m M リン酸カリウム溶出緩衝液を使用して行われる。緩衝液交換は、サイズ排除クロマトグラフィー、限外濾過 / ダイアフィルトレーション、もしくは他の適切な手段によって達成され得る。

【 0 0 8 4 】

上記キャリア - 薬物結合体の一部として、N - アセチル ジメチルヒドラジドは、上記 C D 2 2 レセプター、上記 5 T 4 レセプターおよび上記リス - Y 抗原 (全て癌細胞上で発現される) に特異的に結合するモノクローナル抗体に結合体化された。これらキャリア - 薬物結合体は、上記 N - アセチル ジメチルヒドラジド分子の一部として、メチルグリコシド (すなわち、S - [(2 R , 4 S , 6 S) - 6 - ({ [(2 R , 4 S , 5 R) - 5 - ({ (2 S , 4 S , 5 S) - 5 - [アセチル (エチル) アミノ] - 4 - メトキシテトラヒドロ - 2 H - ピラン - 2 - イル } オキシ) - 4 - ヒドロキシ - 6 - メトキシ - 2 - メチルテトラヒドロ - 2 H - ピラン - 3 - イル] アミノ } オキシ) - 4 - ヒドロキシ - 2 - メチルテトラヒドロ - 2 H - ピラン - 3 - イル] 4 - { [(2 S , 3 R , 4 R , 5 S , 6 S) - 3 , 5 - ジヒドロキシ - 4 - メトキシ - 6 - メチルテトラヒドロ - 2 H - ピラン - 2 - イル] オキシ } - 3 - ヨード - 5 , 6 - ジメトキシ - 2 - メチルベンゼンカルボチオエート) 炭水化物部分を有する。この炭水化物は、他の炭水化物とともに、一般的炭水化物部分に対して指向される、血清中の内因性抗体と相互作用し得る。

10

20

【 0 0 8 5 】

本明細書中で引用される全ての特許、特許出願、および他の文献は、それら全体が本明細書に参考として援用される。

【 0 0 8 6 】

本発明は、以下の実施例によってさらに例示されかつ裏付けられる。しかし、これら実施例は、本発明の範囲をさらに限定するとは如何様にも斟酌されるべきではない。対照的に、当業者は、本発明の趣旨および / もしくは添付の特許請求の範囲から逸脱することなく、本発明の他の実施形態、改変、および等価物を容易に理解する

【 実施例 】

【 0 0 8 7 】

(実施例 1 : 未処置血清におけるシグナルの干渉)

抗カリチアマイシン結合体抗体アッセイの開発の間に、最初の研究が、未処置のヒトもしくはサル血清で行われた。E L I S A を、マイクロタイタープレートのウェルに固定化した捕捉試薬としてカリチアマイシンを使用して行い、4 % N F D M / P B S T 緩衝液 (無脂肪乾燥乳 / リン酸緩衝液生理食塩水 T w e e n ; 1 3 7 m M N a C l , 2 . 7 m M K C l , 4 . 3 m M N a 2 H P O 4 , 1 m M K H 2 P O 4 , p H 7 . 2) 中でブロックした。上記ヒトもしくはサル血清を、1 % N F D M / P B S T 中で希釈し、E L I S A ウェルに添加し、次いでインキュベートした。上記ウェルを、T H S T (5 0 m M T r i s - H C l , 0 . 5 M N a C l , 1 m M グリシンおよび 0 . 0 5 % (v / v) T w e e n 2 0 , p H 8) 中で洗浄し、抗種 - H R P 結合体とインキュベートした。上記プレートを、T M B (テトラメチルベンジジン) 試薬の添加によって、呈色反応のために発色させる前に、T H S T 中で洗浄した。

30

40

【 0 0 8 8 】

これら最初のアッセイの間のデータによって、上記反応を発色させた後に認められる高い干渉バックグラウンドシグナルが明らかになった。その後のアッセイにおいて、最大 1 : 1 6 0 の高希釈を、上記ウェルに添加した血清に対して行った。これらアッセイにおけるバックグラウンドは、上記アッセイの感度と同様に低下した。上記データは、上記アッセイウェルにおける特異的シグナルの干渉に寄与する、上記血清中の要素が存在することを示唆した。このたかいバックグラウンドは、上記ヒトの約 1 / 3 および試験した上記サル血清のうちの 1 / 3 において認められた。

50

【 0 0 8 9 】

カリチアマイシン結合体のどの部分が上記干渉血清要素と相互作用したかを決定するために架橋タイプ E L I S A を行った。カリチアマイシン結合体、C M C - 5 4 4、C M D - 1 9 3 および C M E - 5 4 8 ならびにこれらの親である非結合体化抗体、抗 C D 2 2 ヒト化モノクローナル抗体 G 5 4 4、抗ルイス - Y ヒト化モノクローナル抗体 G 1 9 3 および抗 5 T 4 ヒト化モノクローナル抗体 h u H 8 をそれぞれ、1 0 0 n g / m l の濃度でプレートに固定化し、4 % N F D M / P B S T でブロックした。

【 0 0 9 0 】

C M D - 5 4 4 は、米国特許出願第 U S 2 0 0 4 0 8 2 7 6 4 号に記載されるカリチアマイシン - モノクローナル抗体薬物結合体である。このキャリア薬物結合体のモノクローナル抗体部分は、ヒト C D 2 2 抗原に対する標的特異性を有し、その親抗体は、「G - 5 4 4」と本明細書で称される。

10

【 0 0 9 1 】

C M D - 1 9 3 は、米国特許出願公開第 U S 2 0 0 6 0 0 0 2 9 4 2 号に記載されるカリチアマイシン - モノクローナル抗体薬物結合体である。このキャリア薬物結合体のモノクローナル抗体部分は、h a s ルイス Y 抗原に対する標的特異性を有し、その親抗体は、「G - 1 9 3」と称される。

【 0 0 9 2 】

C M E - 5 4 8 は、米国特許出願公開第 U S 2 0 0 6 0 0 8 5 2 2 号に記載されるカリチアマイシン - モノクローナル抗体薬物結合体である。このキャリア薬物結合体のモノクローナル抗体部分は、ヒト 5 T 4 レセプター抗原に対する標的特異性を有し、その親抗体は、「h u H 8」と称される。

20

【 0 0 9 3 】

プールされたカニクイザル血清を、1 % N F D M / P B S T 中で 1 : 2 0 希釈し、ウェル中でインキュベートした。他のウェルを、コントロールとして、血清なしの緩衝液中でインキュベートした。T H S T 中で洗浄した後、上記アッセイプレートを、P B S T 中で 1 : 2 0 0 0 希釈したカリチアマイシン - H R P 結合体とインキュベートした。上記ウェルは、T M B 試薬で発色させる前に、T H S T 中で洗浄した。

【 0 0 9 4 】

図 1 に示されるように、高いバックグラウンドが、上記カリチアマイシン結合体を含むが、その親抗体を含まないウェル中でのみ認められた。このことは、上記血清要素が、上記結合体にのみ特異的に結合したが、それらの親抗体には結合せず、カリチアマイシン - H R P にそれらを「架橋した」ことを示している。このデータによって、上記血清中の上記干渉要素が、上記カリチアマイシン部分に結合するが、その親結合体化抗体に結合しないことが示唆された。さらに、上記血清要素が、2 つの異なるカリチアマイシン部分（上記カリチアマイシン結合体化抗体および上記カリチアマイシン - H R P ）を架橋する能力は、多価分子（すなわち、干渉血清要素としての免疫グロブリン）を示唆した。

30

【 0 0 9 5 】

（実施例 2 : さらなる炭水化物を使用することによる妨害の低下）

上記血清中の干渉要素と、上記カリチアマイシンとの間の相互作用の性質を決定するために、架橋タイプ E L I S A を行った。カリチアマイシンは、上記分子の一部として、いくつかの血清サンプル中で既存の抗炭水化物抗体によって結合され得る炭水化物部分を有する。C M C - 5 4 4 を、アッセイウェル中で固定化した捕捉試薬として使用し、次いで、4 % N F D M / P B S T 緩衝液中でブロックした。前に記載されたアッセイ（未処置）において使用される血清を、1 % N F D M / P B S T 中で希釈し、上記ウェルに添加した。カリチアマイシン炭水化物とのいかなる相互作用をも完了させようとする試みにおいて、解毒したリポポリサッカリド（L P S ）を、1 n g / m l ~ 1 0 0 n g / m l の範囲に及ぶ濃度において、上記血清へと滴定した。コントロールウェルには、L P S を含めなかった。次いで、上記アッセイを、振盪しながら 1 時間にわたってインキュベートした（本明細書中の全ての実施例について別段記載されていなければ、標準）。上記ウェルを

40

50

、 T H S T 中で洗浄し、次いで、 P B S T 中で 1 : 2 0 0 0 の希釈度において、カリチアマイシン - H R P 結合体とインキュベートした。次いで、上記アッセイを、 T M B 試薬の添加によって、呈色反応のために発色させた。図 3 に示されるように、 C M C - 5 4 4 ウェルに添加された L P S の漸増量は、バックグラウンドシグナルの低下を引き起こした。 L P S なしの C M C - 5 4 4 を含むコントロールウェルにおいて、高いバックグラウンドが、全てのサンプル中で認められた。

【 0 0 9 6 】

類似の試験を、二次的な E L I S A で行った（ここでは上記 C M C - 5 4 4 モノクローナル抗体）。抗体を、上記アッセイウェル中に固定化し、次いで、 4 % N F D M / P B S T 緩衝液中でブロックした。前に記載されたアッセイ（未処置）において使用した血清を、 1 % N F D M / P B S T 中で希釈し、上記ウェルに添加した。 L P S の解毒部分もしくは L P S のいずれかの干渉量を、上記反応系に添加した。プレート上で上記 C M C - 5 4 4 に結合した C M C - 5 4 4 （ビオチン）を、上記血清中の抗体を介して架橋した。上記 C M C - 5 4 4 ビオチンを、 H R P 検出因子に結合したストレプトアビジンで検出した。 L P S および解毒した L P S の漸増量は、特異的結合を妨害した。結果を、図 5 に示す。

10

【 0 0 9 7 】

これらデータは、上記血清中の干渉要素が、カリチアマイシン上の炭水化物部分と相互作用するが、上記結合体の抗体分とは相互作用しないことを示唆した。上記 L P S の添加は、上記 L P S ありの上記血清の予備吸着を必要とせずに、上記干渉血清要素について上記カリチアマイシン上の炭水化物と競合することができた。

20

【 0 0 9 8 】

さらなる研究を行って、上記血清要素の上記カリチアマイシン炭水化物部分に対する特異性を示した。外因的に添加したメチルグリコシド S - [(2 R , 4 S , 6 S) - 6 - ({ [(2 R , 4 S , 5 R) - 5 - ({ (2 S , 4 S , 5 S) - 5 - [アセチル (エチル) アミノ] - 4 - メトキシテトラヒドロ - 2 H - ピラン - 2 - イル } オキシ) - 4 - ヒドロキシ - 6 - メトキシ - 2 - メチルテトラヒドロ - 2 H - ピラン - 3 - イル] アミノ } オキシ) - 4 - ヒドロキシ - 2 - メチルテトラヒドロ - 2 H - ピラン - 3 - イル] 4 - { [(2 S , 3 R , 4 R , 5 S , 6 S) - 3 , 5 - ジヒドロキシ - 4 - メトキシ - 6 - メチルテトラヒドロ - 2 H - ピラン - 2 - イル] オキシ } - 3 - ヨード - 5 , 6 - ジメトキシ - 2 - メチルベンゼンカルボチオエート) を、上記カリチアマイシン上のメチルグリコシド部分との任意の相互作用と特異的に競合し、従って、上記血清要素との相互作用を阻害する能力について試験した。 L P S の添加について上記に記載される同じアッセイを、 C M D - 1 9 3 、 C M E - 5 4 8 および C M C - 5 4 4 を含む別個のウェルにおいて行った。それらの結合体化していない親抗体を、コントロールとして使用した。上記のメチルグリコシドを、 2 ~ 2 0 0 0 n g / m l の範囲に及ぶ種々の最終濃度で、上記 L P S の代わりにこのアッセイ中で使用した。図 4 に示されるように、上記に示したメチルグリコシドは、 3 0 ~ 7 0 n M の範囲の I C 5 0 を有する、試験した上記血清中の干渉要素の強力なインヒビターであることが分かった。これらデータは、血清中の上記干渉要素が、カリチアマイシンに存在する炭水化物メチルグリコシド S - [(2 R , 4 S , 6 S) - 6 - ({ [(2 R , 4 S , 5 R) - 5 - ({ (2 S , 4 S , 5 S) - 5 - [アセチル (エチル) アミノ] - 4 - メトキシテトラヒドロ - 2 H - ピラン - 2 - イル } オキシ) - 4 - ヒドロキシ - 6 - メトキシ - 2 - メチルテトラヒドロ - 2 H - ピラン - 3 - イル] アミノ } オキシ) - 4 - ヒドロキシ - 2 - メチルテトラヒドロ - 2 H - ピラン - 3 - イル] 4 - { [(2 S , 3 R , 4 R , 5 S , 6 S) - 3 , 5 - ジヒドロキシ - 4 - メトキシ - 6 - メチルテトラヒドロ - 2 H - ピラン - 2 - イル] オキシ } - 3 - ヨード - 5 , 6 - ジメトキシ - 2 - メチルベンゼンカルボチオエート) に特異的に結合することを示唆する。

30

40

【 0 0 9 9 】

（実施例 3 : 血清 I g G は、妨害因子ではない）

以前に言及されたように、上記因子の架橋能力は、免疫グロブリンを示した。 I g G お

50

よび I g M の両方を、可能性として最初に試験した。I g G については、プロテイン A 樹脂を、上記干渉因子を含むことが公知のサル血清から I g G 画分を精製するために使用した。SDS-PAGE は、I g G の首尾良い単離を示した（示さず；L38054-17）。上記血清の I g G 富化画分および I g G 除去画分の両方を、濃度を調節して、バッチ結合クロマトグラフィープロセスの間に、サンプルの必然的な希釈を説明した後に、架橋能力について試験した。

【0100】

上記結果は、上記精製 I g G 画分は、緩衝液のみのバックグラウンドに対して何ら架橋の雨緑を示さず、上記 I g G 除去画分は、未処理血清と同じレベルの LPS 感受性架橋活性を示すことを実証した。従って、I g G は、活性を担わないようである。

10

【0101】

（実施例 4：I g M として血清因子を同定する）

前に記載したアッセイにおいて認められる干渉を担い得るカリチアマイシンの炭水化物部分に結合する血清中の干渉分子の性質を決定するために、架橋タイプ ELISA を行った。アッセイウェルを、以下の捕捉試薬でコーティングした：CMC-544、その結合体化していない親抗体 G544、もしくは陽性コントロールとしてサル I g M。陰性コントロールとして、ミルクを使用した。次いで、上記ウェルを、4% NFD M / P B S T 緩衝液中でブロックした。血清を、1% NFD M / P B S T 中で希釈して、上記ウェルに添加した。LPS を、250 μg / ml の濃度で上記血清に添加し、インキュベートした。上記ウェルを T H S T 中で洗浄し、抗 I g M - H R P とインキュベートして、上記プレートに結合した任意の I g M を検出した。上記アッセイを、TMB 試薬を添加することによって、呈色反応のために発色させた。図 6 に示されるように、CMC-544 は、血清由来の多量の I g M を捕捉し、顕著に低いシグナルが、リポポリサッカライドの存在下で得られた。ごくわずかな I g M しか、結合体化していない親抗体 G544 に結合しなかった。

20

【0102】

さらなるアッセイにおいて、ウェルを、抗サル I g M でコーティングした。陰性コントロールとして、抗マウス I g G を使用した。0.001 ~ 10% の範囲に及ぶ、P B S T で作製した血清の希釈物を作製し、上記ウェルに添加した。インキュベーション後に、カリチアマイシン - H R P を添加した。上記プレートを洗浄し、TMB 試薬中で発色させた。図 7 に示されるように、上記血清 I g M を、用量依存性様式で、カリチアマイシン - H R P を結合した上記プレート上で捕捉した。抗マウス I g G を含む上記ウェルは、捕捉しなかった。

30

【0103】

これらデータは、いくつかの血清中に存在する I g M は、上記カリチアマイシン分子の炭水化物部分に特異的に結合する能力を有することを実証する。このような結合は、カリチアマイシン結合体に対する抗体を検出するかまたはカリチアマイシン自体を検出するために使用されるアッセイにおいて高いバックグラウンドシグナルを生じ得る。上記アッセイに外因的に添加される炭水化物の添加は、上記血清中の干渉 I g M の存在によって精製されるシグナルの排除を補助する。

40

【0104】

（実施例 5：抗炭水化物 I g M を含む未処置血清）

未処置ヒト血清のランダムパネルにおける抗炭水化物抗体の流行を決定するために、架橋タイプ ELISA を行った。CMC-544 を捕捉試薬として使用し、上記アッセイウェル中に固定化した。上記ウェルを、4% NFD M / P B S T 緩衝液中でブロックした。上記未処置血清サンプルを、1% NFD M / P B S T 中で希釈し、上記ウェルに添加し、次いでインキュベートした。上記ウェルを T H S T 中で洗浄し、次いで、カリチアマイシン - H R P とインキュベートした。次いで、上記アッセイを、TMB 試薬を添加することによって、呈色反応のために発色させた。このアッセイには、試験した血清サンプルのどの程度の割合が、上記カリチアマイシン上の炭水化物部分に結合し得る干渉 I g M を

50

含んでいたかを決定しようとして、炭水化物を添加しなかった。図 8 に示されるように、上記試験した血清サンプルのうちの約 30% が、干渉を示した。類似の観察が、未処置サル血清で注目された。ここで 20 匹のサルの中の 2 匹で、高レベルの抗炭水化物抗体が示され、20 匹の中の 8 匹で、抗炭水化物抗体の顕著なレベルが示された。

【0105】

(実施例 6 : 血清中での抗カリチアマイシン結合体抗体の検出)

カリチアマイシン結合体モノクローナル抗体への曝露に反応して特異的に生成された血清中の抗体(例えば、CMC-544)の存在を検出するために、カリチアマイシンに存在するメチルグリコシド S-[(2R, 4S, 6S) - 6 - ({ [(2R, 4S, 5R) - 5 - ({ (2S, 4S, 5S) - 5 - [アセチル(エチル)アミノ] - 4 - メトキシテトラヒドロ - 2H - ピラン - 2 - イル } オキシ) - 4 - ヒドロキシ - 6 - メトキシ - 2 - メチルテトラヒドロ - 2H - ピラン - 3 - イル] アミノ } オキシ) - 4 - ヒドロキシ - 2 - メチルテトラヒドロ - 2H - ピラン - 3 - イル] 4 - { [(2S, 3R, 4R, 5S, 6S) - 3, 5 - ジヒドロキシ - 4 - メトキシ - 6 - メチルテトラヒドロ - 2H - ピラン - 2 - イル] オキシ } - 3 - ヨード - 5, 6 - ジメトキシ - 2 - メチルベンゼンカルボチオエート)の最適濃度を決定した後に、架橋タイプの ELISA を行う。

10

【0106】

未処置血清を、上記のように力価測定して、上記薬物への曝露後に、抗薬物抗体の生成について試験される被験体に由来する未処置血清からの内因性抗炭水化物バックグラウンドノイズを除去する炭水化物の最小(よって、最適)濃度を決定する。

20

【0107】

実験被験体に、CMC-544を注射するかまたは他の方法で曝露し、血清を回収する。CMC-544、およびその結合体化していない親抗体 G544 を、捕捉試薬として使用し、100 ng/ml の濃度で別個のウェルに固定化した。上記ウェルを、4% NFD M / P B S T 緩衝液中でブロックした。血清を、上記曝された被験体から回収し、1% NFD M / P B S T と混合し、上記ウェルに添加し、次いで、インキュベートした。上記ウェルを T H S T 中で洗浄し、カリチアマイシン - H R P 結合体およびその最適濃度のカリチアマイシンに存在するさらなる炭水化物メチルグリコシド (S - [(2 R , 4 S , 6 S) - 6 - ({ [(2 R , 4 S , 5 R) - 5 - ({ (2 S , 4 S , 5 S) - 5 - [アセチル (エチル) アミノ] - 4 - メトキシテトラヒドロ - 2 H - ピラン - 2 - イル } オキシ) - 4 - ヒドロキシ - 6 - メトキシ - 2 - メチルテトラヒドロ - 2 H - ピラン - 3 - イル] アミノ } オキシ) - 4 - ヒドロキシ - 2 - メチルテトラヒドロ - 2 H - ピラン - 3 - イル] 4 - { [(2 S , 3 R , 4 R , 5 S , 6 S) - 3 , 5 - ジヒドロキシ - 4 - メトキシ - 6 - メチルテトラヒドロ - 2 H - ピラン - 2 - イル] オキシ } - 3 - ヨード - 5 , 6 - ジメトキシ - 2 - メチルベンゼンカルボチオエート)) インキュベートする。あるいは、上記さらなる炭水化物は、捕捉試薬およびコントロールウェルとの最初のインキュベーションにおいて、上記血清を有するウェルに直接添加され得る。洗浄後、次いでプレートに T M B 試薬を添加することによって、呈色反応のために発色させた。発色後の呈色反応に存在は、内因性抗炭水化物抗体の結果ではないが、代わりに、上記キャリア - 薬物結合体の対する反応において免疫反応の生成の結果である血清中のカリチアマイシン結合体に対する抗体の存在を示す。

30

40

【0108】

上記抗体反応が、上記カリチアマイシンの炭水化物部分に対して生成されたか否かを決定するために、曝された被験体に由来する血清を、カリチアマイシン特異的メチルグリコシドで力価測定して、上記抗体反応性が、バックグラウンドレベルに戻るか否かを決定する。上記抗体反応が力価測定され、バックグラウンドレベルに戻っている場合、キャリア - 薬物結合体に反応して生成された上記抗体反応は、上記カリチアマイシンの炭水化物部分に起因している。

【0109】

(実施例 7 : 薬物が炭水化物部分を有するキャリア薬物結合体へ抗体の存在についての

50

未処置血清の試験)

カリチアマイシン結合体での処置のために候補被験体に由来する血清中の既存の干渉IgMの存在を決定するために、架橋タイプELISAを行う。カリチアマイシンを捕捉試薬として使用し、上記アッセイウェルに固定化する。上記ウェルを、4% NFDMPBST緩衝液中でブロックする。上記薬物未処置被験体から回収した血清を、1% NFDMPBST中で希釈し、上記アッセイに添加し、インキュベートする。メチルグリコシドの最適濃度を、上記のように決定する。炭水化物の力価測定はまた、各血清サンプルについての炭水化物なしコントロール試験を含み得る。上記ウェルをTHST中で洗浄し、カリチアマイシン-HRP結合体、およびさらなるメチルグリコシド(カリチアマイシンに存在するS-[(2R, 4S, 6S) - 6 - ({ [(2R, 4S, 5R) - 5 - ({ (2S, 4S, 5S) - 5 - [アセチル(エチル)アミノ] - 4 - メトキシテトラヒドロ - 2H - ピラン - 2 - イル } オキシ) - 4 - ヒドロキシ - 6 - メトキシ - 2 - メチルテトラヒドロ - 2H - ピラン - 3 - イル] アミノ } オキシ) - 4 - ヒドロキシ - 2 - メチルテトラヒドロ - 2H - ピラン - 3 - イル] 4 - { [(2S, 3R, 4R, 5S, 6S) - 3, 5 - ジヒドロキシ - 4 - メトキシ - 6 - メチルテトラヒドロ - 2H - ピラン - 2 - イル] オキシ } - 3 - ヨード - 5, 6 - ジメトキシ - 2 - メチルベンゼンカルボチオエート)の最適濃度とインキュベートする。洗浄後、プレートを、TMB試薬を添加することによって、呈色反応のために発色させる。呈色反応は、上記ウェルに結合したカリチアマイシンにIgが結合したこと、およびその後添加された上記カリチアマイシンHRPに結合したことを示す。

10

20

【0110】

あるいは、未処置血清の最初のスクリーンは、さらなる炭水化物を添加しない。次いで、血清を、炭水化物が上記血清反応性の標的であることを確認するために、炭水化物の力価測定に供する。

【0111】

(実施例8:薬物としてカリチアマイシンを用いたキャリア-薬物結合体についての試験)

この薬物を投与した被験体から由来するカリチアマイシン結合体(例えば、CMC-544)を検出するために、ELISAを行う。被験体に、CMC-544を注射するかまたは別の方法で曝し、血清を回収する。親抗体G544によって特異的に結合する抗原であるCD22を、上記アッセイウェルに固定化し、捕捉試薬として使用する。次いで、上記ウェルを、4% NFDMPBST緩衝液中でブロックする。血清を、1% NFDMPBST中で希釈し、上記ウェルに添加し、次いでインキュベートする。上記さらなる炭水化物は、CD22-特異的結合によるCMC-544の捕捉を妨害しないはずであるので、大過剰の炭水化物をここに添加して、CMC-544に結合し得る、血清中に存在する抗体をブロックする(上記プレートをTHST中で洗浄し、抗カリチアマイシン-HRP結合体とインキュベートし、次いで、上記プレートを、TMB試薬の添加によって、呈色反応のために発色させる。呈色反応は、上記血清中の上記カリチアマイシン結合体の存在を示す。

30

【 図 1 】

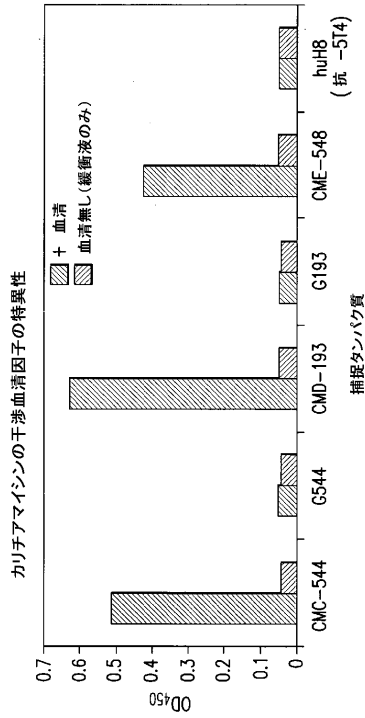
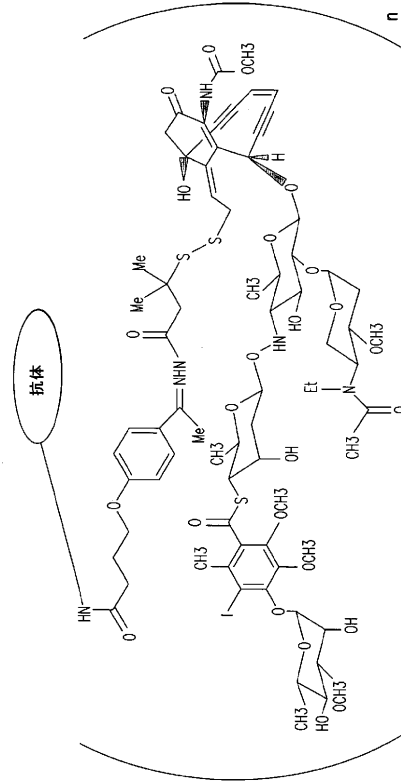


FIG.1

【 図 2 】



カリチアマインシンの構造

FIG.2

【 図 3 】

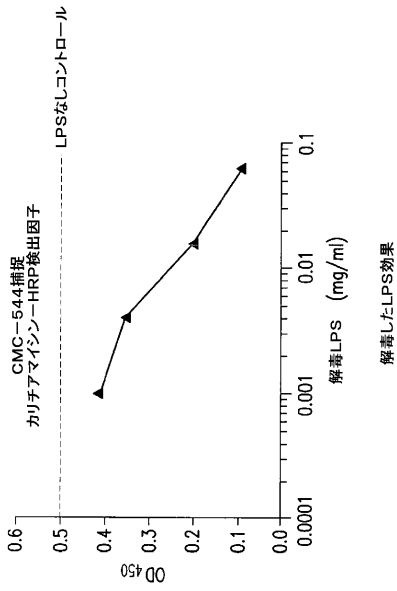
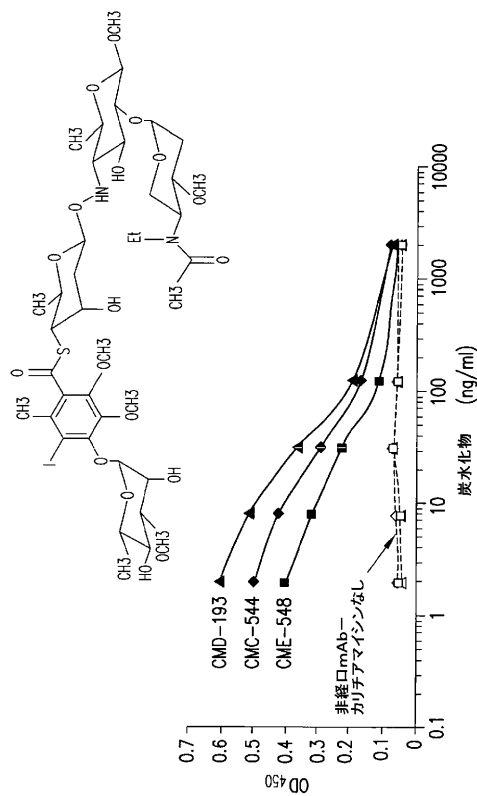


FIG.3

【 図 4 】



カリチアマインシンの炭水化物部分は、血清相互作用を阻害する

FIG.4

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/062739

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/50 G01N33/53		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HAMILTON R G AND ADKINSON N F: "Naturally occurring carbohydrate antibodies: Interference in solid-phase immunoassays" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 77, 1985, pages 95-108, XP002491456 cited in the application the whole document	1-68
X	WO 97/16727 A (BIOTRANSPLANT) 9 May 1997 (1997-05-09) cited in the application claims 1-13	1-68
A	US 5 705 353 A (BECKMAN INSTRUMENTS) 6 June 1998 (1998-06-06) claims 1-28	1-68
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the International filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the International search		Date of mailing of the International search report
7 August 2008		27/08/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Moreno de Vega, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2008/062739

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9716727	A 09-05-1997	AU 7464596 A US 5856106 A	22-05-1997 05-01-1999
US 5705353	A 06-01-1998	NONE	

フロントページの続き

(51) Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

A 6 1 P 37/00

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 アワード, マイケル

アメリカ合衆国 ニューハンプシャー 03051, ハドソン, ロビン ドライブ 38

Fターム(参考) 4C084 AA17 ZB07 ZB08 ZB09 ZB26

专利名称(译)	去除由抗碳水化合物抗体引起的免疫测定中的干扰		
公开(公告)号	JP2010527005A	公开(公告)日	2010-08-05
申请号	JP2010507595	申请日	2008-05-06
[标]申请(专利权)人(译)	惠氏公司		
申请(专利权)人(译)	魏斯, LLC		
[标]发明人	ウエンセルデイビッドリロイ アワードマイケル		
发明人	ウエンセル, デイビッド リロイ アワード, マイケル		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/574 A61K45/00 A61P35/00 A61P37/00		
CPC分类号	A61P35/00 A61P37/00 G01N33/5306		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/53.V G01N33/574.A A61K45/00 A61P35/00 A61P37/00		
F-TERM分类号	4C084/AA17 4C084/ZB07 4C084/ZB08 4C084/ZB09 4C084/ZB26		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/928144 2007-05-07 US 60/928438 2007-05-08 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明总体上涉及用于检测抗药物抗体的测定法，并且尤其涉及其中药物具有碳水化合物部分的抗药物抗体的检测。本发明还涉及通常用于检测药物的测定法，尤其涉及其中药物具有碳水化合物部分的药物的检测。本发明进一步涉及鉴定用于含有碳水化合物部分的药物治疗的合适受试者的方法。

