

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4435305号
(P4435305)

(45) 発行日 平成22年3月17日 (2010.3.17)

(24) 登録日 平成22年1月8日 (2010.1.8)

(51) Int. Cl.		F I
C O 7 H 9/04	(2006.01)	C O 7 H 9/04
C O 7 H 15/26	(2006.01)	C O 7 H 15/26
C O 7 K 16/44	(2006.01)	C O 7 K 16/44
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08
G O 1 N 33/53	(2006.01)	G O 1 N 33/53

G
請求項の数 12 (全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平9-520642
(86) (22) 出願日	平成8年11月27日 (1996.11.27)
(65) 公表番号	特表2000-502888 (P2000-502888A)
(43) 公表日	平成12年3月14日 (2000.3.14)
(86) 国際出願番号	PCT/US1996/018971
(87) 国際公開番号	W01997/019950
(87) 国際公開日	平成9年6月5日 (1997.6.5)
審査請求日	平成15年9月25日 (2003.9.25)
審査番号	不服2009-7376 (P2009-7376/J1)
審査請求日	平成21年4月6日 (2009.4.6)
(31) 優先権主張番号	08/565,143
(32) 優先日	平成7年12月1日 (1995.12.1)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	オーパス ダイアグノスティックス インコーポレイテッド アメリカ合衆国 ニュージャージー州 O7024 フォートリー ワン パーカープラザ (番地なし)
(74) 代理人	弁理士 中村 稔
(74) 代理人	弁理士 大塚 文昭
(74) 代理人	弁理士 熊倉 禎男
(74) 代理人	弁理士 宍戸 嘉一

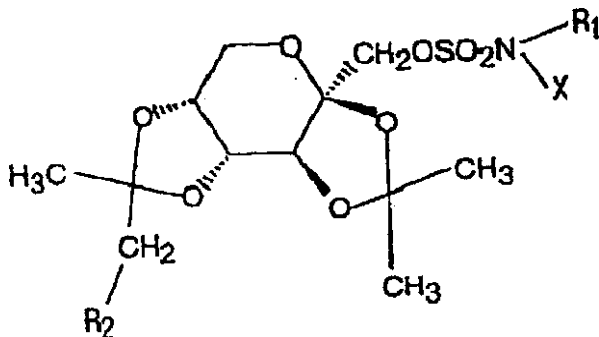
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トピラメートのイムノアッセイ、並びに類似体及び抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記式を有するトピラメート類似体。



(式中、R₁及びR₂の一方はHであり、もう一方はR-Yであり、Rは連結基であり、Yは免疫原性キャリア又はアミノ基を有する標識であり、XはH又はアルキル基である。)

【請求項 2】

該キャリアがウシ血清アルブミン及びキーホールリンペットヘモシアニンからなる群より選ばれる、請求項 1 記載のトピラメート類似体。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 記載のトピラメート類似体を免疫原として使用して誘導された抗トピラメ

ート抗体。

【請求項 4】

該抗体がポリクローナル抗体である、請求項 3 記載の抗トピラメート抗体。

【請求項 5】

該抗体がモノクローナル抗体である請求項 3 記載の抗トピラメート抗体。

【請求項 6】

該抗体が、トピラメートのスルファメート部分で誘導されたトピラメート類似体と反応する、請求項 3 記載の抗トピラメート抗体。

【請求項 7】

下記の成分を含むトピラメートを分析する免疫分析キット。

- a . 請求項 3 記載の抗トピラメート抗体 ; 及び
- b . 請求項 1 又は 2 記載のトピラメート類似体。

【請求項 8】

R_2 が R - Y である、請求項 7 記載の免疫分析キット。

【請求項 9】

R - Y が $(CH_2)_nCO - NH - (標識)$ (ここで、 $n = 1 \sim 9$) である、請求項 7 記載の免疫分析キット。

【請求項 10】

該標識が蛍光色素である、請求項 7 記載の免疫分析キット。

【請求項 11】

試料中のトピラメートを分析する方法であって、

- a) 該試料と、請求項 1 又は 2 記載のトピラメート類似体と請求項 3 記載の抗トピラメート抗体とを混合する工程 ;
- b) 該試料中のトピラメート量を示すものとして該トピラメート類似体に結合した抗体量を求める工程を含む、前記方法。

【請求項 12】

該トピラメート類似体が蛍光色素で標識される、請求項 11 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

発明の背景

発明の分野

本発明は、トピラメートのイムノアッセイ、免疫原とトレーサーとして有用なトピラメート類似体、及びイムノアッセイにおいて有用な抗トピラメート抗体に関するものである。

関連技術の説明

トピラメート (2 , 3 : 4 , 5 - ビス - O - (1 - メチルエチリデン) - - D - フルクトピラノーススルファメート) は、けいれん性の病気の臨床治療において有用であることが示されてきた、最近開発された抗癲癇薬である。治療薬剤の血液レベルを追跡することは、治療を続け、患者の安全を保証するための通常のプラクティスである。組織又は体液中の薬剤の定量は、薬物動態学的研究及び患者のコンプライアンスを追跡することにおいても重要である。従って、患者の試料、特に血漿及び血清中のトピラメートの濃度を定量するための分析法が必要である。

現在、トピラメートの測定に利用できる 2 つの分析法がある。両方ともガスクロマトグラフィーを利用する。1 つは、炎イオン化検出と連結されるガスクロマトグラフィーを使用し、2 つ目は、質量分光法と連結されるガスクロマトグラフィーを使用する。これらの方法は、時間を消費し、特殊な装置、高度に熟練した分析者、及び広範囲にわたる試料の調製を必要とし、かつ高価である。また、これらの方法は、小児科の検査においては、トピラメートの濃度が異常に高くない限り利用できないほど多量の試料を必要とする。要するに、トピラメートのための現存の方法は、典型的な臨床化学研究所又は病院の研究所での通常の利用には適していない。

イムノアッセイは、20 年以上の間、臨床研究所又は病院で、治療薬剤の血清又は血漿レベルを追跡するために使用されてきた。イムノアッセイのいくつかの利点は、このような

10

20

30

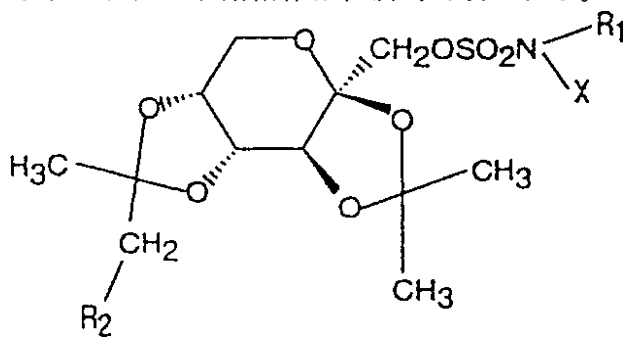
40

50

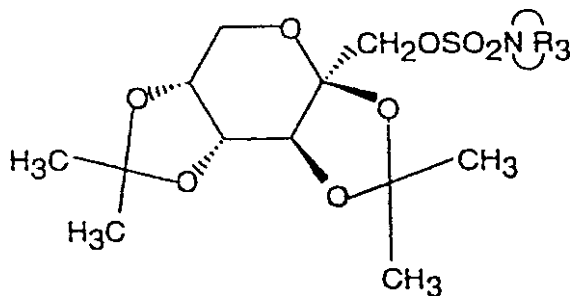
定量法は、正確であり、感度が高く、多くの市販のアッセイフォーマットにおいて、使用し易いということである。トピラメートを測定するためのイムノアッセイは、患者の試料中の薬剤レベルを定期的に測定するために使用できる分析法として有効であることは確かである。しかしながら、薬剤と反応する抗体を産生する免疫原を発現させるための巨大分子（タンパク質のような）に接合するのに適した薬剤類似体を作ることは、困難若しくは不可能である。しばしば、免疫原を生成するのに必要な誘導は、産生された抗体が、薬剤ではなく、その類似体を認識するように、その薬剤を完全に変えてしまうことがある。従って、タンパク質に接合するのに適し、類似体と薬剤の両方を認識する抗体を産生する類似体を調製することが、イムノアッセイを発展させるために要望されている。

発明の概要

本発明は、連結基を含有するように誘導されるトピラメート類似体を提供する。一実施態様においては、トピラメート類似体は、標識に接合され、トレーサーとして作用するトピラメート類似体を生成する。他の実施態様においては、トピラメート類似体は、キャリアーに接合され、免疫原として作用するトピラメート類似体を生成する。一実施態様におけるトピラメート類似体は、次式で表される。



式中、 R_1 と R_2 のうち一方は、Hである。他方は、R - Yである。Rは、連結基で、Yは、キャリアー又は標識である。 R_1 がHの場合は、XはHである。 R_1 がHでない場合は、XはH又はアルキル基である。他の実施態様においては、トピラメート類似体は、次式で表される。



式中、 R_3 は $R' - Y$ である。 R' は、トピラメートのスルファメート基のNが環の一員である複素環基を含有する連結基である。Yは、キャリアー又は標識である。

また、本発明は、この発明の免疫原を使用して産生される抗トピラメート抗体を提供する。本発明のトピラメートのイムノアッセイ法は、試料中のトピラメートと抗トピラメート抗体のための本発明のトレーサーとの競合に基づいている。一実施態様においては、イムノアッセイは、蛍光分極イムノアッセイである。また、イムノアッセイキットも提供される。

発明の詳細な説明

本発明は、トピラメートの新規な類似体を提供する。一実施態様においては、トピラメート類似体は、免疫原又はトレーサーとして使用できるトピラメート類似体を生成するために、それぞれ、キャリアー又は標識との接合を促進するための連結基を含有するように誘導される。キャリアーを含有するトピラメート類似体は、その類似体と反応し、トピラメートと反応する抗体を産生する。標識を含有するトピラメート類似体は、競合的なイムノアッセイ構成において、トレーサーとして使用することができる。また、抗トピラメート

10

20

30

40

50

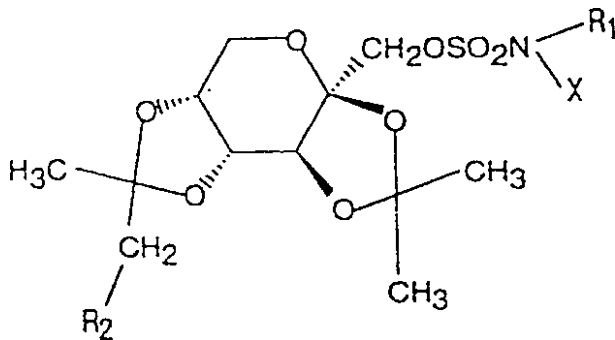
抗体及び本発明の試薬を使用するトピラメートのためのイムノアッセイも提供される。

トピラメート類似体

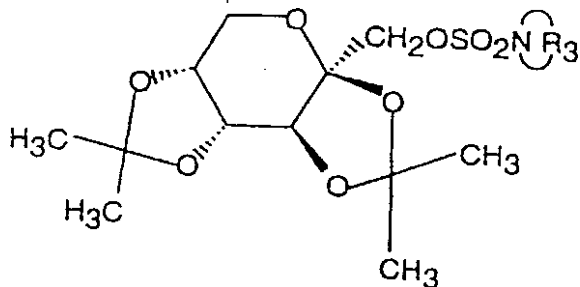
本発明のトピラメート類似体は、キャリアー又は標識のトピラメート類似体との結合を促進する化学的部位を含有するように誘導されたトピラメートである。本発明のトピラメート類似体は、トピラメートのスルファメート部位、9-炭素のメチル基、又は機能的に等価な10-炭素のメチル基において誘導される(炭素の番号及びスルファメート部位の位置を示すトピラメートの構造は、下表1に示されている。)。便宜上後述するトピラメートの9-炭素についての議論で、等価な10-炭素の位置と称することについても理解される。スルファメート部位を誘導することは、9-炭素メチル基を誘導することよりも有利である。なぜなら、抗体産生及び抗体認識に利用できるトピラメート類似体の部分は、トピラメート代謝生成物9-ヒドロキシ-トピラメート(表1参照)における部分とは異なるからである。このように、トピラメートのスルファメート部位による連結基とキャリアーとの接合が、9-ヒドロキシ-トピラメートとの最少の交差反応活性で抗体を引き出すことのできる免疫原を生成する。

スルファメート部位又は9-炭素メチル基におけるトピラメートの誘導は、類似体によって産生された抗体が、類似体及びトピラメートの双方と反応するトピラメートと、免疫学的に十分類似するトピラメート類似体を提供する。従って、本発明のキャリアーを含有するトピラメート類似体は、抗トピラメート抗体を産生することができる。さらに、トピラメート類似体は、以下にさらに詳しく述べるように、イムノアッセイにおけるトレーサーとして利用するために標識されうる。

本発明のトピラメート類似体の2つの一般式は、以下に示される。



式中、 R_1 と R_2 のうち一方は、Hである。他方は、連結基である。 R_1 がHの場合は、XはHである。 R_1 がHでない場合は、XはH又はアルキル基である。



式中、 R_3 は、トピラメートのスルファメート基のNが環の一員である複素環基を含有する連結基である。

周知のように、薬剤又は他のハプテンは、ハプテンがキャリアー又は標識と結合することを促進する化学的部位を有する連結基を含有するように誘導されうる。ハプテンから免疫原及び/又はトレーサーを調製するための連結基は周知であり、例えば、米国特許第5,051,361号(Stengleinらに、1991年9月24日に発行された)及び、Wong, S.のChemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida (1991)に記載されている。接合のための連結基において好適な化学的部位は、カルボキシ、アミノ、イミノ、アミド、カルボニル、ノンオキソカルボニル、アジド、ホスホニウム、チオ、ヒドロキシ、アルコキシ、ハロ、スルホニルオキシ、ヒドロキシフェニル、イミダゾリ

ル、マレイミド、及び同様のその他の飽和又は不飽和の基を含む。このような連結基は、このような連結基を担持するハプテン類似体を合成するための種々の化学的性質として周知である。いくつかの実施態様においては、以下にさらに詳しく述べるように、連結基は、トピラメート前駆体と反応することができ、連結基と結合したトピラメート（1又は1以上の水素が存在する）が生成される。

連結基は、30個までの炭素原子と、酸素、イオウ、窒素、及びハロゲンより選択されたヘテロ原子を0～10個含有しうる。一般的に、連結基は、水素以外の1～15個の原子、さらに通常は、水素以外の1～10個の原子から成る。より長い連結アームは、トピラメート分子からより離れたところで、標識又はキャリアーと結合する必要がある場合に、利用されうる。

10

Xが、アルキル基の場合は、そのアルキル基は、通常は1～5個、さらに通常は、1～3個、最も通常は、1～2個の炭素を有する。Xがアルキル基であるトピラメート類似体を生成するためには、トピラメート前駆体を使うと都合がよい。特に、MaryanoffらのJ. Med. Chem. 30:880-887 (1987)に記載されているように、トピラメートの酸塩化物前駆体（ジイソプロピリデンフルクトピラノースクロロスルフェート）を調製し、アルキル-アミンと反応させて、N-アルキル-トピラメート類似体を生成しうる。酸塩化物は、簡単には、次のように調製することができる。塩化メチレン（100ml）に塩化スルフリル（93ml、1.15モル）を加えた溶液を塩化メチレン（400ml）とピリジン（150ml）にジアセトンフルクトース（150g、0.58モル）を加えた冷溶液（-35℃）に、滴下して加え、反応混合物を生成する。この反応混合物を攪拌し、室温まで暖める。その反応混合物を、さらに2時間攪拌する。溶媒を減圧下除去して、酸塩化物トピラメート前駆体を生成する。

20

そして、酸塩化物前駆体は、アルキル-アミンと反応して、Xがアルキル基であるトピラメート類似体を生成しうる。さらに具体的には、酸塩化物前駆体は、メチルアミン、6-アミノカブロン酸、N-メチル-グリシン、又はN-エチル-グリシンのようなアルキルアミンと反応して、Xがアルキル基であるトピラメート類似体を生成しうる。例えば、MaryanoffらのJ. Med. Chem. 30:880-887 (1987)に記載されているように、トピラメートの酸塩化物前駆体は、メチルアミンと反応してN-メチル-トピラメートを生成しうる。上述のように調製した酸塩化物前駆体（35g、0.10モル）を無水アセトニトリル（150ml）に溶解し、メチルアミンを加える。得られた反応混合物を3日間密閉しておき、そして、溶媒を減圧下除去する。得られたシロップを液体クロマトグラフィー（シリカゲルのドライカラム、エチルアセテート/ヘキサン、4:1）にかけると、薄層クロマトグラフィー及び³HのNMRによって均一である明黄色のシロップ（4.1g、12%）が生じる。同様の方法を、他のN-アルキルトピラメート類似体を生成するために、他のアルキルアミンに使用できる。

30

連結基は、トピラメートのスルファメート基のNが環の一員である複素環基を含有しうる。複素環基は、閉環構造で、通常は、5又は6員環であり、環の1又は1以上の原子が炭素以外のものである。好適な典型的複素環基は、例えば、ピロリジン、ピペリジン、ピペラジン、又はモルホリンである。

複素環基を生成するためには、通常、トピラメート前駆体が使用される。特に、トピラメートの酸塩化物前駆体は、複素環と反応して、複素環トピラメート類似体を生成しうる。トピラメート類似体の連結基は、脱離基を含有しうる。脱離基は、トピラメート類似体が標識又はキャリアーに接合するとき作用する化学的部位である。接合プロセスの一部として、脱離基の1又は1以上の原子が捨てられる。さらに、標識又はキャリアーが接合すると、一般的に、脱離基が変化し、その変化に伴って生じる残基を、接合体の連結基が含有することになる。ここで、便宜上、用語「連結基」は、トピラメート類似体を生成するためにトピラメートに結合された連結基、及び標識若しくはキャリアーとの接合に伴って生じる連結基の残基を意味する。

40

ここで例示されるいくつかの実施態様においては、トピラメートは、類似体を標識又はキャリアーと結合させるために使用されるカルボキシル基を含有する連結基を有して誘導される。典型的な接合プロセスにおいては、トピラメート類似体のカルボキシル基は、N-ヒ

50

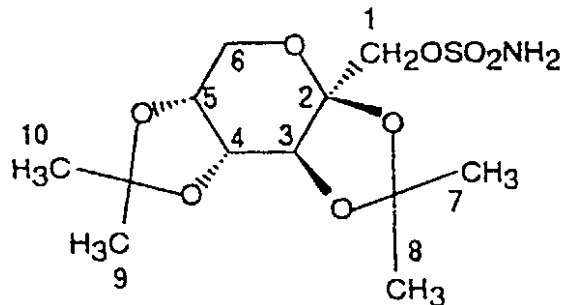
ドロキシスクシンイミド (NHS) と反応して活性なエステルを生成する。その活性なエステルが、アミノ基と反応して、トピラメート類似体接合体 (複合体) を生成する。アミノ基は、フルオレセイン若しくはビオチン誘導体のような小さい分子の中又はウシの血清アルブミン若しくはアルカリ属ホスファターゼのようなタンパク質のような巨大分子の中に存在しうる。接合体が、キャリアー又は標識を含有する場合は、トピラメート類似体は、それぞれ、免疫原又はトレーサーとして用いることができる。

ここで記載されているトピラメート類似体は、接合プロセスに関与するカルボキシル基を有するものが例示されているが、接合に関与しうる他の化学的部位は周知であり、かつ、適用できる。例えば、トピラメートのアミン誘導体又はチオール誘導体は、本技術の当業者に周知の方法を使って、キャリアー又は標識に結合されうる。典型的なトピラメート類似体が、これら化合物の構造とともに、以下の表 1 にリストされている。化合物番号 5 の 9-ヒドロキシ-トピラメートは、公知のトピラメート代謝生成物である。

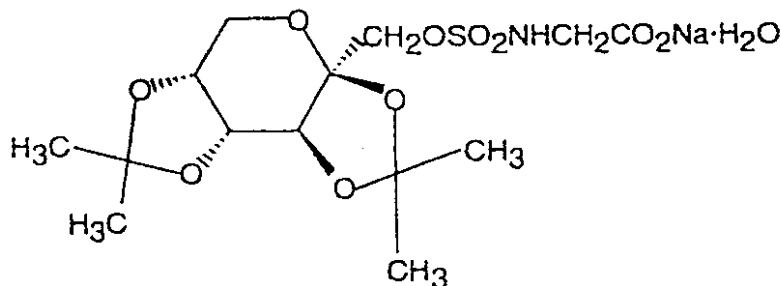
表 1

トピラメート及びその類似体

1. 2, 3 : 4, 5-ビス-O-(1-メチルエチリデン)-β-D-フルクトピラノーススルファメート (トピラメート)



2. N-カルボキシメチルルートピラメート、ナトリウム塩一水和物 (トピラメートグリシン類似体又は TGA ともいわれる)



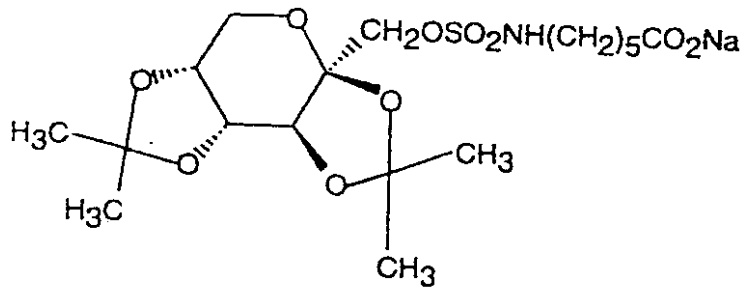
10

20

30

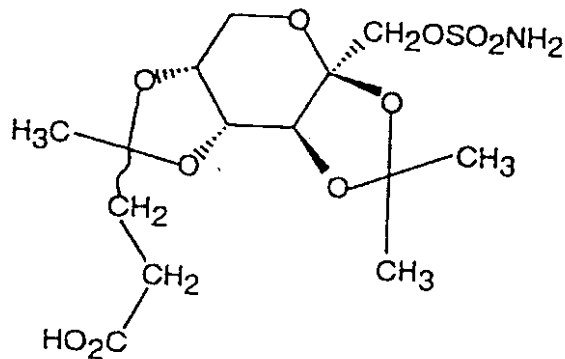
40

3. N-(5-カルボキシペンチル)ートピラメート、ナトリウム塩(トピラメートカブロン酸類似体、ナトリウム塩又はTCAともいわれる)



10

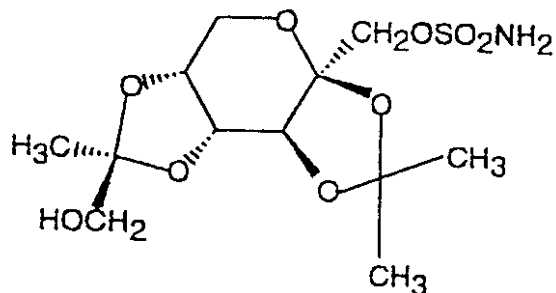
4. 9-カルボキシメチルートピラメート(トピラメートレブリン酸ケタール類似体又は9-CMTともいわれる)



20

30

5. 9-ヒドロキシートピラメート(9-OH-T)



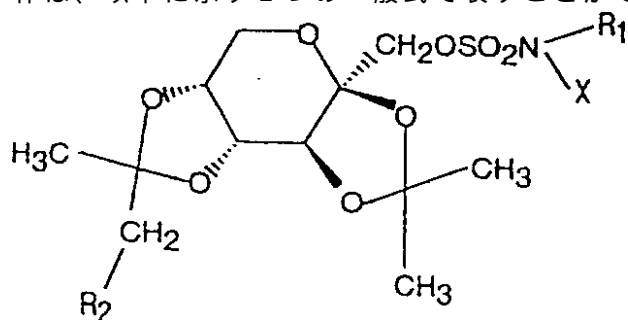
40

本発明のトピラメート類似体は、標準的な化学合成法を用いて調製した。類似体2~4を生成する典型的な方法は、実施例1~3において詳細に記載されている。トピラメート及びいくつかのトピラメート類似体の調製は、MaryanoffらのJ. Med. Chem. 30:880-887(1987)に記載されている出発原料を使用することができる。さらに、トピラメートは、Ortho/McNeil Pharmaceuticalsによって、商品名TOPAMAXで市販されている。

また、本発明のトピラメート類似体は、キャリアー又は標識と結合して、それぞれ、免疫原又はトレーサーを生成するトピラメートを含む。本発明の免疫原においては、連結基を

50

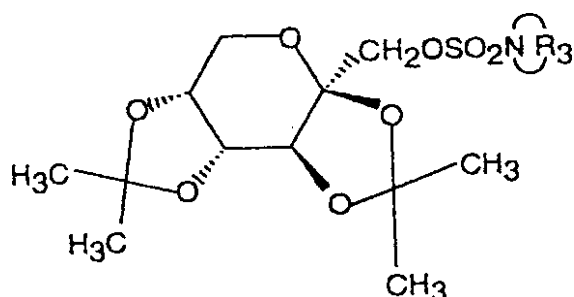
含有するトピラメート類似体は、キャリアーと接合する。本発明のトレーサーにおいては、連結基を含有するトピラメート類似体は、標識と接合する。これらのトピラメート類似体は、以下に示す2つの一般式で表すことができる。



10

式中、 R_1 と R_2 のうち一方は、Hである。他方は、R - Yである。Rは、連結基で、Yは、キャリアー又は標識である。 R_1 がHの場合は、XはHである。 R_1 がHでない場合は、Xは、H又はアルキル基である。

他の実施態様においては、トピラメート類似体は、次式で表される。



20

式中、 R_3 はR' - Yである。R'は、トピラメートのスルファメート基のNが環の一員である複素環基を含有する連結基である。Yは、キャリアー又は標識である。

本発明の免疫原は、キャリアーを含有するトピラメート類似体である。ここで、用語「キャリアー」は、技術上、選択された宿主動物において免疫原性物質を意味するのと同様に使用されている。キャリアーにハプテンを結合させて免疫原を調製することは、周知である。キャリアー及び投与経路の選択は、宿主動物によって変わる。キャリアーは、一般的に巨大分子、通常は、ポリマー、最も通常は、宿主動物以外の種から得られる巨大タンパク質である。ウシの血清アルブミン(BSA)及びキーホールリムベットヘモシアニン(KLH)は、マウス、ラット、ヤギ、ウサギ、ニワトリ、及びヒツジに抗体を産生するためのキャリアーとして、しばしば使用される。抗トピラメート抗体を産生するための免疫原性トピラメート類似体の典型的な調製は、実施例に記載されている。その典型的な免疫原の調製においては、R - Yは、 $(CH_2)_nCO-NH-$ (キャリアー)であり、nは、1~9である。さらに具体的には、nが1又は5で、BSAが典型的なキャリアーである実施例がある。

30

ここで、用語「トレーサー」は、技術上、競合的なイムノアッセイ法において使用される標識された分析用類似体を意味するのと同様に使用されている。本発明のトレーサーは、連結基によってトピラメートに結合する標識を含有するトピラメート類似体である。ここで、用語「標識」は、直接的に又は間接的に検知しうる物質を意味する。直接的に検知しうる標識は、例えば、放射性核種又は蛍光色素を含む。また1又は1以上の反応を経て間接的に検知しうる標識もある。このような標識は、着色生成物の生成によって検知される酵素を含む。このような酵素標識及びその着色の改良システムは周知である。他のこのような標識は、ピオチン/アビジンのように特異的な結合対を一員として使用することを含む。イムノアッセイ法において使用するのに適した標識は周知であり、例えば、酵素、放射線核種、蛍光色素、ピオチン等を含む。標識は、蛍光色素が、便利である。

40

好適な蛍光色素は、ローダミン(例えば、テトラメチルローダミンイソチオシアネート-TRITC)、フィコエリトリン(PE)、アロフィコシアニン(APC)、テキサスレッド(Molecular Probes, Eugene OR)を含み、好ましくは、フルオレセインである。アロ

50

フィコシアニン及びフィコエリトリンは、蛍光色素に適しているが、これらは、大きすぎるので、蛍光分極イムノアッセイのためには使用されない。好適なフルオレセインは、フルオレセインイソチオシアネート (FITC)、2 - (アミノエチル) - チオウレイド - フルオレセイン (FTED)、フルオレセイン - チオセミカルバジド (FTSC)、(2 - アミノエチル) - ウレイド - フルオレセイン (FAMCO - E)、エリトロシン (テトラ - ヨード - フルオロセイン)、及びフルオレセインアミン (FAM) を含む。

蛍光色素は、蛍光色素核上の可能などの位置でも連結基と結合しうる。5 - 、6 - 、4 ' - 、及び5 ' - 位に結合された連結基からなるフルオレセイン標識が好ましい。5 - 及び / 又は6 - 位に結合された標識が最も好ましい。(例えば、表2のトレーサー4 ~ 10を見よ。)

便宜上、フルオレセイン部位の5 - 位において連結基と結合しているフルオレセイン残基を有するトレーサーは、異性体Iと称される。フルオレセイン部位の6 - 位において連結基と結合しているフルオレセイン残基を有するトレーサーは、異性体IIと称される。特に言及しない場合は、異性体又は異性体の混合物とを区別しない。フルオレセイン及びローダミンで標識されたトレーサーは、蛍光の測定の間、ラクトンの形では、ほとんど又は全く存在せず、カルボキシル化された形で主に塩として存在する。フルオレセインは、均一な組成物又は異性体の混合物であってもよい。さらに、蛍光色素は、蛍光色素がイムノアッセイにおいて、イオン化状態で存在できるように、ラクトンの形で又は生物学的に許容される塩(例えば、Na、K、アンモニウム類の塩)として使用できる。

下表2は、実施例に記載されているように調製されたトピラメート類似体免疫原及びトレーサーを示す。これらは、表1に示されている典型的なトピラメート類似体から誘導された。免疫原及びトレーサーの調製においては、表1のトピラメート類似体が、標準的な方法で活性化され、カルボン酸基によって、N - ヒドロキシスクシンイミドエステルが生成された。この活性化エステルが、キャリアー又は標識中の一級アミンと順次反応して、アミドが生成された。

換言すれば、カルボン酸は、技術的に公知の他の方法を使って、アミンと縮合しうる。カルボン酸のアミド生成の合成法は周知であり、例えば、米国特許第5,051,361号 (Stengleinらに、1991年9月24日に発行された) に記載されている。また、免疫原性接合体の製造方法は、Methods in Immunology and Immunochemistry, (Curtis A. Williams and Merrill W. Chase eds., Volume 1, 1967) に記載されている。これらの文献は、引用文献として、その全体が本明細書に組み入れられている。さらに、トレーサー又は免疫原として有用な典型的なトピラメート類似体の典型的な製造方法が、実施例に詳細に記載されている。免疫原及びトレーサーとして有用な典型的なトピラメート類似体が、これら化合物の構造とともに、以下の表2にリストされている。

10

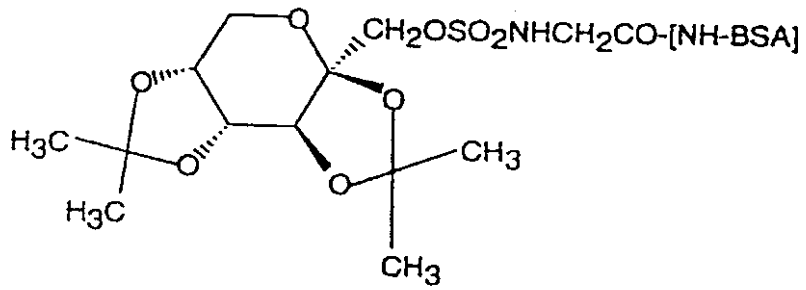
20

30

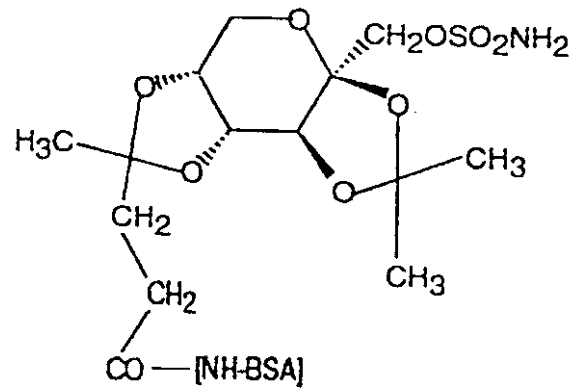
表 2

トピラメート接合体

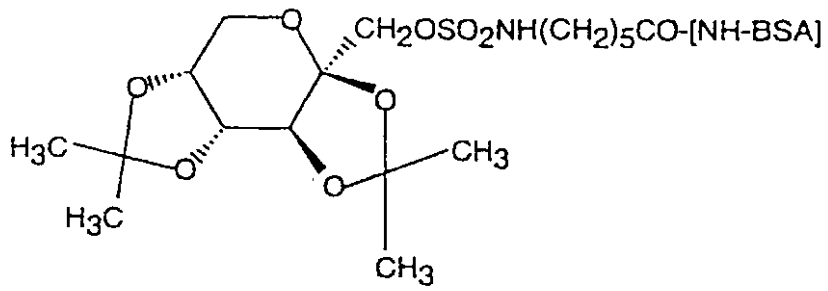
1. TGA : BSA



2. 9-CMT : BSA

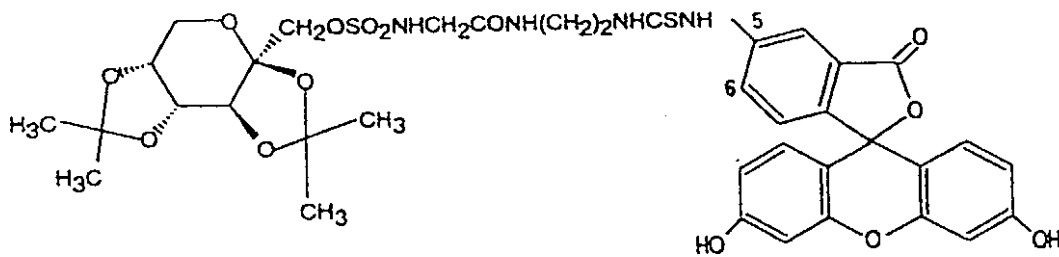


3. TCA : BSA



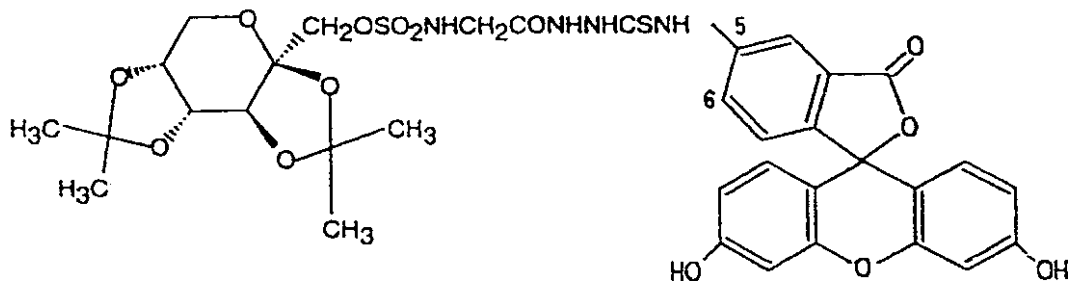
10

4. TGA : FTED



20

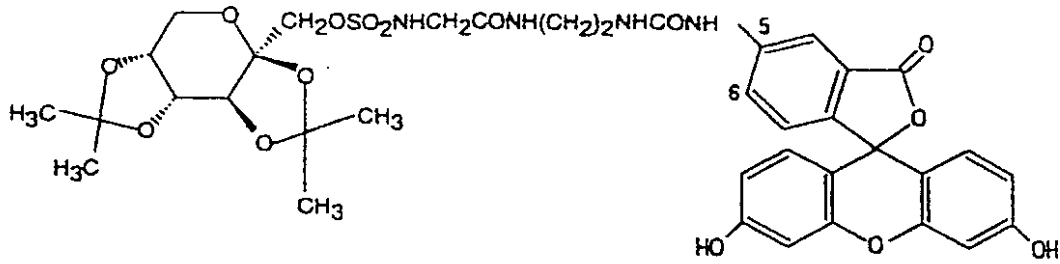
5. TGA : FTSC



30

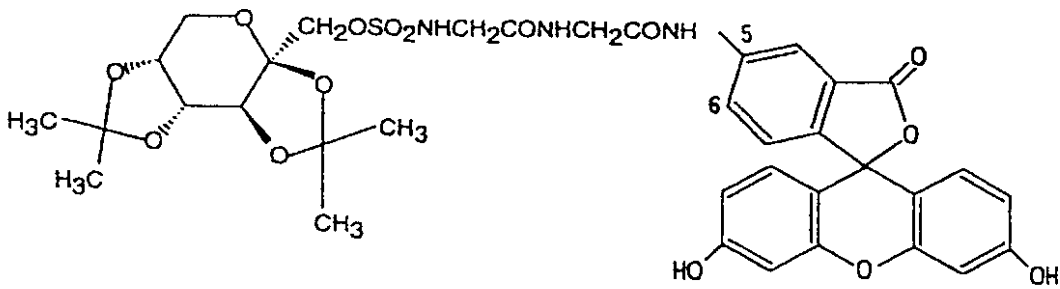
40

6. TGA:FAMCO-E



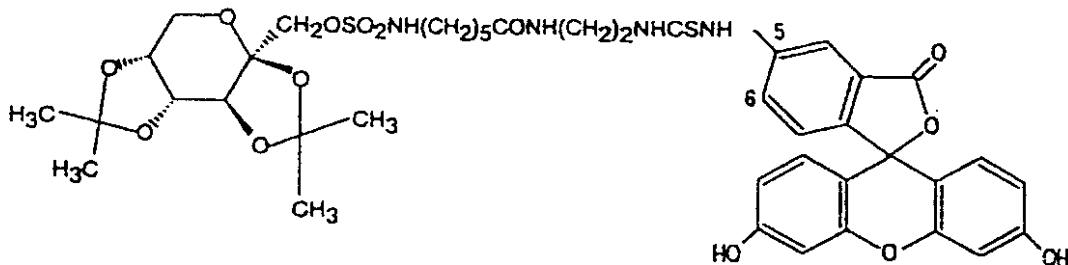
10

7. TGA:Gly-FAM



20

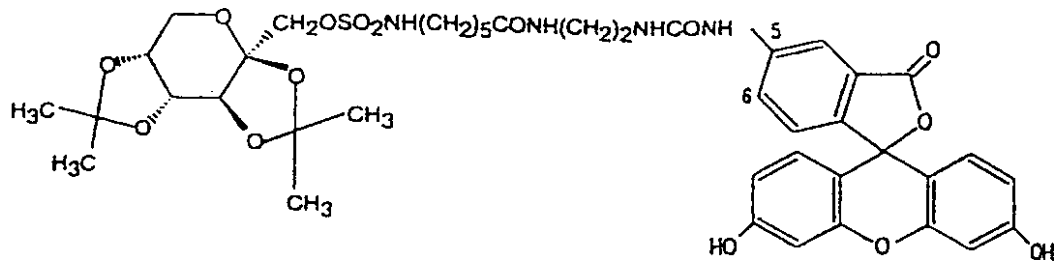
8. TCA:FTED



30

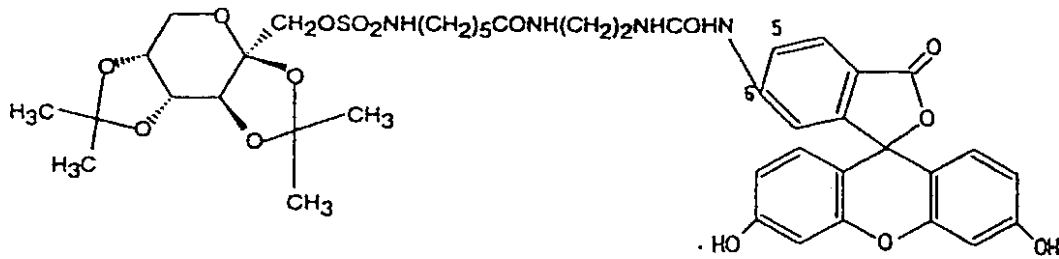
40

9. TCA:FAMCO-E



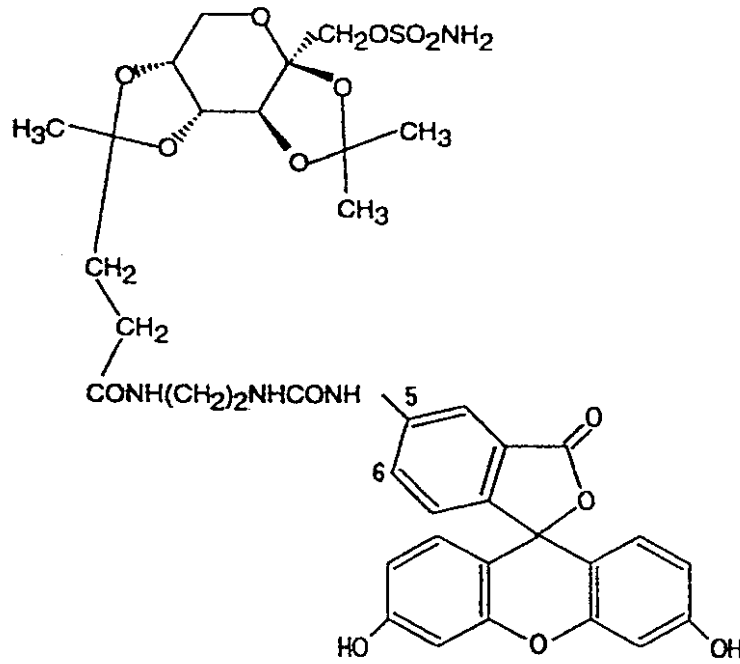
10

10. TCA:FAMCO-E トレーサー、異性体II



20

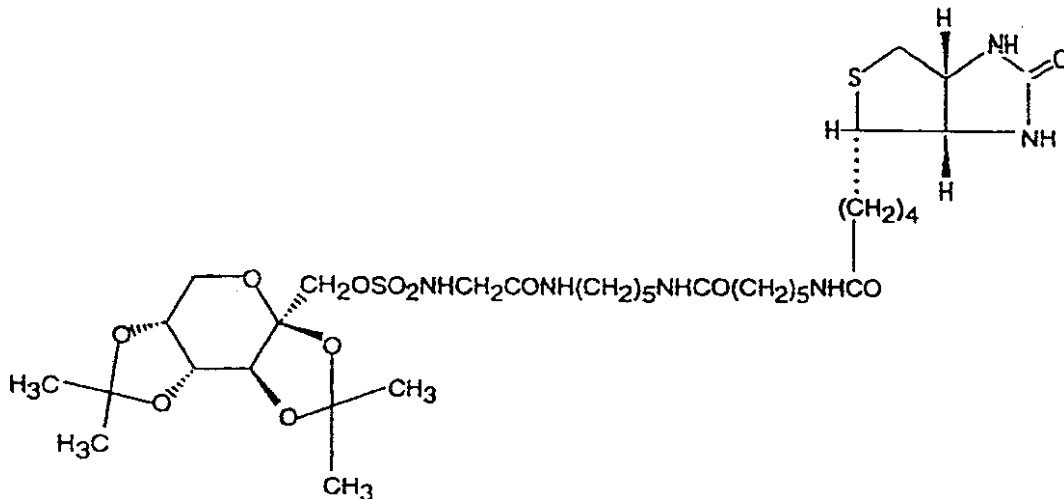
11. 9CMT:FAMCO-E



10

20

12. TGA-R:ピオチン



30

抗トピラメート抗体

40

本発明の抗トピラメート抗体は、トピラメート及び抗体を誘導するために用いられるトピラメート類似体と反応する。抗トピラメート抗体は、水、生理食塩水、リン酸塩緩衝食塩水等の水溶液中で処方される又はアジュバント又は類似の組成物中に供給される本発明の免疫原を用いて誘導される。本組成物がトピラメートに特異的であることを求めるために誘導した抗体が試験される。

ポリクローナル抗トピラメート抗体組成物が所望の特異性を示さない（例えば、高レベルの代謝物含む試料用トピラメート代謝物と許容しえないレベルの交差反応性を有する）場合には、下記に詳述されるように、該抗体は低レベルの代謝物を含む試料を分析するために用いられ、代謝物との交差反応性が関係しない方法にも用いられる。

モノクローナル抗トピラメート抗体は、常法で調製される。マウスに、本発明の免疫原を

50

含む組成物及び得られた脾臓細胞を注射する。脾臓細胞は、ハイブリドーマを調製するために融合パートナーと融合することができる。ハイブリドーマによって分泌された抗体は、抗体がトピラメートと反応するハイブリドーマを選択するためにスクリーニングされる。便利には、9-ヒドロキシトピラメートのようなトピラメート代謝物と最少の反応を示す抗体がスクリーニングされる。所望の特異性の抗体を生じるハイブリドーマを標準法によって培養する。ハイブリドーマ調製法及び培養法は、周知であり、本発明の一部を構成しない。

モノクローナル抗トピラメート抗体及びポリクローナル抗トピラメート抗体の具体的な調製は、実施例に記載される。ほとんどの患者試料においては、単一トピラメート代謝物が試料中に少量（通常4%未満）の濃度のトピラメートで存在することは留意される。しかしながら、数種の代謝物が存在することがあり、正常な患者においては薬剤量の20%まで及び代謝が亢進した患者又は腎不全のような医療問題のある患者においては50%まで集合体で存在することがある。

少量のトピラメート代謝物を含む試料中の正確な免疫分析値を得るのに抗トピラメート抗体と代謝物との交差反応性はほとんど重要でないが、抗トピラメート抗体はトピラメート代謝物と実質的に交差反応しないことが好ましい。“実質的に交差反応しない”とは、抗体が競合免疫分析形式に用いられる場合にトピラメートと同量の抗体阻害を得るため少なくとも約5倍以上の9-ヒドロキシトピラメートを必要とすることを意味する。

免疫分析（イムノアッセイ）

体液中に薬剤又は他の小分子のようなハプテンを検出する多くの定量的免疫分析形式は既知である。トピラメートの分析法は、次の要素を含む。該方法は、試料と抗トピラメート抗体とを混合する工程及び試料中のトピラメート量を表す抗トピラメート抗体-トピラメート複合体量を検出する工程が含まれる。トピラメートが検出される具体的な方法は、該方法が所望の感度及び信頼度を得る限り本発明の目的に重要ではない。免疫分析を行う種々の方法がTijssen, P., Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, (R.H. Burdon & P.H. van Kniffenberg eds., Vol. 15, 1985); The Immunoassay Handbook, (David Wild ed., 1994) に記載されている。

トピラメート免疫分析用試料は、体液、通常は血液、更に詳しくは血清又は血漿である。しかしながら、尿又は唾液のような他の体液の使用も企図される。

様々なプロトコールや標識を用いる多くの異なる種類の免疫分析が周知である。分析条件及び試薬は、従来技術に見られる種類のいずれでもよい。分析は、不均質又は均質であってもよく、便利には競合分析とする。トピラメートのスルファメート部分或いはトピラメートの9-炭素メチル基で誘導されたトピラメート類似体を認識する抗体の誘導によって示されるように、トピラメートは抗体認識できる少なくとも2種類の異なるエピトープがある。しかしながら、他の小分子とのようにある抗体がトピラメート又はトピラメート類似体に結合する場合、第2抗体によってトピラメートの認識が遮断され、2つの抗体が被検体に対する2つのエピトープに結合する従来のサンドイッチ型免疫分析の使用が除外される。

トピラメート免疫分析は、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体としてもよい抗トピラメート抗体を使用する。便利には、分析は競合に基づき、試料中のトピラメートが本発明の所定量のトピラメートトレーサーと競合する。競合分析に必要なトレーサー量は、多くの周知の要因によって変動する。例えば、トレーサーが蛍光色素で標識される場合、分析に必要とされるトレーサー量は経験的に求められる。トレーサーの使用量は、バックグラウンドシグナルに関して用いられる検出器に適切なシグナルを与えなければならずかつトレーサー及び試料中に存在するトピラメートの範囲に対する抗トピラメート抗体の親和性が所望の感度を与えるようなトレーサー量を与えなければならない。

競合免疫分析においては、使用される抗体標品はトレーサーとして用いたトピラメート類似体と同じ位置で誘導されたトピラメート類似体を含む免疫原によって誘導される。即ち、抗体組成物及びトレーサーを誘導するために用いられる免疫原は共にトピラメートのスルファメート部分或いは9-炭素メチル基で誘導されたトピラメート類似体が含まれる。

10

20

30

40

50

抗体と試料中のトピラメート間の結合は、多くの方法で求められる。例えば、試料中に存在するトピラメートは抗トピラメート抗体結合部位の所定量の標識トピラメート類似体（トレーサー）と競合することができる。固相に付着したトレーサー量又は溶液中に残存するトレーサー量が求められる。実施態様においては、固相付着アビジンに結合することによりビオチンで標識したトレーサーが固相に付着する。試料中のトピラメートは、抗トピラメート抗体の固相付着トピラメートトレーサーと競合する。固相に付着した又は溶液中に残存する標識抗トピラメート抗体が検出される。抗トピラメート抗体は、直接標識されるか又は抗トピラメート抗体の種類に特異的な標識第2抗体を用いて検出される。

多くの他の形式も用いられる。例えば、抗トピラメート抗体は付着した固相とすることができる。所定量の特異的トレーサーは、抗体結合について試料中のトピラメートと競合することができる。固相付着トレーサー又は溶液中に残存するトレーサーの量が求められる。トレーサーは、放射性核種、蛍光色素等のように直接に又は酵素とのように間接に検出される標識をもつことができる。また、トピラメートトレーサーはビオチンで標識され、酵素標識アビジン又はアビジン標識抗体で検出される。アビジン標識抗体は、直接標識されるか又は標識第2抗体で検出される。

他の実施態様においては、免疫分析は、患者の試料中のトピラメートを測定する蛍光偏光免疫分析である。便利には、蛍光偏光免疫分析は、臨床化学実験室や病院内での薬剤モニタリング用に設計されたTDx^R及びTDxFIx^Rアナライザーのような自動装置で用いられる。

蛍光分極免疫分析は、分子量（典型的には5000未満）の小さい蛍光的に標識されたトレーサーを用いる。トレーサーは、平面偏光の入射ビーム内に配置される。光が吸収され、蛍光として再発光される。小分子のブラウン運動が急速なために発光蛍光が偏光解消する。トレーサーのサイズが大きいと回転時間が非常に増加し、偏光したままの発光した蛍光を生じる。従って、フルオレセイン標識トレーサーへの抗体の結合は発光した光の偏光を引き起こす。試料中の被検体は、抗体結合に対してトレーサーと競合し、よって蛍光の偏光解消を増大させる。偏光解消の程度は、試料中の被検体の濃度による。従って、蛍光の偏光解消量が被検体の増加濃度と相関する競合免疫分析の標準曲線が調製される。

トピラメートを分析する試薬は、キット中に便利に包装される。トピラメートを分析する免疫分析キットは、抗トピラメート抗体及び本発明のトピラメート類似体トレーサーが含まれる。

個々の実施例であるが限定されない下記の実施例によって本発明を更に具体的に説明する。特にことわらない限り、温度は示され、濃度は重量%として示される。実施するために構成的に縮小される手順は現在時制で記載され、実験室で行われた手順は過去時制で示される。上記明細書及び下記の実施例での引用は全て、本願明細書に含まれるものとする。

実施例 1

N - カルボキシメチル - トピラメートの調製

例示的な手順として、N - カルボキシメチル - トピラメート（トピラメートグリシン類似体、TGA）は、以下に示すようにトピラメートから調製した（Maryanoffら、J. Med. Chem.、30、880～887頁、1987年）。

トピラメート33.9g（0.1mol）、ヘキサメチルジシラザン16.1g（0.1mol）、及びクロロトリメチルシラン約1mlをテトラヒドロフラン150mlに加えて溶液を得た。溶液を、5時間還流し、室温まで冷却した。攪拌しながら、80% NaHの3.0g（0.1mol）を、約10分間にわたって少しずつ（portion-wise）加えて反応混合物を得た。反応混合物は、非常に濃厚になった。ジメチルホルムアミド20ml及びテトラヒドロフラン100mlを加えて、反応混合物中の沈殿物を溶解させると、反応混合物は、均質な溶液になった。その後、t - ブチル - プロモアセテート19.5g（0.1mol）を、30分間、反応混合物に滴下法で加えた。反応混合物を、終夜攪拌した。反応混合物を、酢酸エチル500mlで希釈し、水洗し（2 × 100ml）、塩水（水にNaClを飽和）で飽和し（100ml）、乾燥し（MgSO₄を使用）、溶媒は、真空中で除去し、t - ブチルグリシネート類似体粗生成物を粘着性の白色固体として得

10

20

30

40

50

た。t - ブチルグリシネート類似体を含むこの粗固体を、シリカゲルクロマトグラフィにかけ、18%酢酸エチル/ヘキサン(v/v)を溶出剤として溶出し、白色固体のt - ブチルグリシネート類似体17.2g(収率38%)を得た。

約9.0g(19.9mmol)のt - ブチルグリシネート類似体を室温で攪拌しながら、トリフルオロ酢酸90mlに少しずつ加えて、反応混合物を得た。10分後、反応混合物を、ろ過して少量の不溶物質を除去し、溶媒を真空中で除去して粗製のグリシン類似体を濃厚油状物として得た。この油状物は、1NのNaOH150mlで希釈し、ジエチルエーテルで洗浄した(2×50ml)。水層を、3NのHClでpH3に酸性化し、メチレンクロライドで抽出した(3×100ml)。混合した有機抽出物を真空中で濃縮して、白色気泡のグリシン類似体6.68g(収率84%)を得た。

グリシン類似体(6.0g、15.1mmol)を、13.6mlの1.0NNaOH中に溶解した。水を、真空中で除去し、得られた残留物を、トルエンを使って共沸的に乾燥して白色固体の粗製のナトリウムグリシネート4を得た。この白色固体をジエチルエーテル(2×50ml)で粉砕し、得られた固体を、真空ろ過して単離し、ナトリウムグリシネート水和物(N - カルボキシメチル - トピラメート)5.3g(収率80%)を得た。N - カルボキシメチル - トピラメートの融点は、169.0 から170.0 である。元素分析で計算したN - カルボキシメチル - トピラメート(C₁₄H₂₂NO₁₀SNa·H₂O)は、C、38.44; H、5.53; N、3.20; S、5.26; Na、5.26である。元素分析で計算したN - カルボキシメチル - トピラメート類似体は、C、38.27; H、5.59; N、3.08; S、5.50; Na、5.50である。H₂O(KF)%は4.12%である(KFは、含水量を、Karl Fischer法で測定し、かつ%w/wで表したものを示す)。

N - カルボキシメチル - トピラメート(TGA)は、ナトリウム塩一水和物として得られ、これは、以下の実施例において、免疫原、トレーサー、及びビオチン結合を調製するために使用する。

実施例 2

N - (5 - カルボキシメチル) - トピラメート(TCA)の調製

例示的な手順として、N - (5 - カルボキシメチル) - トピラメート(トピラメートカプロン酸類似体、TGA)を、以下に示すように2,3:4,5 - ビス - O - (1 - メチルエチリジン)クロロ硫酸塩から調製した(Maryanoffら、J.Med.Chem.、30、880~887頁、1987年)。

2,3:4,5 - ビス - O - (1 - メチルエチリジン)クロロ硫酸塩(35.8g、0.10mol)のメタノール溶液(200ml)を、6 - アミノカプロン酸(26.2g、0.20mol)、及びピリジン(7.91g、0.10mol)のメタノール溶液(300ml)にゆっくりと2.25時間にわたって滴下法で加え、混合物を得た。溶液を、2.5時間加熱還流し、減圧下で濃縮して赤橙色の油状物を得た。この油状物を、蒸留水(300ml)、酢酸エチル(200ml)に溶解し、4MのNaOH溶液でpH10~12に塩基化した。この油層は分離され、水層は、副産物であるジアセトンフルクトースが除去されるまで酢酸エチルで繰り返し抽出された(12×200ml)。その後、水層を、濃HClでpH5.0に酸性化し、酢酸エチルで抽出した(4×150ml)。有機抽出物を混合し、乾燥し(MgSO₄)、ろ過し、粗生成物の19.5%中に油状のカプロン酸誘導体を得た。

この油状物を2 - プロパノール(230ml)に溶解し、4M NaOH溶液(13ml)で処理して反応混合物を得た。この反応混合物を濃縮し、得られる固体を、室温でISOPAR E(高沸点炭化水素、EXXON Corporationから入手可能)を用いて終夜スラリー化した。スラリーをろ過し、回収した固体を、ISOPAR Eで洗浄した。空気乾燥を、白色固体で融点が197.0~202.0 のカプロン酸ナトリウム類似体(N - (5 - カルボキシペンチル) - トピラメート)23.64g(収率97.5%)を得た。元素分析で計算したC₁₈H₃₀NO₁₀SNaは、C、45.47; H、6.36; N、2.95; S、6.74; Na、4.83である。元素分析で計算したこの類似体は、C、44.87; H、6.31; N、2.89; S、6.44; Na、5.08である。

N - (5 - カルボキシペンチル) - トピラメート(TCA)は、以下の実施例において、免疫原及びトレーサーを調製するためのナトリウム塩として使用した。

実施例 3

9 - カルボキシメチル - トピラメート (9 - C M T) の調製

例示的な手順として、9 - カルボキシメチル - トピラメート (9 - C M T) (レプリン酸ケタール類似体、T G A) は、以下に示すように調製した。

トリエチルオルトギ酸塩 (24.6g、0.166mol) は、レプリン酸エチル24.0g (0.166mol)、硫酸0.8ml、無水エタノール300mlを含む攪拌した溶液に加え、反応混合物を得た。反応混合物を30分、室温で攪拌した後、16.4g (0.055mol) の2,3 - O - (1 - メチルエチリジン) - B - D - フルクトピラノーススルファメート (Maryanoffら、J.Med.Chem.、30、880 ~ 887頁、1987年) を加え、攪拌を16 ~ 18時間続けた。固体炭酸ナトリウム (80.0g、0.75 mol) を、反応混合物に続いて蒸留水 (100ml) に加え、p H 7 . 0 を有する反応混合物を得た。反応混合物をろ過し、酢酸エチル (約500ml) で希釈した。この層を分離し、有機層を塩化ナトリウム飽和溶液洗浄し (3 × 200ml)、硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮してケタール、少量のジオール、及びレプリン酸エチルの混合物である油状物を得た。油状物を、過剰のレプリン酸エチルが除去されるまでヘキセンで繰り返し粉碎し、その後、油状物をメタノール125mlに溶解して、メタノール溶液を得た。1NのN a O H (250 ~ 300ml) をこのメタノール溶液に加え、得られる反応混合物を約2時間加熱還流した。室温まで冷却後、反応混合物を、酢酸エチルで抽出した (3 × 100ml)。水層を、3NのH C l でp H 4.0に酸性化し、酢酸エチルで抽出した (3 × 100ml)。有機抽出物を混合し、終夜乾燥し (M g S O ₄)、ろ過し、濃縮して、白色脆性気泡で融点42.0 ~ 45.0 のレプリン酸ケタール誘導体 (9 - カルボキシメチル - トピラメート) 15.7g (収率71.8%) を得た。元素分析で計算したC₁₄H₂₃N₁₀O₁₀Sは、C、42.31；H、5.83；N、3.52；S、8.07である。元素分析の実測値は、C、42.55；H、5.83；N、3.38；S、7.57である。

9 - カルボキシメチル - トピラメート (9 - C M T) は、以下の実施例において、免疫原及びトレーサーを調製するための遊離酸として使用した。

実施例 4

N - カルボキシメチル - トピラメート：ウシ血清アルブミン免疫原の調製

本実施例は、本発明の例示的な免疫原の調製において、実施例1の記述で調製されたN - カルボキシメチル - トピラメートが、ウシ血清アルブミン (B S A) と結合してN - カルボキシメチル - トピラメート：ウシ血清アルブミン免疫原 (T G A : B S A) を得るものについて記述する。

N - カルボキシメチル - トピラメート103mgとN - ヒドロキシスクシンイミド (N H S) 34.9mgのジメチルアセトアミド溶液1mlを、氷冷メタノール浴で冷却し、3.15Mのジシクロヘキシルカルボジイミド (ジメチルアセトアミド中) で処理して反応混合物を得た。反応混合物を、氷冷メタノール浴上で15分間攪拌し、ジシクロヘキシルカルボジイミド溶液を更に50 μ l 加えた。攪拌を、反応混合物が、ゆっくりと室温になる間、続けた。その後、攪拌を、室温で終夜続けた。

終夜攪拌した後、反応混合物中に得られる活性エステルを、ウシ血清アルブミンに結合した。ウシ血清アルブミンを、結合に使用する前に、脱イオン水中、G-25 SEPHADEXカラムクロマトグラフィで脱塩する。あらかじめ脱塩したウシ血清アルブミン109mgの水溶液の全量15mlを、氷冷メタノール浴で冷却した。活性エステルを含む反応混合物を、5% K₂ C O₃をp Hが安定化するまで加えて (約1時間) p H 8 から9に維持して、攪拌しながらウシ血清アルブミン溶液に滴下法で加えた。

その後、得られる反応混合物を、終夜4に維持し、固体を遠心分離法で除去した。結合体を含む得られる上澄み液を、0.8 μ mポリカーボネート膜を通してろ過し、2.5 × 41cmのG-25 SEPHADEXカラムのクロマトグラフィにかけ、0.15M N a C l を含む0.01Mのリン酸カリウムでp H 7.4に平衡しかつ溶出した。全量97mg (タンパク質として) のこの結合物 (複合体) を、最終生成物中に得た。結合物を凍結保存した。

本実施例及び後に続く実施例において、免疫原のタンパク質濃度を、市販ビュレット分析により、又はウシ血清アルブミンの1mg/ml溶液が、p H 7 . 4 のリン酸塩緩衝生理食塩水 (P B S) 中で280nm、光路1cmで0.67の吸光度を示すと仮定することにより測定した。

10

20

30

40

50

実施例 5

9 - カルボキシメチル - トピラメート：ウシ血清アルブミン免疫原の調製

本実施例は、本発明のもう一つの例示的な免疫原の調製において、実施例 3 の記述から調製した 9 - カルボキシメチル - トピラメートが、ウシ血清アルブミン (B S A) と結合して 9 - カルボキシメチル - トピラメート：ウシ血清アルブミン免疫原 (9 - C M T : B S A) を得るものについて記述する。

9 - カルボキシメチル - トピラメート 206mg と N - ヒドロキシスクシンイミド 70mg を、2ml のジメチルアセトアミドに溶解して反応混合物を得た。反応混合物を、氷冷メタノール浴で冷却し、ジメチルアセトアミド中、3.15M のジシクロヘキシルカルボジイミド 200 μ l を加えた。反応混合物を、氷冷メタノール浴上で 15 分間攪拌し、その後、更に 3.15M ジシクロヘキシルカルボジイミド溶液 100 μ l を加えた。反応混合物を更に 10 分間、氷冷メタノール浴上で攪拌し、0.025mol のピリジンを加えた。反応混合物を含む容器を、浴から取り除き、外界温度で数分間攪拌し、その後、-10 で終夜保存した。翌日、反応混合物を、ウシ血清アルブミン溶液 (G-25SEPHADEX カラムを使ってあらかじめ脱塩した) 200mg を攪拌しながら氷浴中で加えた。反応混合物の pH を、pH が安定化するまで 5 % K_2CO_3 を加えて pH 8 から 9 に維持した。その後、反応混合物を室温で終夜攪拌した。後日、固体を遠心分離法で除去し、上澄み液を、0.2 μ m フィルターでろ過して浄化溶液を得た。この溶液を、0.15M NaCl を含む 10mM のリン酸カリウム緩衝液 (K P i) で pH 7.4 に平衡した G-25 SEPHADEX カラムで脱塩した。タンパク質の生成量は、189mg だった。9 - C M T : B S A 結合物を、凍結保存した。

実施例 6

N - (5 - カルボキシペンチル) - トピラメート：ウシ血清アルブミン免疫原の調製

本実施例は、本発明のもう一つの例示的な免疫原の調製において、実施例 2 の記述から調製した N - (5 - カルボキシペンチル) - トピラメートが、ウシ血清アルブミン (B S A) と結合して N - (5 - カルボキシペンチル) - トピラメート：ウシ血清アルブミン免疫原 (T C A : B S A) を得るものについて記述する。

N - (5 - カルボキシペンチル) - トピラメートのナトリウム塩 250mg を、2ml のジメチルアセトアミドに溶解した。N - ヒドロキシスクシンイミドのナトリウム塩 100mg を加えて反応混合物を得、この反応混合物を 10 分間室温で攪拌した。ジメチルアセトアミド中、3.15M ジシクロヘキシルカルボジイミド 200 μ l を加え、反応混合物を 30 分間室温で攪拌した。N - ヒドロキシスクシンイミド 50mg を、3.15M ジシクロヘキシルカルボジイミド溶液を 100 μ l 加えた後に反応混合物に加えた。反応混合物を、更に 10 分間攪拌し、0.025mol のピリジンを加えた。その後、反応混合物を終夜室温で攪拌し、活性エステルを得た。

翌日、活性エステルを含む反応混合物を、攪拌しながら、ウシ血清アルブミン 200mg の水溶液 (使用する前に水の G-25SEPHADEX カラムクロマトグラフィで脱塩した) 全量 20ml を氷浴中で滴下法で加えた。反応混合物の pH を、5 % K_2CO_3 を pH が安定化するまで (約 2 時間) 加えて、pH 8 から 9 に維持した。得られる懸濁液を終夜 4 で保存した。不溶性物質を 0.2 μ m ポリカーボネート膜でろ過して除去し、浄化溶液を得た。この浄化溶液を、0.15M NaCl を含む、10mM K P i で pH 7.4 に平衡した G-25 SEPHADEX カラムのクロマトグラフィにかけた。T C A : B S A の最終生成量は、189mg だった。

実施例 7

N - カルボキシメチル - トピラメート：(2 - アミノエチル) - チオウレイド - フルオレッセインの調製

本実施例は、フルオレッセンス偏光免疫学的測定法におけるトレーサー (T G A : F T E D トレーサー) として有用な、N - カルボキシメチル - トピラメート：(2 - アミノエチル) - チオウレイド - フルオレッセインの調製を記述する。

実施例 1 の記述から調製した N - カルボキシメチル - トピラメート 22mg を、ジメチルアセトアミド 200 μ l に溶解した。N - ヒドロキシスクシンイミド 20mg と 1M のジシクロヘキシルカルボジイミド (テトラヒドロフラン中) 100 μ l (100 μ mol) を加えて反応混合物を得た。この反応混合物を、90 分間室温で攪拌し、活性エステルを得た (T G A : N O S) 。

MeOH 2ml と 1N NaOH 0.1ml を試験管に加えた。(2-アミノエチル)-チオウレイド-フルオレッセイン (FTEID) (Pourfarzanehら、Clinical Chemistry、26、730項、1980年の記載から調製) 21.6mgを、メタノール溶液に溶解し、続いて活性TGA: NOS エステルを含む反応混合物に加えた。沈殿物は、1N NaOH の 4 × 50 μl 分量を加えて再溶解して得た。得られる反応混合物のpHは、8.5だった。その後、反応混合物を、30分間室温で攪拌した。pHを、1N NaOHをpHが安定化するまで(約1時間)必要に応じて更に加えて、pH 7.5 から 8.5 に維持した。反応混合物の試料は、その後1時間、長くても4時間クロマトグラフィで除去した。

得られるN-カルボキシメチル-トピラメート:(2-アミノエチル)-チオウレイド-フルオレッセインを、以下に記述するように、CHCl₃/MeOH/水(4+4+1)中、シリカゲル(SGF-250)薄層クロマトグラフィの後、MeOH/水/15M NH₄OH(25+75+2)中、逆相(RPF-250)薄層クロマトグラフィで精製した。

本実施例中、薄層クロマトグラフィ(TLC)を、254nmで吸収する蛍光指示薬を含むシリカゲルプレートを使用して実施した。プレートは、250 μm (SGF-250とする)又は1000 μm (SGF-1000とする)の厚さだった。254nmで吸収する蛍光指示薬を含むC-18逆相シリカゲルプレートは、厚さ250 μm (RPF-250とする)だった。薄層クロマトグラフィ溶媒系、シリカ及び逆相カラムクロマトグラフィ溶媒系は、すべて体積/体積組成で表現される。一定の化合物を、化合物の吸収(254nm又は366nm)又は種々のスプレー指示薬を用いてTLCプレートに可視化した。多くの蛍光誘導体及び有色化合物は、処理なしでも見ることができた。

精製したトレーサー(N-アシルアミドフルオレッセイン)の近似の濃度を、0.05M炭酸塩緩衝液(pH 9.6)で希釈した溶液に対し、最大吸収を示す波長(490~500nm、スキャニングして測定)での67000のモル吸光係数から仮定し、かつ1cm光路長で読んで測定した。本実施例中、有機溶媒中のpH測定を、含水pH紙で行った。

実施例 8

N-カルボキシメチル-トピラメート:フルオレッセイン-チオセミカルバジドの調製
本実施例は、フルオレッセス偏光免疫学的測定法におけるトレーサー(TGA:FTSCトレーサー)として有用な、N-カルボキシメチル-トピラメート:フルオレッセイン-チオセミカルバジドの調製を記述する。

実施例1で記述したように調製したN-カルボキシメチル-トピラメート22.8mgを、ジメチルアセトアミド0.25mlに溶解した。N-ヒドロキシスクシンイミド14.8mgを加えた後、1Mのジシクロヘキシルカルボジイミド(テトラヒドロフラン中)0.1mlを加えて反応混合物を得た。この反応混合物を、終夜室温で攪拌し、活性エステルを得た。

フルオレッセイン チオセミカルバジド(10mg、Sigma Chemical Companyから入手)を、(MeOH 0.1ml + 1N NaOH 0.05ml)に溶解し、N-カルボキシメチル-トピラメートの活性エステルを含む反応混合物に加えた。反応混合物を、15分間攪拌し、その時に10%トリエチルアミン(MeOH中)0.05mlを加え、攪拌を室温で更に2時間続けてN-カルボキシメチル-トピラメート:フルオレッセイン-チオセミカルバジドを得た。このN-カルボキシメチル-トピラメート:フルオレッセイン-チオセミカルバジドを、MeOH/CHCl₃/H₂O(4+4+1)溶液中のシリカゲルプレート(SGF-250)連続薄層クロマトグラフィ工程の後、MeOH/水/トリエチルアミン(20+80+1)溶液系中の逆相プレート(RPF-250)で精製した。

実施例 9

(2-アミノエチル)-ウレイド-フルオレッセインの調製

本実施例は、以下の実施例に記載したようなトピラメート類似体と結合した(2-アミノエチル)-ウレイド-フルオレッセイン(FAMCO-E)の精製について記述する。

FAMCO-Eを調製するために、フルオレッセインアミン異性体I 3.25gを、ジメチルアセトアミド17.5mlに溶解し、2.5gの1,1'-カルボニルジイミダゾールを加え、反応混合物を得た。(フルオレッセインの異性体I及びIIは、フルオレッセイン環の5又は6位の置換基を有するものとして定義される。他言しない限り、全てのフルオレッセイン誘導

体の記述は、異性体 I 誘導体である。しかしながら、異性体 II 又は I と II の混合物は、適したリガンド試薬を調製するために使用される。) 反応混合物を、3 時間、室温で攪拌した。エチレンジアミン 5ml を、1 リットルフラスコ中のメチレンクロライド 500ml に加え、エチレンジアミン溶液を得、この溶液を氷冷メタノール浴で冷却した。1,1' - カルボニルジイミダゾール / フルオレッセインアミン反応混合物を、その後、勢いよく攪拌しながら冷却したエチレンジアミン溶液に滴下法で加えた。橙色沈殿物が生じた。反応混合物を、終夜室温で攪拌した。橙色沈殿物をブフナーロートで集め、メチレンクロライド、メチレンクロライド / アセトン / MeOH (100+10+1v/v)、そしてメチレンクロライドで連続的に大規模洗浄した。洗浄した沈殿生成物を乾燥し、アセトン中で乾燥し、ろ過し、石油エーテルで洗浄し、粗粉末を空気乾燥した。MeOH 5ml 及び 1.5M NH₄OH 0.15ml を、その乾燥粗粉末 0.5042g に加え、透明深赤色溶液を得た。この溶液を攪拌しながら滴下法で、体積 200 倍の MeOH / 水 / 酢酸 (10+90+1v/v) に加えた。いくらか沈殿を生じた。不溶性の物質を集め、MeOH / 15M NH₄OH (100+2v/v) に溶解し、再度、攪拌しながら滴下法で容積 200 の MeOH / 水 / 酢酸 (10+90+1v/v) に加えた。この沈殿物を集め、廃棄した。たまった MeOH / 水 / 酢酸の溶液を浄化するためにろ過し、MeOH / 水 / 酢酸 (10+90+1v/v) で平衡化したカラムの低圧 C18 逆相クロマトグラフィにかけた。FAMCO - E は、カラムに結合し、MeOH / 水 / 酢酸 (15+85+1) で溶出した。溶出した FAMCO - E を、7.5%メタノール洗浄工程 (酢酸除去のため) を溶出前に行い、溶出をメタノール (100%) で行った他は、同一条件下、C18 カラム上で再循環して濃縮した。溶出した FAMCO - E を含む画分を貯蔵し、十分なトリエチルアミンを加えて pH を 8 から 9 にした。精製した FAMCO - E を、メタノール溶液として -10 °C で保存した。

10

20

実施例 10

N - カルボキシメチル - トピラメート : (2 - アミノエチル) - ウレイド - フルオレッセインの調製

本実施例は、フルオレッセンス偏光免疫学的測定法におけるトレーサー (TGA : FAMCO - E トレーサー) として有用な、N - カルボキシメチル - トピラメート : (2 - アミノエチル) - ウレイド - フルオレッセインの調製を記述する。

実施例 1 の記述により調製した N - カルボキシメチル - トピラメート 10mg と N - ヒドロキシスクシンイミド 5mg を、ジエメルアセトアミド 0.2ml に溶解した。1M のジシクロヘキシルカルボジイミド (テトラヒドロフラン中) 0.05ml を加え、得られる反応混合物を 2.5 時間攪拌し、活性エステルを得た。活性エステルを含む反応混合物 0.1ml を、実施例 9 の記載から調製した (2 - アミノエチル) - ウレイド - フルオレッセイン (FAMCO - E) 溶液 0.5ml に加えた。15 分後、トリエチルアミン 5 μ l を pH 8 から 9 に維持するために加えた。反応混合物を、60 分室温でインキュベートした。得られる N - カルボキシメチル - トピラメート : (2 - アミノエチル) - ウレイド - フルオレッセインを、その後、CHCl₃ / MeOH / 水 (4+4+1) 溶液系中のシリカゲル (SGF-250) 連続薄層クロマトグラフィ工程、及び MeOH / 水 / 15M NH₄OH (20+80+2) 溶液系中の逆相薄層クロマトグラフィで精製した。

30

実施例 11

N - カルボキシメチル - トピラメート : グリシル - フルオレッセインアミンの調製

40

本実施例は、フルオレッセンス偏光免疫学的測定法におけるトレーサー (TGA : Gly - FAM トレーサー) として有用な、N - カルボキシメチル - トピラメート : グリシル - フルオレッセインアミンの調製を記述する。

アミノアセトアミド - フルオレッセイン (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon) 5mg を、ジメチルアセトアミド 0.1ml に溶解した。実施例 10 の記述から調製した N - カルボキシメチル - トピラメートの活性エステル 0.15ml を加え、得られる反応を、1 時間室温で行った。pH を、少量のトリエチルアミンを加えて pH 6.5 から 8 に維持した。得られる N - カルボキシメチル - トピラメート : グリシル - フルオレッセインアミンを、CHCl₃ / MeOH / 水 (4+4+1) 溶液系中のシリカゲル (SGF-250) 連続薄層クロマトグラフィ工程、及び MeOH / 水 / 15M NH₄OH (20+80+2) 溶液系中の逆相 (RPF-250) 薄層ク

50

ロマトグラフィで精製した。

実施例 1 2

N - (5 - カルボキシペンチル) - トピラメート : (2 - アミノエチル) - チオウレイド - フルオレッセインの調製

本実施例は、フルオレッセンス偏光免疫学的測定法におけるトレーサー (T C A : F T E D トレーサー) として有用な、N - (5 - カルボキシペンチル) - トピラメート : (2 - アミノエチル) - チオウレイド - フルオレッセインの調製を記述する。

実施例 2 の記述から調製した N - (5 - カルボキシペンチル) - トピラメートのナトリウム塩 250mg を、ジメチルアセトアミド 2ml に加えた。N - ヒドロキシスルホスクシンイミドのナトリウム塩 0.1g を加え、得られる反応混合物を 10 分間攪拌し、3.15M ジシクロヘキシルカルボジイミド (ジメチルアセトアミド中) 0.2ml を加えた。反応混合物を 30 分間攪拌し、N - ヒドロキシスクシンイミド 0.05g と 3.15M ジシクロヘキシルカルボジイミド (ジメチルアセトアミド中) 0.1ml を連続的に加えた。さらに 10 分攪拌した後、ピリジン 0.025ml を加え、反応混合物を終夜室温で攪拌して活性エステルを得た。過剰の (2 - アミノエチル) - チオウレイド - フルオレッセイン (N a O H アルカリ性のメタノール中) を、活性エステルを含む反応混合物 0.5ml を加えた。反応は、30 分間室温で行った。得られる N - (5 - カルボキシペンチル) - トピラメート : (2 - アミノエチル) - チオウレイド - フルオレッセインを、C H C l ₃ / M e O H / 水 (4+4+1) 溶液系中のシリカゲル (S G F - 250) 薄層クロマトグラフィ、及び M e O H / 水 / 15 M N H ₄ O H (27.5+72.5+2) 溶液系中の逆相薄層クロマトグラフィの連続工程で精製した。

実施例 1 3

N - (5 - カルボキシペンチル) - トピラメート : (2 - アミノエチル) - ウレイド - フルオレッセインの調製

本実施例は、フルオレッセンス偏光免疫学的測定法におけるトレーサー (T C A : F A M C O - E トレーサー) として有用な、N - (5 - カルボキシペンチル) - トピラメート : (2 - アミノエチル) - ウレイド - フルオレッセインの調製を記述する。

実施例 2 の記述から調製した N - (5 - カルボキシペンチル) - トピラメートのナトリウム塩 473mg を、ジメチルアセトアミド 5ml に加えて反応混合物を得た。N - ヒドロキシスクシンイミド 399mg を加え、反応混合物を 5 分間室温で攪拌し、その後 5 分間氷浴中で攪拌しながら冷却した。1M ジシクロヘキシルジカルボジイミド (テトラヒドロフラン中) 1ml を加え、反応混合物を 1 5 分間氷浴上で攪拌し、その後終夜室温で攪拌した。

実施例 9 の記述から調製した、F A M C O - E 0.108mmol を含む M e O H 20ml を、反応混合物に加えた。p H を、少量のトリエチルアミンを加えて p H 8 から 9 に維持した。反応を、2 時間室温で行い、T C A : F A M C O - E トレーサーを得、その後、反応混合物を、9 倍の 0.5% N H ₄ O H (0.075M) で希釈し、M e O H / 水 / 15 M N H ₄ O H (10+90+0.5) で平衡化した低圧 C18 HPLC 吸着剤カラム (20g) を適用した。このカラムをカラム容量の約 10 倍の M e O H / 水 / 15 M N H ₄ O H (10+90+0.5) で洗浄して混入物を除去し、その後、T C A : F A M C O - E トレーサーを、M e O H / 水 / 15 M N H ₄ O H (15+85+0.5) で溶出した。T C A : F A M C O - E トレーサーを、同様の条件下、C18 クロマトグラフィで濃縮したが、溶出は、メタノール / トリエチルアミン (10+0.04v/v) で行った。その後、T C A : F A M C O - E トレーサーは、M e O H / C H C l ₃ / 水 (4+4+1) 溶液系中のシリカゲル (S G F - 1000) プレート薄層クロマトグラフィで精製し、この中でトレーサーは約 0.6 の R_f を示した。トレーサーバンドをメタノール / トリエチルアミン (10+0.04) でシリカプレートから溶出し、溶液の p H をトリエチルアミンで p H 8 から 9 に調節し、トレーサーを -10 で保存した。

実施例 1 4

N - (5 - カルボキシペンチル) - トピラメート : (2 - アミノエチル) - ウレイド - フルオレッセイン異性体 II の調製

本実施例は、フルオレッセンス偏光免疫学的測定法におけるトレーサー (T C A : F A M C O - E トレーサー異性体 II) として有用な、N - (5 - カルボキシペンチル) - トピラ

メート：(2-アミノエチル)-ウレイド-フルオレッセイン異性体IIの調製を記述する。

本実施例で使用したFAMCO-E異性体IIを、フルオレッセイン異性体II(6-アミノフルオッセイン)を、フルオレッセイン異性体I(5-アミノフルオッセイン)の代わりに合成で使用し、粗粉体を、メタノール水/15M NH₄OH(10+90+2)溶液系を用いた逆相プレート薄層クロマトグラフィで精製したことを除き、FAMCO-E異性体Iの調製について実施例9に記述した方法により合成しかつ精製した。FAMCO-Eを、メタノール溶液として-10 で保存した。

実施例2の記述から調製したN-(5-カルボキシペンチル)-トピラメートのナトリウム塩25mgを、ジメチルアセトアミド0.25mlに加えて反応混合物を得た。N-ヒドロキシスクシンイミド10mgを加えた。反応混合物を、攪拌し、氷浴中で冷却し、1Mジシクロヘキシルカルボジイミド(テトラヒドロフラン中)0.05mlに加えた。反応混合物を、30分以上氷浴上で攪拌し、その後2時間室温で攪拌した。過剰のFAMCO-E(異性体II)溶液を加え、反応を、1時間室温で、pHをトリエチルアミンを必要に応じて加えて7以上に維持して行った。反応混合物を1時間外界温度でインキュベートしてTCA:FAMCO-Eトレーサー異性体IIを得た。その後、トレーサーを、MeOH/水/15M NH₄OH(25+75+2)溶液系中の逆相プレート(RPF-250)薄層クロマトグラフィで精製した。

実施例15

9-カルボキシメチル-トピラメート：(2-アミノエチル)-ウレイド-フルオレッセインの調製

本実施例は、フルオレッセス偏光免疫学的測定法におけるトレーサー(9-CMT:FAMCO-Eトレーサー)として有用な、9-カルボキシメチル-トピラメート：(2-アミノエチル)-ウレイド-フルオレッセインの調製を記述する。

実施例3の記述から調製した9-カルボキシメチル-トピラメート12.4mgを、ジメチルアセトアミド0.20mlに加えた。N-ヒドロキシスクシンイミド12.9mgを加えた後、1Mジシクロヘキシルカルボジイミド(テトラヒドロフラン中)0.05mgを加え、反応混合物を室温で2.5時間インキュベートした。過剰のFAMCO-E(メタノール中)を加えた後、トリエチルアミン(9μl)を加えてpHを8.5に調節した。反応混合物を、60分間室温で攪拌し、その後、1N NaOH0.05mgを加え、反応混合物を振り混ぜた。更に15分室温でインキュベートした後、1N HCl0.05mlを加えて最終pH8.5とし、9-CMT:FAMCO-Eトレーサーを得た。トレーサーを、CHCl₃/MeOH/水(50+50+1)溶液系中のシリカゲル(SGF-250)薄層クロマトグラフィ(SGF-250)精製した。

実施例16

N-カルボキシメチル-トピラメート：5-(((N-ビオチノイル)アミノ)ヘキサノール)アミノ)ペンチルアミンの調製

本実施例は、ビオチン-アビジン-基準免疫学的測定法におけるトレーサーとして有用な、N-カルボキシメチル-トピラメート：5-(((N-ビオチノイル)アミノ)ヘキサノール)アミノ)ペンチルアミン結合(TGA-R:ビオチン)の調製を記述する。

N-カルボキシメチル-トピラメート(実施例1の記述で調製)9mg、N-ヒドロキシスクシンイミド3.3mg、5-(((N-ビオチノイル)アミノ)ヘキサノール)アミノ)ペンチルアミン(Molecular Probes、Eugene、Oregon)8.4mgを、ジメチルアセトアミド0.3mlに加え、反応混合物を得た。反応混合物を、氷/メタノール浴中で冷却し、1Mジシクロヘキシルカルボジイミド(テトラヒドロフラン中)0.025mlを加えた。反応混合物を数分間氷/メタノール浴上で攪拌し、その後、メタノール0.05mlを加えた。反応混合物を終夜室温でインキュベートした。冷却中、結晶が生成した。反応混合物を-20 で1時間置き、不溶性物質を遠心分離して除去した。N-カルボキシメチル-トピラメート：ビオチン誘導体を、MeOH/CHCl₃/水(20+80+1)溶液系を用いたシリカゲル(SGF-250)薄層クロマトグラフィで可溶性の画分から精製した。生成物を、ほんの少しのTLCプレートに0.2% KMnO₄の1N H₂SO₄溶液をスプレーして可視化した。適当なバンドを、残りのプレート(可視化のためにスプレーしていない)からこすり取り、シリカからメタノ

10

20

30

40

50

ールを用いて溶出した。競合的なアビジン - ビオチンフルオレッセンス偏向分析を使用して、調製中のビオチン濃度(トピラメート結合として)を評価した。濃度を約1.2mMとして評価した。TGA - R : ビオチン結合をメタノール貯蔵溶液として-10 で貯蔵した。

実施例 17

N - カルボキシメチルトピラメート : 5 - (((N - ビオチノイル) アミノ) ヘキサノイル) アミノ) ペンチルアミン複合体を用いる ELISA 免疫分析

本実施例は、N - カルボキシメチルトピラメート : 5 - (((N - ビオチノイル) アミノ) ヘキサノイル) アミノ) ペンチルアミン複合体 (TGA : R - ビオチン) を用いるトピラメートの具体的な ELISA 免疫分析を記載するものである。

モノクローナル抗トピラメート抗体を産生する 7B10 と称するハイブリドーマ細胞系を、実施例 4 に記載されるように調製した N - カルボキシメチルトピラメート : BSA (TGA : BSA) で免疫した Balb / c 雌マウスの脾臓細胞から作製した。マウスに、完全フロイントアジュバントに乳化した 50 µg の TGA : BSA を腹腔内に 1 回免疫した。その後、マウスに、不完全フロイントアジュバントに乳化した 50 µg の TGA : BSA を 3 ~ 5 週間毎に注射して合計 5 回免疫した。次に、マウスに 50 µg の N - (5 - カルボキシペンチル) トピラメート : BSA (実施例 6 に記載されたように調製した) を腹腔内に 1 回追加免疫した。脾臓細胞を用いて融合パートナーとして NS1 マウスミエローマ系を用いてハイブリドーマ細胞系を調製した。下記の ELISA 法を用いてハイブリドーマ培養液中のトピラメート抗体の存在をスクリーニングした。ストレプトアビジンに固定化した TGA : R - ビオチンに結合したがストレプトアビジン単独には結合しない抗体を確認のために選択した。スクリーニング結果によって 7B10 細胞系についてクローニ化を選択し、サブクローン 7B10 . 2 及びこのクローン 7B10 . 2 . 1 を樹立及び凍結保存した。

PBS (0 . 15 M NaCl 及び 0 . 01 % チメロサルを含有する 0 . 01 M リン酸カリウムバッファー、pH 7 . 4) 中 0 . 1 µg/ml のストレプトアビジン溶液 (Molecular Probes, オレゴン州ユージーン) を調製し、0 . 1 ml のストレプトアビジン溶液をピアスィムノウェアポリスチレンマルチウェルプレートの各ウェルにピペットで分注した。ストレプトアビジン溶液をプレート上で 4 で一晩インキュベートした。他の工程は全て周囲温度で行った。

ウェルを 0 . 1 % (v/v) トウイーン 20 (以後、PBS / トウイーン) を含有する PBS で 4 回洗浄し、はじいて大部分の液を全て取り除いた。実施例 16 に記載されたように調製した TGA : R - ビオチンの貯蔵液 (メタノール中約 1 . 2 mM) を PBS / トウイーンで 1 / 5000 に希釈し、0 . 1 ml の希釈 TGA : R - ビオチン溶液を全ウェルに加えた。室温で 3 時間後、TGA : R - ビオチン溶液を吸引し、プレートを PBS / トウイーンで 4 回洗浄した。PBS / トウイーン中のトピラメートの貯蔵溶液を調製して濃度が 20、200 及び 2000 ng/ml のトピラメート標準液を得た。トピラメート標準液 (0 . 05 ml) をウェルに加えて最終濃度 0、10、100 及び 1000 ng/ml を得た。トピラメート代謝物、9 - ヒドロキシトピラメート (Ortho/Mcneil Pharmaceuticals, カタログ No. RJW-38214-000) を一連のウェルに加えて最終濃度 100、1000 及び 10,000 ng/ml を得た。

ハイブリドーマ細胞系 7B10 からの細胞培養液を PBS / トウイーンで 1 / 128 に希釈し、0 . 05 ml を各ウェルに加えた (最終抗体希釈度 1/256)。プレートを周囲温度で 2 時間インキュベートした。次に、プレートを PBS / トウイーンで 4 回洗浄した。ヤギ抗マウス IgG - ホースラディッシュペルオキシダーゼ複合体 (CALTAG Laboratories, カリフォルニア州サウスサンフランシスコ) を PBS / トウイーンで 1 / 500 に希釈し、各ウェル (0 . 1 ml) に加えた。室温で 2 時間後、プレートを PBS / トウイーンで 4 回洗浄し、0 . 125 M 酢酸ナトリウム / 0 . 075 M クエン酸バッファー、pH 4 . 0 中 2 . 6 mM H₂O₂ を含む 0 . 1 ml の 0 . 31 mg/ml テトラメチルベンジジンを加えることにより分析した。4 分後、各ウェルに 0 . 1 ml の 1 M 硫酸を加えることにより反応を停止した。ダイナテック MR5000 プレートリーダーで 450 nm の黄色生産物を読み取った。分析の結

10

20

30

40

50

果を下記の表3に示す。表中の B / B_0 は、試験試料の 450 nmにおける吸光度を競合する被検体の存在しないときに得られた吸光度 (B_0) で割った比率である。

表3

被検体(ng/ml)

<u>トピラメート</u>	A_{450nm}	B/B_0	
0	0.696	1.00	
10	0.599	0.86	10
100	0.247	0.35	
1,000	0.028	0.04	
10,000	ND *	ND	
<u>9-ヒドロキシ-</u>			
<u>トピラメート</u>			
0	0.659	1.00	20
10	ND	ND	
100	0.663	1.01	
1,000	0.651	0.99	
10,000	0.466	0.71	

* ND: 測定せず

表3に示されるように、トピラメートは100 ng/ml未満で抗体結合を50%より大きく阻害し、10,000 ng/mlの代謝物9-ヒドロキシトピラメートにおいては50%未満の阻害が見られた。分析から、トピラメート代謝物9-ヒドロキシトピラメートに対する7B10モノクローナル抗体の交差反応性が1%未満であることが証明された。

実施例18

N-カルボキシメチルトピラメート：(2-アミノエチル)チオウレイドフルオレセインを用いる蛍光偏光免疫分析

本実施例は、トレーサーとしてN-カルボキシメチルトピラメート：(2-アミノエチル)チオウレイドフルオレセイン(TGA:FTEDトレーサー)を用いてトピラメートの具体的な蛍光偏光免疫分析(FPIA)を記載するものである。本実施例及び次の実施例に用いられる具体的な自動蛍光偏光免疫分析系に続いて実施例に用いられる抗体の調製を下記に述べる。

自動蛍光偏光免疫分析

競合免疫分析形式を用いて自動TDX^R 偏光アナライザー(テキサス州アーピングのアポットラボラトリーズ)を用いる蛍光偏光免疫分析を行った。自動分析を行う試薬としては、抗被検体抗体(抗トピラメート抗体)又は“A”、フルオレセイン：トピラメート類似体複合体(トレーサー又は“T”)、及び前処理バッファー又は“B”を含めた。実施例に記載された自動分析の検定は、ヒト血清にスパイクした指定濃度のトピラメートを含む6種類の一連の検定物質を用いて得られた。

自動分析は、アポットラボラトリーズ、テキサス州アーピングから入手しうる文献に詳細に記載されている。本明細書に記載される実施例は全て、機器の“モード1”ピペット分注順序を用いた。患者試料(ニート血清又は血漿)をTDX^R 用に設計された円形カル

30

40

50

セルのプラスチック試料カップに入れた。カルーセルをA、T及びBを含む試薬キットと共に機器に入れた。分析の最初のサイクルにおいては、患者試料のTDx Systems^Rバッファーによる前希釈を試料カップの第2ウェルで行い、試料(バッファーで希釈した患者試料)の全容量の1/2を試薬キットからの0.025mlの前処理バッファーBと共に試料キュベット(全量約1ml)に入れる。ブランクの蛍光を読み取る。第2ピペット分注サイクルにおいては、希釈した患者試料の第2容量をキュベットの全量約2mlに0.025mlのトレーサー(典型的には0.5~10ピコモル/試験管)及び0.025mlの抗体と共に加える。反応が完結した後、アナライザーがガラスキュベット中の蛍光偏光を読み取り、その数値をヒト血清中で処方した薬剤(検定物質)の6種の濃度を測定することにより作られた検定曲線と比較する。0.5~5マイクロリットルの患者血清又は血漿の等価量は、自動分析における典型的な試料サイズである(2mlの全試料容量に加えた)。蛍光偏光は、ミリ偏光単位(mP)で示される。TDx^Rアナライザーは、検定曲線と比較することにより試料中の被検体濃度を自動的に計算する。

10

実施例においては、免疫分析キット中の抗体試薬(80x貯蔵溶液)とガラスキュベット中の最終希釈液双方の抗トピラメート抗体希釈液を記載する。実施例においては、免疫分析キット中に存在する試薬の80x貯蔵溶液としてトレーサー希釈剤と前処理バッファー(B)を記載する。

ポリクローナルヒツジ抗トピラメート抗体

初回注射用完全フロイントアジュバント及び次回注射用不完全フロイントアジュバント中のエマルジョンとして全ての免疫原を調製した。ヒツジに1mlの免疫原(タンパク質として)を皮下に或いは50µgの免疫原をリンパ腺に直接免疫した。ヒツジに典型的には3週間毎に注射した。マイクロタイタープレート内のストレプトアビジン上に固定化したTGA:R-ビオチンに結合したヒツジ抗体がウサギ抗ヒツジIgG-ホースラディッシュペルオキシダーゼ複合体(Chemicon International,カリフォルニア州テメキュラ)を用いて検出される以外は上記マウスモノクローナル標品について記載されたELISAを用いて血清をスクリーニングした。

20

3匹のヒツジからの抗血清を実施例に用いた。ヒツジを下記のように免疫した。

<u>ヒツジ No.</u>	<u>免疫原</u>	<u>免疫経路</u>
787	TGA:BSA	リンパ腺
662	9CMT:BSA	皮下
650	TCA:BSA	皮下

30

ヒツジNo.787由来の3種の抗体標品を実施例に使用した。これらの標品を787-1、787-2及び787-3としてコードする。ヒツジ787を免疫するために用いるTGA:BSAを実施例4に記載されるように調製した。ヒツジ662を免疫するために用いられる9-CMT:BSAを実施例5に記載されるように調製した。ヒツジ650を免疫するために用いるTCA:BSAを実施例6に記載されるように調製した。

TGA:FTEDトレーサーを用いる蛍光偏光免疫分析においては、上記のように調製しかつTDx Systems^Rバッファー(0.1M KPi、pH7.5、0.1%アジ化ナトリウム及び0.01mg/mlウシグロブリン、pH7.0~7.5を含有する)で1/24(最終濃度1/1920)に希釈したヒツジ抗体No.787-1を用いて検定曲線を作った。トレーサーとして実施例7に記載されたように調製しかつ0.01M KPi、0.15M NaCl、0.1%w/vアジ化ナトリウム、1mg/mlウシグロブリン、pH7.4~7.5に希釈したTGA:FTEDトレーサーを用いた。前処理バッファーは、TDx Systems^Rバッファーとした。検定物質の試料容量は1µlとした。

40

表4は、6種のトピラメート検定物質を用いて得られた偏光値を示す表である。本表及び次表においては、偏光値をミリ偏光単位で示す。

表4

トピラメート ($\mu\text{g/ml}$)	偏光
0	235.09
2.5	222.06
5.0	208.12
10.0	184.83
25.0	141.89
50.0	110.42

10

実施例19

N - カルボキシメチルトピラメート：フルオレセインチオセミカルバジドを用いる蛍光偏光免疫分析

本実施例は、トレーサーとして実施例8に記載されたように調製したN - カルボキシメチルトピラメート：フルオレセインチオセミカルバジド (T G A : F T S C トレーサー) を用いる具体的な蛍光偏光免疫分析を記載するものである。TDx^R 自動偏光アナライザーを用いて蛍光偏光免疫分析を行い T G A : F T S C トレーサーを用いて次のことを除き実施例18に記載されるように検定曲線を作った。本実施例においては、抗体は実施例18に記載されるように調製しかつ1 / 24 (最終抗体希釈度1/1920) に希釈したヒツジ抗体No.787-1とした。トレーサー希釈剤はTDx Systems^R バッファーとした。検定物質の試料容量は1.3 μl とした。分析の結果を下記表5に示す。

20

表5

トピラメート ($\mu\text{g/ml}$)	偏光
0	224.54
2.5	212.83
5.0	198.29
10.0	178.85
25.0	145.09
50.0	122.07

30

実施例20

N - カルボキシメチルトピラメート：(2 - アミノエチル) ウレイドフルオレセインを用いる蛍光偏光免疫分析

本実施例は、トレーサーとして実施例8に記載されたように調製したN - カルボキシメチルトピラメート：(2 - アミノエチル) ウレイドフルオレセイン (T G A : F A M C O - E トレーサー) を用いるトピラメートの具体的な蛍光偏光免疫分析を記載するものである。TDx^R 自動偏光アナライザーを用いて蛍光偏光免疫分析を行い T G A : F A M C O - E トレーサーを用いて次のことを除き実施例18に記載されるように検定曲線を作った。本実施例においては、抗体は実施例18に記載されるように調製しかつ1 / 80 (最終抗体希釈度1/6400) に希釈した抗体No.787-2とした。分析の結果を下記表6に示す。

40

表 6

トピラメート ($\mu\text{g/ml}$)	偏光
0	223.68
2.5	194.69
5.0	173.33
10.0	145.51
25.0	109.34
50.0	86.36

10

実施例 2 1

N - カルボキシメチルトピラメート：グリシルフルオレセインアミドを用いる蛍光偏光免疫分析

本実施例は、トレーサーとして実施例 1 1 に記載されたように調製した N - カルボキシメチルトピラメート：グリシルフルオレセインアミド (T G A : G l y - F A M トレーサー) を用いるトピラメートの具体的な蛍光偏光免疫分析を記載するものである。TDx^R 自動偏光アナライザーを用いて蛍光偏光免疫分析を行い T G A : G l y - F A M トレーサーを用いて次のことを除き実施例 1 8 に記載されるように検定曲線を作った。本実施例においては、抗体は実施例 1 8 に記載されるように調製しかつ 1 / 8 0 (最終抗体希釈度 1 / 6400) に希釈した抗体 No. 787-2 とした。分析の結果を下記表 7 に示す。

20

表 7

トピラメート ($\mu\text{g/ml}$)	偏光
0	193.28
2.5	180.25
5.0	162.38
10.0	141.51
25.0	109.17
50.0	89.10

30

実施例 2 2

N - (5 - カルボキシペンチル) トピラメート：(2 - アミノエチル) チオウレイドフルオレセインを用いる蛍光偏光免疫分析

本実施例は、トレーサーとして実施例 1 2 に記載されたように調製した N - (5 - カルボキシペンチル) トピラメート：(2 - アミノエチル) チオウレイドフルオレセイン (T C A : F T E D トレーサー) を用いるトピラメートの具体的な蛍光偏光免疫分析を記載するものである。TDx^R 自動偏光アナライザーを用いて蛍光偏光免疫分析を行い T C A : F T E D トレーサーを用いて次のことを除き実施例 1 8 に記載されるように検定曲線を作った。本実施例においては、抗体は実施例 1 8 に記載されるように調製しかつ 1 / 1 0 0 (最終希釈度 1 / 8000) に希釈した抗体 No. 787-2 とした。トレーサーを 0 . 0 1 M K P i 、 p H 7 . 5 、 0 . 1 % w / v アジ化ナトリウム、1 mg / ml ウシ グロブリンで希釈した。分析の結果を下記表 8 に示す。

40

表8

トピラメート ($\mu\text{g/ml}$)	偏光
0	245.78
2.5	200.79
5.0	172.41
10.0	139.21
25.0	97.70
50.0	75.50

10

実施例 2 3

N - (5 - カルボキシペンチル) トピラメート : (2 - アミノエチル) ウレイドフルオレ
セインを用いる蛍光偏光免疫分析

本実施例は、トレーサーとして実施例 1 3 に記載されたように調製した N - (5 - カルボ
キシペンチル) トピラメート : (2 - アミノエチル) チオウレイドフルオレセイン (T C
A : F A M C O - E トレーサー) を用いるトピラメートの具体的な蛍光偏光免疫分析を記
載するものである。TDx^R 自動偏光アナライザーを用いて蛍光偏光免疫分析を行い T
C A : F A M C O - E トレーサーを用いて次のことを除き実施例 1 8 に記載されるように
検定曲線を作った。本実施例においては、抗体は実施例 1 8 に記載されるように調製しか
つ 1 / 9 0 (最終希釈度 1/7200) に希釈した抗体 No.787-2 とした。トレーサー希釈剤は、
TDx Systems^R バッファーとした。検定物質の試料容量は 0 . 7 μl とした。分析の結果
を下記表 9 に示す。

20

表9

トピラメート ($\mu\text{g/ml}$)	偏光
0	240.92
2.5	204.13
5.0	180.44
10.0	150.23
25.0	109.96
50.0	87.83

30

実施例 2 4

N - (5 - カルボキシペンチル) トピラメート : (2 - アミノエチル) ウレイドフルオレ
セイン、異性体 I I を用いる蛍光偏光免疫分析

本実施例は、トレーサーとして実施例 1 4 に記載されたように調製した N - (5 - カルボ
キシペンチル) トピラメート : (2 - アミノエチル) ウレイドフルオレセイン、異性体 I
I (T C A : F A M C O - E トレーサー、異性体 I I) を用いるトピラメートの具体的な
蛍光偏光免疫分析を記載するものである。TDx^R 自動偏光アナライザーを用いて蛍光
偏光免疫分析を行い T C A : F A M C O - E トレーサー、異性体 I I を用いて次のことを
除き実施例 1 8 に記載されるように検定曲線を作った。本実施例においては、抗体は実施
例 1 8 に記載されるように調製しかつ 0 . 1 M K P i、0 . 1 % アジ化ナトリウム、p H
7 . 4 ~ 7 . 6 で 1 / 6 8 (最終希釈度 1/5440) に希釈した抗体 No.787-3 とした。トレー
サー希釈剤は、0 . 1 M K P i、0 . 0 0 5 % ジオクチルナトリウムスルホスクシネート

40

50

(D O S S)、0.1%w/vアジ化ナトリウム、1mg/mlウシ グロブリンとした。前処理バッファーは、20mMKPi、pH4.0、0.1%D O S Sとした。検定物質の試料容量は1.4 μ lとした。分析の結果を下記表10に示す。

表10

トピラメート (μ g/ml)	偏光
0	227.24
2	184.65
4	157.73
8	128.78
16	100.50
32	76.86

10

実施例25

9-カルボキシメチルトピラメート：(2-アミノエチル)ウレイドフルオレセインを用いる蛍光偏光免疫分析

本実施例は、トレーサーとして実施例13に記載されたように調製した9-カルボキシメチルトピラメート：(2-アミノエチル)ウレイドフルオレセイン(9-CMT：FAMCO-Eトレーサー)を用いるトピラメートの具体的な蛍光偏光免疫分析を記載するものである。TDx^R自動偏光アナライザーを用いて蛍光偏光免疫分析を行い9-CMT：FAMCO-Eトレーサーを用いて次のことを除き実施例18に記載されるように検定曲線を作った。本実施例においては、抗体は実施例18に記載されるように調製しかつ1/10(最終希釈度1/800)に希釈したヒツジ抗体No.662とした。トレーサー希釈剤は、TDx Systems^Rバッファーとした。検定物質の試料容量は5 μ lとした。分析の結果を下記表11に示す。

20

表11

トピラメート (μ g/ml)	偏光
0	202.90
4.0	185.60
8.0	174.58
16.0	159.91
32.0	143.77
64.0	124.42

30

40

実施例26

N-カルボキシメチルトピラメート：(2-アミノエチル)ウレイドフルオレセインを用いる蛍光偏光免疫分析

本実施例は、トレーサーとして実施例10に記載されたように調製したN-カルボキシメチルトピラメート：(2-アミノエチル)ウレイドフルオレセイン(TGA：FAMCO-Eトレーサー)を用いるトピラメートの具体的な蛍光偏光免疫分析を記載するものである。TDx^R自動偏光アナライザーを用いて蛍光偏光免疫分析を行いTGA：FAMCO-Eトレーサーを用いて次のことを除き実施例18に記載されるように検定曲線を作った。本実施例においては、抗体は実施例18に記載されるように調製しかつ1/10に希

50

釈した（最終希釈度1/800）抗体No.650とした。トレーサー希釈剤は、TDx Systems^Rバッファーとした。検定物質の試料容量は2 µlとした。分析の結果を下記表12に示す。

表12

トピラメート (µg/ml)	偏光
0	229.22
2	213.93
4	203.44
8	186.89
16	167.79
32	145.54

10

実施例27

トピラメートの蛍光偏光免疫分析とガスクロマトグラフィー分析の比較

本実施例は、トピラメートの具体的な蛍光偏光免疫分析の結果とトピラメート治療を受けている患者から得られた117個の血漿試料を用いるガスクロマトグラフィー分析との比較を記載するものである。

20

蛍光偏光免疫分析は、0.1M KPi、pH7.4~7.6、0.005%ジオクチルナトリウムスルホスクシネート(DOSS)、0.1%w/vアジ化ナトリウム、1mg/mlウシグロブリンで希釈したN-(5-カルボキシペンチル)トピラメート:(2-アミノエチル)ウレイドフルオレセイントレーサー(TCA:FAMCO-Eトレーサー)を用いた。抗体は、実施例18に記載されるように調製しかつ0.1%w/vアジ化ナトリウムを含有する0.1M KPi、pH7.4~7.6で1/68(最終希釈度1/5440)に希釈したヒツジ抗体No.787-3を使用した。前処理バッファーは、0.1%ジオクチルナトリウムスルホスクシネート(DOSS)を含有する20mMKPi、pH4.0とした。試料容量は1.4 µlとした。検定曲線は、実施例18に記載される自動分析を用いてTDx^Rアナライザーで作った。6種の検定物質とヒト血清中0、2、4、8、16及び32 µg/mlのトピラメートとした。試料を2回の実験で分析し、比較方法のために平均値を用いた。窒素リン検出によるガスクロマトグラフィーを、Cooper, JM. Stubbs, RJ & Palmer, ME, Pharmaceutical Research 8(10 Suppl.), s19(1991)に記載されるように行った。この方法は多くを要求しており、感度、精度及び特異的であることがわかった。

30

試料の2~32 µg/mlトピラメートの範囲にわたる検定を用いて2つの方法の直接比較を行った。117個の患者試料に対する蛍光偏光免疫分析とガスクロマトグラフィーの結果の比較から下記の関係が示された。

$$(FPIA値) = -0.147 + 0.985 (GC値) \quad r = 0.9935$$

本実施例で証明されるように、本発明の具体的な試薬を用いる蛍光偏光免疫分析は、トピラメートのガスクロマトグラフィー分析法に対して優れた相関を示した。

40

実施例28

抗体交差反応性の定量

本実施例は、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体組成物とトピラメート代謝生成物9-ヒドロキシトピラメートとの交差反応量の定量を記載するものである。

ヒツジにおいて行われた2つのポリクローナル抗体標品(ヒツジ抗体No.662及び787-3)を実施例18に記載されるように調製した。ヒツジ抗体No.662及び9-カルボキシメチルトピラメート:(2-アミノエチル)ウレイドフルオレセイントレーサー(9-CMT:FAMCO-Eトレーサー)を用いる標準曲線は、実施例25に記載されるように作られる。その検定曲線を用いてヒト血清中の既知量の9-ヒドロキシトピラメートを分析した

50

。ヒツジ抗体No.787-3とN-(5-カルボキシペンチル)トピラメート：(2-アミノエチル)ウレイドフルオレセイントレーサー(TCA:FAMCO-Eトレーサー)の標準曲線を実施例27に記載されるように作った。その検定曲線を用いてヒト血清中の既知量の9-ヒドロキシトピラメートを分析した。

トピラメートの測定濃度を用いて次のように抗体標品と9-ヒドロキシトピラメートとの交差反応量を算出した。(%交差反応性) = (トピラメートの測定濃度 $\mu\text{g/ml} \times 100$) / (添加した9-ヒドロキシトピラメート濃度 $\mu\text{g/ml}$)。その分析結果を表13に示す。

表13*

10

抗体 No.	9-ヒドロキシ		交差反応性 (%)
	トピラメート	トピラメート	
<u>662</u>	3.1	2.6	83
	6.2	5.2	83
	12.5	9.9	79
	25.0	16.3	63
	50.0	26.5	53
<u>787-3</u>	4	0.51	12.8
	8	0.84	10.5
	32	2.18	6.8

20

*表中の9-ヒドロキシトピラメートは試料中の9-ヒドロキシトピラメート濃度 $\mu\text{g/ml}$ である。トピラメートはトピラメートの測定濃度 $\mu\text{g/ml}$ である。

30

本実施例からトピラメート類似体がトピラメートのスルファメート部分で誘導された免疫原を用いる場合に市販の分析において使用するのに十分に特異的であったことが証明される。トピラメート類似体が9-炭素メチル基で誘導された免疫原を用いて調製された抗血清は、9-ヒドロキシトピラメートの量が試料中のトピラメート量に比べて相対的に少ない免疫分析に有用な抗体を示した。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
G 0 1 N 33/94	(2006.01)	G 0 1 N 33/94	
C 1 2 N 15/02	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	C
C 1 2 R 1/91	(2006.01)	C 1 2 P 21/08	
		C 1 2 R 1:91	

(74)代理人

弁理士 竹内 英人

(74)代理人

弁理士 今城 俊夫

(74)代理人

弁理士 小川 信夫

(74)代理人

弁理士 村社 厚夫

(74)代理人

弁理士 西島 孝喜

(74)代理人

弁理士 箱田 篤

(72)発明者 ステングレイン ケニス ジェイ

アメリカ合衆国 オレゴン州 97201 ポートランド サウス ウェスト リンカーン ストリート 301 #1215

(72)発明者 カウリー ダニエル ビー

アメリカ合衆国 オレゴン州 97007 ビーバートン サウス ウェスト ワンハンドレッド アンドフォーティナイン ストリート 5465

(72)発明者 マリアノフ ブルース イー

アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 18938 ニュー ホープ アクアトン ロード 3204

(72)発明者 ソーギ カーク エル

アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 19477 ブルーベル アーリントン ロード 1725

合議体

審判長 鈴木 恵理子

審判官 引地 進

審判官 平田 和男

(56)参考文献 特開昭62-14064(JP,A)

J. Med. Chem. (1987) Vol. 30, p. 880-887

Drug Metabolism and Disposition (1995) Vol. 23, No. 1, p. 90-93

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K16/00-46

REGISTRY

CA

MEDLINE

BIOSIS

WPIS

JSTPLUS