



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104160273 B

(45)授权公告日 2016.11.16

(21)申请号 201380012686.X

(22)申请日 2013.01.31

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 104160273 A

(43)申请公布日 2014.11.19

(30)优先权数据  
13/413925 2012.03.07 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2014.09.05

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2013/024054 2013.01.31

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02013/133917 EN 2013.09.12

(73)专利权人 西门子医疗保健诊断公司  
地址 美国纽约州

(72)发明人 T.Q.魏

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
72001  
代理人 周铁 石克虎

(51)Int.Cl.  
*G01N 33/53*(2006.01)  
*C12P 21/08*(2006.01)  
*C07K 16/00*(2006.01)

审查员 陈伟潘

权利要求书1页 说明书17页 附图4页

(54)发明名称

用于免疫抑制剂药物的夹心测定

(57)摘要

公开了用于测定怀疑含有免疫抑制剂药物的样品中的免疫抑制剂药物的方法。所述方法包括在介质中组合提供样品、针对免疫抑制剂药物的第一单克隆抗体和针对免疫抑制剂药物的第二单克隆抗体。第二单克隆抗体结合除了第一单克隆抗体结合免疫抑制剂药物的部分以外的免疫抑制剂药物的部分。在用于第一单克隆抗体和第二单克隆抗体结合免疫抑制剂药物的条件下孵育介质。检查该介质中包含免疫抑制剂药物、第一单克隆抗体和第二单克隆抗体的免疫复合体的存在。免疫复合体的存在和/或量表明样品中免疫抑制剂药物的存在和/或量。

1. 用于测定怀疑含有他克莫司的样品中的他克莫司的方法,所述方法包括:

(a) 在介质中组合提供:

(i) 所述样品,

(ii) 针对他克莫司的第一单克隆抗体,和

(iii) 针对他克莫司的第二单克隆抗体,其中所述第二单克隆抗体结合除了所述第一单克隆抗体结合他克莫司的部分以外的他克莫司的部分,

(b) 在用于所述第一单克隆抗体和所述第二单克隆抗体结合所述样品中的他克莫司的条件下孵育所述介质,和

(c) 检查所述介质中包含他克莫司、所述第一单克隆抗体和所述第二单克隆抗体的免疫复合体的存在,所述免疫复合体的存在和/或量表明所述样品中他克莫司的存在和/或量;

所述第一单克隆抗体结合基本上由包括甲氧基和羟基取代基的C29-C34环和包括甲氧基取代基的C15组成的他克莫司的部分,且所述第二单克隆抗体结合基本上由C10-C14环的甲氧基和包括C22酮氧的C1-C26环的C19-C27组成的他克莫司的部分;或者

所述第一单克隆抗体针对包含在C22处连接至他克莫司的免疫原性载体的免疫原产生,且所述第二单克隆抗体针对包含在C32处连接至他克莫司的免疫原性载体的免疫原产生。

2. 根据权利要求1的方法,其中所述第一单克隆抗体和所述第二单克隆抗体中的一种包含信号产生系统的成员。

3. 根据权利要求1的方法,其中所述第一单克隆抗体和所述第二单克隆抗体中的一种结合至支持物。

4. 用于测定怀疑含有他克莫司的样品中的他克莫司的方法,所述方法包括:

(a) 在介质中组合提供:

(i) 所述样品,

(ii) 缔合磁性颗粒的针对他克莫司的第一单克隆抗体,和

(iii) 针对他克莫司的第二单克隆抗体,其中所述第二单克隆抗体结合除了所述第一单克隆抗体结合他克莫司的部分以外的他克莫司的部分,且其中所述第二单克隆抗体与酶缔合,

(b) 在用于所述第一单克隆抗体和所述第二单克隆抗体结合他克莫司的条件下孵育所述介质,和

(c) 检查所述介质中包含他克莫司和所述第一单克隆抗体和所述第二单克隆抗体的免疫复合体的存在,所述免疫复合体的存在和/或量表明所述样品中他克莫司的存在和/或量;

其中所述第一单克隆抗体结合基本上由包括甲氧基和羟基取代基的C29-C34环和包括甲氧基取代基的C15组成的他克莫司的部分,且其中所述第二单克隆抗体结合基本上由C10-C14环的甲氧基和包括C25羟基和C22酮氧的C1-C26环的C19-C27组成的他克莫司的部分。

## 用于免疫抑制剂药物的夹心测定

### [0001] 背景

[0002] 本发明涉及用于测定已知或怀疑含有一种或多种免疫抑制剂药物的样品(诸如患者样品)中的此类免疫抑制剂药物的化合物、方法和试剂盒。

[0003] 机体依赖于复杂的免疫应答系统来区分自身与非自身。有时,机体的免疫系统必须按顺序进行控制,以便增强缺陷应答或抑制过度应答。例如,当在人中移植器官诸如肾、心脏、心-肺、骨髓和肝脏,机体经常通过被称为同种异体移植排斥的过程排斥移植的组织。

[0004] 在治疗同种异体移植排斥中,频繁用药物治疗以受控的方式抑制免疫系统。免疫抑制剂药物是被小心地施用于移植受体以帮助防止非自身组织的同种异体移植排斥的治疗药物。免疫抑制剂药物可以如下分类:糖皮质激素、细胞抑制剂、抗体、作用于抑免蛋白(immunophilin)的药物、和其他药物,诸如干扰素、阿片剂INF结合蛋白、麦考酚酯、FTY720等。免疫抑制剂药物的具体类别包含作用于抑免蛋白的那些药物。抑免蛋白是具有生理意义的高亲和力的特异性结合蛋白的实例。目前已知抑免蛋白的两个不同的家族:亲环蛋白和巨菲蛋白(macrophilins),其中后者特异性结合,例如,他克莫司或西罗莫司。

[0005] 防止移植患者中的器官排斥的两种最常施用的免疫抑制剂药物是环孢菌素(CSA)和FK-506(FK或他克莫司)。在美国和其他国家中发现用作免疫抑制剂的另一种药物是西罗莫司,也称为雷帕霉素。雷帕霉素的衍生物也可用作免疫抑制剂。此类衍生物包括,例如,依维莫司等。

[0006] 可以部分通过小心控制患者中存在的药物水平来控制与一些免疫抑制剂药物相关的副作用。需要治疗性监测血液中免疫抑制剂药物和相关药物的浓度,以优化给药方案,以确保具有最小毒性的最大免疫抑制。尽管免疫抑制剂药物是非常有效的免疫抑制剂,但必须小心管理其使用,因为有效剂量范围通常是窄的且过度剂量可以导致严重的副作用。另一方面,太少剂量的免疫抑制剂可以导致组织排斥。因为免疫抑制剂药物的分布和代谢在患者之间变化很大,且由于不良反应的大范围和严重度,所以准确监测药物水平是必要的。

[0007] 因此,存在对于开发快速且准确的诊断方法来测量患者中免疫抑制剂药物或其衍生物的水平的需求。该方法应当能够完全自动化,且应当选择性地检测母体药物,同时尽可能减小由其代谢物的交叉反应性,或由怀疑含有免疫抑制剂药物的样品中的成分导致的不精确性。

### [0008] 概述

[0009] 根据本文描述的原理的一些实例涉及用于测定怀疑含有免疫抑制剂药物的样品中的免疫抑制剂药物的方法。所述方法包括在介质中组合提供样品、针对免疫抑制剂药物的第一单克隆抗体和针对免疫抑制剂药物的第二单克隆抗体。第二单克隆抗体结合除了第一单克隆抗体结合免疫抑制剂药物的部分以外的免疫抑制剂药物的部分。在用于第一单克隆抗体和第二单克隆抗体结合免疫抑制剂药物的条件下孵育介质。检查该介质中包含免疫抑制剂药物、第一单克隆抗体和第二单克隆抗体的免疫复合体的存在。免疫复合体的存在和/或量表明样品中免疫抑制剂药物的存在和/或量。

[0010] 根据本文描述的原理的一些实例涉及用于测定怀疑含有他克莫司的样品中的他克莫司的方法。所述方法包括在介质中组合提供样品、针对他克莫司的第一单克隆抗体和针对他克莫司的第二单克隆抗体。第二单克隆抗体结合除了第一单克隆抗体结合他克莫司的部分以外的他克莫司的部分。在用于第一抗体和第二抗体结合样品中的他克莫司的条件下孵育介质,并且检查该介质中包含他克莫司、第一单克隆抗体和第二单克隆抗体的免疫复合体的存在。免疫复合体的存在和/或量表明样品中他克莫司的存在和/或量。

[0011] 根据本文描述的原理的一些实例涉及用于测定怀疑含有他克莫司的样品中的他克莫司的方法。所述方法包括在介质中组合提供样品、缔合磁性颗粒的针对他克莫司的第一单克隆抗体和与酶缔合的针对他克莫司的第二单克隆抗体。第二单克隆抗体结合除了第一单克隆抗体结合他克莫司的部分以外的他克莫司的部分。在用于第一抗体和第二抗体结合样品中的他克莫司的条件下孵育介质,并且检查该介质中包含他克莫司、第一单克隆抗体和第二单克隆抗体的免疫复合体的存在。免疫复合体的存在和/或量表明样品中他克莫司的存在和/或量。

[0012] 附图简述

[0013] 图1是具有编号的他克莫司的化学式。

[0014] 图2是图1的化学式,其描绘根据本文所述的原理单克隆抗体结合的分子部分。

[0015] 图3是描绘根据本文所述的原理他克莫司夹心免疫测定的信号剂量响应曲线的图。

[0016] 图4是描绘根据本文所述的原理他克莫司ELISA夹心免疫测定的信号剂量响应曲线的图。

[0017] 具体实施方案的详述

[0018] 总体讨论

[0019] 本发明人已经发现,可以制备特异性结合免疫抑制剂药物分子的分开部分的单克隆抗体。这个发现是令人惊讶的,因为免疫抑制剂药物是半抗原,其是相对小的分子(分子量小于约2500,或小于约2000,或小于约1500,或小于约1000),并且不被认为具有多于一个抗体可以结合的位点。根据本文所述的原理,可以制备至少两种不同的抗体,其同时结合免疫抑制剂药物分子的分开部分。短语“针对免疫抑制剂药物的抗体”意指特异性结合免疫抑制剂药物且不在任何显著程度结合可以扭曲免疫抑制剂药物的分析的其他物质的抗体。特异性结合涉及相比于对其他分子实质上较差的识别,对于两种不同分子中的一种相对于另一种的特异性识别。另一方面,非特异性结合涉及相对独立于特定表面结构的分子之间的非共价结合。非特异性结合可以由几种因素导致,包括分子之间的疏水性相互作用。

[0020] 半抗原是能够特异性结合相应抗体,但本身不充当用于制备抗体的免疫原(或抗原)的化合物。因此,半抗原与用来产生抗体的免疫原性载体连接。

[0021] 同时结合免疫抑制剂药物上的两个不同位点的单克隆抗体的制备使得能够在夹心测定中使用此类抗体,其中所述免疫抑制剂药物被两种不同抗体同时结合以形成免疫复合体。对免疫抑制剂药物进行夹心测定的能力增强了测定对免疫抑制剂药物的灵敏度。此外,在涉及结合至支持物的一种单克隆抗体的夹心测定的情况下,该测定可以在杂质和样品的干扰物质存在的情况下进行,因为可以在已经使免疫抑制剂药物结合至支持物的单克隆抗体之后、但在引入第二单克隆抗体之前,将支持物与样品分离和并洗涤。

[0022] 术语“免疫抑制剂药物”包括作用于抑免蛋白的那些,诸如,但不限于,例如,环孢菌素(包括环孢菌素A、环孢菌素B、环孢菌素C、环孢菌素D、环孢菌素E、环孢菌素F、环孢菌素G、环孢菌素H、环孢菌素I)、他克莫司(FR-900506、FK506、PROGRAF<sup>®</sup>)、西罗莫司(雷帕霉素、RAPAMUNE<sup>®</sup>)和依维莫司(RAD、CERTICAN<sup>®</sup>)。

[0023] 抗体可以包括完整的免疫球蛋白或其片段,所述免疫球蛋白包括各种类型和同种型,诸如IgA、IgD、IgE、IgG1、IgG2a、IgG2b和IgG3、IgM等。其片段可以包括Fab、Fv和F(ab')<sub>2</sub>、Fab'等。此外,适当时可以使用免疫球蛋白的聚集体、聚合物和缀合物或其片段,只要维持了对特定分子的结合亲和力。

[0024] 单克隆抗体可以通过本领域众所周知的技术(诸如制备连续杂交细胞系和收集分泌的蛋白(体细胞杂交技术))来制备。单克隆抗体可以根据Köhler和Milstein, *Nature* 265:495-497, 1975的标准技术来产生。单克隆抗体技术的综述可见Lymphocyte Hybridomas, 编辑 Melchers, 等人 Springer-Verlag (New York 1978), *Nature* 266:495 (1977), *Science* 208:692 (1980), 和 *Methods of Enzymology* 73 (Part B):3-46 (1981)。

[0025] 在用于制备抗体的另一种方法中,可以将编码抗体结合位点的序列从染色体DNA切下并插入到克隆载体中,其可以在细菌中表达,以产生具有相应抗体结合位点的重组蛋白。该方法涉及克隆和表达编码至少对于天然抗体的特异性结合所需的氨基酸序列的核苷酸序列或其诱变版本。

[0026] 在用于产生单克隆抗体的一种方法中,第一个步骤包括用抗原,例如,用免疫原免疫产生抗体的动物,诸如小鼠、大鼠、山羊、绵羊或母牛。可以使用或不使用佐剂诸如弗氏完全佐剂或其他佐剂诸如单磷酸脂质A和合成海藻糖二杆菌分枝菌酸酯(trehalose dicorynomycolate)佐剂进行免疫。下一个步骤包括从产生抗体的动物中分离脾细胞,并将产生抗体的脾细胞与适当的融合伴侣,典型地骨髓瘤细胞,诸如通过使用聚乙二醇或其他技术进行融合。通常,使用的骨髓瘤细胞是通常在次黄嘌呤-胸苷(HT)培养基中生长,但无法在次黄嘌呤-氨基嘌呤-胸苷(HAT)培养基中生长的用于选择融合的细胞的那些。下一个步骤包括选择融合的细胞,通常是通过在HAT培养基中选择。下一个步骤包括使用免疫测定诸如酶联免疫吸附测定(ELISA)或适当用于筛选的其他免疫测定筛选用于适当抗体产生的克隆杂合体。

[0027] 术语“免疫原性载体”意指这样的基团或部分,当缀合至半抗原并注射到哺乳动物或以其他方式用作免疫原时,其诱导免疫应答,并引发产生结合半抗原的抗体。免疫原性载体有时也被称为抗原载体。在根据本文所述的原理的一些实例中,合成包含免疫原性载体(包括在特定位置连接至免疫抑制剂化合物的聚(氨基酸)和非聚(氨基酸)免疫原性载体)的免疫原,并用于制备抗体。

[0028] 作为免疫原性载体的聚(氨基酸)的分子量范围(以道尔顿计)为例如约5,000至约10,000,000,或约20,000至约600,000,或约25,000至约250,000分子量。聚(氨基酸)免疫原性载体包括蛋白诸如,例如,白蛋白、血清蛋白,例如球蛋白、眼晶状体蛋白和脂蛋白。说明性蛋白包括,但不限于,例如,牛血清白蛋白(BSA)、钥孔血蓝蛋白(KLH)、蛋卵清蛋白和牛丙种球蛋白(BGG)。非聚(氨基酸)免疫原性载体包括多糖、核酸和颗粒(生物材料和合成材料)。各种各样的免疫原性载体公开于,Davalian等人,美国专利号5,089,390,第4栏第57

行至第5栏,第5行,其通过引用并入本文。

[0029] 如上面所提到,免疫原性载体可以是多糖,其是可以天然或合成制备的单糖的高分子量聚合物,且通常涉及单糖的重复缩合物。多糖的实例是淀粉、糖原、纤维素、碳水化合物树胶,诸如阿拉伯胶、琼脂等等。多糖也可以含有聚(氨基酸)残基和/或脂质残基。

[0030] 如上所提到,在根据本文所述的原理的一些实例中,免疫原性载体可以通过连接基团的方式在免疫抑制剂化合物的预定位置连接至免疫抑制剂化合物。在一些实例中,连接基团可以包含约2至约50个原子,或4至约30个原子,不计算氢,并且可以包含2至约30个原子,或3至约20个原子(分别独立地选自通常由碳、氧、硫、氮和磷组成的组)的链。部分或所有连接基团可以是连接至免疫抑制剂化合物的分子部分,诸如,但不限于,例如,聚(氨基酸)上的氨基酸残基。在一些实例中,连接基团包含肟官能度。

[0031] 连接基团中杂原子数目的范围可以为0至约20,或1至约15,或约2至约10。连接基团可以是脂族或芳族的。当存在杂原子时,氧通常作为键合至碳、硫、氮或磷的氧代或氧基存在,氮通常作为通常键合至碳、氧、硫或磷的硝基、亚硝基或氨基存在;硫类似于氧;而磷键合至碳、硫、氧或氮,通常作为磷酸酯和磷酸酯单酯或二酯。在连接基团和待缀合的分子之间形成共价键中常用的官能度是烷基胺、脒、硫代酰胺、醚、脲、硫脲、胍、氮杂、硫醚和羧酸酯、磺酸酯和磷酸酯、酰胺和硫酯。包含杂原子的连接基团的一个具体实施方案是如上提到的肟官能度。

[0032] 对于大多数部分,当连接基团具有连接官能度(用于与部分反应的官能度),诸如,例如,包括氮和硫类似物的非氧代羰基,磷酸酯基,氨基,烷基化剂诸如卤(halo)或甲苯磺酰基烷基,氧基(羟基或硫类似物,巯基),氧代羰基(例如醛或酮),或活性烯烃诸如乙烯基砜或 $\alpha$ -、 $\beta$ -不饱和酯时,这些官能度连接至胺基、羧基、活性烯烃、烷基化剂,例如溴乙酰基。其中胺和羧酸或其氮衍生物或磷酸连接时,形成酰胺、脒和磷酰胺。其中硫醇和活化烯烃连接时,形成硫醚。其中硫醇与烷基化剂连接时,形成硫醚。其中醛和胺在还原条件下连接时,形成烷基胺。其中酮或醛和羟胺(包括其中取代基替代羟基的氢的其衍生物)连接时,形成肟官能度(=N-O-)。其中羧酸或磷酸和醇连接时,形成酯。各种连接基团是本领域众所周知的;参见,例如,Cautrecasas, *J. Biol. Chem.* (1970) 245:3059。

[0033] 他克莫司作为具体实例

[0034] 以下具体说明是通过对本发明范围说明的方式,而不是作为对本发明范围的限制。免疫抑制剂药物,具体而言他克莫司的选择也是通过说明且不是限制的方式,因为本发明具有检测任何具有空间上分开区域(可以对其产生抗体且在针对化合物的测定过程中此类产生的抗体将与其特异性结合)的半抗原的一般应用。

[0035] 可以制备结合他克莫司分子的分开部分的单克隆抗体(图1)。可以确定单克隆抗体结合的分开部分,例如,通过使用他克莫司的代谢物的交叉反应研究。参照图2,可以制备的一种单克隆抗体结合基本上由包括甲氧基和羟基取代基的C29-C34环和包括甲氧基取代基的C15组成的他克莫司的部分(区域14)。可以制备另一种单克隆抗体,其结合基本上由C10-C14环的甲氧基和包括C22酮氧且还包括C24羟基和C26酯氧的C1-C26环的C19-C27组成的他克莫司的部分(区域12)。通过三维分析对他克莫司结构的检查揭示了区域12和14的构象。

[0036] 针对区域14的单克隆抗体可以从以下免疫原制备,其中他克莫司在他克莫司分子

的C19-C27区域中的位置,或通过键直接或通过连接基团的中间性(intermediacy),连接至免疫原性载体。

[0037] 在一个具体实例中,通过说明而非限制的方式,根据本文所述的原理,他克莫司在他克莫司分子的C22位置,或通过键直接或通过连接基团的中间性,连接至免疫原性载体。在一个具体实例中,通过说明而非限制的方式,酮基在C22位置与胺反应以产生脞。所述脞可以是,但不限于,例如,羧基甲氧基胺。

[0038] 在一个方法中,他克莫司与羧基甲氧基胺的反应产生羧甲基脞。在该具体实例中,他克莫司可以在缓冲盐(诸如,例如,乙酸钠)存在的情况下与羧基甲氧基胺在醇介质(诸如,例如,甲醇、乙醇或丙醇)中反应,以得到羧甲基脞。该脞可以连接至免疫原性载体,诸如,例如,高分子量蛋白,其可以是,但不限于,例如,牛血清白蛋白、甲状腺球蛋白、卵清蛋白、纤维蛋白原或钥孔血蓝蛋白。在一个实例中,所述蛋白是钥孔血蓝蛋白。

[0039] 在一个实例中,制备他克莫司与高分子量蛋白的缀合物的方法如下:(1)如上所述制备他克莫司的羧甲基脞;(2)活化羧甲基脞以产生反应性N-羟基琥珀酰亚胺酯;和(3)使N-羟基琥珀酰亚胺酯与高分子量蛋白反应以产生缀合物。进行羧甲基脞的活化以产生N-羟基琥珀酰亚胺酯,例如,通过使用偶联剂诸如水溶性碳二亚胺,诸如,例如,3-(3-二甲基氨基丙基)-1-乙基-3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸化物(EDAC)。

[0040] 在另一个实例中,在他克莫司的C19 - C27区域内的碳原子处衍生化的他克莫司的缀合物是溴乙酰基衍生物。他克莫司的溴乙酰基衍生物的制备包括(1)使他克莫司与羧基甲氧基胺反应以产生他克莫司的羧甲基脞衍生物,(2)活化羧甲基脞以产生反应性N-羟基琥珀酰亚胺酯,和(3)使N-羟基琥珀酰亚胺酯与溴乙酰基乙二胺的三氟乙酸盐反应以产生溴乙酰基衍生物。如上所述制备该方法中使用的羧甲基脞衍生物。可以使用此类溴乙酰基衍生物通过使溴乙酰基部分与蛋白的巯基反应以产生他克莫司的蛋白缀合物。

[0041] 可以如下通过筛选方法鉴定针对区域14的单克隆抗体:基于其与不同他克莫司衍生物诸如代谢物和免疫原的结合特性鉴定抗体克隆的结合区域。基于以下将区域14鉴定为14H04克隆的结合区域:(a) 采用的免疫原具有通过他克莫司的C22酮基连接的免疫原性载体蛋白,(b)他克莫司C22脞显示出与单克隆抗体14H04的强结合,这表明在C22区域附近不会发生抗体结合(改变该区域没有破坏抗体结合),(c)他克莫司C32氨基甲酸酯化合物不结合单克隆抗体14H04,且涉及C31甲氧基的脱甲基化的代谢物显著降低了抗体结合,两者都表明,14H04结合C29-34环,和(d) 与15-O-脱甲基(demethyl)他克莫司没有交叉反应性表明14H04结合C15邻近区域(改变15-O-甲基去除了抗体的结合能力)。

[0042] 针对区域12的单克隆抗体可以从以下免疫原制备,其中他克莫司在他克莫司分子的C29-C34区域中的位置,或通过键直接或通过连接基团的中间性,连接至免疫原性载体。对于通过他克莫司的C19 - C27区域中位置的连接,连接基团和连接程序如上所述。在一个实例中,部分通过采用羟基的他克莫司分子的位置C32连接至他克莫司。

[0043] 可以通过以下筛选方法鉴定针对区域12的单克隆抗体。基于以下将区域12鉴定为1E2克隆的结合区域:(a) 采用的免疫原通过C32连接,且改变C32(例如,他克莫司C32氨基甲酸酯化合物)不改变单克隆抗体1E2的结合,(c) 1E2具有与他克莫司的C32酯衍生物的100%结合,和(d)改变C31甲氧基(31-O-去甲基(desmethyl))不减少单克隆抗体1E2的结合。以上所有都表明单克隆抗体1E2不结合他克莫司的C29-C34环。连接至C24的羟基的修饰

减弱了单克隆抗体1E2与他克莫司的结合。他克莫司C22脲化合物不结合1E2,这表明单克隆抗体1E2结合他克莫司的C22-C24区域。如在M1(13-0-去甲基)和MV1(13,31二去甲基)的情况下的C13甲氧基的改变去除了单克隆抗体1E2与他克莫司的结合,表明单克隆抗体1E2结合他克莫司的C13区域。

[0044] 鉴于上述,单克隆抗体1E2和14H04在他克莫司分子上具有分开的结合结构域,这允许针对他克莫司药物的夹心测定。

[0045] 根据以下程序实施通过ACM1A测定形式的他克莫司衍生物体的测量。代谢物获得自Isotechnika Pharma Inc (Alberta,Canada)和University of Colorado in Denver, Colorado的Christistians博士实验室。他克莫司衍生物化合物,诸如免疫原获得自Siemens AG (Glasgow,DE)。代谢物和免疫原交叉反应性使用美国专利号7,186,518(其相关公开内容通过引用并入本文)中描述的ACM1A方法进行测量。简而言之,根据已知技术使用标准的异双官能SMCC(琥珀酰亚胺基反-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯)接头将两个克隆缀合至 $\beta$ -半乳糖苷酶。通过将他克莫司类似物缀合至牛免疫球蛋白,然后缀合至聚醛葡聚糖包被的二氧化铬颗粒而制备铬颗粒(免疫测定固相)。用于单克隆抗体14H04的他克莫司类似物是他克莫司C22脲化合物。用于单克隆抗体1E2的类似物是固定在抗荧光素抗体包被的二氧化铬颗粒的他克莫司C32荧光素衍生物。通过测试含有掺入代谢物和其他他克莫司衍生物诸如免疫原的样品而检测交叉反应性。将从含有掺入代谢物的样品获得的测定信号与从含有他克莫司标准品的样品获得的信号进行比较。通过将表现他克莫司浓度除以添加代谢物的浓度并将结果表示为百分比来确定交叉反应性。

[0046] 应当指出的是,根据本文所述的原理的夹心测定应当表现出相比于利用一种或另一种上述单克隆抗体试剂的竞争测定的与他克莫司代谢物的较低交叉反应性。在夹心测定中,代谢物需要结合两种抗体以表现出交叉反应性。如果代谢物仅结合一种抗体,而不结合另一种(或与另一种具有弱结合),则没有生成任何测定信号,因此,没有表明交叉反应性。如果代谢物表现出与一种抗体的100%结合,但与另一种具有较弱结合(例如,30%),通过该测定测量的交叉反应性是较弱的结合(即,30%)。此外,如果代谢物表现出与一种抗体的低结合(例如,40%),且与另一种抗体具有甚至更低的结合(例如,20%),则夹心测定中的交叉反应性应当比更低结合更低(在上述实例中, $40\% \times 20\% = 8\%$ )。在交叉反应性研究中,两种抗体,1E2和14H04,表现出与代谢物M1 13-0-去甲基-他克莫司、M11,31-0-去甲基-他克莫司、M111 15-0-去甲基-他克莫司、M1V 12-0H-他克莫司、M-V1 13,31-0-二去甲基-他克莫司和M-V11 15,31-0-二去甲基-他克莫司不同的交叉反应性概况。在夹心测定中测量的交叉反应性应当等于或低于表现出与代谢物较低结合的抗体的交叉反应性。

[0047] 针对免疫抑制剂药物的测定的总体描述

[0048] 如上所提到,根据本文描述的原理的实例能够实现用于测定怀疑含有免疫抑制剂药物的样品中的免疫抑制剂药物的夹心测定。在夹心测定中,采用两种单克隆抗体,其中每种同时结合免疫抑制剂药物分子的分开区域,以形成免疫复合体。免疫复合体的检测允许测定样品中的免疫抑制剂药物。

[0049] 待测试的样品通常是生物样品。短语“生物样品”是指任何生物材料,诸如,例如,体液、机体组织、机体化合物和培养基。样品可以是来自任何来源的固体、半固体或流体(液体或气体)。在一些实施方案中,样品可以是机体排泄物、机体吸出物(aspirant)、机体切除

物或机体提取物。机体通常是哺乳动物的机体,在某些实施方案中,机体是人体。机体排泄物是从机体排泄的那些物质(尽管它们也可以通过切除或提取获得),诸如,例如尿、排泄物、粪便、阴道粘液、精液、泪液、呼气、汗、疱液和炎性渗出物。机体切除物是从机体切除的那些物质,诸如,例如,皮肤、毛发和组织样品,包括来自器官和其他机体部分的活检样品。机体吸出物是从机体吸出的那些物质,诸如,例如,粘液、唾液和痰。机体提取物是从机体提取的那些物质,诸如,例如,全血、血浆、血清、脊髓液、脑脊髓液、淋巴液、关节液和腹膜液。在一些实例中,样品是全血、血浆或血清。

[0050] 在测定之前,或在测定过程中的一些情况下,样品可以经受一种或多种预处理以裂解细胞和/或从内源结合物质释放免疫抑制剂药物。裂解细胞可以通过使用溶血剂实现,所述溶血试剂是破坏红血细胞膜的完整性,从而释放细胞的胞内内容物的化合物或化合物的混合物。溶血剂包括,但不限于,例如,非离子型去垢剂、阴离子型去垢剂、两性去垢剂、低离子强度水溶液(低渗溶液)、细菌剂和引起补体依赖性裂解的抗体。

[0051] 可以被用作溶血剂的非离子型去垢剂包括合成去垢剂和天然去垢剂两者。合成去垢剂的实例包括TRITON™ X-100、TRITON™ N-101、TRITON™ X-114、TRITON™ X-405、TRITON™ SP-135、TWEEN® 20(聚氧乙烯(20)脱水山梨醇单月桂酸酯)、TWEEN® 80(聚氧乙烯(20)脱水山梨醇单油酸酯)、DOWFAX®、ZONYL®、季戊四醇基棕榈酸酯、ADOGEN® 464、ALKANOL® 6112表面活性剂、烯丙基醇1,2-丁氧基化物-嵌段-乙氧基化物HLB 6、BR1J®、乙二胺四(乙氧基化物-嵌段-丙氧基化物)四醇、1GEPAL®、MERPOL®、聚(乙二醇)、2-[乙基[(十七氟辛基)磺酰基]氨基]乙基醚、聚乙烯-嵌段-聚(乙二醇)、聚氧乙烯脱水山梨醇四油酸酯、聚氧乙烯山梨醇六油酸酯、TERGITOL® NP-9、GAFAC® (RHODAFAC®, 烷基聚氧乙烯二醇磷酸酯,诸如,例如, $\alpha$ -十二烷基- $\omega$ -羟基聚(氧-1,2-乙二基)磷酸酯),和EP110®等。可以被用作溶血剂的天然存在的去垢剂包括,例如,皂苷、钠或钾中和的脂肪酸、中和的磷脂、甘油二酯、中和的磷脂酰丝氨酸、磷脂酸(phosphatidate)、中和的磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱、磷脂酰肌醇、磷脂酰胆碱、胆汁盐、未酯化的胆固醇、中和的鞘氨醇、神经酰胺等。也可以使用一种或多种合成去垢剂或一种或多种天然存在的去垢剂的组合和合成去垢剂和天然存在的去垢剂的组合。

[0052] 采用的溶血剂的性质和量或浓度取决于例如样品的性质、免疫抑制剂药物的性质、试剂组分的剩余部分的性质和反应条件中的一种或多种。溶血剂的量至少足以引起红细胞裂解以释放细胞内容物。在一些实例中,溶血剂的量为例如约0.0001%至约0.5%,约0.001%至约0.4%,约0.01%至约0.3%,约0.01%至约0.2%,约0.1%至约0.3%,约0.2%至约0.5%,或约0.1%至约0.2%(百分比为重量/体积)。

[0053] 释放剂是从内源结合部分替代免疫抑制剂药物的化合物或化合物的混合物。释放剂可以,并且在许多情况下,从内源结合部分替代免疫抑制剂药物的代谢物。在许多实例中,释放剂具有与内源结合蛋白的高结合亲和力,使得它容易从内源结合蛋白替代免疫抑制剂药物和在需要时替代其代谢物。此外,释放剂不在任何显著程度结合针对测定中使用的药物的单克隆抗体。短语“不在任何显著程度结合”意指,结合的程度应该是足够低的,从而使得可以实施针对药物的准确测定。因此,释放剂可以是任何部分,或单一化合物或化合物的混合物,其中实现期望的替代结果而不与测定抗体显著结合。

[0054] 在一些实例中,释放剂是免疫抑制剂药物的类似物,包括结构类似物。免疫抑制剂

药物类似物是可以从结合蛋白替代类似免疫抑制剂药物、但在任何显著程度竞争针对免疫抑制剂药物的单克隆抗体的修饰的药物。修饰提供了将免疫抑制剂药物类似物连接至另一分子的方式。在一个实例中,免疫抑制剂药物类似物可以是,例如,通过连接基团缀合至另一分子的免疫抑制剂药物。对于包含羟基或羧酸官能度的免疫抑制剂药物,释放剂可以是免疫抑制剂药物的酯,其相对于待检测的免疫抑制剂药物对内源结合蛋白具有高结合亲和力,并且对于针对免疫抑制剂药物的抗体没有显著结合亲和力。例如,在针对他克莫司的测定中,他克莫司的酯可以用作释放剂,只要它满足上述要求。结构类似物是与免疫抑制剂药物具有相同或类似的结构或空间特性,从而使得结构类似物实现与免疫抑制剂药物的类似物相同或类似结果的部分。结构类似物可以是,例如,涉及免疫抑制剂药物的另一种化合物。例如,在针对他克莫司的测定中,西罗莫司的酯可以用作释放剂。该酯可以是,例如,氨基甲酸酯、碳酸酯、C<sub>1</sub>至C<sub>6</sub>羧酸的酯等。参见,例如,美国专利号7,186,518,其相关公开内容通过引用并入本文。释放剂的其他实例包括对于环孢菌素A的[Thr<sub>2</sub>,Leu<sub>5</sub>,D-Hiv<sub>8</sub>,Leu<sub>10</sub>]-环孢菌素A、对于西罗莫司的FK506、对于FK506的西罗莫司等。参见,例如,美国专利号6,187,547,其相关公开内容通过引用并入本文。

[0055] 释放剂在介质中的浓度是足以实现如上讨论的从内源结合部分替代免疫抑制剂药物和在一些情况下免疫抑制剂药物的代谢物,以使药物和代谢物可接近结合针对药物的抗体的期望结果的浓度。采用的释放剂的量或浓度取决于例如样品的性质、免疫抑制剂药物的性质、药物代谢物的性质、其他试剂组分的性质和反应条件中的一种或多种。在一些实施方案中,释放剂的量为约0.000001%至约0.5%,约0.0001%至约0.4%,约0.001%至约0.3%,约0.01%至约0.2%,约0.1%至约0.3%,约0.2%至约0.5%,约0.1%至约0.2%等等(百分比为重量/体积)。

[0056] 该测定是免疫测定,其可以在不分离(均质)或分离(异质)任何测定组分或产物的情况下进行。均质或异质测定在通常提供最佳测定灵敏度的温和pH的含水缓冲介质中实施。含水介质可以是单独的水或可以包括0.1至约40体积百分比的共溶剂。介质的pH通常在约4至约11的范围内,或约5至约10的范围内,或约6.5至约9.5的范围内。pH通常会单克隆抗体和免疫抑制剂药物的最佳结合以及测定的其他试剂诸如例如信号产生系统的成员的pH最佳值之间的折衷。

[0057] 可以使用各种缓冲剂以实现期望的pH并在测定过程中维持pH。说明性缓冲剂包括硼酸盐、磷酸盐、碳酸盐、tris、巴比妥等。采用的具体缓冲剂对于本发明不是关键,但在单独测定中,一种或另一种缓冲剂可以是优选的。上述方法中可以采用各种辅助材料。例如,除了缓冲剂以外,介质可以包含用于介质和用于采用的试剂的稳定剂。经常,除了这些添加剂以外,可以包括例如蛋白,诸如白蛋白;有机溶剂,诸如甲酰胺;季铵盐;聚阴离子,诸如硫酸葡聚糖;表面活性剂,特别是非离子型表面活性剂;结合增强剂,例如,聚亚烷基二醇。

[0058] 可以在一个或多个时间间隔(包括添加上述各种试剂之间的任何时间间隔)对介质应用一个或多个孵育期间。该介质通常以足以使试剂的各种组分的结合发生的温度和时间进行孵育。在测量期间过程中,适中的温度通常用于实施该方法,通常为恒定温度,优选室温。孵育温度的范围为约5°C至约99°C,或约15°C至约70°C,或约20°C至约45°C。孵育的时间期间为约0.2秒至约6小时,或约2秒至约1小时,或约1至约5分钟。该时间期间取决于介质的温度和各种试剂结合速率(这通过结合速率常数、浓度、结合常数和解离速率常数确定)。

测量过程中的温度范围为约10℃至约50℃,或约15℃至约40℃。

[0059] 可以测定的免疫抑制剂药物分析物的浓度通常从约 $10^{-5}$ 至约 $10^{-17}$  M,或从约 $10^{-6}$ 至约 $10^{-14}$  M变化。考虑因素,诸如测定是否是定性的、半定量的或定量的(相对于样品中存在的分析物的量),具体检测技术和分析物的浓度通常决定了各种试剂的浓度。

[0060] 测定介质中各种试剂的浓度将通过免疫抑制剂药物分析物的目标浓度范围来确定。然而,每种试剂的最终浓度通常根据经验确定,以优化该测定在该范围内的灵敏度。即,分析物浓度的显著变化应当提供精确测量的信号差异。考虑因素,诸如信号产生系统的性质和免疫抑制剂分析物的性质通常决定各种试剂的浓度。

[0061] 尽管添加顺序可以广泛变化,但基于测定的性质将存在某些优先。最简单的添加顺序是同时添加所有物质,并确定如均质测定中测定介质对信号具有的作用。或者,可以依次组合试剂。任选地,孵育步骤可以在如上所讨论的每次添加之后涉及。

[0062] 在上面讨论的测定中,采用一种或多种标记,其中标记通常是信号产生系统(“sps”)的部分。标记的性质取决于具体测定形式。sps通常包括一种或多种组分,至少一种组分是可检测的标记,其生成的可检测的信号,所述信号涉及结合和/或未结合的标记的量,即与待检测的免疫抑制剂药物或与反映待检测的免疫抑制剂药物的量的试剂结合或不结合的标记的量。该标记是产生或能够被诱导产生信号的任何分子,并且可以是,例如,荧光剂、放射性标记、酶、化学发光剂或光敏剂。因此,根据具体情况,通过检测酶活性、化学发光、光吸收或放射性检测和/或测量信号。

[0063] 合适的标记包括,通过说明但非限制的方式,酶诸如 $\beta$ -半乳糖苷酶、碱性磷酸酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(“G6PDH”)和辣根过氧化物酶;核酶;复制酶诸如QB复制酶的底物;促进剂;染料;荧光剂,诸如荧光素、异硫氰酸酯、罗丹明化合物、藻红蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白、邻苯二甲醛和荧光胺;复合体,诸如由被称为量子点(Quantum dots)的半导体纳米晶体中存在的CdSe和ZnS制备的那些;化学发光剂,诸如异鲁米诺;敏化剂;辅酶;酶底物;放射性标记,诸如 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{57}\text{Co}$  和  $^{75}\text{Se}$ ;颗粒,诸如乳胶颗粒、碳颗粒、金属颗粒,包括磁性颗粒,例如,铬颗粒等;金属溶胶;微晶;脂质体;细胞等,其可以用染料、催化剂或其他可检测基团进一步标记。合适的酶和辅酶公开于Litman,等人,美国专利号4,275,149,第19-28列,和Boguslaski等人,美国专利号4,318,980,第10-14列;合适的荧光剂和化学发光剂公开于Litman,等人,美国专利号4,275,149,第30和31栏;其通过引用并入本文。

[0064] 标签可以直接产生信号,因此,产生信号不需要额外组分。许多有机分子,例如荧光剂,能够吸收紫外线和可见光,其中光吸收将能量转移至这些分子并将它们提升至激发能态。这种吸收能量然后通过第二波长的光发射而消散。其他直接产生信号的标记包括放射性同位素和染料。

[0065] 或者,标签可以需要其他组分来产生信号,然后信号产生系统将包括产生可测量的信号所需的所有组分。此类其他组分可以包括底物、辅酶、增强剂、其他酶、与酶产品反应的物质、催化剂、活化剂、辅因子、抑制剂、清除剂、金属离子、和对于信号生成物质的结合所需的特异性结合物质。合适的信号产生系统的详细讨论可见,Ullman等人,美国专利号5,185,243,第11-13列,其通过引用并入本文。

[0066] 可以将标记或其他sps成员或一种或多种单克隆抗体结合至支持物。可以以本领域已知的任何方式将单克隆抗体结合至固体支持物,只要该结合基本上不干扰与免疫抑制

剂药物的区域结合的能力。在一些实例中,标签或其他sps成员或单克隆抗体可以被包被或直接共价结合至固相,或可以具有多层一种或多种载体分子,诸如聚(氨基酸),包括蛋白,诸如血清白蛋白或免疫球蛋白,或多糖(碳水化合物),诸如,例如,葡聚糖或葡聚糖衍生物。连接基团也可用于共价偶联固体支持物和待偶联的部分。连接基团可以是如上所述的用于将免疫原连接至免疫抑制剂药物分子的基团。也可以采用结合至支持物的其他方法。例如,固体支持物可以具有小分子的结合剂的包被,诸如,例如,抗生物素蛋白或抗体,其中小分子,诸如,例如,生物素或半抗原,可以结合至待偶联的部分,或反之亦然。组分与支持物表面的结合可以是直接或间接的,共价或非共价的,并且可以通过在文献中通常可用的众所周知的技术来实现。参见,例如,“Immobilized Enzymes,” Ichiro Chibata, Halsted Press, New York (1978)和Cautrecasas, *J. Biol. Chem.*, 245:3059 (1970)。

[0067] 支持物可以由有机或无机、固体或流体、水溶性材料(其可以是透明或部分透明的)构成。支持物可以具有许多形状中的任一种,诸如颗粒,包括珠、胶片、薄膜、管、孔、条、杆、平表面,诸如,例如,板、DENDRIMERS等。基于测定类型,支持物在其应用的介质中可以是可悬浮的或可以不是可悬浮的。作为说明而非限制的可悬浮支持物的实例是聚合材料,诸如,例如,胶乳,脂质双分子层或脂质体,油滴,细胞和水凝胶,和磁性颗粒。其他支持物组合物包括聚合物,诸如,例如硝酸纤维素,醋酸纤维素,聚(氯乙烯),聚丙烯酰胺,聚丙烯酸酯,聚乙烯,聚丙烯,聚(4-甲基丁稀),聚苯乙烯,聚甲基丙烯酸酯,聚(对苯二甲酸二乙酯),尼龙,聚(乙烯丁酸酯);以其本身或与其他材料结合使用。

[0068] 支持物可以是颗粒。颗粒应该具有至少约0.02微米且不超过约100微米的平均直径。在一些实施方案中,颗粒具有约0.05微米至约20微米,或约0.3微米至约10微米的平均直径。颗粒可以是有机或无机的,可溶胀的或不可溶胀的,多孔的或非多孔的,优选密度接近于水,通常为约0.7 g/mL至约1.5 g/mL,且由可以是透明的、部分透明的或不透明的材料构成。颗粒可以是生物材料,诸如细胞或微生物,例如,红细胞、白细胞、淋巴细胞、杂交瘤、链球菌、金黄色葡萄球菌、和大肠杆菌、病毒等。颗粒也可以是由有机和无机聚合物、脂质体、胶乳颗粒、磁性或非磁性颗粒、磷脂小泡、乳糜微粒、脂蛋白等构成的颗粒。在一些实例中,颗粒是铬颗粒或胶乳颗粒。

[0069] 聚合物颗粒可以由加成或缩合聚合物形成。颗粒将是在含水介质中容易分散的,并且可吸附或可官能化,以便允许直接或通过连接基团间接地缀合至针对免疫抑制剂药物的单克隆抗体。连接基团可以是如上所述的用于将免疫原连接至免疫抑制剂药物分子的基团。颗粒也可以衍生自天然存在的材料、合成修饰的天然存在的材料和合成材料。特别感兴趣的有机聚合物是多糖,特别是交联的多糖,诸如琼脂糖(agarose),其可作为琼脂糖(Sepharose)、葡聚糖获得,可作为Sephadex和Sephacryl、纤维素、淀粉等获得;加成聚合物,诸如聚苯乙烯,聚乙烯醇,丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯的衍生物(特别是具有游离羟基官能度的酯和酰胺)的均聚物和共聚物等。

[0070] 可以将标记和/或其他sps成员结合至两种不同单克隆抗体中的一种或两种。标记与sbp成员的键合可以通过导致用与单克隆抗体的键替代标记的氢原子的化学反应来实现,或可以包括标记和单克隆抗体之间的连接基团。连接基团可以是如上所述的用于将免疫原连接至免疫抑制剂药物分子的基团。其他sps成员也可以共价结合至单克隆抗体。例如,两个sps成员诸如荧光剂和猝灭剂可以分别各自结合至单克隆抗体,其中荧光剂被结合

至一种单克隆抗体,且猝灭剂被结合至另一种单克隆抗体。当两种不同的单克隆抗体结合至免疫抑制剂药物时,夹心复合体的形成使得荧光剂和猝灭剂密切邻近,从而允许猝灭剂与荧光剂相互作用以产生信号。缀合的方法是本领域众所周知的。参见,例如,Rubenstein 等人,美国专利号3,817,837,其通过引用并入本文。

[0071] 作为标签蛋白的特别感兴趣的酶是氧化还原酶,特别是脱氢酶,诸如葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,乳酸脱氢酶等,和涉及产生过氧化氢和使用过氧化氢以便将染料前体氧化为染料的酶。具体的组合包括,但不限于,糖氧化酶,例如葡萄糖和半乳糖氧化酶,或杂环氧化酶,诸如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶,其偶联采用过氧化氢来氧化染料前体的酶,即,过氧化物酶诸如辣根过氧化物酶、乳过氧化物酶或微过氧化物酶。额外的酶组合是本领域众所周知的。当单一酶用作标记时,其他酶可以找到用途,诸如水解酶、转移酶和氧化还原酶,优选水解酶诸如碱性磷酸酶和 $\beta$ -半乳糖苷酶。或者,可以使用萤光素酶,诸如萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶。

[0072] 可以找到用途的说明性辅酶包括NAD[H]、NADP[H]、磷酸吡哆醛、FAD[H]、FMN[H]等,通常是涉及循环反应的辅酶。参见,例如,美国专利号4,318,980,其公开内容通过引用并入本文。

[0073] 信号产生系统的活化取决于信号产生系统成员的性质。对于用光活化的信号产生系统的那些成员,所述成员用光照射。对于在颗粒表面上的信号产生系统的成员,添加碱可能导致活化。鉴于本文的公开内容将为本领域技术人员建议其他活化方法。对于一些信号产生系统,不需要任何活化剂,诸如涉及作为放射性标记、酶等等的标记的那些系统。对于酶系统,添加底物和/或辅因子可能是必要的。

[0074] 对于信号的存在和量的检查还包括信号的检测,这通常仅仅是其中读取信号的步骤。信号通常使用仪器读取,所述仪器的性质取决于信号的性质。该仪器可以是分光光度计、荧光计、吸收光谱仪、发光计、化学发光计、光能测定仪、摄影仪器等。检测的信号的存在和量与样品中存在的西罗莫司化合物的存在和量相关。测量过程中的温度范围可以为约10 $^{\circ}$ C至约70 $^{\circ}$ C,或约20 $^{\circ}$ C至约45 $^{\circ}$ C,或约20 $^{\circ}$ C至约25 $^{\circ}$ C。在一个方法中,使用已知浓度的待筛选的分析物形成标准曲线。如上所讨论,也可以使用校准剂和其他对照。

[0075] 短语“测量免疫抑制剂药物的量”是指免疫抑制剂药物的定量、半定量和定性测定。定量、半定量和定性的方法,以及用于测定免疫抑制剂药物的所有其他方法,被认为是测量免疫抑制剂药物的量的方法。例如,仅仅检测怀疑含有免疫抑制剂药物的样品中免疫抑制剂药物的存在或不存在的方法被认为包括在本公开的范围之内。术语“检测”和“测定”,以及用于测量的其他常用的同义词包括在本公开的范围之内。

[0076] 在根据本文描述的原理的一个实例中,对于免疫抑制剂药物的区域特异性的单克隆抗体中的一种结合至支持物,对于与其他单克隆抗体结合的免疫抑制剂药物的区域空间分开的免疫抑制剂药物的区域特异性的单克隆抗体中的另一种结合至sps成员,诸如,例如,标记。将怀疑含有免疫抑制剂药物的样品与两种缀合的单克隆抗体在合适的介质中组合,并将介质孵育。然后,检查介质中由两种不同的单克隆抗体和来自样品的免疫抑制剂药物形成的免疫复合体的存在和量中的一种或两种。在检查之前,支持物可以与介质分开或可以不分开。免疫复合体的存在和/或量通过测定介质中或支持物上标记的存在和/或量来测定。

[0077] 在一个具体实施方案中,采用捕获测定。在该测定形式中,一种单克隆抗体共价结合至磁性颗粒,诸如,例如,铬(二氧化铬)颗粒。将样品与这些颗粒孵育,以允许样品中的免疫抑制剂药物结合磁性颗粒上的单克隆抗体。随后,将缀合至酶,诸如,例如, $\beta$ -半乳糖苷酶的第二单克隆抗体与磁性颗粒孵育。在应用磁体和洗涤磁性颗粒之后,测量结合至磁性颗粒的酶的量,其与样品中免疫抑制剂药物的存在和/或量直接相关。在这种方法中,将报道酶的底物添加至最后的反应容器中,且用分光光度法将酶活性测定为吸光度随时间的变化。

[0078] 在可替代方法中,添加过量磁性颗粒试剂,即,其量高于结合样品中可能存在的所有免疫抑制剂药物所需要的量。然后,应用磁体以便从介质分开磁性颗粒,并将磁性颗粒洗涤并重悬浮于测定介质中。添加缀合至第二单克隆抗体的酶,并孵育介质,随后如上所述测定信号。

[0079] 在另一个实例中,通过说明而非限制的方式,采用化学发光颗粒,其包括与其结合(诸如通过并入其中或与其粘附)的化学发光的化合物。针对免疫抑制剂药物的单克隆抗体中的一种结合至颗粒,诸如通过包被颗粒的多糖的中间性。结合免疫抑制剂药物的另一种单克隆抗体是生物素缀合物的部分。将链霉抗生物素蛋白缀合至第二组具有与其结合的光敏剂的颗粒。将化学发光颗粒与怀疑含有免疫抑制剂药物的样品和光敏剂颗粒混合。孵育反应介质,以允许颗粒借助单克隆抗体与免疫抑制剂药物的结合而结合免疫抑制剂药物。然后,用光照射介质来激发光敏剂,所述光敏剂在其激发态能够将氧活化为单态(singlet state)。因为一组颗粒的化学发光化合物现在借助免疫抑制剂药物的存在密切接近于光敏剂,所以它被单态氧(singlet oxygen)活化并发射冷光。然后检查介质中发射的冷光或光的存在和/或量,其存在与样品中免疫抑制剂药物的存在和/或量相关。

#### [0080] 进行测定的试剂盒

[0081] 用于进行具体测定的试剂可以存在于试剂盒中,所述试剂盒可用于方便地进行用于测定免疫抑制剂药物分析物的测定。在一个实例中,试剂盒在包装组合中包含用于分析分析物的试剂,其性质取决于具体测定形式。试剂可以包括,例如,根据本文所述的原理的一种或多种单克隆抗体,其可以缀合至标记或支持物。取决于试剂的交叉反应性和稳定性,试剂可以各自在不同的容器中或各种试剂可以在一个或多个容器中进行组合。试剂盒可以进一步包括其他分开包装的用于进行测定的试剂,诸如额外结合成员和辅助试剂。

[0082] 试剂盒中各种试剂的相对量可以广泛变化,以提供显著优化本方法过程中需要发生的反应的试剂的浓度,并进一步显著优化测定灵敏度。在适当情况下,试剂盒中的一种或多种试剂可以被提供为干粉,通常是冻干的,包括赋形剂,其在溶解之后将提供具有用于进行方法或测定的适当浓度的试剂溶液。试剂盒可以进一步包括根据如上所述的本实施方案的方法的书面说明。

[0083] 如本文中使用的短语“至少”意指指定项目的数目可以等于或大于所述数目。如本文中使用的短语“约”意指所述数目可以变化正或负10%;例如,“约5”意指4.5至5.5的范围。指定“第一”和“第二”是完全任意的,并不意指暗示上述语言涉及的组的任何成员之间的顺序或排名,诸如,例如,“第一和第二单克隆抗体”或“第一单克隆抗体”和“第二单克隆抗体”。

[0084] 以下实施例通过说明而非限制的方式进一步描述本发明的具体实施方案,并且意

在描述,而非限制本发明的范围。本文公开的份和百分数以体积计,除非另有说明。

## 实施例

[0085] 除非另有说明,所有化学品均购自Sigma-Aldrich Company (St. Louis MO)。他克莫司获得自Astellas Pharma US, Inc., Deerfield, IL。

[0086] 使用获得自Siemens AG, Newark DE的DIMENSION® RxL分析仪实施测试。用夹心免疫测定形式使用酶检测系统采用仪器。在本文中使用和在下面更详细讨论的夹心方法实施方案中,缀合至酶的经标记的抗体(Ab)(缀合物)和患者样品中的他克莫司药物(TACRO)之间的结合以及随后所得免疫复合体与铬颗粒上的捕获抗体的结合确定患者样品中他克莫司的量。通过3-4次混合/洗涤和磁分离循环自动去除未结合的标签抗体酶缀合物。将来自铬颗粒上剩余的缀合物的酶活性进行测量,其与患者样品中他克莫司的量成正比。

[0087] 实施例1

[0088] 使用自动化ACM1A夹心测定来测定他克莫司

[0089] 他克莫司-钥孔血蓝蛋白缀合物的制备。向1.05 mL无水二甲基甲酰胺中他克莫司单肟(32.3 mg, 36.8  $\mu\text{mol}$ )的溶液中添加1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸化物(EDAC)(11 mg, 57.4  $\mu\text{M}$ , 1.5当量)和N-羟基琥珀酰亚胺(7.3 mg, 63.4  $\mu\text{M}$ , 1.7当量)。连接是在他克莫司分子的C22位置。将反应在室温在氩气下搅拌1小时。然后将混合物经由注射器逐滴添加至5.0 mL磷酸盐缓冲盐水(0.1 M, pH 8.0)和0.25 mL二甲基甲酰胺中钥孔血蓝蛋白(74 mg, 54%纯)的溶液中。在室温下搅拌2小时后,将所得悬浮液针对PBS(磷酸盐缓冲盐水)(10 mM, pH 7.0)进行透析(1 x 4 L, 4°C, 2小时)。

[0090] 然后将所得混合物用二氯甲烷萃取3次,以去除任何痕量的未反应的他克莫司单肟。使用二喹啉甲酸(BCA)蛋白测定溶液进行混合物的定量分析,以得到8 mL PBS (10 mM, pH 7.0)中的50 mg免疫原。

[0091] 使用TNBS方法(A.F.S.A. Habeeb, Anal. Biochem. 14:328 (1966))测定半抗原数得到1300的半抗原数。将免疫原使用干冰-丙酮浴立即冷冻并保持在-20°C用于储存。

[0092] 如下制备含有他克莫司的三种位置异构体(在位置C32连接的KLH,在位置C24连接的KLH和在位置C32和C24连接的KLH)的免疫原混合物:将圆底烧瓶中的他克莫司(301.3 mg)在真空干燥1.5小时。向烧瓶中添加搅拌棒、琥珀酸酐(568.2 mg)、4-(二甲基氨基)吡啶(46.3 mg)、二氯甲烷(2 mL, 无水)和吡啶(2.093 mL)。将反应混合物在室温(24°C)在氩气气氛下搅拌24.5小时。三种位置异构体是该反应的产物:他克莫司-32-琥珀酸酯、他克莫司-24-琥珀酸酯和他克莫司-24,32-二-琥珀酸酯。一旦停止反应,则通过旋转蒸发去除溶剂,并将产物通过真空泵进一步干燥两小时。

[0093] 向小瓶中添加来自上述的他克莫司-琥珀酸酯混合物(2.5 mg, 2.8微摩尔)、N-羟基琥珀酰亚胺(1.0 mg, 8.7微摩尔)和无水乙腈(250  $\mu\text{L}$ )。将混合物加盖,并在室温搅拌。向搅拌的混合物中添加N,N'-二环己基碳二亚胺(3.0 mg, 15微摩尔)。将小瓶加盖,并将混合物在室温搅拌。

[0094] 2小时后,将混合物蒸发至干燥。将所得物质溶解在无水N,N'-二甲基甲酰胺(250  $\mu\text{L}$ )中。这是活化的FK506-琥珀酸酯的工作溶液。

[0095] 向20 mL小瓶中添加8 mL 10 mM磷酸盐缓冲液pH 8和DMF (1.5 mL)中KLH (8 mg)

的溶液。将混合物冷却至约4℃,并在搅拌下将200 μL来自上述的工作溶液逐滴添加至冷却溶液。将混合物在4℃搅拌16-24小时,然后用水稀释至30 mL,用两个CENTRICON® 30过滤器脱盐,并用新鲜水再重构3次。用水将最终物质稀释至10 mL。通过BCA蛋白测定方法测定蛋白浓度。

[0096] 针对他克莫司的单克隆抗体的制备。如下制备结合他克莫司分子的分开部分的单克隆抗体。免疫原是如上所述制备的他克莫司-钥孔血蓝蛋白缀合物。使用该免疫原来免疫Balb/c小鼠。第一次免疫是腹膜内200 μl 体积中的25 μg,具有单磷酸脂质A和合成海藻糖二杆菌分枝菌酸酯(trehalose dicorynomycolate)佐剂(R1B1 MPL+TDM Emulsion, R1B1 ImmunoChem Research Inc., Hamilton MT)。五周后,用200 μl单磷酸脂质A和合成海藻糖二杆菌分枝菌酸酯佐剂中的25 μg免疫原腹膜内给予加强免疫。随后,在另外8周后,静脉内和腹膜内给予200 μl Hanks'平衡盐溶液中25 μg免疫原的融合前加强(prefusion boost)。

[0097] 三天后,使用指定为P3x63-AG8.653的非分泌型鼠骨髓瘤通过标准方法进行融合。通过标准方法实施克隆。

[0098] 根据以下方案通过以下反向ELISA免疫测定程序筛选克隆。以100 μl/孔用磷酸盐缓冲盐水中5 μg/ml的多克隆山羊抗小鼠IgG (IgG+IgA+IgM) (Zymed Laboratories, South San Francisco CA)包被板。板包被在室温进行2小时或更久,或在约4℃进行过夜;可以将所述板在约4℃包裹在膜中储存数天。然后将板轻轻拍干,并用300 μl/孔的封闭缓冲稀释液(PBS中0.5%牛血清白蛋白,0.05% TWEEN® 20)封闭。通过在室温在板振荡的情况下孵育15分钟或更久而进行板封闭。然后将板轻轻拍干。然后如下将待筛选的单克隆抗体添加至各孔中:添加50 μl/孔的封闭缓冲稀释液连同50 μl/孔的从融合生长板中的相应孔转移的培养上清液。孵育在室温在振荡的情况下约1小时。使用具有S20堆叠器(stacker)的TITERTECK PLUS®洗板机用作为具有0.05% TWEEN® 20的PBS的洗涤缓冲液洗涤板。以100 μl/孔添加在封闭缓冲稀释剂中稀释至1:4000的共价偶联至葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的他克莫司的酶缀合物。在室温在振荡的情况下进行孵育约1小时。然后将板洗涤,并以100 μl/孔的体积添加显色溶液。显色溶液含有0.593 mM对碘硝基四唑紫、0.02 M NAD、0.033 M 葡萄糖-6-磷酸、0.055 M Tris、0.02%叠氮化钠和心肌黄酶(硫辛酰脱氢酶)的1:4000稀释液。BSA以5% w/vol BSA溶液的1% (体积/体积(vol/vol))存在。使用BSA来帮助防止还原的对碘硝基四唑紫的快速沉淀。

[0099] 从筛选选择产生合适的单克隆抗体的杂交瘤。这被指定为14H04抗体。

[0100] 使用如上所述的他克莫司分子的具有在C32、C24和C32以及C24位置处连接的KLH的免疫原混合物以类似方式制备指定为1E2的他克莫司的单克隆抗体。

[0101] 溶血性预处理溶液的制备。该预处理溶液含有5 μg/mL西罗莫司(SIRO)、6.8 mg/mL PIPES™ 1.5钠盐、0.3 mg/mL EDTA二钠、1.0 mg/mL皂苷、0.2% PROCLIN® 300、0.024 mg/mL硫酸新霉素和0.99 mg/mL NaN<sub>3</sub>, pH 6.5。最终反应混合物中的SIRO浓度为1.1 μg/mL。表1显示了对用于测定他克莫司的全血样品的部分发生溶血中使用的溶血试剂的组成(A1=如指示)。Chol是胆固醇,且Trig是甘油三酯。

[0102] 表 1

[0103]

名称	量(每 mL)	功能
胰凝乳蛋白酶	5 µg	从结合蛋白解离 I K 506
叠氮化钠	0.99 mg	杀菌剂/防腐剂
PIPES™ 1.5 缓冲液	6.8 mg	缓冲剂
EDTA 二钠二水合物	0.5 mg	防止凝块形成
肝素	1 mg	血细胞裂解
PLURONIC® 25R2	0.9 mg	choI/Trig 干扰
PROCLIN® 300	0.4 mg	防腐剂
硫脲基丙酮	0.024 mg	防腐剂

[0104] 使用14H04克隆制备抗他克莫司F(ab')<sub>2</sub>-β-半乳糖苷酶缀合物。根据已知技术,将单克隆抗他克莫司抗体14H04(如上所述制备)使用赖氨酰基-内肽酶(Wako, Richmond, VA)消化片段化为F(ab')<sub>2</sub>,然后使用标准异双官能的SMCC(琥珀酰亚胺基反-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯)接头缀合至β-半乳糖苷酶。抗体缀合物溶液含有约2.0 µg/mL抗他克莫司抗体-β-半乳糖苷酶缀合物、30 mg/mL无蛋白酶的牛血清白蛋白、0.126 mg/mL MgCl<sub>2</sub>、0.03 mL/mL乙二醇、24.5 mg/mL HEPES、38.5 mg/mL Na HEPES、50 mg/mL NaCl和β-gal突变蛋白(灭活的β-半乳糖苷酶),pH 7.8。

[0105] 磁性铬颗粒制备。通过将单克隆抗他克莫司抗体1E2(如上所述制备)缀合至戊二醛包被的二氧化铬颗粒而制备铬颗粒(免疫测定固相)。铬试剂含有铬颗粒和60.4 mg/mL海藻糖二水合物和7.2 mg/mL聚乙二醇(PEG) 8000。在研究中使用三种铬颗粒浓度,即5、2.5和1.67 mg/mL。

[0106] 夹心他克莫司测定。他克莫司的夹心测定的原理和操作如下:在DIMENSION<sup>®</sup> RxL分析仪上在反应容器中将含有他克莫司的全血样品(50 µL)与如上所述制备的溶血预处理试剂组合。通过首先将血液与超声波样品探头混合而从标准杯采样全血。全血样品与预处理溶液的混合确保了全血的溶血和从其结合位点置换出蛋白结合的他克莫司分子。

[0107] 将使用14H04抗体克隆制备的抗他克莫司F(ab')<sub>2</sub>-β-半乳糖苷酶缀合物(50 µL)添加至反应容器中,并将混合物在43°C的温度保持一段时间(35秒),以允许他克莫司,如果存在的话,与抗体酶缀合物反应。将具有固定化的1E2单克隆抗体的铬颗粒(50 µL)添加至反应容器中,并使其结合他克莫司-14H04 F(ab')<sub>2</sub>-β-半乳糖苷酶复合体以形成铬-1E2 Ab::他克莫司::14H04 Ab夹心。将该反应混合物在43°C的温度孵育14分钟,然后在Dimension仪器上开始自动化磁分离、混合和洗涤循环。采用总共4个分离/洗涤循环以便从样品去除未结合的他克莫司F(ab')<sub>2</sub>-β-半乳糖苷酶缀合物和碎片。在HEPES缓冲液在pH 8.0使用Chemistry Wash溶液在线(on board)进行自动化铬洗涤,提供其两者用于DIMENSION<sup>®</sup> 异质免疫测定模块。然后通过超声波混合将洗涤的铬颗粒再悬浮在Chemistry Wash溶液中,并将悬浮的铬颗粒的部分(54µL)转移到光度计比色皿中与β-半乳糖苷酶底物溶液(氯酚红-β-D-吡喃半乳糖苷(galactopyranoside),或CPRG)混合。通过测量在CPRG存在的情况下缀合物的酶速率而检测铬颗粒表面上结合至14H04抗他克莫司F(ab')<sub>2</sub>-β-半乳糖苷酶缀合物的他克莫司。在577和700 nm双色测量每个反应容器的速率。他克莫司夹心免疫测定的信号剂量响应曲线描述于图3。

[0108] 实施例2[0109] 使用自动化ELISA夹心测定来测定他克莫司

[0110] 使用1E2克隆制备抗他克莫司抗体- $\beta$ -半乳糖苷酶缀合物。在由10 mM磷酸钠, pH 6.7与添加的300 mM氯化钠构成的环境中用异双官能接头SMCC(琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-甲酸酯(EMD Biosciences, Inc., La Jolla CA)衍生化小鼠单克隆抗-他克莫司抗体克隆1E2(如上所述制备)。使衍生化反应在25°C进行60分钟之后,将所得马来酰亚胺活化的抗体通过缓冲液交换至上述环境而再纯化,以去除未反应的接头和游离的N-羟基琥珀酰亚胺,随后调整浓度至1.0 mg/mL。

[0111] 然后将来自大肠杆菌的重组产生的 $\beta$ -半乳糖苷酶(Roche Diagnostics, Indianapolis IN)以1.0 mg/mL的浓度溶解在相同的磷酸盐/氯化钠环境中,向其中以1:1抗体:酶摩尔比混合马来酰亚胺活化的抗体。将混合物在25°C轻轻搅拌,同时通过使用9.4 x 250 mm ZORBAX® GF-450 HPLC柱(Agilent Technologies, Santa Clara CA)的层析监测缀合物种类随时间的生成。当生成少量的低分子量缀合物时,猝灭缀合反应。通过向反应混合物中添加足量的N-乙基马来酰亚胺(Thermo Fisher Scientific, Rockford IL)和胍而完成该猝灭。将猝灭的反应混合物过滤通过0.2微米过滤器,浓缩至约15 mg总蛋白/mL。然后使用与流动相相同的磷酸盐/氯化钠缀合反应环境通过使用21.2 x 300 mm BIOSEP™ -SEC-S-4000 HPLC柱(Phenomenex, Torrance CA)的半制备型尺寸排阻层析纯化混合物。合并含有期望分子量的缀合物物质的级分。然后稀释产物缀合物合并物以供使用。

[0112] 用于他克莫司的夹心酶联免疫吸附测定(ELISA)。采用以下步骤:步骤1:在4°C将50  $\mu$ L纯化的14H04(如上面所述制备)(PBS中10  $\mu$ g/mL)在ELISA板上包被过夜。将板使用含有0.05% TWEEN® 20的MilliQ水洗涤。步骤2:将200  $\mu$ L PCT封闭剂溶液(含有0.05% TWEEN® 20的磷酸盐缓冲液中0.5%酪蛋白(乳蛋白))添加至每个孔中并将介质在室温孵育30分钟。将板使用含有0.05% TWEEN® 20的MilliQ水洗涤。步骤3:将50  $\mu$ L在PBS中稀释的期望浓度的药物(FK506)添加至各孔中,并将介质在室温孵育30分钟。将板使用含有0.05% TWEEN® 20的MilliQ水洗涤。测试的他克莫司(TACR)药物浓度分别为0、0.01、0.02、0.04、0.08、0.16、0.31、0.63、1.25、2.50、5.0 和10.0 ng/mL。步骤4:添加单克隆抗体1E2- $\beta$ -半乳糖苷酶缀合物(以类似于上述的方式制备)(在PCT封闭剂溶液中1:300稀释),并将介质在室温孵育30分钟。将板使用含有0.05% TWEEN® 20的MilliQ水洗涤。步骤5:将 $\beta$ -半乳糖苷酶底物溶液(氯酚红- $\beta$ -D-吡喃半乳糖苷,或CPRG)添加至各孔中(100  $\mu$ L/孔)。步骤6:将各孔在读板器中以577 nm每分钟进行读取,持续20分钟。结果总结在图4中,其中ELISA信号以毫吸光度单位(mAU)计。

[0113] 排除非特异性结合的对照研究。在如上所述的实验条件下实施排除非特异性结合的对照研究。在一项研究中,将单克隆抗体14H04包被在ELISA板上,然后将其洗涤。添加他克莫司和抗他克莫司14H04 F(ab')<sub>2</sub>- $\beta$ -半乳糖苷酶缀合物,并如上述将所得混合物孵育并洗涤。在第二项研究中,将单克隆抗体1E2包被在ELISA板上,然后将其洗涤。添加他克莫司和抗他克莫司1E2- $\beta$ -半乳糖苷酶缀合物,并如上述将所得混合物孵育并洗涤。在第三项研究中,在ELISA板上没有包被任何捕获单克隆抗体,但添加他克莫司药物和任一上述单克隆抗体缀合物,随后如上所述洗涤并孵育。对于所有这些对照研究,在添加 $\beta$ -半乳糖苷酶底物溶液之后,在读板器中在20分钟读数期间中在577 nm处读数没有检测到任何ELISA信号。这些结果表明,在所述条件下没有形成任何夹心。

[0114] 本说明书中引用的所有出版物和专利申请都通过引用并入本文,如同每个单独的

出版物或专利申请被明确且单独地提到通过引用并入。

[0115] 尽管已经出于清楚理解的目的通过说明和举例的方式详细描述了前述发明,但鉴于本发明的教导,对于本领域普通技术人员显而易见的是,在不脱离所附权利要求的精神或范围的情况下,可以对其进行某些变化和改变。此外,出于解释的目的,上述描述使用特定术语来提供本发明的透彻理解。然而,对于本领域技术人员将显而易见的是,不需要具体细节来实施本发明。因此,呈现本发明的上述具体实施方案的描述是为了说明和描述的目的;它们并非意在穷举或将本发明限制为所公开的精确形式。鉴于上述教导,许多改变和变化是可能的。选择并描述实施方案是为了解释本发明的原则和其实际应用,进而帮助本领域技术人员利用本发明。

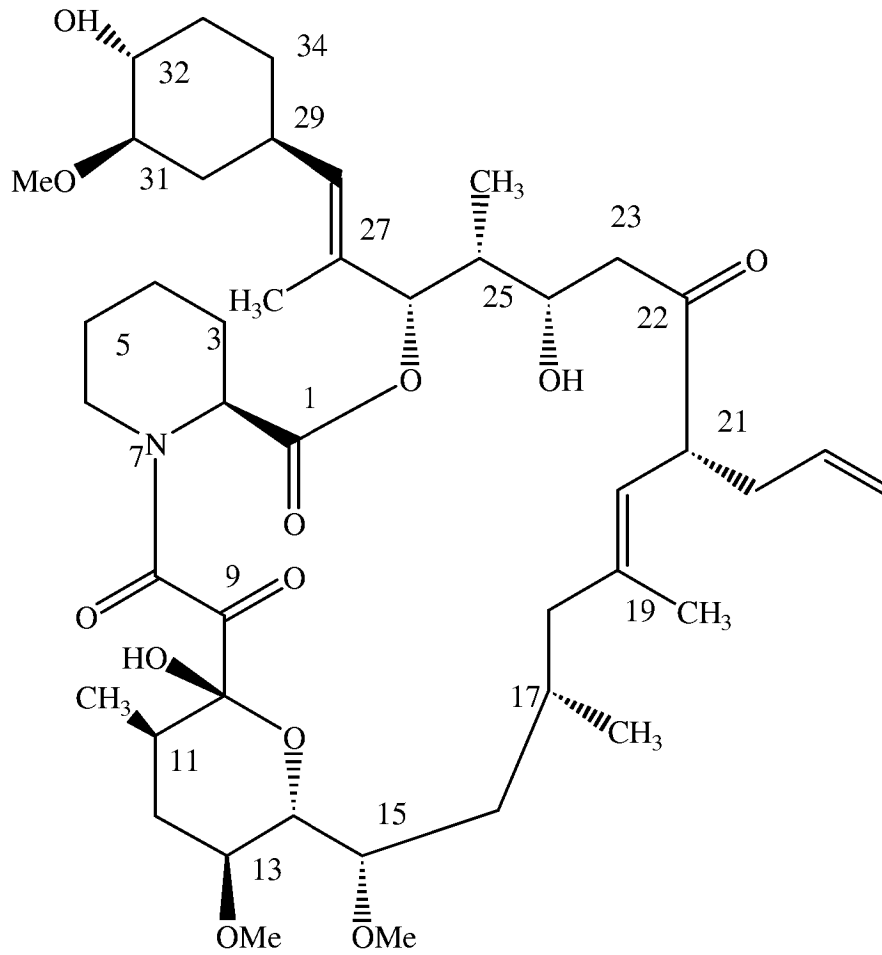


图 1

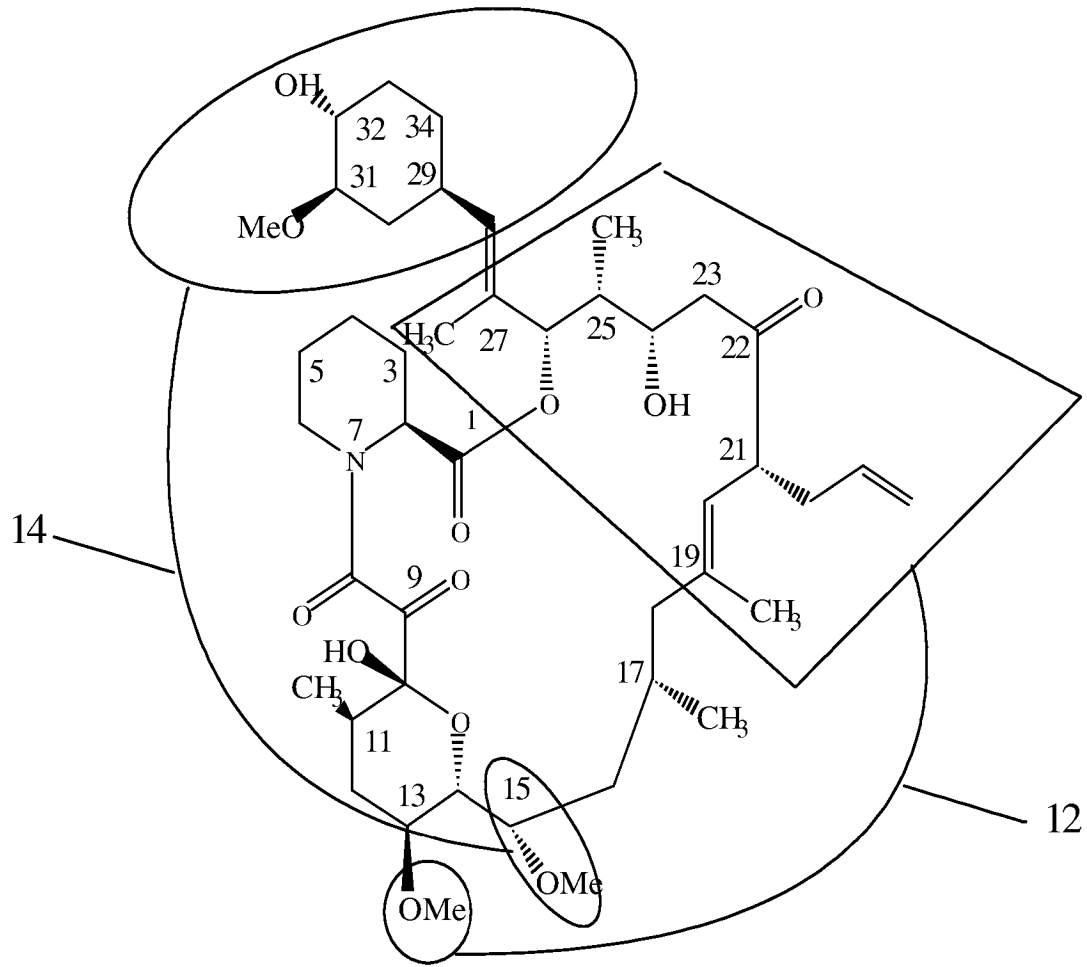


图 2

药物信号剂量响应曲线  
他克莫司夹心免疫测定

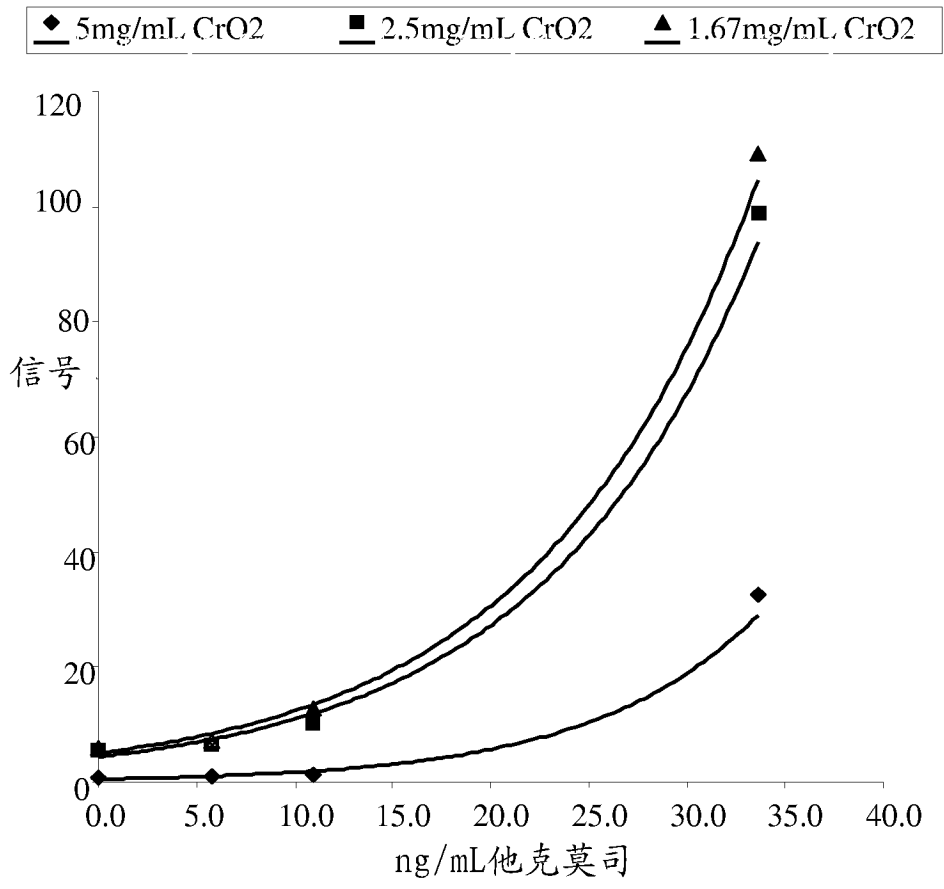


图 3

ELISA夹心测定中的他克莫司  
剂量响应曲线

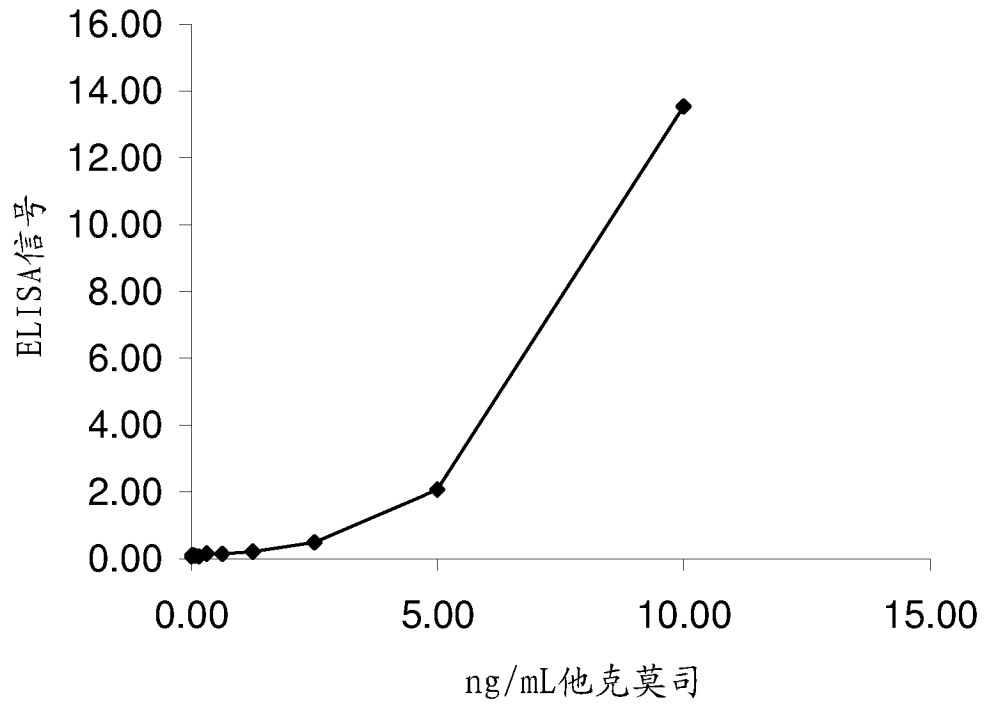


图 4

专利名称(译)	用于免疫抑制剂药物的夹心测定		
公开(公告)号	<a href="#">CN104160273B</a>	公开(公告)日	2016-11-16
申请号	CN201380012686.X	申请日	2013-01-31
[标]申请(专利权)人(译)	西门子医疗保健诊断公司		
申请(专利权)人(译)	西门子医疗保健诊断公司		
当前申请(专利权)人(译)	西门子医疗保健诊断公司		
[标]发明人	T Q 魏		
发明人	T.Q.魏		
IPC分类号	G01N33/53 C12P21/08 C07K16/00		
CPC分类号	G01N33/9493 G01N2333/36		
代理人(译)	周轶		
优先权	13/413925 2012-03-07 US		
其他公开文献	CN104160273A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

公开了用于测定怀疑含有免疫抑制剂药物的样品中的免疫抑制剂药物的方法。所述方法包括在介质中组合提供样品、针对免疫抑制剂药物的第一单克隆抗体和针对免疫抑制剂药物的第二单克隆抗体。第二单克隆抗体结合除了第一单克隆抗体结合免疫抑制剂药物的部分以外的免疫抑制剂药物的部分。在用于第一单克隆抗体和第二单克隆抗体结合免疫抑制剂药物的条件下孵育介质。检查该介质中包含免疫抑制剂药物、第一单克隆抗体和第二单克隆抗体的免疫复合体的存在。免疫复合体的存在和/或量表明样品中免疫抑制剂药物的存在和/或量。

