

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5241735号  
(P5241735)

(45) 発行日 平成25年7月17日(2013.7.17)

(24) 登録日 平成25年4月12日(2013.4.12)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 A
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 G
GO 1 N 1/28 (2006.01)	GO 1 N 1/28 J

請求項の数 48 (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願2009-544191 (P2009-544191)	(73) 特許権者	391008788
(86) (22) 出願日	平成19年12月19日(2007.12.19)		アボット・ラボラトリーズ
(65) 公表番号	特表2010-515062 (P2010-515062A)		ABBOTT LABORATORIES
(43) 公表日	平成22年5月6日(2010.5.6)		アメリカ合衆国 イリノイ州 アボット
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/088070		パーク アボット パーク ロード 10
(87) 国際公開番号	W02008/082974		0
(87) 国際公開日	平成20年7月10日(2008.7.10)	(74) 代理人	110001173
審査請求日	平成22年8月26日(2010.8.26)		特許業務法人川口国際特許事務所
(31) 優先権主張番号	11/618,495	(74) 代理人	100140523
(32) 優先日	平成18年12月29日(2006.12.29)		弁理士 渡邊 千尋
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100103920
			弁理士 大崎 勝真
		(74) 代理人	100124855
			弁理士 坪倉 道明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非変性細胞溶解試薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

非タンパク質分子であるアナライトのアッセイにおいて使用する試験サンプルを調製する方法であって、

試験サンプルを細胞溶解試薬に接触させて細胞溶解混合物を形成させることを含んでなり；

細胞溶解試薬が、エチレングリコール、プロピレングリコールおよび2から6個の炭素原子を有するグリコールよりなる群から選ばれるグリコールを含み；

5個以下の炭素を有する少なくとも1種のアルコールが細胞溶解試薬中に含まれるか、または細胞溶解混合物に加えられ、かつ、アルコールが加えられた後、細胞溶解混合物が均一混合物であり；

方法が、試験サンプルまたは細胞溶解混合物を界面活性剤と接触させることを含まず；

細胞溶解混合物は、遠心分離工程を必要としない分析のために用意されている、前記方法

。

【請求項 2】

アルコールが細胞溶解試薬中に含まれる、請求項1の方法。

【請求項 3】

試験サンプルがヒト血液サンプルを含む、請求項1の方法。

【請求項 4】

アルコールが、メタノール、エタノールおよびプロパノールよりなる群から選ばれる、

10

20

請求項 1 の方法。

【請求項 5】

グリコール対アルコールの比が約 4 : 1 から約 1 : 4 の範囲である、請求項 2 の方法。

【請求項 6】

グリコール対アルコールの比が約 4 : 1 から約 1 : 2 の範囲である、請求項 2 の方法。

【請求項 7】

試験サンプルを細胞溶解試薬に約 2 : 1 から約 1 : 2 の範囲の比で加える、請求項 2 の方法。

【請求項 8】

方法が、細胞溶解混合物を遠心分離することを含まない、請求項 1 から 7 のいずれかの方法。 10

【請求項 9】

アッセイが、試験サンプル中の 1 以上の結合タンパク質に結合しているアナライトを検出し、方法が更に、試験サンプルまたは細胞溶解混合物を、前記の 1 以上の結合タンパク質からアナライトを遊離させる物質に接触させることを含む、請求項 1 から 7 のいずれかの方法。

【請求項 10】

物質が前記の 1 以上の結合タンパク質への結合に関してアナライトと競合する、請求項 9 の方法。

【請求項 11】

アナライトが免疫抑制薬を含み、ならびに物質が、異なるが構造的に類似している免疫抑制薬を含む、請求項 10 の方法。 20

【請求項 12】

アナライトが非タンパク質分子を含み、ならびに物質が、前記の 1 以上の結合タンパク質を分解するプロテアーゼを含む、請求項 9 の方法。

【請求項 13】

非タンパク質分子であるアナライトを含むことができる試験サンプル；  
エチレングリコール、プロピレングリコールおよび 2 から 6 個の炭素原子を有するグリコールよりなる群から選ばれるグリコール、および  
5 個以下の炭素を有する少なくとも 1 種のアルコール 30  
を含んでなる細胞溶解試薬混合物であって、  
細胞溶解混合物が均一混合物であり；  
細胞溶解試薬混合物は、界面活性剤を含まず、遠心分離工程を必要としない分析のために用意されている、前記細胞溶解試薬混合物。

【請求項 14】

試験サンプルがヒト血液サンプルを含む、請求項 13 の細胞溶解試薬混合物。

【請求項 15】

アルコールが、メタノール、エタノールおよびプロパノールよりなる群から選ばれる、請求項 13 の細胞溶解試薬混合物。

【請求項 16】

グリコール対アルコールの比が約 4 : 1 から約 1 : 4 の範囲である、請求項 13 から 15 のいずれかの細胞溶解試薬混合物。 40

【請求項 17】

グリコール対アルコールの比が約 4 : 1 から約 1 : 2 の範囲である、請求項 13 から 15 のいずれかの細胞溶解試薬混合物。

【請求項 18】

試験サンプル対細胞溶解試薬の比が約 2 : 1 から約 1 : 2 の範囲である、請求項 13 ~ 15 のいずれかの細胞溶解試薬混合物。

【請求項 19】

( a ) 試験サンプルを細胞溶解試薬に接触させて細胞溶解混合物を形成させる工程であ 50

って、

細胞溶解試薬は、エチレングリコール、プロピレングリコールおよび 2 から 6 個の炭素原子を有するグリコールよりなる群から選ばれるグリコールを含み；

5 個以下の炭素を有する少なくとも 1 種のアルコールが細胞溶解試薬中に含まれるか、または細胞溶解混合物に加えられ、かつ、アルコールが加えられた後、細胞溶解混合物が均一混合物であり；

試験サンプルまたは細胞溶解混合物を界面活性剤と接触させることを含まず；

細胞溶解混合物は、遠心分離工程を必要としない分析のために用意されている、前記工程、

( b ) アナライトに関して細胞溶解混合物をアッセイする工程 10  
を含んでなる、試験サンプル中の非タンパク質分子であるアナライトの存在または濃度を評価するための方法。

【請求項 2 0】

アルコールが細胞溶解試薬中に含まれる、請求項 1 9 の方法。

【請求項 2 1】

細胞溶解混合物が均一混合物である、請求項 1 9 の方法。

【請求項 2 2】

アッセイがイムノアッセイを含む、請求項 1 9 の方法。

【請求項 2 3】

アナライトが免疫抑制薬を含む、請求項 1 9 の方法。 20

【請求項 2 4】

免疫抑制薬が、シロリムス、タクロリムス、エベロリムス、テムソロリムス、ゾタロリムス、およびシクロスポリンよりなる群から選ばれる、請求項 2 3 の方法。

【請求項 2 5】

試験サンプルがヒト血液サンプルを含む、請求項 1 9 の方法。

【請求項 2 6】

アルコールが、メタノール、エタノールおよびプロパノールよりなる群から選ばれる、請求項 1 9 の方法。

【請求項 2 7】

グリコール対アルコールの比が約 4 : 1 から約 1 : 4 の範囲である、請求項 2 0 の方法 30

【請求項 2 8】

グリコール対アルコールの比が約 4 : 1 から約 1 : 2 の範囲である、請求項 2 7 の方法

【請求項 2 9】

試験サンプルを細胞溶解試薬に約 2 : 1 から約 1 : 2 の範囲の比で加える、請求項 2 0 の方法。

【請求項 3 0】

方法が、細胞溶解混合物を遠心分離することを含まない、請求項 1 9 から 2 9 のいずれかの方法。 40

【請求項 3 1】

アッセイが、試験サンプル中の 1 以上の結合タンパク質に結合しているアナライトを検出し、方法が更に、試験サンプルまたは細胞溶解混合物を、前記の 1 以上の結合タンパク質からアナライトを遊離させる物質に接触させることを含む、請求項 1 9 から 2 9 のいずれかの方法。

【請求項 3 2】

物質が前記の 1 以上の結合タンパク質への結合に関してアナライトと競合する、請求項 3 1 の方法。

【請求項 3 3】

アナライトが免疫抑制薬を含み、ならびに物質が、異なるが構造的に類似している免疫 50

抑制薬を含む、請求項 3 2 の方法。

【請求項 3 4】

アナライトが非タンパク質分子を含み、ならびに物質が、前記の 1 以上の結合タンパク質を分解するプロテアーゼを含む、請求項 3 1 の方法。

【請求項 3 5】

( a ) 少なくとも 1 つの非タンパク質分子であるアナライトに特異的に結合しうる少なくとも 1 つの抗体またはタンパク質、

( b ) エチレングリコール、プロピレングリコールおよび 2 から 6 個の炭素原子を有するグリコールよりなる群から選ばれるグリコールを含む細胞溶解試薬、ならびに

( c ) 5 個以下の炭素を有する少なくとも 1 種のアルコール

を含んでなる試験キットであって、

細胞溶解試薬およびアルコールが組合され、単一の容器内に包装されており；

細胞溶解試薬は、界面活性剤を含まず；

細胞溶解試薬は、試験サンプルと混合された時、均一混合物である細胞溶解混合物を形成し；

細胞溶解試薬混合物は、遠心分離工程を必要としない分析のために用意されている、前記試験キット。

【請求項 3 6】

アナライトが免疫抑制薬を含む、請求項 3 5 の試験キット。

【請求項 3 7】

免疫抑制薬が、シロリムス、タクロリムス、エベロリムス、テムソロリムス、ゾタロリムス、およびシクロスポリンよりなる群から選ばれる、請求項 3 6 の試験キット。

【請求項 3 8】

( a ) の少なくとも 1 つのアナライトを含む対照組成物を更に含む、請求項 3 5 の試験キット。

【請求項 3 9】

アルコールが、メタノール、エタノールおよびプロパノールよりなる群から選ばれる、請求項 3 5 の試験キット。

【請求項 4 0】

グリコール対アルコールの比が約 4 : 1 から約 1 : 4 の範囲である、請求項 3 5 の試験キット。

【請求項 4 1】

グリコール対アルコールの比が約 4 : 1 から約 1 : 2 の範囲である、請求項 3 5 の試験キット。

【請求項 4 2】

試験キットが更に、試験サンプル中の 1 以上の結合タンパク質からアナライトを遊離させる物質を含む、請求項 3 5 の試験キット。

【請求項 4 3】

物質が前記の 1 以上の結合タンパク質への結合に関してアナライトと競合する、請求項 4 2 の試験キット。

【請求項 4 4】

アナライトが免疫抑制薬であり、ならびに物質が、異なるが構造的に類似している免疫抑制薬を含む、請求項 4 2 から 4 3 のいずれかの試験キット。

【請求項 4 5】

免疫抑制薬がシロリムス、タクロリムス、エベロリムス、テムソロリムス、ゾタロリムスおよびシクロスポリンよりなる群から選ばれる、請求項 4 4 の試験キット。

【請求項 4 6】

物質が、前記の 1 以上の結合タンパク質を分解するプロテアーゼを含む、請求項 4 2 の試験キット。

【請求項 4 7】

10

20

30

40

50

( a ) シロリムス、タクロリムス、エベロリムス、テムソロリムス、ゾタロリムスおよびシクロスポリンよりなる群から選ばれる少なくとも1つの免疫抑制薬に特異的に結合しうる少なくとも1つの抗体またはタンパク質、

( b ) プロピレングリコールおよびエタノールを約4 : 1から約1 : 2の範囲の比で含む細胞溶解試薬、ならびに

( c ) ( a ) の少なくとも1つの免疫抑制薬を含む対照組成物

を含んでなる試験キットであって、

前記細胞溶解プロピレングリコールおよびエタノールが組合され、単一の容器内に包装されており；

細胞溶解試薬は、界面活性剤を含まず；

細胞溶解試薬は、試験サンプルと混合された時、均一混合物である細胞溶解混合物を形成し；

細胞溶解試薬混合物は、遠心分離工程を必要としない分析のために用意されている、前記試験キット。

【請求項48】

少なくとも1つの免疫抑制薬がシロリムスを含む、請求項47の試験キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、例えば試験サンプル中の免疫抑制薬の濃度レベルを測定するための診断イムノアッセイにおいて有用である非変性細胞溶解試薬に関する。

【背景技術】

【0002】

臨床上関心のある多数のアナライトは細胞により取り込まれ、または試験サンプルの他の成分の1以上と複合体を形成する。したがって、サンプル中に存在するアナライトの量の正確な測定結果を得るためには、アッセイにおける検出のためにアナライトが細胞または他の成分から遊離される条件下、サンプルを処理し、および/またはアッセイを行うことが好ましい。

【0003】

例えば、タクロリムス、エベロリムス、テムソロリムスおよびシクロスポリンのような免疫抑制薬は移植手術後の器官または組織拒絶、移植片対宿主病およびヒトにおける自己免疫疾患の治療に有効である。免疫抑制薬療法中、免疫抑制薬の血液濃度レベルのモニターは臨床ケアの重要な態様である。なぜなら、不十分な薬物レベルは移植片（器官または組織）拒絶を招き、過剰レベルは、望ましくない副作用および毒性を招くからである。したがって、薬物レベルを適当な濃度に維持するために薬物投与量が調節されるよう、免疫抑制薬の血中レベルが測定される。したがって、免疫抑制薬の血中レベルの測定のための診断アッセイは広範な臨床用途を有する。

【0004】

まず、免疫抑制薬を患者のサンプルのその他の成分から抽出し分離しなければならない。患者のサンプル中の免疫抑制薬の大部分は結合タンパク質のような種々の「担体」分子との複合体中に存在する。シロリムス、タクロリムスおよびシクロスポリンは患者の試料の赤血球中に主に見出され、特異的結合タンパク質（シロリムスおよびタクロリムスの場合にはFKBP、そしてシクロスポリンの場合にはシクロフィリン）と結合している。試料中の全薬物濃度の正確な測定を保証するためには、結合タンパク質に結合した薬物を、好ましくは、定量前に遊離させる。これは、細胞を細胞溶解する界面活性剤および/またはサンプルタンパク質を変性させる有機溶媒を使用することにより対処されている。

【0005】

薬物は、結合タンパク質からのその抽出後、吸光度または質量分光光度検出を伴うクロマトグラフィーまたはイムノアッセイを含む多数の異なる方法により測定される。免疫抑制薬に関するイムノアッセイは種々の形態で利用可能であるが、全ては免疫抑制薬に対

10

20

30

40

50

する抗体または結合タンパク質（例えば、FKBP）の結合を利用する。一般に用いられるイムノアッセイは、免疫抑制薬への一次抗体の結合および残存遊離抗体結合部位への標識免疫抑制薬（例えば、アクリジニウム - シロリムス）の結合、ならびにそれに続く、標識の検出による定量を含むアッセイである。

【発明の概要】

【0006】

発明の概括

本発明は、試験サンプルを細胞溶解試薬に接触させて細胞溶解混合物を形成させることを含んでなる、アッセイにおいて使用する試験サンプルを調製する方法を提供する。細胞溶解試薬は、エチレングリコール、プロピレングリコールおよびそれらの類似体よりなる群から選ばれるグリコールを含み、5個以下の炭素を有する少なくとも1種のアルコールが細胞溶解試薬中に含まれるか、または細胞溶解混合物に加えられる。アルコールは、例えば、メタノール、エタノールおよび/またはプロパノールでありうる。特定の実施形態においては、試験サンプルは、ヒト血液サンプルを含む。

10

【0007】

本発明のサンプル調製方法の利点は、遠心分離工程を伴うことなく、および/または界面活性剤の使用を伴うことなく、分析のためにサンプルが製造されうることを含む。

【0008】

好ましい実施形態においては、細胞溶解試薬中にアルコールが含まれる。そのような実施形態の変形態様においては、グリコール対アルコールの比は、約4:1から約1:4、または好ましくは、約4:1から約1:2の範囲である。試験サンプルは、任意のそのような細胞溶解試薬に、約2:1から約1:2の範囲の比で加えられうる。

20

【0009】

試験サンプル中の1以上の結合タンパク質に結合しているアナライトに関するアッセイの前に方法を行う場合、方法は更に、試験サンプルまたは細胞溶解混合物を、結合タンパク質からアナライトを遊離させる物質に接触させることを含みうる。遊離誘発性物質は、例えば、結合タンパク質への結合に関してアナライトと競合する物質でありうる。1つの典型的な実施形態においては、アナライトは免疫抑制薬を含み、物質は、異なるが構造的に類似している免疫抑制薬を含む。アナライトが非タンパク質分子を含む場合、物質には、例えば、結合タンパク質を分解するプロテアーゼが含まれうる。

30

【0010】

本発明のもう1つの態様は、エチレングリコール、プロピレングリコールおよびそれらの類似体よりなる群から選ばれるグリコールと、5個以下の炭素を有する少なくとも1種のアルコールとを含む細胞溶解試薬混合物である。典型的な実施形態においては、グリコール対アルコールの比は、約4:1から約1:4、または好ましくは、約4:1から約1:2の範囲である。このグリコール - アルコール混合物は、典型的には、試験サンプルに加えられ、典型的な実施形態においては、約2:1から約1:2の範囲の比で加えられる。したがって、「細胞溶解試薬混合物」なる語は、試験サンプルへのグリコール - アルコール混合物の添加から生じる混合物をも含む。アルコールは、例えば、メタノール、エタノールおよび/またはプロパノールでありうる。特定の実施形態においては、試験サンプルはヒト血液サンプルを含む。

40

【0011】

本発明はまた、試験サンプル中のアナライトの存在または濃度を評価するための方法を提供する。この方法は、試験サンプルを細胞溶解試薬に接触させて細胞溶解混合物を形成させ、アナライトに関して細胞溶解混合物をアッセイすることを含む。細胞溶解試薬は、エチレングリコール、プロピレングリコールおよびそれらの類似体よりなる群から選ばれるグリコールを含み、5個以下の炭素を有する少なくとも1種のアルコールが細胞溶解試薬中に含まれるか、または細胞溶解混合物に加えられる。アルコールは、例えば、メタノール、エタノールおよび/またはプロパノールでありうる。特定の実施形態においては、試験サンプルはヒト血液サンプルを含む。

50

## 【0012】

典型的な実施形態においては、アルコールが細胞溶解試薬中に含まれ、グリコール対アルコールの比は、約4：1から約1：4、または好ましくは、約4：1から約1：2の範囲である。このグリコール-アルコール混合物は、典型的には、試験サンプルに加えられ、典型的な実施形態においては、約2：1から約1：2の範囲の比で加えられる。

## 【0013】

本発明のサンプル調製方法の利点は、細胞溶解混合物が、遠心分離工程の必要性を伴うことなく及び/又は界面活性剤の使用を伴うことなく自動化ピペティングに適した均一混合物であることを含む。しかし、所望により、試験サンプルまたは細胞溶解混合物を界面活性剤に接触させることが可能である。

10

## 【0014】

細胞溶解混合物は、例えばイムノアッセイにより分析されうる。典型的な実施形態においては、検出されるアナライトには、免疫抑制薬、例えばシロリムス(sirrolimus)、タクロリムス(tacrolimus)、エベロリムス(everolimus)、テムソロリムス(temsorolimus)、ゾタロリムス(zotarolimus)、シクロスポリン(cyclosporine)またはこれらの化合物のいずれかの類似体が含まれる。

## 【0015】

特定の実施形態においては、アッセイは、試験サンプル中の1以上の結合パートナーに結合しているアナライトを検出する。そのような実施形態においては、方法は更に、試験サンプルまたは細胞溶解混合物を、結合タンパク質からアナライトを遊離させる物質に接触させることを含む。遊離誘発性物質は、例えば、結合タンパク質への結合に関してアナライトと競合する物質でありうる。1つの典型的な実施形態においては、アナライトは免疫抑制薬を含み、物質は、異なるが構造的に類似している免疫抑制薬を含む。アナライトが非タンパク質分子を含む場合、物質には、例えば、結合タンパク質を分解するプロテアーゼが含まれうる。

20

## 【0016】

本発明のもう1つの態様は、(a)少なくとも1つのアナライトに特異的に結合しうる少なくとも1つの抗体またはタンパク質、(b)エチレングリコール、プロピレングリコールおよびそれらの類似体よりなる群から選ばれるグリコールを含む細胞溶解試薬、ならびに(c)5個以下の炭素を有する少なくとも1種のアルコールを含む試験キットである。アルコールは、例えば、メタノール、エタノールおよび/またはプロパノールでありうる。好ましい実施形態においては、細胞溶解試薬およびアルコールが組合せられ、単一の容器内に包装される。そのような実施形態の変形態様においては、グリコール対アルコールの比は、約4：1から約1：4、好ましくは、約4：1から約1：2の範囲である。試験キットは、場合によっては、(a)の少なくとも1つのアナライトおよび/または界面活性剤を含む対照組成物を含有しうる。

30

## 【0017】

典型的な実施形態においては、検出されるアナライトには、免疫抑制薬、例えばシロリムス、タクロリムス、エベロリムス、テムソロリムス、ゾタロリムス、シクロスポリンまたはこれらの化合物のいずれかの類似体が含まれる。

40

## 【0018】

特定の実施形態においては、試験キットは更に、試験サンプル中の1以上の結合タンパク質からアナライトを遊離させる物質を含む。遊離誘発性物質は、例えば、結合タンパク質への結合に関してアナライトと競合する物質でありうる。1つの典型的な実施形態においては、アナライトは免疫抑制薬を含み、物質は、異なるが構造的に類似している免疫抑制薬を含む。アナライトが非タンパク質分子を含む場合、物質には、例えば、結合タンパク質を分解するプロテアーゼが含まれうる。

## 【0019】

本発明の典型的な好ましい試験キットは、(a)シロリムス、タクロリムス、エベロリ

50

ムス、テムソロリムス、ゾタロリムスおよびシクロスポリンよりなる群から選ばれる少なくとも1つの免疫抑制薬に特異的に結合しうる少なくとも1つの抗体またはタンパク質、(b)プロピレングリコールおよびエタノールを約4:1から約1:2の範囲の比で含む細胞溶解試薬、ならびに(c)(a)の少なくとも1つの免疫抑制薬を含む対照組成物を含む。

【発明を実施するための形態】

【0020】

詳細な説明

本発明は、均一な細胞溶解混合物を得るために試験サンプルと混合されうる非変性細胞溶解試薬に関する。このアプローチは、界面活性剤または変性剤に基づく従来の抽出方法より優れている。

10

【0021】

界面活性剤の使用は特定の形態においては問題となりうる。なぜなら、迅速に細胞を細胞溶解し断片化するために必要な界面活性剤の量は発泡を引き起こすことがあり、これは、ほとんどの自動化ピペティング系によりピペティングされなければならないサンプルでは許容されず、免疫アッセイにより分析されるサンプルにおける免疫化学を阻害しうる。本発明の細胞溶解試薬は、発泡しにくいサンプルを与え、界面活性剤の必要性を排除して、アッセイ免疫化学における界面活性剤誘発性阻害を回避する。

【0022】

変性剤の使用は、沈殿した血液成分を除去するための後続の遠心分離工程を要し、これはこのアプローチの効率を低下させる。また、要求される濃度での有機溶媒の使用は、アナライトの濃度に影響を及ぼすのに十分に有意なサンプルの蒸発を招きうる。本発明の細胞溶解試薬は、遠心分離工程の必要性を伴うことなく自動化ピペティング系における使用に適した均一混合物を与え、相当な濃度の揮発性有機溶媒の使用を回避する。

20

【0023】

定義

特許請求の範囲および明細書において用いる用語は、特に示さない限り、以下に記載するとおりに定義される。

【0024】

本明細書中で用いる「免疫抑制薬」または「免疫抑制剤」は、ラパマイシン(シロリムス)またはシクロスポリン(シクロスポリンAとしても公知である。)と同一の又は類似した化学構造を有する、小分子または抗体に基づく治療用化合物を意味する。ラパマイシンまたはシクロスポリンの任意の公知の又は後に開発される類似体が本明細書において免疫抑制薬とみなされる。好ましい免疫抑制薬には、シロリムス、タクロリムス、エベロリムス、テムソロリムス、ゾタロリムスおよびシクロスポリンが含まれる。タクロリムスおよびシクロスポリンは、インターロイキン2のようなサイトカインの抑制により免疫系のTリンパ球の初期活性化を抑制するカルシニューリンインヒビターである。これとは対照的に、シロリムス、エベロリムスおよびゾタロリムスの一次標的は、特異的細胞周期調節性タンパク質である、ラパマイシンの哺乳類標的(mTOR)である。mTORの抑制はサイトカイン駆動性Tリンパ球増殖の抑制を招く。

30

40

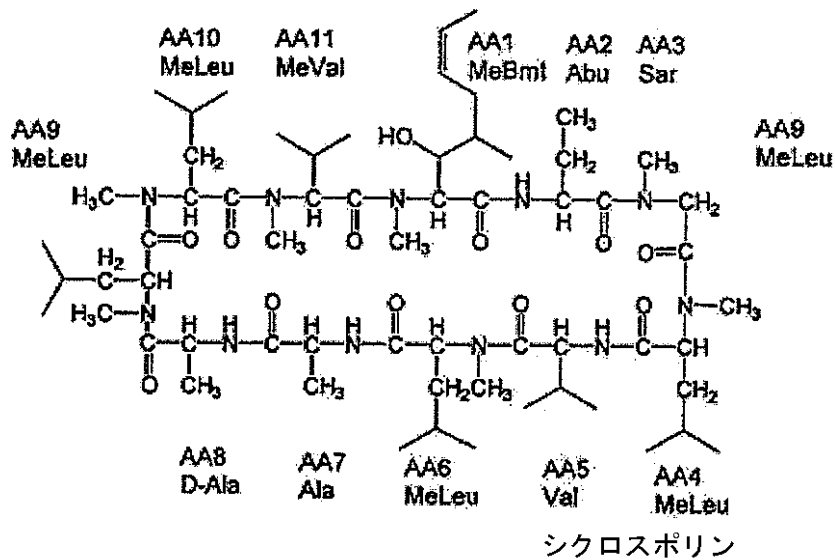
【0025】

シクロスポリンの化学式を図Aに示す。シロリムス(ラパマイシン)の化学式を式Bに示す。エベロリムス(RAD)の、シロリムスとは構造上異なる部分の化学式を、図Cに示す。

【0026】

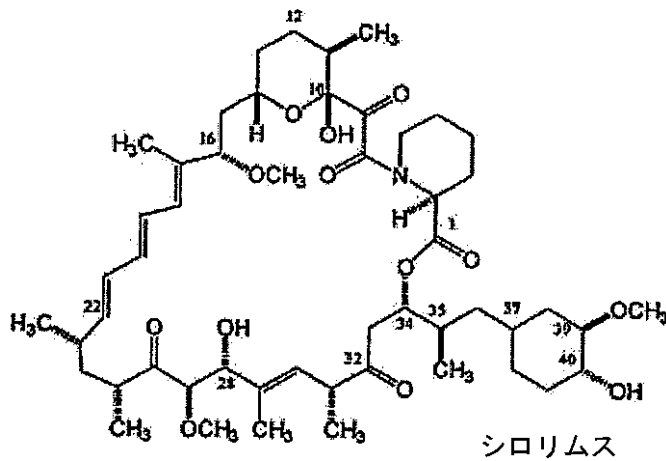
【化1】

A



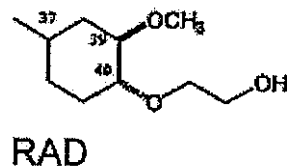
10

B



20

C



30

【0027】

シクロスポリンの多数の誘導体または類似体が製造されている。本発明は、シクロスポリンまたはその類似体のいずれかに関する細胞溶解試薬、細胞溶解方法、アッセイおよびアッセイキットを含む。

40

【0028】

ラパマイシンの多数の誘導体または類似体が製造されている。例えば、これらには、ラパマイシンのエステルモノ-およびジ-エステル誘導体（PCT国際出願WO 92/05179）、ラパマイシンの27-オキシム（欧州特許EP 0 467606）、ラパマイシンの42-オキソ類似体（米国特許第5,023,262号）、二環式ラパマイシン（米国特許第5,120,725号）、ラパマイシン二量体（米国特許第5,120,727号）、ラパマイシンのシリルエーテル（米国特許第5,120,842号）ならびにアリールスルホナートおよびスルファマト（米国特許第5,177,203号）の製造が含まれる。ラパマイシンは、最近、その天然に存在するエナンチオマー形態として合成された。（K.C.Nicolaouら, J. Am. Chem. Soc, 1993,

50

115, 4419-4420; S. L. Schreiber, J. Am. Chem. Soc., 1993, 115, 7906-7907; S. J. Danishefsky, J. Am. Chem. Soc., 1993, 115, 9345-9346)。本発明は、ラパマイシンまたはその類似体のいずれかに関する細胞溶解試薬、細胞溶解方法、アッセイおよびアッセイキットを含む。

【0029】

ラパマイシンのもう1つの免疫抑制薬類似体は、エス・ツクバエンシス (*S. tsukubaensis*) の株から単離された、タクロリムスとしても公知のFK-506である。FK-506の化学式は欧州特許EP 0 293 892 B1に公開されている。FK506の類似体には、関連天然物FR-900520およびFR-900523が含まれ、これらは、C-21のそれらのアルキル置換基においてFK506とは異なり、エス・ヒグロスコピクス・ヤクシムナエンシス (*S. hygrosopicus yakushimnaensis*) から単離された。エス・ツクバエンシス (*S. tsukubaensis*) により産生されるもう1つの類似体FR-900525は、プロリン基によるピペコリン酸部分の置換においてFK506とは異なる。本発明は、FK506またはその類似体のいずれかに関する細胞溶解試薬、細胞溶解方法、アッセイおよびアッセイキットを含む。テムソロリムスはシロリムスのもう1つのエステル誘導体であり、本発明によりモニターされる。

10

【0030】

ABT-578 [40-エピ-(1-テトラゾリル)-ラパマイシン] (今日ではゾタロリムスとしてのほうがよく知られている。) は、ラパマイシンから誘導される半合成マクロライドトリエン抗生物質である。ゾタロリムスの構造を図Dに示す。

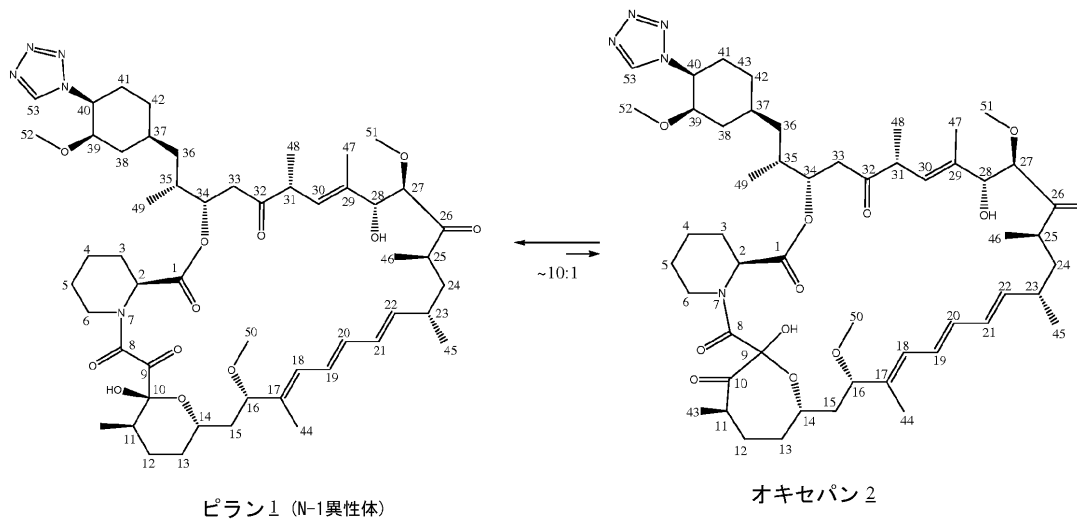
20

【0031】

【化2】

式 D

ゾタロリムスの異性体



30

40

(Ia)

(Ib)

【0032】

免疫抑制薬に関して本明細書中で用いる「構造的に類似」なる語は、薬物が少なくとも1つの共通の結合パートナー(例えば、結合タンパク質)に競合的に結合するのに十分な程度に類似した構造を薬物が有することを示す。

【0033】

「試験サンプル」なる語は、免疫抑制薬アナライトの起源である動物の体の成分、組織

50

または流体を意味する。これらの成分、組織および流体には、ヒトおよび動物の体液、例えば全血、血清、血漿、滑液、脳脊髄液、尿、リンパ液ならびに気道、腸管および尿生殖路の種々の外分泌物、涙、唾液、乳、白血球、骨髄腫など；生物学的流体、例えば細胞培養上清；固定組織試料；ならびに固定細胞試料が含まれる。好ましくは、試験サンプルはヒト末梢血サンプルである。

【 0 0 3 4 】

本明細書中で用いる「抗体」は、免疫グロブリン遺伝子または免疫グロブリン遺伝子の断片により実質的にコードされる1以上のポリペプチドよりなるタンパク質を意味する。この用語は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体およびそれらのフラグメント、ならびに免疫グロブリン遺伝子配列から改変操作された分子を含む。認識されている免疫グロブリン遺伝子には、カッパ、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロンおよびミュー定常領域遺伝子ならびに種々の免疫グロブリン可変領域遺伝子が含まれる。軽鎖はカッパまたはラムダとして分類される。重鎖はガンマ、ミュー、アルファ、デルタまたはイプシロンとして分類され、今度はこれが、それぞれ、免疫グロブリンクラス I g G、I g M、I g A、I g D および I g E を定める。

10

【 0 0 3 5 】

典型的な免疫グロブリン（抗体）構造単位は四量体を構成することが公知である。各四量体はポリペプチド鎖の2つの同一ペアから構成され、各ペアは1本の「軽」鎖（約25 kD）および1本の「重」鎖（約50から70 kD）を有する。各鎖のN末端は、主として抗原認識をもたらす約100から110個以上のアミノ酸の可変領域を定める。「可変軽鎖（V L）」および「可変重鎖（V H）」なる語は、それぞれ、これらの軽鎖および重鎖を意味する。

20

【 0 0 3 6 】

抗体は、完全な免疫グロブリンとして、または種々のペプチダーゼでの消化により生成した十分に特徴づけられたフラグメントとして存在する。したがって、例えば、ペプシンはヒンジ領域内のジスルフィド架橋より下の抗体を消化して F ( a b ' ) 2 を産生する。これは、それ自体が、ジスルフィド結合により V H - C H 1 に結合した軽鎖である F a b の二量体である。F ( a b ' ) 2 は穏和な条件下で還元されて、ヒンジ領域内のジスルフィド結合が分解され、それにより、F ( a b ' ) 2 二量体は F a b ' 単量体に変換される。F a b ' 単量体は、本質的には、ヒンジ領域の部分を伴う F a b である（他の抗体フラグメントの更に詳細な説明には、Fundamental Immunology, W. E. Paul 編, Raven Press, N. Y. (1993) を参照されたい）。完全な抗体の消化に関して種々の抗体フラグメントが定義されるが、そのような F a b ' フラグメントは化学的に又は組換え DNA 法を利用することにより新規に合成されうる、と当業者は理解するであろう。

30

【 0 0 3 7 】

したがって、本明細書中で用いる「抗体」なる語は、全抗体の修飾により産生される又は組換え DNA 法を用いて新規に合成される抗体フラグメントをも含む。「抗体」なる語はまた、一本鎖抗体（単一ポリペプチド鎖として存在する抗体）、より好ましくは、一本鎖 F v 抗体（s F v または s c F v）[ここで、可変重鎖および可変軽鎖が（直接的に又はペプチドリンカーを介して）互いに結合して連続的ポリペプチドを形成している]を含む。一本鎖 F v 抗体は、直接的に連結された又はペプチドコードリンカーにより連結された V H および V L をコードする配列を含む核酸から発現されうる共有結合した V H - V L ヘテロ二量体である（Huston ら, (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85: 5879 - 5883）。V H および V L は単一ポリペプチド鎖としてそれぞれに連結されるが、V H ドメインおよび V L ドメインは非共有的に結合する。s c F v 抗体および多数の他の構造体は、抗体 V 領域からの天然で凝集するが化学的に分離される軽および重ポリペプチド鎖を、抗原結合部位構造に実質的に類似した三次元構造に折り畳まれる分子に変換することが、当業者に公知である（例えば、米国特許第 5, 091, 513 号、第 5, 132, 405 号および第 4, 956, 778 号を参照されたい）。

40

50

## 【0038】

本明細書中で用いる「アナライト」は、試験サンプル中に存在すると疑われうる検出すべき物質を意味する。アナライトは、対応する特異的結合パートナーが天然に存在する又は対応する特異的結合パートナーが製造可能である任意の物質でありうる。したがって、アナライトは、アッセイにおいて1以上の特異的結合パートナーに結合しうる物質である。

## 【0039】

本明細書中で用いる「結合パートナー」は、結合ペア（すなわち、分子のペアであって、分子の一方が他方の分子に結合するもの）のメンバーである。特異的に結合する結合パートナーは「特異的結合パートナー」と称される。イムノアッセイにおいて一般に使用される抗原および抗体結合パートナーに加えて、他の特異的結合パートナーには、ビオチンおよびアビジン、炭水化物およびレクチン、相補的ヌクレオチド配列、エフェクターおよび受容体分子、補因子および酵素、酵素インヒビターおよび酵素などが含まれうる。免疫反応性特異的結合パートナーには、抗原、抗原フラグメント、抗体および抗体フラグメント、モノクローナルおよびポリクローナルの両抗体、ならびにそれらの複合体（組換えDNA法により形成されるものを含む）が含まれる。

10

## 【0040】

「特異的結合」なる語は、本明細書においては、特異的部位における、結合パートナー（例えば、ポリペプチドおよびリガンド（アナライト）、2つのポリペプチド、ポリペプチドおよび核酸分子、または2つの核酸分子）の、他方に対する優先的結合と定義される。「特異的に結合」なる語は、非特異的標的分子（例えば、特異的に認識される部位を欠くランダムに作製された分子）に比べて、標的分子/配列に対する結合優先性（例えば、アフィニティー）が少なくとも2倍、より好ましくは少なくとも5倍、最も好ましくは少なくとも10または20倍であることを示す。

20

## 【0041】

免疫抑制薬に特異的に結合する抗体は、その免疫抑制薬「に特異的」とであると称される。

## 【0042】

「捕捉物質」なる語は、本明細書においては、好ましくは特異的に、アナライトに結合する結合パートナーを表すために用いられる。捕捉物質は固相に結合されうる。本明細書中で用いる、アナライトへの固相固定捕捉物質の結合は、「固相固定複合体」を形成する。

30

## 【0043】

「標識検出用物質」なる語は、本明細書においては、検出可能な標識で標識されている又はアッセイにおける使用中に、検出可能な標識で標識される、好ましくは特異的に、アナライトに結合する結合パートナーを表すために用いられる。

## 【0044】

「検出可能な標識」は、検出可能である部分、または検出可能にされうる部分を含む。

## 【0045】

標識検出用物質に関して用いられる「直接標識」は、任意の手段により検出用物質に結合している検出可能な標識である。

40

## 【0046】

標識検出用物質に関して用いられる「間接標識」は、検出用物質に特異的に結合する検出可能な標識である。したがって、間接標識は、検出用物質の部分の特異的結合パートナーである部分を含む。ビオチンおよびアビジンは、例えば、間接的に標識された抗体を得るためにビオチン化抗体を標識アビジンに接触させることにより使用されるそのような部分の具体例である。

## 【0047】

本明細書中で用いる「指示試薬」なる語は、検出可能なシグナルを生成するために標識に接触させる任意の物質を意味する。したがって、例えば、通常の酵素標識においては、

50

酵素で標識された抗体を基質（指示試薬）に接触させて、検出可能なシグナル、例えば呈色反応産物を得ることが可能である。

【0048】

本明細書中で用いる「グリコール類似体」は、2から6個の炭素原子を有する任意のグリコールである。

【0049】

細胞溶解混合物は、それが、（手動で又は自動化系を使用して）正確かつ信頼しうるピペティングを可能にするのに十分な程度に、大きな微粒子を含有しない場合、「均一」と称される。

【0050】

#### Ⅰ．サンプル採集および加工

本発明の方法は、一般に、動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトに由来する試験サンプルに関して行われる。

【0051】

本発明の方法は、関心のあるアナライト（例えば免疫抑制薬）を含有しうる任意のサンプル、例えば血液サンプルを使用して行われうる。

【0052】

サンプルを任意の標準的な技術により採集し、ついで細胞溶解試薬に接触させて、細胞溶解混合物を形成させる。細胞溶解試薬は、2から6個の炭素原子を有するグリコールを含む。5個以下の炭素を有する少なくとも1種のアルコールが細胞溶解試薬中に含まれるか、または細胞溶解混合物に加えられる。好ましい実施形態においては、細胞溶解試薬はアルコールを含む。細胞溶解試薬における使用に適したグリコールには、例えば、エチレングリコール、プロピレングリコールおよびそれらの類似体ならびにそのようなグリコールの混合物が含まれる。特定の実施形態においては、グリコール対アルコールの比は約5：1から約1：5、4：1から約1：4、2：1から約1：2の範囲、または約1：1（容量：容量）である。より厳密な実施形態においては、グリコール対アルコールの比は約4：1から約1：2の範囲である。

【0053】

細胞溶解混合物は、任意の選択した量のサンプルを細胞溶解試薬に接触させるための任意の望ましい温度で、任意の混合技術により形成されうる。サンプルを、サンプル中の細胞を細胞溶解し均一混合物を得るために十分な容量の細胞溶解試薬に接触させる。前記のとおり、グリコール対アルコールの比が約4：1から約1：4の範囲である細胞溶解試薬の場合、サンプルは細胞溶解試薬に約2：1から約1：2、約1：3、約1：4、約1：5もしくは約1：10の範囲、例えば約1：1（容量：容量）または細胞溶解試薬組成に応じてこれらの値をエンドポイントとして含む任意の他の範囲で加えられうる。例えば、約100 $\mu$ Lから約600 $\mu$ Lの血液サンプルを約50 $\mu$ Lから約1200 $\mu$ Lの細胞溶解試薬と約5分間まで混合することが可能である。ある実施形態においては、150 $\mu$ Lの血液サンプルを300 $\mu$ Lの細胞溶解試薬と混合し、5から10秒間激しくボルテックスすることにより、細胞溶解混合物を形成させる。好ましい実施形態においては、細胞溶解は室温で1分未満で完了する。ついで細胞溶解混合物を、適当なアッセイを用いてアナライトに関してアッセイする。好ましい実施形態においては、細胞溶解混合物は、サンプルを遠心分離する必要性を伴うことなく、そのまま分析に使用される状態で得られる。

【0054】

本発明の細胞溶解試薬は、加えられる界面活性剤を何ら伴わずに使用されうる。しかし、ある実施形態においては、所望により、1以上の界面活性剤が加えられうる。界面活性剤は、典型的には、細胞溶解試薬の存在下で発泡しない。したがって、本発明に従い調製された細胞溶解混合物は、界面活性剤が含まれるかどうかには無関係に、自動化ピペティングに適している。界面活性剤は、免疫アッセイを意図した細胞溶解混合物中に含まれる場合、好ましくは、その免疫化学を阻害しない濃度で存在する。好ましくは、界面活性剤は非イオン界面活性剤、例えばサポニンであり、約0.01%から0.1%の範囲、よ

10

20

30

40

50

り好ましくは約0.1%の濃度で使用される。米国特許第5,650,288号(MacFarlaneおよびJensenに対して1997年7月22日付けで発行された;その全体を、界面活性剤の使用についてのその教示に関して、参照により本明細書に組み入れることとする。)は、界面活性剤の使用、特に、免疫抑制薬に関するイムノアッセイにおける界面活性剤の使用を記載している。

#### 【0055】

アナライトが試験サンプル中の1以上の結合タンパク質に結合している特定の実施形態においては、方法は更に、結合タンパク質からアナライトを遊離させる物質と試験サンプルを接触させることを含みうる。所望により、この物質は細胞溶解試薬中に含まれうる。物質は、例えば、結合タンパク質への結合に関してアナライトと競合するものでありうる。物質は、一般に、行うアッセイの結果にそれが影響を及ぼさないように選択される。したがって、例えば、アッセイがイムノアッセイである場合、物質は、典型的には、関連抗体が交差反応しないものである。アナライトが免疫抑制薬である場合、物質は、異なるが構造的に類似した免疫抑制薬でありうる。例えば、シロリムスおよびタクロリムスは共にFKBPに結合し、この理由により、シロリムスは、タクロリムスをFKBPから遊離させるため(およびその逆のため)に使用されうる。任意の後続のイムノアッセイは、一般に、シロリムスとタクロリムスとを識別する抗体を使用する。米国特許第6,187,547号(LegayおよびWegnerに対して2001年2月13日付けで発行された;その全体を、免疫抑制薬競合についてのその教示に関して、参照により本明細書に組み入れることとする。)は、結合タンパク質から免疫抑制薬を遊離させるのに有用な「結合競合体」を記載している。具体例には、シクロスポリンを遊離させうる[Thr<sup>2</sup>, Leu<sup>5</sup>, D-Hiv<sup>8</sup>, Leu<sup>10</sup>]-シクロスポリンが含まれる。

#### 【0056】

アナライトが非タンパク質分子である場合、アナライトを結合タンパク質から遊離するためにプロテアーゼが使用されうる。方法において使用されるプロテアーゼは、結合タンパク質を分解することによりアッセイ用のアナライトを遊離しうる、ならびに行うアッセイの感度および精度に悪影響を及ぼすことなく不活性化されうるものであるべきである。用いる不活性化方法により不活性化され得ない他の混入酵素を伴わない酵素を得るように留意すべきである。そうでなければ、いずれかの残留タンパク質分解活性が、後続のイムノアッセイにおいて使用される抗体を分解しうるであろう。典型的なプロテアーゼには、プロテイナーゼK、スブチリシン、ジスパーゼ、サーモリシン、トリプシン、フィシン、プロメラインおよびそれらの組合せが含まれる。

#### 【0057】

プロテイナーゼK(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.)は、熱(65以上)により及び特異的プロテアーゼインヒビター、例えばフェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF, Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.)またはジソプロピルフルオロホスファート(DFP, Calbiochem, La Jolla, Calif.)により不活性化されうる非特異的Ca依存性プロテアーゼである。スブチリシン(Sigma)は、酸性pHまたは特異的プロテアーゼインヒビター、例えばPMSF、DFPもしくはアプロチニンにより阻害されうるが、それは同様に、熱(55以上)により不活性化されうる非特異的Ca依存性プロテアーゼである。

#### 【0058】

ジスパーゼ(Boehringer MannheimまたはSigmaまたはCalbiochem)およびサーモリシン(SigmaまたはBoehringer Mannheim)は、例えば約5mMの濃度のEDTAにより不活性化されうるCa依存性メタロプロテアーゼである。プロテアーゼとしてジスパーゼおよびサーモリシンを組合せて使用する場合、タンパク質分解は、好ましくは、亜鉛塩、例えば約40mMのZnSO<sub>4</sub>の存在下、例えば約5mMの濃度のEDTAのような2価陽イオンキレート剤の添加により不活性化される。

10

20

30

40

50

## 【0059】

トリプシン(Worthington Biochemical Corp., Freehold, N.J.)はリシンまたはアルギニン残基のカルボキシル側において特異的にタンパク質を切断し、熱(90以上)により阻害されることが可能であり、あるいはアプロチニン(かつてはBayer, West Haven, CTによりTrasylol(登録商標)として販売されていたアプロチニン注射剤; Calbiochem, La Jolla, CAおよび他の販売業者から尚も入手可能なインヒビター)、ロイペプチン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MOまたはBoehringer Mannheim)、PMSF、またはダイズ、ライマメもしくは卵白由来の特異的トリプシンインヒビター(Worthington Biochemical Corp., Freehold, N.J.またはSigma-Aldrich, St. Louis, MO)を含む多数の物質により特異的に阻害されることが可能である。フィシンは、例えば約2mMの濃度のHgCl<sub>2</sub>により不活性化されうるチオールプロテアーゼである。プロメラインもチオールプロテアーゼであり、プロメラインインヒビター(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)により不活性化されうる。

10

## 【0060】

特定の実施形態においては、プロテアーゼの濃度は、約30分以内、好ましくは約20分以内に結合タンパク質を分解するのに十分な程度に高いが、酵素の効率的な不活性化を可能にするのに十分な程度に低い。したがって、プロテアーゼの濃度は、好ましくは、約0.5から2.0単位/mLの範囲、より好ましくは約1単位/mLである。

20

## 【0061】

細胞溶解および結合タンパク質からの遊離の後、適用可能な場合には、アナライトを検出するための任意の標準的な技術、例えば吸光度または質量分光光度検出を伴うクロマトグラフィーまたはイムノアッセイを用いて、アナライトを測定することが可能である。免疫抑制薬の検出のためには、イムノアッセイが簡便に用いられる。

## 【0062】

## II. イムノアッセイ

## A. 総論

本発明のイムノアッセイは、試験サンプル中のアナライトの定性的特定および/または定量のために用いられうる。これらの方法は、例えば、免疫抑制薬、例えばラパマイシン(シロリムス)、タクロリムス、エベロリムス、テムソロリムス、ゾタロリムス、シクロスポリンおよびこれらの化合物のいずれかの類似体のイムノアッセイに適用可能である。そのようなイムノアッセイは、前記のとおり、細胞溶解試薬を試験サンプルと混合して細胞溶解混合物を形成させることにより行われうる。細胞溶解混合物を、アナライトに特異的な少なくとも1つの抗体と、存在する場合のアナライトへの抗体の結合に適した条件下で接触させて、アッセイ混合物を形成させ、ついでアナライトへの抗体の結合を検出する。

30

## 【0063】

ある実施形態においては、約0.4Mを超える塩濃度(例えば、約0.5Mから約5.0M)の存在下、細胞溶解混合物を抗体に接触させることにより、アッセイ感度の増加が達成されうる。特定の実施形態においては、塩濃度は約4.0M以下(例えば、約0.5Mから約4.0M)である。典型的な実施形態においては、塩濃度は約2.0M(例えば、約1.5Mから約2.5M、特に、約1.8M、約1.9M、約2.0M、約2.1Mまたは約2.2M)である。適当な塩は、例えば、以下の陰イオンのいずれかを含みうる:フルオリド、クロリド、ブロミド、ヨージド、チオシアナート、アセタート、シトラートおよびビスルファート。特定の実施形態においては、塩は、1価陰イオン、例えばフルオリド、クロリド、ブロミド、ヨージド、チオシアナートおよびアセタートを含む。好ましい実施形態においては、塩は、クロリド、例えば、アルカリ金属(例えば、リチウム、ナトリウム、カリウム、ルビジウム、セシウム)の塩化物(クロリド)塩を含む。一般に、使用する塩はアッセイ条件下で可溶性である。塩化ナトリウムはほとんどの条件下で高

40

50

溶解性であり、したがって、本発明の多種多様なイムノアッセイにおいてアッセイ感度を増加させるために簡便に使用されうる。

【0064】

塩は任意の簡便な状態でアッセイ混合物に供給されることが可能であり、細胞溶解混合物と抗体との接触の前に存在することが可能であり、あるいは接触の後に加えられることが可能である。特定の実施形態においては、塩は、水に加えて1以上の他の成分（例えば、バッファー）を場合によっては含みうるアッセイ希釈剤中で供給される。アッセイ希釈剤中の塩濃度は、所望の最終塩濃度およびアッセイ混合物に加えられる希釈剤の量によって様々となる。例えば、約4.0Mの塩濃度を有するアッセイ希釈剤を等容量のアッセイ混合物に加えて、約2.0の最終塩濃度を得ることが可能であろう。

10

【0065】

B. 抗体

試験サンプル中のアナライトの定性的または定量的検出のためのイムノアッセイにおいては、アナライトに結合する少なくとも1つの抗体を、アナライトを含有する疑いのある細胞溶解混合物に接触させて、抗体-アナライト免疫複合体を形成させる。免疫抑制薬を検出するために、その特定の薬物に結合する任意の適当な抗体を本発明のイムノアッセイにおいて使用することが可能である。ラパマイシン（シロリムス）、タクロリムス、ゾタロリムス、シクロスポリンおよびエベロリムスのそれぞれに対する抗体は当技術分野で公知であり、および/または商業的に入手可能であり、これらのいずれもが使用可能である。シロリムスを測定するためのAbbott Laboratoriesの商業的に入手可能なIMx（登録商標）Sirolimusアッセイ（Abbott Laboratories, Abbott Park, IL）またはAbbott Laboratoriesにより販売されている任意の他のSirolimusアッセイキット（例えば、異なる市販の自動化形態上で使用するためのもの）の成分であるモノクローナル抗体を使用することが好ましい。

20

【0066】

免疫抑制薬に特異的な抗体を製造するための典型的なプロトコールは以下のとおりである。雌RBF/DnJマウスに薬物-27-CMO-破傷風トキソイド免疫原の3回の毎月の追加抗原（ブースト）の投与を行い、ついで第4月に、薬物-42-HS-破傷風トキソイド調製物での免疫化を行う。7ヵ月後、融合の3日前に、薬物-27-CMO-破傷風トキソイド免疫原を使用して、脾臓内融合前追加抗原を動物に投与する。ついで脾B細胞を単離し、SP2/0骨髓腫との標準的なポリエチレングリコール（PEG）融合において使用する。10から14日後、マイクロタイターEIAにおいて、コンフルエント培養を抗薬物活性に関してスクリーニングし、ついで限界希釈クローニング技術を用いて、陽性培養をクローニングする。得られたクローンを単離し、IMDM w/FBS（Invitrogen Corp., Carlsbad, CA）組織培養培地内で規模拡大し、分泌された抗体を、プロテインAを使用してアフィニティー精製する。薬物としてシロリムスを使用して得られた典型的な好ましい抗体は、シロリムス、エベロリムスおよびゾタロリムスに関するイムノアッセイにおいて使用されうる。

30

【0067】

タクロリムスに関するイムノアッセイにおいて使用する典型的な好ましい抗体はM. Kobayashiら, "A Highly Sensitive Method to Assay FK-506 Levels in Plasma", "FK-506 A Potential Breakthrough in Immunosuppression" のp. 23-29, A Transplantation Proceedings Reprint, Supplement 6, Vol. XIX, October, 1987, T. Starzl, L. MakowkaおよびS. Todo編, Grune & Stratton, Inc. (Philadelphia, PA.) 発行に記載されている。

40

【0068】

50

シクロスポリンに関するイムノアッセイにおいて使用する典型的な好ましい抗体は、シクロスポリンを測定するためのAbbott Laboratoriesの商業的に入手可能なASYM(登録商標)シクロスポリンアッセイの成分であるモノクローナル抗体である。

【0069】

#### C. 検出

ついで任意の適当な技術を用いて、抗体-アナライト免疫複合体を検出することが可能である。例えば、抗体-アナライト複合体の存在を検出するために、検出可能な標識で抗体を標識することが可能である。個々の標識の選択は決定的に重要なものではないが、選択される標識は、単独で又は1以上の追加的物質と共に、検出可能なシグナルを生成するものでなければならない。

10

【0070】

したがって、有用な検出可能な標識、抗体へのそれらの結合および検出技術は当技術分野で公知である。当技術分野で公知の任意の検出可能な標識が使用されうる。例えば、検出可能な標識は、放射能標識、例えば $^3\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ ；酵素標識、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリペルオキシダーゼ、グルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼなど；化学発光標識、例えばアクリジニウム誘導体、ルミノール、イソルミノール、チオエステル、スルホンアミド、フェナントリジニウムエステルなど；蛍光標識、例えばフルオレセイン(5-フルオレセイン、6-カルボキシフルオレセイン、3',6-カルボキシフルオレセイン、5(6)-カルボキシフルオレセイン、6-ヘキサクロロ-フルオレセイン、6-テトラクロロフルオレセイン、フルオレセインイソチオシアナートなど)、ローダミン、フィコビリタンパク質、R-フィコエリトリン、量子ドット(硫化亜鉛-キャップ化カドミウムセレニド)、熱標識または免疫-ポリメラーゼ連鎖反応標識でありうる。標識、標識法および標識の検出の手引きは、PolakおよびVan Noorden, Introduction to Immunocytochemistry, 2<sup>nd</sup> ed., Springer Verlag, N.Y. (1997)ならびにHaugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemi (1996) (これは、Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregonにより公開されている一体となった手引書およびカタログである。)(それらのそれぞれを参照により本明細書に組み入れることとする。)において見出される。本発明で使用する好ましい標識は、化学発光標識、例えばアクリジニウム-9-カルボキサミドである。更なる詳細はMattingly, P.G.およびAdamczyk, M. (2002) Chemiluminescent N-sulfonylacridinium-9-carboxamides and their application in clinical assays, in Luminescence Biotechnology: Instruments and Applications (Dyke, K.V. 編) pp 77-105, CRC Press, Boca Ratonにおいて見出されうる。

20

30

【0071】

検出可能な標識は、直接的に又はカップリング剤を介して、アナライト、アナライト類似体または抗体に結合させることが可能である。使用されうるカップリング剤の一例として、EDAC(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩)が挙げられ、これはSigma-Aldrich(St. Louis, MO)から商業的に入手可能である。使用されうる他のカップリング剤は当技術分野で公知である。検出可能な標識を抗体に結合させるための方法は当技術分野で公知である。また、抗体への検出可能な標識のカップリングを促進する末端基を既に含有する多数の検出可能な標識が購入可能または合成可能であり、それらとしては例えば、N10-(3-スルホプロピル)-N-(3-カルボキシプロピル)-アクリジニウム-9-カルボキサミド(CPSP-アクリジニウムエステルとしても公知である。)またはN10-(3-スルホプロピル)

40

50

- N - ( 3 - スルホプロピル ) - アクリジニウム - 9 - カルボキサミド ( S P S P - アクリジニウムエステルとしても公知である。 ) が挙げられる。

【 0 0 7 2 】

あるいは、検出可能な標識を有しアナライトに結合する第 2 抗体を細胞溶解混合物に加え、それを使用して、抗体 - アナライト複合体の存在を検出することが可能である。この実施形態においては、任意の適当な検出可能な標識が使用されうる。

【 0 0 7 3 】

#### D . 典型的な形態

本発明のイムノアッセイは、当技術分野で公知の任意の形態、例えばサンドイッチ形態、競合阻害形態 ( フォワード ( 前方向 ) またはリバース ( 逆方向 ) 競合阻害アッセイを含む ) または蛍光偏光形態 ( これらに限定されるものではない ) を用いて行われうる。後記の典型的な形態は免疫抑制薬のアッセイに関して記載されている。しかし、当業者に理解されるとおり、記載されている形態は任意のアナライトに適用可能である。

【 0 0 7 4 】

免疫抑制薬の定量的検出のためのイムノアッセイ、例えば、好ましいサンドイッチ型の形態においては、細胞溶解混合物中の薬物を分離し定量するために少なくとも 2 つの抗体を使用する。より詳しくは、それらの少なくとも 2 つの抗体は、薬物の、異なる部分に結合して、「サンドイッチ」と称される免疫複合体を形成する。一般に、試験サンプル中の免疫抑制薬を捕捉するために 1 以上の抗体が使用されることが可能であり ( これらの抗体は、しばしば、「捕捉」抗体と称される。 )、検出可能 ( すなわち定量可能 ) な標識をサンドイッチに結合させるために 1 以上の抗体が使用される ( これらの抗体は、しばしば、「検出用」抗体と称される。 )。サンドイッチアッセイにおいては、薬物に結合する両方の抗体は、アッセイにおけるいずれかの他の抗体の、そのそれぞれの結合部位への結合によっては、損なわれないことが好ましい。言い換えると、免疫抑制薬を含有する疑いのある細胞溶解混合物に接触させる 1 以上の一次抗体が、二次または後続抗体により認識される結合部位の全部または一部に結合して、その 1 以上の二次または後続抗体の、薬物への結合能を阻害することがないように、抗体は選択されるべきである。サンドイッチアッセイにおいては、抗体、好ましくは、少なくとも 1 つの捕捉抗体は、細胞溶解混合物において予想される薬物の最大量に対してモル過剰量で使用される。例えば、固相含有溶液 1 mL 当たり約 5  $\mu$ g / mL から約 1 mg / mL の抗体が使用されうる。

【 0 0 7 5 】

1 つの実施形態においては、少なくとも 1 つの第 1 ( 一次 ) 捕捉抗体は、試験サンプルからの第 1 抗体 - 薬物複合体の分離を促進する固体支持体に結合されうる。本発明のイムノアッセイにおいて使用される固体支持体または「固相」は決定的に重要なものではなく、当業者により選択されうる。本明細書中で用いる固相または固体支持体は、不溶性である又は後続の反応により不溶性にされうる任意の物質を意味する。有用な固相または固体支持体は当業者に公知であり、反応トレイのウェルの壁、試験管、ポリスチレンビーズ、磁気ビーズ、ニトロセルロース片、膜、微粒子、例えばラテックス粒子、ヒツジ ( または他の動物 ) の赤血球および Duracytes ( 登録商標 ) ( Abbott Laboratories, Abbott Park, Ill. の登録商標 ) ( これは、ピルビン酸アルデヒドおよびホルムアルデヒドにより「固定」された赤血球である。 ) などを包含する。固相上にペプチドを固定化するための適当な方法には、イオン相互作用、疎水性相互作用、共有結合相互作用などが含まれる。固相は、捕捉物質を誘引し固定化するその固有の能力に関して選択されうる。あるいは、固相は、捕捉物質を誘引し固定化する能力を有する追加的な受容体を含みうる。追加的な受容体には、捕捉物質自体とは反対に荷電した物質、または捕捉物質に結合した荷電物質とは反対に荷電した荷電物質が含まれうる。さらにもう 1 つの態様として、受容体は、特異的結合反応により捕捉物質を固定化する能力を有する、固相上に固定化 ( 結合 ) された任意の特異的結合パートナーでありうる。受容体分子は、アッセイの実施前またはアッセイの実施中に、固相物質への捕捉物質の間接的結合を可能にする。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 6 】

ウェル、チューブ（管）またはビーズの形態の高分子材料からなる固体支持体を含む（それらに限定されるものではない）、当技術分野で公知の任意の固体支持体を使用されうる。抗体は、吸着により、または化学カップリング剤を使用する共有結合により、または当技術分野で公知の他の手段により、固体支持体に結合されうる。ただし、そのような結合は、薬物への抗体の結合能を阻害しないものでなければならぬ。さらに、必要に応じて、固体支持体は、抗体上の種々の官能基との反応性を可能にするよう誘導体化されうる。そのような誘導体化は、あるカップリング剤、例えば無水マレイン酸、N - ヒドロキシスクシンイミドおよび1 - エチル - 3 - ( 3 - ジメチルアミノプロピル ) カルボジイミド（これらに限定されるものではない）の使用を要する。

10

## 【 0 0 7 7 】

また、検出用抗体による接近を可能にするのに十分な多孔度および抗原に結合する適当な表面アフィニティーを有する任意の適当な多孔性物質を固相が含むことも、本発明の範囲内である。微孔性構造体が一般に好ましいが、水和状態でゲル構造を有する物質も使用されうる。そのような有用な固体支持体には、ニトロセルロースおよびナイロンが含まれるが、これらに限定されるものではない。本明細書に記載されているそのような多孔性固体支持体は、好ましくは、約0.01から0.5mm、好ましくは約0.1mmの厚さのシートの形態であると想定される。孔のサイズは広い範囲内で様々となりうるが、好ましくは、約0.025から15ミクロン、特に、約0.15から15ミクロンである。そのような支持体の表面は、支持体への抗原または抗体の共有結合を引き起こす化学的加工により活性化されうる。しかし、一般には、疎水性力による多孔性物質上の吸着により、抗原または抗体の不可逆的結合が得られる。

20

## 【 0 0 7 8 】

免疫抑制薬を含有する疑いのある又はそれを含有する細胞溶解混合物を少なくとも1つの第1捕捉抗体に接触させた後、得られたアッセイ混合物をインキュベートして、第1捕捉抗体（または複数の抗体）- 薬物複合体を形成させる。インキュベーションは、約4.5から約10.0のpHを含む任意の適当なpHで、約2 から約45 の温度を含む任意の適当な温度で、少なくとも1分間から約18時間の適当な時間、好ましくは約4から20分間、最も好ましくは約17から19分間にわたって行われうる。

## 【 0 0 7 9 】

検出用物質の添加および標識複合体の形成の後、複合体中の標識の量を、当技術分野で公知の技術を用いて定量する。例えば、酵素標識を使用する場合には、標識複合体を、定量可能な反応（例えば、発色）を引き起こす標識に対する基質と反応させる。標識が放射能標識である場合には、シンチレーションカウンターを使用して標識を定量する。標識が蛍光標識である場合には、1つの色（これは「励起波長」として公知である。）の光で標識を刺激し、刺激に応答して標識により放出された別の色（これは「発光波長」として公知である。）を検出することにより、標識を定量する。標識が化学発光標識である場合には、可視的に又はルミノメーター、X線フィルム、高速写真フィルム、CCDカメラなどを使用して発光を検出することにより、標識を定量する。複合体中の標識の量が定量されたら、例えば既知濃度の免疫抑制薬の系列希釈を用いて作成された標準曲線を使用して、試験サンプル中の薬物の濃度が決定されうる。薬物の系列希釈を用いる代わりに、重量分析、質量分析および当技術分野で公知の他の技術により、標準曲線が作成されうる。

30

40

## 【 0 0 8 0 】

好ましいフォワード競合形態においては、既知濃度の標識薬物またはその類似体のアリコートを使用して、抗体に対する結合に関して、試験サンプル中に存在する薬物と競合させる。フォワード競合アッセイにおいては、固定化抗体を、試験サンプルおよび標識された薬物またはその薬物類似体と連続的または同時に接触させることが可能である。薬物または薬物類似体は、前記の検出可能な標識を含む任意の適当な検出可能な標識で標識されうる。このアッセイにおいては、捕捉抗体は、本明細書において既に記載されている技術を用いて固体支持体上に固定化されうる。あるいは、捕捉抗体は、例えば微粒子のような

50

固体支持体上に固定化された例えば抗種抗体のような抗体に結合されうる。

【0081】

標識された薬物または薬物類似体、細胞溶解混合物および抗体を、サンドイッチアッセイ形態に関して前記で説明したのと同様の条件下でインキュベートする。ついで2つの異なるタイプの抗体 - 薬物複合体が生成される。具体的には、生成した抗体 - 薬物複合体のうち的一方は、検出可能な標識を含有し、もう一方の抗体 - 薬物複合体は、検出可能な標識を含有しない。検出可能な標識の定量の前に、抗体 - 薬物複合体をアッセイ混合物の残部から分離することが可能であるが、分離する必要はない。ついで、抗体 - 薬物複合体をアッセイ混合物の残部から分離するかどうかには無関係に、抗体 - 薬物複合体中の検出可能な標識の量が定量される。ついで、抗体 - 薬物複合体中の検出可能な標識の量を標準曲線と比較することにより、試験サンプル中の薬物の濃度が決定されうる。標準曲線は、既知濃度の薬物の系列希釈の利用、質量分析、重量分析および当技術分野で公知の他の技術により作成されうる。

10

【0082】

抗体 - 薬物複合体は、抗体を固体支持体（例えば、サンドイッチアッセイ形態に関して前記で説明した固体支持体）に結合させ、ついで固体支持体との接触からのアッセイ混合物の残部を除去することにより、アッセイ混合物から分離されうる。

【0083】

リバース競合アッセイにおいては、固定化された免疫抑制薬またはその類似体を、細胞溶解混合物および少なくとも1つの標識抗体と連続的または同時に接触させることが可能である。抗体は、前記の検出可能な標識を含む任意の適当な検出可能な標識で標識されうる。薬物または薬物類似体は、固体支持体（例えば、サンドイッチアッセイ形態に関して前記で説明した固体支持体）に結合されうる。

20

【0084】

固定化された薬物または薬物類似体、細胞溶解混合物および少なくとも1つの標識抗体を、サンドイッチアッセイ形態に関して前記で説明したのと同様の条件下でインキュベートする。ついで2つの異なるタイプの抗体 - 薬物複合体が生成される。具体的には、生成した抗体 - 薬物複合体のうち的一方は固定化されており、検出可能な標識を含有し、もう一方の抗体 - 薬物複合体は固定化されておらず、検出可能な標識を含有する。未固定化抗体 - 薬物複合体およびアッセイ混合物の残部を、当技術分野で公知の技術、例えば洗浄により、固定化抗体 - 薬物複合体の面前から除去する。未固定化抗体 - 薬物複合体を除去したら、ついで固定化抗体 - 薬物複合体中の検出可能な標識の量を定量する。ついで、抗体 - 薬物複合体中の検出可能な標識の量を標準曲線と比較することにより、試験サンプル中の薬物の濃度が決定されうる。標準曲線は、既知濃度の薬物の系列希釈の利用、質量分析、重量分析および当技術分野で公知の他の技術により作成されうる。

30

【0085】

蛍光偏光アッセイにおいては、1つの実施形態においては、抗体または機能的に活性なそのフラグメントを、まず、免疫抑制薬を含有する未標識細胞溶解混合物に接触させて、未標識抗体 - 薬物複合体を形成させる。ついで未標識抗体 - 薬物複合体を蛍光標識薬物またはその類似体に接触させる。標識薬物または薬物類似体は、抗体または機能的に活性なそのフラグメントへの結合に関して、アッセイ混合物中のいずれかの未標識薬物と競合する。形成された標識抗体 - 薬物複合体の量を決定し、試験サンプル中の薬物の量を標準曲線の利用により決定する。

40

【0086】

イムノアッセイのための走査型プローブ顕微鏡検査法 (scanning probe microscopy) (SPM) の利用も、本発明のイムノアッセイ法が容易に適応化されうる技術である。SPM、特に原子間力顕微鏡検査法においては、捕捉物質を、走査に適した表面を有する固相に固定する。捕捉物質は、例えばプラスチックまたは金属表面に吸着されうる。あるいは、捕捉物質は、当業者に公知の方法により、例えば誘導体化プラスチック、金属、ケイ素またはガラスに共有結合されうる。捕捉物質の結合の後、細

50

胞溶解混合物を固相に接触させ、走査型プローブ顕微鏡を使用して、固相 - 固定複合体を検出し定量する。SPMの利用は、イムノアッセイ系において典型的に使用される標識の必要性を排除する。そのような系はU.S.App.No.662,147(それを参照により本明細書に組み入れることとする。)に記載されている。

**【0087】**

本発明のイムノアッセイは、MicroElectroMechanical System(MEMS)を用いることによっても行われうる。MEMSは、機械的、光学的および流体的要素をエレクトロニクスと組合せて対象アナライトの簡便な検出を可能にする、シリコン上に組込まれた顕微鏡的構造体である。本発明における使用に適した典型的なMEMS装置は、プロチベリス(Protiveris)マルチカンチレバー・アレイである。このアレイは、特別に設計されたシリコン・マイクロカンチレバーの化学・機械的動作、およびそれに続く、マイクロカンチレバーの偏向の光学的検出に基づくものである。一方の面が結合パートナーでコートされている場合、マイクロカンチレバーは、それが、相補体分子を含有する溶液にさらされると、曲がるであろう。この曲がり、曲げ事象による表面エネルギーの変化により引き起こされる。曲がり(偏向)の度合の光学的検出は、マイクロカンチレバーに結合した相補的分子の量の測定を可能にする。

**【0088】**

他の実施形態においては、本発明のイムノアッセイは、電気化学的検出を用いて行われる。電気化学的検出のための基本的方法はHeinemannらにより記載されている。これは、一次抗体(Ab、ラット抗マウスIgG)の固定化、ならびにそれに続く、抗原(Ag、マウスIgG)、酵素標識に結合した二次抗体(AP-Ab、ラット抗マウスIgGおよびアルカリホスファターゼ)およびp-アミノフェニルホスファート(PAPP)を含有する一連の溶液への曝露を含んでいた。APはPAPPをp-アミノフェノール(PAP<sub>R</sub>;「R」は、還元型を酸化型PAP<sub>O</sub>(キノイミン)から区別することを意図したものである。)に変換し、これは、APが最適活性を示すpH9.0において酸素および水の還元を阻害しない電位において電気化学的に可逆的である。フェノール(その前駆体フェニルホスファートは酵素基質としてしばしば使用される。)とは異なり、PAP<sub>R</sub>は電極汚損を引き起こさない。PAP<sub>R</sub>は空気および光酸化を受けるが、これらは小規模および短い時間枠においては容易に避けられる。20μLから360μLの範囲のPAPP容量を使用する微量電気化学的イムノアッセイにおいて達成された、PAP<sub>R</sub>に関するピコモルの検出限界およびIgGに関するフェトグラムの検出限界が、既に報告されている。電気学的検出を用いるキャピラリーイムノアッセイにおいては、これまでに報告されている最低検出限界は、70μLの容量および30分または25分のアッセイ時間を用いた場合、マウスIgGの3000分子である。

**【0089】**

種々の電気化学的検出系が米国特許第7,045,364号(2006年5月16日付け発行;これを参照により本明細書に組み入れることとする。)、第7,045,310号(2006年5月16日付け発行;これを参照により本明細書に組み入れることとする。)、第6,887,714号(2005年5月3日付け発行;これを参照により本明細書に組み入れることとする。)、第6,682,648号(2004年1月27日付け発行;これを参照により本明細書に組み入れることとする。)、第6,670,115号(2003年12月30日付け発行;これを参照により本明細書に組み入れることとする。)に記載されている。

**【0090】**

例えば1つの試験サンプル中の複数のアナライトを同時にアッセイするのに有用な特定の実施形態においては、固相は、複数の異なる捕捉物質を含みうる。したがって、例えば、固相上には複数の抗体が固定されており、この場合、それぞれはサンプル中の異なるアナライトの存在に関して試験することが意図される。典型的な実施形態においては、固相は表面上の複数の異なる領域よりなることが可能であり、それらの各領域には特定の抗体が固定されている。

10

20

30

40

50

## 【0091】

多重（マルチプレックス）形態は、各標識が特定のアナライトの検出のために使用される複数の標識を使用することが可能であるが、これが必要なわけではない。例えば、複数の捕捉物質、例えば抗体が、特異性に基づいて、異なる既知位置において固相に固定される場合、複数の標識を使用することなく、複数の異なるアナライトが検出されうる。各位置における捕捉物質の特異性が既知であるため、個々の位置におけるシグナルの検出は、その位置に結合したアナライトの存在と関連づけられうる。この形態の例には、それぞれチャンネルまたはキャピラリーに沿った異なる位置に異なる捕捉物質を含有するマイクロフルイディック（microfluidic）装置およびキャピラリーアレイ、ならびに典型的には固体支持体の表面上のスポット（「標的要素」）のマトリックス内に配置された異なる捕捉物質を含有するマイクロアレイが含まれる。特定の実施形態においては、それぞれの異なる捕捉物質は、異なる電極に固定されることが可能であり、それは、例えば、固体支持体の表面上、マイクロフルイディック装置のチャンネル内またはキャピラリー内に形成されうる。

10

## 【0092】

## III. 試験キット

本発明はまた、アナライトに関して試験サンプルをアッセイするための試験キットを提供する。本発明の試験キットは、本発明の1以上のイムノアッセイを実施するのに有用な1以上の試薬を含む。試験キットは、一般に、試薬を1以上の別々の組成物として又は場合によっては試薬の混和性が許容する場合には混合物として収容する1以上の容器を伴うパッケージを含む。試験キットはまた、使用者の立場から望ましい可能性がある他の物質、例えばバッファー、希釈剤、標準および/またはサンプルの加工、洗浄もしくは任意の他のアッセイ工程の実施において有用な任意の他の物質を含みうる。

20

## 【0093】

特定の実施形態においては、本発明の試験キットは、(a)少なくとも1つのアナライトに特異的に結合しうる少なくとも1つの抗体またはタンパク質、ならびに(b)エチレングリコール、プロピレングリコールおよびそれらの類似体よりなる群から選ばれるグリコールを含む細胞溶解試薬、ならびに5個以下の炭素を有する少なくとも1種のアルコールを含みうる。免疫抑制薬に関するイムノアッセイを行うのに有用な典型的な実施形態においては、抗体は、ラパマイシン（シロリムス）、タクロリムス、エベロリムス、テムソロリムス、ゾタロリムス、シクロスポリンまたはこれらの化合物のいずれかの類似体に特異的でありうる。

30

## 【0094】

ある実施形態においては、細胞溶解試薬は、メタノール、エタノール、プロパノールまたはこれらのアルコールのいずれかの混合物でありうる。典型的な実施形態においては、グリコール対アルコールの比は、約4:1から約1:4、より厳密には、約4:1から約1:2の範囲である。1つの実施形態においては、細胞溶解試薬は、細胞溶解試薬の約10%から約40%であるグリコールレベルを用いる。もう1つの実施形態においては、アルコールは、グリコールの添加を伴うことなく、細胞溶解試薬中で単独で使用される。

## 【0095】

所望により、試験キットは更に、アッセイされるアナライトを含む対照組成物を含みうる。

40

## 【0096】

特定の実施形態においては、本発明の試験キットは、1以上の界面活性剤および/または試験サンプル中の1以上の結合タンパク質からアナライトを遊離させる物質を含みうる。適当な界面活性剤または界面活性剤の組合せには、前記のとおり、非イオン界面活性剤、例えばサポニンが含まれる。適当な遊離誘発性物質には、前記のとおり、1以上の結合タンパク質への結合に関してアナライトと競合する物質、および結合タンパク質を分解し非タンパク質アナライトを遊離させるために使用されうるプロテアーゼが含まれる。典型的なプロテアーゼには、プロテイナーゼK、スブチリシン、ジスパーゼ、サーモリシン、

50

トリプシン、フィシン、プロメラインおよびそれらの組合せが含まれる。本発明のキットにおいて提供されるいずれの界面活性剤またはプロテアーゼも、前記のとおり of 適当な濃度で成分を含有する細胞溶解混合物の生成を促進する様態で提供されるべきである。

【0097】

本発明のキットは、固相、および固相に固定された又はアッセイ中に固相に固定される捕捉物質を含みうる。典型的な実施形態においては、固相は1以上の微粒子または電極を含む。サンドイッチイムノアッセイを行うためにそのようなキットを使用する場合、キットは更に、標識された検出用物質を含みうる。ある実施形態においては、試験キットは、少なくとも1つの直接標識、例えばアクリジニウム-9-カルボキサミドを含む。本発明の試験キットは少なくとも1つの間接標識をも含みうる。使用される標識が、一般に、検出可能なシグナルを生成するために指示試薬を要する場合、試験キットは、好ましくは、1以上の適当な指示試薬を含む。

10

【0098】

本発明の試験キットは、好ましくは、本発明のイムノアッセイの1以上を行うための説明を含む。本発明のキットに含まれる説明は包装材に添付されることが可能であり、あるいはパッケージ挿入物として含まれることが可能である。説明は、典型的には、書かれた又は印刷された資料であるが、それらはそのようなものには限定されない。そのような説明を記憶しそれらを最終消費者に伝達しうる任意の媒体が本発明で想定される。そのような媒体には、電子記憶媒体（例えば、磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ）、光学的媒体（例えば、CD ROM）などが含まれるが、それらに限定されるものではない。本明細書中で用いる「説明」なる語は、説明を提供するインターネットサイトのアドレスを含みうる。

20

【0099】

もちろん、言うまでもなく、本明細書中の典型的な形態はいずれも、および本発明のアッセイまたはキットはいずれも、例えば米国特許第5,089,424号および第5,006,309号に記載されている、ならびに例えばAbbott LaboratoriesのARCHITECT（登録商標）、ASYM（登録商標）、IMX（登録商標）、ABBOTT PRISM（登録商標）およびQuantum IIPプラットフォームおよび他のプラットフォームを含む（これらに限定されるものではない）Abbott Laboratories（Abbott Park, IL）により商業的に販売されている自動化および半自動化系（微粒子を含む固相が存在するものを含む）における使用のために適合化または最適化されうる。

30

【0100】

また、本発明のアッセイおよびキットは、場合によっては、Abbott LaboratoriesのPoint of Care（i-STAT（登録商標））電気化学的イムノアッセイ系を含むポイント・オブ・ケア・アッセイ系に適合化または最適化されうる。単一用途試験装置におけるイムノセンサーならびにその製造および操作方法が、例えば米国特許第5,063,081号ならびに公開米国特許出願20030170881、20040018577、20050054078および20060160164（これに関するそれらの教示を参照により本明細書に組み入れることとする。）に記載されている。

40

【実施例】

【0101】

以下の実施例は、特許請求されている本発明を例示するために記載されており、本発明を限定するものではない。

【0102】

（実施例）

血液サンプルの細胞溶解およびシロリムスに関するイムノアッセイ

この実施例は、血液サンプルを細胞溶解しシロリムスに関する自動化イムノアッセイを行うための、非変性細胞溶解試薬の使用を例示する。

50

## 【0103】

プロピレングリコールおよびエタノールを4：1の容量：容量比で混合することにより、細胞溶解試薬を製造し、ついで、プロピレングリコールが10容量%から40容量%となるまで水で希釈する。5から10秒間激しくボルテックスすることにより100 $\mu$ Lのサンプルを200 $\mu$ Lの細胞溶解試薬と混合することにより、血液サンプルの細胞溶解を行う。細胞溶解は室温で1分未満で完了する。得られた細胞溶解混合物を以下の操作により自動化ARCHITECT（登録商標）i2000（登録商標）分析装置（Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois）でアッセイする。

## 【0104】

(1) 10から40 $\mu$ Lの細胞溶解混合物を、ヤギ抗マウス抗体（Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouriから）およびマウス抗シロリムス抗体（前記のとおりに製造）でコートされた50 $\mu$ Lの微粒子と混合する。

## 【0105】

(2) アッセイ混合物を33から38 $^{\circ}$ Cで約18分間インキュベートする。サンプル中のシロリムスは微粒子上の抗シロリムス抗体に結合する。

## 【0106】

(3) 反応混合物に20 $\mu$ Lのアクリジニウム - シロリムスコンジュゲートを加える。

## 【0107】

(4) 反応混合物を33から38 $^{\circ}$ Cで4分間インキュベートする。アクリジニウム - シロリムスコンジュゲートは遊離抗シロリムス結合部位に結合する。

## 【0108】

(5) 微粒子をリン酸バッファーで洗浄する。

## 【0109】

(6) Pre-trigger（酸溶液）およびTrigger（塩基性溶液）を加えて、捕捉されたアクリジニウム - シロリムス標識を発光させて、それを装置により測定する。

## 【0110】

シロリムス結合性抗体は以下のとおりに製造した。雌RBf/Dnjマウスにシロリムス - 27 - CMO - 破傷風トキソイド免疫原の3回の毎月の追加抗原（ブースト）の投与を行い、ついで第4月に、シロリムス - 42 - HS - 破傷風トキソイド調製物での免疫化を行った。7ヵ月後、融合の3日前に、シロリムス - 27 - CMO - 破傷風トキソイド免疫原を使用して、脾臓内融合前追加抗原を動物に投与した。ついで脾B細胞を単離し、SP2/0骨髓腫との標準的なPEG融合において使用した。10から14日後、マイクロタイターEIAにおいて、コンフルエント培養を抗シロリムス活性に関してスクリーニングし、ついで限界希釈クローニング技術を用いて、陽性培養をクローニングした。単離されたクローンをIMDM w/FBS（Invitrogen Corp., Carlsbad, CA）組織培養培地内で規模拡大し、分泌された抗体を、プロテインAを使用してアフィニティー精製した。

## 【0111】

本明細書に記載されている実施例および実施形態は単なる例示を目的としたものであり、それを考慮して種々の修飾または変更が当業者に示唆され、本出願の精神および範囲ならびに添付の特許請求の範囲の範囲内に含まれると理解される。

## 【0112】

また、共通に所有されている同時係属出願米国仮出願番号60/882,732（2006年12月29日付け出願）の全体を、全血中の分子または薬物の検出のための診断試験についてのその教示に関して、明示的に、参照により本明細書に組み入れることとする。

## 【0113】

共通に所有されている同時係属出願米国仮出願番号60/878,017（2006年

10

20

30

40

50

12月29日付け出願)の全体を、溶液内捕捉イムノアッセイでの使用のための非変性細胞溶解試薬についてのその教示に関して、明示的に、参照により本明細書に組み入れることとする。

【0114】

共通に所有されている同時係属出願米国仮出願番号60/882,863(2006年12月29日付け出願)の全体を、免疫抑制薬に関する改良アッセイについてのその教示に関して、明示的に、参照により本明細書に組み入れることとする。

【0115】

共通に所有されている同時係属出願米国非仮出願番号11/490,624(2006年7月21日付け出願)の全体を、抽出試薬組成物についてのその教示に関して、明示的に、参照により本明細書に組み入れることとする。

10

【0116】

また、本明細書中に引用されている全ての他の刊行物、特許および特許出願の全体を全ての目的において参照により本明細書に組み入れることとする。

## フロントページの続き

- (72)発明者 グレニアー, フランク・シー  
アメリカ合衆国、イリノイ・60048、リバティビル、サウス・セカンド・アベニュー・218
- (72)発明者 ワークマン, ライアン・エフ  
アメリカ合衆国、イリノイ・60048、リバティビル、サウス・プレザント・ヒル・コート・1  
296
- (72)発明者 シエド, ヒナ・エヌ  
アメリカ合衆国、イリノイ・60031、ガーニー、ピスタ・ドライブ・1164
- (72)発明者 アリ, サルマン  
アメリカ合衆国、イリノイ・60169、ホフマン・エステイツ、キングマン・レイン・5

審査官 宮澤 浩

- (56)参考文献 特表平09-502272(JP,A)  
特表平10-510527(JP,A)  
特表平11-508683(JP,A)  
特表2000-503655(JP,A)  
特表2001-514737(JP,A)  
米国特許出願公開第2003/0157556(US,A1)  
米国特許出願公開第2005/0112778(US,A1)  
米国特許第05217971(US,A)  
欧州特許出願公開第00753744(EP,A1)  
特開平04-233460(JP,A)  
特開平04-253999(JP,A)

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48  
G01N 1/28  
G01N 33/53

专利名称(译)	非变性细胞裂解试剂		
公开(公告)号	<a href="#">JP5241735B2</a>	公开(公告)日	2013-07-17
申请号	JP2009544191	申请日	2007-12-19
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司		
申请(专利权)人(译)	雅培制药		
当前申请(专利权)人(译)	雅培制药		
[标]发明人	グレニアーフランクシー ワークマンライアンエフ シエドヒナエヌ アリサルマン		
发明人	グレニアーフランクシー ワークマン、ライアン・エフ シエド、ヒナ・エヌ アリ、サルマン		
IPC分类号	G01N33/48 G01N33/53 G01N1/28		
CPC分类号	G01N33/5306 G01N33/9493		
FI分类号	G01N33/48.A G01N33/53.G G01N1/28.J		
代理人(译)	Masarushin大崎		
审查员(译)	宫泽浩		
优先权	11/618495 2006-12-29 US		
其他公开文献	JP2010515062A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供了裂解试剂和制备用于测定的测试样品的方法，其中该方法产生适用于自动移液系统的均匀裂解混合物，而不需要离心步骤。裂解试剂包括二醇和醇。本发明的其他方面包括相关的免疫测定和测试试剂盒。

シクロスポリン

