

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5174898号  
(P5174898)

(45) 発行日 平成25年4月3日(2013.4.3)

(24) 登録日 平成25年1月11日(2013.1.11)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 N
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 G
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 H
	GO 1 N 33/531 B

請求項の数 30 (全 42 頁)

(21) 出願番号	特願2010-509567 (P2010-509567)	(73) 特許権者	391008788
(86) (22) 出願日	平成20年5月23日(2008.5.23)		アボット・ラボラトリーズ
(65) 公表番号	特表2010-528295 (P2010-528295A)		ABBOTT LABORATORIES
(43) 公表日	平成22年8月19日(2010.8.19)		アメリカ合衆国 イリノイ州 アボット
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/064688		パーク アボット パーク ロード 10
(87) 国際公開番号	W02008/147982		O
(87) 国際公開日	平成20年12月4日(2008.12.4)	(74) 代理人	110001173
審査請求日	平成23年3月3日(2011.3.3)		特許業務法人川口国際特許事務所
(31) 優先権主張番号	60/940,062	(74) 代理人	100140523
(32) 優先日	平成19年5月24日(2007.5.24)		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】 疎水性薬物検体代謝産物との交差反応性が低下している免疫アッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

試験試料中の対象の検体の量を評価するための免疫アッセイであって、該検体は、代謝して1以上の交差反応性代謝産物を形成する疎水性薬物であり、該免疫アッセイは、

(a) 第一の混合物を形成させるために、1以上の前処理試薬と試験試料を接触させる段階と、ここで、該1以上の前処理試薬は、細胞を溶解し、試験試料中に存在する検体を可溶化し、;

(b) 検体又は代謝産物と抗体の複合体を含む第二の混合物を形成させるために、検体に特異的な抗体と第一の混合物を接触させる段階と;

(c) 抗体と複合体形成しない検体及び代謝産物を除去するために、及び、検体に対する抗体の平衡解離定数( $K_D$ )の10倍~0.1倍まで検体濃度が低下した第三の混合物を形成させるために、第二の混合物を洗浄する段階と;

(d) トレーサーとの抗体の複合体(「抗体-トレーサー複合体」)を含む第四の混合物を形成させるために、検出可能な標識で標識された抗体の特異的結合パートナー(「トレーサー」)と第三の混合物を接触させる段階と;

(e) 抗体と複合体形成しないトレーサーを除去するために、第四の混合物を洗浄する段階と;

(f) 試料中に存在する検体の量の尺度として抗体-トレーサー複合体を検出する段階とを含み、

試料中に存在する何らかの1以上の交差反応性代謝産物との交差反応性が10%未満あ

る、免疫アッセイ。

【請求項 2】

試料中に存在する何らかの 1 以上の交差反応性代謝産物との交差反応性が 5 % 未満である、請求項 1 に記載の免疫アッセイ。

【請求項 3】

検体に特異的な抗体が、固相上に固定化されている、請求項 1 に記載の免疫アッセイ。

【請求項 4】

1 以上の前処理試薬が、試料中に存在する何らかの検体結合タンパク質を段階 ( a ) で沈殿させる、請求項 1 に記載の免疫アッセイ。

【請求項 5】

第一の混合物から検体結合タンパク質を除去することをさらに含む、請求項 4 に記載の免疫アッセイ。

【請求項 6】

段階 ( b ) の抗体量が、試験試料中の検体量の 0 . 1 % から 1 0 % の間である、請求項 1 に記載の免疫アッセイ。

【請求項 7】

試験試料と比較した場合、段階 ( c ) の第三の混合物中での検体及び代謝産物濃度が 1 0 倍から 5 0 0 倍低下する、請求項 1 に記載の免疫アッセイ。

【請求項 8】

段階 ( d ) において、抗体との複合体中に存在する検体量が 1 . 0 から 1 0 . 0 n M の範囲であり、トレーサーが 0 . 1 から 1 . 0 n M の間の量存在する、請求項 1 に記載の免疫アッセイ。

【請求項 9】

試験試料が全血である、請求項 1 に記載の免疫アッセイ。

【請求項 10】

疎水性薬物が界面活性剤又は有機溶媒中で可溶性である、請求項 1 に記載の免疫アッセイ。

【請求項 11】

疎水性薬物が免疫抑制剤である、請求項 1 に記載の免疫アッセイ。

【請求項 12】

免疫抑制剤が、タクロリムス、シロリムス及びシクロスポリンからなる群から選択される、請求項 1 から請求項 11 の何れかに記載の免疫アッセイ。

【請求項 13】

( a ) 免疫抑制剤がタクロリムスであり、代謝産物が 1 3 - O - デメチル化タクロリムス ( M - I )、3 1 - O - デメチル化タクロリムス ( M - I I )、1 5 - O - デメチル化タクロリムス ( M - I I I ) 及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるか；

( b ) 免疫抑制剤がシクロスポリンであり、代謝産物が M 1、M 8、M 9、M 1 3、M 1 7、M 1 8、M 2 1 及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるか；又は

( c ) 免疫抑制剤がシロリムスであり、代謝産物が、1 1 - ヒドロキシ - シロリムス、4 1 - O - デメチル - シロリムス、7 - O - デメチル - シロリムス、4 1 - O - デメチル - ヒドロキシ - シロリムス及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 1 2 に記載の免疫アッセイ。

【請求項 14】

免疫抑制剤がシクロスポリンであり、代謝産物が M 1 7 及び M 1 である、請求項 1 3 に記載の免疫アッセイ。

【請求項 15】

抗体が、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、F ( a b ) ' <sub>2</sub>、キメラ抗体、ヒト抗体及び親和性成熟抗体からなる群から選択される、請求項 1 から請求項 11 の何れかに記載の免疫アッセイ。

【請求項 16】

10

20

30

40

50

固相が、磁性粒子、ビーズ、試験管、マイクロタイタープレート、キュベット、膜、足場分子、フィルム、ろ紙、ディスク及びチップからなる群から選択される、請求項 3 に記載の免疫アッセイ。

【請求項 17】

検出可能な標識が、放射性標識、酵素標識、化学発光標識、蛍光標識、温度標識及び免疫ポリメラーゼ連鎖反応標識からなる群から選択される、請求項 1 から請求項 11 の何れかに記載の免疫アッセイ。

【請求項 18】

トレーサーが、複数の結合パートナーを含む、請求項 1 から請求項 11 の何れかに記載の免疫アッセイ。

10

【請求項 19】

1 以上の前処理試薬が、サポニン、メタノール、エチレングリコール及び硫酸亜鉛を含む、請求項 1 から請求項 11 の何れかに記載の免疫アッセイ。

【請求項 20】

第二の混合物がアッセイ希釈剤をさらに含む、請求項 1 から請求項 11 の何れかに記載の免疫アッセイ。

【請求項 21】

アッセイ希釈剤が、緩衝液、塩、界面活性剤、溶媒又はそれらの組み合わせを含む、請求項 20 に記載の免疫アッセイ。

【請求項 22】

20

段階 (d) の第四の混合物が界面活性剤をさらに含む、請求項 1 から請求項 11 の何れかに記載の免疫アッセイ。

【請求項 23】

界面活性剤が還元 Triton (登録商標) X - 100 である、請求項 22 に記載の免疫アッセイ。

【請求項 24】

検体がシクロスポリンであり、トレーサーがアクリジニウムで標識されたシクロスポリンを含む、請求項 1 から請求項 11 の何れかに記載の免疫アッセイ。

【請求項 25】

段階 (b) の抗体が、検体に対するものよりも、10 倍から 1000 倍高い、交差反応性代謝産物に対する  $K_D$  を有する、請求項 1 から請求項 11 の何れかに記載の免疫アッセイ。

30

【請求項 26】

免疫アッセイが、検体に対する標準曲線の使用によるか又は参照標準に対する比較によるかの何れかの、試験試料中の検体量に対して形成される抗体 - トレーサー複合体の量に関する、請求項 1 から請求項 11 の何れかに記載の免疫アッセイ。

【請求項 27】

- (i) 第一の温置時間にわたり、段階 (a) で第一の混合物を温置することと；
  - (ii) 第二の温置時間にわたり、段階 (b) で第二の混合物を温置することと；
  - (iii) 第三の温置時間にわたり、段階 (d) で第四の混合物を温置することと；
- をさらに含む、請求項 1 から請求項 11 の何れかに記載の免疫アッセイ。

40

【請求項 28】

第一の温置時間が、2 分から 60 分間の時間を含む、請求項 27 に記載の免疫アッセイ。

【請求項 29】

第二の温置時間が、2 分から 30 分間の時間を含む、請求項 27 に記載の免疫アッセイ。

【請求項 30】

第三の温置時間が、2 分から 30 分間の時間を含む、請求項 27 に記載の免疫アッセイ。

50

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

## 関連出願情報

本願は、2007年5月24日出願の米国仮出願60/940,062（この内容は、参照により本明細書中に組み込まれる。）の優先権を主張する。

## 【0002】

## 技術分野

本開示は、検体代謝産物との交差反応性が低下している免疫アッセイに関する。とりわけ、本開示は、インビボ又はインビトロで代謝して交差反応性代謝産物を形成する疎水性薬物の試験試料中の濃度又はレベルを決定するための、薬物検体のこのような代謝産物との交差反応性が低下している診断用免疫アッセイに関する。特に、本開示は、疎水性薬物が免疫抑制剤である、このような免疫アッセイに関する。

10

## 【背景技術】

## 【0003】

シロリムス（ラパマイシンとしても知られる。）、タクロリムス（FK506としても知られる。）及びシクロスポリン（「CsA」）などの免疫抑制剤は、ヒトにおける、移植手術後の臓器又は組織拒絶、移植片対宿主病、自己免疫疾患の治療に有効である。薬物レベルが不十分であると移植片（臓器又は組織）拒絶が起こり、過剰なレベルであると、不要な副作用及び毒性がもたらされるので、免疫抑制剤治療の間、免疫抑制剤の血液濃度レベルを監視することは、臨床ケアの重要な態様である。例えば、タクロリムスは、CsAの毒性と同様のある程度の毒性を示し、この毒性には、腎毒性、消化管の合併症及び神経毒性が含まれる。（Murthy、J.N.ら、*Clinical Biochemistry*、31（8）：613-617（1998）参照）。従って、免疫抑制剤の血液レベルが測定されるので、適切な濃度に薬物レベルを維持するために薬物投与量を調整することができる。従って、免疫抑制剤血液レベルの決定のための診断用アッセイは、幅広い臨床用途がある。

20

## 【0004】

タクロリムスは、土壌中の細菌ストレプトミセス・ツクバエンシス（*Streptomyces tsukubaensis*）により産生されるマクロライド系免疫抑制剤に対する一般名である（Inamura、N.ら、*Transplantation*、45（1）：206-209（1988）参照）。タクロリムスは、特に肝臓、腎臓又は骨髄移植を受けている患者において、臓器拒絶の予防のために、静脈内及び経口で使用されてきた。

30

## 【0005】

シクロスポリンは、土壌真菌トリボクラジウム・インフラータム（*Tolypocladium inflatum*）から得られる免疫抑制剤である。移植後の臓器拒絶を予防するために主に使用される一方、CsAはまた、無形成性貧血などのその他の疾患を治療するため又は移植片対宿主病を予防するためにも使用されてきた。CsAの作用形式は、IL-2遺伝子の転写を妨げることによりT細胞活性化を阻止することである。

40

## 【0006】

タクロリムスは、シクロスポリンCsAよりも50-100倍高いインビボ効力を有する（Murthy、J.N.ら、前出（1998）参照）。タクロリムスの免疫抑制効果はCsAと同様であり、細胞毒性T細胞の生成の選択的阻害を通じたものであると考えられる。Id.

その他の免疫抑制剤には、シロリムス、エベロリムス、テムソロリムス、ゾタロリムス及びミコホフェノール酸（*mycophenolic acid*）が含まれる。

## 【0007】

シロリムス、エベロリムス（RAD-001）、テムソロリムス及びゾタロリムスの主たる標的は、特異的な細胞周期制御タンパク質であるmTOR（ラパマイシンの哺乳動物

50

標的)であり、その阻害により、サイトカインによるTリンパ球増殖の抑制が起こる。エベロリムスは、臓器移植の拒絶を予防するために免疫抑制剤として、及び癌抑制剤として、使用される。エベロリムスの使用における禁忌は、コレステロールレベルのある一定の上昇(従って心血管性のリスクが高い。)である。

【0008】

ミコフェノール酸モフェチル(MMF)はミコフェノール酸(MPA)のエステル誘導体であり、腎移植患者において免疫抑制剤として承認されている。プロドラッグMMFは、インビボで急速に活性のある免疫抑制剤MPAに変換されるが、これは、イノシンモノリン酸デヒドロゲナーゼ2を阻害する。このようにして、MMFは、特にT及びBリンパ球においてグアノシンヌクレオチドのデノボ合成を抑制し、それらの増殖を停止させる。

10

【0009】

免疫抑制剤の血液濃度を監視するための様々な異なる診断用免疫アッセイが市販されている。免疫アッセイが様々な形式で利用可能である一方、全て、免疫抑制剤に対する抗体又は結合タンパク質(例えばFKBP)の結合を使用する。一般に使用される先行技術の免疫アッセイは、免疫抑制剤への第一の抗体の結合及び残りの遊離抗体結合部位への標識免疫抑制剤(例えば、アクリジニウム化シロリムス又はタクロリムス)の結合と、それに続くアクリジニウム標識の検出を通じた定量を含むアッセイである。

【0010】

これらの免疫アッセイのうちいくつかは、全血試料からタクロリムスを抽出するために有機溶媒を使用する。有機溶媒は、平衡解離定数( $K_D$ )を上昇させ及び/又はアッセイにおいて使用される抗体の機能的活性を低下させる。抗体の活性低下により、アッセイ感度が低下し、精度及びロバスト性が低下する可能性がある。従って、これらの免疫アッセイの有効性には、使用される免疫抑制剤に対する特定の抽出及び変性溶媒が影響する。

20

【0011】

同様に、免疫抑制剤に対する代謝産物のインビボでの生成により、アッセイ結果に影響が及ぼされ得る。最新の文献により、CsA代謝産物M17(AM1としても知られる。)及びM1(AM9としても知られる。)の生成によって、活性親薬物(CsA)の濃度が隠蔽されることが示唆される。タクロリムス及びシロリムスは、インビボで代謝産物を形成することが知られている。タクロリムスの第1世代の主要な代謝産物は、13-O-デメチル化タクロリムス(「M-I」)、31-O-デメチル化タクロリムス(「M-II」)及び15-O-デメチル化タクロリムス(「M-III」)である。

30

【0012】

血清中のMPAの測定のための免疫アッセイ(例えばMMF処理後)によって、HPLC法で得られる結果よりも高い結果が得られる。これは、モノクローナル抗体とのMPA代謝産物の交差反応性によるものと考えられる。MPAは、主にグルクロニド誘導体(MPAG)(これは不活性であると考えられる。)に代謝される。最近、MPAのアシルグルクロニドを含む、MPAの2種類のその他の代謝産物が同定された。

【0013】

言うまでもないが、免疫抑制剤の適切な投与量は臓器移植患者にとって重要であり、代謝産物の存在下で正確かつ再現性をもって測定される必要がある。

40

【0014】

従って、当技術分野において、免疫抑制剤の交差反応性代謝産物存在下で、薬物検体(例えば免疫抑制剤)を正確に測定することができるようにする新しい免疫アッセイが必要とされる。本開示の目的は、このような免疫アッセイを提供することである。さらなる目的は、代謝産物との交差反応性を低下させるための抽出試薬組成の改変に伴う問題を最適に回避するような免疫アッセイを提供することである。さらに別の目的は、交差反応性薬物代謝産物との交差反応性を低下させるための、抗体又は抗体最適化の選択に伴う費用及び労力の検討事項を最適に回避する免疫アッセイを提供することである。さらなる目的及び実施形態は本明細書中の記述から明らかとなる。

【先行技術文献】

50

## 【非特許文献】

## 【0015】

【非特許文献1】Murthy、J. N. 他、Clinical Biochemistry、31(8)、1998年、p. 613 - 617

【非特許文献2】Inamura、N. 他、Transplantation、45(1)、1988年、p. 206 - 209

## 【発明の概要】

## 【0016】

ある実施形態において、本開示は、試験試料中の対象の検体の量を評価するための免疫アッセイに関し、ここで、検体は、代謝して1以上の交差反応性代謝産物を形成する疎水性薬物であり、本免疫アッセイの、試料中に存在する何らかの1以上の交差反応性代謝産物との交差反応性は約10%未満(場合によっては約5%未満の交差反応性)である。試験試料は、全血を含む、様々な患者試料であり得る。

10

## 【0017】

疎水性薬物は、界面活性剤又は有機溶媒中で可溶性であるものである。ある実施形態において、疎水性薬物は、免疫抑制剤であり、特に免疫抑制剤は、タクロリムス、シロリムス及びシクロスポリンからなる群から選択される。ある態様において、免疫抑制剤はタクロリムスであり、代謝産物は、M-I、M-II、M-III及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。別の態様において、免疫抑制剤はシクロスポリンであり、代謝産物は、M1(AM9としても知られる。)、M8、M9、M13、M17(AM1としても知られる。)、M18、M21及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。さらに別の態様において、免疫抑制剤はシクロスポリンであり、代謝産物は、AM1及びAM9である。さらに別の態様において、免疫抑制剤はシロリムスであり、代謝産物は、11-ヒドロキシ-シロリムス、41-O-デメチル-シロリムス、7-O-デメチル-シロリムス及び/又は41-O-デメチル-ヒドロキシ-シロリムス及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。

20

## 【0018】

ある実施形態において、免疫アッセイは、

(a) 第一の混合物を形成させるために、1以上の前処理試薬と試験試料を接触させ(ここで、1以上の前処理試薬は、あらゆる細胞を溶解し、試験試料中に存在するあらゆる検体を可溶化する。);

30

(b) 検体又は代謝産物と抗体の複合体を含む第二の混合物を形成させるために、検体に特異的な抗体と第一の混合物を接触させ;

(c) 抗体と複合体形成しないあらゆる検体及びあらゆる代謝産物を除去するために、及び、検体に対する抗体の平衡解離定数( $K_D$ )付近まで検体濃度が低下する第三の混合物を形成させるために、第二の混合物を洗浄し;

(d) トレーサーとの抗体の複合体(「抗体-トレーサー複合体」)を含む第四の混合物を形成させるために、検出可能な標識で標識された抗体の特異的結合パートナー(「トレーサー」)と第三の混合物を接触させ;

(e) 抗体と複合体形成しない何れのトレーサーをも除去するために、第四の混合物を洗浄し;

40

(f) 試料中に存在する検体量の尺度として抗体-トレーサー複合体を検出する、

段階を含む。ある実施形態において、段階(b)の検体に特異的な抗体を固相に結合させる。

## 【0019】

このような免疫アッセイのある態様において、1以上の前処理試薬は、試料中に存在するあらゆる検体結合タンパク質を段階(a)において沈殿させる。場合によっては、本アッセイは、第一の混合物からあらゆる検体結合タンパク質を除去することをさらに含む。1以上の前処理試薬は、ある態様において、サポニン、メタノール及び硫酸亜鉛を含む1以上の前処理試薬を含む、様々な異なる前処理試薬から選択され得る。別の態様において

50

、1以上の前処理試薬は、メタノール、エチレングリコール及び硫酸亜鉛（例えば、場合によっては第二の前処理試薬中に存在する。）と組み合わせて、サポニン（例えば、場合によっては第一の前処理試薬中に存在する。）を含む。

【0020】

このような免疫アッセイの別の態様において、場合によっては、検体に特異的な抗体は固相上に固定化される。抗体は、様々な異なる抗体から選択され得る。ある態様において、抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、 $F(ab)'_2$ 、キメラ抗体、ヒト抗体及び親和性成熟抗体からなる群から選択され得る。固相は、ある態様において、磁性粒子、ビーズ、試験管、マイクロタイタープレート、キュベット、膜、足場分子、フィルム、ろ紙、ディスク及びチップからなる群から選択される固相を含む、様々な異なる固相であり得る。

10

【0021】

このような免疫アッセイのさらに別の態様において、トレーサーに対して使用される検出可能な標識は、検出可能な標識が、放射性標識、酵素標識、化学発光標識、蛍光標識、温度標識及び免疫ポリマーゼ連鎖反応標識からなる群から選択されるある態様において含む、様々な異なる検出可能な標識であり得る。場合によっては、トレーサーは複数の結合パートナーを含み得る。

【0022】

このような免疫アッセイにおいて、ある実施形態において、第二の混合物は、アッセイ希釈剤をさらに含む。場合によっては、アッセイ希釈剤は、緩衝液、塩、界面活性剤又はそれらの組み合わせを含む。さらに、場合によっては、アッセイ希釈剤は、緩衝液、塩、界面活性剤、溶媒又はそれらの組み合わせを含む。別の態様において、段階(d)の第四の混合物は、界面活性剤をさらに含む。場合によっては、界面活性剤は、芳香族又は化学的還元形態の何れかのTriton（登録商標）X-100である。ある実施形態において、Triton（登録商標）X-100は、還元Triton（登録商標）X-100である。

20

【0023】

このような免疫アッセイのある態様において、段階(b)の抗体は、交差反応性代謝産物に対して、検体に対するものよりも約10倍から約1000倍高い $K_D$ を有する。

【0024】

このような免疫アッセイのさらなる態様において、段階(b)の抗体量は、試験試料中の検体量の約0.1%から約10%の間である。さらに、またさらなる態様において、検体及び代謝産物濃度は、段階(c)の第三の混合物中では、試験試料中と比較した場合、約10倍から約500倍低い。さらに、別の態様において、段階(d)で、抗体との複合体中に存在する検体の量は約1.0から約10.0 nMの範囲であり、トレーサーは、約0.1から約1.0 nMの間の量、存在する。

30

【0025】

このような免疫アッセイのさらに別の態様において、場合によっては、免疫アッセイは、(i)第一の温置時間にわたり、段階(a)において第一の混合物を温置することと；(ii)第二の温置時間にわたり、段階(b)において第二の混合物を温置することと；(iii)第三の温置時間にわたり、段階(d)において第四の混合物を温置することと、をさらに含む。第一の温置時間は、場合によっては、約2分から約60分間の時間を含む。第二の温置時間は、場合によっては、約2分から約30分間の時間を含む。第三の温置時間は、場合によっては、約2分から約30分間の時間を含む。

40

【0026】

このような免疫アッセイのまたさらなる態様において、場合によっては、免疫アッセイは、検体に対する標準曲線の使用によるか又は参照標準との比較によるかの何れかの、試験試料中の検体量に対して形成される抗体-トレーサー複合体の量に関する。

【図面の簡単な説明】

【0027】

50

【図1】タクロリムスの構造を示す。

【図2】シクロスポリンA(「CsA」左)及びCsAの代謝産物(右)(これは、「AM1又はM17」と呼ばれる。)の構造を示す。CsA及び代謝産物M17(AM1)の分子式及び分子量は、対応する構造の下に挙げる。

【図3A】図3A及び3Bは、シロリムスの構造(図3A)及びシロリムスとエベロリムス(RAD)の構造の相違(図3B)を示す。

【図3B】図3A及び3Bは、シロリムスの構造(図3A)及びシロリムスとエベロリムス(RAD)の構造の相違(図3B)を示す。

【図4】セクションII(診断用免疫アッセイ)「代表的免疫アッセイ」でさらに述べられる本開示による代表的な2段階免疫アッセイを示す。

【図5】実施例3に記載のとおり、の相対光単位(RLU)シグナルにおけるトレーサーTriton(登録商標)X-100濃度の効果のグラフである。横座標:トレーサーにおける% Triton(登録商標)X-100(「TX100」)。縦座標:RLUシグナル。記号:菱形、較正物質A(0 ng/mL CsA);四角、較正物質F(1500 ng/mL CsA)。

【図6】実施例3に記載のとおり、の%濃度CVにおけるトレーサーTX100濃度の効果のグラフである。横座標:トレーサーにおける%TX100。縦座標:平均%CV。記号:シリーズ1較正物質(0 ng/mL CsAを含有する較正物質A)に対して得られるデータ点。

【図7】実施例4に記載のとおり、曲線の形態における抽出法の影響を示すグラフである。横座標:ng/mLでのCsA濃度。縦座標:RLUシグナル。記号:菱形、ARCHITECT(登録商標)前処理を用いたアッセイ結果;四角、ASYM(登録商標)前処理を用いたアッセイ結果;丸、TDx前処理を用いたアッセイ結果。

【図8】実施例5に記載のとおり、アッセイ希釈剤へのTX100添加の影響を示すグラフである。横座標:ng/mLでのCsA濃度。縦座標:RLUシグナル。記号:四角、TX100添加;菱形、TX100添加なし。

【発明を実施するための形態】

【0028】

本開示は、検体代謝産物(検体はインビボ又はインビトロで代謝する疎水性薬物である。)との交差反応性が低下している免疫アッセイを提供する。特に、本開示は、試験試料中の疎水性薬物の濃度又はレベルを測定するための、検体薬物の代謝産物との交差反応性が低下している診断用免疫アッセイを提供する。ある実施形態において、疎水性薬物は免疫抑制剤である。

【0029】

I. 定義

a. インビボ又はインビトロで代謝する疎水性薬物。本明細書中で使用される場合、「疎水性薬物」は、水に曝露される薬物分子の表面積を減少させる熱力学傾向があり、その結果、水溶液中で溶解度が低くなる(例えば水に難溶性又は水に不溶性である薬物)ものである。疎水性薬物は、米国薬局方(U.S.P.)、その他の国の薬局方などの様々な薬局方及びその他の医学的著作物に記載されている。溶解性は、当技術分野で周知の様々な手段により評価することができる(例えば、水及び緩衝液とn-オクタノール又はシクロヘキサンとの間の分配係数)。「インビボ又はインビトロで代謝する疎水性薬物」は、生化学的修飾又は分解を通じて(例えば特定の酵素系を通じて)、別の化合物、通常は、極性生成物としてより容易に排泄される脂溶性化学化合物へと変換される疎水性薬物である。本開示は、代謝して(本明細書中に記載のように)交差反応性代謝産物を形成する疎水性薬物にのみ関する。例としては、免疫抑制剤ならびにステロイド薬(例えば、プレドニゾン、プレドニゾロン、コルチゾンなど)が挙げられる。

【0030】

b. 免疫抑制剤。本明細書中で使用される場合、「免疫抑制剤(immunosuppressive drug)」、「免疫抑制剤(immunosuppressive

10

20

30

40

50

agent)」又は「免疫抑制剤 (immunosuppressant)」という用語は、対象における免疫系活性を遅らせるか又は停止させる薬物を指す。免疫抑制剤は、臓器移植後、対象の免疫系が免疫反応を開始させるのを妨げるために、又は過活動免疫系により引き起こされる疾患を治療するために、対象に与えられ得る。免疫抑制剤の例には、以下に限定されないが、次のもの：カルシニューリン阻害剤、例えば、以下に限定されないが、シクロスポリン、タクロリムスなど、ラパマイシンの標的 (mTOR)、例えば、以下に限定されないが、シロリムス、エベロリムス、ゾタロリムス又はテムソロリムスなど、又はイノシンモノリン酸デヒドロゲナーゼの阻害剤、例えばミコフェノール酸モフェチルなど、ジヒドロ葉酸レダクターゼの阻害剤、例えば、以下に限定されないが、メトトレキサートなど、コルチコステロイド、例えば、以下に限定されないが、プレドニゾン及びメチルプレドニゾンなど、又は免疫抑制性代謝拮抗剤、例えば、以下に限定されないが、アザチオプリンなどが含まれる。

10

## 【0031】

c. 抗体。本明細書中で使用される場合、「抗体 (antibody) 及び antibodies)」という用語は、モノクローナル抗体、多特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体 (完全又は部分的ヒト化)、動物抗体、例えば、以下に限定されないが、鳥類 (例えば、アヒル又はガチョウ)、サメ又はクジラ、非霊長類を含む哺乳動物 (例えば、ウシ、ブタ、ラクダ、ラマ、ウマ、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ラット、マウスなど) 又は非ヒト霊長類 (例えば、サル、例えばカニクイザル、チンパンジーなど)、組み換え抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、1本鎖 Fv (scFv)、1本鎖抗体、単ドメイン抗体、Fab断片、F(ab)<sub>2</sub>を含むF(ab')断片、ジスルフィド結合 Fv (sdFv) 及び抗イデオタイプ (抗-Id) 抗体 (例えば、本開示の抗体に対する抗-Id抗体を含む。) 及び上記の何れかの機能的に活性を有するエピトープ結合断片を指す。特に、抗体は、免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫学的に活性を有する断片、即ち、抗原結合部位を含有する分子を含む。免疫グロブリン分子は、何らかのタイプ (例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgY)、クラス (例えば、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>及びIgA<sub>2</sub>) 又はサブクラスのものであり得る。

20

## 【0032】

本明細書中で使用される場合、「ヒト化」抗体という用語は、所定の抗原に結合することができ、実質的にヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有するフレームワーク領域及び実質的に非ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有するCDRを含む、免疫グロブリン変異体又はその断片を指す。通常、ヒト化抗体は、非ヒトであるソースからそれに導入される1以上のアミノ酸残基を含む。一般に、ヒト化抗体は、CDR領域の全て又は実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンのものと対応する少なくとも1及び通常は2つの可変ドメイン (Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fabc、Fvなど) の実質的に全てを含み、フレームワーク (FR) 領域の全て又は実質的に全ては、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである。ヒト化抗体は、最適には、免疫グロブリン定常領域 (Fc) の少なくとも一部 (通常はヒト免疫グロブリンのもの) を含む。一般に、抗体は、軽鎖ならびに少なくとも重鎖の可変ドメインの両方を含有する。ヒト化抗体は、IgM、IgG、IgD、IgA及びIgE及び何らかのアイソタイプ (IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>及びIgG<sub>4</sub>を含む。) を含む免疫グロブリンの何らかのクラスから選択され得る。ヒト化抗体は、複数のクラス又はアイソタイプからの配列を含み得、所望のエフェクター機能を最適化するために特定の定常ドメインを選択することは、当業者の範囲内である。

30

40

## 【0033】

d. 捕捉抗体。免疫アッセイにおいて試料からの検体の捕捉 (例えば分離) のために使用される抗体は、「捕捉抗体」と呼ばれる。本明細書中に記載のように、捕捉抗体には、検体の特異的結合パートナーである抗体が含まれる (例えば、免疫抑制剤などの疎水性薬物)。

## 【0034】

50

e. 特異性。本明細書中で使用される場合、特異的な結合ペア（本明細書中で定義されるように、例えば抗原及び抗体）のメンバー間の相互作用に関して、「特異的」又は「特異性」は、相互作用の選択的反応性を指す。従って、例として、「検体に特異的」という語句及びその類似語は、免疫抑制剤（以下に限定されないが、タクロリムス、シロリムス、エベロリムス及びCsAを含む。）などの検体に特異的に結合する、及びその他の結合競合物質（以下に限定されないが、代謝産物、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、作用物質又は薬物など）に特異的に結合しない、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、融合タンパク質及び抗体を指す。免疫抑制剤に特異的に結合する、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質又は抗体は、例えば診断用免疫アッセイ、B I A c o r e（登録商標）、K i n E x A（登録商標）又は当技術分野で公知のその他のアッセイにより測定した場合、より低い結合親和性で、その他の代謝産物、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、作用物質又は薬物に結合し得る。免疫抑制剤に免疫特異的に結合する抗体又は抗体断片は、例えば、診断用免疫アッセイ、B I A c o r e（登録商標）、K i n E x A（登録商標）又は当技術分野で公知のその他の技術により、同定することができる。抗体は、以下に限定されないが、放射性免疫アッセイ（「R I A」）及び酵素免疫測定法アッセイ（「E L I S A」）などの実験技術を用いて測定した場合、何らかの交差反応性抗原に対する結合親和性よりも高い結合親和性で、免疫抑制剤に免疫特異的に結合する（例えば、Paul 編、「Fundamental Immunology」、第2版、Raven Press、New York、p. 332 - 336（1989）参照）。

10

## 【0035】

20

f. 結合定数（例えば、 $K_D$ 、 $k_a$ 及び $k_d$ ）。本明細書中で使用される場合、交換可能に使用される場合に、「平衡解離定数」又は「 $K_D$ 」という用語は、本明細書中で、会合速度定数（ $k_{on}$ ）で解離速度定数（ $k_{off}$ ）を割ることにより得られる値を指す。抗原に対する抗体の結合親和性を表すために、会合速度定数、解離速度定数及び平衡解離定数が使用される。

## 【0036】

「会合速度定数」、「 $k_{on}$ 」又は「 $k_a$ 」という用語は、本明細書中で交換可能に使用される場合、下記の式により示されるような、抗体のその標的抗原への結合速度又は抗体と抗原との間の複合体形成の速度を示す値を指す：



30

## 【0037】

会合速度定数を決定するための方法は当技術分野で周知である。例えば、B I A c o r e（登録商標）（Sweden）アッセイを使用することができる。さらに、Sapidyne Instruments（Boise、Idaho）から入手可能なK i n E x A（登録商標）（結合平衡除外アッセイ）アッセイを使用することもできる。

## 【0038】

「解離速度定数」、「 $k_{off}$ 」又は「 $k_d$ 」という用語は、本明細書中で交換可能に使用される場合、下記の式により示されるような、その標的抗原からの抗体の解離速度又は時間経過に伴う遊離Ab及び抗原へのAb - Ag複合体の分離を示す値を指す：



40

## 【0039】

解離速度定数を決定するための方法は当技術分野で周知である。例えば、B I A c o r e（登録商標）（生体分子相互作用分析）アッセイを使用することができる（例えば、B I A c o r e International AB、GE Healthcare社、Uppsala、Swedenから入手可能な機器）。さらに、Sapidyne Instruments（Boise、Idaho）から入手可能なK i n E x A（登録商標）（結合平衡除外アッセイ）アッセイも使用することができる。

## 【0040】

g. 結合競合物質（例えば交差反応性代謝産物）。本明細書中で使用される場合、「結合競合物質」という用語は、関心のあるエピトープを含有する分子と競合するか又は交差

50

反応し、従って、分子がその特異的結合パートナーと相互作用するか結合することを妨害する、何らかの分子を指す。好ましくは、関心のあるエピトープを含有する分子と競合するか又は交差反応する分子は、関心のあるエピトープを含有する分子よりも低い親和性（以下に限定されないが、より高い $K_D$ 、より高い $k_d$ 又はより低い $k_a$ など）で、特異的結合パートナーに結合する。

【0041】

代謝産物結合競合物質の例には、例えば、以下に限定されないが、免疫抑制剤の代謝産物を含む薬物の代謝産物：例えば、13-O-デメチル化タクロリムス（「M-I」）、31-O-デメチル化タクロリムス（「M-II」）及び15-O-デメチル化タクロリムス（「M-IIII」）（これは、タクロリムスの代謝産物である。）；又はM1、M8、M9、M13、M17、M18又はM21（これは、シクロスポリンの代謝産物である。）が含まれる。CsA及びその代謝産物は、文献において（例えば、Kahanら、「Consensus Document: Hawk's Cay Meeting on Therapeutic Drugs Monitoring of Cyclosporine」、Clin. Chem., 36/8: 1510-1516 (1990)（これは、代謝産物に関するその教示に対して参照により本明細書中に組み込まれる。）において）詳述されている。例えば、シクロスポリン抗体は、親シクロスポリン薬物に対する $9.5 \times 10^{-10}$  Mの $K_D$ 及び代謝産物M17に対する $1.45 \times 10^{-8}$  Mの $K_D$ を有する。結合競合物質はまた、ハプテン；ホルモン；薬物；酵素；受容体；タンパク質；ペプチド；ポリペプチド；オリゴヌクレオチド；又はポリヌクレオチドも含み得る。

【0042】

h. 交差反応性。本明細書中で使用される場合、「交差反応する」又は「交差反応性」という用語は、通常は異なる親和性で、同じ特異的結合パートナーにおける同じ部位と反応する、2つのエピトープ、分子又はリガンドの能力を指す。

【0043】

i. エピトープ。本明細書中で使用される場合、「エピトープ (epitope)」、「エピトープ (epitopes)」又は「関心のあるエピトープ」という用語は、認識され、その特異的結合パートナー上の相補的部位に結合することができる、何らかの分子における部位を指す。分子及び特異的結合パートナーは、特異的な結合ペアの一部である。例えば、エピトープは、ポリペプチド、タンパク質、ハプテン、糖質抗原（以下に限定されないが、糖脂質、糖タンパク質又はリポ多糖類など）又は多糖類及びその特異的結合パートナーであり得、以下に限定されないが抗体であり得る。

【0044】

j. 緩衝液。使用され得る緩衝液の例には、以下に限定されないが、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸[「MES」]、3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸[「MOPS」]、(4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸)[「HEPES」]、2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール[トリスヒドロキシメチルアミノメタン又は「トリス」]、リン酸、クエン酸、ホウ酸緩衝液又はそれらの組み合わせが含まれる。ある実施形態において、MESは好ましい緩衝液である。

【0045】

k. 塩。使用され得る塩の例は、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸亜鉛又はそれらの組み合わせである。好ましい塩は塩化ナトリウムである。

【0046】

l. タンパク質。使用され得るタンパク質の例は、ウシ血清アルブミン（「BSA」）、魚ゼラチン、ウシガンマグロブリン又はそれらの組み合わせである。好ましいタンパク質はウシガンマグロブリンである。

【0047】

m. 溶媒。使用され得る溶媒の例は有機溶媒である。使用され得る有機溶媒の例には、以下に限定されないが、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、プロピレングリ

10

20

30

40

50

コール、エチレングリコール、メタノール、エタノール又はそれらの組み合わせが含まれる。好ましい溶媒は、メタノール及びエチレングリコールである。

【0048】

n. アッセイ希釈剤。本明細書中で使用される場合、「アッセイ希釈剤」という用語は、診断用免疫アッセイの反応条件のために使用することができる何らかの液体又は固体物質を指す。アッセイ希釈剤の組成は、アッセイ希釈剤がどのように使用されるべきかに依存して変化する（例えば様々な疎水性薬物アッセイに対してさらに最適化され得る。）。例えば、アッセイ希釈剤は、少なくとも1つの緩衝液、場合によっては少なくとも1つの塩、場合によっては少なくとも1つの界面活性剤及び/又は場合によっては少なくとも1つの溶媒（例えば水）を含み得る。ある実施形態において、アッセイ希釈剤は、例えば、以下に限定されないが、メタノール、エチレングリコール又はプロピレングリコールを含む、1以上の液体又は固体有機添加物又は界面活性剤をさらに含む。さらに、アッセイ希釈剤は、少なくとも1つの緩衝液、場合によっては少なくとも1つの塩、場合によっては少なくとも1つの界面活性剤及び場合によっては少なくとも1つの溶媒の何らかの組み合わせを含み得る。別の例として、アッセイ希釈剤は、約5から約8のpHを有する緩衝液（例えばMES緩衝液）及び約1Mから約4.5M（例えば、特に約1.9M NaCl又は約4.5M NaCl）の濃度を有する塩を含み得る。市販のアッセイ、例えばARCHITECT（登録商標）、TDx又はASYM（登録商標）分析装置（Abbott Laboratories、Abbott Park、IL）に対するアッセイからのアッセイ希釈剤を使用することができる。通常、アッセイ希釈剤は各アッセイに対してカスタマイズされる。

10

20

【0049】

o. 前処理試薬（例えば、溶解、沈殿及び/又は可溶化剤）。本明細書中に記載のように診断用アッセイで使用される前処理試薬は、あらゆる細胞を溶解し、試験試料中に存在するあらゆる検体を可溶化するものである。とりわけ、検体を可溶化することは、試料中に存在するあらゆる内在性結合タンパク質（「検体結合タンパク質」）からの検体の放出を伴う。一般に、1以上の前処理試薬を使用することができるか、又は第二又は第三など、その他の前処理試薬とともに第一の前処理試薬を使用することができる。前処理試薬、例えば、1以上の前処理試薬の使用は、均一系であり得るか（分離段階を必要としない。）又は不均一系であり得る（分離段階を必要とする。）。不均一系の前処理試薬を使用して、アッセイの次の段階に進む前に、試験試料からあらゆる検体結合タンパク質をさらに除去する。前処理試薬は、（a）1以上の溶媒及び塩、（b）1以上の溶媒、塩及び界面活性剤、（c）界面活性剤又は（d）界面活性剤及び塩を含み得る。

30

【0050】

p. 洗浄緩衝液。洗浄緩衝液は、アッセイ洗浄段階のために使用され、市販のARCHITECT（登録商標）洗浄緩衝液（Abbott Laboratories、Abbott Park、IL）を指すが、別の洗浄緩衝液（例えば界面活性剤の少量を含む緩衝食塩水）もまた場合によっては使用することができる。

【0051】

q. 界面活性剤。使用することができる界面活性剤の例には、以下に限定されないが、陰イオン性界面活性剤、陽イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤又は両性イオン界面活性剤が含まれる。試験試料などの試料内に含有される関心のあるタンパク質又はその他の検体を安定化及び/又は可溶化するために、一連の診断用免疫アッセイ中の非特異的結合を阻止するために、試料内に含有される細胞を破裂させるために、など、1以上の界面活性剤を含有するアッセイ希釈剤を使用することができる。陰イオン性界面活性剤には、以下に限定されないが、ケノデオキシコール酸、ケノデオキシコール酸ナトリウム塩、コール酸、デヒドロコール酸、ジギトニン、ジギトキシゲニン、N,N-ジメチルドデシルアミンN-オキシド、ドクサートナトリウム塩、グリコケノデオキシコール酸ナトリウム塩、グリココール酸水和物、グリココール酸ナトリウム塩水和物、グリコデオキシコー

40

50

ル酸モノ水和物、グリコリトコール酸3 - 硫酸2ナトリウム塩、グリコリトコール酸エチルエステル、N - ラウロイルサルコシンナトリウム塩、N - ラウロイルサルコシン溶液、ドデシル硫酸リチウム、ルゴール溶液、1 - オクタンスルホン酸ナトリウム塩、1 - ブタンスルホン酸ナトリウム、1 - デカンスルホン酸ナトリウム、1 - ドデカンスルホン酸ナトリウム、1 - ヘプタンスルホン酸ナトリウム無水物、1 - ノナンスルホン酸ナトリウム、1 - プロパンスルホン酸ナトリウムモノ水和物、2 - ブロモエタンスルホン酸ナトリウム、コール酸ナトリウム水和物、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウムモノ水和物、ドデシル硫酸ナトリウム、ヘキサンスルホン酸ナトリウム無水物、オクチル硫酸ナトリウム、ペンタンスルホン酸ナトリウム無水物、タウロコール酸ナトリウム、タウロケノデオキシコール酸ナトリウム塩、タウロデオキシコール酸ナトリウム塩モノ水和物、タウロデオキシコール酸ナトリウム塩水和物、タウロリトコール酸3 - 硫酸2ナトリウム塩、タウロウルソデオキシコール酸ナトリウム塩、ウルソデオキシコール酸又はそれらの組み合わせが含まれ、全て、Sigma - Aldrich、St. Louis、MIから入手可能である。

10

## 【0052】

陽イオン性界面活性剤には、以下に限定されないが、アルキルトリメチルアンモニウムブロミド、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンジルジメチルヘキサデシルアンモニウム、ベンジルジメチルヘキサデシルアンモニウムブロミド、ベンジルトリメチルアンモニウムテトラクロロヨウ素酸塩、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド、ドデシルエチルジメチルアンモニウムブロミド、ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド、エチルヘキサデシルジメチルアンモニウムブロミド、ジラール試薬T、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド又はそれらの組み合わせが含まれ、全て、Sigma - Aldrich、St. Louis、MIから入手可能である。

20

## 【0053】

非イオン性界面活性剤には、以下に限定されないが、Big CHAP、ビス(ポリエチレングリコールビス[イミダゾイルカルボニル])、Brij (登録商標) 35、Brij (登録商標) 56、Brij (登録商標) 72、クレモフォア(登録商標) EL、デカエチレングリコールモノドデシルエーテル、N - デカノイル - N - メチルグルカミン、n - デシル - D - マルトシド、n - ドデシル - D - マルトシド、ヘプタエチレングリコールモノデシルエーテル、ヘキサエチレングリコールモノドデシルエーテル、オクタエチレングリコールモノデシルエーテル、オクタエチレングリコールモノドデシルエーテル、オクタエチレングリコールモノヘキサデシルエーテル、オクタエチレングリコールモノオクタデシルエーテル、オクタエチレングリコールモノテトラデシルエーテル、ペンタエチレングリコールモノデシルエーテル、ペンタエチレングリコールモノドデシルエーテル、ペンタエチレングリコールモノヘキサデシルエーテル、ペンタエチレングリコールモノヘキシルエーテル、ペンタエチレングリコールモノオクタデシルエーテル、ポリエチレングリコールジグリシジルエーテル、ポリエチレングリコールエーテルW - 1、ポリオキシエチレン10トリデシルエーテル、ポリオキシエチレン100ステアレート、ポリオキシエチレン20イソヘキサデシルエーテル、サポニン、Span (登録商標) 20、Span (登録商標) 40、Span (登録商標) 60、Span (登録商標) 65、Span (登録商標) 80、Span (登録商標) 85、タージトール、Triton (登録商標) CF - 21、Triton (登録商標) CF - 32、Triton (登録商標) DF - 12、Triton (登録商標) DF - 16、Triton (登録商標) GR - 5M、Triton (登録商標) QS - 15、Triton (登録商標) QS - 44、Triton (登録商標) X - 15、Triton (登録商標) X - 100、Triton (登録商標) X - 102、Triton (登録商標) X - 114、TWEEN (登録商標) 20、TWEEN (登録商標) 21、TWEEN (登録商標) 40、TWEEN (登録商標) 60、TWEEN (登録商標) 61、TWEEN (登録商標) 65、TWEEN (登録商標) 80、TWEEN (登録商標) 81、TWEEN (登録商標) 85又はそれらの組み合わせが含まれ、全て、Sigma - Aldrich、St. Louis、MIから入手可能

30

40

50

である。

【0054】

両性イオン界面活性剤には、以下に限定されないが、CHAPS、3-(デシルジメチルアンモニオ)プロパンスルホネート分子内塩、(ドデシルジメチルアンモニオ)プロパンスルホネート分子内塩、3-(N,N-ジメチルミリスチルアンモニオ)プロパンスルホネート、3-(N,N-ジメチルオクタデシルアンモニオ)プロパンスルホネート、3-(N,N-ジメチルオクチルアンモニオ)プロパンスルホネート分子内塩、3-(N,N-ジメチルパルミチルアンモニオ)プロパンスルホネート又はそれらの組み合わせが含まれ、全て、Sigma-Aldrich、St. Louis、MIから入手可能である。

10

【0055】

好ましい界面活性剤は、界面活性剤の疎水性領域において標準的な芳香環を有するか又は化学的に還元された脂環式環を有するか何れかのTriton(登録商標)X-100である(「還元型」)。

【0056】

r. 特異的結合ペア/パートナー。本明細書中で使用される場合、「特異的結合パートナー」という用語は、特異的結合ペアのメンバーを意味する。特異的結合ペアのメンバーは、それぞれが、他方の分子の構造に相補的な少なくとも1つの構造を有する、少なくとも2つの分子を含み、この少なくとも2つの分子は、相補的構造の結合を通じて結合することができる。この用語はまた、例えば、Apo酵素及び補酵素からなる酵素、サブユニットの複数からなるタンパク質、タンパク質及び脂質からなるリポタンパク質などの分子複合体も含む。特異的結合パートナーは、天然に生じるか又は例えば化学合成、微生物学的技術及び/又は遺伝子操作の方法により調製された物質であり得る。特異的結合パートナーの例には、以下に限定されないが、抗体、抗原、ハプテン、酵素、レクチン、核酸、リプレッサー、オリゴ-及びポリヌクレオチド、プロテインA、プロテインG、アビジン、ストレプトアビジン、ビオチン、補体成分C1q、核酸結合タンパク質などが含まれる。特異的結合ペアには、以下に限定されないが、抗体-抗原、抗体-ハプテン、オペレーター-リプレッサー、ヌクレアーゼ-ヌクレオチド、ビオチン-アビジン、レクチン-多糖類、ステロイド-ステロイド-結合タンパク質、薬物-薬物受容体、ホルモン-ホルモン受容体、酵素基質、IgG-プロテインA、相補的オリゴ-又はポリヌクレオチドなどが含まれる。

20

30

【0057】

s. トレーサー。免疫アッセイにおける捕捉のために使用される抗体(いわゆる捕捉抗体)の特異的結合パートナーには、いわゆる「トレーサー」が含まれる。本明細書中に記載のようなトレーサーは、検出され得、さらに捕捉抗体に結合(これと反応)することができるようにする、当技術分野で公知であるものなどの検出可能な標識を組み込む。トレーサーには、(a)標識された検体(例えば、標識された、免疫抑制剤などの疎水性薬物);及び(b)標識された抗原又は検体の抗原性領域(例えば、標識された、免疫抑制剤などの抗原疎水性薬物)が含まれる。トレーサーはまた、本明細書中で、標識特異的結合パートナー、「検出特異的結合パートナー」及び「検出sbp」とも呼ばれる。

40

【0058】

t. 検体結合タンパク質。本明細書中で使用される場合、「検体結合タンパク質」は、関心のある検体に結合することができる試験試料中に存在する内在性タンパク質を指す。このような検体結合タンパク質は免疫アッセイを妨害し得るので、一般に、これは、例えば前処理試薬での試料の前処理によって、検体に対する結合から除去される。

【0059】

u. 対象。本明細書中で使用される場合、「対象」及び「患者」という用語は、対象が何らかの形態の治療を受けてきたか又は現在受けているか否かに関わりなく、交換可能に使用される。本明細書中で使用される場合、「対象(subject及びsubjects)」という用語は、動物を、ある態様において、鳥類(例えば、アヒル又はガチョウ)、

50

別の態様において、サメもしくはクジラ、又はさらなる態様において、非霊長類を含む哺乳動物（例えば、ウシ、ブタ、ラクダ、ラマ、ウマ、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ラット、マウス）及び霊長類（例えば、サル、例えばカニクイザル、チンパンジー及びヒトなど）を指す。

#### 【 0 0 6 0 】

v . 試験試料。本明細書中で使用される場合、「試験試料」という用語は、免疫抑制剤検体のソースである対象の身体からの成分、組織又は液体を指す。これらの成分は当技術分野で周知である。例えば、試験試料は、対象の、血清、血漿、全血、リンパ、CNS液、尿、リンパ液又はその他の体液由来の何らかの生体試料であり得る。本開示によるある実施形態において、試験試料は全血である。試験試料は、当業者にとって公知の通常の技術を用いて得ることができる。

10

#### 【 0 0 6 1 】

##### II . 診断用免疫アッセイ

代謝産物（即ち結合競合物質）と交差反応しない特異的抗体の使用によって又は本明細書中に記載のような本開示によって処理されなければ、試験試料中に存在する1以上の結合競合物質は、関心のあるエピトープに対する結合に対して1以上のその他の分子と競合し得るか又は、試験試料中の関心のあるエピトープに対する1以上のその他の分子の結合を妨害し得る。具体的に、1以上の結合競合物質は、試験試料の別の成分に対する関心のある検体の結合を排除するか又は妨げることによって、試験試料のアッセイ特性を変化させ得る。これが起こっているか否かを調べることにあって、抗体が1以上の結合競合物質に対して有する交差反応性の程度を調べるために、1以上の結合競合物質を含むアッセイ希釈剤は、本明細書中に記載のように使用することができ、1以上の結合競合物質に対して交差反応性が改良された（即ち低下した）免疫アッセイに対する条件を提供するために使用することができる。同じように、本開示は、とりわけ、それらの各自の主要な代謝産物（例えば、タクロリムスに対する、M - I、M - II及び/又はM - III；例えば、シクロスポリンに対する、M 1、M 8、M 9、M 13、M 17、M 18及び/又はM 21；例えば、シロリムスに対する、11 - ヒドロキシ - シロリムス、41 - O - デメチル - シロリムス、7 - O - デメチル - シロリムス及び/又は41 - O - デメチル - ヒドロキシ - シロリムス）の1以上の存在下での、活性親薬物（例えば、シクロスポリン、タクロリムス、シロリムス又はエベロリムスなどの免疫抑制剤）のアッセイ定量の向上を提供する。

20

30

#### 【 0 0 6 2 】

次のセクション、「代表的免疫アッセイ」及び「免疫アッセイ全般」を参照することにより、本開示の理解が促進される。

#### 【 0 0 6 3 】

##### A . 代表的免疫アッセイ

本開示による代表的な好ましい2段階アッセイを図4で示すが、このアッセイには、抗体捕捉段階（段階1）及びトレーサー競合段階（段階2）が含まれる。図4のダイアグラムは、免疫抑制剤CsA（本開示の、ある実施形態）に関するが、その他の免疫抑制剤（例えば、タクロリムス、シロリムス、エベロリムス、ゾタロリムス、テムソロリムスMMF、MPAなど）及びインビボ又はインビトロで代謝して交差反応性代謝産物を形成するその他の疎水性薬物に適用でき、容易に適合させられる。

40

#### 【 0 0 6 4 】

試料前処理剤中に存在する有機溶媒及び界面活性剤（例えば、メタノール、エチレングリコール、サポニン）は全て、抽出血液試料中の疎水性薬物（例えばCsA）及び交差反応性代謝産物（例えば「CsA + Metab」）の可溶化を促進する。抗体捕捉段階で抽出試料がさらに希釈され、溶媒環境が有機溶媒から主として水性混合液に転換される。ここで、水に不溶性の薬物及び代謝産物が、水溶性界面活性剤相において封鎖されるようになる。これらの条件下で、界面活性剤はミセル構造を形成することが知られており、その大きさ及び構造は、塩濃度、界面活性剤のタイプ及び温度により影響を受ける。消泡剤（

50

例えばポリジメチルシロキサン)などのその他の疎水性試薬成分もまた存在し得、薬物封鎖に参与し得る。薬物及び代謝産物の抗体結合は、この水性の、界面活性剤が豊富な環境で起こる。

【0065】

第一段階において、微粒子上に存在するモノクローナル抗体(球面上でY型構造として示される。)は、好ましくは、CsAなどの検体免疫抑制剤の約10から約100nM及び代謝産物の免疫抑制剤の量の4倍以下を含むことが予想される試験試料のアッセイに対して約0.2nMの量で存在する。試料からの免疫抑制剤(CsA)及び代謝産物のわずかに約1%が微粒子上の抗体に結合され得る。残りの未結合免疫抑制剤及び代謝産物を洗浄段階で除去する。

10

【0066】

トレーサー競合段階(段階2)は、場合によっては、トレーサー(アクリジニル化CsA、「CsA-Acr」などの標識免疫抑制剤)をさらに含む反応中に存在するNaCl及び消泡剤及び、界面活性剤(還元Triton(登録商標)X-100、「TX-100(R)」)を含む。還元型Triton(登録商標)X-100は、ベンゼン環がシクロヘキサン環に還元されているTriton(登録商標)X-100である。場合によっては、本発明において、Triton(登録商標)X-100及び還元型Triton(登録商標)X-100の両方を使用することができる。ある実施形態において、Triton(登録商標)X-100の使用が好ましい。第二段階において、免疫抑制剤、代謝産物及びトレーサーは、利用可能な抗体部位に対して競合し、その後洗浄段階及びシグナル測定が続く。この第二段階において、微小微粒子上に存在する免疫抑制剤(例えばCsA)の量は約0.1から約1nMの範囲であり、約0.5nMトレーサーが使用される。何らかの理論により縛られることを望まないが、2段階方式において、トレーサー競合段階でおよそ100倍、免疫抑制剤(例えばCsA)及び代謝産物濃度を低下させることにより、薬物及び代謝産物に対する抗体解離定数の有利な差ゆえに、薬物結合選択性が可能になると思われる。特に、これは、免疫抑制剤(CsAなど)、代謝産物及びトレーサーは全て、免疫抑制剤(CsAなど)に対する $K_D$ 濃度に近い(50%結合が起こる。)非常に低い濃度(1nM未満)で競合していることを意味する。代謝産物結合に対する $K_D$ が非常に高いことが予想される(即ち、より弱い結合の反映)。代謝産物 $K_D$ を十分に下回る代謝産物濃度において、特に競合状況において、抗体に結合する代謝産物は非常に少

20

30

【0067】

B. 免疫アッセイ一般

その他の態様において、本開示は、試験試料中の検体としての疎水性薬物(例えば免疫抑制剤)の定性及び/又は定量のために使用することができる診断用免疫アッセイに関する。本開示の診断用免疫アッセイは、以下に限定されないが競合阻害方式など、当技術分野で公知の何らかの方式を用いて行うことができる。好ましい方式は、第一段階での抗体捕捉及び第二段階でのトレーサー競合を含み、少なくとも1回の洗浄段階を含む、2段階競合アッセイである。最適には、競合アッセイの前に本明細書中に記載のような試料前処理が行われる。

40

【0068】

その他の態様において、本開示は、試験試料中の検体としての疎水性薬物(例えば免疫抑制剤)の定性及び/又は定量のために使用することができる診断用免疫アッセイに関する。特に、本開示は、インピボ(即ち試験試料の単離前)又はインピトロ(例えば、試験試料の単離後、試料操作及び/又は保管中など)の何れかでの、代謝して交差反応する1以上の代謝産物を形成する疎水性薬物に対する免疫アッセイに関する。本開示の診断用免疫アッセイは、当技術分野で公知の何らかの固定化抗体方式を用いて行うことができる。

【0069】

最適に、競合アッセイの前に本明細書中に記載のような試料前処理が行われる(例えば

50

実施例及びセクションIV)。試料前処理は、一般に、第一の混合物を形成させるために1以上の前処理試薬と試験試料を接触させることを含む。前処理試薬は、あらゆる細胞を溶解し、試験試料中に存在するあらゆる検体結合タンパク質から検体を放出させる。場合によっては、あらゆる検体結合タンパク質が第一の混合物から除去される(例えば、第一の混合物からタンパク質を沈殿させるために1以上の前処理試薬を用いて)。ある実施形態において、沈殿した検体結合タンパク質を除去し(不均一系前処理)、一方、別の態様において、検体結合タンパク質は可溶性であり、除去しない(均一系前処理)。しかし、薬物検体からの検体結合タンパク質の放出は、免疫アッセイにおける妨害の可能性を阻止するために行われる。

#### 【0070】

検体(例えば免疫抑制剤)を含有する疑いがあるか又は含有することが知られている試験試料中の検体の検出のためのこのような競合的免疫アッセイにおいて、抗体-検体免疫複合体を形成させるために、検体の少なくとも1つのエピトープに結合する少なくとも1つの抗体と試験試料を接触させる。使用される抗体(いわゆる「捕捉抗体」)は、場合によっては、固相上に固定化されている。抗体は、検体に特異的(即ち検体の特異的結合パートナー)である。このような抗体は、試料中に存在し得る何らかの交差反応性代謝産物に対する交差反応性を減少させるために最適化される必要がある。本明細書中に記載の驚くべき予想外の結果によって、本明細書中で推奨されるように行われたい他のアッセイにおいて10%を超えるレベルで代謝産物と捕捉抗体が交差反応する状況でも、試料中に存在する何らかの1以上の交差反応性代謝産物との交差反応性が10%未満に低下するようにして、免疫アッセイを行うことができる。

#### 【0071】

本明細書中のセクションIIIに記載の抗体は、前処理した試験試料(第一の混合物)由来の第二の混合物中でこのような抗体-検体(例えば免疫抑制剤)複合体を形成させるために、このような免疫アッセイで使用することができる。場合によっては、第二の混合物中の抗体量は、試験試料中に存在する検体量の約0.1%から約10%、特に約0.5%から約2%、特に約1%である。

#### 【0072】

言うまでもなく、検体に特異的な抗体はまた、試験試料中に存在する何らかの1以上の交差反応性代謝産物との複合体を第二の混合物においても形成し得る。従って、抗体と複合体形成しないあらゆる検体及び代謝産物を除去するために、第二の混合物の洗浄が行われる。本明細書中に記載の全ての洗浄段階は、適切な洗浄緩衝液を用いて当技術分野で公知のように行われる。このような洗浄の結果として、検体に対する抗体の平衡解離定数( $K_D$ )近くまで検体濃度が低下する第三の混合物が形成される。「 $K_D$ 近く」とは、検体に対する抗体の $K_D$ の大きさの約1桁(即ち約1小数点の変化)内である値を意味する。場合によっては、「 $K_D$ 近く」とは、検体に対する抗体の $K_D$ の大きさの約半桁(即ち1小数点の約半分の変化)内である。

#### 【0073】

また、このような洗浄の結果として、第三の混合物において、試験試料中と比較した場合、約10倍から約1000倍、特に約10倍から約500倍、検体(例えばCSA)及び代謝産物濃度が低下する。場合によっては、これらの濃度は、約50倍から約250倍又は約75倍から約200倍又は約100倍低下する。言うまでもなく、この範囲は疎水性薬物及び代謝産物に対する $K_D$ の比ならびに抗体捕捉段階前に存在する最初の疎水性薬物/代謝産物濃度に依存するので、その他の範囲も本開示により包含される。

#### 【0074】

続いて、抗体-特異的結合パートナー複合体を含む第四の混合物を形成させるために、検出可能な標識で標識された抗体の特異的結合パートナー(例えばいわゆる「検出sbp」又は「トレーサー」と第三の混合物を接触させる。この第四の混合物において、特異的結合パートナーは、検体又は代謝産物の何れかに占有されていない/複合体化されていない捕捉抗体上の部位にのみ結合する。抗体と複合体形成しない特異的結合パートナーを

10

20

30

40

50

除去するための第四の混合物の洗浄後、試料中に存在する検体量の尺度として、抗体 - 特異的結合パートナー複合体を検出する。抗体 - 特異的結合パートナー複合体の量は、試料中に存在する検体量に反比例する。このような免疫アッセイにおいて、試料中に存在する何らかの1以上の交差反応性代謝産物との交差反応性は約10%未満である。場合によっては交差反応性は約7%未満、交差反応性は約5%未満、交差反応性は約4%未満、交差反応性は約3%未満、交差反応性は約2%未満、交差反応性は約1%未満、交差反応性は約0.5%未満、交差反応性は約0.3%未満、交差反応性は約0.2%未満又は交差反応性は約0.1%未満である。殆どの場合において、交差反応性の最低量の検出は、アッセイの感度によって制限され(即ち検出限界)、本明細書中に記載のCsAアッセイの場合、約0.1%であると思われる。しかし、下限は、本開示による別のアッセイにおいて、例えばアッセイ精度、シグナル量及びその他の因子(例えば、より最近開発され、より感度が高い可能性がある検出技術の入手)に基づき、変化し得る。

10

**【0075】**

さらに、好ましくはトレーサー競合が行われる第四の混合物中で免疫アッセイが行われる方式のために、トレーサー競合段階の第四の混合物に存在する抗体の濃度が、抗体捕捉段階の第二の混合物中に存在する抗体の、約8倍から約3倍内、特に約7倍から約4倍内、特に約5倍内、低下するように、抗体捕捉が行われる第二の混合物におけるものと比較して、体積が低下させられる。トレーサー競合が行われる第四の混合物において、混合物の体積は、約20 $\mu$ Lから約80 $\mu$ Lの範囲、特に約30 $\mu$ Lから約70 $\mu$ L、場合によっては、約40 $\mu$ Lから約60 $\mu$ L及び特に約50 $\mu$ Lである。抗体捕捉が行われる第二の混合物において、混合物の体積は、100 $\mu$ Lから約400 $\mu$ Lの範囲、特に約150 $\mu$ Lから約350 $\mu$ L、場合によっては約200 $\mu$ Lから約300 $\mu$ L及び特に約250 $\mu$ L、約225 $\mu$ L、約200 $\mu$ L又は約175 $\mu$ Lである。

20

**【0076】**

ある実施形態において、抗体との複合体中に存在する検体量は、約0.01から約10nM(特に約0.1から約1.0nM)の範囲であり、特異的結合パートナー(トレーサー)は、約0.1から約1.0nM(特に約0.5nM)の間の量で存在する。

**【0077】**

これらの免疫複合体の検出は、当業者にとって公知の通常の技術を用いて行われる。例えば、本開示の特異的結合パートナーは、抗体 - 検体複合体の存在を検出するために、検出可能な標識で標識され得る(即ち反比例関係)。検出可能な標識及び、疎水性薬物検体(例えば免疫抑制剤)の抗原性部分などの特異的結合パートナーへのそれらの連結は、以下でより詳細に考察する。

30

**【0078】**

好ましい実施形態において、競合的アッセイ方式における、抗体(本開示の捕捉抗体など)への結合のための、試験試料中の少なくとも1つの免疫抑制剤及びその何らかの交差反応性代謝産物と競合させるために、既知の濃度の少なくとも1つの免疫抑制剤の標識抗原のアリコートを使用する。免疫抑制剤の抗原及び抗原を作製する方法は、当技術分野で周知であり、市販されている。当業者にとって公知の何れかの検出可能な標識で、免疫抑制剤又は免疫抑制剤の抗原を標識することができる。例えば、以下に限定されないが、検出可能な標識は、放射性標識、例えば<sup>3</sup>H、<sup>125</sup>I、<sup>35</sup>S、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、<sup>33</sup>Pなど、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-ホスフェート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エステル、ルミナル(luminal)、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ネートなど)、ローダミン、フィコピタンパク質、R-フィコエリトリン、量子ドット(硫化亜鉛被覆セレン化カドミウム)、温度標識又は免疫ポリメラーゼ連鎖反応標識などであり得る。標識への導入、標識

40

50

手順及び標識の検出は、Polak及びVan Noorden、Introduction to Immunocytochemistry、第2版、Springer Verlag、N.Y.(1997)及びHaugland、Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals(1996)(これは、Molecular Probes、Inc.、Eugene、Oregonにより刊行されている併合ハンドブック及びカタログである。)で見出される。例えば、本明細書中の実施例に記載のように、競合的方式において、アクリジニウム-CsA抗原又はその他の標識免疫抑制剤(例えば、ビオチン化CsA又はその他の免疫抑制剤)を使用することができる。

【0079】

ある実施形態において、本免疫アッセイは、検体に対する標準曲線の使用によるか又は参照標準との比較によるかの何れかの、試験試料中の検体量に対して形成される抗体-特異的結合パートナー(即ちトレーサー)複合体の量に関する。検体量を調べるための(例えば実施例に記載のような)何らかの周知の手段を使用することができる。

【0080】

いわゆるトレーサーを含むようにするために、当業者にとって公知の何らかの検出可能な標識で、免疫抑制剤(又は免疫抑制剤の抗原)を標識することができる。ある実施形態において、固体の支持体上に本開示の捕捉抗体を固定化することができる。さらに、必要であれば又は必要に応じて、抗体における様々な官能基との反応が可能となるように、固体の支持体を誘導体化することができる。このような誘導体化は、場合によっては、以下に限定されないが、無水マレイン酸、N-ヒドロキシスクシンイミド及び1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなどのある種のカップリング剤の使用を含む。あるいは、微粒子などの固体の支持体上に固定化されている、抗種抗体などの別の抗体に、本開示の捕捉抗体をカップリングすることができる(例えば実施例参照)。このようなアプローチは、複数の結合パートナーを含む抗体(特定の特異的結合パートナー)の例である。捕捉抗体のような標識された特異的結合パートナー(例えばトレーサー)は、複数の結合パートナーを含み得る。複数の結合パートナーを含むトレーサーを使用して、アッセイの特徴を変化させるために、異なる結合強度又は親和性を有する結合パートナーを使用することが可能であり得る。

【0081】

抗体-検体複合体の形成を可能にするために、標識された特異的結合パートナー(例えば、標識された免疫抑制剤又は免疫抑制剤の抗原又はいわゆるトレーサー)、試験試料検体及び抗体を温置する。一般的に言えば、約4.0から約9.0のpH、約2から約45(特に約33から約38)の温度及び少なくとも約2(2)分から約18(18)時間、好ましくは約2分から約24分間、最も好ましくは約4分から約18分間、免疫アッセイでの様々な温置(例えば、第一の温置時間にわたる第一の混合物の温置、第二の温置時間にわたる第二の混合物の温置及び第三の温置時間にわたる第四の混合物の温置)が行われ得る。

【0082】

好ましくは、第一の温置時間(即ち前処理段階)は約2分から約60分間の時間を含む。好ましくは、第二の温置時間(即ち抗体捕捉段階)は、約2分から約30分間、特に約15分から約25分間、特に約22分間、約20分間、約18分間又は約16分間の時間を含む。好ましくは、第三の温置時間(即ちトレーサー競合段階)は、約2分から約30分間、特に約2分から約8分間、特に約6分間、約5分間、約4分間又は約3分間の時間を含む。

【0083】

通常、抗体捕捉段階及びトレーサー競合段階において、抗体複合体の少なくとも2つの異なる種が生成される。具体的に、抗体捕捉段階において、生成される抗体複合体の1つは検体を含み、別のものは何らかの交差反応検体代謝産物を含む。トレーサー競合段階において、これらの種の複合体の両方がある量存在し得、さらに、抗体とのトレーサー(検

10

20

30

40

50

出可能な標識を有する特異的結合パートナー)の複合体もまた形成される。好ましくは、未結合トレーサーを混合物の残りの部分から分離し、次いで、放射活性、蛍光、化学発光、酵素的又は当技術分野で公知のその他の手段により、抗体と複合体形成される検出可能な標識の量を定量する。例えば、酵素標識が使用される場合、発色などの定量可能な反応を与える標識に対する基質と、標識された複合体を反応させる。標識が放射性標識である場合、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、ある色の光(「励起波長」として知られる。)で標識を刺激し、刺激に反応して標識により発光される別の色(「発光波長」として知られる。)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(例えば、実施例に記載のようなアクリジニウム)である場合、視覚的に、又は、照度計、X線フィルム、高速度撮影フィルム、CCDカメラなどを用いることによるかの何れかで、発光される光を検出して、標識を定量する。次に、抗体と複合体形成された検出可能な標識の量を標準曲線と比較することにより、試験試料中の検体(例えば免疫抑制剤)の濃度を調べることができる。質量分析により、重量測定法で及び当技術分野で公知のその他の技術により、既知の濃度の検体(例えば免疫抑制剤)の連続希釈物を用いて、標準曲線を作成することができる。

10

## 【0084】

好ましくはトレーサー競合に先立つ抗体捕捉段階において、固体の支持体に抗体を結合させ、次いで固体の支持体と接触しないように試験試料の残りを除去することにより、試験試料混合物から、抗体-検体(例えば免疫抑制剤)複合体を分離することができる。例えば、捕捉抗体がウェル又はビーズなどの固体の支持体に結合される場合、固体支持体と接触しないように液体を(試験試料混合物から)除去することによって、分離を行うことができる。場合によっては、洗浄緩衝液で洗浄することにより分離を行う。場合によっては、固体支持体(例えばいわゆる「固相」)は、当技術分野で公知のものなどの、何らかの適切な固体支持体又は相である。例えば、場合によっては、固相は、磁性粒子、ビーズ、試験管、マイクロタイプレート、キュベット、膜、足場分子、フィルム、ろ紙、ディスク及びチップからなる群から選択される。当技術分野で公知の洗浄溶液及び流体技術を用いて、反応と反応との間に固相の洗浄を行うことができる。好ましい固相は、磁性微粒子であり、好ましい洗浄緩衝液は塩及び非イオン性界面活性剤を含有する。

20

## 【0085】

このようにして、ある実施形態において、本明細書中で、試験試料中のシクロスポリンの量を評価するための免疫アッセイが提供されるが、この中にはシクロスポリンの1以上の交差反応性代謝産物もまた存在し得、この免疫アッセイは、

30

(a) 第一の混合物を形成させるために、1以上の前処理試薬と試験試料を接触させ(ここで、1以上の前処理試薬は、あらゆる細胞を溶解し、試験試料中に存在するあらゆる検体を可溶化する。);

(b) シクロスポリン又はシクロスポリンの代謝産物との抗体の複合体を含む第二の混合物を形成させるために、シクロスポリンに特異的で固相上に固定化されている抗体と第一の混合物を接触させ;

(c) 抗体と複合体形成しないあらゆる検体及びあらゆるシクロスポリン代謝産物を除去するために、及び第三の混合物を形成させるために(この中では、シクロスポリン濃度がシクロスポリンに対する抗体の平衡解離定数( $K_D$ )近くまで低下する。)、第二の混合物を洗浄し;

40

(d) トレーサーと抗体の複合体(「抗体-トレーサー複合体」)を含む第四の混合物を形成させるために、アクリジニウムなどの検出可能な標識で標識されるシクロスポリン(「トレーサー」)と第三の混合物を接触させ;

(e) 抗体と複合体形成されないあらゆるトレーサーを除去するために、第四の混合物を洗浄し;

(f) 試料中に存在するシクロスポリン量の尺度として、抗体-トレーサー複合体を検出する(ここで、この免疫アッセイにおいて、試料中に存在するシクロスポリンの何らかの1以上の交差反応代謝産物との交差反応性は約10%未満(又は、あるいは交差反応性

50

は約5%未満)である。) )、段階を含む。

【0086】

この免疫アッセイのある態様において、場合によっては、段階(b)での抗体量は、試験試料中で存在するシクロスポリンの量の約0.1%から約10%である。さらに、場合によっては、試験試料中と比較した場合、段階(c)の第三の混合物においてシクロスポリン及び代謝産物濃度が約10倍から約500倍低くなる。さらに、場合によっては、段階(d)で、抗体との複合体中に存在するシクロスポリンの量は、約1.0から約10.0 nMの範囲であり、トレーサーは、約0.1から約1.0 nMの量で存在する。さらに、場合によっては、段階(b)の抗体は、検体に対するものよりも約10倍から約1000倍高い、交差反応性シクロスポリン代謝産物に対する $K_D$ を有する。

10

【0087】

本免疫アッセイの別の態様において、試験試料は全血である。場合によっては、シクロスポリン代謝産物は、M1、M-8、M-9、M-13、M-17、M-18、M-21及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。特に、シクロスポリン代謝産物はM1又はM9であり得る。

【0088】

本明細書中に記載の免疫アッセイ(即ちシクロスポリン免疫アッセイ又はその他の免疫抑制剤免疫アッセイ)は、場合によっては、免疫抑制剤療法を受けている患者を監視するために行われ得(例えば、移植手術後の臓器又は組織拒絶、移植片対宿主病、自己免疫疾患の治療のために)、さらに場合によっては、医師の治療決定を促進するために使用され得る。同じように、本開示はまた、代謝して1以上の交差反応性代謝産物を形成する免疫抑制剤(例えばシクロスポリン)での対象の一連の治療を監視する方法も提供し、この方法は、

20

(a) 試験試料を提供し；

(b) 本明細書中に記載の免疫アッセイに従い、試験試料中の免疫抑制剤(例えばシクロスポリン)の濃度を調べ；

(c) 所定のレベル(免疫抑制剤に対して周知)により段階(b)で決定される試験試料中の免疫抑制剤(例えばシクロスポリン)の濃度を比較する段階を含む。

【0089】

別の態様において、この方法は、

30

(a) 免疫抑制剤(例えばシクロスポリン)を対象に投与する前に対象からの第一の試験試料を提供し；

(b) 第一の試験試料中の免疫抑制剤(例えばシクロスポリン)の濃度を決定し；

(c) 所定のレベルにより段階(b)で決定された免疫抑制剤(例えばシクロスポリン)の濃度を比較し；

(d) 所定のレベルにより段階(c)で決定された免疫抑制剤(例えばシクロスポリン)の濃度の比較が必要とされる場合、ある時間にわたり、免疫抑制剤(例えばシクロスポリン)で対象を治療し；

(e) 対象に免疫抑制剤(例えばシクロスポリン)を投与した後、対象からの第二及び/又は続く試験試料を提供し；

40

(f) 第二及び/又は続く試験試料中の免疫抑制剤(例えばシクロスポリン)の濃度を決定し；

(g) 段階(b)で決定された免疫抑制剤(例えばシクロスポリン)の濃度と段階(f)で決定された免疫抑制剤(例えばシクロスポリン)の濃度を比較する、段階を含む。

【0090】

これらの方法に従い、測定される免疫抑制剤(例えばシクロスポリン)の濃度が推奨される所定レベルより高いか又は低い場合、又は前の測定レベルに基づくレベルの傾向(増加又は減少)から、治療を変更すべきであることが示唆される場合、治療を変更することができる。

【0091】

50

## I I I . 抗体

本開示の免疫アッセイでの使用のための抗体は、当業者にとって公知の通常技術を用いて調製することができるか又は市販されている。

## 【 0 0 9 2 】

例えば、場合によっては、捕捉抗体に対して本明細書中に記載の抗体を用いるか、C s A アッセイにおける幅広い文献に記載の抗体の何れかを用いるか、C s A に特異的な市販の抗体の何れかを用いるか、又はC s A アッセイを行うための市販キットの何れかの抗体 - 含有成分を用いて、C s A アッセイを行うことができる。同様に、捕捉抗体として、タクロリムス、シロリムス又はその他の免疫抑制剤アッセイにおける幅広い文献に記載の抗体の何れかを用いるか、タクロリムス、シロリムス又はその他の免疫抑制剤に特異的な市販の抗体を用いるか、又はタクロリムス、シロリムス又はその他の免疫抑制剤アッセイを行うための市販キットの何れかの抗体 - 含有成分を用いて、本開示に従う、タクロリムス、シロリムス又はその他の免疫抑制剤アッセイを行うことができる。

10

## 【 0 0 9 3 】

特に、使用することができるその他の抗シクロスポリンモノクローナル抗体には、モノクローナルマウス抗 - シクロスポリンAが含まれる [ カタログ番号 R D I - T R K 3 C 1 3 - C S Z . 2 2、R D I D i v i s i o n o f F i t z g e r a l d I n d u s t r i e s I n t l , C o n c o r d、M A ]。使用することができるその他の抗 - タクロリムスモノクローナル抗体には、F K B P I B モノクローナル抗体 ( M 0 1 )、クローン 4 H 5 - 1 B 6 [ カタログ番号 H 0 0 0 0 2 2 8 1 - M 0 1、A b n o v a C o r p o r a t i o n、T a i p e i C i t y、T a i w a n ] 及びモノクローナルマウス抗 - F K 5 0 6 [ カタログ番号 4 F K 4 2、H y T e s t L t d .、T u r k u F i n l a n d ] が含まれる。使用することができるその他の抗 - シロリムスモノクローナル抗体には、モノクローナル m T O R 抗体 [ カタログ番号 2 9 7 2 C e l l S i g n a l i n g T e c h n o l o g y、B e v e r l y、M A ] が含まれる。

20

## 【 0 0 9 4 】

本開示の免疫アッセイ法において有用な抗体には、ポリクローナル及びモノクローナル抗体の両方が含まれる。ポリクローナル抗体は、適切な非ヒト哺乳動物 ( 例えばマウス、ヤギ又はウサギ ) に免疫原を注射 ( 例えば皮下又は筋肉内注射 ) することにより産生される。一般に、免疫原は、標的抗原に対して比較的親和性が高い抗体の高力価の産生を誘導するはずである。

30

## 【 0 0 9 5 】

必要に応じて、当技術分野で周知の結合技術により、内在性抗原 ( 即ち関心のある検体 ) を担体タンパク質に結合させ得る。

## 【 0 0 9 6 】

一般に使用される担体には、キーホールリンペットヘモシアニン ( K L H )、サイログロブリン、ウシ血清アルブミン ( B S A ) 及び破傷風トキソイドが含まれる。次に、動物に免疫付与するために、この結合物を使用する。

## 【 0 0 9 7 】

次に、動物から採取した血液試料から抗体を得る。ポリクローナル抗体を産生させるために使用される技術は、文献に広く記載されている ( 例えば、M e t h o d s o f E z y m o l o g y、「P r o d u c t i o n o f A n t i s e r a W i t h S m a l l D o s e s o f I m m u n o g e n : M u l t i p l e I n t r a d e r m a l I n j e c t i o n s」、L a n g o n e ら編 ( A c a d . P r e s s、1 9 8 1 ) を参照)。例えば標的抗原が結合されるマトリクスへの結合及びマトリクスからのその溶出により、動物により産生されるポリクローナル抗体をさらに精製することができる。当業者は、ポリクローナルならびにモノクローナル抗体の精製及び / 又は濃度について免疫学の技術分野で共通の様々な技術をよく知っている。例えば、C o l i g a n ら ( 1 9 9 1 ) U n i t 9、C u r r e n t P r o t o c o l s i n I m m u n o l o g y、W i l e y I n t e r s c i e n c e 参照。

40

50

## 【0098】

多くの適用に対して、モノクローナル抗体 (mAb) は、それらの結合特異性が一定であり、よく特徴付けられ得るので、好ましい。mAb を分泌するハイブリドーマの産生のために使用される一般的な方法は周知である (Kohler ら、Nature、256: 495 (1975) 参照)。簡潔に述べると、Kohler 及び Milstein により記載されるように、この技術は、メラノーマ、奇形腫又は子宮頸癌、神経膠腫又は肺癌の何れかの5名の個別の癌の患者 (外科標本から試料を得た。) の局所的排液リンパ節からリンパ球を単離し、細胞をプールし、細胞を SHFP-1 と融合させることを必要とした。癌細胞株に結合する抗体の産生についてハイブリドーマをスクリーニングした。関心のある mAb の基本反応パターンを決定するために、通常のスクリーニング技術 (酵素免疫測定法アッセイ又は「ELISA」など) を用いて、mAb 間の特異性の確認を行うことができる。

10

## 【0099】

本明細書中で使用される場合、「抗体」という用語は、抗原-結合抗体断片、例えば1本鎖抗体 (scFv 又はその他) を包含し、これは、既知のファージディスプレイ又は酵母ディスプレイ技術を用いて (即ち抗体のインビトロ親和性成熟により) 作製/選択することができる。細菌に感染するウイルス (バクテリオファージ又はファージ) の表面上で抗体断片を発現させることができることによって、単一の結合抗体断片を、例えば1010非結合クローンよりも大きいライブラリから単離することができるようになる。ファージの表面上で抗体断片を発現させるために (ファージディスプレイ)、ファージ表面タンパク質 (例えば pIII) をコードする遺伝子に抗体断片遺伝子を挿入し、ファージ表面上で抗体断片-pIII 融合タンパク質を提示させる (McCafferty ら (1990) Nature、348: 552-554 (1990); Hoogenboom ら、Nucleic Acids Res. 19: 4133-4137 (1991))。酵母ディスプレイ親和性成熟は、例えば、PCT WO2007/056507 (これに関するその教示に対してその全体において参照により本発明によって組み込まれる。) で考察されている。

20

## 【0100】

ある態様において、本開示の抗体は、宿主細胞中の免疫グロブリン軽及び重鎖遺伝子の組み換え発現により調製することができる。抗体を組み換え発現させるために、軽及び重鎖が宿主細胞において発現され、好ましくは、宿主細胞が培養される培地に分泌されるように、抗体の免疫グロブリン軽及び重鎖をコードする核酸分子を担う1以上の組み換え発現ベクターを宿主細胞に遺伝子移入し、その培地から抗体を回収することができる。 Sambrook、Fritsch 及び Maniatis (編)、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第二版、Cold Spring Harbor、New York (1989)、Ausbel、F.M. ら (編) Current Protocols in Molecular Biology、Greene Publishing Associates (1989) 及び米国特許第4,816,397号に記載のものなど、抗体重及び軽鎖遺伝子を得て、これらの遺伝子を組み換え発現ベクターに組み込み、宿主細胞にベクターを導入するために、標準的組み換え核酸 (DNA) 法を使用する。

30

40

## 【0101】

本開示の組み換え抗体を発現させるための好ましい哺乳動物宿主細胞には、CHO細胞 (例えば、R.J. Kaufman 及び P.A. Sharp、Mol. Biol. 159: 601-621 (1982) に記載のように、DHFR 選択可能マーカールとともに使用される Urlaub 及び Chasin、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220 (1980) に記載の dhfr-CHO 細胞を含む。) 、NSO 骨髄腫細胞、COS細胞、HEK-293細胞及びSP2細胞が含まれる。抗体遺伝子をコードする組み換え発現ベクターが哺乳動物宿主細胞に導入される場合、宿主細胞での抗体の発現を可能にするか又はより好ましくは宿主細胞が増殖させられる培養液中への抗

50

体の分泌を可能にするのに十分な時間、宿主細胞を培養することにより、抗体が産生される。標準的タンパク質精製法を用いて、培養液から抗体を回収することができる。

【0102】

宿主細胞はまた、Fab断片、F(ab')断片又はscFv分子など、インタクトな抗体の一部を産生させるために使用することもできる。上記手段における変更は本開示の範囲内であることを理解されたい。例えば、本開示の抗体の軽鎖又は重鎖の何れか（しかし両方ではない。）をコードする核酸分子を宿主細胞に遺伝子移入することが望ましいものであり得る。組み換えDNA技術はまた、少なくとも1つの免疫抑制剤において少なくとも1つのエピトープに結合するのに必要ではない軽及び重鎖の何れか又は両方をコードする核酸分子の一部又は全てを除去するためにも使用され得る。このような短縮型核酸分子から発現される分子もまた本開示の抗体により包含される。

10

【0103】

IV. 試料前処理のための方法及びアッセイ成分組成

本方法において使用される試料は、関心のある少なくとも1つのエピトープを含有する検体のソースである。試料は、対象からの試験試料であり得るか、又は対象由来でなくてもよいが、それにかかわらず、関心のあるエピトープを含有する検体を含む（例えば、スパイク試料又は対象以外の生体ソースからの試料、例えば水など）。試料には、（関心のある検体に加えて）以下に限定されないが、関心のある、抗体、抗原、ハプテン、ホルモン、薬物、酵素、受容体、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを含むその他の成分がさらに含まれ得る。例えば、試料は、タクロリムス又はシクロスポリン（例えば薬物そのもののソース、市販ソースなど）など、免疫抑制剤であり得る。あるいは、試料は、タクロリムス又はシクロスポリンを含有する対象から得られる全血試料であり得る。本開示による好ましい試料は、試験試料、特に全血、特に、例えば前処理試薬により、本明細書中に記載のように処理された全血である。

20

【0104】

ある一定の疎水性薬物検体（例えば免疫抑制剤）に対して1以上の前処理試薬を使用することができるが、その他に対しては必要とされない可能性がある。前処理試薬は、不均一系試薬又は均一系試薬であり得る。

【0105】

本開示による1以上の不均一系前処理試薬の使用により、前処理試薬は、試料中に存在する何らかの検体結合タンパク質を沈殿させる。このようなアッセイは、沈殿した検体結合タンパク質から第一の混合物の上清を分離することにより、第一の混合物からあらゆる検体結合タンパク質を除去することを含む。このようなアッセイにおいて、結合タンパク質が存在しない第一の混合物の上清が、アッセイの次の段階、抗体捕捉段階で使用される。

30

【0106】

1以上の均一系前処理試薬の使用ではこのような分離段階はない。抗体捕捉段階において、試験試料の第一の混合物全体及び1以上の前処理試薬を捕捉抗体と接触させる。このようなアッセイにおける1以上の前処理試薬は、通常、抗体捕捉段階の前又は抗体捕捉段階での抗体との接触中の何れかで、前処理した試験試料混合物中で希釈される。このような希釈にもかかわらず、抗体捕捉中、試験試料混合物において、1以上の前処理試薬（例えば、5Mメタノール及び/又は0.6Mエチレングリコール）のある一定量が依然として存在（又は残存）する。

40

【0107】

1以上の前処理試薬は、(a) 1以上の溶媒及び塩、(b) 1以上の溶媒、塩及び界面活性剤、(c) 界面活性剤又は(d) 界面活性剤及び塩を含む。溶媒には、メタノール及びエチレングリコールが含まれる。塩には、硫酸亜鉛及び塩化ナトリウムが含まれる。前処理試薬に対する好ましい界面活性剤はサポニンである。好ましい前処理試薬は、約70%メタノール、約20%エチレングリコール及び約50mM硫酸亜鉛を含む。

【0108】

50

前処理試薬の組成は、場合によっては、1以上の有機溶媒及び界面活性剤ならびに具体的なアッセイ法に必要とされる場合、その他の成分を含有する。従って、免疫アッセイのある実施形態において、1以上の前処理試薬は、実施例及び文献に記載のように、サポニン、メタノール、エチレングリコール及び硫酸亜鉛を含む。メタノール及びエチレングリコール（及び場合によっては硫酸亜鉛）の組み合わせなど、1以上の有機溶媒を含有するアッセイ前処理試薬もまた使用され得る。塩添加なし又は塩添加ありの何れかの、サポニンを含む前処理試薬を使用することができる。さらに、例えば、文献に記載のような（例えば、Yatscoffら、Abbott TDX Monoclonal Antibody Assay Evaluated for Measuring Cyclosporine in Whole Blood、Clin Chem、36：1969 - 1973（1990）及びWallemacqら、Evaluation of the New AxSYM（登録商標）Cyclosporine Assay：Comparison with TDX Monoclonal Whole Blood and EMIT Cyclosporine Assays、Clin Chem 45：432 - 435（1999）参照）及び/又は市販のような（Abbott Laboratories、Abbott Park、IL）、TDX、AxSYM（登録商標）及びARCHITECT（登録商標）分析装置でのアッセイにおける使用のための前処理試薬を使用することができる（特に、あるアッセイに対して最適化される場合）。

10

## 【0109】

試料前処理の好ましい方法は本明細書中に記載されている（例えば実施例において）。さらに、Abbottの米国特許第5,135,875号、欧州特許第0471293号、米国特許出願第60/878,017号（2006年12月29日出願）；及び米国特許出願第11/490624号（2006年6月21日出願）（前処理に関するその教示に対してその全体において参照により組み込まれる。）に記載のように前処理を行い得る。

20

## 【0110】

別の態様において、第二の混合物はアッセイ希釈剤を含む。好ましくは、アッセイ希釈剤は、診断用免疫アッセイの反応条件に悪影響を与えずに使用することができるものである。好ましくは、アッセイ希釈剤は、実質的に捕捉抗体の $K_D$ を変化させない。場合によっては、アッセイ希釈剤は、少なくとも1つの緩衝液、場合によっては塩、場合によっては界面活性剤及び/又はそれらの組み合わせを含む。また、アッセイ希釈剤は、特にあるアッセイに対して最適化される場合、市販のアッセイ、例えばARCHITECT（登録商標）に対するアッセイ又はTDX又はAxSYM（登録商標）（Abbott Laboratories、Abbott Park、IL）に対するアッセイ（例えばCsAアッセイ）のものであり得る。

30

## 【0111】

別の態様において、本明細書中での免疫アッセイで使用される第四の混合物は、界面活性剤をさらに含む。最適には、界面活性剤はTriton（登録商標）X-100である。

## 【0112】

本明細書中に記載の免疫アッセイ及び方法はまた、米国特許第5,089,424号及び同第5,006,309号に記載のような、及び例えば、以下に限定されないが、AbbottのARCHITECT（登録商標）、AxSYM（登録商標）、IMx（登録商標）、PRISM（登録商標）及びQuantum<sup>TM</sup> I I機器ならびにその他のプラットフォームを含め、Abbott Laboratories（Abbott Park、IL）により市販されているような、様々な自動化及び半自動化システムでの使用に適応させることができる（固相が微粒子を含むものを含む。）。さらに、本開示は、場合によっては、サンドイッチ免疫アッセイを行うための、Abbott Laboratories市販のポイントオブケア（I-STAT（登録商標））電気化学免疫アッセイシステムに対して適応可能である。免疫センサー及び、それらの製造方法及び使い捨て試験装

40

50

置での操作は、例えば、米国特許第5,063,081号、米国特許出願第2003/0170881号、米国特許出願第2004/0018577号、米国特許出願第2005/0054078号及び米国特許出願第2006/0160164号(上記内容に関するそれらの教示に対して参照によりそれらの全体において組み込まれる。)に記載されている。

#### 【0113】

##### V. キット

本開示はまた、試験試料中の関心のある検体(例えば代謝し、1以上の交差反応性代謝産物を形成する疎水性薬物)の存在を検出するためのキットも目論む。このようなキットは、本明細書中に記載の抗体の1以上を含み得る。より具体的には、本キットは、場合によっては、(1)検体に対するものより約10倍から約1000倍高い、交差反応性代謝産物に対する $K_D$ を有する少なくとも1つの抗体及び(2)免疫アッセイを行うための1以上の説明書を含有し得る。捕捉抗体として、検出抗体として、又は捕捉抗体及び検出抗体の両方として、このような試験キット中に本開示の抗体が含まれ得る。あるいは、検出のためにトレーサーを使用することができる。何らかの適切な校正物質又は対照が本キットに含まれ得る(例えばシクロスポリンアッセイに対するシクロスポリン校正物質)。場合によっては、本キットはまた、少なくとも1つの試料回収チューブも含有し得る。場合によっては、本キットはまた少なくとも1つの前処理試薬も含有し得る。

#### 【0114】

このようにして、本開示は、本開示による免疫アッセイを含む、診断用キット及びクオリティィーコントロールキットも提供する。場合によっては、市販のプラットフォームでの使用に対して、本発明の、アッセイ、キット及びキット成分が最適化される(例えば、Abbott Laboratories、Abbott Park、ILの、PRISM(登録商標)、ASYM(登録商標)、ARCHITECT(登録商標)及びEIA(Bead)プラットフォームならびにその他の市販及び/又はインビトロ診断用アッセイでの免疫アッセイ)。さらに、アッセイ、キット及びキット成分は、その他の方式、例えば、電気化学的又はその他の携帯用又はポイントオブケアアッセイシステムにおいて使用され得る。本開示は、例えば、TnI、CKMB及びBNPを含むいくつかの心臓マーカーに対するいくつかのサンドイッチ免疫アッセイを行う市販のAbbottポイントオブケア(I-STAT(登録商標)、Abbott Laboratories、Abbott Park、IL)電気化学的免疫アッセイ系に対して適用可能である。免疫センサー及び使い捨て試験装置においてそれら进行操作する方法は、例えば、米国特許出願第2003/0170881号、同第2004/0018577号、同第2005/0054078号及び同第2006/0160164号(参照により本明細書中に組み込まれる。)に記載されている。電気化学的及び免疫センサーのその他のタイプの製造のさらなる背景は、米国特許第5,063,081号(これも上記のものに関するその教示に対して参照により組み込まれる。)で見出される。

#### 【0115】

場合によっては、キットは、クオリティィーコントロール試薬を含む(例えば、感度パネル、校正物質及び陽性対照)。クオリティィーコントロール試薬の調製は、当技術分野で周知であり、例えば、様々な免疫診断用生成物の挿入シートに記載されている。

#### 【0116】

本キットは、場合によっては、緩衝液、塩、酵素、酵素補因子、基質、検出試薬など、診断用アッセイを行うか又はクオリティィーコントロール評価を促進するのに必要とされるその他の試薬を含み得る。試験試料(例えば前処理試薬)の単離及び/又は処理のための緩衝液及び溶液などのその他の成分もまた本キットに含まれ得る。本キットは、さらに、1以上のその他の対照を含み得る。本キットの成分の1以上は凍結乾燥され得、本キットは、凍結乾燥成分の再構成に適切な試薬をさらに含み得る。あるいは、キット成分は、即時使用の形態で提供され得る。

#### 【0117】

10

20

30

40

50

本キットの様々な成分は、場合によっては、適切な容器中で提供される。上記で示されるように、容器の1以上はマイクロタイプレートであり得る。しかし、好ましくは、本キットは、市販の自動化アッセイでの使用に対して提供される。本キットは、さらに、試料を保持するか又は保管するための容器を含み得る（例えば、血液又は尿試料に対する容器又はカートリッジ）。必要に応じて、本キットはまた、場合によっては、反応槽、混合槽及び試薬もしくは試験試料の調製を促進するその他の成分も含有し得る。本キットはまた、シリンジ、ピペット、鉗子、計量スプーンなど、試験試料の採取を促進するための1以上の機器も含み得る。

【0118】

本キットは、さらに、場合によっては、使用説明書を含み得、これは、紙の形態又はディスク、CD、DVDなどのコンピュータ読み取り可能な形態で提供され得る。

10

【0119】

ここで例として、以下に限定されないが、本開示の実施例を与える。

【実施例1】

【0120】

様々なアッセイ方式の検討

この実施例は、1段階又は2段階方式を含み、洗浄段階があるか又はないかの何れかの様々な方式で、磁性微粒子に連結されたトレーサー（アクリジニル化CsA）、抗体（抗-CsA抗体）及びアッセイ希釈剤（緩衝液及び塩化ナトリウム）とCsA血液抽出物を組み合わせる免疫アッセイにおいて、代謝産物交差反応性を比較する。

20

【0121】

この実施例に記載の全4種類のアッセイ方式（即ち方式1-4）に対して、水性サポニン試薬100µLと血液試料（代謝産物添加あり又は添加なし）200µLを混合し、次いで1.5mLプラスチック遠心管中でメタノール/エチレングリコール/硫酸亜鉛試薬400µLを混合することにより、血液試料からのCsAの抽出を行った。この混合物を5-10秒間激しくボルテックス処理し、得られた懸濁液を13,000rpmで5分間遠心し、沈殿物を沈降させた。自動化ARCHITECT（登録商標）i2000分析装置（Abbott Laboratories、Abbott Park、Illinois）でCsAについて上清をアッセイした。

【0122】

本明細書中及び続く実施例で使用されるその他の物質及び方法は次のとおりであった。

30

【0123】

抗体。ヤギ抗-マウス（GAM）抗体被覆磁性微粒子上にARCHITECT（登録商標）アッセイで使用される抗-CsAモノクローナル抗体を固定化する。Abbott TDx及びASYM（登録商標）アッセイ（Abbott Laboratories、Abbott Park、Illinois）において、可溶性形態で同じ抗-CsA抗体が使用される。GAM微粒子に可溶性マウス抗-CsA抗体が直接添加され、抗体介在結合により非共有結合が起こる。GAM抗体は磁性ポリスチレン微粒子に受動的に結合させられ、次いで、粒子上に抗体を固定するために、水溶性カルボジイミドで処理される。当技術分野での通常の技術を用いてGAM粒子を調製することができる。

40

【0124】

トレーサー。アッセイで使用されるCsA-アクリジニウムトレーサーは、免疫アッセイのARCHITECT（登録商標）ファミリーで使用されるアクリジニウム化学に基づく。アクリジニウム標識は、TDx及びASYM（登録商標）トレーサーにおけるフルオレセイン標識のように、CsA分子の同じ位置に共有結合される（例えば、欧州特許出願0283801A2に記載されているように、しかし、フルオレセインではなく、アクリジニウム標識が使用されるものとは異なる；また、Mattinglyら、Chemiluminescent N-sulfonylacridinium-9-Carboxamides and their Application in Clinical Assays（化学発光スルホニルアクリジニウム-9-カルボキサミド及び臨

50

床アッセイでのそれらの適用) *Luminescence Biotechnology: Instruments and Applications* (Dyke K.V. 編、CRC Press、Boca Raton) 2002; pp. 77 - 105も参照。)

【0125】

アッセイ希釈剤。次の実験のためのアッセイ希釈剤は、免疫アッセイのARCHITECT (登録商標) ファミリーで使用されるもの (即ちMES緩衝液、NaCl及び保存料を含有する。) である。

【0126】

CsA較正物質及び対照。較正において使用されるCsAは、米国薬局方 (USP、Rockville, MD) から購入されるUSPグレードである。ABT (American Biological Technologies, Inc., Seguin, Texas 78155) からの処理済のヒト全血マトリクスにおいて、較正物質を調製する。有機溶媒中でCsAを溶解させ、重量測定法で血液マトリクスに添加する。較正物質濃度は、0 ng/mL CsA (較正物質A又は「CAL A」)、40 ng/mL CsA (較正物質B又は「CAL B」)、150 ng/mL CsA (較正物質C又は「CAL C」)、400 ng/mL CsA (較正物質D又は「CAL D」)、800 ng/mL CsA (較正物質E又は「CAL E」) 及び1500 ng/mL CsA (較正物質F又は「CAL F」) である。高精製度CsAを用いる一次標準に対して濃度をチェックする。凍結乾燥ヒト血液マトリクス対照は、BioRad Laboratories、Clinical Diagnostics、4000 Alfred Nobel Drive、Hercules、CA 94547から購入した。

【0127】

検体及び検定試料。Tronto General Hospitalより、移植患者からの血液検体を得た。この病院の倫理手順に従い、検体に数字で番号を付し、患者情報と関連がないようにした。使用前に最長1ヵ月間、血液検体を冷蔵保存した。凍結試料を-20で無期限に保存した。

【0128】

David W Holt教授、Analytical Services International Ltd.、5 Lavender Close、Chaldon Common、CATERHAM、CR3 5DW、UKから、移植薬物に対して臨床検査室により使用された既に試験済みの検定試料を得た。これらの試料は、凍結患者検体のプールのアリコート及びスパイクした薬物不含の血液であり、これらは、実験室で4分割して凍結されて供給される。様々なアッセイ法により測定されたCsA濃度は、プロフィールサーベイに対して報告され、<http://www.bioanalyticals.co.uk/html>のインターネットで公表された、実験室間での平均の結果である。

【0129】

免疫抑制剤濃度。ARCHITECT (登録商標) の光学系、化学発光反応により発光される光において光子計数を行う光電子増倍管 (PMT) を基本的に使用して、CsA濃度を計算する。化学発光反応により生成される光の量は、反応混合物中に存在するアクリジニウムトレーサーの量に比例し、CsAの量に反比例する。ARCHITECT (登録商標) 系での光測定の単位に対する名称であるRLU (相対光単位) でシグナルを測定する。

【0130】

相対光単位という用語は、ある一定のアクリジニウム量に対する光子計数の関係から来る。各光学モジュールは、一連のアクリジニウム標準物質を用いて較正される。化学発光反応が起こる際、光が発光され、3秒間、光子を測定する。PMTは、計数される光子をデジタルシグナルに変換し、次いで、これが処理のためのサーキットボードに送信される。光学サーキットボードは、PMTからのデジタルシグナルを計数される光子 (これは、

10

20

30

40

50

同じく存在するアクリジニウムの量に比例する。)に比例するアナログシグナルに変換する。次に、RLU値を出すためにこのアナログシグナルをさらに処理する。この関係は、光学モジュールの較正のための標準物質を生成させるために確立されたが、この場合、様々なアクリジニウム標準物質は、それらに割り当てられたRLU値を有する。つまり、RLU単位それ自身が任意である一方、アクリジニウムのある一定量に比例する(即ち相対的)。

【0131】

%CV。%変動計数(CV)は、平均検体濃度で割って100を掛ける、測定値の標準偏差(SD)として定義される。

【0132】

B/A及びF/A比。B/A及びF/Aは、較正物質A、B及びFのためのARCHITECT(登録商標)分析装置により提供されるRLUシグナルの比である。

【0133】

%交差反応性。スパイクした交差反応性代謝産物の存在下及び非存在下での測定CsA濃度に基づき、交差反応性の結果を調べた。%交差反応性を次のように計算した：

(スパイク試料中のng/mL CsA - 対照中のng/mL CsA) / (ng/mL 代謝産物) × 100。

【0134】

代謝産物スパイク実験。200ng/mLのCsA及び代謝産物AM1又はAM9の0(「対照」)又は1000ng/mLの何れか(インビボ産生代謝産物混合物からAbbott Laboratories、Abbott Park、ILで精製)を血液試料に添加した。

【0135】

K<sub>D</sub>測定。タンパク質の様々な濃度を含有する溶液中のフルオレセイン標識CsAトレーサーの蛍光偏光を測定することにより、ヒトアルブミン、ウシガンマグロブリン及び抗-CsA抗体に対するCsAの結合定数を調べた。測定を行い、Tetin、S.Y.及びHazlett、T.L.、Studies of Antibody-Hapten Interactions. Methods 20:341-361(2000)の、Optical Spectroscopyに記載の方法によりK<sub>D</sub>を計算した。Celliance Corporation、Norcross、Georgia 30092 U.S.A.から精製ヒトアルブミン及びガンマグロブリンを購入した。Porous 50A Perfusion Chromatography Bulk Media for Protein A Affinity Chromatography、Operating Instructionsに記載のように、Abbott LaboratoriesでプロテインAアフィニティークロマトグラフィーにより抗-CsA抗体を精製した。PerSeptive Biosystems. Rev. 2、1994、pp. 1-7。

【0136】

FPIA試験法。包装挿入物に記載の手段を使用して、検体及び較正物質においてAbbott TDxモノクローナル及びAxSYM(登録商標)免疫アッセイを測定した。サポニン、有機溶媒及び硫酸亜鉛の組み合わせを用いて検体を抽出し、沈殿タンパク質を遠心して沈降させた。アッセイ試薬(トレーサー、抗体及びアッセイ希釈剤)を用いて、透明な上清を試験した。しかし、実施例4において、TDx及びAxSYM(登録商標)の様々な抽出(前処理)法を用いたが、全ての結果はARCHITECT(登録商標)において生成された。

【0137】

その他のARCHITECT(登録商標)試薬。記載の実験のために使用されるARCHITECT(登録商標)洗浄緩衝液、プレトリガー及びトリガー溶液は、この機器で行われるアッセイに対して標準的である。

【0138】

10

20

30

40

50

試験される4種類のアッセイ方式(方式1、方式2、方式3及び方式4)を以下で開示する。

【0139】

方式1 - 1段階アッセイ方式における直接トレーサー添加。この方式は、第一段階においてトレーサー及び抗体試薬とCsA血液抽出物を組み合わせ、次いで希釈剤添加及び洗浄段階を行う。次のことにより、自動化ARCHITECT(登録商標)i2000分析装置においてアッセイ方式1を行った：

1. 試料抽出物15 $\mu$ Lと、トレーサー90 $\mu$ L及びヤギ抗-マウス抗体で被覆された微粒子50 $\mu$ L(Sigma, St. Louis, Missouriより)及びマウス抗-CsA抗体(TDx及びASYM(登録商標)機器(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)における蛍光偏向免疫アッセイでの使用のために精製された抗体を用いて)を混合。

2. 抗体におけるCsA結合部位に対して、CsA、CsA代謝産物とアクリジニウム-CsAトレーサーの間で競合を引き起こすために、33-38で18分間、反応混合物を温置。

3. 微粒子/トレーサー/試料反応混合物とアッセイ希釈剤50 $\mu$ Lを混合し、さらに33-38で4分間温置。

4. 磁力により反応混合物から微粒子を分離し、トレーサー及びその他の液体反応物を除去するために、ARCHITECT(登録商標)洗浄緩衝液でそれらを洗浄。

5. 捕捉されたアクリジニウム-CsA標識を発光させるために、プレトリガー(酸性溶液)及びトリガー(塩基性溶液)を添加し、RLUとして機器によりこれを測定。

6. CsA標準物質を用いたアッセイ較正操作中に生成されるRLUと、未知の試料からのRLUシグナルを比較。

7. ARCHITECT(登録商標)数学的方法を用いて未知の試料に対してCsA濃度を計算。

【0140】

方式2 - 2段階アッセイ方式における直接トレーサー添加。この方式は、第一段階においてトレーサー及び抗体試薬とCsA血液抽出物を組み合わせ、次いで洗浄段階を行う。これに続いて、アッセイ希釈剤温置段階及び第二の洗浄段階を行う。次のことにより、自動化ARCHITECT(登録商標)i2000分析装置においてアッセイ方式2を行った：

1. 方式1に対して上記で述べたトレーサー90 $\mu$ L及び微粒子50 $\mu$ Lと、試料抽出物75 $\mu$ Lを混合。

2. 抗体におけるCsA結合部位に対して、CsA、CsA代謝産物とアクリジニウム-CsAトレーサーの間で競合を引き起こすために、33-38で18分間、反応混合物を温置。

3. 反抗混合物から磁力により微粒子を分離し、トレーサー及び反応物を除去するために、ARCHITECT(登録商標)洗浄緩衝液でそれらを洗浄。

4. アッセイ希釈剤50 $\mu$ L中で洗浄した粒子を再懸濁し、さらに33-38で4分間温置。

5. 磁力により反応混合物から微粒子を分離し、液体反応物を除去するために、ARCHITECT(登録商標)洗浄緩衝液でそれらを再び洗浄。

6. 試料及び標準物質から測定されるRLUシグナルを比較し、方式1に対して記載のように、CsA濃度を測定。

【0141】

方式3 - 1段階アッセイ方式での遅延トレーサー添加。この方式は、トレーサー及びアッセイ希釈剤が交換されることを除き、方式1に対するものと同様である。このようにして、最初の温置(段階1)でアッセイ希釈剤90 $\mu$ Lを添加し、第二の温置(段階3)でトレーサー50 $\mu$ Lを添加する。このアッセイは、方式1におけるように1回の洗浄段階を使用する。自動化ARCHITECT(登録商標)i2000分析装置においてアッセ

イ方式3を行った。

【0142】

方式4 - 2段階アッセイ方式での遅延トレーサー添加。この方式は、トレーサー及びアッセイ希釈剤が交換されることを除き、方式2に対するものと同様である。このようにして、最初の温置（段階1）でアッセイ希釈剤90 $\mu$ Lを添加し、第二の温置（段階3）でトレーサー50 $\mu$ Lを添加する。このアッセイは、2回の別個の洗浄段階を使用する。自動化ARCHITECT（登録商標）i2000分析装置においてアッセイ方式4を行った。

【0143】

トレーサー、代謝産物及び抗体結合部位の濃度に関して、様々なアッセイ方式を表1でまとめる。2つの抗体結合部位があるので、結合部位濃度は抗体濃度の2倍である。抽出された試料はサポニン界面活性剤（Desert King, Lexington, KY）を含有するので、トレーサーは化学的に還元されたTriton（登録商標）X-100（「TX100」、Sigma, St Louis, MOより）を含有する。これらの界面活性剤の有無もまた表1に記す。界面活性剤は、CsA、代謝産物及びトレーサーなどの疎水性化合物を可溶化することに関与する。これらもまた、界面活性剤において封鎖されるものに対して溶液中で遊離しているこれらの成分の量を調節することにおいて重要な役割を果たし得る。サポニンは80 - 300 $\mu$ Mの濃度で存在し、TX100は、140 - 1900 $\mu$ Mの範囲である。これらの濃度は、両者とも、界面活性剤に対する臨界ミセル濃度を優に上回り、そのため、サポニン及びTX100がミセル形態で存在することが予想される。

【0144】

【表1】

表1

		第一の温置	第二の温置	第一の温置	第二の温置
		方式1 1段階		方式2 2段階	
トレーサー添加	抗体、nM	0.32	0.24	0.23	1.0
	代謝産物、nM	23	17	83	<1.0
第一の温置段階	トレーサー、nM	0.29	0.22	0.21	<0.2
	サポニン	あり	あり	あり	なし
	Triton <sup>(R)</sup> X-100	あり	あり	あり	なし
		方式3 1段階		方式4 2段階	
トレーサー添加	抗体、nM	0.32	0.24	0.23	1.0
	代謝産物nM	23	17	83	<1.0
第二の温置まで遅延	トレーサー、nM	なし	0.12	なし	0.50
	サポニン	あり	あり	あり	なし
	Triton <sup>(R)</sup> X-100	なし	あり	なし	あり

【0145】

様々なアッセイ方式で観察される交差反応性の値を表2でまとめる。これらの結果により、アッセイ方式4の使用により観察される交差反応性の低下が確認される。

【0146】

【表 2】

表 2

交差反応性	方式 1 1 段階		方式 2 2 段階	
	AM 1	8 %	AM 1	8 %
	AM 9	2 2 %	AM 9	1 7 %
交差反応性	方式 3 1 段階		方式 4 2 段階	
	AM 1	4 5 %	AM 1	< 1 %
	AM 9	8 8 %	AM 9	< 1 %

10

## 【実施例 2】

## 【0147】

ARCHITECT (登録商標) トレーサー試薬における界面活性剤の影響

この実施例は、トレーサーを妨害するために選択される界面活性剤が、曲線形態及びアッセイ精度の両方に影響を与えることを示す。

## 【0148】

0.05% 濃度の様々な界面活性剤を含有するトレーサーを用いて、実施例 1、方式 4 (2 段階アッセイ方式における遅延トレーサー添加) でのようにアッセイを行った。Sigma Chemical Co (St. Louis, MO) から界面活性剤を購入した。

20

## 【0149】

これらの実験の結果を表 3 で示すが、これは、% CV として表される、RLU シグナル、曲線形態 (B/A 及び F/A RLU 比) 及び平均校正物質濃度精度 (変動係数、「CV」) をまとめる。低 B/A 比は最大アッセイ感度と相関する。高 F/A 比は、プラスチック反応容器及びポリスチレン微粒子の表面に対する高トレーサー非特異的結合 (NSB) に相関する。シグナル対ノイズ比を改善することにより、低 NSB がアッセイ精度にとって有利であると推測することは理に適っている。

## 【0150】

## 【表 3】

30

表 3

	ng/mL	Triton® X-100	Triton® X-114	Igepal CA-520	Triton® SP-135	Tetronic 1107	Brij 700
<u>CAL A</u>	0	736,795	637,497	688,088	480,075	694,375	351,879
<u>CAL B</u>	40	440,071	415,282	476,408	340,997	519,584	268,978
<u>CAL C</u>	150	251,156	257,303	321,951	210,246	401,285	216,236
<u>CAL D</u>	400	145,546	149,332	215,980	129,438	296,499	173,188
<u>CAL E</u>	800	96,478	105,218	148,882	95,797	238,658	150,633
<u>CAL F</u>	1500	70,707	74,121	106,614	78,521	203,810	137,096
	<u>% CV</u>	5.7	7.7	6.5	9.8	12.6	29.6
	<u>B/A</u>	0.60	0.65	0.69	0.71	0.75	0.76
	<u>F/A</u>	0.10	0.12	0.15	0.16	0.29	0.39

40

## 【0151】

表 3 から見られ得るように、B/A 及び F/A 比 (NSB 上昇の指標) の低い方から順に界面活性剤を列挙する。これらの比が増大するにつれて、不正確になる明らかな傾向が

50

ある。また、界面活性剤、T r i t o n (登録商標) S P - 1 3 5 及び B r i j 7 0 0 の2つにより、C a l A アッセイシグナルが顕著に低下する。T e t r o n i c 1 1 0 7 及び B r i j 7 0 0 の F / A が最大であった。T r i t o n (登録商標) X - 1 0 0 の量が少ないと、精度が最大となり、B / A 及び F / A が最低になることが分かった。従って、次の実施例で行われる全ての実験は、トレーサー界面活性剤として T X 1 0 0 を使用した。

【実施例 3】

【0152】

アッセイ性能における低 T r i t o n (登録商標) X - 1 0 0 の影響

この実施例は、好ましい界面活性剤 ( T X 1 0 0 ) を用いて、界面活性剤濃度がどのように性能に影響を及ぼすかを示す。実施例 1、方式 4 ( 2 段階アッセイ方式における遅延トレーサー添加 ) でのように、本アッセイを行った。このデータから、R L U シグナル及び精度の両方における強い影響が示され、これを表 4 で示し、図 5 及び 6 でグラフにより示す。

【0153】

【表 4】

表 4

	ng/mL CsA	0.01%	0.02%	0.04%	0.08%	0.12%	0.15%	0.20%	0.30%
CAL A	0	1,258,564	1,094,498	930,200	816,422	707,907	599,404	542,550	445,513
CAL B	40	845,584	686,082	572,351	509,191	425,507	372,974	365,371	314,560
CAL C	150	596,919	432,876	339,755	315,198	256,571	231,313	226,640	222,492
CAL D	400	430,981	286,878	210,908	189,764	160,982	159,249	156,030	145,701
CAL E	800	368,695	217,101	151,063	129,044	103,839	107,922	103,559	100,450
CAL F	1500	322,522	172,874	117,797	91,954	73,614	72,903	70,136	66,961
	%CVs	13.6	6.5	7.5	4.4	4.4	5.2	5.1	5.2
	B/A	0.67	0.63	0.62	0.62	0.60	0.62	0.67	0.71
	F/A	0.26	0.16	0.13	0.11	0.10	0.12	0.13	0.15

【0154】

表 4 から見られ得るように、T X 1 0 0 により、0 . 0 1 % から 0 . 1 2 % の範囲で、R L U シグナル及びアッセイ % C V が劇的に低下する。より高い範囲において、影響は横這いになる ( 図 5 及び 6 参照 ) 。従って、次の実施例で行われる全ての実験は、0 . 1 2 % T X 1 0 0 濃度を使用した。

【実施例 4】

【0155】

抽出段階における様々な界面活性剤組成の影響

この実施例は、全血前処理段階に存在する界面活性剤に対する修飾 ( 抽出と呼ばれ、血液抽出物を回収。 ) が較正曲線の形態に顕著な影響を及ぼし得ることを示す。

【0156】

これらの実験に対して、免疫アッセイ、即ち、微粒子酵素免疫アッセイ、F P I A 及びイオン捕捉免疫アッセイを処理するための、3 種類の個別の分析技術を有する、A b b o t t L a b o r a t o r i e s ( A b b o t t P a r k , I L ) の 3 種類の異なる機器 : ( 1 ) 上述のような A R C H L T E C T (登録商標) ( 「 A R C H 」 ) ; ( 2 ) T D x ( 「 T D x 」 ) 、患者における血清薬物濃度を測定するために蛍光偏向免疫アッセイ ( F P I A ) を使用するシステム ; 及び ( 3 ) A x S Y M (登録商標) 又は A x S Y M (登録商標) P l u s (まとめて「 A X S 」と呼ばれる。 ) に対してアッセイで使用される血液前処理段階に基づき、3 種類の異なる前処理法を使用した。

【0157】

この 3 種類の前処理法を用いた抽出の前後の成分組成を下記表 5 で示す。

【0158】

【表5】

表5

試料前処理	試薬及び試料組成			抽出した試料の組成		
	TDx	ARCH	AXS	TDx	ARCH	AXS
体積比						
(B/S/P)	150/ 50/ 300	200/ 100/ 400	150/ 50/ 300	NQ <sup>1</sup>	NQ <sup>1</sup>	NQ <sup>1</sup>
血液試料						
Ca I F, ng /mL	1500	1500	800	450	429	240
%CsA	100%	100%	100%	30%	29%	30%
可溶化						
%サポニン	2.0	1.0	0.2	0.20	0.14	0.02
%ターゲットール	1.9	なし	0.2	0.19	なし	0.02
沈殿						
%メタノール	50	70	90	30	40	54
%エチレングリコ ール	30	20	10	18	11	6
mm硫酸亜鉛	60	50	60	36	29	36

「NQ」という表示は、これが定量されなかったことを示す。

## 【0159】

この3種類の前処理法は組成が非常に類似しているが、抽出された試料中の%メタノール及びエチレングリコールが異なる。表5において、TDxからARCHITECT（登録商標）からAXSYM（登録商標）へとメタノールが増加するが、エチレングリコールは減少する。さらに、TDx及びAXSYM（登録商標）可溶化試薬はターゲットールを含有するが、これはARCHITECT（登録商標）前処理段階には存在しない。

## 【0160】

3セットのCsA較正物質においてこれらの3種類の抽出法を独立して使用し、得られた抽出物を全てARCHITECT（登録商標）分析装置にかけた。下記で表6で示され、図7でグラフにより示される結果を用いて、RLUシグナル、曲線比率及び平均%CVに関してARCHITECT（登録商標）CsAにおける前処理試薬の影響を評価した。

## 【0161】

10

20

30

【表6】

表6

<u>CsA</u> ng/mL	<u>RLUs</u>		
	<u>TDx</u>	<u>ARCH</u>	<u>AXS</u>
0	908,888	913,203	871,849
40	858,303	588,619	742,037
150	759,988	349,284	600,800
400	650,811	211,024	469,253
800	566,833	142,161	418,226
1,500	497,804	103,395	309,611
<u>%CV</u>	5.4	4.3	7.8
<u>B/A</u>	0.94	0.64	0.85
<u>F/A</u>	0.55	0.11	0.36

10

## 【0162】

図7で見られ得るように、曲線形態が最悪である曲線は、TDx前処理条件からの結果であり、ASYM（登録商標）前処理条件はTDxとARCHITECT（登録商標）との中間である。この変化は、有機溶媒又はサポニン濃度と相関せず、反応に移されるCsA量（総血液CsAの29%から30%である。）とも相関しない（表5参照）。しかし、この観察は、前処理段階で使用される可溶化剤中に存在するターゲットの量と相関する。ターゲットが、NSBを増加させ、CsA較正物質（この場合、較正物質Fは1500ng/mL CsAを有する。）RLUSIGNALを上昇させる可能性は低いと思われるが、それは、精度が、表3におけるその他の界面活性剤の例と同じように劇的には変化しないからである。サポニン及びターゲットは両者ともトレーサー-TX100試薬が添加される前に洗浄段階により除去されるので、ターゲットはトレーサー温置段階に影響はないはずである。

20

## 【0163】

最後の実現性はより可能性が高いと思われるが、即ち、サポニンよりも強くターゲットが非特異的にCsAに結合される、ということである。CsAは水に非常に難容である分子であるので、大量の水性溶媒においてよりもむしろ、界面活性剤ミセルの疎水性内部で選択的に封鎖されるであろうことを提案することは理に適っている。さらに、抗体が遊離CsAと平衡であり、結合段階での総CsAとは平衡ではないので、界面活性剤との結合平衡によって遊離CsAが低下する場合、平衡状態において抗体に結合する総CsA%は低下する。トレーサー及びCsAと一緒に存在する場合及び界面活性剤により同様の割合で結合される場合、これは定量的問題ではない。これは、表1で概説される3種類のアッセイ方式、即ちアッセイ方式1-3で述べられる状況である。一方、第四の例（即ち代謝産物交差反応性が低いアッセイ方式4）において、CsA及びトレーサー結合段階は非常に異なる界面活性剤環境で起こる。

30

40

## 【実施例5】

## 【0164】

別の界面活性剤を用いた曲線形態変化の反復

この実施例は、ターゲットの影響が界面活性剤特異的ではないか又は血液からの異なった抽出に関連しないことを示す。

## 【0165】

この実施例において、サポニン界面活性剤のみを用いて抽出を行った。第一の抗体結合段階中に（しかし、抽出中ではなく）TX100を導入するために、Triton（登録商標）X-100をアッセイ希釈剤に添加した。アッセイ希釈剤中0.05%TX100

50

の存在下及び非存在下で較正曲線を比較した。実験の結果を図8で示す。

【0166】

図8から見られ得るように、TX100の添加により、精度を顕著に変化させることなく較正曲線が上方に移動した(即ちTX100なしでのCVは5.4%であり、一方TX100存在下では6.8%であった。)。この観察は、第一のアッセイ温置中に生じ、従って抗体に結合するために利用可能な遊離CsAの量が減少することによる、TX100によるCsAのさらなる結合と一致する。この知見により、これが、サポニンのみで行われた抽出段階に関連しないことが確認される。

【実施例6】

【0167】

低代謝産物交差反応性を達成することに対する理論的根拠

この実施例は、アッセイ成分の相対濃度を示し、交差反応性を決定する結合平衡のいくつかを推定する。

【0168】

低交差反応性アッセイの第一及び第二の段階における活性成分のリストを下記表7で示す。

【0169】

【表7】

表7

	第一段階	第二段階
反応体積	215 $\mu$ L	50 $\mu$ L
成分	濃度	
メタノール	14%	なし
サポニン	3mM	なし
mAb結合部位	0.2 nM	1 nM
200 ng/mL CsA	17 nM	~0.5 nM
1000 ng/mL 代謝産物	83 nM	~2.5 nM
CsA-Actトレーサー	なし	0.5 nM
Tx-100	なし	2mM
界面活性剤/CsA比	~200,000	~2,000,000
抗体/CsA比	0.01	~2

【0170】

両段階でCsAを上回る大量の界面活性剤があることが表7から見る事ができる。これにより、抗体結合及び競合反応中、界面活性剤ミセルが疎水性の低分子(CsA、代謝産物、トレーサー)を封鎖し、それらを溶液中に保持することができるようになる。第一段階において、CsAの約1%のみが、存在する抗体の少量に結合し得る。これから、抗体が、界面活性剤に結合されないほんのわずかのCsAと平衡状態にあり、CsAの約99%が第一の洗浄段階で除去されることが示唆される。これにより、トレーサー競合段階に加わることができるCsAは非常に少量となる。この段階で、この低CsA濃度は、抗体とのその平衡解離定数( $K_D$ )に近い。 $K_D$ は直接測定していないが、CsA-フルオレセントトレーサーの結合を測定することにより、約0.5 nMであると推定した。これらの実験に関して、トレーサー $K_D$ はCsA  $K_D$ の桁内であることが推測される。代謝産物に対する $K_D$ は正確には分かっていないが、代謝産物%交差反応性の計算値がわずかに約7-20%の範囲であるので、代謝産物 $K_D$ は桁数大きいはずである。それらの結合パートナーに対する、CsA、代謝産物及びトレーサーに対する結合定数全ては分からないので、結合平衡に対する厳密解を見つけ出すことはできないが推定することはできる。このような推定を表8で示す。

【0171】

【表 8】

表 8

第一の温置段階	濃度	$K_D$	%結合
代謝産物	83 nM	750 nM	10%
シクロスポリン	17 nM	0.5 nM	97%
比	5	1500	~10%
第二の温置段階	濃度	$K_D$	%結合
代謝産物	2.5 nM	500 nM	0.3%
CsA	0.5 nM	0.5 nM	50%
比	5	1500	0.6%

10

## 【0172】

この実施例における実験に関して、代謝産物濃度が1000 ng/mLであり、CsAに対して5倍濃度過剰であると推定された。代謝産物に対する $K_D$ は、CsAに対する $K_D$ よりも1500倍大きいことも推定された。表8における%結合計算値は、過剰な抗体がある平衡条件下で結合される代謝産物又はCsAの割合を表す。アッセイ状況において、言うまでもなく、抗体は非常に低く、代謝産物及びCsAの相対結合は、%結合数の比としてのみ推定することが可能である。第一及び第二段階における、 $K_D$ 及びCsA及び代謝産物濃度の差が大きいため、代謝産物/CsAの相対結合はおよそ10%から1%未満まで下落する。標識したトレーサーを用いて競合によってこの異なる結合が測定される場合、代謝産物交差反応性の大きな違いが見られるはずである。実際、表1に記載の4種類のアッセイ方式例のうち3種類（即ち方式1-3）におけるトレーサー競合は、トレーサー及び抗体に対して高いCsA及び代謝産物濃度の条件下で起こる。これらの3種類のアッセイ方式はまた、どのアッセイ成分が添加されるか及びどの順序かに依存して、顕著な代謝産物交差反応性も示す。トレーサー反応が低いCsA、代謝産物及び抗体濃度で起こるアッセイ方式のみが、低交差反応性のアッセイである（即ち方式4）。このようにして、この実施例及び先行する実施例は、アッセイ方式4の低交差反応性を説明するための論理的根拠を提供する。

20

## 【実施例7】

## 【0173】

## 交差反応性の比較

この実施例は、その他の市販のアッセイを用いた、本明細書中で述べられるARCHITECT（登録商標）CsA免疫アッセイの交差反応性比較を示す。

30

## 【0174】

300 ng/mL親CsAの存在下で、AMI（100 ng/mL）に対する交差反応性は、ASYM（登録商標）の場合は7%であり、CEDIAの場合は4%であり、EMITの場合は基本的に交差反応性はなかった。

## 【0175】

AM9（500 ng/mL）に対する交差反応性は、ASYM（登録商標）の場合は12.6%、CEDIAの場合は25%であり、EMITの場合は6%であった。HPLCとの比較から、心臓及び腎臓受容者において、~22%のEMIT及びCEDIAでの平均過大評価及び32%のASYM（登録商標）での過大評価が示された。最も困難な患者群である肝臓受容者において、CEDIA及びASYM（登録商標）CsAアッセイにより、HPLCと比較して、それぞれ43%及び47%の平均過大評価が示され、EMITは31%異なった（Schutzら、Cyclosporin whole blood immunoassays (ASYM（登録商標）、CEDIA及びEMIT): a critical overview of performance characteristics and comparison with HPLC. Clinical Chemistry 44:2158-2164 (1998) 参照)。

40

## 【0176】

50

200 ng/mLシクロスポリンの存在下でDade RxLFlex交差反応性を測定し、AM1(1000 ng/mL)に対して2-5%、AM9(1000 ng/mL)に対して2%、AM4n(1000 ng/mL)に対して3-6%、AM19(1000 ng/mL)に対して2-3%及びAM1c(1000 ng/mL)に対して1-2%であることが分かった。

【0177】

200 ng/mLシクロスポリンの存在下で、Abbott ARCHITECT(登録商標)の交差反応性を測定し、AM1(1000 ng/mL)に対して-0.23%、AM9(1000 ng/mL)に対して0.28%、AM4n(1000 ng/mL)に対して0.26%、AM19(1000 ng/mL)に対して-0.43%及びAM1c(1000 ng/mL)に対して0.41%であることが分かった。

10

【0178】

200 ng/mLシクロスポリンの存在下で、Abbott TDxの交差反応性を測定し、500 ng/mL AM1に対して6.7%、250 ng/mL AM9に対して19.4%であり、250 ng/mL AM4nに対して、250 ng/mL AM19に対して及び250 ng/mL AM1cに対しては統計学的有意性がないことが分かった。

【0179】

200 ng/mLシクロスポリンの存在下で、Abbott ASYM(登録商標)の交差反応性を測定し、500 ng/mL AM1に対して6.9%、250 ng/mL AM9に対して10.8%であり、250 ng/mL AM4nに対して、250 ng/mL AM19に対して及び250 ng/mL AM1cに対しては統計学的有意性がないことが分かった。

20

【0180】

200 ng/mL CsAの存在下で、4種類の主要なCsA代謝産物とのEMITの交差反応性を評価した。これらの代謝産物のうち、M1(AM9)のみが7%で有意な交差反応性を示した。

【実施例8】

【0181】

特異性の比較

この実施例は、その他の市販のアッセイを用いた、本明細書中に記載のARCHITECT(登録商標)CsA免疫アッセイの特異性の比較を示す。

30

【0182】

以前、CsAに対するモノクローナル免疫アッセイの特異性は、殆ど、HPLCでの直接的比較によるか又は精製代謝産物の測定によって対処した。本明細書中に記載のARCHITECT(登録商標)CsA免疫アッセイは、CsA代謝産物AM1及びAM9に対する交差反応性を低くするために設計されている。Dr.Holtのプロフィシエンシー(proficiency)移植患者プールを用いて低交差反応性が確認され、HPLC結果に対して比較した。

【0183】

ARCHITECT(登録商標)CsAアッセイにより、HPLC結果に対して<10%のバイアスが示され、一方、TDxCsAアッセイにより、HPLCに対して34.23%の正バイアスが示され、ASYM(登録商標)CsAアッセイにより、HPLCに対して17.77%の正バイアスが示された。これは、TDx及びASYM(登録商標)CsAアッセイがAM1及びAM9に対して交差反応性があり、主にCsAの谷の領域(<500 ng/mL)において可変の正濃度バイアスを示し、一方、ARCHITECT(登録商標)CsAアッセイが全てのシクロスポリン代謝産物に対して<1%交差反応性を示すということによると思われる。

40

【0184】

HPLCに対するDr.Holtのプロフィシエンシー(proficiency)ス

50

スパイク処理患者プールを用いた、これらの3種類のアッセイの分析から、スパイク処理試料には何らシクロスポリン代謝産物が存在しないので、3種類全てのアッセイ（ARCHITECT（登録商標）、TDx及びASYM（登録商標））が±5%バイアス内であることが示された。

【0185】

当業者にとって当然のことながら、本開示は、目的を遂行するため及び結果及び言及される長所ならびにそれらにおける特徴となるものを得るために、よく適合される。本明細書中に記載の、組成、処方物、方法、手順、処置、分子、具体的化合物は、現在、好ましい実施形態の代表であり、例示であり、開示の範囲を限定するものではない。当業者にとって当然のことながら、本開示の範囲及び精神から逸脱することなく、本明細書中で開示される本開示に対して各種置換及び修飾を為し得る。

10

【0186】

明細書中で言及される全ての特許及び刊行物は本開示が属する技術分野の熟練者のレベルの指標となる。全ての特許及び刊行物は、各個別の刊行物が具体的かつ個々に参照により組み込まれることが指示されるように、同じ程度まで、参照により本明細書中に組み込まれる。

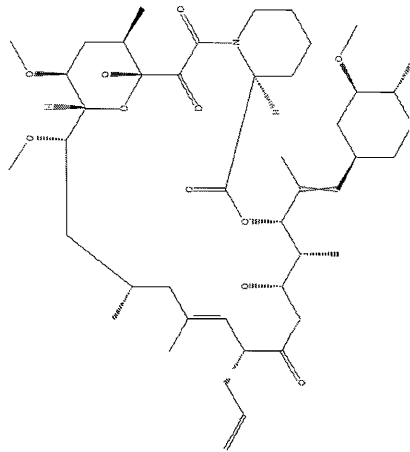
【0187】

適切に実例になるように本明細書中に記載される開示は、本明細書中で具体的に開示されない、要素、制限なしに、実施され得る。このようにして、例えば、本明細書中の各例において「含む（comprising）」、「基本的にからなる（consisting essentially of）」及び「からなる（consisting of）」という用語の何れも、その他の2つの用語の何れかと置き換え得る。使用されてきたこの用語及び表現は、説明の用語として使用され、限定の用語ではなく、示される及び記載される特性の何らかの同等物を除くかかる用語及び表現又はその一部の使用における意図はないが、様々な修飾が主張される本開示の範囲内で可能であることが認められる。このようにして、好ましい実施形態及び任意の特性により本開示を具体的に開示してきたが、本明細書中で開示される概念の修飾及び変更が当業者により再分類され得、かかる修飾及び変更が、添付の特許請求の範囲により定義されるように本発明の範囲内であると見なされることを理解されたい。

20

【 図 1 】

FIGURE 1



【 図 2 】

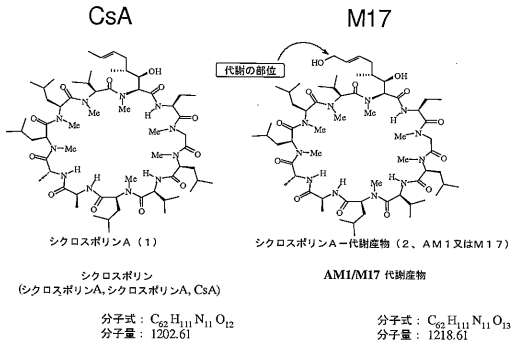


FIGURE 2

【 図 3 A 】

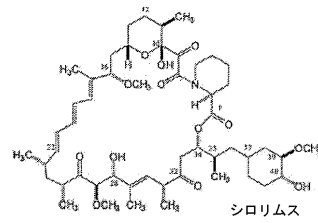


FIGURE 3A

【 図 3 B 】

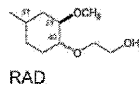


FIGURE 3B

【 図 4 】

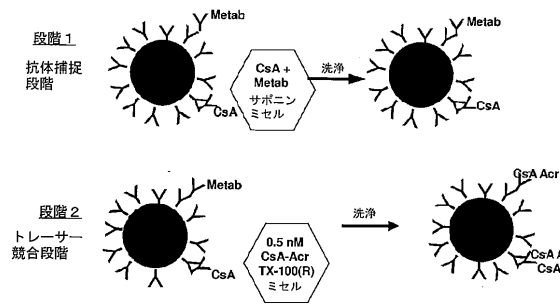
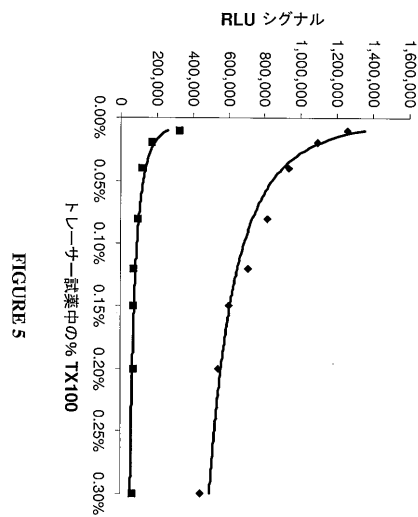


FIGURE 4

【 図 5 】



FIGURES

【 図 7 】

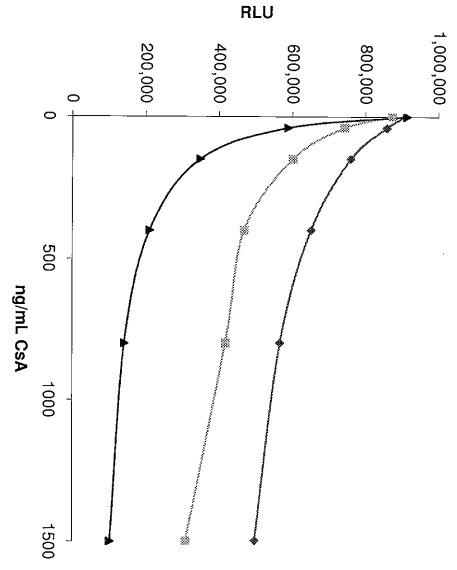


FIGURE 7

【 図 6 】

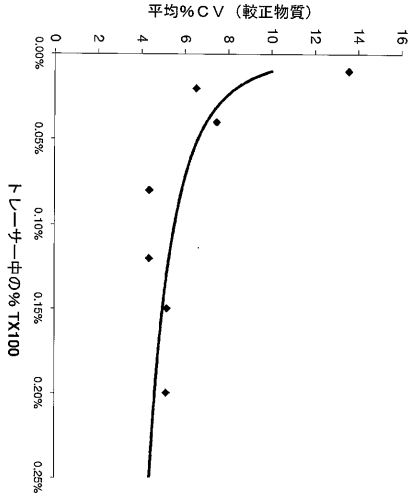


FIGURE 6

【 図 8 】

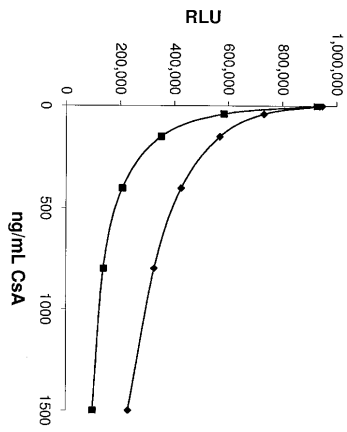


FIGURE 8

## フロントページの続き

- (72)発明者 ブレイト, エレイン・エム  
アメリカ合衆国、イリノイ・60030、グレイズレイク、ハミングバード・レイン・1159
- (72)発明者 ファインリー, デイビッド・エム  
アメリカ合衆国、イリノイ・60081、スプリング・グローブ、ヒドウン・トレイル・2414
- (72)発明者 ホレツツ - マコーマツク, シエリー・アール  
アメリカ合衆国、イリノイ・60087、ウオーキーガン、バー・オーク・3216
- (72)発明者 パチエンテイ, デイビッド・ピー  
アメリカ合衆国、イリノイ・60031、ガーニー、フラワー・ロード・935
- (72)発明者 ピクテル, ライアン・イー  
アメリカ合衆国、イリノイ・60085、ウオーキーガン、モンロー・1531
- (72)発明者 シールズ, マイケル  
アメリカ合衆国、イリノイ・60464、パロス・パーク、ウエスト・ワンハンドレッドトウエン  
テイス・ストリート・7900
- (72)発明者 スプリング, トーマス・ジー  
アメリカ合衆国、イリノイ・60035、ハイランド・パーク、バーベリー・ロード・234
- (72)発明者 ワン, フィリップ・ピー  
アメリカ合衆国、イリノイ・60048、リバティビル、ドーズ・608

審査官 加々美 一恵

- (56)参考文献 特開平04-316599(JP, A)  
特開2003-201298(JP, A)  
国際公開第2007/044978(WO, A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N 33/48-33/98

专利名称(译)	免疫分析与疏水性药物分析物代谢物的交叉反应性降低		
公开(公告)号	<a href="#">JP5174898B2</a>	公开(公告)日	2013-04-03
申请号	JP2010509567	申请日	2008-05-23
[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	ブレイトエレインエム ファインリーデイビツドエム ホレツツマコーマツクシエリーアール パチエンテイデイビツドピー ピクテルライアンイー シールズマイケル スプリングトーマスジー ワンファイリツプピー		
发明人	ブレイト,エレイン・エム ファインリー,デイビツド・エム ホレツツ-マコーマツク,シエリー・アール パチエンテイ,デイビツド・ピー ピクテル,ライアン・イー シールズ,マイケル スプリング,トーマス・ジー ワン,ファイリツプ・ピー		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/54393 G01N33/9493		
FI分类号	G01N33/543.501.N G01N33/53.G G01N33/543.501.H G01N33/531.B		
代理人(译)	Masarushin大崎		
优先权	60/940062 2007-05-24 US		
其他公开文献	JP2010528295A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明尤其提供了与分析物代谢物表现出降低的交叉反应性的免疫测定。另外，本公开内容提供诊断免疫测定以确定测试样品中疏水性药物的浓度或水平，所述疏水性药物在体内或体外代谢以形成交叉反应代谢物，其中与药物分析物的这些代谢物的交叉反应性降低。特别地，本公开提供了这样的免疫测定，其中疏水性药物是免疫抑制药物，例如环孢菌素A。

		第一の温 置	第二の温 置	第一の温 置	第二の温 置
		アッセイタイプ		方式1 1段階	方式2 2段階
トレーサー添 加	抗体、nM	0.32	0.24	0.23	1.0
	代謝産物、nM	23	17	83	<1.0
第一の温置段 階	トレーサー、nM	0.29	0.22	0.21	<0.2
	サポニン	あり	あり	あり	なし
	Triton <sup>(R)</sup> X-100	あり	あり	あり	なし
		アッセイタイプ		方式3 1段階	方式4 2段階
トレーサー添 加	抗体、nM	0.32	0.24	0.23	1.0
	代謝産物nM	23	17	83	<1.0
第二の温置ま で遅延	トレーサー、nM	なし	0.12	なし	0.50
	サポニン	あり	あり	あり	なし
	Triton <sup>(R)</sup> X-100	なし	あり	なし	あり