

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公開特許公報** ( A ) (11)特許出願公開番号

特開2002 - 207039

(P2002 - 207039A)

(43)公開日 平成14年7月26日(2002.7.26)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* ( 参考 )
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	G 4 B 0 6 3
// C 1 2 Q 1/28		C 1 2 Q 1/28	

審査請求 有 請求項の数 50 L ( 全 11数 )

(21)出願番号 特願2001 - 347898(P2001 - 347898)

(22)出願日 平成13年11月13日(2001.11.13)

(31)優先権主張番号 09/712,525

(32)優先日 平成12年11月14日(2000.11.14)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 591003013

エフ・ホフマン - ラ ロシュ アーゲー

F . HOFFMANN - LA ROC

HE AKTIENGESELLSCH

AFT

スイス・シーエイチ - 4070バーゼル・グレ

ンツアーヘルストラツセ124

(72)発明者 サルバトーレ ジェイ・サラモン

アメリカ合衆国 インディアナ 46038 フ

ィッシャーズ,8960 ブラッドウェル プレ

イス 101

(74)代理人 100095832

弁理士 細田 芳徳

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 H I Vプロテアーゼインヒビターの免疫測定法

(57)【要約】 ( 修正有 )

【課題】 H I Vプロテアーゼ阻害剤検出用非アイソトープ性免疫測定法及びその測定法を実施するためのキットを提供する。

【解決手段】 ( a ) H I Vプロテアーゼ阻害剤を含有試料を、該阻害剤に特異的なレセプター、並びに該阻害剤のリガンド及び非アイソトープ性シグナル生成部分を含有するコンジュゲートと合わせる工程、 ( b ) 該シグナル生成部分で生じるシグナル生成をモニターして、該コンジュゲートに結合した該レセプターの量を測定する工程、並びに ( c ) 該シグナル生成を試料中の該阻害剤の存在又は量と関連させる工程、を含む、試料中の H I Vプロテアーゼ阻害剤の免疫測定法、並びに ( a ) H I Vプロテアーゼ阻害剤に特異的なレセプター、及び ( b ) 該阻害剤のリガンド及び非アイソトープ性シグナル生成部分を含有するコンジュゲートをパッケージした組み合わせで含有する、試料中の H I Vプロテアーゼ阻害剤の測定テストキット。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) HIVプロテアーゼインヒビターを含有すると思われる試料を、該インヒビターに特異的なレセプター、ならびに該インヒビターのリガンドおよび非アイソトープ性シグナル生成部分を含有してなるコンジュゲートと合わせる工程、(b) 該シグナル生成部分により生じるシグナル生成をモニターすることにより、該コンジュゲートに結合した該レセプターの量を測定する工程、ならびに(c) 該シグナル生成を試料中の該インヒビターの存在または量と関連させる工程、を含む、試料中のHIVプロテアーゼインヒビターを測定するための免疫測定法。

【請求項2】 該レセプターが、抗体、抗体フラグメントおよび抗体誘導体からなる群より選ばれる請求項1記載の方法。

【請求項3】 該プロテアーゼインヒビターが、サキナビル、アンブレナビル、インジナビル、ネルフィナビルおよびリトナビルからなる群より選ばれる請求項1記載の方法。

【請求項4】 該レセプターが、直接または間接的に固相に結合している請求項1記載の方法。

【請求項5】 該シグナル生成部分が、酵素、蛍光発生化合物、化学発光物質、電気化学的メディエーター、粒子、レポーター基、酵素インヒビターおよびポリペプチドキャリアからなる群より選ばれる請求項1記載の方法。

【請求項6】 (a) HIVプロテアーゼインヒビターを含有すると思われる試料を、該プロテアーゼインヒビターのリガンドおよびミコフェノール酸を含有するコンジュゲート、該プロテアーゼインヒビターに特異的なレセプター、IMP、NADならびにIMP DHと合わせる工程、(b) NADHの生成をモニターする工程、ならびに(c) NADHの生成を試料中の該プロテアーゼインヒビターの存在または量と関連させる工程、を含む、試料中のHIVプロテアーゼインヒビターを測定するための非アイソトープ性免疫測定法。

【請求項7】 (a) HIVプロテアーゼインヒビターに特異的なレセプター、および(b) 該インヒビターのリガンドおよび非アイソトープ性シグナル生成部分を含有してなるコンジュゲートをパッケージした組み合わせで含有する、試料中のHIVプロテアーゼインヒビターを測定するためのテストキット。

【請求項8】 該レセプターが、抗体、抗体フラグメントおよび抗体誘導体からなる群より選ばれてなる請求項7記載のテストキット。

【請求項9】 該プロテアーゼインヒビターが、サキナビル、アンブレナビル、インジナビル、ネルフィナビルおよびリトナビルからなる群より選ばれてなる請求項7記載のテストキット。

【請求項10】 該レセプターが、直接または間接的に

固相に結合している請求項7記載のテストキット。

【請求項11】 該シグナル生成部分が、酵素、蛍光発生化合物、化学発光物質、電気化学的メディエーター、粒子、レポーター基、酵素インヒビターおよびポリペプチドキャリアからなる群より選ばれてなる請求項7記載のテストキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、一般に、液体媒体中の解析物を測定する技術分野に関する。より詳細には、生物学的試料中の治療薬を測定するための免疫測定法に関する。特に、本発明は、生物学的試料中のプロテアーゼインヒビター、特にHIVプロテアーゼインヒビターを検出するための非アイソトープ性免疫測定法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】HIVプロテアーゼインヒビターは、1995年に第1号のサキナビルが市場に導入されて以来、AIDS患者の健康管理に対して意義のある効果を与えてきた重要な新薬である。他のプロテアーゼインヒビターの例には、アンブレナビル(amprenavir)、インジナビル(indinavir)、ネルフィナビル(nelfinavir)およびリトナビル(ritonavir)がある。これらは、逆転写酵素インヒビターなどの他の抗HIV薬や、他のHIVプロテアーゼインヒビターと併用すると特に有効である。これらの新しい治療法が顕著な成功を収めているにもかかわらず、プロテアーゼインヒビターをモニターするための治療薬試験法があれば、治療成績はもっと改善されるであろうという強い示唆がある。すべての患者がプロテアーゼインヒビター併用療法に最適に回答するわけではない。最初は応答を示した患者でさえ、HIVウイルスの変異率が非常に高いことから薬剤耐性を発現しうる。しかしながら、プロテアーゼインヒビターの血漿レベルと、ウイルス量の低下およびCD4細胞数の増加に基づく治療有効性との間には明白な関係があることが示されている。薬剤には、広範に代謝され、複雑な薬剤間相互作用を行うという問題がある。その結果、極めて複雑な薬剤動態が生じ、用量と、任意の特定患者における任意の特定時間での残留薬剤レベルとの間に予測不可能な強い要因がもたらされる。治療薬のモニタリングにより、薬剤の用量は、個々の患者毎に決定することができ、ウイルスが抑制される可能性がずっと高くなる。しかしながら、プロテアーゼインヒビターの常套的治療薬モニタリングには、高処理臨床解析装置に適合しうる簡単な自動化試験法が利用できることが必要である。現在、プロテアーゼインヒビターの治療薬モニタリングに関する報告のほとんどは、HPLC法を使用したものであるが、これは、時間、労力および費用がかかる。最近、サキナビルに関する放射免疫測定(RIA)法が報告された。しかしながら、この方法は、高処理治

療薬モニタリングに適合しえないことがあり、すべてのRIA法と同様に、アッセイで使用したラジオアイソトープ標識に関する安全性や廃棄物処理の管理の問題がある。したがって、治療薬モニタリングの最も望ましいアッセイの形態は、非アイソトープ性免疫測定法であり、このような形態の方法は、HIVプロテアーゼインヒビターのモニタリングに関して、これまでに知られていない。

【0003】HPLCは、HIVプロテアーゼインヒビターのモニタリング方法の1つとして使用されてきた。最近の文献において、Poirierら、Therapeutic Drug Monitoring 22, 465-473, 2000 およびRemmelら、Clinical Chemistry 46, 73-81, 2000の2件の報告には、ヒト血漿中において数種類のプロテアーゼインヒビターを同時測定するためのHPLCアッセイが記載されている。あらゆる免疫測定法の中でHIVプロテアーゼインヒビターに関する公知文献はたった1件しかない。今年より前では、サキナビルのためのRIA、その患者サンプルでの使用およびHPLC法との比較が、Wiltshireら、Analytical Biochemistry 281, 105-114, 2000に記載されている。しかしながら、非アイソトープ性代替法の教示も示唆もなかった。

【0004】化学的アッセイおよび生物学的アッセイは、通常、目的の解析物を、所定の非限定的な量の1種以上のアッセイ試薬と接触させる工程、得られた生成物（検出産物）の1種以上の物性を測定する工程、および典型的には被検試料に期待される範囲の既知量の目的解析物を含有する標品試料または較正試料から求められる関係を用い、測定値を元の試料中に存在する解析物の量と関連させる工程を含む。典型的には、検出産物は、1種以上のアッセイ試薬により供給される1種以上の検出可能な標識を含有する。一般的に使用される標識の例としては、<sup>125</sup>Iおよび<sup>32</sup>Pなどのラジオアイソトープ標識、ペルオキシダーゼおよび - ガラクトシダーゼなどの酵素ならびに酵素基質標識、フルオレセインおよびローダミンなどの蛍光標識、ニトロキシド遊離ラジカルなどの電子スピン共鳴標識、抗体および抗原などの免疫反応性標識、ピオチン - アビジンおよびピオチン - ストレプトアビジンなどの結合ペアの一方の構成物である標識、ならびにルテニウムピピリジル部を含有するものなどの電子化学発光標識が挙げられる。サンドイッチアッセイは、典型的には、最終的に分離に使用する第一アッセイ試薬、例えば、抗体、抗原または結合ペアの一方の構成物と、検出可能な標識を供給する第二アッセイ試薬との間に目的解析物がサンドイッチされた複合体を形成する工程を含む。競合アッセイは、典型的には、目的解析物とこの解析物の類似体の両方が別の試薬、例えば抗体の結合部位に関して競合する系を含み、このとき、解析物、類似物または結合試薬のうち1つは、検出可能な標識を有する。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、高処理量の治療薬モニタリングに適合し、安全であり、廃棄物処理の管理を必要としない、HIVプロテアーゼインヒビターの検出のための非アイソトープ性免疫測定法および該方法を実施するためのキットを提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】即ち、本発明の要旨は、(1) (a) HIVプロテアーゼインヒビターを含有すると思われる試料を、該インヒビターに特異的なレセプター、ならびに該インヒビターのリガンドおよび非アイソトープ性シグナル生成部分を含有してなるコンジュゲートと合わせる工程、(b) 該シグナル生成部分により生じるシグナル生成をモニターすることにより、該コンジュゲートに結合した該レセプターの量を測定する工程、ならびに(c) 該シグナル生成を試料中の該インヒビターの存在または量と関連させる工程、を含む、試料中のHIVプロテアーゼインヒビターを測定するための免疫測定法、(2) 該レセプターが、抗体、抗体フラグメントおよび抗体誘導体からなる群より選ばれる前記(1)記載の方法、(3) 該プロテアーゼインヒビターが、サキナビル、アンブレナビル、インジナビル、ネルフィナビルおよびリトナビルからなる群より選ばれる前記(1)記載の方法、(4) 該レセプターが、直接または間接的に固相に結合している前記(1)記載の方法、(5) 該シグナル生成部分が、酵素、蛍光発生化合物、化学発光物質、電気化学的メディエーター、粒子、レポーター基、酵素インヒビターおよびポリペプチドキャリアからなる群より選ばれる前記(1)記載の方法、(6) (a) HIVプロテアーゼインヒビターを含有すると思われる試料を、該プロテアーゼインヒビターのリガンドおよびミコフェノール酸を含有するコンジュゲート、該プロテアーゼインヒビターに特異的なレセプター、IMP、NADならびにIMP DHと合わせる工程、(b) NADHの生成をモニターする工程、ならびに(c) NADHの生成を試料中の該プロテアーゼインヒビターの存在または量と関連させる工程、を含む、試料中のHIVプロテアーゼインヒビターを測定するための非アイソトープ性免疫測定法、(7) (a) HIVプロテアーゼインヒビターに特異的なレセプター、および(b) 該インヒビターのリガンドおよび非アイソトープ性シグナル生成部分を含有してなるコンジュゲートをパッケージした組み合わせで含有する、試料中のHIVプロテアーゼインヒビターを測定するためのテストキット、(8) 該レセプターが、抗体、抗体フラグメントおよび抗体誘導体からなる群より選ばれてなる前記(7)記載のテストキット、(9) 該プロテアーゼインヒビターが、サキナビル、アンブレナビル、インジナビル、ネルフィナビルおよびリトナビルからなる群より

選ばれてなる前記(7)記載のテストキット、(10)該レセプターが、直接または間接的に固相に結合している前記(7)記載のテストキット、(11)該シグナル生成部分が、酵素、蛍光発生化合物、化学発光物質、電気化学的メディエーター、粒子、レポーター基、酵素インヒビターおよびポリペプチドキャリアからなる群より選ばれてなる前記(7)記載のテストキット、に関する。

#### 【0007】

【発明の実施の形態】本発明は、HIVプロテアーゼインヒビターの免疫測定法を包含し、該方法は、該プロテアーゼインヒビターを含有すると思われる試料を、該インヒビターに特異的なレセプター、および該インヒビターのリガンドまたは類似体と非アイソトープ性標識とからなる非アイソトープ性コンジュゲートとともにインキュベートする工程、該コンジュゲートに結合するレセプターの量を測定する工程、ならびに結合したパートナーの量を試料中のプロテアーゼインヒビターの量と関連させる工程を含む。レセプターおよびコンジュゲートとの試料のインキュベーションは逐次的または同時に行いうる。試料は、好ましくは全血、血清、血漿、尿、唾液、脳脊髄液または涙などの体液である。レセプターまたは結合パートナーは、他のプロテアーゼインヒビター、プロテアーゼインヒビター代謝物または同時投与された非プロテアーゼインヒビター薬剤から特定のプロテアーゼインヒビターを選択しうる(selective)抗体でありうる。あるいはまた、本発明の別の局面では、レセプターは、構造的に関連するプロテアーゼインヒビターおよび/またはプロテアーゼインヒビター代謝物の一群と反応しうる抗体である。非アイソトープ性コンジュゲートは、非アイソトープ性標識とリガンドとの共有結合複合体または非共有結合複合体であり、リガンドは、プロテアーゼインヒビター、プロテアーゼインヒビター誘導体およびプロテアーゼインヒビター類似体からなる群より選ばれる。非アイソトープ性標識の例としては、酵素、蛍光発生化合物、化学発光物質、電気化学的メディエーター、粒子、ピオチンなどのレポーター群、ミコフェノール酸などの酵素インヒビター、およびタンパク質、糖タンパク質、多糖と核酸との複合体などの巨大分子担体が挙げられる。本発明の免疫測定法は、固相を用いた不均一形態で行ってもよく、溶液または懸濁液を用いた均一形態で行ってもよく、どちらのアッセイ形態も当該技術分野において周知である。好ましい不均一系形態の1つにマイクロタイタープレートELISA(固相酵素免疫測定法)がある。好ましい均一系形態には、微粒子凝集、および非競合阻害免疫測定法、例えば2000年6月26日に出版された、Dornらの米国特許出願第09/603,646号明細書に記載されたミコフェノール酸/イノシンリン酸デヒドロゲナーゼ法が挙げられる。

【0008】HIVプロテアーゼインヒビターの非アイ

ソトープ性免疫測定法は、不均一形態でも均一形態でも構築しうる。不均一系免疫測定法は、結合した解析物を遊離の解析物から、または結合した標識を遊離の標識から固相分離することが特徴である。固相は、チューブ、プレート、ビーズまたは細片などの当該技術分野において周知の種々の形態をとりうるが、これらには限定されない。特に好ましい形態の1つにマイクロタイタープレートがある。固相材料は、様々なガラス、ポリマー、プラスチック、紙または膜から構成されうる。特に好ましくは、ポリスチレンなどのプラスチックである。不均一系免疫測定法は、競合形態であってもよく、非競合形態、すなわちサンドイッチ形態であってもよい。

【0009】HIVプロテアーゼインヒビターなどの低分子量解析物には、競合形態が好ましい。HIVプロテアーゼインヒビター用の競合不均一系免疫測定は様々な方法で行いうる。例えば、一形態では、プロテアーゼインヒビターに対する抗体を固相に固定した後、ある一定数のレセプター結合部位に関して競合する試料およびコンジュゲートとともにインキュベートする。次いで、結合しなかった解析物およびコンジュゲートを除き、結合したコンジュゲートの量を測定する。結合したコンジュゲートの量は、試料中のHIVプロテアーゼインヒビター量に反比例する。当該技術分野において周知の方法により、既知量のHIVプロテアーゼインヒビターを用いて用量応答較正曲線を作成する。

【0010】本発明の別の好ましい形態は、HIVプロテアーゼインヒビター誘導体とタンパク質などの巨大分子担体物質とのコンジュゲートを最初に調製する工程を含む。このようなコンジュゲートの調製は、ウシ血清アルブミン(BSA)輸送タンパク質とサキナビル誘導体とのコンジュゲートに関して本明細書の実施例1~3に記載している。このタイプのコンジュゲートは、共有結合固定化または受動固定化(passive immobilization)を用いて任意の固相に固定しうる。実施例4には、マイクロタイタープレート上への受動固定化について記載している。コンジュゲートでコートしたプレートの調製後、レセプターを所定の至適希釈度で、HIVプロテアーゼインヒビター含有試料とともに添加する。その結果、固相に結合したコンジュゲートと溶液中のHIVプロテアーゼインヒビターとが、ある限られた数のレセプター結合部位に関して競合する。インキュベーション後、固相を洗浄して未結合レセプターを除去する。最後に、標識を加え、結合した抗体の存在を検出するのに使用する。実施例6に記載したようなELISAアッセイの場合、標識として特定の結合レセプター種に対する二次抗体または二次レセプター、例えばウサギ抗ヒツジ抗体が挙げられ、これは酵素標識、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)とコンジュゲートする。他の酵素標識および二次結合物質は、マイクロタイタープレートELISAの技術分野の当業者にとって自明

である。最初に記載したアッセイ形態と同様、結合した酵素コンジュゲートの量は、試料中のHIVプロテアーゼインヒビター量に反比例する。標準的な方法を用い、既知量のHIVプロテアーゼインヒビターを用いて用量応答較正曲線を作成し、次いで、未知試料中のHIVプロテアーゼインヒビター量を該較正曲線と相関させる。

【0011】本発明の好ましい均一系微粒子免疫測定法およびテストキットは、血清、血漿、全血、尿および唾液中のHIVプロテアーゼインヒビター検出のための既製の(ready-to-use)液体試薬を含有する二試薬系を含む。溶液中の微粒子の動力学的相互作用は、自動解析装置を用いて簡便に測定される。この特定のアッセイ形態では、特定のプロテアーゼインヒビターに対する抗体を、共有結合固定化または受動固定化を用いて微粒子上に負荷し、このプロテアーゼインヒビターの誘導体をアミノデキストランなどの任意の巨大分子に結合させる。以下、これを薬剤コンジュゲートという。薬剤コンジュゲートと血清試料中の任意の薬剤との間には、微粒子上のある限られた量の特異的抗体結合部位への結合に関して競合反応が起こる。溶液中の微粒子の動力学的相互作用は、薬剤コンジュゲートの微粒子上の抗体への結合により誘導され、試料中の薬剤の存在により阻害される。微粒子の相互作用は、溶液の吸光度により測定され、それは溶液の濁度と関連している。粒子と薬剤コンジュゲートが架橋すると濁度が高くなる(吸光度が高くなる)。遊離の薬剤が粒子上の抗体に結合すると、濁度は低くなる(吸光度が低くなる)。

【0012】均一系微粒子免疫測定法およびテストキットの別の形態は、血清、血漿、全血、尿および唾液中のHIVプロテアーゼインヒビター検出のための既製液体試薬を含む。溶液中の微粒子の動力学的相互作用は、自動解析装置を用いて簡便に測定される。このアッセイ形態では、ウシ血清アルブミンなどの任意の巨大分子に結合した薬剤誘導体を、共有結合固定化または受動固定化を用いて微粒子上に負荷する。この特定のプロテアーゼインヒビターに対する抗体をバッファー系に配合する。微粒子上の薬剤コンジュゲートと血清試料中に存在する任意の薬剤との間には、反応溶液中のある一定量の特異的抗体への結合に関して競合反応が起こる。溶液中の微粒子の動力学的相互作用は、薬剤コンジュゲートの抗体への結合により誘導され、試料中の薬剤の存在により阻害される。微粒子の相互作用は、溶液の吸光度により測定され、それは溶液の濁度と関連している。粒子と薬剤コンジュゲートが架橋すると濁度が高くなる(吸光度が高くなる)。遊離の薬剤が粒子上の抗体に結合すると、濁度は低くなる(吸光度が低くなる)。

【0013】本発明の別の免疫測定形態では、蛍光偏光免疫測定法およびテストキットは、蛍光偏光の原理を用いる血清、血漿、全血、尿および唾液中のHIVプロテアーゼインヒビター検出のための既製液体試薬を含む。

このアッセイ形態では、薬剤誘導体を発蛍光団でタグ化または標識し、この特定のプロテアーゼインヒビターに対する抗体をバッファー系に配合する。蛍光トレーサーを有する薬剤と血清試料中の任意の薬剤との間には、反応溶液中のある一定量の特異的抗体への結合に関して競合反応が起こる。

【0014】蛍光分子または発蛍光団に適切な波長(励起波長)の光を照射すると、長波長(発光波長)でいくらかの発光が見られる。発光が偏光しているか否かは、溶液中での発蛍光団の回転自由度に依存する。フルオレセインなどの小さな分子は、発光前に迅速に回転し得、これにより発光の偏光解消が生じる。これに対し、フルオレセイン標識タンパク質などの蛍光巨大分子の回転はずっと遅い。したがって、巨大分子は、励起と発光の間にごくわずかしら回転せず、発光は偏光する。蛍光偏光は、薬剤濃度の再現可能な相関的要素であり、試料中の薬剤濃度の定量に好適である。

【0015】本発明により意図される別の免疫測定形態は、抗体または別の結合レセプターに結合すると阻害される電気的活性な標識の使用に基づく均一系電気化学的免疫測定法である。好ましい電気的活性標識は、ビピリジルオスミウム複合体などの可逆的酸化還元標識である。シグナルの増幅は、酸化還元酵素やインターデジタル・アレイ(interdigitated array)(IDA)電極を用い、これらのメディエーターを生体電気触媒的に(bioelectrocatalytically)に酸化還元サイクルを行うことにより達成しうる。均一系アッセイに使用する形態は、逐次的結合阻害である。アッセイ対象の試料は、抗体または他の結合レセプターと混合される。抗原が存在する場合、結合が生じる。未結合の抗体/結合レセプターが残っていれば、それを電気的活性標識で標識した抗原と混合する。次いで、電気的活性化化合物で標識された未結合の抗原を電極表面で測定する。

【0016】試料中に解析物が存在しない場合、より多量の抗体または結合レセプターが、抗原標識電気的活性化化合物と結合する。これにより、電気的活性化化合物の阻害が最大となる。試料中の解析物濃度が高いと、電気的活性化化合物の阻害はほとんどないか、あるいは全くない。したがって、電気化学的応答と解析物濃度との間には明確な関連性がある。

【0017】本発明のさらにまた別の免疫測定形態において、試料中に存在する解析物は、キャピラリー表面上に固定された抗体の結合部位に関して、解析物-酵素コンジュゲートと競合する。未結合解析物-酵素コンジュゲートは検出ゾーンに向かって流れ、そこで該酵素は基質を電気的活性産物に変換する。次いで、該産物を電極で電気化学的に検出する。試料中の解析物濃度が高いと、未結合のまま検出ゾーンに向かって流れる解析物-酵素コンジュゲートが多くなる。これにより、酵素コンジュゲートにより生成される電気的活性産物の濃度は高

くなり、電極で検知される電流は高くなる。したがって、検知される電流と解析物濃度との間には明確な関連性がある。

【0018】本発明の別の局面は、HIVプロテアーゼインヒビターの測定のために本発明のアッセイ法を簡便に行うのに有用なキットに関する。本発明の多様性を高めるため、本発明の方法に有用な試薬は、同じ容器または別個の容器内にパッケージした組み合わせで、液体または凍結乾燥の形態で提供され、それにより該方法およびアッセイを実質的に最適化することができる。該試薬

は、その架橋反応性および安定性に応じて、それぞれ別個の容器に入れてもよく、種々の試薬を1個以上の容器内に合わせて入れることもできる。

【0019】本発明の試薬キットは、HIVプロテアーゼインヒビターに特異的なレセプター、およびこのインヒビターのリガンドと非アイソトープ性シグナル生成部分とを含有してなるコンジュゲートを含む。試薬は液体のままであってもよく、凍結乾燥してもよい。このキットは、本発明のアッセイを行うのに有用な較正物質および対照物質をさらに含む。

レセプターまたはコンジュゲートは、固体支持体に固定されていてもよい。

【0020】解析物、すなわちHIVプロテアーゼインヒビターまたは代謝物を適量含有すると思われる試料は、いずれも本発明の方法により解析することができる。試料は、典型的には、例えば尿、全血、血漿、血清、唾液、精液、糞便、喀痰、脳脊髄液、涙、粘液などの、宿主由来の体液などの水性溶液であるが、好ましくは血漿または血清である。試料は、所望により前処理することができ、該アッセイを妨げない簡便な任意の媒体中で調製することができる。水性媒体が好ましい。

【0021】抗体（または好ましくはレセプター）とは、解析物の特異的結合パートナーを意味し、リガンドに対し、他の物質を除外する程度の特異的結合親和性を有する任意の物質または物質群である。

【0022】リガンドとは、解析物に対する抗体の結合親和性に関して、解析物と本質的に同じ挙動を示す任意の物質または物質群を意味し、任意のHIVプロテアーゼインヒビターもしくはその誘導体および異性体を含むものとする。

【0023】較正物質とは、既知量の測定対象解析物を含有する任意の標準物質または参照物質を意味する。解析物を含むと思われる試料および較正物質を同様の条件下でアッセイする。次いで、未知試料について得られた結果を標品について得られた結果と比較することにより解析物濃度を算出する。これは、較正曲線や図2に示すような用量応答曲線を作成することによってよく用いられる手段である。

【0024】本発明のアッセイでは、種々の補助物質を使用することが多い。例えば、通常、アッセイ媒体にはバッファーとともにアッセイ媒体の安定化剤およびアッ

セイ成分が存在する。これらの添加剤に加えて、アルブミンなどの追加のタンパク質や界面活性剤、特に非イオン性界面活性剤等が含まれる場合も多い。

【0025】HIVプロテアーゼインヒビターに関する明細書および特許請求の範囲における記載はいずれも、該インヒビターに加え、生物学的な意味において該インヒビターとしての挙動を示すその生物学的活性代謝物および治療上活性な代謝物ならびに生物学的活性誘導体および治療上活性な誘導体を含むことが意図されることを理解されたい。

【0026】誘導体という用語は、1つ以上の化学反応により親化合物または親分子から作製される化合物または分子をいう。

【0027】本明細書に記載のように、検出用分子、標識またはトレーサーは、非放射活性の同定タグであり、担体物質または担体分子と結合させて解析物を検出するのに使用しうる。標識は、連結部または架橋部により担体分子に直接または間接的に結合しうる。標識の例としては、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼおよびペルオキシダーゼなどの酵素、ローダミンおよびフルオレセインイソチオシアネート(FITC)などの蛍光化合物、ならびにジオキセタンおよびルシフェリンなどの発光化合物が挙げられる。

【0028】

【実施例】実施例1

2 - [ 3 ( S ) - [ ( L - アスパラギニル ) アミノ ] - 2 ( R ) - ヒドロキシ - 4 - フェニルブチル ] - N - tert - ブチル - デカヒドロ - ( 4 a S , 8 a S ) - イソキノリン - 3 ( S ) - カルボキサミド ( II ) の調製

548 mg のシス - 2 - [ 3 ( S ) - [ [ N - ( ベンジルオキシカルボニル ) - L - アスパラギニル ] アミノ ] - 2 ( R ) - ヒドロキシ - 4 - フェニルブチル ] - N - tert - ブチル - デカヒドロ - ( 4 a S , 8 a S ) - イソキノリン - 3 ( S ) - カルボキサミド ( I 、 米国特許第 5 , 196 , 438 号明細書 ) を含有する 50 ml のメタノール溶液を含むフラスコに、58 mg の 10 % パラジウム / カーボンを加えた。フラスコおよび内容物を水素雰囲気下に置き ( パージ / 排気サイクル 5 回 ) 、次いで、内容物を攪拌下、水素圧 1 ~ 2 気圧、室温で一晩放置した。薄層クロマトグラフィー解析 ( シリカゲルプレート、10 % メタノール / クロロホルムで溶出 ) の後、ヨウ素チャンパにてプレートの染色を行うと、出発物質の消失が示され、より極性の高い新たなスポットが現れた。反応物をセライトパッドで濾過し、メタノールで洗浄した。濾液を回収し、減圧下で液体を蒸発させた。残渣を少量のメタノールに再度溶解し、濾過 ( 0 . 2  $\mu$  , Gelman Acrodisc ) し、蒸発乾固した。残渣を蒸留塩化メチレンに再度溶解させ、再度液体を蒸発させ ( 反復 5 回 ) 、残渣を高真空下で 2 日間乾燥させ、白色 / オフホワイト固体の生成物 ( II ) 451 mg を得

た。<sup>1</sup>H-NMR：一致。FAB(+)MS：516 (M+H)。

#### 【0029】実施例2

シス-4-{1(S)-[1(S)-ベンジル-3-[3(S)-tert-ブチルカルバモイル-デカヒドロ-(4aS,8aS)-イソキノリン-2-イル]-2(R)-ヒドロキシ-プロピルカルバモイル]-2-カルバモイル-エチルカルバモイル}-酪酸2,5-ジオキソ-ピロリジン-1-イルエステル(IV)の調製アルゴン雰囲気下、氷水浴中で冷却した、50mgの生成物(II)を含有する10mlの乾燥塩化メチレン(アルゴン雰囲気下、水素化カルシウムで蒸留)の攪拌溶液に、2.4mg(1モル当量)の5-[(2,5-ジオキソ-1-ピロリジニル)オキシ]-5-オキソ-ペンタノイルクロリド(III、欧州特許出願第EP 503454号および米国特許第5,248,611号明細書の記載と同様にして調製)を固体で一度に添加した。冷却しながら反応物を2時間攪拌した。薄層クロマトグラフィ-解析(シリカゲルプレート、10%メタノール/塩化メチレンで溶出)により、反応の完結が示された。反応物を塩化メチレンで希釈し、0.1N塩酸水溶液中に注入し、10%炭酸ナトリウムでpHを約5に調整した。混合液を十分に振盪し、相分離させた。水相をさらに10%炭酸ナトリウムでpH約7まで塩基性化し、塩化メチレンで再度抽出した。有機性抽出物を合わせ、水(1回)、飽和重炭酸ナトリウム水溶液(3回)、飽和塩化ナトリウム水溶液(1回)で洗浄し、硫酸ナトリウムでの乾燥、濾過および液体の蒸発を行った。ゲル様残渣を高真空下、室温で数時間乾燥し、白色固体および一部塩化メチレンとの溶媒和物として生成物(IV)57mgを得た。<sup>1</sup>H-NMR：一致。FAB(+)MS：727(M+H)。HR(+)FABMS：計算(M+H)値727.4031、測定値727.4013。

#### 【0030】実施例3

[シス-1-オキソ-4-{1(S)-[1(S)-ベンジル-3-[3(S)-tert-ブチルカルバモイル-デカヒドロ-(4aS,8aS)-イソキノリン-2-イル]-2(R)-ヒドロキシ-プロピルカルバモイル]-2-カルバモイル-エチルカルバモイル}-ブチル]-BSA(V)の調製氷水浴中で冷却した、380mgのウシ血清アルブミン(Miles-Pentex, Fraction V)を含有する7.6mlの50mMリン酸カリウム(KPi)、pH7.5の攪拌溶液に、1.9mlのジメチルスルホキシド(DMSO)を5~10分かけて滴下した。得られた透明な溶液のうち1mlを取り出し、BSAを対照とした。約340mgのBSAを含有する20%DMSO/50mMKPi(pH7.5)からなる残りの溶液に、全量約1.5mlのDMSOに溶解した7.8mg(約2.1

モル当量)の生成物(IV)を添加し、生成物(IV)と、BSAを含有する32%DMSO/50mMKPi、pH7.5とを反応させた。反応物を一晩攪拌し、温度を室温にした。得られた溶液を3~15ml容透析カセット(Pierce Chemical Co., Slide-A-Lyzer(登録商標)、分子量10Kカットオフ)に移し、順に30%、20%、10%のDMSO/50mMKPi、pH7.5(各1L)に対して室温でそれぞれ約2時間、次いで50mMKPi、pH7.5に対して室温で一晩、さらに50mMKPi、pH7.5(5回交換)に対して3日間かけて逐次的に透析した。保持物質をカセットから取り出し、実質的に無色透明の溶液のコンジュゲート(V)19mlを得た。BSA対照を標準として使用し、タンパク質濃度を測定すると(クーマシーブルー、Bradford変法)、18.6mg/mlであった。

#### 【0031】実施例4

抗血清およびサキナビル-BSAコンジュゲート濃度範囲

本実験ではCorning マイクロELISAプレート(96穴)を使用した。サキナビル-BSAコンジュゲートを0.1M炭酸ナトリウムバッファー、pH9.5中で2μg/mlに希釈した。100μlのバッファーを、プレートの第1列以外の各列のウェルに入れた。第1列には、200μlの2μg/mlサキナビル/BSA溶液を入れ、12チップマイクロピペッターを用いて第1列から100μlを全てのカラムの第2列に同時に移した。ピペティングを3回繰り返すことにより第2列の内容物を混合した。第2列から100μlを第3列に移し、混合した。この操作をプレートの最終列まで繰り返した。混合後、最終列から100μlを取り出し、廃棄した。プレートを加湿したZip-Loc袋に入れ、1時間37℃でインキュベートした。

【0032】インキュベーション後、インキュベーターと袋からプレートを取り出し、空にして廃棄用容器に入れた。200μlのPost Coat溶液を各ウェルに加えた。この溶液は、1%ゼラチン水解物、2%スクロース、0.15M Tris(pH7.4)、0.17%Tween 20および0.02%チメロサル保存料から構成され、すべての試薬はSigma Chemicals社製である。プレートを加湿した袋に戻し、インキュベーター内に1時間放置した。

【0033】インキュベーションの間、サキナビル抗血清希釈液(H.R. Wiltshire, Anal. Biochem. 281, 105-114, 2000 参照のこと)を以下のようにして調製した。血清バイアルを温水中で解凍し、2μlの10%チメロサルを保存料として添加した。これを気泡が生じないように静かに混合した。Falconフレキシブルマイクロタイタープレートを用い、110μlのPBS/Tween(0.2%Tween 20含有リン酸緩衝生理食塩水)を第1列のウェル以外の各ウェルに添加することに

より血清希釈物を調製した。第1列のウェルには110  $\mu$ lの希釈度1:100の血清含有PBS/Tweenを添加した。第2列には、8口マイクロピペッター(8 place micropipettor)を用いて100  $\mu$ lの希釈度1:100の血清含有PBS/Tweenを添加し、ピペティングを3回繰り返すことにより混合した。次いで、第2列から110  $\mu$ lを第3列に移し、混合を繰り返した。この操作をプレートの各列について繰り返した。

【0034】コートしたプレートのインキュベーション終了後、PBS/Tweenで洗浄し、最後に吸引することによりコートしたプレートを空にした。8口マイクロピペッターを用い、希釈プレートの第12カラムから100  $\mu$ lをコートしたプレートの第12カラムに移した。次いで、第11カラムから100  $\mu$ lを移した(以下同様)。希釈抗体を移し終えた後、コートしたプレートを再度袋に入れて37で1時間インキュベートした。

【0035】インキュベーション完了の5分前に、Zymed ウサギ抗ヒツジIgG-HRPコンジュゲートをPBS/Tween中で1:2000に希釈し、静かに攪拌して十分に混合した。インキュベーション時間終了時、Bio Tek Instruments, Inc.社製 EL 404 プレート洗浄器を用い300  $\mu$ lのPBS/Tweenでプレートを4回洗浄した。次いで、100  $\mu$ lの希釈ウサギ抗ヒツジIgG-HRPコンジュゲートを各ウェルにピペティングし、プレートを再度袋に入れて1時間インキュベートした。

【0036】1時間後、プレートをインキュベーターと袋から取り出し、プレート洗浄器で6回洗浄した。次いで、100  $\mu$ lのK-BLUE酵素基質(Neogen, Inc.)を各ウェルに添加し、暗所で5分間、発色させた。100  $\mu$ lの1N塩酸を各ウェルに添加することにより発色を止めた。Molecular Devices, Inc, 社製 ThermoMaxプレートリーダーを用い、各ウェルの光学密度を2つの波長、405 nmおよび450 nmで測定した。450 nmでの目盛りにより、このリーダーの測定能は、高濃度のコンジュゲートおよび抗血清では目盛りが振り切れた(exceed)。したがって、OD<sub>405</sub> 測定値を用い、両波長での目盛りの線形最小二乗法回帰を用いる周知の方法により外挿OD<sub>450</sub> を算出した。

【0037】各希釈度の抗血清について、光学密度を各サキナビル/BSA濃度に対して、それぞれY軸、X軸にプロットすることにより得られたデータを解析した。これにより、12個の曲線が得られた。次に、光学密度対血清希釈度を各サキナビル/BSA濃度に対してプロットし、8つの曲線を含むグラフを得た。後者のグラフにより、サキナビル/BSAは、1:1000以下の抗サキナビル血清希釈物と併用した場合、0.125  $\mu$ g/ml以下の濃度で顕著なプロゾーン効果を示すことが

わかった。これらの2つのグラフから、62.5 ng/mlのコンジュゲートおよび1:12, 800希釈度の抗血清を併用することにした。

#### 【0038】実施例5

##### アッセイ特異性の測定

上記と同じ条件下で、ELISAプレートを上記濃度のサキナビル-BSAでコートした。プレートをポストコート(Post Coat)溶液でコートしている間に、1ml容96穴プレート中でサキナビル、リトナビル、インジナビルおよびネルフィナビルの段階3倍希釈物を調製した。すべての薬剤は、絶対メタノールで1mg/mlとし、使用時まで4で保存した。簡単には、まず各薬剤1  $\mu$ lをプレートの第1列のウェルに移した。なお、第1列の各ウェルは500  $\mu$ lのPBS/Tweenを含み、他の列のウェルはすべて200  $\mu$ lの同バッファーを含んだ。混合後、4つのカラムのそれぞれの第1列から100  $\mu$ lを第2列に移し、混合した。この操作を、各列について第7列が完了するまで繰り返した。第8列はバッファーのみを含み、各薬剤のゼロ濃度とした。

【0039】ポストコートインキュベーションの終了時、コートしたプレートを洗浄し、50  $\mu$ lの溶液を希釈プレートのH列からコートしたプレートのH列に移し、この操作を4チップマイクロピペッターを用いてG列からA列まで繰り返した。この操作の終了後、PBS/Tweenで1:12, 800に希釈した50  $\mu$ lのサキナビル抗血清を、コートしたプレートの各ウェルに添加した。プレートを上述のようにしてインキュベートした。1時間後、プレートを4回洗浄し、PBS/Tweenで1:2, 000に希釈した100  $\mu$ lのZymed ウサギ抗ヒツジIgG/HRPを添加し、上述のようにしてインキュベートした。さらにプレートを上述のようにして処理した。450 nmでの光学密度の読み取りにより、サキナビルでは用量応答曲線が得られ、ネルフィナビルでは応答が少なく、その他の薬剤では用量応答曲線は観察されなかった。これらのデータから、ネルフィナビルと交差反応した抗血清は0.4%程度と算出された。

#### 【0040】実施例6

##### 血清環境でのアッセイ性能

本実施例は、いくつかの変更を行った以外は実施例5と同様にして行う。評価した薬剤はサキナビルであり、薬剤の希釈剤は、100%正常ヒト血清とした。したがって、最後のアッセイは、PBS/Tweenで希釈した抗血清を半量(容積比)を加えた50%ヒト血清において行った。さらに、先の実施例で7段階の希釈を行ったようにして、本実施例では15段階の希釈を行った。実施例5においてゼロ濃度でない最低濃度の薬剤ではゼロ濃度の約50%の阻害を示したため、完全な阻害曲線を得るために希釈工程を増やす必要があった。すべての薬

剤濃度について3連の実験を行った。各薬剤濃度での3つのウェルの平均およびエラーバーを用いてデータを図式化し、図2に示す用量応答曲線を得た。グラフに示すように、アッセイは、1mlあたり1ng未満から1μgの範囲で行った。最低検出可能レベルは0.5ng/mlと推定される。

【0041】本実施例は、酵素結合免疫測定法によるヒト血清中の薬剤量の測定における、サキナビル-KLHに対する抗血清の使用法を示すものである。

【0042】

【発明の効果】本発明によれば、高処理量の治療薬モニタリングに適合し、安全であり、廃棄物処理の管理を必要としない、新規なHIVプロテアーゼインヒビターの検出のための非アイソトープ性免疫測定法および該方法\*

\*を実施するためのキットが提供される。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、実施例1~3に記載の[シス-1-オキソ-4-{1(S)-[1(S)-ベンジル-3-[3(S)-tert-ブチルカルバモイル-デカヒドロ-(4aS,8aS)-イソキノリン-2-イル]-2(R)-ヒドロキシ-プロピルカルバモイル]-2-カルバモイル-エチルカルバモイル}-ブチル]-BSAの合成を示す概略図である。

10 【図2】図2は、種々の濃度のサキナビルを含む試料を本発明に従ってアッセイした実施例6において得られた結果をプロットすることにより得られたグラフを示す図である。X軸はサキナビルの濃度であり、Y軸は450nmでの吸光度である。

【図2】

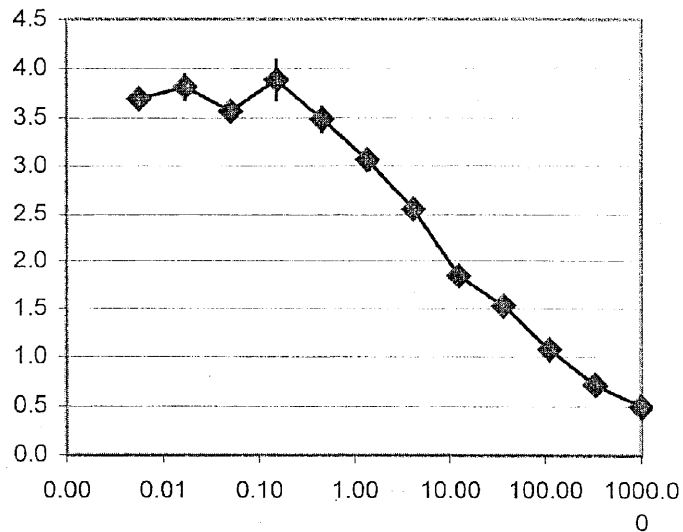


Figure 2

【図1】

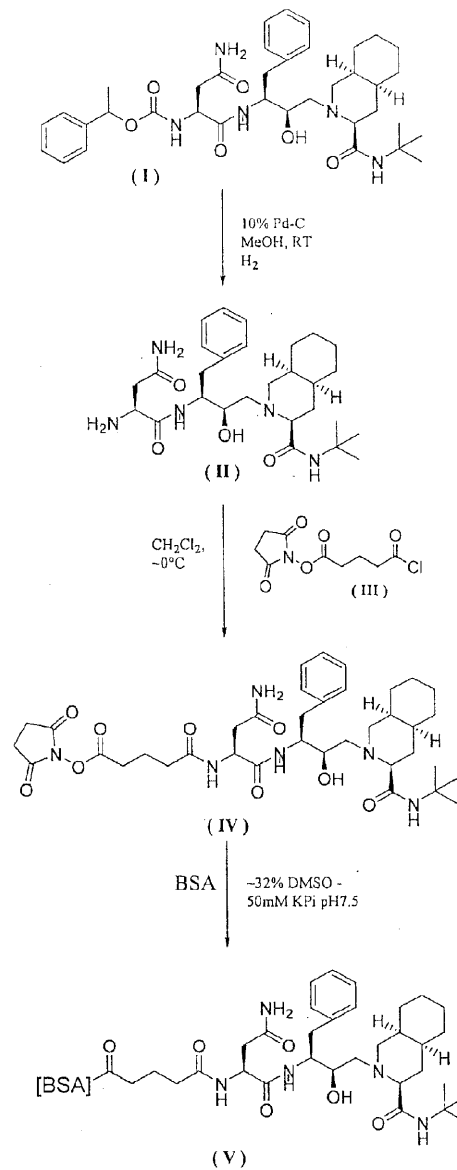


Figure 1

## 【手続補正書】

【提出日】平成13年11月14日(2001.11.14)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) HIVプロテアーゼインヒビターを含有すると思われる試料を、該インヒビターに特異的

なレセプター、ならびに該インヒビターのリガンドおよび非アイソトープ性シグナル生成部分を含有してなるコンジュゲートと合わせる工程、(b) 該シグナル生成部分により生じるシグナル生成をモニターすることにより、該コンジュゲートに結合した該レセプターの量を測定する工程、ならびに(c) 該シグナル生成を試料中の該インヒビターの存在または量と関連させる工程、を含む、試料中のHIVプロテアーゼインヒビターを測定するための免疫測定法。

【請求項2】 該プロテアーゼインヒビターが、サキナ

ビル、アンブレナビル、インジナビル、ネルフィナビルおよびリトナビルからなる群より選ばれる請求項1記載の方法。

【請求項3】 (a) HIVプロテアーゼインヒビターを含有すると思われる試料を、該プロテアーゼインヒビターのリガンドおよびミコフェノール酸を含有するコンジュゲート、該プロテアーゼインヒビターに特異的なレセプター、IMP、NADならびにIMP DHと合わせる工程、(b) NADHの生成をモニターする工程、ならびに(c) NADHの生成を試料中の該プロテアーゼインヒビターの存在または量と相関させる工程、を含む、試料中のHIVプロテアーゼインヒビターを測定す

るための非アイソトープ性免疫測定法。

【請求項4】 (a) HIVプロテアーゼインヒビターに特異的なレセプター、および(b)該インヒビターのリガンドおよび非アイソトープ性シグナル生成部分を含有してなるコンジュゲートをパッケージした組み合わせで含有する、試料中のHIVプロテアーゼインヒビターを測定するためのテストキット。

【請求項5】 該プロテアーゼインヒビターが、サキナビル、アンブレナビル、インジナビル、ネルフィナビルおよびリトナビルからなる群より選ばれてなる請求項4記載のテストキット。

フロントページの続き

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ01 QQ79 QR02  
QR48 QS15 QS26 QS36 QX02

专利名称(译)	HIV蛋白酶抑制剂的免疫测定		
公开(公告)号	<a href="#">JP2002207039A</a>	公开(公告)日	2002-07-26
申请号	JP2001347898	申请日	2001-11-13
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	サルバトーレジェイサラモン		
发明人	サルバトーレ ジェイ.サラモン		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/28 G01N33/569 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/94 C12Q1/34 G01N33/56988 G01N2333/16 G01N2333/81 G01N2333/8142		
FI分类号	G01N33/53.G C12Q1/28		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ01 4B063/QQ79 4B063/QR02 4B063/QR48 4B063/QS15 4B063/QS26 4B063/QS36 4B063/QX02		
优先权	09/712525 2000-11-14 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供用于检测HIV蛋白酶抑制剂的非同位素免疫测定法和用于实施免疫测定的试剂盒。解决方案：样品中HIV蛋白酶抑制剂的免疫测定包括 (a) 将含有HIV蛋白酶抑制剂的样品与含有抑制剂特异性受体的结合物，抑制剂配体和非同位素信号结合的方法。创建部分，(b) 通过监测信号产生部分产生的信号的产生来测量与受体结合的受体量的过程，以及 (c) 将信号的产生与存在或量相关联的过程样品中的抑制剂。用于测量样品中HIV蛋白酶抑制剂的测试试剂盒包含在包装的组合中 (a) HIV蛋白酶抑制剂特异性受体和 (b) 含有抑制剂配体和非同位素信号产生部分的缀合物。

