

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公表特許公報** ( A ) (11)特許出願公表番号

特表2002 - 539450

(P2002 - 539450A)

(43)公表日 平成14年11月19日(2002.11.19)

(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
33/543	551	33/543	551 A

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 84数)

(21)出願番号 特願2000 - 605205(P2000 - 605205)

(86) (22)出願日 平成12年3月9日(2000.3.9)

(85)翻訳文提出日 平成13年9月17日(2001.9.17)

(86)国際出願番号 PCT/CA00/00246

(87)国際公開番号 W000/55624

(87)国際公開日 平成12年9月21日(2000.9.21)

(31)優先権主張番号 60/124,488

(32)優先日 平成11年3月15日(1999.3.15)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 レイランド - ジョーンズ, ブライアン  
カナダ国ケベック アーシュ1カ・4セー5,  
アンジュ, ボディニエ 7816

(71)出願人 ウォン, ピエール  
カナダ国ケベック アーシュ2イクス・2  
ペー4, モンレアル, エイルメ 3415, アパー  
トメント 4

(72)発明者 レイランド - ジョーンズ, ブライアン  
カナダ国ケベック アーシュ1カ・4セー5,  
アンジュ, ボディニエ 7816

(74)代理人 弁理士 社本 一夫 (外5名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 代謝表現型決定のための E L I S A キット

(57)【要約】

本発明は臨床実験室における日常的な基準で使用できる、CYP1A2、N - アセチルトランスフェラーゼ - 1 (NAT - 1)、CYP2P6、CYP2E1およびCYP3A4を含む(これらに限定されるわけではない)代謝表現型の迅速な決定のための酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) に関する。ELISAキットは医者に a) テオフィリン、タモキシフェンおよびクロザピンのような薬剤の個別化治療、および b) 結腸直腸癌のような発癌物質誘導疾患に対する感受性の予測を可能にしている。臨床試験を受ける患者の数を減少させるため、最も応答しそうな適当な表現型を持つ患者を選択する。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 個体のCYP1A2表現型を決定する方法であって、各々カフェインまたは異なったカフェイン代謝産物に特異的な少なくとも三つの抗体で、カフェイン溶液を飲んだ後に該個体の生物学的試料中のカフェインおよびカフェインの第一および第二の異なった代謝産物のモル比を測定することから成り、ここで4のモル比は遅い中間体の指標であり、12は速いCYP1A2代謝体の指標であり、および該モル比は該個体のCYP1A2表現型の指標である、方法。

【請求項2】 該第一のカフェイン代謝産物が1,7-ジメチルキサンチン(1,7-DMX)および図3に例示されたものから成る群より選択される；該第二のカフェイン代謝産物が1,7-ジメチル尿酸(1,7-DMU)および図4に例示されたものから成る群より選択される；および該第三の代謝産物が1,3,7-トリメチルキサンチン(カフェイン)および図2に例示されたものから成る群より選択される請求項1に記載の方法。

【請求項3】 該生物学的試料が尿試料である請求項2に記載の方法。

【請求項4】 該個体の該決定されたCYP1A2表現型が医者に発癌物質誘導疾患への感受性を予測するおよび/または薬剤処置を個別化するのを可能にする請求項3に記載の方法。

【請求項5】 CYP1A2表現型を決定するための競合的酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)法であって、カフェイン溶液を飲んだ後に個体の生物学的試料中のカフェインまたは異なったカフェイン代謝産物のモル比を測定するために、各々それらに特異的な少なくとも三つの抗体を使用することから成り、ここで4のモル比は遅い中間体の指標であり、12は速いCYP1A2代謝体の指標であり、および該モル比は該個体のCYP1A2表現型の指標である、ELISA法。

【請求項6】 該第一のカフェイン代謝産物が1,7-ジメチルキサンチン(1,7-DMX)および図3に例示されたものから成る群より選択される；該第二のカフェイン代謝産物が1,7-ジメチル尿酸(1,7-DMU)および図4に例示されたものから成る群より選択される；および該第三の代謝産物が1,

3, 7 - トリメチルキサンチン (カフェイン) および図2に例示されたものから成る群より選択される、請求項5に記載のELISA法。

【請求項7】 該生物学的試料が尿試料である請求項6に記載のELISA法。

【請求項8】 該個体の該決定されたCYP1A2表現型が医者に発癌物質誘導疾患への感受性を予測するおよび/または薬剤処置を個別化するのを可能にする請求項7に記載のELISA法。

【請求項9】 CYP1A2表現型を決定するための競合的酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)キットであって、カフェイン溶液を飲んだ後に個体の生物学的試料中のそれらのモル比を測定するために、各々それらに特異的な少なくとも三つの抗体を含み、ここで4のモル比は遅い中間体の指標であり、12は速いCYP1A2代謝体の指標であり、および該モル比は該個体のCYP1A2表現型の指標である、キット。

【請求項10】 さらに

- a) カフェインに特異的な第一の抗体で被覆されたプレート；
- b) カフェインの第一の代謝産物に特異的な第二の抗体；
- c) カフェインの第二の代謝産物に特異的な第三の抗体；
- d) 標準検量線が得られる既知量のカフェイン - 西洋ワサビペルオキシダーゼ抱合体；
- e) 標準検量線が得られる既知量の1, 7 - ジメチルキサンチン - 西洋ワサビペルオキシダーゼ抱合体；および
- f) 標準検量線が得られる既知量の1, 7 - ジメチル尿酸 - 西洋ワサビペルオキシダーゼ抱合体を含む請求項9に記載の競合的ELISAキット。

【請求項11】 該特異的抗体がポリクローナルまたはモノクローナル抗体である請求項1に記載の方法。

【請求項12】 該特異的抗体がポリクローナル抗体である請求項1に記載の方法。

【請求項13】 該特異的抗体がポリクローナルまたはモノクローナル抗体である請求項5に記載の競合的抗原酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)。

【請求項14】 該特異的抗体がポリクローナル抗体である請求項5に記載の競合的抗原酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）。

【請求項15】 該特異的抗体がポリクローナルまたはモノクローナル抗体である請求項10に記載の競合的ELISAキット。

【請求項16】 該特異的抗体がポリクローナル抗体である請求項10に記載の競合的ELISAキット。

【請求項17】 個体のNAT1表現型を決定する方法であって、各々p - アミノサリチル酸または異なったp - アミノサリチル酸代謝産物に特異的な少なくとも2つの抗体で、p - アミノサリチル酸を消費した後に個体の生物学的試料中のp - アミノサリチル酸のモル比を測定することから成り、および該モル比は該個体のNAT1表現型の指標である、方法。

【請求項18】 第一のp - アミノサリチル酸代謝産物が4 - オキシメチル - アミノサリチル酸および図1に例示したものから成る群より選択され、ここでp - アミノサリチル酸が選択され図1に例示されている、請求項17に記載の方法。

【請求項19】 該生物学的試料が尿試料である請求項18に記載の方法。

【請求項20】 該個体の該決定されたNAT1表現型が医者に発癌物質誘導疾患への感受性を予測するおよび/または薬剤処置を個別化するのを可能にする請求項19に記載の方法。

【請求項21】 NAT1表現型を決定するための競合的酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）法であって、p - アミノサリチル酸を消費した後に個体の生物学的試料中のp - アミノサリチル酸またはp - アミノサリチル酸代謝産物のモル比を測定するために、各々それらに特異的な少なくとも2つの抗体を使用することから成り、および該モル比は該個体のNAT1表現型の指標である、ELISA法。

【請求項22】 第一のp - アミノサリチル酸代謝産物が4 - オキシメチル - アミノサリチル酸および図1に例示したものから成る群より選択され、ここでp - アミノサリチル酸が選択され図1に例示されている、請求項21に記載のELISA法。

【請求項23】 該生物学的試料が尿試料である請求項22に記載のELISA法。

【請求項24】 該個体の該決定されたNAT1表現型が医者に発癌物質誘導疾患への感受性を予測するおよび/または薬剤処置を個別化するのを可能にする請求項23に記載のELISA法。

【請求項25】 NAT1表現型を決定するための競合的酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)キットであって、p-アミノサリチル酸を消費した後に個体の生物学的試料中のp-アミノサリチル酸またはp-アミノサリチル酸代謝産物のモル比を測定するために、各々それらに特異的な少なくとも2つの抗体を含み、および該モル比は該個体のNAT1表現型の指標である、キット。

【請求項26】 さらに

- a) p-アミノサリチル酸に特異的な第一の抗体で被覆されたプレート；
- b) p-アミノサリチル酸の第一の代謝産物に特異的な第二の抗体；
- c) 標準検量線が得られる既知量のp-アミノサリチル酸-西洋ワサビペルオキシダーゼ抱合体；
- d) 標準検量線が得られる既知量のp-アミノサリチル酸代謝産物-西洋ワサビペルオキシダーゼ抱合体を含む請求項25に記載の競合的ELISAキット。

【請求項27】 該特異的抗体がポリクローナルまたはモノクローナル抗体である請求項17に記載の方法。

【請求項28】 該特異的抗体がポリクローナル抗体である請求項17に記載の方法。

【請求項29】 該特異的抗体がポリクローナルまたはモノクローナル抗体である請求項21に記載の競合的抗原酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)。

【請求項30】 該特異的抗体がポリクローナル抗体である請求項21に記載の競合的抗原酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)。

【請求項31】 該特異的抗体がポリクローナルまたはモノクローナル抗体である請求項26に記載の競合的ELISAキット。

【請求項32】 該特異的抗体がポリクローナル抗体である請求項26に記載

載の競合的E L I S Aキット。

【請求項33】 個体のC Y P 2 D 6表現型を決定する方法であって、各々デキストロメトルファンまたは代謝産物に特異的な少なくとも2つの抗体で、デキストロメトルファンを消費した後に該個体の生物学的試料中の第一および第二のデキストロメトルファンの異なった代謝産物のモル比を測定することから成り、モル比 > 1は遅い中間体の指標でありおよびモル比 < 1は速いC Y P 2 D 6代謝体の指標であり、および該モル比は該個体のC Y P 2 D 6表現型の指標である、方法。

【請求項34】 第一のデキストロメトルファン代謝産物が3 - ヒドロキシ - 17 - メチルモルフィナンおよび図5に例示されたものから成る群より選択され、およびデキストロメトルファンが選択され、図5に例示されている、請求項33に記載の方法。

【請求項35】 該生物学的試料が尿試料である請求項34に記載の方法。

【請求項36】 該個体の該決定されたC Y P 2 D 6表現型が医者に発癌物質誘導疾患への感受性を予測するおよび/または薬剤処置を個別化するのを可能にする請求項35に記載の方法。

【請求項37】 C Y P 2 D 6表現型を決定するための競合的酵素結合免疫吸着アッセイ ( E L I S A ) 法であって、デキストロメトルファンを消費した後に個体の生物学的試料中のデキストロメトルファンまたはデキストロメトルファン代謝産物のモル比を測定するために、各々それらに特異的な少なくとも2つの抗体を使用することから成り、ここでモル比 > 1は遅い指標でありおよびモル比 < 1は速いC Y P 2 D 6代謝体の指標であり、および該モル比は該個体のC Y P 2 D 6表現型の指標である、E L I S A法。

【請求項38】 3 - ヒドロキシ - 17 - メチルモルフィナンおよび図5に例示されたものから成る群より選択され、デキストロメトルファンが選択され、図5に例示されている、請求項37に記載のE L I S A方法。

【請求項39】 該生物学的試料が尿試料である請求項38に記載のE L I S A法。

【請求項40】 該個体の該決定されたC Y P 2 D 6表現型が医者に発癌物

質誘導疾患への感受性を予測するおよび/または薬剤処置を個別化するのを可能にする請求項38に記載のELISA法。

【請求項41】 CYP2D6表現型を決定するための競合的酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)キットであって、デキストロメトルファンを消費した後、個体の生物学的試料中のデキストロメトルファンの異なった代謝産物のモル比を測定するために、各々それらに特異的な少なくとも2つの抗体を含み、ここでモル比>1は遅い指標でありおよびモル比<1は速いCYP2D6代謝体の指標であり、および該モル比は該個体のCYP2D6表現型の指標である、キット。

【請求項42】 さらに

- a) デキストロメトルファンに特異的な第一の抗体で被覆されたプレート；
- b) デキストロメトルファンの第一の代謝産物に特異的な第二の抗体；
- c) 標準検量線が得られる既知量のデキストロメトルファン - 西洋ワサビペルオキシダーゼ抱合体；
- d) 標準検量線が得られる既知量のデキストロメトルファン代謝産物 - 西洋ワサビペルオキシダーゼ抱合体を含む請求項41に記載の競合的ELISAキット。

【請求項43】 該特異的抗体がポリクローナルまたはモノクローナル抗体である請求項33に記載の方法。

【請求項44】 該特異的抗体がポリクローナル抗体である請求項33に記載の方法。

【請求項45】 該特異的抗体がポリクローナルまたはモノクローナル抗体である請求項37に記載の競合的酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)。

【請求項46】 該特異的抗体がポリクローナル抗体である請求項37に記載の競合的酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)。

【請求項47】 該特異的抗体がポリクローナルまたはモノクローナル抗体である請求項42に記載の競合的ELISAキット。

【請求項48】 該特異的抗体がポリクローナル抗体である請求項42に記載の競合的ELISAキット。

【請求項49】 個体のCYP2E1表現型を決定する方法であって、各々

クロルゾキサゾンの異なった代謝産物に特異的な少なくとも2つの抗体で、クロルゾキサゾンを消費した後に該個体の生物学的試料中の第一および第二のクロルゾキサゾンの異なった代謝産物のモル比を測定することから成り、モル比は該個体のCYP2E1表現型の指標である、方法。

【請求項50】 第一のクロルゾキサゾン代謝産物が5 - クロロ - 6 - ヒドロキシ - ベンゾオキサゾールおよび図6に例示されたものから成る群より選択され、ここでクロルゾキサゾンが選択され図6に例示されている、請求項49に記載の方法。

【請求項51】 該生物学的試料が尿試料である請求項50に記載の方法。

【請求項52】 該個体の該決定されたCYP2E1表現型が医者に発癌物質誘導疾患への感受性を予測するおよび/または薬剤処置を個別化するのを可能にする請求項51に記載の方法。

【請求項53】 CYP2E1表現型を決定するための競合的酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)キットであって、クロルゾキサゾンを消費した後に個体の生物学的試料中のクロルゾキサゾンの異なった代謝産物のモル比を測定するために、各々それらに特異的な少なくとも2つの抗体を含み、該モル比は該個体のCYP2E1表現型の指標である、キット。

【請求項54】 第一のクロルゾキサゾン代謝産物が5 - クロロ - 6 - ヒドロキシ - ベンゾオキサゾールおよび図6に例示されたものから成る群より選択され、およびクロルゾキサゾンが選択され図6に例示されている、請求項53に記載のELISA法。

【請求項55】 該生物学的試料が尿試料である請求項53に記載のELISA法。

【請求項56】 該個体の該決定されたCYP2E1表現型が医者に発癌物質誘導疾患への感受性を予測するおよび/または薬剤処置を個別化するのを可能にする請求項53に記載のELISA法。

【請求項57】 CYP2E1表現型を決定するための競合的酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)キットであって、クロルゾキサゾンを消費した後に個体の生物学的試料中のクロルゾキサゾンの異なった代謝産物のモル比を測定す

るために、各々それらに特異的な少なくとも2つの抗体を含み、該モル比は該個体のCYP2E1表現型の指標である、キット。

【請求項58】 さらに

- a) クロルゾキサゾンに特異的な第一の抗体で被覆されたプレート；
- b) クロルゾキサゾンの第一の代謝産物に特異的な第二の抗体；
- c) 標準検量線が得られる既知量のクロルゾキサゾン - 西洋ワサビペルオキシダーゼ抱合体；
- d) 標準検量線が得られる既知量のクロルゾキサゾン代謝産物 - 西洋ワサビペルオキシダーゼ抱合体を含む請求項57に記載の競合的ELISAキット。

【請求項59】 該特異的抗体がポリクローナルまたはモノクローナル抗体である請求項49に記載の方法。

【請求項60】 該特異的抗体がポリクローナル抗体である請求項49に記載の方法。

【請求項61】 該特異的抗体がポリクローナルまたはモノクローナル抗体である請求項53に記載の競合的抗原酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)。

【請求項62】 該特異的抗体がポリクローナル抗体である請求項53に記載の競合的抗原酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)。

【請求項63】 該特異的抗体がポリクローナルまたはモノクローナル抗体である請求項58に記載の競合的ELISAキット。

【請求項64】 該特異的抗体がポリクローナル抗体である請求項58に記載の競合的ELISAキット。

【請求項65】 個体のCYP3A4表現型を決定する方法であって、各々デキストロメトルファンまたはデキストロメトルファンの代謝産物に特異的な少なくとも2つの抗体で、デキストロメトルファンを消費した後に該個体の生物学的試料中のデキストロメトルファンの第一および第二の異なった代謝産物のモル比を測定することから成り、該モル比は該個体のCYP3A4表現型の指標である、方法。

【請求項66】 第一のデキストロメトルファン代謝産物が3 - メトキシ -

モルフィナンおよび図7に例示されたものから成る群より選択され、およびデキストロメトルファンが選択され図7に例示されている、請求項65に記載の方法。

【請求項67】 該生物学的試料が尿試料である請求項66に記載の方法。

【請求項68】 該個体の該決定されたCYP3A4表現型が医者に発癌物質誘導疾患への感受性を予測するおよび/または薬剤処置を個別化するのを可能にする請求項67に記載の方法。

【請求項69】 CYP3A4表現型を決定するための競合的酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)キットであって、デキストロメトルファンを消費した後に個体の生物学的試料中のデキストロメトルファンの異なった代謝産物のモル比を測定するために、各々それらに特異的な少なくとも2つの抗体を含み、該モル比は該個体のCYP3A4表現型の指標である、キット。

【請求項70】 第一のデキストロメトルファン代謝産物が3-メトキシモルフィナンおよび図7に例示されたものから成る群より選択され、およびデキストロメトルファンが選択され図7に例示されている、請求項69に記載のELISA法。

【請求項71】 該生物学的試料が尿試料である請求項69に記載のELISA法。

【請求項72】 該個体の該決定されたCYP3A4表現型が医者に発癌物質誘導疾患への感受性を予測するおよび/または薬剤処置を個別化するのを可能にする請求項69に記載のELISA法。

【請求項73】 CYP3A4表現型を決定するための競合的酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)キットであって、デキストロメトルファンを消費した後に個体の生物学的試料中のデキストロメトルファンの異なった代謝産物のモル比を測定するために、各々それらに特異的な少なくとも2つの抗体を含み、該モル比は該個体のCYP3A4表現型の指標である、キット。

【請求項74】 さらに

- a) デキストロメトルファンに特異的な第一の抗体で被覆されたプレート；
- b) デキストロメトルファンの第一の代謝産物に特異的な第二の抗体；

c) 標準検量線が得られる既知量のデキストロメトルファン - 西洋ワサビペルオキシダーゼ抱合体 ;

d) 標準検量線が得られる既知量のデキストロメトルファン代謝産物 - 西洋ワサビペルオキシダーゼ抱合体を含む請求項73に記載の競合的ELISAキット。

【請求項75】 該特異的抗体がポリクローナルまたはモノクローナル抗体である請求項65に記載の方法。

【請求項76】 該特異的抗体がポリクローナル抗体である請求項65に記載の方法。

【請求項77】 該特異的抗体がポリクローナルまたはモノクローナル抗体である請求項69に記載の競合的抗原酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)

。

【請求項78】 該特異的抗体がポリクローナル抗体である請求項69に記載の競合的抗原酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)。

【請求項79】 該特異的抗体がポリクローナルまたはモノクローナル抗体である請求項74に記載の競合的ELISAキット。

【請求項80】 該特異的抗体がポリクローナル抗体である請求項74に記載の競合的ELISAキット。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****発明の背景****(a) 技術分野**

本発明は以下の酵素、CYP 1A2、N-アセチルトランスフェラーゼ-1 (NAT-1)、CYP 2D6、CYP 2E1およびCYP 3A4を含む(しかし、これらに限定されるわけではない)代謝表現型の迅速な決定のための酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)に関する。ELISAキット使用は臨床実験室における日常的な基準での使用、および医者にa)これらの酵素により代謝される多数の薬剤の個別化した治療、b)多くの癌を含む発癌物質誘導疾患への感受性の予測、および最も応答しそうな適した表現型により患者を選択することにより臨床試験を受けている患者の数を減少させることを可能にすることが含まれるが、これらに限定されるわけではない。

**(b) 従来技術**

ヒトに投与される大多数の薬剤(または非生体物質)について、それらの運命はより毒性の少ないおよび親油性の形に肝臓で代謝され、続いて尿中に排泄されることである。それらの代謝には連続して働く2つの系が含まれている:酸化反応を触媒し、およびミクロソーム分画に局在している少なくとも20の酵素を含むチトクロームP450系、および少なくとも5つの酵素を含む抱合系。薬剤代謝の速度は、各々の系内の酵素多形性の存在のため個人間および人種間で異なっている。2つまたは3つの表現型が区別できる:不十分な代謝体(PM)、高度な代謝体(EM)および超高度な代謝体(UEM)。表現型の知識は以下のような理由で臨床的に有用である:

- a) 表現型は化学的、植物、疾患および癌における毒性に関連している。
- b) 個人に基づいた薬剤投与計画を医者が処方することを可能にする。
- c) 治療薬剤の設計における理論的根拠を提供する。

**【0002】**

現在、表現型は臨床実験室では容易に利用できないような高速液体クロマトグラフィー(HPLC)またはキャピラリー電気泳動(CE)法を使用することに

よる、尿試料中の薬剤またはプローブ薬剤の代謝産物のモル比測定で決定される

。

### 【0003】

#### 特許の代謝酵素により代謝された薬剤

酵素NAT-1、CYP1A2、CYP2D6、CYP2E1およびCYP3A4は多数の薬剤の代謝に関与している。表1には代謝される広範な薬物療法および関与する酵素が掲げられている。これらには喘息（テオフィリン）、マラリア（ダブソン）、乳癌（タモキシフェン）、心血管疾患（プロカイニミド）、臓器移植（シクロスポリン）、鎮痛剤（アセトアミノフェン、コデイン）、一般麻酔薬（リドカイン）および穏和安定薬（バリウム）のような共通の投薬を含む種々の疾患に使用される薬剤が含まれている。スクリーニングがこれらの酵素に応用できる広範な薬物療法は、迅速な表現型スクリーニングは患者処置の結果および安全性を決める可能性および影響力を持つことを示している。

表1 CMPDにより表現型分類された非生体物質酵素により代謝される薬剤

### 【0004】

#### 【表1】

酵素	薬剤
NAT1	p-アミノ安息香酸、p-アミノサリチル酸、 ダブソン
CYP1A2	カフェイン、テオフィリン、イミプラミン、プロプラノール、 クロザピン、17β-エストラジオール（性ホルモン） ウロルボルヒリノーゲン、リドカイン、プロパフェノン、 タモキシフェン（抗エストロゲン）
CYP2D6	向精神薬：アミフラミン、アミトリプチリン、クロミプラミン、 クロザピン、デシプラミン、ハロペリドール、イミプラミン、 マプロチリン、メトキシフェナミン、ミナプリン、 ノルトリプチリン、パロキセチン、ペルフェナジン、 レモキシプリド、チオリダジン、トモキセチン、 トリフロペリドール、ズクロペンチキソール 心臓血管薬：ブフラロール、デブリソキン、エンカイニド、 フレカイニド、グアノキサソ、インドラミン、メトプロロール、 メキシレチン、n-プロピルアジマリン、プロパフェノン、 プロプラノロール、スパルテイン、チモロール、ベラパミール その他の薬剤：クロロプロパミド、コデイン、 デキストロメトルファン、メタアンフェタミン、 ペルヘキシレン、フェンフォルミン
CYP2E1	エタノール、アセトン、アセトアミノフェン、ニトロサミン、 ニトロソジメチルアミン、p-ニトロフェノール
CYP3A4	ベンゾジアゼピン、シクロスポリン、デキストロメトルファン、 ジヒドロピリジン、ドキシソルビシン、エリスロマイシン、 エトボシド、リドカイン、ロバスタチン、ミダゾラム、 パクリタキセル、タモキシフェン カルシウムチャンネルブロッカー：ニフェジピン、 ディルチアゼム、ベラパミール

### 【0005】

#### 代謝酵素と改変された癌感受性の関連

代謝酵素は多くの発癌性化合物の代謝に関与している。従って、これらの酵素活性の変化は多くの発癌物質の生物学的活性を変化させる。表2は該酵素により代謝される非生体物質を掲げている。

表2 酵素およびそれらが代謝する発癌物質

【0006】

【表2】

酵素	発癌物質
NAT1	ジアミノベンジジン、N-ヒドロキシ-4-アミノピフェニル； ヘテロ環式芳香族アミン (MeIQxおよびPhIP)
NAT2	4-アミノピフェニル、ジアミノベンジジン、ヘテロ環式芳香族 アミン (MeIQxおよびPhIP)
CYP1A2	4-アミノピフェニル、ヘテロ環式芳香族アミン (MeIQx、 PhIP)、4-メチルニトロソアミノ-1-(3-ピリジル- 1-ブタノン) (NNK、タバコ煙生成物)
CYP2D6	多くの発癌物質の代謝に関与している、しかしながら、それらの 主代謝体とは未だ報告されていない
CYP2E1	ニトロソジメチルアミン、ニトロソピロリドン、ベンゼン、 四塩化炭素、3-ヒドロキシピリジン (タバコ煙生成物)
CYP3A4	N'-ニトロソノルニコチン (NNN)、4-メチルニトロソア ミノ-1-(3-ピリジル-1-ブタノン) (NNK)、5-メ チルクリセン、4, 4'-メチレン-ビス (2-クロロアニリ ン) (タバコ煙生成物)

【0007】

癌に関連する代謝酵素表現型

癌発育に影響する因子は多因子的であり、ただ一つの因子を癌と関連づけるのは困難である。しかしながら、現在の研究は異なった代謝表現型とある種の癌の危険性増加を結び付けている。

【0008】

表3はこれらの酵素により表現型分類された代謝酵素および改変された表現型が増加した感受性と結び付けられた癌を掲げている。

表3 癌発生と関連した非生体物質代謝酵素

【0009】

【表3】

酵素	遺伝子型	癌	注
NAT1	NAT*10	結腸直腸 膀胱	OR=1.9;95%CI=1.2-3.2 ベンジジンを代謝
CYP1A2	速い+ 速い+NAT2	結腸直腸	対照16%に対して35%
CYP2D6	速い+ 遅いNAT2	肝細胞	OR=2.6;95%CI=1.6-4
CYP2E1	c2	胃	OR=23.6-25.7
CYP3A4	変化した表現型と変化した癌感受性が相関した研究はない		

## 【0010】

NAT1

NAT1 遺伝子は長い間単形性として分類されてきた。しかしながら、現在は NAT1 は他の N - アセチルトランスフェラーゼ ( NAT2 ) と同様に多形性であることが示唆されている。NAT1 は遅いおよび速い代謝体の二つの表現型を持っている ( 例えば、各々 NAT1\*4 vs . NAT1\*10 遺伝子型 ) 。 NAT1 活性の測定は以下のような理由で臨床的に興味を持たれる。

## 多形性

NAT1 は多形性であり、二つの代謝表現型が区別できる：速いおよび遅い代謝体。NAT1 は p - アミノ安息香酸、p - アミノサリチル酸およびダブソンを含むいくつかの薬剤および食品成分を代謝する。

## 【0011】

加えて、NAT1 は環境前発癌物質、特にジアミノベンジジン、N - ヒドロキシ - 4 - アミノピフェノール、ヘテロ環式芳香族アミン ( MeIQx および PhIP ) 、を活性化する。一つの研究において、NAT1\*10 対立遺伝子を持つ、よって速い N - アセチル化を起こす個体で直腸結腸癌の危険率が増加していること ( OR = 1 . 9 ; CI = 1 . 2 - 3 . 2 ) が示されているが、別の研究では膀胱癌の危険率が増加していることが示されている ( ベンジジンを代謝 ) 。

## 人種間相違

NAT1 の活性は与えられた集団により広く変化する。遅いおよび速い NAT

1 表現型が区別されている。速い代謝表現型に関連する NAT 1\*10 遺伝子型が三つの異なった人種集団でモニターされた、インド人、マレーシア人および中国人。NAT 1\*10 対立遺伝子の頻度は各々 17%、39% および 30% であった。一方、遅い代謝体に関連する NAT 1\*4 遺伝子型は同一の集団において各々 50%、30% および 35% の頻度を持っていた。従って、薬剤代謝研究においては、各々の人種は多形性の証拠のため別々に研究しなければならない、およびそのアンチノードを一つの人種から他の人種へ外挿するべきではないことは道理に合っている。

### ダブソン

薬剤投与において表現型分類が必要な古典的な例はダブソンの場合である。ダブソンはマラリアの治療に使用され、AIDS 患者におけるニューモシスティスカリニ肺炎の治療について調べられている。副作用には発疹、貧血、メトヘモグロビン血症、顆粒球減少症および肝臓不全が挙げられる。ダブソンは NAT 1 代謝系により体から取り除かれる。遅いアセチル化とダブソンの副作用の増加の間に相関が示されている（遅いおよび速いアセチル化体に対して各々 46% vs . 17%）。これらの理由のため信頼できる表現型分類試験の効用は明白である。

### 個別化治療

多くの薬剤に対して個別化治療が可能ながよく知られている（テオフィリン、ジゴキシン、アミノグリコシダーゼ、ダブソンその他）。しかしながら、治療の個別化は、薬剤表現型分類のために使用される方法が、費用がかかり、時間がかかり、および臨床実験室では容易に利用できない専門的意見を必要とする高速液体クロマトグラフィー（HPLC）またはキャピラリー電気泳動（CE）を含んでいるので、開発がなかなか進んでいない。

#### 【0012】

広範囲の毒性の可能性のある薬剤に対する応答および副作用プロファイルを予測するために、無毒の薬剤を使用して個体の NAT 1 表現型を決定するための方法が強く求められているであろう。

#### 【0013】

最少の訓練しかしていない技術者により、および複雑な装置を必要としない日

常的な基準で達成できるであろう、NAT1 表現型分類のための酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) キットを提供することが強く求められているであろう。

#### 【0014】

ダブソンのような薬剤の個別化治療を医者に可能にするであろう、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) キットを提供することが強く求められているであろう。

#### CYP1A2

CYP1A2 はヒト肝臓中の全 CYP450 酵素の 15% を構成する。CYP1A2 活性の測定は以下の理由で臨床的に興味を持たれる：

##### 多形性

CYP1A2 は多形性であろうが、確固として確立することはなされていない。三つの代謝的表現型が区別できる：速い、中程度および遅い代謝体。CYP1A2 はアセトアミノフェン、アンチピリン、17 $\beta$ -エストラジオール、カフェイン、クロイプラミン、クロザピン、フルタミド (抗アンドロゲン)、イミプラミン、パラセタモール、フェナセチン、タクリンおよびテオフィリンを含むいくつかの薬剤および食品成分を代謝する。

#### 【0015】

加えて、CYP1A2 は環境前発癌物質、特にヘテロ環式アミンおよび芳香族アミンを活性化する。一つの研究において、速い N-アセチル化を起こし、および高い CYP1A2 活性を持つ個体で直腸結腸癌の危険率が増加している (16% の対照に対して 35%、OR = 2.79 (P = 0.002)) ことが示されている。

##### 誘導および阻害

CYP1A2 はオメプラゾール、イアンソプラゾール、多芳香環炭化水素およびタバコの煙のような多くの薬剤および環境因子により誘導される。CYP1A2 は経口避妊薬、ケトコナゾール、 $\beta$ -ナフトフラボン、フルボキサミン (セロニン取り込み阻害剤)、フラフィリンにより阻害される。

##### 人種間相違

CYP1A2の活性は与えられた集団により大きく変化する(60から70倍)。遅い、中程度および速いCYP1A2表現型が区別されている。これら三つのCYP1A2表現型の比率は人種間および国間で変化している:米国、アフリカ系アメリカ人、中国、日本、イタリアおよびオーストラリアにおける中程度の%は各々50、70、60、>95、60および20である。薬剤代謝研究においては、各々の人種は多形性の証拠のため別々に研究しなければならない、およびそのアンチノードを一つの人種から他の人種へ外挿するべきではないことは道理に合っている。

#### テオフィリン

薬剤投与において表現型分類が必要な古典的な例はテオフィリンの場合である。テオフィリンは発疹の治療に使用される。しかしながら、テオフィリン毒性は共通の臨床問題であり続けており、生命を脅かす心臓血管および神経学的毒性が含まれている。テオフィリンはCYP1A2代謝系により体から取り除かれる。キノロン抗生物質またはセロトニン再吸収阻害剤によるCYP1A2の阻害はテオフィリン毒性を生じるであろう。これらの理由のため信頼できる表現型分類試験の効用は明白である。

#### 個別化治療

多くの薬剤に対して個別化治療が可能ながよく知られている(テオフィリン、ジゴキシン、アミノグリコシダーゼ、その他)。しかしながら、治療の個別化は、薬剤表現型分類のために使用される方法が、費用がかかり、時間がかかり、および臨床実験室では容易に利用できない専門的意見を必要とする高速液体クロマトグラフィー(HPLC)またはキャピラリー電気泳動(CE)を含んでいるので、開発がなかなか進んでいない。

#### 【0016】

広範囲の毒性の可能性のある薬剤に対する応答および副作用プロファイルを予測するために、無毒の薬剤を使用して個体のCYP1A2表現型を決定するための方法が強く求められているであろう。

#### 【0017】

最少の訓練しかしていない技術者により、および複雑な装置を必要としない日

常的な基準で達成できるであろう、CYP1A2表現型分類のための酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)キットを提供することが強く求められているであろう。

#### 【0018】

テオフィリン、タモキシフェンまたはクロザピンのような薬剤の個別化治療を医者に可能にするであろう、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)キットを提供することが強く求められているであろう。

#### 【0019】

### CYP2D6

CYP2D6はヒト肝臓中の全CYP450酵素の1-3%を構成する。CYP2D6活性の測定は以下の理由で臨床的に興味を持たれる：

#### 多形性

CYP2D6はヒトにおいて多形性発現が示された最初のP450酵素である。三つの代謝的表現型が区別可能である：不十分な(PM)、高度な(EM)および超高度な(UEM)表現型。CYP2D6は下記のものを含む広範囲の薬剤および食品成分を代謝する：

#### 向精神薬：

アミフラミン、アミトリプチリン、クロミプラミン、クロザピン、デシプラミン、ハロペリドール、イミプラミン、マプロチリン、メトキシフェナミン、ミナプリリン、ノルトリプチリン、パロキセチン、ペルフェナジン、レモキシプリド、チオリダジン、トモキセチン、トリフロペリドール、ズクロペンチキソール

#### 心臓血管薬：

ブフラロール、デブリソキン、エンカイニド、フレカイニド、グアノキサソ、インドラミン、メトプロロール、メキシレチン、n-プロピルアジマリン、プロパフェノン、プロプラノロール、スパルテイン、チモロール、ベラパミール

#### その他の薬剤：

クロロプロパミド、コデイン、デキストロメトर्फアン、メタアンフェタミン、ペルヘキシレン、フェンフォルミン。

#### 【0020】

加えて、CYP2D6は多くの発癌物質の代謝に関与しているが、未だに主代謝体としては報告されていない。一つの研究において、速いCYP2D6代謝体を持ち、遅いN-アセチル化体を持つ個体で肝細胞癌の危険率が増加している（OR = 2.6 ; 95% CI = 1.6 - 4）ことが示されている。

#### 誘導および阻害

CYP2D6はキニジンによりインビトロで、およびウイルスプロテアーゼ阻害剤ならびにD-およびL-フェンフルラミドのような食欲抑制薬により阻害される。

#### 人種間相違

CYP2D6の活性は与えられた集団により大きく変化する。CYP2D6の不十分な（PM）、高度な（EM）および超高度な（UEM）表現型が区別されている。CYP2D6遺伝子は常染色体劣性形質として遺伝され、白色欧州人および北アメリカ人の90および10%を各々高度な（EM）および不十分な（PM）代謝体表現型に分別する。別の研究において、異なった人種集団におけるPMのパーセントが観察されており、白色北アメリカ人および欧州人は5 - 10%、黒色アメリカ人は1.8%、タイ原住民は1.2%、中国人は1%、マレー原住民集団では2.1%のPMが存在したが、日本人集団ではPM表現型は全く存在しなかった。

#### 【0021】

薬剤代謝研究においては、各々の人種は多形性の証拠のため別々に研究しなければならない、およびそのアンチノードを一つの人種から他の人種へ外挿するべきではないことは道理に合っている。

#### デキストロメトルファン / 抗うつ薬

薬剤投与において表現型分類が必要な例はデキストロメトルファンの場合である。デキストロメトルファンは向精神効果を持つ非オピオイド鎮咳薬である。しかしながら、0から6 mg / kgのデキストロメトルファン投与量範囲は個々の患者の許容度に基づいている。デキストロメトルファンはCYP2D6代謝系を経て活性化される。デキストロメトルファンは定性的および定量的に異なった客観的および主観的影響を不十分な vs . 高度な代謝体で示している（平均動作 +

/ - S E、E Mでの95 + / - 0.5 %に対しP Mでは86 + / - 6 % ; p < 0.05)。

#### 【0022】

CYP2D6表現型分類のための別の重要な薬剤は三環式抗うつ薬である。CYP2D6のP MおよびU E M表現型の両方に副作用の危険性が存在する。これらの薬剤の標準投与量が与えられたP M個体は、毒性血漿濃度を発生させ、口内乾燥症、低血圧症、鎮静、震え、またある場合には生命を脅かす心臓毒性を含む不愉快な副作用を導く可能性がある。逆に、これらの薬剤のU E M個体への投与は、標準投与量では活性薬剤の血漿濃度ははるかに低いので、治療が失敗するであろう。これらの理由のため、信頼できる表現型分類試験の効用は明白である。

#### 個別化治療

多くの薬剤に対して個別化治療が可能ながよく知られている(テオフィリン、ジゴキシン、アミノグリコシダーゼ、デキストロメトルファンその他)。しかしながら、治療の個別化は、薬剤表現型分類のために使用される方法が、費用がかかり、時間がかかり、および臨床実験室では容易に利用できない専門的意見を必要とする高速液体クロマトグラフィー(HPLC)またはキャピラリー電気泳動(CE)を含んでいるので、開発がなかなか進んでいない。

#### 【0023】

広範囲の毒性の可能性のある薬剤に対する応答および副作用プロファイルを予測するために、無毒の薬剤を使用して個体のCYP2D6表現型を決定するための方法が強く求められているであろう。

#### 【0024】

最少の訓練しかしていない技術者により、および複雑な装置を必要としない日常的な基準で達成できるであろう、CYP2D6表現型分類のための酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)キットを提供することが強く求められているであろう。

#### 【0025】

デキストロメトルファン、クロザピンまたはベラパミルのような薬剤の個別化治療を医者に可能にするであろう、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)キ

ットを提供することが強く求められているであろう。

#### 【0026】

##### CYP2E1

CYP2E1はヒト肝臓中の全CYP450酵素の約5%を構成する。CYP2E1活性の測定は以下の理由で臨床的に興味を持たれる：

##### 多形性

ヒト集団中でCYP2E1遺伝子多形のいくつかの証拠が存在しているが、分子機構はさらに特徴付けなければならない。研究で、c1およびc2と称される二つの対立遺伝子の存在が示されている。最初の研究はc2対立遺伝子のより高いCYP2E1発現への関連の可能性を示している。

#### 【0027】

CYP2E1はエタノール、アセトン、アセトアミノフェン、ニトロサミン、ニトロソジメチルアミン、p-ニトロフェノールを含むいくつかの薬剤および食品成分を代謝する。

#### 【0028】

加えて、CYP2E1は環境前発癌物質、特にニトロソジメチルアミン、ニトロソピロリドン、ベンゼン、四塩化炭素、3-ヒドロキシピリジン（タバコ煙生成物）を活性化する。一つの研究では、高いCYP2E1（c2）活性を持つ個体は胃癌の危険度が高いことが示されている（OR = 23.6 - 25.7）。

##### 誘導および阻害

CYP2E1は多くの薬剤およびタバコ煙のような環境因子により、ならびに飢餓により、および管理されていない糖尿病で誘導される。CYP2E1はクロロメチアゾール、トランス-1,2-ジクロロエチレンにより、およびイソフラボノイド ゲネステインおよびイクオールにより阻害される。

##### 人種間相違

CYP2E1表現型の比率は人種および国間で変化している：稀なc2対立遺伝子の頻度はカフカス人で約4%および日本人で20%であり、別の多形の研究はカフカス人で約10%および日本人で25%の頻度を持つ稀なC対立遺伝子を記載している。一つの研究において、日本人男性はカフカス人男性と比較してか

なり低いレベルのCYP2E1活性を持っていることが示されている。別の研究において、白人（スペイン人）およびアジア人（中央アメリカインディアン）が混血したニカラグア人集団は親集団と比較すると中間レベルのCYP1A2対立遺伝子突然変異を持っていることが示されている。従って、薬剤代謝研究においては、各々の人種は多形性の証拠のため別々に研究しなければならない、およびそのアンチノードを一つの人種から他の人種へ外挿するべきではないことは道理に合っている。

#### アセトアミノフェン

薬剤投与において表現型分類が必要な例はアセトアミノフェンの場合である。アセトアミノフェンは広く使用されている鎮痛剤である。しかしながら、アセトアミノフェンは低頻度で肝臓毒性を示す。肝臓毒性は、求核試薬へ結合できる反応性代謝産物（N - アセチル - p - ベンゾキノニン）へのCYP2E1を経た転換によるものである。これらの理由のため、信頼できる表現型分類試験の効用は明白である。

#### 個別化治療

多くの薬剤に対して個別化治療が可能ながよく知られている（テオフィリン、ジゴキシン、アミノグリコシダーゼ、アセトアミノフェンその他）。しかしながら、治療の個別化は、薬剤表現型分類のために使用される方法が、費用がかかり、時間がかかり、および臨床実験室では容易に利用できない専門的意見を必要とする高速液体クロマトグラフィー（HPLC）またはキャピラリー電気泳動（CE）を含んでいるので、開発がなかなか進んでいない。

#### 【0029】

広範囲の毒性の可能性のある薬剤に対する応答および副作用プロファイルを予測するために、無毒の薬剤を使用して個体のCYP2E1表現型を決定するための方法が強く求められているであろう。

#### 【0030】

最少の訓練しかしていない技術者により、および複雑な装置を必要としない日常的な基準で達成できるであろう、CYP2E1表現型分類のための酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）キットを提供することが強く求められているであ

ろう。

#### 【0031】

アセトアミノフェンのような薬剤の個別化治療を医者に可能にするであろう、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) キットを提供することが強く求められているであろう。

#### 【0032】

#### CYP3A4

CYP3Aファミリーはヒト肝臓中の全CYP450酵素の約25%を構成する。CYP3A4活性の測定は以下の理由で臨床的に興味を持たれる：

#### 多形性

ヒト肝臓においてCYP3A4アイソザイム発現の個人間の大きな程度の変異が示されているが (>20倍)、この多形発現の遺伝子的基礎は現在まで同定されていない。CYP3A4はベンゾジアゼピン、エリスロマイシン、デキストロメトルファン、ジヒドロピリジン、シクロスポリン、リドカイン、ミダゾラム、ニフェジピン、テルフェナジン、シクロスポリンA含むいくつかの薬剤および食品成分を代謝する。

#### 【0033】

加えて、CYP3A4は環境前発癌物質、特にN'-ニトロソノルニコチン (NNN)、4-メチルニトロソアミノ-1-(3-ピリジル-1-ブタノン) (NNK)、5-メチルクリセン、4,4'-メチレン-ビス(2-クロロアニリン) (タバコ煙生成物) を活性化する。

#### 誘導および阻害

CYP3A4はデキサメタゾン、フェノバルビタール、プリミドンおよび抗生物質リファムピシンのような多くの薬剤で誘導される。逆に、CYP3A4はエリスロマイシン、グレープフルーツジュース、インジナビル、ケトコナゾール、ミコナゾール、キニンおよびサキナビルにより阻害される。

#### シクロスポリン

薬剤投与において表現型分類が必要な例は臓器移植患者の処置におけるシクロスポリンの場合である。シクロスポリンは新規臓器が拒絶されるのを防ぐため、

移植後に投与される免疫抑制剤である。この薬剤の血漿濃度は決定的であり、高レベルは腎毒性を導き、低レベルは臓器拒絶を導く。シクロスポリンはCYP3A4系を経て代謝される。いくつかの研究は有効および安全なシクロスポリン量の維持における、CYP3A4活性のモニタリングの重要性を指摘している。これらの理由のため、信頼できる表現型分類試験の効用は明白である。

#### 個別化治療

多くの薬剤に対して個別化治療が可能ながよく知られている（テオフィリン、ジゴキシン、アミノグリコシダーゼ、シクロスポリンその他）。しかしながら、治療の個別化は、薬剤表現型分類のために使用される方法が、費用がかかり、時間がかかり、および臨床実験室では容易に利用できない専門的意見を必要とする高速液体クロマトグラフィー（HPLC）またはキャピラリー電気泳動（CE）を含んでいるので、開発がなかなか進んでいない。

#### 【0034】

広範囲の毒性の可能性のある薬剤に対する応答および副作用プロファイルを予測するために、無毒の薬剤を使用して個体のCYP3A4表現型を決定するための方法が強く求められているであろう。

#### 【0035】

最少の訓練しかしていない技術者により、および複雑な装置を必要としない日常的な基準で達成できるであろう、CYP3A4表現型分類のための酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）キットを提供することが強く求められているであろう。

#### 【0036】

シクロスポリンのような薬剤の個別化治療を医者に可能にするであろう、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）キットを提供することが強く求められているであろう。

#### 【0037】

#### 発明の要約

本発明の一つの目的は、臨床実験室において日常的な基準で使用できる、代謝酵素表現型の迅速な決定のための酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）キッ

トを提供することである。

【0038】

本発明の別の目的は医者が

- a) これらの酵素により代謝される薬剤での治療を個別化する
  - b) 種々の癌のような発癌物質誘導疾患への感受性を予測することを可能にする
- E L I S Aキットを提供することである。

【0039】

本発明の別の目的は広範囲の毒性の可能性のある薬剤に対する応答および副作用プロフィールを予測するために、無毒の薬剤を使用して個体の代謝酵素表現型を決定するための方法を提供することである。

【0040】

E L I S A表現型分類キットは個体の代謝酵素表現型のスペクトルを決定するために無毒のプローブ薬剤を使用するであろう。表4は提案された酵素の各々に使用されるべきであるプローブ薬剤を掲げている。

表4 酵素およびプローブ薬剤

【0041】

【表4】

酵素	プローブ薬剤
NAT1	p-アミノサリチル酸
CYP1A2	カフェイン
CYP2D6	デキストロメトルファン
CYP2E1	クロロゾキサゾン
CYP3A4	デキストロメトルファン

【0042】

これらの薬剤は表現型分類される個体により摂取され、個体の尿が摂取4時間後に集められた。尿は本発明により開発されたE L I S A技術により分析されるであろう。尿試料は下記のプローブ薬剤誘導体についてモニターされ(図1-7

)、個体の表現型を明らかにするためにモル比が計算されるであろう。

#### 【0043】

実施例IおよびIIにおいて、CYP1A2のためのプローブ薬剤誘導体およびELISA開発の詳細な説明が示されている。CYP1A2 ELISAキットの開発のために説明された材料および方法、および全体にわたる一般法はNAT1、CYP2D6、CYP2E1およびCYP3A4のための代謝的表現型ELISAキットの開発に応用できる、および応用されるであろう。

#### 【0044】

##### 発明の詳細な説明

異なったプローブ薬剤がCYP1A2表現型を決定するために使用できる(カフェイン、テオフィリン)。本発明に従うと、適したプローブ薬剤にはカフェイン、テオフィリンまたはアセトアミノフェンが含まれるが、これらに限定されるわけではない。

#### 【0045】

これらの中でもカフェインが好適なプローブである。カフェインは広く消費されており、比較的安全である。従来の研究では、表現型は1,7-ジメチルキサンチン(1,7DMX)+1,7-ジメチル尿酸(1,7DMU)および1,3,7-トリメチルキサンチン(1,3,7TMX、カフェイン)の比から一般的に決定されてきた。これらの研究においては、被検者にカフェイン含有物質が経口投与され、標的代謝産物の尿濃度がHPLCにより決定される(Kilbane, A. J. et al. (1990) Clin. Pharmacol. Ther. 47:470-477; Tang, B.-K. et al. (1991) Clin. Pharmacol. Ther. 49:648-657)またはCE(Meachers et al. (1998) Biomarkers 3:205-218)。

#### 【0046】

キノロン抗生物質またはセロトニン摂取阻害剤によるCYP1A2の阻害は、テオフィリン毒性を生じる。これらの理由のため、信頼できる表現型分類試験の効用は明白である。

## 【0047】

酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) は血漿および尿試料中の少量の薬剤およびその他の抗原性化合物の決定に成功裡に応用されてきており、実施が簡単である。我々は以前にプローブ薬剤としてカフェインを使用するN - アセチルトランスフェラーゼ (NAT2) 表現型分類のためのELISAを開発した (Wong, P., Leyland-Jones, B., and Wainer, I. W. (1995) J. Pharm. Biomed. Anal. 13:1079-1086)。我々は続いてNAT2表現型分類のためのELISAの有効性を試験し証明した (Leyland-Jones et al. (1999) Amer. Assoc. Cancer Res. 40:Abstract 356)。NAT2表現型分類のためのELISAはHPLCおよびCEより実施が簡単である。

## 【0048】

本発明に従うと、カフェイン消費後に集められた個体尿試料中のカフェインおよび二つのカフェイン代謝産物 (1,7 - ジメチルキサンチン (1,7DMX)、1,7 - ジメチル尿酸 (1,7DMU)) のモル比を測定するために現在開発された抗体が使用される。この比から個体のCYP1A2表現型が決定される。これらの抗体を使用して、この比を測定するための抗原酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) が行われるであろう。本発明の抗体はカフェインおよび二つの異なったカフェイン代謝体に対して高められたポリクローナルまたはモノクローナルであろうし、それらはカフェインおよびこれらの代謝産物のモル比の測定を可能にする。

## 【0049】

本発明に従うと、カフェイン代謝産物のモル比は以下のように個体のCYP1A2表現型を決定するための使用される：

(1,7 - ジメチルキサンチン (1,7DMX) + 1,7 - ジメチル尿酸 (1,7DMU)) / カフェイン

4および12のモル比で遅い、中程度および速いCYP1A2代謝体を区別する (Butler et al. (1992) Pharmacogenetic

s 2 : 116 - 117 )。

### 【0050】

#### 材料および方法

##### 材料

N - アセチル - p - アミノフェノール (アセトアミノフェン)、ジオキサン、98 - 100%ガラス再蒸留ギ酸およびクロロギ酸イソブチルはA & C American Chemicals Ltd. (Ville St - Laurent, Que. Canada) から購入された; 西洋ワサビペルオキシダーゼはBoehringer Mannheim (Montreal, Que., Canada) から購入された; ELISAプレート (96 - ウェル Easy Wash™修飾平底、高結合; Corningガラス製品, Corning, NY, USA) およびFalcon 96 - ウェル微量試験組織培養プレートno. 3072 (Beckton Dickinson Labware, Franklin, NJ, USA) はFisher (Montreal, Quebec, Canada) から購入された; ヤギ抗ウサギIgGへ結合されたアルカリ性ホスファターゼ、キーホール リンペットヘモシニアン (KLH) はPierce Chemical Co. (Rockford, IL, USA) からのものである; 無水酢酸、HPLC用アセトニトリル、ベンジルウレア、ウシ血清アルブミン (カタログ番号A - 3803)、N - ブロモスクシンイミド、カフェイン代謝体、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溶液 (EDAC)、4 - ブロモ酪酸エチル、6 - ブロモヘキサン酸エチル、シアノ酢酸メチル、重水素化クロロホルム ( $CDCl_3$ )、重水素化ジメチルスルホキシド ( $d_6$ )、重水 ( $D_2O$ )、1, 4 - ジアミノブタン、ジエタノールアミン、ジメチルホルムアミド、ジメチル硫酸、二炭酸ジ - tert - ブチル、クロロギ酸エチル、フロイントアジュバント (完全および不完全)、グルタルアルデヒド (50% v/v)、1 - メチルキサンチン、p - ニトロフェノールリン酸二ナトリウム塩、パラジウム (10乾燥重量%活性炭)、o - フェニレンジアミン塩酸塩、ポリエチレンソルビタンモノラウレート (トウィーン20)、ブタ皮膚ゼラチン、プロテインA - セファロース4B、セファデックス™G25ファイン、

水素化ナトリウム、ナトリウムメトキシド、テオフィリン、トリブチルアミン、トウイーン™20はSigma-Aldrich (St-Louis, Missouri, USA) から購入された；シリカゲル粒子サイズ0.040-0.063mm (230-400メッシュ) ASTM Emerck Darmstadt, Germany、はVWR (Montreal, Que., Canada) から購入された。ジオキサンは使用前に水素化カルシウムと4時間還流して脱水し、蒸留した。他の試薬はACS等級であった。

#### 【0051】

##### 合成法

カフェイン、1,7-ジメチルキサンチン、1,7-ジメチル尿酸誘導体生成のための合成経路は図8および図9に示されている。

#### 【0052】

7-エトキシカルボキシペンチル-1,3-ジメチルキサンチン(II)の合成化合物IIはDaly et al. (Daly, J.W., Mueller, C., Shamin, M. (1991) Pharmacology, 42:309-321)の方法と同様の方法により合成される。320mgのテオフィリン(I) (1.78ミリモル)を7mLの乾燥ジメチルホルムアミドに溶解し、290mgの炭酸カリウム(2.1ミリモル)を反応混合物に加える。358μLの6-プロモヘキサン酸エチル(2.02ミリモル)を徐々に加え、懸濁液は60で14時間加熱する。炭酸カリウムを除去するために懸濁液を濾過する。炭酸カリウムを少量のジメチルホルムアミドで洗浄後、回転エバポレーターおよび高真空ポンプを用いて減圧下で溶媒を蒸発させる。残渣をクロロホルムに溶解し、溶液は硫酸マグネシウム(MgSO<sub>4</sub>)で乾燥させる。溶媒を回転エバポレーターを用いて減圧下で蒸発させる。480mgの生成物(わずかに黄色の液体、1.49ミリモル)が得られ、83.7%の収率に相当する。

#### 【0053】

##### 7-カルボキシペンチル-1,3-ジメチルキサンチン(III)の合成

化合物IIIは以下のように合成される。225mgの化合物II(0.7ミリモル)を7mLのジメチルホルムアミドに溶解する。4mLの10%NaOH

溶液を加え、溶液を30分間還流する(100-125)。回転エバポレーターおよび高真空ポンプを用いて減圧下で溶媒を蒸発させる。残渣を7mLの水に溶解し、溶液は6N HCl溶液でpH4の酸性とする。溶液を4に冷却すると生成物が針状晶として結晶化する。結晶を15mLの半融ガラスロート(10-15ASTM)を通して濾過し、乾燥する。175mgの生成物(0.595ミリモル)が得られ、85%の収率に相当する。

#### 【0054】

##### 7-エトキシカルボキシペンチル-1-メチルキサンチン(V)の合成

化合物Vは以下のように合成される。116mgの1-メチルキサンチン(IV)(0.7ミリモル)を4mLのジメチルホルムアミドに溶解する。129mgの炭酸カリウム(0.93ミリモル)を加え、生じた溶液を攪拌する。125 $\mu$ Lの6-ブロモヘキサン酸エチル(0.7ミリモル)の0.4mLジメチルホルムアミド溶液を3回に分けてゆっくり加える。反応混合物は50で1.5時間および65で1時間加熱する。冷却後、懸濁液を濾過し、濾液は回転エバポレーターおよび高真空ポンプを用いて減圧下で蒸発させる。生成物は酢酸エチル-ヘキサン溶液(9:1、v/v)を溶出液として用いるシリカゲルカラム(40x1cm)のフラッシュクロマトグラフィーにより精製する。

#### 【0055】

##### 7-カルボキシペンチル-1-メチルキサンチン(VI)の合成

化合物VIは以下のように合成される。31mgの化合物V(0.1ミリモル)を1mLのジメチルホルムアミドに溶解し、660 $\mu$ Lの10%NaOHを加える。得られた溶液は30分間還流する(100-120)。室温まで冷却後、回転エバポレーターおよび高真空ポンプを用いて減圧下で溶媒を蒸発させる。残渣を水に溶解し、溶液は6N HCl溶液でpH4の酸性とする。冷却後、溶液から白色針状晶が得られ、それは濾過して乾燥させる。23mgの生成物(0.082ミリモル)が得られ、82%の収率に相当する。

#### 【0056】

##### 6-アミノ-1-ベンジルウラシル(IX)の合成

化合物IXは以下のようにHutzenlaub and Pfeidere

r (Hutzenlaub, W., and Pfeiderer, W. (1979) Liebigs Ann. Chem. 1847-1854) の方法と同様の方法により合成される。8.46 g のナトリウムメトキシド (160 ミリモル) を 71 mL のメタノールに溶解する。溶液を攪拌し、7.55 g のベンジル尿素 (50 ミリモル) および 4.71 mL のシアノ酢酸メチル (53.4 ミリモル) を加える。懸濁液は 68 - 70 °C で 5.5 時間還流し、室温まで冷却する。濾過後、回転エバポレーターを用いて減圧下でメタノールを蒸発させる。残渣を温かい蒸留水に溶解し、氷酢酸で pH 3 - 4 まで酸性化することにより生成物を沈殿させる。室温で 2 時間 (または一夜) 後、懸濁液を半融ガラスロートを通して減圧下で濾過する。生成物は水で洗浄して乾燥させる。収率は 62 - 65 % である。

#### 【0057】

##### 6 - アミノ - 1 - ベンジル - 5 - ブロモウラシル (X) の合成

化合物 X は以下のように Hutzenlaub and Pfeiderer (Hutzenlaub, W., and Pfeiderer, W. (1979) Liebigs Ann. Chem. 1847-1854) の方法と同様の方法により合成される。3.2 g の 6 - アミノ - 1 - ベンジルウラシル (15.8 ミリモル) を 100 °C で 60 mL の酢酸および 3 mL の無水酢酸に溶解する。2.85 g の N - ブロモスクシンイミド (16 ミリモル) を 30 分以上かけて少量ずつ加える。反応混合物は 1 時間攪拌し、室温まで冷却する。沈殿を濾過し、少量の冷エタノールで洗浄して乾燥させる。3.36 g の白色結晶が得られ (12 ミリモル)、76 % の収率に相当する。

#### 【0058】

##### 6 - アミノ - 1 - ベンジル - 5 - [(N - 4' - アミノブチル) - アミノ]ウラシル (XI) の合成

化合物 XI は以下のように合成される。3 g の化合物 X (10.71 ミリモル) を 30 mL の 50 % 1, 4 - ジアミノブタン (bp 158 - 160 °C ; d 0.877) 水溶液 (v/v) に溶解し、溶液は室温で一夜攪拌する。溶液は回転エバポレーターおよび高真空ポンプを用いて減圧下で蒸発させる。得られた油状

物は最少量の酢酸エチル - メタノール溶液 ( 4 : 1 ; v / v ) に溶解し、溶出液として酢酸エチル - メタノール溶液を使用する半融ガラスロート ( 150 mL ) に詰めたシリカゲルでの乾燥フラッシュクロマトグラフィーにより精製する。各々の連続する分画において、溶媒の極性を増加させた、60%酢酸エチル / 40%メタノールから45%酢酸エチル / 55%メタノール ( v / v ) へ。生成物は淡黄色油状物として単離される。得られた精製生成物の量は1.6 g ( 6.1 ミリモル ) であり、57%の収率に相当する。

#### 【0059】

6 - アミノ - 1 - ベンジル - 5 - [ N - 4 ' - tert - ブトキシカルボニル - アミノ ] ウラシル ( X I I ) の合成

化合物 X I I は以下のように合成される。1.63 g の化合物 X I ( 5.9 ミリモル ) を 5.4 mL の 1 N NaOH に溶解する。270 mg の炭酸水素ナトリウム ( 3.2 ミリモル ) および 2.7 mL の水を加える。5.4 mL のジ - tert - ブチルジカーボナートのイソプロパノール溶液 ( 1.88 g ( 8.61 ミリモル ) を 5.4 mL のイソプロパノールに溶解 ) を化合物 X I の溶液へ徐々に加える。室温で3時間攪拌後、13.4 mL の水を加え、未反応のジ - tert - ブチルジカーボナートを 20 mL の石油エーテルで2回抽出する。反応混合物の pH を 10% クエン酸溶液を加えることにより7に調整し、溶液を 40 mL の酢酸エチルで2回抽出する。有機層を硫酸ナトリウム ( Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ) で乾燥し、回転エバポレーターを用いて減圧下で濃縮する。濃縮溶液への少量の軽石油エーテルの添加により生成物が沈殿する。0.99 g の灰色がかった白色の結晶性化合物 X I I ( 2.62 ミリモル ) が得られ、44%の収率に相当する。

#### 【0060】

6 - アミノ - 1 - ベンジル - 5 - [ ( N - 4 ' - tert - ブトキシカルボニル - アミノ ) プチル - N - エトキシカルボニル ] - アミノ ] ウラシル ( X I I I ) の合成

化合物 X I I I は以下のように合成される。806 mg の化合物 X I I ( 2.14 ミリモル ) を 7.5 mL の水に懸濁し、勢いよく攪拌する。0.5 mL のクロロギ酸エチル ( 5.22 ミリモル ) を加える。3.75 mL の 1 N NaOH

溶液を滴加し、得られた溶液は室温で2.5時間攪拌する。白色固体生成物を濾過し、十分に水で洗浄して乾燥させる。741mgの生成物が得られ(1.77ミリモル)、82.7%の収率に相当する。

【0061】

6-アミノ-1-ベンジル-5-[(N-4'-tert-ブトキシカルボニルアミノブチル-N-エトキシカルボニル)-アミノ]-3-メチルウラシル(XIV)の合成

化合物XIVは以下のように合成される。712mgの化合物XIII(1.77ミリモル)を5.8mLの水に懸濁する。2.3mLの1N NaOH溶液を加え、得られた溶液は激しく攪拌しながら40℃で加熱する。0.23mLのジメチル硫酸(2.43ミリモル)を徐々に加え、溶液は40℃で1.5時間攪拌する。反応間に形成された沈殿は濾過し、水で洗浄して乾燥させる。生成物は沈殿から4%メタノール含有ジクロロメタン溶液を溶出液として使用するシリカゲルカラム(40×1cm)でのフラッシュクロマトグラフィーにより精製される。生成物は酢酸エチルから再結晶する。498mgの化合物XIV(1.15ミリモル)が得られ、65%の収率に相当する。

【0062】

6-アミノ-5-[(N-4'-tert-ブトキシカルボニルアミノブチル-N-エトキシカルボニル)-アミノ]-3-メチルウラシル(XV)の合成

化合物XVは以下のように合成される。440mgの化合物XIV(1.02ミリモル)を12mLのメタノールに溶解し、252mgのギ酸アンモニウム(4ミリモル)と混合する。窒素雰囲気下で240mgのパラジウム炭素(10%)を加える。接触水素化は室温で3時間実施される。濾過して触媒を除き、濾液は回転エバポレーターおよび高真空ポンプを用いて減圧下で蒸発させる。341mgの生成物が得られ(0.99ミリモル)、97%の収率に相当する。

【0063】

7-(4'-アミノブチル)-1-メチル尿酸(XVI)の合成

化合物XVIは以下のように合成される。300mgの化合物XV(0.875ミリモル)を4.5mLの乾燥ジメチルホルムアミドに溶解し、144mgの

水素化ナトリウム(6ミリモル)と混合する。混合物は室温で20分間および10-115で30分間攪拌する。色が暗い黄色へ徐々に変化する。冷後、6.5mLの水を加え、溶液を6N HCl溶液でpH0の酸性とする。回転エバポレーターおよび高真空ポンプを用いて減圧下で溶媒を蒸発させ、粗生成物は酢酸エチル-メタノール溶液(1:4、v/v)に溶解する。無機塩を濾過して除き、黄色濾液は溶出液として酢酸エチル-メタノール(3:7、v/v)溶液を使用するシリカゲルカラム(40×1cm)でのフラッシュクロマトグラフィーにより精製する。イソプロパノールによる残渣の滴定後、生成物が淡黄色固形物として得られた。98.9mgの生成物が得られ(0.391ミリモル)、45%の収率に相当する。

#### 【0064】

##### NMR分光法

合成物の<sup>1</sup>H NMRスペクトルは500MHz分光光度計を使用して得られた(Varian XL 500MHz, Varian Analytical Instruments, San Fernando, CA, USA)。

#### 【0065】

##### ウシ血清アルブミンおよびキーホール リンペットヘモシニアンへのハプテンの抱合

カフェイン-BSA、1,7-ジメチルキサンチン-BSA抱合体はRojoら(Rojo et al. (1986) J Immunol. 137:904-910)の方法と同様の方法により調製された。25mLのエーレンマイヤーフラスコ中、15mgのBSAを6mLのカフェイン誘導体(または1,7-ジメチルキサンチン誘導体)溶液(1.25μモル/mL水溶液)に溶解し、続いて、1.43mLのEDAC溶液(10mg/mL水溶液)を加えた。溶液は室温で一夜攪拌し、室温で48時間500mLの水に対して透析する(1日2回水を交換して)。抱合体は0.5mLずつ-20で保存する。ジメチル尿酸抱合体はPeskarらの方法(Peskar (1972) Eur. J. Biochem. 26:191-195)により調製される。7.5mgの1,7-ジメチル尿酸(0.03ミリモル)を5mLの丸底フラスコに入れ、1mLの0.1M

$\text{Na}_2\text{PO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 緩衝液、 $\text{pH} 7.0$ で溶解する。500  $\mu\text{L}$ の0.021 Mグルタルアルデヒド溶液(10 mLの水当たり42.5  $\mu\text{L}$ の50%グルタルアルデヒド(v/v))を攪拌溶液に加える。2時間攪拌後、100  $\mu\text{L}$ の1 Mリジンの0.1 M  $\text{Na}_2\text{PO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 緩衝液( $\text{pH} 7.0$ )溶液を加える。溶液は1時間攪拌し、250 mLの150 mM  $\text{NaCl}$ 、5 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 緩衝液、 $\text{pH} 7.0$ 、に対し、1日当たり2-3回緩衝液を交換しながら48時間透析する。1,7-ジメチルキサンチン-BSA抱合体は0.5 mLずつ-20 で保存する。カフェイン-KLHおよび1,7-ジメチルキサンチン-KLH抱合体は以下のように調製する。20 mgのKLH凍結乾燥粉末を2 mLの0.9 M  $\text{NaCl}$ 溶液に溶解し、100 mLに対して10時間、2回液を交換して透析する。25 mLのエーレンマイヤーフラスコ中、1.1 mLのKLH溶液(約10 mg/mL)に0.8 mLのカフェイン誘導体または1,7-ジメチルキサンチン誘導体(2.5  $\mu\text{mol/mL}$  0.9 M  $\text{NaCl}$ 溶液)を加える。2 mLのEDAC溶液(10 mg/mL 0.9 M  $\text{NaCl}$ 溶液)および1.8 mLの0.9 M  $\text{NaCl}$ 溶液を誘導体溶液へ連続的に加える。溶液は室温で一夜(20時間)攪拌する。溶液は250 mLの0.9 M  $\text{NaCl}$ に対して48時間、1日当たり2-3回液を交換して透析する。カフェイン-KLHおよび1,7-ジメチルキサンチン-KLH溶液は0.5 mLずつ-20 で保存する。1,7-ジメチル尿酸-KLH抱合体はPeskaraらの方法(Peskara(1972) Eur. J. Biochem. 26: 191-195)と同様の方法により調製される。20 mgのKLH凍結乾燥粉末を2 mLの0.9 M  $\text{NaCl}$ 溶液に溶解し、100 mLに対して10時間、2回液を交換して透析する。7.3 mgの1,7-ジメチル尿酸(約0.03ミリモル)を5 mLの丸底フラスコに入れ、1 mLのKLH溶液で溶解する。500  $\mu\text{L}$ の0.021 Mグルタルアルデヒド溶液(10 mLの水当たり42.5  $\mu\text{L}$ の50%グルタルアルデヒド(v/v))を攪拌溶液に滴加する。2時間攪拌後、100  $\mu\text{L}$ の1 Mリジンの0.1 M  $\text{Na}_2\text{PO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 緩衝液( $\text{pH} 7.0$ )溶液を加える。溶液は1時間攪拌し、250 mLの0.9 M  $\text{NaCl}$ 、5 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 緩衝液、 $\text{pH} 7.0$ 、に対し、1日当

たり2 - 3回緩衝液を交換しながら48時間透析する。1,7 - ジメチル尿酸 - K L H抱合体は0.5 mLずつ - 20 で保存する。

### 【0066】

Lowryらの方法による蛋白質決定

(Lowry, O. H. et al. (1951) J. Biol. Chem., 193: 265 - 275)

溶液A: 2gの $\text{Na}_2\text{CO}_3$ を50mLの水に溶解、10mLの10% SDS および10mLの1N NaOH、水で100mLの容量に持っていく。新たに調製

溶液B: 1% NaK酒石酸塩

溶液C: 1%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

溶液D: 1Nフェノール(新たに調製): 3mLのフォルリン - シオカルトフェノール試薬(2.0N) および3mL水

溶液E: 98mLの溶液A、1mLの溶液B、1mLの溶液C、新たに調製

BSA: 1mg/mL。0.10gウシ血清アルブミン  
(分画容量) / 100mL

アッセイ

標準曲線	チューブ# (13 x 100mm)						
溶液	1	2	3	4	5	6	7
BSA ( $\mu\text{l}$ )	0	10	15	20	30	40	50
水 ( $\mu\text{l}$ )	200	190	185	180	170	160	150
溶液E (mL)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0

ボルテックスし、室温で10分間放置。

溶液D ( $\mu\text{l}$ ) 200 200 200 200 200 200 200

ボルテックスし、室温で1時間放置。

ブランクとして水を用い、750nmで吸光度を読みとる。

未知試料

溶液D . F<sup>a</sup> (三重に)                      チューブ# (13 x 100mm)

未知試料 ( $\mu\text{l}$ )    x                      x                      x

水 ( $\mu\text{l}$ )	y	y	y	$x + y = 200 \mu\text{l}$
溶液F ( mL )	2.0	2.0	2.0	

ボルテックスし、室温で10分間放置。

溶液D ( $\mu\text{l}$ )	200	200	200	200	200	200	200
-----------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

ボルテックスし、室温で1時間放置。

ブランクとして水を用い、750 nmで吸光度を読みとる。

標準曲線を使用し、未知試料のD・F・(希釈比)を考えに入れて蛋白質濃度を計算する。

a : D・F・(希釈比) : 750 nmでの未知試料の吸光度が標準曲線の吸光度の範囲にはいるようにしなければならない。

#### 【0067】

K L Hのmg当たりに取り込まれたカフェイン、1,7-DMXまたは1,7-DMUのモル数を決定する方法

この方法は大体の見積もりを与える。カップリングが期待されたように進行したかどうかを決定することが可能であるので有用である。

#### A) 溶液

- 10%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)溶液
- 1% SDS溶液
- 0.5または1 mg/mLのカフェイン-K L H(または1,7-DMX-K L Hまたは1,7-DMU-K L H)の1% SDS溶液(1 mL)
- 0.5または1 mg/mLのK L Hの1% SDS溶液

#### B) 方法

- カフェイン-K L H抱合体(または1,7-DMX-K L Hまたは1,7-DMU-K L H)の吸光度を、1% SDS溶液をブランクとしてカフェイン(または1,7-DMXまたは1,7-DMU)の極大吸収の波長で測定する
- K L H溶液の吸光度をカフェイン(または1,7-DMXまたは1,7-DMU)の極大吸収波長で測定する
- 式:

#### 【0068】

## 【式1】

$$y = \frac{A_{\Delta \max}(\text{カフェイン-KLH}) - A_{\Delta \max}(\text{KLH})}{\epsilon_{\Delta \max}(\text{カフェイン})X[\text{KLH}]}$$

## 【0069】

(式中、 $y$ はKLHmg当たりのカフェインのモル数であり； $\epsilon_{\max}$ (カフェイン)は極大吸収波長におけるカフェインのモル吸光係数である)に従って、KLHmg当たりに取り込まれたカフェイン(または1,7-DMXまたは1,7-DMU)のモル数を計算する。

## 【0070】

## 西洋ワサビペルオキシダーゼへのハプテンのカップリング

カフェインおよび1,7-ジメチルキサンチン誘導体および1,7-ジメチル尿酸誘導体(無水コハク酸でスクシニル化後)が以下の方法により西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)へ抱合された。5mLの丸底フラスコに0.12ミリモルの誘導体を入れる。塩化カルシウムで新しく乾燥させた500 $\mu$ Lのジオキサンをピペットで加えた。懸濁液を攪拌し、砕いた氷を用いて水浴で10 $^{\circ}$ に冷却する。31 $\mu$ Lのクロロギ酸イソブチル(0.24ミリモル)(最近封を切ったかまたは購入したもの)および114 $\mu$ Lのトリブチルアミン(0.47ミリモル)をピペットで加えた。10 $^{\circ}$ で30分間攪拌する。攪拌している間に、13mgの西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)を2mLの水に溶解し、溶液を砕いた氷上で4 $^{\circ}$ に冷却する。30分攪拌した後、100 $\mu$ Lの1N NaOH溶液(新しく調製したもの)を4 $^{\circ}$ でHRP溶液へ加え、アルカリ性HRP溶液を5mLフラスコへ一度に注ぐ。懸濁液は10-12 $^{\circ}$ で4時間攪拌する。0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)で平衡化および溶出するセファデックスG-25<sup>TM</sup>ファインカラム(1.6 $\times$ 30cm)での濾過によりHRP抱合体から遊離誘導体を分離する。1.0-1.2mLの分画を手操作またはフラクションコレクターで集める。溶出の間、二つのバンドが観察されるであろう：HRP抱合体およびHRP抱合体の後ろの淡黄色バンド。HRP抱合体バンドは分画11-16の間に溶出した。HRP抱合体を含んでいる分画をスクリーキャ

ップを持つ15 mLの組織培養容器にプールする。一部を希釈して(通常50  $\mu$  L + 650  $\mu$  L緩衝液)HRP抱合体濃度を403 nmで決定する。

$$[\text{HRP抱合体}] (\text{mg/mL}) = A_{403} \times 0.4 \times D \cdot F.$$

320および220 nm間の紫外吸収スペクトル(UV)を記録する。カフェイン-HRP、1,7-DMX-HRPおよび1,7-DMU-HRP抱合体による280 nm、280 nmおよび290 nmでの追加の吸収ピークの存在は、カップリングが期待されたように進行したという指標である。前記の測定後、カフェイン-HRP、1,7-DMX-HRPまたは1,7-DMU-HRP抱合体溶液mL当たり、5  $\mu$  Lの4%チオメルサル溶液を加える。抱合体は4 で保存する。

#### 【0071】

##### 抗体生成

6匹の成熟メスニュージーランドホワイト系ウサギ(Charles River Canada, St-Constant, Que., Canada)が抗体生成に使用された。この研究に用いられたプロトコールはカナダ動物保護評議会のガイドラインに従ってMcGill大学動物保護委員会により承認されている。240  $\mu$  gのKLH抱合抗原を含んでいる等張塩溶液(0.6 mL)を0.6 mLの完全フロイントアジュバントで乳化した。ウサギ当たり0.5 mLの乳剤(100  $\mu$  gの抗原)を筋肉内または皮下に注射された。ウサギは続いて不完全フロイントアジュバントで乳化した50  $\mu$  gの抗原を用い3週間の間隔で追加免疫された。追加免疫して10-14日後、耳の静脈穿刺により真空チューブ内へ凝固阻止薬なしで血液を集め、4 に保った。凝固後、4 で遠心分離し、0.001%の最終濃度になるように抗血清へアジ化ナトリウムを加えた(1 mLの抗血清当たり1%アジ化ナトリウム溶液を1  $\mu$  L)。抗血清は0.5 mLに分けて-20 で保存した。

#### 【0072】

##### 抗血清力価

マイクロタイタープレートのウェルを10  $\mu$  g mL<sup>-1</sup>のウシ血清アルブミン-カフェイン(または1,7-ジメチルキサンチン、1,7-ジメチル尿酸)抱合

体(100mM炭酸ナトリウム緩衝液、pH9.6)を用いて4にて一夜被覆した(150 $\mu$ L/ウェル)。それらはNunc Immuno Wash 12 autoclavableを使用してTPBS(0.05%トウエン20を含んでいるリン酸緩衝液)で3回洗浄した。非占有部位は、150 $\mu$ L/ウェルの0.05%ブタゼラチン含有TPBSとの室温での2時間のインキュベーションによりブロックされた。ウェルをTPBSで3回洗浄し、TPBSに希釈した150 $\mu$ Lの抗血清を加えた。室温で2時間後、ウェルをTPBSで3回洗浄し、1%BSA含有PBSに希釈した100 $\mu$ Lのヤギ抗ウサギIgGs-アルカリ性ホスファターゼ抱合体を加えた。室温で1時間後、ウェルをTPBSで3回、水で3回洗浄した。次にウェルにMgCl<sub>2</sub>(0.5mM)およびp-ニトロフェノールホスフェート(3.85mM)を含んでいる150 $\mu$ Lのジエタノールアミン緩衝液(10mM、pH9.8)溶液を加えた。室温で30分後、マイクロプレートリーダーで405nmの吸光度を読みとった。抗体力価は1単位(1au)吸光度を変化させるのに必要とされる希釈として定義される。

#### 【0073】

##### IgG抗体の単離

KLH抱合体に対するウサギIgG抗体は以下のように、プロテインA-セファロース4Bカラムでのアフィニティークロマトグラフィーにより精製された。0.9x15cm Pharmaciaクロマトグラフィーカラムに1mLの容量までプロテインA-セファロース4B懸濁液を詰めた。カラムは0.15M NaClを含んでいる0.01M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>緩衝液(pH8.0)(PBS)で十分に洗浄し、続いて3-4mLの0.1Mクエン酸三ナトリウム緩衝液(pH3.0)で洗浄した。カラムは次にPBSで十分に洗浄した。1mLのウサギ抗血清を1mLのPBSで希釈し、得られた溶液はゆっくりとカラムに加えた。カラムを15mLのPBSで洗浄し、0.1Mクエン酸三ナトリウム緩衝液(pH3.0)で溶出した。2.2mLの三つの分画が、0.8mLの1Mトリス-HCl緩衝液(pH8.5)を含んでいる目盛りのついた15mLのチューブに集められた。精製されたウサギIgG抗体は、0.01%アジ化ナトリウム存在下、4にて保存された。

## 【0074】

## 競合的抗原ELISA

添加物を含まない緩衝液および水は0.45  $\mu$ Mミリポアフィルターを通して1週間は維持されたが、ただし基質緩衝液は新しく調製された。BSA、抗体、トウエン™20および西洋ワサビペルオキシダーゼは使用直前に緩衝液および水に加えられた。尿試料は通常一カップのコーヒー（カップ当たり約100mgのカフェインを含んでいるインスタントまたは焙煎されたコーヒー）を飲んで4時間後に集められ、1mLずつ1.5mLのマイクロチューブに-20℃で保存した。ELISAのためには、マイクロタイタープレートのウェル中で $3 \times 10^{-6}$ Mより低いカフェイン、1,7-DMXおよび1,7-DMU濃度を与えるように、尿試料を等張リン酸ナトリウム緩衝液、pH7.5（310mosM）、で希釈する。ELISAプレートのウェルはNunc Immuno Wash 12洗浄機で洗浄した。6.6  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>の単離されたIgG抗体を含む16mLの溶液を100mM炭酸ナトリウム緩衝液（pH9.6）で調製し、この溶液の150  $\mu$ Lを8チャンネルピペット（Brinkmann Transferpette™-8 50-200  $\mu$ L）およびBrinkmannからの200  $\mu$ L Flexチップを使用してマイクロタイタープレートの各々のウェルに加えた。20時間、4℃にてウェルを抗体でコーティングした後、ウェルを0.05%トウエン™20を含んでいる等張リン酸ナトリウム緩衝液（IPBT）で3回洗浄し、プレートを逆にして液体をペーパータオルに吸収させることにより適当に水を排出した。1%BSAを含んでいるIPBT溶液を30mL調製し、この溶液の150  $\mu$ Lを8チャンネルピペット（Brinkmann Transferpette™-8 50-200  $\mu$ L）および200  $\mu$ Lイエローチップ（P200 Gilson Pipetman用のSarstedtイエローチップ）を使用して各々のウェルに加えた。室温で3時間後、ウェルをIPBT溶液で3回洗浄し、排水した。カフェイン、1,7-DMXおよび1,7-DMU決定のための400  $\mu$ Lの試料をSarstedtイエローチップおよびP200 Gilson Pipetmanを使用して1.5mLのマイクロチューブに加えた。SarstedtイエローチップおよびP200 Gilson

on Pipetmanを使用して各々の試料の200 $\mu$ Lを図10に示したようなパターンに従って、Falcon96ウェルマイクロテスト組織培養プレートに二重に加える。8チャンネルピペット(Brinkmann Transferpette<sup>TM</sup>-850-200 $\mu$ L)を使用し、および8チャンネルピペットのチップ(Brinkmannからの200 $\mu$ L Flexチップ)へ変更し、各々の列に、150 $\mu$ Lの試料を抗体で被覆した96-ウェルELISAマイクロタイタープレートの対応したウェルへ移す。試料添加後、マイクロタイタープレートを覆い、室温で2時間放置する。プレートを放置している間に、過酸化水素およびo-フェニレンジアミン塩酸塩を含まない基質緩衝液(25mMクエン酸および50mMリン酸ナトリウム二塩基緩衝液pH5.0)を調製する。マイクロタイタープレートはIPBT溶液で3回および0.05%トウィーン<sup>TM</sup>で3回洗浄し、排水する。50 $\mu$ Lの過酸化水素および40mgのo-フェニレンジアミン塩酸塩を基質緩衝液に加える。150マイクロリットル(150 $\mu$ L)の基質緩衝液を8チャンネルピペット(Brinkmann Transferpette<sup>TM</sup>-850-200 $\mu$ L)および200 $\mu$ L Flexチップ(Brinkmann)を使用して各々のウェルに加える。マイクロタイタープレートを覆い、室温で25-30分間振盪し、酵素反応は8チャンネルピペット(Brinkmann Transferpette<sup>TM</sup>-850-200 $\mu$ L)および200 $\mu$ L Flexチップ(Brinkmann)を使用して50 $\mu$ L/ウェルの2.5M HClを加えることにより停止させる。穏やかに3分間振盪した後、マイクロプレートリーダーで405nmの吸光度を読みとった。

#### 【0075】

ELISAのためのカフェイン、1,7-DMXおよび1,7-ジメチル尿酸溶液の標準溶液

100mLのメスフラスコを用い、310mosMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.5(IPB)に $6.00 \times 10^{-4}$ Mの濃度でカフェイン、1,7-DMXおよび1,7-DMU保存溶液を100mL調製する。完全に溶解するのを確実にするため溶液を攪拌する。

#### 【0076】

保存溶液は1 mLずつ - 20 で保存する。

E L I S Aを行う日、一つを融解し室温まで温める。

上記化合物の以下の標準溶液を調製する

標品 #	[化合物]	組成
1	$6.00 \times 10^{-4} M$	保存溶液
2	$2.00 \times 10^{-4} M$	200 $\mu$ L S 1 + 400 $\mu$ L I P B
3	$1.12 \times 10^{-4} M$	200 $\mu$ L S 1 + 868 $\mu$ L I P B
4	$6.00 \times 10^{-5} M$	100 $\mu$ L S 1 + 900 $\mu$ L I P B
5	$3.56 \times 10^{-5} M$	60 $\mu$ L S 1 + 951 $\mu$ L I P B
6	$2.00 \times 10^{-5} M$	100 $\mu$ L S 2 + 900 $\mu$ L I P B
7	$1.12 \times 10^{-5} M$	100 $\mu$ L S 3 + 900 $\mu$ L I P B
8	$6.00 \times 10^{-6} M$	100 $\mu$ L S 4 + 900 $\mu$ L I P B
9	$3.56 \times 10^{-6} M$	100 $\mu$ L S 5 + 900 $\mu$ L I P B
10	$2.00 \times 10^{-6} M$	100 $\mu$ L S 6 + 900 $\mu$ L I P B
11	$1.12 \times 10^{-6} M$	100 $\mu$ L S 7 + 900 $\mu$ L I P B
12	$6.00 \times 10^{-7} M$	100 $\mu$ L S 8 + 900 $\mu$ L I P B
13	$3.56 \times 10^{-7} M$	100 $\mu$ L S 9 + 900 $\mu$ L I P B
14	$2.00 \times 10^{-7} M$	100 $\mu$ L S 10 + 900 $\mu$ L I P B
15	$1.12 \times 10^{-7} M$	100 $\mu$ L S 11 + 900 $\mu$ L I P B
16	$6.00 \times 10^{-8} M$	100 $\mu$ L S 12 + 900 $\mu$ L I P B
17	$3.56 \times 10^{-8} M$	100 $\mu$ L S 13 + 900 $\mu$ L I P B
18	$2.00 \times 10^{-8} M$	100 $\mu$ L S 14 + 900 $\mu$ L I P B
19	$2.00 \times 10^{-9} M$	100 $\mu$ L S 15 + 900 $\mu$ L I P B
20	$2.00 \times 10^{-10} M$	100 $\mu$ L S 15 + 900 $\mu$ L I P B
21	$2.00 \times 10^{-11} M$	100 $\mu$ L S 15 + 900 $\mu$ L I P B
22	$2.00 \times 10^{-12} M$	100 $\mu$ L S 15 + 900 $\mu$ L I P B
23	$2.00 \times 10^{-13} M$	100 $\mu$ L S 15 + 900 $\mu$ L I P B

【0077】

抗体特異性

CYP1A2表現型分類のELISA測定の正確さを確実にするには、抗体はその個々のカフェイン代謝産物に対する特異性を持っていなければならない、他の誘導体は全く認識しないかまたはほとんど認識しない。その選択性を確かめるため、表5に掲げた化合物の標準溶液でELISAが実施されるであろう。理想的な抗体特異性の結果もまた表5に仮定されている。

表5 カフェイン代謝産物および構造類似体に対するカフェイン - Ab、1,7 - DMX - Abおよび1,7 - DMU - Abの交差反応性

【0078】

【表5】

化合物 Ab	%交差反応		
	カフェイン-Ab	1,7-DMX-Ab	1,7-DMU-
カフェイン	100	0 <sup>a</sup>	0
キサンチン	0	0	0
ヒポキサンチン	0	0	0
1-メチルキサンチン	0	0	0
3-メチルキサンチン	0	0	0
7-メチルキサンチン	0	0	0
8-メチルキサンチン	0	0	0
1,3-ジメチルキサンチン <sup>b</sup>	0	0	0
1,7-ジメチルキサンチン <sup>c</sup>	0	100	0
3,7-ジメチルキサンチン <sup>d</sup>	0	0	0
尿酸	0	0	0
1-メチル尿酸	0	0	0
3-メチル尿酸	0	0	0
7-メチル尿酸	0	0	0
1,3-ジメチル尿酸	0	0	0
1,7-ジメチル尿酸	0	0	100
3,7-ジメチル尿酸	0	0	0
1,3,7-トリメチル尿酸	0	0	0
グアニン	0	0	0
ウラシル	0	0	0
AAU <sup>e</sup>	0	0	0
AAMU <sup>f</sup>	0	0	0
AADMU <sup>g</sup>	0	0	0

## 【0079】

a、数字の0はELISAで試験された最も高い濃度 ( $5 \times 10^{-3} \text{M}$ ) で阻害がなかったかまたは40%よりは高くなかったことを意味している；競合的抗原ELISAでの50%阻害に必要とされるカフェイン、1,7-ジメチルキサンチンおよび1,7-ジメチル尿酸の濃度が決定されるであろう；b、1,3-ジメチルキサンチン、テオフィリン；c、1,7-ジメチルキサンチン、パラキサンチン；d、3,7-ジメチルキサンチン、テオブロミン；e、AAU、5-アセトアミド-6-アミノウラシル；f、AAMU、5-アセトアミド-6-アミノ-3-メチルウラシル；g、AADMU、5-アセトアミド-6-アミノ-1,3-ジメチルキサンチン。

## 結果

ELISA、抗血清およびウサギ血清アルブミンに抱合された誘導体の寒天プレートでの二重免疫拡散後の強い沈殿ライン、および他のカフェイン誘導体との低い交差反応性で決定されたように、30,000-100,000の抗体力価のカフェイン、1,7-DMXおよび1,7-DMUに対する抗体の陽性作製が観察できた。これらの結果は材料および方法と題して上記の節で説明したような方法に従って、競合的抗原ELISA開発のための建設的な条件を構成している。

## 【0080】

本発明の一つの態様に従うと、競合的抗原ELISAがプローブ薬剤としてカフェインを使用するCYP1A2表現型分類のために開発されるであろう。表現型分類に使用されている現在の方法に反して、本アッセイは感度が良く、迅速であり、および臨床実験室で最少の訓練しかつんでいない技術者でも日常的な基準で容易に実施できる。

## 実施例II

ELISAキットによる尿中のカフェイン、1,7-ジメチルキサンチン(1,7-DMX)および1,7-ジメチル尿酸(1,7-DMU)の決定

表6 ELISAキットの内容および保存条件

## 【0081】

【表6】

品目	単位	状態	量	保存条件
Tween™ 20	1 バイアル	液体	250 $\mu$ L/バイアル	4℃
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1 バイアル	液体	250 $\mu$ L/バイアル	4℃
カフェイン-HRP	1 バイアル	液体	250 $\mu$ L/バイアル	4℃
1,7-DMX-HRP	1 バイアル	液体	250 $\mu$ L/バイアル	4℃
1,7-DMU-HRP	1 バイアル	液体	250 $\mu$ L/バイアル	4℃
緩衝液 A	4 バイアル	個体	0.8894g/バイアル	4℃
緩衝液 B	6 バイアル	個体	1.234g/バイアル	4℃
緩衝液 C	6 バイアル	個体	1.1170g/バイアル	4℃
緩衝液 D	6 バイアル	個体	0.8082g/バイアル	4℃
プレート (カフェイン-Ab)	2	個体	—	4℃
プレート (1,7-DMX-Ab)	2	個体	—	4℃
プレート (1,7-DMU-Ab)	2	個体	—	4℃
緩衝液 E	6 バイアル	個体	0.9567g/バイアル	-20℃
標品 (カフェイン)	14 バイアル	液体	200 $\mu$ L	-20℃
標品 (1,7-DMX)	14 バイアル	液体	200 $\mu$ L	-20℃
標品 (1,7-DMU)	14 バイアル	液体	200 $\mu$ L	-20℃
1N NaOH	1 ボトル	液体	15 mL	20℃
1N HCl	1 ボトル	液体	15 mL	20℃

## 【0082】

ELISAによる[カフェイン]、[1,7-DMX]および[1X]決定のための尿試料の希釈

カフェイン、1,7-DMXおよび1,7-DMUの決定に必要とされる尿試料の希釈は競合的抗原ELISAの感度および尿試料中のカフェイン、1,7-DMXおよび1,7-DMU濃度の関数である。AAMUおよび1Xがマイクロタイタープレートのウェル中で約 $3 \times 10^{-6}$ Mであるような因子で尿試料を希釈することが示唆される。

## 【0083】

【表7】

希釈比	20x	40x	50x	80x	100x	150x	200x	400x
溶液	1	2	3	4	5	6	7	8
尿試料 (mL) <sup>a</sup> 10x希釈	500	250	200	125	100	66.7	50	25
緩衝液B (mL)	500	750	800	875	900	933.3	950	975

## 【0084】

a : ピペッティング前に尿試料を含んでいるマイクロチューブをかき混ぜる。

希釈尿試料は - 20 でマイクロチューブのためのボックスに保存。

緩衝液B : 1本のバイアルBの内容物を溶解 / 100 mL。

## 【0085】

ELISAによる希釈尿試料中の [カフェイン]、[1,7-DMX] および [1,7-DMU] の決定

## 警告

基質は発癌性である。緩衝液E (基質緩衝液) を取り扱う場合は手術用手袋をつけるべきである。各々の試料は二重に決定される。優秀なピペッティング技術が必要とされる。この技術を習得した場合は、二重の吸収値は5%未満になるべきである。緩衝液C、D、Eは新しく調製される。緩衝液E - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>はマイクロタイタープレートのウェルへピペッティングする直前に調製される。

## 試料の調製 :

コンピューターで表8を作り、印刷する。この表は96ウェルマイクロタイタープレートの各々の内容物を示している。表8の対応するウェル位置に尿試料の名前 (または番号) を入れる。各々の尿試料の希釈比 (D.F.) を選び、表8の対応する位置に記入する。緩衝液Bによる各々の尿試料の希釈を表8の対応する位置に記入する : 例えば、100のD.F. (100 µLの10x希釈尿試料 + 900 µL緩衝液B)、100 / 900を入れる。異なった希釈の調製試料に対しては、前記 "ELISAによる...尿試料の希釈" を参照されたい。100マイクロチューブ用のスタイロフォーム支持台を使用して1.5 mLのマイクロチューブに異なった希釈の尿試料を準備する。コンピューターで表9を作り、印刷する。スタイロフォーム支持台 (100マイクロチューブ) を使用し、表

9に示された順序で以下の48マイクロチューブを準備する。

表8 マイクロタイタープレート中のブランク、対照および尿試料の位置

【0086】

【表8】

試料	ウェル#	D.F.	希釈	試料	ウェル#	D.F.	希釈
ブランク	1-2	-		対照	49-50		-
対照	3-4	-		8	51-52		
S1	5-6	-		9	53-54		
S2	7-8	-		10	55-56		
S3	9-10	-		11	57-58		
S4	11-12	-		12	59-60		
S5	13-14	-		13	61-62		
S6	15-16	-		14	63-64		
S7	17-18	-		15	65-66		
S8	19-20	-		16	67-68		
S9	21-22	-		17	69-70		
S10	23-24	-		対照	71-72		-
S11	25-26	-		18	73-74		
S12	27-28	-		19	75-76		
S13	29-30	-		20	77-78		
S14	31-32	-		21	79-80		
S15	33-34	-		22	81-82		
1	35-36			23	83-84		
2	37-38			24	85-86		
3	39-40			25	87-88		
4	41-42			26	89-90		
5	43-44			27	91-92		
6	45-46			28	93-94		
7	47-48			ブランク	95-96		-

【0087】

表9 異なったマイクロチューブの内容物

【0088】

【表9】

チューブ#	試料	内容物	チューブ#	試料	内容物
1	ブランク	緩衝液B	25	7	希釈尿
2	対照	緩衝液B	26	8	希釈尿
3	S1	カフェイン/1,7-DMX/1,7-DMU	27	9	希釈尿
4	S2	カフェイン/1,7-DMX/1,7-DMU	28	10	希釈尿
5	S3	カフェイン/1,7-DMX/1,7-DMU	29	11	希釈尿
6	S4	カフェイン/1,7-DMX/1,7-DMU	30	12	希釈尿
7	S5	カフェイン/1,7-DMX/1,7-DMU	31	13	希釈尿
8	S6	カフェイン/1,7-DMX/1,7-DMU	32	14	希釈尿
9	S7	カフェイン/1,7-DMX/1,7-DMU	33	15	希釈尿
10	S8	カフェイン/1,7-DMX/1,7-DMU	34	16	希釈尿
11	S9	カフェイン/1,7-DMX/1,7-DMU	35	17	希釈尿
12	S10	カフェイン/1,7-DMX/1,7-DMU	36	対照	緩衝液B
13	S11	カフェイン/1,7-DMX/1,7-DMU	37	18	希釈尿
14	S12	カフェイン/1,7-DMX/1,7-DMU	38	19	希釈尿
15	S13	カフェイン/1,7-DMX/1,7-DMU	39	20	希釈尿
16	S14	カフェイン/1,7-DMX/1,7-DMU	40	21	希釈尿
17	S15	カフェイン/1,7-DMX/1,7-DMU	41	22	希釈尿
18	1	希釈尿	42	23	希釈尿
19	2	希釈尿	43	24	希釈尿
20	3	希釈尿	44	25	希釈尿
21	4	希釈尿	45	26	希釈尿
22	5	希釈尿	46	27	希釈尿
23	6	希釈尿	47	28	希釈尿
24	対照	緩衝液B	48	ブランク	緩衝液B

## 【0089】

溶液

緩衝液C：1本のバイアルCの内容物を溶解 / 50 mL。

25 mLのトウイーン™20を加える。

緩衝液C：1本のバイアルDの内容物を溶解 / 25 mL。

## 【0090】

25 mLのトウイーン™20を加える。

0.05%トウイーン™20：50 mLの水を含んでいる100 mLのエーレンマイヤーフラスコに25 mLのトウイーン™20を加える。

2.5N HCl：41.75 mLの12N HCl / 200 mL。250 mLガラス瓶に保存。

カフェイン - HRP 抱合体：9 mL の緩衝液 C を 15 mL のガラス試験管に加える。90  $\mu$ L のカフェイン - HRP 保存溶液を加える。

1, 7 - DMX - HRP 抱合体：9 mL の緩衝液 C を 15 mL のガラス試験管に加える。90  $\mu$ L の 1, 7 - DMX - HRP 保存溶液を加える。

1, 7 - DMU - HRP 抱合体：9 mL の緩衝液 C を 15 mL のガラス試験管に加える。90  $\mu$ L の 1, 7 - DMU - HRP 保存溶液を加える。

緩衝液 E - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>：1 本のバイアル E - 基質の内容物を溶解 / 50 mL の水。25  $\mu$ L の 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液を加える（新たに調製）。

表 10 カフェイン、1, 7 - DMX および 1, 7 - DMU の標準溶液（緩衝液 B で希釈）

【0091】

【表 10】

標品	カフェイン	標品	1,7-DMX	標品	1,7-DMU
1	1.12 x 10 <sup>-4</sup> M	1	1.12 x 10 <sup>-4</sup> M	1	1.12 x 10 <sup>-4</sup> M
2	6.00 x 10 <sup>-5</sup> M	2	6.00 x 10 <sup>-5</sup> M	2	6.00 x 10 <sup>-5</sup> M
3	3.56 x 10 <sup>-5</sup> M	3	3.56 x 10 <sup>-5</sup> M	3	3.56 x 10 <sup>-5</sup> M
4	2.00 x 10 <sup>-5</sup> M	4	2.00 x 10 <sup>-5</sup> M	4	2.00 x 10 <sup>-5</sup> M
5	6.00 x 10 <sup>-6</sup> M	5	6.00 x 10 <sup>-6</sup> M	5	6.00 x 10 <sup>-6</sup> M
6	3.56 x 10 <sup>-6</sup> M	6	3.56 x 10 <sup>-6</sup> M	6	3.56 x 10 <sup>-6</sup> M
7	2.00 x 10 <sup>-6</sup> M	7	2.00 x 10 <sup>-6</sup> M	7	2.00 x 10 <sup>-6</sup> M
8	1.12 x 10 <sup>-6</sup> M	8	1.12 x 10 <sup>-6</sup> M	8	1.12 x 10 <sup>-6</sup> M
9	6.00 x 10 <sup>-7</sup> M	9	6.00 x 10 <sup>-7</sup> M	9	6.00 x 10 <sup>-7</sup> M
10	3.56 x 10 <sup>-7</sup> M	10	3.56 x 10 <sup>-7</sup> M	10	3.56 x 10 <sup>-7</sup> M
11	2.00 x 10 <sup>-7</sup> M	11	2.00 x 10 <sup>-7</sup> M	11	2.00 x 10 <sup>-7</sup> M
12	1.12 x 10 <sup>-7</sup> M	12	1.12 x 10 <sup>-7</sup> M	12	1.12 x 10 <sup>-7</sup> M
13	6.00 x 10 <sup>-8</sup> M	13	6.00 x 10 <sup>-8</sup> M	13	6.00 x 10 <sup>-8</sup> M
14	3.56 x 10 <sup>-8</sup> M	14	3.56 x 10 <sup>-8</sup> M	14	3.56 x 10 <sup>-8</sup> M
15	2.00 x 10 <sup>-8</sup> M	15	2.00 x 10 <sup>-8</sup> M	15	2.00 x 10 <sup>-8</sup> M

【0092】

ELISA の条件

最後の列から出発して、カフェイン - HRP (1, 7 - DMX - HRP または 1, 7 - DMU - HRP) 抱合体溶液の 50  $\mu$ L をウェルに加える。ウェル # 96 から出発して (表 11 参照)、50  $\mu$ L の希釈尿試料 (二重に)、標品、ブランクをマイクロピペット (0 - 200  $\mu$ L) でウェルに加える。プレートを覆い

、数秒かき混ぜることにより穏やかに混合する。プレート室温に3時間放置する。マイクロタイタープレート洗浄機を使用して100 µL / ウェルの緩衝液Cで3回洗浄する。100 µL / ウェルの0.05% トゥィーン™ 20で3回洗浄する。150 µL / ウェルの緩衝液E - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (マイクロタイタープレートウェルへピペッティングする直前に調製する) を加える。軌道を描く振盪機を使用して、室温にて20 - 30分間振盪する。2.5 N HCl 溶液をウェル当たり50 µL 加える。軌道を描く振盪機を使用して、室温にて3分間振盪する。マイクロプレートリーダーを使用して490 nmでウェルの吸光度を読みとる。データシートを印刷し、適切に貼る。

【0093】

データからの尿試料中の[カフェイン]、[1,7-DMX]および[1,7-DMU]の計算

コンピューターで表11を描く。マイクロプレートリーダーのデータシートを使用し、表11にブランク、対照(遊離ハプテンは存在しない)、標品および試料の平均吸光度を書き入れる。シグマ-プロット(または他のソフトウェア)を使用して、片対数プロットで検量線を描く。検量線から未知試料のマイクロタイターウェル中の[AAMU](または[1X])を見だし、表12にデータを記入する。希釈比を未知試料の[カフェイン]([1,7-DMX]または[1,7-DMU])掛、結果を表12の対応するセルに記入する。

表11 マイクロタイタープレート中の試料の平均吸光度値

【0094】

【表11】

試料	ウェル#	A <sub>490</sub>	試料	ウェル#	A <sub>490</sub>
ブランク	1-2		対照	49-50	
対照	3-4		8	51-52	
S1	5-6		9	53-54	
S2	7-8		10	55-56	
S3	9-10		11	57-58	
S4	11-12		12	59-60	
S5	13-14		13	61-62	
S6	15-16		14	63-64	
S7	17-18		15	65-66	
S8	19-20		16	67-68	
S9	21-22		17	69-70	
S10	23-24		対照	71-72	
S11	25-26		18	73-74	
S12	27-28		19	75-76	
S13	29-30		20	77-78	
S14	31-32		21	79-80	
S15	33-34		22	81-82	
1	35-36		23	83-84	
2	37-38		24	85-86	
3	39-40		25	87-88	
4	41-42		26	89-90	
5	43-44		27	91-92	
6	45-46		28	93-94	
7	47-48		ブランク	95-96	

【0095】

表12 尿試料中のカフェイン、1,7-DMXおよび1,7-DMU濃度

【0096】

【表12】

試料	D.F.	[カフェイン]	[カフェイン] x D.F.
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			

【0097】

表13 異なった緩衝液の組成

【0098】

【表13】

緩衝液	pH	組成	濃度 (mM)	[P] (mM)
A	7.50	0.15629 g/100 mL NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.622 g/100 mL Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 1.778 g/100 mL (全重量)	11.325 60.099	71.424
B	7.50	0.1210191 g/100 mL NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.11309 g/100 mL Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 1.2341 g/100 mL (全重量)	8.769 41.23	49.999
C	7.50	1 g/ 100mL BSA 0.1210191 g/100 mL NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.11309 g/100 mL Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 2.2341 g/100 mL (全重量)	8.769 41.23	49.999
D	7.50	2 g/ 100mL BSA 0.1210191 g/100 mL NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.11309 g/100 mL Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 3.2341 g/100 mL (全重量)	8.769 41.23	49.999
E	5.00	0.52508 g/ 100mL クエン酸 1.34848 g/100 mL Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 40 mg/100 mL o-フェニレンー ジアミン塩酸塩 1.913567 g/100 mL (全重量)	25 50	-

## 【0099】

本発明をその特定の態様に関連して説明してきたが、さらなる変更が可能なことおよび本出願は一般に本発明の原理に従った任意の本発明の変形、使用または適用を包含することを意図していること、およびそのような本開示からの新展開は、本発明が関与する技術の既知のまたは慣例による実施内にあるものとして、および前に示した本質的特色を応用したものとして、および付随する特許請求の範囲に従うものとして含まれることが理解されるであろう。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 図1はELISAによるNAT1表現型分類のためのp-アミノサリチル酸誘導体を示している。

【図2】 図2はELISAによるCYP1A2表現型分類のためのカフェイ

ン誘導体を示している。

【図3】 図3はELISAによるCYP1A2表現型分類のための1,7-ジメチルキサンチン誘導体を示している。

【図4】 図4はELISAによるCYP1A2表現型分類のための1,7-ジメチル尿酸誘導体を示している。

【図5】 図5はELISAによるCYP2D6表現型分類のためのデキストロメトルファン誘導体を示している。

【図6】 図6はELISAによるCYP2E1表現型分類のためのクロルゾキサゾン誘導体を示している。

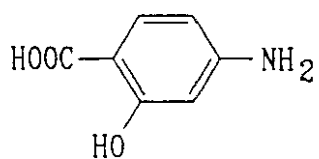
【図7】 図7はELISAによるCYP3A4表現型分類のためのデキストロメトルファン誘導体を示している。

【図8】 図8は本発明の一つの態様に従ったCYP1A2表現型分類のためのカフェインおよび1,7-ジメチルキサンチン誘導体生成のための合成経路を示している。

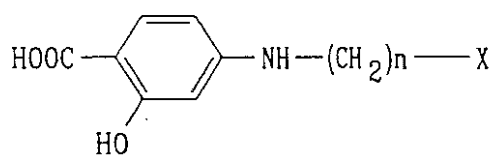
【図9】 図9は本発明の一つの態様に従ったCYP1A2表現型分類のためのカフェインおよび1,7-ジメチル尿酸誘導体生成のための合成経路を示している。

【図10】 図10はFalcon96-ウェルマイクロテスト組織培養プレートにピペッティングされるべき試料のパターンを示している。

【図1】



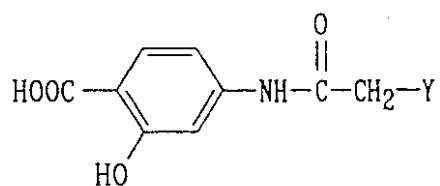
p-アミノサリチル酸



p-アミノサリチル酸誘導体 I

式中 X = NH<sub>2</sub>  
 (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>  
 N=C=S  
 I

式中 n = 1-5

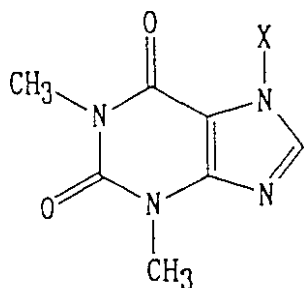


p-アミノサリチル酸誘導体 II

式中 Y = (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>  
 (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>N=C=S  
 (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OH  
 (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>I

式中 n = 1-5

【図2】



式中  $X = (\text{CH}_2)_n\text{COOH}$   $n=1-5$

または

$(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$   $n=1-5$

または

$(\text{CH}_2)_n\text{OH}$   $n=2-5$

または

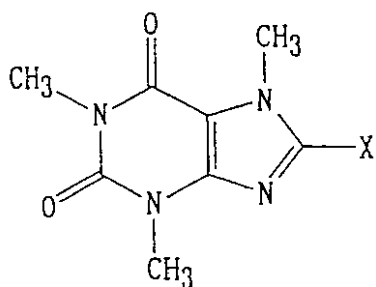
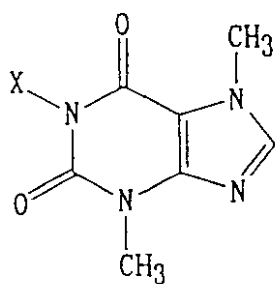
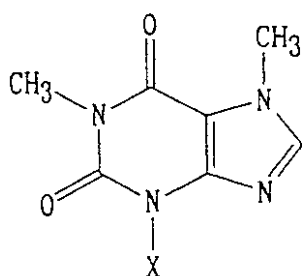
$(\text{CH}_2)_n\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$   $n=1-5$

または

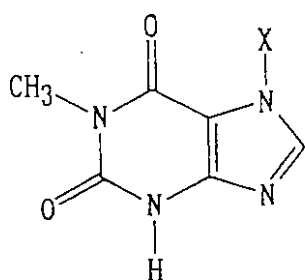
$(\text{CH}_2)_n\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$   $n=2-5$

または

$(\text{CH}_2)_n\text{N}=\text{C}=\text{S}$   $n=1-5$



【図3】



式中 X = (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOH n=1-5

または

(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub> n=1-5

または

(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OH n=2-5

または

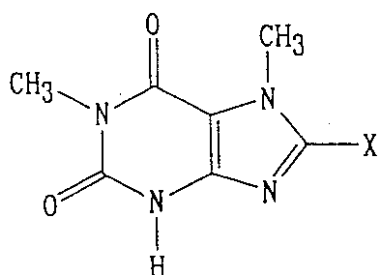
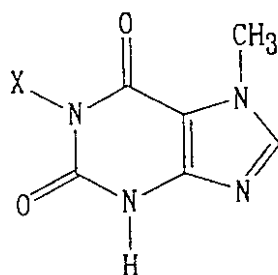
(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH n=1-5

または

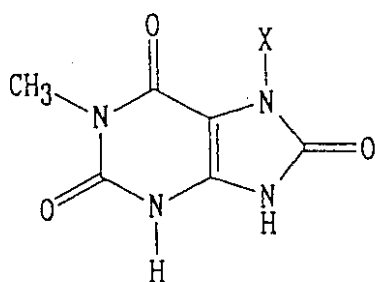
(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH n=2-5

または

(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>N=C=S n=1-5



【図4】



式中 X = (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOH n=1-5

または

(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub> n=1-5

または

(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OH n=2-5

または

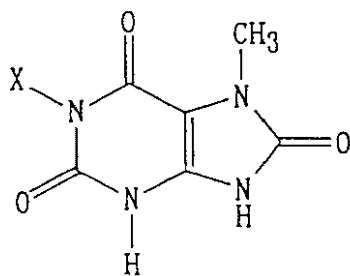
(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH n=1-5

または

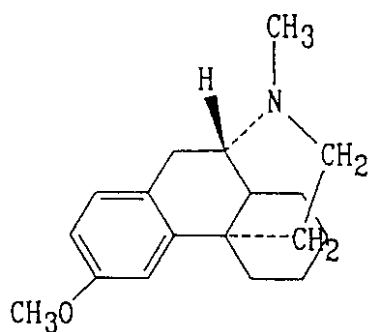
(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH n=2-5

または

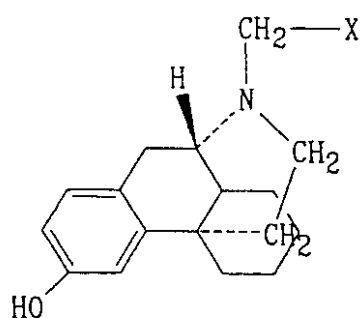
(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>N=C=S n=1-5



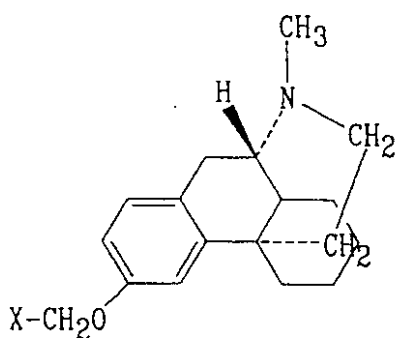
【図5】



デキストロメトルファン



デキストロメトルファン誘導体 I



デキストロメトルファン誘導体 I I

式中  $X = (\text{CH}_2)_n\text{COOH}$

$(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$

$(\text{CH}_2)_n\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$

$(\text{CH}_2)_n\text{N}=\text{C}=\text{S}$

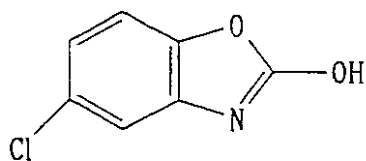
$(\text{CH}_2)_n\text{OH}$

$(\text{CH}_2)_n\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$

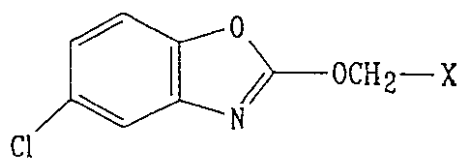
$\text{CH}_2\text{I}$

式中  $n = 1-5$

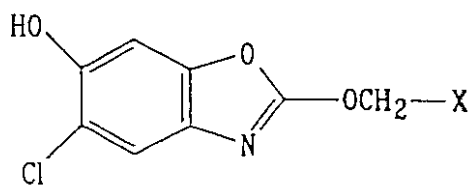
【図6】



クロロゾキサゾン



クロロゾキサゾン誘導体 I



クロロゾキサゾン誘導体 II

式中  $X = (\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$

$(\text{CH}_2)_n\text{N}=\text{C}=\text{S}$

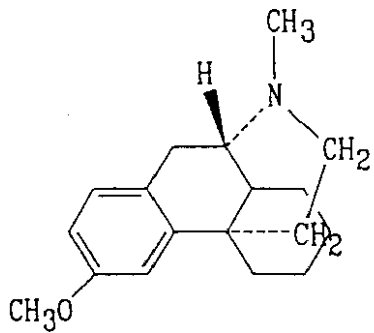
$(\text{CH}_2)_n\text{OH}$

$(\text{CH}_2)_n\text{OCO}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$

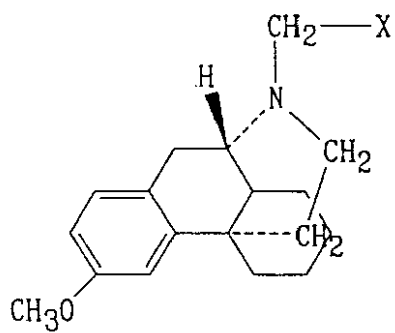
$(\text{CH}_2)_n\text{I}$

式中  $n = 0-5$

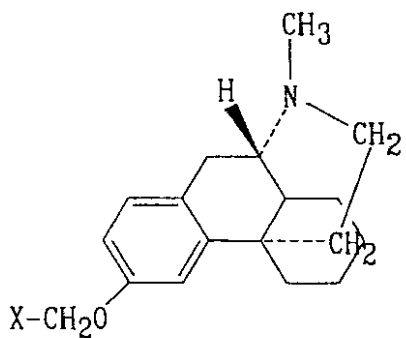
【図7】



デキストロメトルファン



デキストロメトルファン誘導体 I

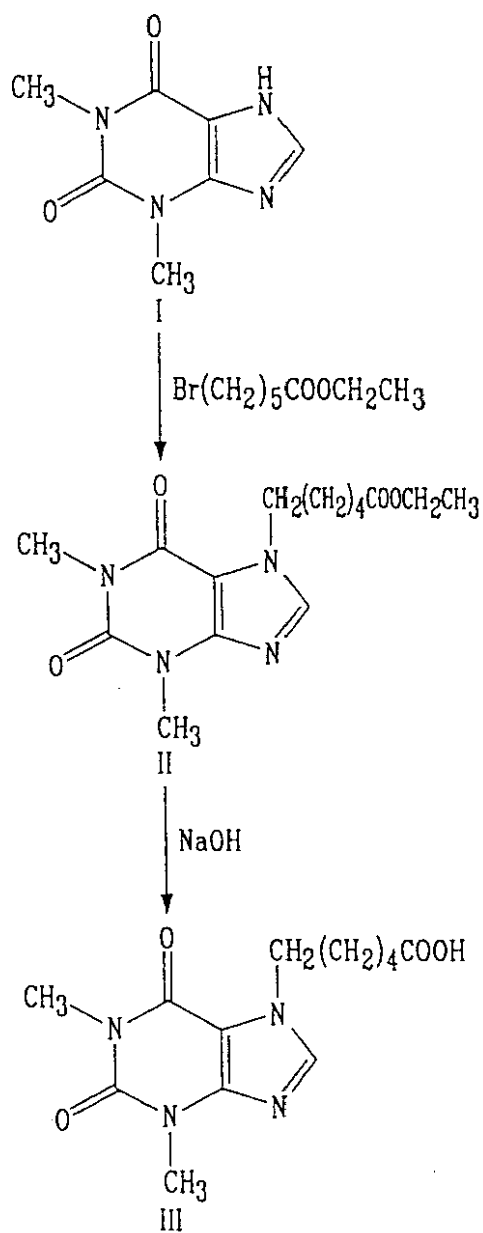


デキストロメトルファン誘導体 II

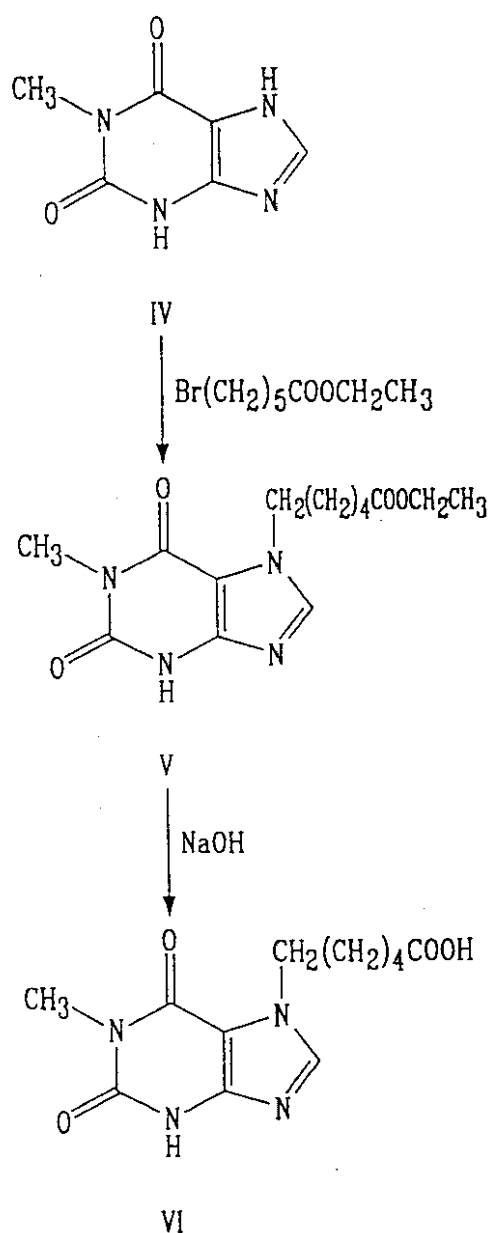
式中 X = (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOH(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>N=C=S(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OH(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOHCH<sub>2</sub>I

式中 n = 1-5

【図8】

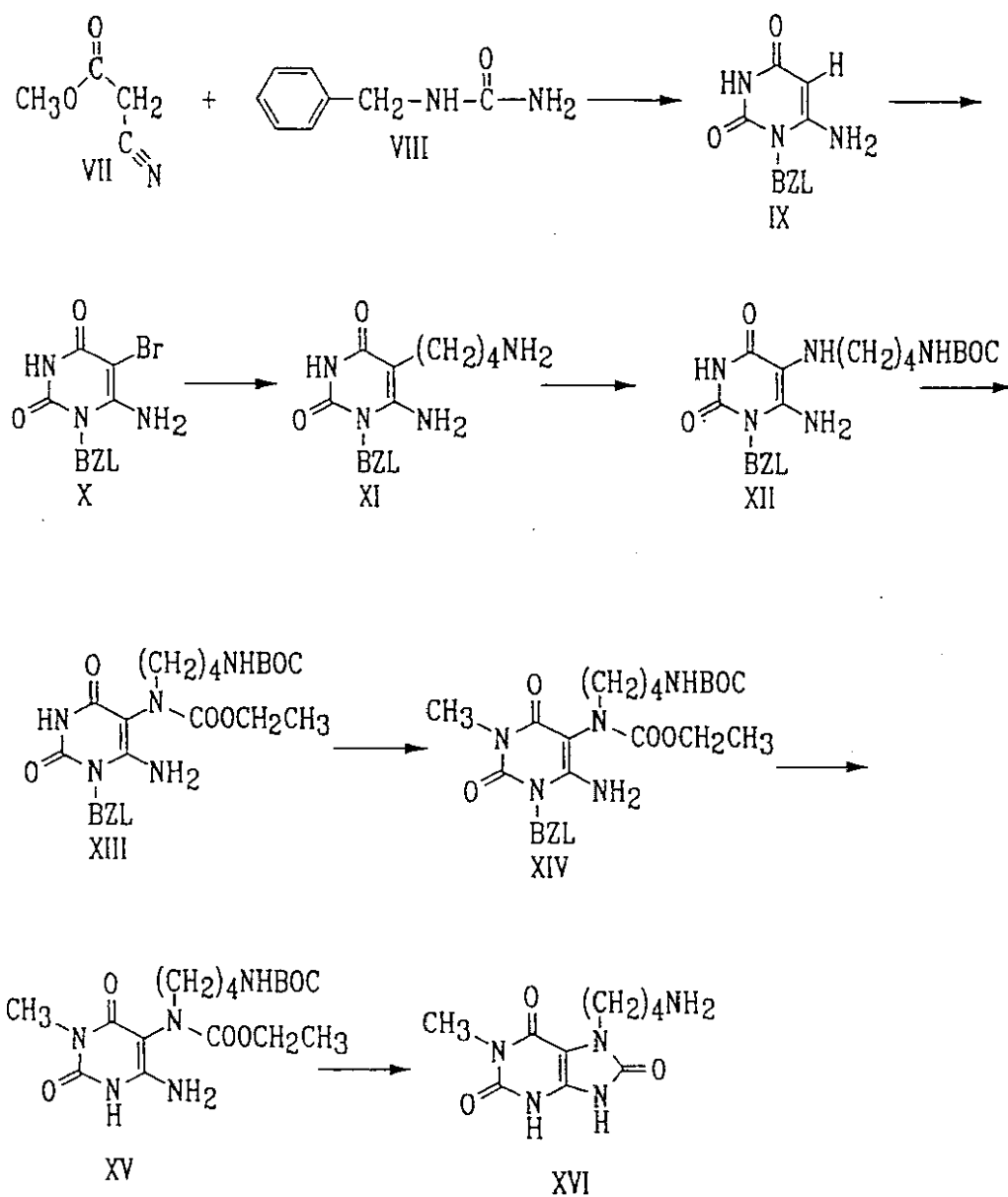


カフェイン誘導体



1,7-ジメチルキサンチン誘導体

【図9】



1,7-ジメチル尿酸誘導体

【図10】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BIK	STD8	STD16	S1	S9	S5	S1	S9	S5	BIK	STD8	STD16
B	STD1	STD9	STD17	S2	S10	S6	S2	S10	S6	STD1	STD9	STD17
C	STD2	STD10	STD18	S3	S11	S7	S3	S11	S7	STD2	STD10	STD18
D	STD3	STD11	STD19	S4	S12	S8	S4	S12	S8	STD3	STD11	STD19
E	STD4	STD12	STD20	S5	S1	S9	S5	S1	S9	STD4	STD12	STD20
F	STD5	STD13	STD21	S6	S2	S10	S6	S2	S10	STD5	STD13	STD21
G	STD6	STD14	STD22	S7	S3	S11	S7	S3	S11	STD6	STD14	STD22
H	STD7	STD15	STD23	S8	S4	S12	S8	S4	S12	STD7	STD15	STD23

【**手続補正書**】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【**提出日**】平成13年4月9日(2001.4.9)

【**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

【**補正の内容**】

【**特許請求の範囲**】

【**請求項1**】 個体のCYP1A2表現型を決定する方法であって、カフェインに特異的な少なくとも一つの抗体、およびカフェインの異なった代謝産物にそれぞれ特異的な二つの抗体で、カフェイン溶液を飲んだ後に該個体の生物学的試料中のカフェインおよびカフェインの第一および第二の異なった代謝産物のモル比を測定することから成り、ここで4のモル比は遅い中間体の指標であり、12は速いCYP1A2代謝体の指標であり、および該モル比は該個体のCYP1A2表現型の指標である、方法。

【**請求項2**】 該第一のカフェイン代謝産物が1,7-ジメチルキサンチン(1,7-DMX)および図3に例示されたものから成る群より選択される; 該第二のカフェイン代謝産物が1,7-ジメチル尿酸(1,7-DMU)および図4に例示されたものから成る群より選択される; および該第三の代謝産物が1,3,7-トリメチルキサンチン(カフェイン)および図2に例示されたものから成る群より選択される、請求項1に記載の方法。

【**請求項3**】 該生物学的試料が尿試料である請求項2に記載の方法。

【**請求項4**】 該個体の該決定されたCYP1A2表現型が医者に発癌物質誘導疾患への感受性を予測するおよび/または薬剤処置を個別化するのを可能にする請求項3に記載の方法。

【**請求項5**】 CYP1A2表現型を決定するための競合的酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)法であって、カフェイン溶液を飲んだ後に個体の生物学的試料中のカフェインまたは異なったカフェイン代謝産物のモル比を測定するために、カフェインに特異的な少なくとも一つの抗体、およびカフェインの異な

った代謝産物にそれぞれ特異的な二つの抗体を使用することから成り、ここで4のモル比は遅い中間体の指標であり、12は速いCYP1A2代謝体の指標であり、および該モル比は該個体のCYP1A2表現型の指標である、ELISA法。

【請求項6】 該第一のカフェイン代謝産物が1,7-ジメチルキサンチン(1,7-DMX)および図3に例示されたものから成る群より選択される；該第二のカフェイン代謝産物が1,7-ジメチル尿酸(1,7-DMU)および図4に例示されたものから成る群より選択される；および該第三の代謝産物が1,3,7-トリメチルキサンチン(カフェイン)および図2に例示されたものから成る群より選択される請求項5に記載のELISA法。

【請求項7】 該生物学的試料が尿試料である請求項6に記載のELISA法。

【請求項8】 該個体の該決定されたCYP1A2表現型が医者に発癌物質誘導疾患への感受性を予測するおよび/または薬剤処置を個別化するのを可能にする請求項7に記載のELISA法。

【請求項9】 CYP1A2表現型を決定するための競合的酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)キットであって、カフェイン溶液を飲んだ後に個体の生物学的試料中のそれらのモル比を測定するために、カフェインに特異的な少なくとも一つの抗体を含み、ここで4のモル比は遅い中間体の指標であり、12は速いCYP1A2代謝体の指標であり、および該モル比は該個体のCYP1A2表現型の指標である、キット。

【請求項10】 さらに

- a) カフェインに特異的な第一の抗体で被覆されたプレート；
- b) カフェインの第一の代謝産物に特異的な第二の抗体；
- c) カフェインの第二の代謝産物に特異的な第三の抗体；
- d) 標準検量線が得られる既知量のカフェイン-西洋ワサビペルオキシダーゼ抱合体；
- e) 標準検量線が得られる既知量の1,7-ジメチルキサンチン-西洋ワサビペルオキシダーゼ抱合体；および

f) 標準検量線が得られる既知量の1,7-ジメチル尿酸-西洋ワサビペルオキシダーゼ抱合体を含む請求項9に記載の競合的ELISAキット。

【請求項11】 該特異的抗体がポリクローナルまたはモノクローナル抗体である請求項1に記載の方法。

【請求項12】 該特異的抗体がポリクローナル抗体である請求項1に記載の方法。

【請求項13】 該特異的抗体がポリクローナルまたはモノクローナル抗体である請求項5に記載の競合的抗原酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)。

【請求項14】 該特異的抗体がポリクローナル抗体である請求項5に記載の競合的抗原酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)。

【請求項15】 該特異的抗体がポリクローナルまたはモノクローナル抗体である請求項10に記載の競合的ELISAキット。

【請求項16】 該特異的抗体がポリクローナル抗体である請求項10に記載の競合的ELISAキット。

【請求項17】 個体のNAT1表現型を決定する方法であって、各々p-アミノサリチル酸または異なったp-アミノサリチル酸代謝産物に特異的な少なくとも2つの抗体で、p-アミノサリチル酸を消費した後に個体の生物学的試料中のp-アミノサリチル酸のモル比を測定することから成り、および該モル比は該個体のNAT1表現型の指標である、方法。

【請求項18】 第一のp-アミノサリチル酸代謝産物が4-オキシメチル-アミノサリチル酸および図1に例示したものから成る群より選択され、ここでp-アミノサリチル酸が選択され図1に例示されている、請求項17に記載の方法。

【請求項19】 該生物学的試料が尿試料である請求項18に記載の方法。

【請求項20】 該個体の該決定されたNAT1表現型が医者に発癌物質誘導疾患への感受性を予測するおよび/または薬剤処置を個別化するのを可能にする請求項19に記載の方法。

【請求項21】 NAT1表現型を決定するための競合的酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)法であって、p-アミノサリチル酸を消費した後に個体

の生物学的試料中のp - アミノサリチル酸またはp - アミノサリチル酸代謝産物のモル比を測定するために、各々それらに特異的な少なくとも2つの抗体を使用することから成り、および該モル比は該個体のN A T 1 表現型の指標である、E L I S A 法。

【請求項22】 第一のp - アミノサリチル酸代謝産物が4 - オキシメチル - アミノサリチル酸および図1に例示したものから成る群より選択され、ここでp - アミノサリチル酸が選択され図1に例示されている、請求項21に記載のE L I S A 法。

【請求項23】 該生物学的試料が尿試料である請求項22に記載のE L I S A 法。

【請求項24】 該個体の該決定されたN A T 1 表現型が医者に発癌物質誘導疾患への感受性を予測するおよび/または薬剤処置を個別化するのを可能にする請求項23に記載のE L I S A 法。

【請求項25】 N A T 1 表現型を決定するための競合的酵素結合免疫吸着アッセイ ( E L I S A ) キットであって、p - アミノサリチル酸を消費した後に個体の生物学的試料中のp - アミノサリチル酸またはp - アミノサリチル酸代謝産物のモル比を測定するために、各々それらに特異的な少なくとも2つの抗体を含み、および該モル比は該個体のN A T 1 表現型の指標である、キット。

【請求項26】 さらに

- a ) p - アミノサリチル酸に特異的な第一の抗体で被覆されたプレート ;
- b ) p - アミノサリチル酸の第一の代謝産物に特異的な第二の抗体 ;
- c ) 標準検量線が得られる既知量のp - アミノサリチル酸 - 西洋ワサビペルオキシダーゼ抱合体 ;
- d ) 標準検量線が得られる既知量のp - アミノサリチル酸代謝産物 - 西洋ワサビペルオキシダーゼ抱合体を含む請求項25に記載の競合的E L I S A キット。

【請求項27】 該特異的抗体がポリクローナルまたはモノクローナル抗体である請求項17に記載の方法。

【請求項28】 該特異的抗体がポリクローナル抗体である請求項17に記載の方法。

【請求項29】 該特異的抗体がポリクローナルまたはモノクローナル抗体である請求項21に記載の競合的抗原酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)。

【請求項30】 該特異的抗体がポリクローナル抗体である請求項21に記載の競合的抗原酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)。

【請求項31】 該特異的抗体がポリクローナルまたはモノクローナル抗体である請求項26に記載の競合的ELISAキット。

【請求項32】 該特異的抗体がポリクローナル抗体である請求項26に記載の競合的ELISAキット。

【請求項33】 個体のCYP2D6表現型を決定する方法であって、各々デキストロメトルファンまたは代謝産物に特異的な少なくとも2つの抗体で、デキストロメトルファンを消費した後に該個体の生物学的試料中の第一および第二のデキストロメトルファンの異なった代謝産物のモル比を測定することから成り、モル比 $> 1$ は遅い中間体の指標でありおよびモル比 $< 1$ は速いCYP2D6代謝体の指標であり、および該モル比は該個体のCYP2D6表現型の指標である、方法。

【請求項34】 第一のデキストロメトルファン代謝産物が3-ヒドロキシ-17-メチルモルフィナンおよび図5に例示されたものから成る群より選択され、およびデキストロメトルファンが選択され、図5に例示されている、請求項33に記載の方法。

【請求項35】 該生物学的試料が尿試料である請求項34に記載の方法。

【請求項36】 該個体の該決定されたCYP2D6表現型が医者に発癌物質誘導疾患への感受性を予測するおよび/または薬剤処置を個別化するのを可能にする請求項35に記載の方法。

【請求項37】 CYP2D6表現型を決定するための競合的酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)法であって、デキストロメトルファンを消費した後に個体の生物学的試料中のデキストロメトルファンまたはデキストロメトルファン代謝産物のモル比を測定するために、各々それらに特異的な少なくとも2つの抗体を使用することから成り、ここでモル比 $> 1$ は遅い指標でありおよびモル比

< 1 は速い CYP2D6 代謝体の指標であり、および該モル比は該個体の CYP2D6 表現型の指標である、ELISA 法。

【請求項 38】 3 - ヒドロキシ - 17 - メチルモルフィナンおよび図 5 に例示されたものから成る群より選択され、デキストロメトルフアンが選択され、図 5 に例示されている、請求項 37 に記載の ELISA 方法。

【請求項 39】 該生物学的試料が尿試料である請求項 38 に記載の ELISA 法。

【請求項 40】 該個体の該決定された CYP2D6 表現型が医者に発癌物質誘導疾患への感受性を予測するおよび / または薬剤処置を個別化するのを可能にする請求項 38 に記載の ELISA 法。

【請求項 41】 CYP2D6 表現型を決定するための競合的酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) キットであって、デキストロメトルフアンを消費した後、個体の生物学的試料中のデキストロメトルフアンの異なった代謝産物のモル比を測定するために、各々それらに特異的な少なくとも 2 つの抗体を含み、ここでモル比 > 1 は遅い指標でありおよびモル比 < 1 は速い CYP2D6 代謝体の指標であり、および該モル比は該個体の CYP2D6 表現型の指標である、キット。

【請求項 42】 さらに

- a) デキストロメトルフアンに特異的な第一の抗体で被覆されたプレート ;
- b) デキストロメトルフアンの第一の代謝産物に特異的な第二の抗体 ;
- c) 標準検量線が得られる既知量のデキストロメトルフアン - 西洋ワサビペルオキシダーゼ抱合体 ;
- d) 標準検量線が得られる既知量のデキストロメトルフアン代謝産物 - 西洋ワサビペルオキシダーゼ抱合体を含む請求項 41 に記載の競合的 ELISA キット。

【請求項 43】 該特異的抗体がポリクローナルまたはモノクローナル抗体である請求項 33 に記載の方法。

【請求項 44】 該特異的抗体がポリクローナル抗体である請求項 33 に記載の方法。

【請求項 45】 該特異的抗体がポリクローナルまたはモノクローナル抗体

である請求項37に記載の競合的酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)。

【請求項46】 該特異的抗体がポリクローナル抗体である請求項37に記載の競合的酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)。

【請求項47】 該特異的抗体がポリクローナルまたはモノクローナル抗体である請求項42に記載の競合的ELISAキット。

【請求項48】 該特異的抗体がポリクローナル抗体である請求項42に記載の競合的ELISAキット。

【請求項49】 個体のCYP2E1表現型を決定する方法であって、各々クロルゾキサゾンの異なった代謝産物に特異的な少なくとも2つの抗体で、クロルゾキサゾンを消費した後に該個体の生物学的試料中の第一および第二のクロルゾキサゾンの異なった代謝産物のモル比を測定することから成り、モル比は該個体のCYP2E1表現型の指標である、方法。

【請求項50】 第一のクロルゾキサゾン代謝産物が5-クロロ-6-ヒドロキシ-ベンゾオキサゾールおよび図6に例示されたものから成る群より選択され、ここでクロルゾキサゾンが選択され図6に例示されている、請求項49に記載の方法。

【請求項51】 該生物学的試料が尿試料である請求項50に記載の方法。

【請求項52】 該個体の該決定されたCYP2E1表現型が医者に発癌物質誘導疾患への感受性を予測するおよび/または薬剤処置を個別化するのを可能にする請求項51に記載の方法。

【請求項53】 CYP2E1表現型を決定するための競合的酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)キットであって、クロルゾキサゾンを消費した後に個体の生物学的試料中のクロルゾキサゾンの異なった代謝産物のモル比を測定するために、各々それらに特異的な少なくとも2つの抗体を含み、該モル比は該個体のCYP2E1表現型の指標である、キット。

【請求項54】 第一のクロルゾキサゾン代謝産物が5-クロロ-6-ヒドロキシ-ベンゾオキサゾールおよび図6に例示されたものから成る群より選択され、およびクロルゾキサゾンが選択され図6に例示されている、請求項53に記載のELISA法。

【請求項55】 該生物学的試料が尿試料である請求項53に記載のELISA法。

【請求項56】 該個体の該決定されたCYP2E1表現型が医者に発癌物質誘導疾患への感受性を予測するおよび/または薬剤処置を個別化するのを可能にする請求項53に記載のELISA法。

【請求項57】 CYP2E1表現型を決定するための競合的酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)キットであって、クロルゾキサゾン消費した後に個体の生物学的試料中のクロルゾキサゾンの異なった代謝産物のモル比を測定するために、各々それらに特異的な少なくとも2つの抗体を含み、該モル比は該個体のCYP2E1表現型の指標である、キット。

【請求項58】 さらに

- a) クロルゾキサゾンに特異的な第一の抗体で被覆されたプレート；
- b) クロルゾキサゾンの第一の代謝産物に特異的な第二の抗体；
- c) 標準検量線が得られる既知量のクロルゾキサゾン - 西洋ワサビペルオキシダーゼ抱合体；
- d) 標準検量線が得られる既知量のクロルゾキサゾン代謝産物 - 西洋ワサビペルオキシダーゼ抱合体を含む請求項57に記載の競合的ELISAキット。

【請求項59】 該特異的抗体がポリクローナルまたはモノクローナル抗体である請求項49に記載の方法。

【請求項60】 該特異的抗体がポリクローナル抗体である請求項49に記載の方法。

【請求項61】 該特異的抗体がポリクローナルまたはモノクローナル抗体である請求項53に記載の競合的抗原酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)。

【請求項62】 該特異的抗体がポリクローナル抗体である請求項53に記載の競合的抗原酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)。

【請求項63】 該特異的抗体がポリクローナルまたはモノクローナル抗体である請求項58に記載の競合的ELISAキット。

【請求項64】 該特異的抗体がポリクローナル抗体である請求項58に記載

載の競合的E L I S Aキット。

【請求項65】 個体のC Y P 3 A 4表現型を決定する方法であって、各々デキストロメトルファンまたはデキストロメトルファンの代謝産物に特異的な少なくとも2つの抗体で、デキストロメトルファンを消費した後に該個体の生物学的試料中のデキストロメトルファンの第一および第二の異なった代謝産物のモル比を測定することから成り、該モル比は該個体のC Y P 3 A 4表現型の指標である、方法。

【請求項66】 第一のデキストロメトルファン代謝産物が3 - メトキシ - モルフィナンおよび図7に例示されたものから成る群より選択され、およびデキストロメトルファンが選択され図7に例示されている、請求項65に記載の方法。

【請求項67】 該生物学的試料が尿試料である請求項66に記載の方法。

【請求項68】 該個体の該決定されたC Y P 3 A 4表現型が医者に発癌物質誘導疾患への感受性を予測するおよび/または薬剤処置を個別化するのを可能にする請求項67に記載の方法。

【請求項69】 C Y P 3 A 4表現型を決定するための競合的酵素結合免疫吸着アッセイ(E L I S A)キットであって、デキストロメトルファンを消費した後に個体の生物学的試料中のデキストロメトルファンの異なった代謝産物のモル比を測定するために、各々それらに特異的な少なくとも2つの抗体を含み、該モル比は該個体のC Y P 3 A 4表現型の指標である、キット。

【請求項70】 第一のデキストロメトルファン代謝産物が3 - メトキシ - モルフィナンおよび図7に例示されたものから成る群より選択され、およびデキストロメトルファンが選択され図7に例示されている、請求項69に記載のE L I S A法。

【請求項71】 該生物学的試料が尿試料である請求項69に記載のE L I S A法。

【請求項72】 該個体の該決定されたC Y P 3 A 4表現型が医者に発癌物質誘導疾患への感受性を予測するおよび/または薬剤処置を個別化するのを可能にする請求項69に記載のE L I S A法。

【請求項73】 CYP3A4表現型を決定するための競合的酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)キットであって、デキストロメトルファンを消費した後、個体の生物学的試料中のデキストロメトルファンの異なった代謝産物のモル比を測定するために、各々それらに特異的な少なくとも2つの抗体を含み、該モル比は該個体のCYP3A4表現型の指標である、キット。

【請求項74】 さらに

- a) デキストロメトルファンに特異的な第一の抗体で被覆されたプレート；
- b) デキストロメトルファンの第一の代謝産物に特異的な第二の抗体；
- c) 標準検量線が得られる既知量のデキストロメトルファン - 西洋ワサビペルオキシダーゼ抱合体；
- d) 標準検量線が得られる既知量のデキストロメトルファン代謝産物 - 西洋ワサビペルオキシダーゼ抱合体を含む請求項73に記載の競合的ELISAキット。

【請求項75】 該特異的抗体がポリクローナルまたはモノクローナル抗体である請求項65に記載の方法。

【請求項76】 該特異的抗体がポリクローナル抗体である請求項65に記載の方法。

【請求項77】 該特異的抗体がポリクローナルまたはモノクローナル抗体である請求項69に記載の競合的抗原酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)。

【請求項78】 該特異的抗体がポリクローナル抗体である請求項69に記載の競合的抗原酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)。

【請求項79】 該特異的抗体がポリクローナルまたはモノクローナル抗体である請求項74に記載の競合的ELISAキット。

【請求項80】 該特異的抗体がポリクローナル抗体である請求項74に記載の競合的ELISAキット。

【請求項81】 図1に示したp-アミノサリチル酸誘導体。

【請求項82】 図1に示したp-アミノサリチル酸代謝産物誘導体。

【請求項83】 図2に示したカフェイン誘導体。

【請求項84】 図3に示した1,7-ジメチルキサンチン代謝産物誘導体

。

【請求項85】 図4に示した1,7-ジメチル尿酸代謝産物誘導体。

【請求項86】 図5に示したデキストロメトルファン誘導体。

【請求項87】 図5に示したデキストロメトルファン代謝産物誘導体。

【請求項88】 図6に示したクロルゾキサゾン誘導体。

【請求項89】 図6に示したクロルゾキサゾン代謝産物誘導体。

【請求項90】 図7に示したデキストロメトルファン誘導体。

【請求項91】 図7に示したデキストロメトルファン代謝産物誘導体。

【請求項92】 カフェイン誘導体を合成する方法であって、図8に示したカフェイン合成経路に従って該カフェイン誘導体を合成する方法。

【請求項93】 1,7-ジメチルキサンチン誘導体を合成する方法であって、図8に示した1,7-ジメチルキサンチン合成経路に従って該1,7-ジメチルキサンチン誘導体を合成する方法。

【請求項94】 カフェイン誘導体を合成する方法であって、図9に示したカフェイン合成経路に従って該カフェイン誘導体を合成する方法。

【請求項95】 1,7-ジメチル尿酸誘導体を合成する方法であって、図9に示した1,7-ジメチル尿酸合成経路に従って該1,7-ジメチル尿酸誘導体を合成する方法。

## 【國際調查報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/CA 00/00246
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/53 G01N33/543 C07D473/08 C07D473/10 C07D473/12		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C07D		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WONG P ET AL: "Synthesis of caffeine metabolites derivatives for measuring CYP1A3 activity by ELISA." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL, vol. 40, March 1999 (1999-03), page 53 XP002144104 90th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; Philadelphia, Pennsylvania, USA; April 10-14, 1999, March, 1999 ISSN: 0197-016X abstract  --- -/--	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
° Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search  3 August 2000		Date of mailing of the international search report  13. 11. 00
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentplan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Authorized officer  Goetz, M

2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/CA 00/00246
---

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>WO 95 04757 A (UNIV TEXAS) 16 February 1995 (1995-02-16) page 5, line 7-13 page 5, line 29 -page 6, line 13 page 9, line 9-29 page 11, line 17-23 page 12, line 5-15 claims 9,11,13,14,16,18-29,37</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-16
Y	<p>DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1991 TANG B-K ET AL: "CAFFEINE AS A METABOLIC PROBE VALIDATION OF ITS USE FOR ACETYLATED PHENOTYPING" Database accession no. PREV199192067910 XP002144105 cited in the application abstract &amp; CLINICAL PHARMACOLOGY &amp; THERAPEUTICS, vol. 49, no. 6, 1991, pages 648-657, ISSN: 0009-9236</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-16
Y	<p>DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1990 KILBANE A J ET AL: "HUMAN N-ACETYLATION GENOTYPE DETERMINATION WITH URINARY CAFFEINE METABOLITES" Database accession no. PREV199090015389 XP002144106 cited in the application abstract &amp; CLINICAL PHARMACOLOGY &amp; THERAPEUTICS, vol. 47, no. 4, 1990, pages 470-477, ISSN: 0009-9236</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-16
Y	<p>DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; May 1998 (1998-05) MEACHER DIANNE M ET AL: "Analysis of NAT and CYP1A2 phenotypes and NAT2* genotype by capillary electrophoresis." Database accession no. PREV199800360878 XP002144107 cited in the application abstract &amp; BIOMARKERS, vol. 3, no. 3, May 1998 (1998-05), pages 205-218, ISSN: 1354-750X</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/CA 00/00245

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 645 459 A (COOK DORN C ;PARKINSON ANDREW (US)) 29 March 1995 (1995-03-29) page 3, line 6,7 page 3, line 48 -page 4, line 55 claims 1-5 ---	1-16
A	US 5 830 672 A (LEYLAND-JONES BRIAN ET AL) 3 November 1998 (1998-11-03) column 2, line 28-50 column 3, line 42-55 example 1 claim 5 -----	1-16

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/CA 00/00246

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1 - 16

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

## 1. Claims: 1 - 16

Method, ELISA and kit for determining CYP 1A2 phenotype, based on the determination of the molar ratio between caffeine and selected metabolites thereof.

## 2. Claims: 17 - 32

Method, ELISA and kit for determining NAT1 phenotype, based on the determination of the molar ratio between p-aminosalicylic acid and selected metabolites thereof.

## 3. Claims: 33 - 48

Method, ELISA and kit for determining CYP 2D6 phenotype, based on the determination of the molar ratio between dextromethorphan and selected metabolites thereof.

## 4. Claims: 49 - 64

Method, ELISA and kit for determining CYP 2E1 phenotype, based on the determination of the molar ratio between chlorzoxazone and selected metabolites thereof.

## 5. Claims: 65 - 80

Method, ELISA and kit for determining CYP 3A4 phenotype, based on the determination of the molar ratio between dextromethorphan and selected metabolites thereof.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/CA 00/00246

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9504757 A	16-02-1995	AU 7452094 A	28-02-1995
EP 0645459 A	29-03-1995	US 5478723 A	26-12-1995
US 5830672 A	03-11-1998	CA 2167330 A	01-08-1997

## フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 ウォン, ピエール  
カナダ国ケベック アーシュ2イックス・  
2ペー4, モンリアル, エイルメ 3415,  
アパートメント 4

专利名称(译)	用于测定代谢表型的ELISA试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">JP2002539450A</a>	公开(公告)日	2002-11-19
申请号	JP2000605205	申请日	2000-03-09
[标]申请(专利权)人(译)	利兰·琼斯布赖恩 皮埃尔·旺		
申请(专利权)人(译)	利兰 - 琼斯, 布赖恩 黄皮埃尔		
[标]发明人	レイランドジョーンズブライアン ウォンピエール		
发明人	レイランド-ジョーンズ,ブライアン ウォン,ピエール		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/94		
CPC分类号	G01N33/94 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/53.G G01N33/543.551.A		
优先权	60/124488 1999-03-15 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明包括可在临床实验室中常规使用的代谢表型, 包括 (但不限于) CYP1A2, N-乙酰基转移酶-1 ( NAT-1 ), CYP2P6, CYP2E1和 CYP3A4。 本发明涉及用于快速测定的酶联免疫吸附测定 ( ELISA )。 ELISA试剂盒使医生能够a) 个性化对茶碱, 他莫昔芬和氟氮平等药物的治疗, 以及b) 预测对致癌物引起的疾病 ( 如大肠癌 ) 的易感性。 选择具有最可能应答的适当表型的患者以减少正在进行临床试验的患者数量。

化合物	%交差反応		
	カフェイン-Ab	1,7-DMX-Ab	1,7-DMU-
Ab			
カフェイン	100	0*	0
キサンチン	0	0	0
ヒポキサンチン	0	0	0
1-メチルキサンチン	0	0	0
3-メチルキサンチン	0	0	0
7-メチルキサンチン	0	0	0
8-メチルキサンチン	0	0	0
1, 3-ジメチルキサンチン*	0	0	0
1, 7-ジメチルキサンチン*	0	100	0
3, 7-ジメチルキサンチン*	0	0	0
尿酸	0	0	0
1-メチル尿酸	0	0	0
3-メチル尿酸	0	0	0
7-メチル尿酸	0	0	0
1, 3-ジメチル尿酸	0	0	0
1, 7-ジメチル尿酸	0	0	100
3, 7-ジメチル尿酸	0	0	0
1, 3, 7-トリメチル尿酸	0	0	0
グアニン	0	0	0
ウラシル	0	0	0
AAU*	0	0	0
AAMU*	0	0	0
AADMU*	0	0	0