

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-507422

(P2018-507422A)

(43) 公表日 平成30年3月15日(2018.3.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	S
GO 1 N 33/532 (2006.01)	GO 1 N 33/532	A

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 27 頁)

(21) 出願番号 特願2017-564786 (P2017-564786)
 (86) (22) 出願日 平成27年5月29日 (2015.5.29)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年9月4日 (2017.9.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2015/080330
 (87) 国際公開番号 W02016/155111
 (87) 国際公開日 平成28年10月6日 (2016.10.6)
 (31) 優先権主張番号 201510145431.1
 (32) 優先日 平成27年3月30日 (2015.3.30)
 (33) 優先権主張国 中国 (CN)

(71) 出願人 517310636
 上▲海▼云▲澤▼生物科技有限公司
 中華人民共和国201112上▲海▼市▲
 閔▼行区三▲魯▼公路3279号明浦▲広
 ▼▲場▼2号楼2楼
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉
 (74) 代理人 100133400
 弁理士 阿部 達彦
 (72) 発明者 ▲呉▼ ▲馮▼波
 中華人民共和国201112上▲海▼市▲
 閔▼行区三▲魯▼公路3279号明浦▲広
 ▼▲場▼2号楼2楼

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫分析用の免疫抑制剤薬物の抽出試薬

(57) 【要約】

本発明は免疫分析用の血液サンプル免疫抑制剤薬物の抽出試薬を提供し、抽出試薬は蛋白質変性剤と、蛋白質加水分解酵素と、界面活性剤と、pH緩衝液と、を含む。本発明は前記抽出試薬を用いて全血サンプル中の免疫抑制剤の濃度を検出する方法及び前記抽出試薬を含有する免疫検出試薬キットを更に提供する。本発明の抽出試薬によると、伝統的な抽出方法中の有機溶剤を使用する必要がないので、有機溶剤による検出体系中の抗体活性に対する影響を回避することができる。本発明に係わる薬物抽出工程は、遠心処理を行う必要がなく、処理後のサンプルを直接に免疫の検出に応用することができ、操作が簡単で、検出結果が正確で信頼性のあるものである。

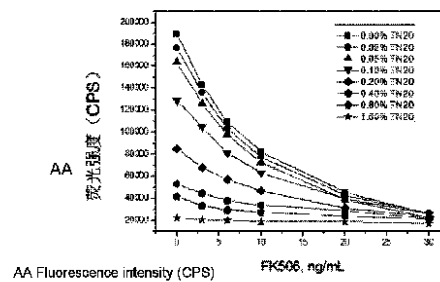


图 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

蛋白質変性剤と、蛋白質加水分解酵素と、界面活性剤と、pH緩衝液と、を含むことを特徴とする免疫分析用の血液サンプル免疫抑制剤薬物の抽出試薬。

【請求項 2】

前記蛋白質変性剤が、尿素、塩化グアニジニウム又は他の非有機溶剤系蛋白質変性剤から選ばれることを特徴とする請求項 1 に記載の抽出試薬。

【請求項 3】

前記尿素の前記抽出試薬中のモル濃度は $4 \text{ mol/L} \sim 12 \text{ mol/L}$ であって、前記塩化グアニジニウムの前記抽出試薬中のモル濃度は $1 \text{ mol/L} \sim 8 \text{ mol/L}$ であることを特徴とする請求項 2 に記載の抽出試薬。

10

【請求項 4】

前記尿素の前記抽出試薬中のモル濃度が $6 \text{ mol/L} \sim 8 \text{ mol/L}$ で、前記塩化グアニジニウムの前記抽出試薬中のモル濃度が $2 \text{ mol/L} \sim 6 \text{ mol/L}$ であることを特徴とする請求項 3 に記載の抽出試薬。

【請求項 5】

前記蛋白質加水分解酵素が、スブチリシン、プロテイナーゼ K、ディスパーゼから選ばれる 1 種又は複種類であることを特徴とする請求項 1 に記載の抽出試薬。

【請求項 6】

前記蛋白質加水分解酵素が、スブチリシンであることを特徴とする請求項 5 に記載の抽出試薬。

20

【請求項 7】

前記スブチリシンの前記抽出試薬中の量は $2.5 \text{ U/ml} \sim 10 \text{ U/ml}$ であることを特徴とする請求項 6 に記載の抽出試薬。

【請求項 8】

前記界面活性剤は、ツイーン 20、サポニン、Triton X-100 から選ばれる 1 種又は複種類であることを特徴とする請求項 1 に記載の抽出試薬。

【請求項 9】

前記界面活性剤がツイーン 20 であることを特徴とする請求項 8 に記載の抽出試薬。

【請求項 10】

前記ツイーン 20 の前記抽出試薬中の体積分率は $0.005\% \sim 1\% (v/v)$ であることを特徴とする請求項 9 に記載の抽出試薬。

30

【請求項 11】

前記ツイーン 20 の前記抽出試薬中の体積分率は $0.02\% \sim 0.1\% (v/v)$ であることを特徴とする請求項 10 に記載の抽出試薬。

【請求項 12】

前記 pH 緩衝液の pH が $6.5 \sim 8.5$ 間であることを特徴とする請求項 1 に記載の抽出試薬。

【請求項 13】

請求項 1 乃至 12 の中のいずれかに記載の抽出試薬を用いて加熱方式で血液サンプルを処理し、その後、免疫分析によって、その中に含有された薬物濃度を測定することを特徴とする血液サンプル中免疫抑制剤の薬物濃度検出方法。

40

【請求項 14】

前記免疫抑制剤は、タクロリムスと、シロリムスと、エベロリムスと、ゾタロリムスと、シクロスポリン又は他の構造類似物を含むことを特徴とする請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記抽出試薬と前記血液サンプルを混合する時、前記血液サンプル/前記抽出試薬の体積比は $1/1 \sim 1/10$ であることを特徴とする請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

前記抽出試薬と前記血液サンプルを混合する時、前記血液サンプル/前記抽出試薬の体

50

積比は 1 / 2 ~ 1 / 5 であることを特徴とする請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記加熱温度は 5 0 ~ 9 0 であって、前記加熱時間は 5 m i n ~ 5 0 m i n であることを特徴とする請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記加熱温度は 6 0 ~ 8 0 であって、前記加熱時間は 1 0 m i n ~ 3 0 m i n であることを特徴とする請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

a) 免疫抑制剤薬物と特異的に結合する抗体と、 b) 前記免疫抑制剤を含有する校正品と、 c) 請求項 1 乃至 1 2 の中のいずれかに記載の抽出試薬と、 d) 検出試薬と、を含み、前記検出試薬がトレーサーマーク付きの抗体、抗原又は半抗原であることを特徴とする血液サンプル中の免疫抑制剤の濃度を検出する試薬キット。

【請求項 2 0】

前記トレーサーが、酵素と、化学発光物質と、放射性物質と、蛍光物質と、稀土類イオンと、ビオチンと、ジゴキシンとを含み、前記稀土類イオンが $E u^{3+}$ 、 $S m^{3+}$ 、 $T b^{3+}$ 、 $D y^{3+}$ 及びそのキレートリガンドを含むことを特徴とする請求項 1 9 に記載の試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、体外診断試薬分野に関し、具体的に、患者の血液サンプル中の免疫抑制剤の濃度レベルを測定するための改善された免疫抑制剤薬物の抽出試薬及び該抽出試薬を用いた抽出方法と免疫検出試薬キットに関する。

【背景技術】

【0002】

免疫抑制剤 (I m m u n o s u p p r e s s a n t) は、細胞及び体液の免疫反応を抑制することで、組織の傷つけを減少する化学又は生物物質で、器官移植後の拒絶反応の抑制と自体の免疫性病気 (例えば、リウマチ、エリテマトーデス、強直性脊椎炎、自己免疫性溶血性貧血等) に汎用されている。

【0003】

現在、常用の免疫抑制剤は主に、微生物代謝産物、糖質コルチコイド、代謝拮抗物質、抗リンパ球抗体、アルキル化剤等の 5 種類があって、その中のタクロリムス (T a c r o l i m u s , F K 5 0 6)、シクロスポリン (C y c l o s p o r i n e A , C s A)、ラパマイシン (R a p a m y c i n , R P M) 等の微生物代謝産物が最も広く応用されていて、主に、細胞質内のカルシニューリンの活性を抑制することで、IL2 等の一連の細胞因子の転写を遮断して、その免疫抑制作用を発揮し、Tリンパ細胞の活性化や増生を有効に抑制する。

【0004】

移植患者の臨床治療の場合、免疫抑制剤の血液濃度が低いと、免疫拒絶が発生し、一方、免疫抑制剤の血液濃度が高いと、肝臓、腎臓等の器官に毒性が発生し、感染、腫瘍等の一連の不良な臨床事件が発生するので、移植患者が免疫抑制剤を合理的に使用しようとする場合、その血液濃度を精確に検出しなければならない。タクロリムス、シロリムス、シクロスポリン A 等の常用の免疫抑制剤は、構造はそれぞれ異なっているが、血液においていずれも蛋白質結合物方式で赤血球に存在し、これらの免疫抑制剤の血中濃度を精確に検出しようとする、必ず免疫抑制剤を結合した蛋白質から外さなければならなく、これはこのような免疫抑制剤の血中濃度を検出する際の共通する要求である。

【0005】

今の免疫抑制剤の血中濃度を検出する方法は主に、受容体結合方法、HPLC - 質量分析スペクトル方法 (H P L C - M S)、微粒子酵素免疫測定 (M E I A)、化学発光微粒子免疫測定 (C M I A) 及び酵素結合免疫吸着法 (E L I S A) 等がある。ここで、受容

10

20

30

40

50

体結合方法は主に薬物に研究に利用される。HPLC-MS方法は、血中濃度の検出が精確で、敏感であるが、操作が煩わしく、検出時間が長く、検出コストが高く、高価の機器を必要とするので、主に科学研究分野に利用されるか又は参照方法として認められている。MELIAとCMIAは現在常用の検出方法で、その検出の自動化レベルが高く、検出結果が正確である。しかし、上記方法は、検出中にいずれもメチル・アルコール、アセトニトリル、エーテル等の有機溶剤を抽出試薬のサンプルとして、細胞と抽出薬物を溶解し、その抽出工程は実験操作と実験後処理の不便をもたらすと共に、免疫検出の感度と正確性もある程度に低下させ、これは免疫反応体系に入った有機溶剤が抗体-薬物間の免疫結合反応を抑制することを避けることができず、抗体の結合力を低下し、検出の感度を低下させるからである。そして、抽出試薬中の有機溶剤が揮発して、薬物濃度の変動をもたらし、検出結果の正確性に影響を与えることになる。

10

【0006】

有機溶剤による抗体結合FK506に対する抑制作用を低減するため、Robert W. Siegel等の人々(Clinical Chemistry, 2008, 54: 6, 1008-1017; Pat. No.: US 8022188 B2)は、遺伝子変異導入方式で抗体の相補性決定領域を改善することで、検出感度を改善した。しかし、該方法は核酸抽出、拡張、順序測定、遺伝子変異導入、クローン選別等の複雑な工程が必要で、実用性に欠けている。有機溶剤の揮発による薬物濃度の変動を低下するため、Frank C. Grenier等の人々は、低揮発性のDMSOで血液薬物の抽出試薬(US 2008/0020401 A1)を調製しているが、該方法で用いられるDMSOも免疫検出体系中の抗体-薬物間の結合反応を嚴重に抑制して検出感度を低下させる。そして、上記した全ての有機溶剤抽出試薬と同様に、抽出試薬の溶解作用が高濃度の二価金属イオン(10mM-100mM)に依存し、且つ、二価金属イオンの濃度が変化すると抽出効果も変化するので、全血サンプルにおいて、常に錯化合物抗凝固薬(例えば、EDTA)の濃度が変化して抽出試薬中の二価金属イオンの濃度の変化をもたらして、異なるサンプル薬物による抽出効果が異なって、測定誤差が発生してしまう。

20

【0007】

上記抽出試薬の処理後のサンプルはいずれも不均一性溶液であるので、使用する前に遠心式で固体の異物を除去しなければならず、該工程も操作の難易度を向上させ、検出時間を延長する。

30

【0008】

有機溶剤による免疫検出に対する影響を避けるため、Francois Legacy等の人々は、RAPAをFK506の置換試薬としたFK506検出方法(US Pat. 6187547 B1)を提示した。FK506とRAPAが血液中でいずれもFKBP(FK結合蛋白質)と結合し、少量が血清アルブミンとリポ蛋白質と結合し、且つ、高度脂溶性のFK506とRAPAがいずれも細胞膜を高速に通過することができるので、免疫分析体系中の高濃度のRAPAは高速且つ有効に血液中のFK506を置換でき、溶解と蛋白質の変性を必要としない。抗FK506抗体の高度の特異性によって、高濃度のRAPAがFK506の免疫検出を干渉することがない。薬物抽出を行う必要がないので、該方法によってFK506を検出することが最も簡単で、便利であって、干渉因子を含有しない殆どのサンプルを正確に検出することができるが、一部の干渉が強いサンプル、特に、抗体系免疫抑制剤を利用した患者のサンプルの場合、対応する干渉対応措置をとっていても、該方法でFK506を検出する場合依然として大きい誤差が出現される。

40

【0009】

従って、免疫抑制剤の血中濃度の検出について、有機溶剤の使用を回避しつつ、正確且つ高速で、簡単に薬物濃度を検出することのできる薬物抽出方法が必要である。現在、国内外で上記特徴を具備する抽出試薬と抽出方法に関する報道はなかった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

50

【特許文献1】Pat. No.: US 8022188 B2

【特許文献2】US 2008/0020401 A1

【特許文献3】US Pat. 6187547 B1

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Clinical Chemistry, 2008, 54: 6, 1008-1017

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

10

有機溶剤で薬物を抽出する際の上記問題を解消するため、本発明は、新しい免疫分析に用いられる血液サンプルの免疫抑制剤薬物の抽出試薬と方法を提供する。前記薬物の抽出試薬は、蛋白質変性剤と、蛋白質加水分解酵素と、界面活性剤と、pH緩衝液からなる。前記抽出方法は、サンプルと抽出試薬を一定の割合で混合し、孵化し、蛋白質変性剤とプロテイナーゼの作用で細胞を溶解して細胞内の薬物を放出することを含む。本発明によると、有機溶剤を使用する必要がなく、血液細胞を有効に溶解して、細胞内の薬物を放出することができる。既存の抽出試薬に比べ、本発明で提供する薬物の抽出試薬と方法によると、溶剤揮発による薬物濃度の変化問題を回避しつつ、溶液媒体による抗体-薬物間の免疫結合に対する抑制作用も明らかに低下させる。そして、本方法で処理した後の全血サンプルは全透明の均一性溶液で、処理後のサンプルは直接に使用することができ、遠心処理を行う必要がなく、サンプル処理工程を有効に簡略化し、検出時間を短縮できる。

20

【0013】

従って、本発明の一番目の目的は、血液サンプルから免疫抑制剤を抽出する抽出試薬を提供することである。

【0014】

本発明の二番目の目的は、血液サンプル中の免疫抑制剤の濃度を検出する方法を提供することである。

【0015】

本発明の三番目の目的は、血液サンプル中の免疫抑制剤の濃度を検出する試薬キットを提供することである。

30

【課題を解決するための手段】

【0016】

上記目的を実現するため、本発明は以下の技術案を提供する：

【0017】

本発明の第1の態様によると、蛋白質変性剤と、蛋白質加水分解酵素と、界面活性剤と、pH緩衝液と、を含む血液サンプルから免疫抑制剤を抽出する抽出試薬を提供する。

本発明によると、前記蛋白質変性剤は、尿素、塩化グアニジニウム、又は他の非有機溶剤系蛋白質変性剤から選ばれる。

【0018】

本発明の好適な実施例によると、前記蛋白質変性剤は尿素である。

40

【0019】

本発明によると、前記尿素的抽出試薬中の濃度は4 mol/L ~ 12 mol/Lであって、前記塩化グアニジニウムの前記抽出試薬中のモル濃度は1 mol/L ~ 8 mol/Lであって、また、前記尿素的抽出試薬中の濃度が6 mol/L ~ 8 mol/Lで、前記塩化グアニジニウムの前記抽出試薬中のモル濃度が2 mol/L ~ 6 mol/Lであることが好ましい。

【0020】

本発明によると、前記蛋白質加水分解酵素は、スブチリシン、プロテイナーゼK、ディスペラーゼ等のプロテイナーゼ系又はその混合物から選ばれ、好ましくは、前記蛋白質加水分解酵素がスブチリシンである。

50

【0021】

本発明によると、前記スプチリシンの前記抽出試薬中の量は1 U / ml ~ 20 U / ml であって、2.5 U / ml ~ 10 U / ml であることが好ましい。

【0022】

本発明によると、前記界面活性剤は、ツイーン20、サポニン、Triton X - 100 から選ばれる1種又は複種類であって、ツイーン20であることが好ましい。

【0023】

本発明によると、前記ツイーン20の前記抽出試薬中の体積分率は0.005% ~ 1% (v / v) であって、0.02% ~ 0.1% (v / v) であることが好ましい。

【0024】

本発明によると、前記pH緩衝液のpHは6.5 ~ 8.5間であって、好ましくは、7.0 ~ 8.0である。

【0025】

本発明の第2の態様によると、上述した抽出試薬を用いて加熱条件で血液サンプルを処理し、蛋白質変性剤、蛋白質加水分解酵素、界面活性剤の協同作用で、血液細胞を溶解して薬物を放出すると共に、血液サンプルを遠心処理が必要でなく直接に免疫分析に利用することができる均一性溶液に変換し、正確な免疫抑制剤薬物の濃度を得ることを含む血液サンプル中の免疫抑制剤薬物の濃度を検出する方法を提供する。

【0026】

本発明によると、前記免疫抑制剤は、タクロリムスと、シロリムスと、エベロリムス (Everolimus) と、ゾタロリムス (Zotarolimus) と、シクロスポリン (cyclosporine) 又は他の構造類似物を含む。

【0027】

本発明によると、前記血液サンプルは、器官移植患者又は他の免疫抑制剤を飲んだ患者のものである。

【0028】

本発明によると、前記抽出試薬と血液サンプルを混合する時、前記血液サンプル / 前記抽出試薬の体積比は1 / 1 ~ 1 / 10 であって、1 / 2 ~ 1 / 5 であることが好ましい。

【0029】

本発明によると、前記加熱方式で血液サンプルを処理する場合、その加熱温度は50 ~ 90 であって、60 ~ 80 であることが好ましい。

【0030】

本発明によると、前記加熱方式で血液サンプルを処理する場合、その加熱時間は5 min ~ 50 min であって、10 min ~ 30 min であることが好ましい。

【0031】

本発明によると、前記抽出試薬と抽出方法の作用は、細胞を溶解して薬物を放出し、血液サンプルを均一性溶液に変換させることである。

【0032】

本発明によると、前記免疫分析は競争免疫分析方法で、その実施形態は、血液サンプル中の免疫抑制剤と固定量の免疫抑制剤が共同に競争して限定量の抗免疫抑制剤の抗体に結合することである。

【0033】

本発明によると、前記免疫分析は固相免疫分析方法を用いていて、その実施形態は、固相容器の表面に免疫試薬を固定し、競争して結合反応を完成した後、検出試薬の洗浄、分離、遊離と検出試薬の結合を介して、検出対象の濃度を検出することである。

【0034】

本発明によると、前記固相容器は、微細孔、試験管又は他の形式の容器を指す。

【0035】

本発明によると、前記免疫分析は、以下の工程を含む：

1) 血液サンプルを処理することであって、サンプルと抽出試薬を混合し、加熱してか

10

20

30

40

50

ら室温に戻す。

2) 免疫反応を行うことであって、免疫試薬を固定した固相容器に処理後のサンプルと、マーク付きの抗免疫抑制剤抗体と固定量の免疫抑制剤とを投入し、又は、処理後のサンプルと、マーク付きの固定量の免疫抑制剤と抗免疫抑制剤抗体とを投入し、固定量の免疫抑制剤とサンプル中の免疫抑制剤が競争して限定量の抗免疫抑制剤抗体に結合し、免疫複合物が同時に固相試薬に捕捉される。

3) 分離することであって、分離された遊離検出試薬と結合した検出試薬とを洗浄する。

4) 検出することであって、固相試薬が捕捉した免疫複合物に含まれたトレーサーから発生される信号を検出し、信号強度と免疫抑制剤の濃度との関係曲線(校正曲線)によって、免疫抑制剤の濃度を測定する。

【0036】

上述した血液サンプルは、抗凝固全血サンプルを指し、EDTA-K(Na)と、クエン酸ナトリウム(カリウム)と、ヘパリンの抗凝固全血サンプルと、を含み、EDTA-K(Na)抗凝固全血であることが好ましい。

【0037】

本発明の第3の態様によると、a) 抗免疫抑制剤抗体と、b) 上述した抽出試薬と、c) 免疫抑制剤と、d) 校正品と、e) 緩衝溶液とを含む血液サンプル中の免疫抑制剤の濃度を検出する試薬キットを提供する。ここで、免疫抑制剤抗体又は免疫抑制剤はトレーサーで標記し、検出試薬とする。

【0038】

本発明の好適な実施例によると、前記抗免疫抑制剤抗体は、特異的に免疫抑制剤薬物に結合可能な抗体を指し、多クローン性抗体又は単クローン性抗体であることができ、単クローン性抗体であることが好ましい。

【0039】

本発明によると、前記抽出試薬は、蛋白質変性剤と、蛋白質加水分解酵素と、界面活性剤と、pH緩衝液からなる。

【0040】

本発明によると、前記検出試薬は、トレーサーマーク付きの抗体、抗原又は免疫抑制剤半抗原を指す。

【0041】

本発明によると、前記トレーサーは、検出可能な信号を発生することのできる物質を指し、酵素と、化学発光物質と、放射性物質と、蛍光物質と、例えばEu³⁺、Sm³⁺、Tb³⁺、Dy³⁺等の稀土類イオンおよびそのキレートリガンドとを含み、ビオチン、ジゴキシン等の小分子の間接性のトレーサーであることもできる。

【0042】

本発明によると、前記緩衝溶液は、pH緩衝溶液と、蛋白質と、界面活性剤と、検出干渉除去剤とからなり、検出試薬を希釈して、検出のバックグラウンド信号を低減し、異好抗体等の干渉物質からの検出への影響を除去する。

【0043】

本発明によると、前記校正品は、既知濃度の免疫抑制剤を含有する溶液又は冷凍乾燥製品を指し、校正曲線の構築に用いられる。マトリックス効果を低減するため、本発明においてヒトの全血を基質として校正品を調製する。

【0044】

以下のような有益な効果を実現できる：

【0045】

本発明で提供する血液サンプル抽出試薬は、細胞を高速に溶解して薬物を放出するという同様の効果を有する点、およびサンプルの干渉物質を不活性化する効果を有し、抽出試薬の作用で、サンプル中の異好抗体、リウマチ因子等の干渉物質を全て有効に不活性化する点で、伝統的な有機溶剤に基づく抽出試薬のメリットを保留した。

10

20

30

40

50

【0046】

同時に、本発明で提供するサンプル抽出試薬はさらに、伝統的な有機溶剤に基づく抽出試薬が具備しなかった以下のメリットを有する：

1) 有機溶剤を含有しないので、有機試薬が揮発して薬物濃度に影響を与えることを避けることができる。

2) 有機溶剤を含有しないので、抽出媒体の抗体結合薬物に対する抑制作用を有効に低減し、サンプルの抽出と実験を行った後のサンプル処理とが一層簡単になる。

3) 二価金属イオンを含有しないので、異なるサンプル間の、複合作用を有する抗凝固薬の濃度差による薬物抽出効果に対する影響をなくすることができる。

4) 処理後の血液サンプルがいずれも均一性溶液であるので、遠心処理を行わずに直接に検出することができ、操作を簡略化し、検出時間を短縮する。

5) 一層信頼性のある検出結果を得ることができる。

6) 上記特性に基づいて、本発明で提供する抽出試薬の検出方法を更に簡単に全自動の検出機器に応用することができ、又は、本発明で提供する抽出試薬の検出方法に基づいて、それに適用する全自動の検出機器を更に簡単に開発することができる。

10

【0047】

本発明の上述した免疫抑制剤抽出試薬の有効性は、効率的な細胞溶解、蛋白質変性とそれに対応する薬物放出能力によるものである。よって、本発明はヒトの血液サンプルの免疫抑制剤の抽出に応用できると共に、ヒトの血液や各種の動物の血液のサンプルにおける免疫抑制剤以外の他の体内で結合状態である薬物又は非薬物物質の抽出に応用することもできる。

20

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1】抽出試薬中の濃度の異なるツイーン20によるFK506抽出効果に対する影響を示す。

【図2】抽出試薬中の濃度の異なる蛋白質変性剤によるFK506抽出効果に対する影響を示す。

【図3】抽出試薬中の濃度の異なるプロテイナーゼによるFK506抽出効果に対する影響を示す。

【図4】サンプル抽出における異なる孵化温度による校正曲線に対する影響を示す。

30

【図5】異なる孵化時間による校正曲線に対する影響を示す。

【図6】異なる3種類の前処理液による校正曲線に対する影響を示す。

【図7A】本発明の前記抽出試薬に基づくFK506 - TRFIA検出値とHPLC - MS測定値の相関性を示す。

【図7B】ABBOTT - i2000前処理液に基づくFK506 - TRFIA検出値とHPLC - MS測定値の相関性を示す。

【図7C】ソウリン(Sorin)前処理液に基づくFK506 - TRFIA検出値とHPLC - MS測定値の相関性を示す。

【発明を実施するための形態】

【0049】

40

特別な説明がない限り、特許請求の範囲と明細書に使用される用語は以下のように定義されたものである。

【0050】

I、免疫抑制剤

本発明における前記免疫抑制剤は、身体の免疫細胞の増生と関連機能を抑制し、身体の免疫反応を低減することのできる各種薬物を指す。本発明における前記免疫抑制剤が、タクロリムス、シロリムス、エベロリムス、タクロリムス又はシクロスポリンを指すことが好ましい。

【0051】

II、抽出試薬

50

本発明における前記抽出試薬は、蛋白質変性剤、蛋白質加水分解酵素、界面活性剤、pH緩衝液からなる混合物である。蛋白質変性剤と、蛋白質加水分解酵素と、界面活性剤とが協同作用することで、細胞を高速に溶解し、蛋白質結合の免疫抑制剤を放出する。

【0052】

III、免疫抑制剤の抽出

本発明における前記免疫抑制剤の抽出は、上述した抽出試薬を用いて、サンプル中の結合状態の薬物を抽出し、成分を検出可能になる過程を指す。

【0053】

測定対象の血液サンプルと抽出試薬とを適切な割合で混合する。10 μ l ~ 50 μ l血液サンプルと50 μ l ~ 200 μ l抽出試薬とを混合することが好ましく、25 μ l血液サンプルと170 μ l抽出試薬とを混合することが更に好ましい。均一に渦流混合した後、加熱して孵化する。選択される孵化温度は、蛋白質加水分解酵素が作用を発揮するに最も適切な温度であって、選択される孵化温度と孵化時間は免疫抑制剤の十分な解離を保証しつつ蛋白質加水分解酵素を有効に不活性化させるものであるべきである。通常、孵化温度は50 ~ 90 で、孵化時間は5min ~ 50minであって、60 ~ 80 で10min ~ 30min孵化することが好ましい。孵化を終了した後、血液サンプルと抽出試薬の混合物は均一性溶液になって、直接に免疫分析に応用できる。

10

【0054】

IV、免疫検出

免疫検出は、抗体 - 抗原(又は半抗原)間の特異的な結合反応を利用して、各種の物質を検出する分析方法を指す。本発明における前記免疫検出は、免疫抑制剤を定量的に測定する。前記免疫検出試薬キットは主に、抽出試薬と、抗体と、測定対象物と競争で抗体に結合する固定量の測定対象物と、分析緩衝液と、校正品と、を含む。検出モードの違いに応じて、抗体又は測定対象物を選択して標記することができる。

20

【0055】

本発明における前記抽出試薬の有効性は、効率的な細胞溶解、蛋白質変性とそれに対応する薬物放出能力によるものである。よって、本発明はヒトの血液サンプルの免疫抑制剤の抽出に応用できると共に、ヒトの血液や各種の動物の血液サンプルにおける免疫抑制剤以外の他の結合状態である薬物又は非薬物物質の抽出に応用することもできる。テストサンプルが、免疫抑制剤を飲んだ患者の抗凝固全血サンプルであることが好ましい。

30

【0056】

本発明の免疫検出試薬キットは、本試薬キットの操作を説明する説明書も含む。前記説明書を外装材料に固定することができ、又は単独の一枚の紙の形式で試薬キットに置かれることもできる。前記説明書は印刷物又は手書の文字材料であることができ、又は本説明書を記憶してその情報を端末ユーザに伝達することのできる媒体、例えば光ディスク、磁気ディスク等の電子記憶媒体であることもできるが、これらに限定されることはない。

【0057】

尿素は、前記抽出試薬の主な成分である。常用の蛋白質変性剤としての尿素は、高濃度で蛋白質骨格上の二つの隣接するペプチド結合のカルボニル基酸素原子と二水素結合を形成し、蛋白質の二、三級構造を破壊し、蛋白質鎖を十分に伸長し、蛋白質の元の物理化学的性状と生物活性が失ってしまう。一方、尿素が低濃度である時、尿素は蛋白質の変性に対する作用が顕著に低下される。尿素の該特性に基づいて、6mol/L ~ 10mol/Lの高濃度の尿素で細胞を溶解し、血液の蛋白質を変性させ、免疫抑制剤を放出することができる。同時に、少量の尿素含有抽出試薬サンプルを反応容器に投入した後、緩衝液で希釈して、尿素の濃度を元の濃度の1/10 ~ 1/5まで低下させ、反応容器内の抗体活性に対する尿素の影響が顕著に低減される。

40

【0058】

スブチリシンは、本発明における前記抽出試薬の他の主な成分である。スブチリシンは60 ~ 80 で最大の蛋白質水解活性を発揮することができ、且つ、該温度で酵素の活性も高速に低下(牛樹舌、韓宝芹。スブチリシンの純化及び酵素学性質、生物技术世界、

50

2014, 3, 11~12)するので、該温度区間においてスブチリシンは短時間内に集中的に酵素分解作用を発揮し、細胞溶解と蛋白質変性を促進することができ、同時に、該過程において、酵素は一部が不活性化される。そして、該酵素を含有する抽出試薬を室温まで冷却させた後、該酵素の活性も温度の低下によって低減される(牛樹彦、韓宝芹。スブチリシンの純化及び酵素学性質、生物技術世界、2014, 3, 11~12)。そして、少量の抽出試薬サンプルを反応容器に投入した後、プロティナーゼが緩衝液によって希釈される。以上の三つの要因によって、抽出後のサンプル内に残留した酵素の活性による反応容器内の抗体活性に対する影響は顕著に低減される。

【0059】

界面活性剤は、本発明における前記抽出試薬の他の重要な成分である。界面活性剤の本発明における主な作用は、尿素やプロティナーゼとの協同作用によって、細胞の破裂を促進し、細胞が破裂された後の血液サンプルを均一的状態にする。強烈な界面活性剤(例えばSDS)は高効率な細胞破裂作用を具備するが、強烈な蛋白質変性作用が抗体の活性に嚴重な影響を与えることになる。本発明で使用する非イオン性界面活性剤、例えばツイーン20は、最適化された動作濃度で良好な細胞溶解と溶解度増加との作用を協同的に表現すると共に、免疫分析のバックグラウンド信号の低減に有利である。

10

【0060】

以下、具体的な実施例を結合して、本発明を更に説明する。ここで、以下の実施例は本発明を説明するためのものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

【0061】

以下の実施例において、特別に明記されていない限り、まず本発明の上述した抽出試薬を用いて血液サンプルを処理を行い、その後、免疫抑制剤の濃度を検出する。

20

【0062】

以下の実施例において、特別に明記されていない限り、係わる%は質量体積比(w/v)である。

【0063】

(実施例1) FK506-TRFIA(Time Resolved Fluorescence Immunoassay)

本実施例において、前記FK506-TRFIAは、固相二次抗体に基づく競争免疫分析方法で、即ち、ヤギ抗マウス二次抗体被覆の微細孔に処理後の校正品/サンプルと、抗FK506単クローン性抗体と、ビオチンマーク付きのFK506を添加し、ビオチンマーク付きのFK506と校正品又はサンプル中のFK506とが競争して限定量の抗FK506単クローン性抗体に結合し、形成された免疫複合物がヤギ抗マウス二次抗体によって微細孔の表面に捕捉される。洗浄して未結合のビオチンマーク付きのFK506を除去し、ユーロピウムイオン(Eu^{3+})で標記したストレプトアビジン(Streptavidin)(SA- Eu^{3+})を添加して、微細孔内面の免疫複合物中のビオチンと結合させる。洗浄して未結合のSA- Eu^{3+} を除去し、免疫複合物上の Eu^{3+} は解離補強によって安定的な蛍光配合物を形成し、蛍光強度でFK506濃度の標準曲線を構築し、校正曲線によってサンプル中のFK506濃度を確定する。

30

【0064】

抽出試薬は、50mM Tris-HCl緩衝液で、pHは8.0で、尿素8mol/Lと、スブチリシン5U/mlと、0.05%ツイーン20を含有する。

40

【0065】

170 μ l抽出試薬と25 μ l血液サンプル又は校正品を混合し、渦流混合して十分に混合させ、70 $^{\circ}$ の水浴で20min孵化して取り出して、室温に戻らせる。

【0066】

ヤギ抗マウス二次抗体(Abcam会社)が被覆された微細孔内に25 μ l処理後の血液サンプル/校正品と100 μ l 0.2 μ g/ml TBST-BSA(50mM Tris-HCl、pHは7.5で、0.9% NaClと、0.05%ツイーン20と、0.05% NaN_3 と、0.5% BSAとを含有する)で希釈されたFK506単クロー

50

ン性抗体（上海強耀会社）を添加して均一に混合し、室温（20 ~ 25）で振動板で30min 孵化する。

【0067】

各微細孔にビオチンで標記したFK506（漸江海正薬業有限公司）を0.05 μg / ml 含有するTBST - BSA溶液50 μlを添加し、継続して30min 反応させる。

TBST緩衝液で微細孔を2回洗浄する。

【0068】

SA - Eu³⁺（蘇州新波生物技術有限公司）を2 μg / ml 含有するTBST - BSA緩衝液を150 μl 添加し、振動板で20min 孵化し、微細孔表面のビオチンと接続させる。

【0069】

TBST緩衝液で微細孔板を6回洗浄し、補強液（蘇州新波生物技術有限公司）を添加し、振動板で5min 孵化し、時間分解蛍光分析装置（Victor 1420, Perkin - Elmer）で蛍光強度を検出し、蛍光強度及び校正曲線に基づいて、測定対象であるサンプルに含有する薬物の濃度を計算する。

【0070】

検出結果の分析

FK506校正品濃度をX軸とし、検出された蛍光強度信号の値をY軸とし、四つのパラメータの当てはめを行って、回帰方程式及び当てはめ曲線を得た。測定対象のサンプル信号値を回帰方程式に代入すると、サンプルの濃度を得ることができる。本発明における検出結果の分析を、例えばELISACalcソフト等の専門コンピューター演算分析ソフトウェアで行うこともでき、大量のサンプルの高速分析に方便である。

【0071】

（実施例2） 抽出試薬中の濃度の異なるツイーン20によるFK506抽出効果に対する影響

本実施例において、抽出試薬は50mM Tris - HCl緩衝液で、PHは8.0で、尿素8mol / Lと、スプチリシン5U / mlと、濃度の異なるツイーン20と、を含有する。測定対象サンプルは、健康なヒトの全血を媒体として調製した異なる濃度のFK506を含有する校正品である。操作工程は実施例1と同様である。結果は図1に示した。

【0072】

図1に示すように、抽出試薬中のツイーン濃度の増加に伴って、蛍光値は顕著に低下する傾向を現した。ツイーンの濃度が0.10%（v / v）を超える時、蛍光値の低下が特に明確である。0.10% ~ 0.20%（v / v）のツイーン20を含有する抽出試薬を反応体系に導入したツイーン20の濃度が0.01% ~ 0.02%（v / v）ですが、このような低濃度のツイーン20は大部分の免疫反応体系において固相抗体を解離させることがなく、抗体活性を明確に損害することもないです。よって、当該現象は体系に含まれた尿素と関連つけられるかもしれなく、尿素とツイーン20の協同作用で、固相表面の抗体を解離させて、検出信号を低減させる。

【0073】

抽出試薬にツイーン20が含まれていない時、校正曲線の各校正品点の蛍光強度と抑制率は良好であるが、この時、一部のサンプル（約20%）が検出中に血の塊が微細孔の壁に接着する現象が発生し、検出の精密性を低下し、測定値に誤差が発生するが、抽出試薬中の少量のツイーン20は当該現象を避けることができる。本実施例によると、本発明の前記抽出試薬中の界面活性剤であるツイーン20の濃度が0.02% ~ 0.1%（v / v）であることが好ましい。

【0074】

（実施例3） 抽出試薬中の濃度の異なる蛋白質変性剤によるFK506抽出効果に対する影響

本実施例において、抽出試薬は50mMのpHが8.0であるTris - HCl緩衝液

10

20

30

40

50

であって、ツイーン20 0.05% (v/v)と、スプチリシン5 U/mlと、濃度の異なる尿素又は塩化グアニジニウムと、を含有する。測定対象サンプルは、健康なヒトの全血を媒体として調製した、濃度の異なるFK506を含む校正品である。操作工程は実施例1と同様である。結果は図2に示す。

【0075】

図2に示すように、蛋白質変性剤（尿素又は塩化グアニジニウム）濃度の増加に伴って、各校正品の蛍光強度はいずれも低下する傾向を現した。蛋白質変性剤が抗体-FK506間の免疫反応を抑制し、蛋白質変性剤が薬物の放出を促進してFK506濃度が上昇したことが、各校正品の蛍光強度が低下した要因である。蛋白質変性剤を含有しない（プロティナーゼのみを含む）抽出試薬の場合、各校正品の蛍光強度が高く、抑制率が低く、当該実験条件で、蛋白質変性剤を含有しない抽出試薬に含有されるプロティナーゼは全血サンプル中の蛋白質が結合したFK506を十分に放出するに不足であることを表す。そして、蛋白質変性剤を含有しない抽出試薬で処理した後の全血サンプルは塊状異物を含有する混濁溶液で、サンプリングに不便であって、検出の精密性も悪い。

10

【0076】

図2に示すように、抽出試薬中の尿素の濃度が2 mol/Lから8 mol/Lまで増加された時、FK506を含有しない校正品A及び低濃度FK506校正品（例えば、3 ng/mL）の蛍光強度の低下は少なく、抗体-FK506間の免疫反応に対する尿素的抑制作用が低いことを表すが、高濃度のFK506校正品（20 ng/mL～30 ng/mL）の場合、尿素濃度の増加に伴って、その蛍光強度は明確に低下し、高濃度の尿素である場合のみ蛋白質変性とFK506の放出を十分に促進できることが分かる。抽出試薬中の尿素の濃度が6 mol/Lから8 mol/Lまで増加された時、各FK506校正品の蛍光強度と抑制率はいずれも変化が大きくなり、抽出試薬中の6 mol/L～8 mol/Lの尿素が標本の変性に対する作用が飽和に接近したことを表す。尿素に比べ、塩化グアニジニウムはもっと強い蛋白質変性作用を示す。抽出試薬中の塩化グアニジニウムの濃度が1 mol/Lから6 mol/Lまで増加された時、FK506を含有しない校正品Aの蛍光強度は明確に低下し、抗体-FK506間の免疫反応に対する塩化グアニジニウムの抑制作用が強いことを表す。同時に、塩化グアニジニウムの濃度が上昇するに伴って、高濃度FK506校正品の蛍光強度の低下程度も低濃度FK506校正品の蛍光強度の低下程度より大きく、薬物の充分放出が塩化グアニジニウムの濃度にある程度依存することを表す。

20

30

【0077】

尿素に基づく抽出試薬による抗体-FK506免疫結合反応に対する抑制が弱く、同時にFK506を高効率的に放出でき、且つ処理後のサンプルが透明な均一性溶液であるので、本発明における前記抽出試薬中の6 mol/L～8 mol/L尿素が蛋白質変性剤であることが好ましい。

【0078】

（実施例4） 抽出試薬中の濃度の異なるプロティナーゼによるFK506抽出効果に対する影響

尿素、塩化グアニジニウム等の変性剤が存在する状況下、抽出試薬中のプロティナーゼの濃度は、短時間内で細胞を破裂し、蛋白質の変性を促進し、蛋白質結合薬物を放出できるものでなければならない。同時に、サンプルを処理した後に残留したプロティナーゼの活性は免疫結合反応に明確な不良影響を与えてはいけない。

40

【0079】

本実施例において、抽出試薬は50 mMのpH 8.0のTris-HCl緩衝液で、ツイーン20 0.05% (v/v)と、尿素8 mol/Lと、濃度の異なるスプチリシンと、を含有する。測定対象のサンプルは健康なヒトの全血を媒体として調製した、濃度の異なるFK506を含有する校正品である。操作工程は実施例1と同様である。検出結果は図3に示す。

【0080】

50

図3に示すように、抽出試薬にスプチリシンを含有しない時、濃度の異なるFK506校正品の抑制率をいずれも低レベルであって、且つ変化が規則的ではなく、この時、サンプル中のFK506が大部分が結合状態であることを表す。そして、スプチリシンを含有しない抽出試薬で処理した後のサンプルは均一性に欠けている。抽出試薬中のスプチリシンの濃度が2.5 U/ml ~ 10.0 U/mlである時、校正品各点の抑制率は略一致し、各校正品はいずれもこはく色の透明な均一性液体である。図3に示すように、抽出試薬中のスプチリシンの使用量が5 U/ml ~ 10 U/mlである時、校正品各点の蛍光強度と抑制率は略一致し、スプチリシンの使用量が10 U/mlを超える時、校正品各点の蛍光強度は急速に低下し、高濃度のスプチリシンは抗体-抗原間の結合反応を損害することを表す。上述した現象に基づいて、本発明における前記抽出試薬中のスプチリシンの使用量が2.5 U/ml ~ 10 U/mlであることが好ましい。

10

【0081】

(実施例5) 異なる孵化温度による校正曲線と血液サンプル測定値に対する影響

本実施例において、抽出試薬は50 mMのTris-HCl緩衝液で、pHは8.0であって、ツイーン20 0.05% (v/v)と、尿素8 mol/Lと、スプチリシン5 U/mlと、を含有し、抽出試薬とサンプルとを均一に混合した後、異なる温度で20 min孵化する。

【0082】

測定対象サンプルは、健康なヒトの全血を媒体として調製した、濃度の異なるFK506を含有する校正品及び12個のABBOTT会社のARCHITECT i2000システム専用試薬(FK506化学発光微粒子免疫検出試薬)で測定したEDTA抗凝固全血臨床サンプル(中国人民解放軍第二軍医大学第三附属病院から取得)(測定値は表1に示す)である。

20

【0083】

李鵬飛等の方法を参照し(李鵬飛、劉麗宏、馬萍、等:高速液体クロマトグラフィー-タンデム型質量分析方法のタクロリムスの臨床血中濃度のモニタリングにおける応用、質譜学報、2008, 29, 137~143)、HPLC-MS/MS方法で上記サンプルを複数回測定し、測定値を表1に示す。

【0084】

【表 1】

表 1 サンプル抽出中の異なる孵化温度による血液サンプル測定値(n g/mL)に対する影響

HPLC-MS測定値 (n g/mL)		1.2	1.6	2.2	3.5	4.0	5.2	6.7	8.6	11.9	16.1	23	37
ABBOTT i 2000 測定値 (n g/mL)		1.0	1.3	2.6	3.2	3.4	5.0	6.1	9.2	13.5	15.8	20.1	>30
異なる孵化温度で、本方法で検出した血液サンプル濃度値 (n g/mL)	90°C	1.0	1.1	1.3	2.6	3.1	3.1	4.1	5.5	5.8	8.5	12.1	15.6
	80°C	0.8	1.1	1.5	2.2	3.0	4.9	5.4	6.2	15.2	11.2	19.6	31.4
	70°C	1.1	1.4	2.5	3.3	3.7	5.0	5.8	9.5	12.7	14.9	21.5	35.9
	60°C	0.4	1.3	1.6	2.6	2.9	4.0	5.3	8.8	10.0	9.9	15.5	29.4
	50°C	0.1	0.5	0.8	1.2	1.1	1.5	1.9	2.3	3.8	6.1	9.9	21.6
	40°C	0.5	1.2	1.8	2.2	3.4	4.5	4.6	3.7	9.4	11.2	15.9	29.9
30°C	0.3	1.7	1.9	3.0	2.9	4.7	5.1	4.6	9.9	15.0	18.9	22.7	

10

20

30

40

50

【0085】

本発明において、加熱孵化方式で血液サンプルを処理することは、短時間内にプロテナーゼの酵素分解作用を十分に発揮させ、同時に加熱孵化中に一部のプロテナーゼの活性を失わせて、後続の免疫反応中の抗体活性に対するプロテナーゼによる影響を低減するためである。表 1 と図 4 に示すように、孵化温度が 60 未満である時、孵化温度の低下によって、蛍光強度も明確に低下し、サンプル測定値は参照方法 (HPLC-MS 方法) の測定値を下回り、非規則的に変化する。該現象は、サンプル処理中に孵化温度が低いと細胞の溶解、蛋白質の変性と薬物の放出を充分に行うことができないことを表す。同時に、孵化温度が低い時、サンプルを抽出した後の残留したプロテナーゼの活性が抗体 (固相二次抗体と抗 FK506 抗体) の免疫反応活性に大きい影響を与え、蛍光強度が低下する。孵化温度が 70 ~ 80 である時、校正曲線の蛍光強度は高く、抑制率も相対的に安定的である。孵化温度が 70 である時、サンプルの測定値と HPLC-MS と ABBOTT i 2000 の測定値はいずれも良好な一致性を有する。孵化温度が 90 である時、サンプルの測定値は低下する傾向を現した。上述のように、本発明の上述した抽出試薬でサンプルを処理する加熱孵化温度は 60 ~ 80 である。

【0086】

(実施例 6) 異なる孵化時間による校正曲線と血液サンプル測定値に対する影響

本実施例において、抽出試薬は 50 mM の Tris-HCl 緩衝液で、pH は 8.0 であって、ツイーン 20 0.05% (v/v) と、尿素 8 mol/L と、スプチリシン 5 U/mL と、含有し、抽出試薬とサンプルとを均一に混合した後、70 で異なる時間孵化する。測定対象サンプルは健康なヒトの全血を媒体として調製した、濃度の異なる FK506 を含有する校正品及び実施例 5 に記載の 12 個の ABBOTT 会社 ARCHITECT i 2000 システム専用試薬 (FK506 化学発光微粒子免疫検出試薬) で測定した EDTA 抗凝固全血臨床サンプル (中国人民解放軍第二軍医大学第三附属病院から取得

)である。

【0087】

図5に示すように、サンプルの処理中に、加熱孵化時間が5minから40minまで延長されると、校正品各点の蛍光強度は明確に上昇する傾向を現した。加熱孵化時間を5minから10minまで延長した時、蛍光強度が明確に増加し、加熱孵化時間が10min未満である時、体系に残留したプロテナーゼの活性が酵素による抗体の分解を介して検出信号を低減することを表す。5min~40min内の異なる孵化時間の場合、サンプルの測定値はいずれもHPLC-MSとABBOTT-i2000の測定値と良好な一致性を現した(表2)。孵化時間が長いと残留されるプロテナーゼの活性がもっと小さいので、本発明のサンプルを処理する際の加熱孵化時間は10min~30minを選択する。

10

【0088】

【表2】

表2 サンプル抽出中の異なる孵化時間による血液サンプル測定値(ng/mL)に対する影響

HPLC-MS測定													
値(ng/mL)	1.2	1.6	2.2	3.5	4	5.2	6.7	8.6	11.9	16.1	23	37	
ABBOTT i2000測定値(ng/mL)													
値(ng/mL)	1.3	2.6	3.2	3.4	5	6.1	9.2	13.5	15.8	20.1	>30		
異なる孵化時間	5min	1.3	1.5	1.9	3	4.9	5.8	6.1	7.5	10.8	18.2	25.3	33.5
10min	0.9	1.6	2.8	3.8	4.1	5.9	6.8	11.2	12.8	16.8	26.9	35.1	
20min	1	1.9	2.5	3.2	4.3	5.5	7.8	8.9	11.7	17.1	22.2	35	
30min	1.2	1.6	2	3.1	3.9	4.3	6.3	8	9.4	15.2	22.9	32.1	
40min	1.4	1.5	1.8	3.2	4.3	6	7.2	10.2	13.2	15.8	20.4	35.8	

20

30

40

【0089】

(実施例7) 異なる前処理液の実験比較

本実施例において、ソウリン会社(PRO-Trac(商標) II Tacrolimus ELISA, Diaspora)、アボット会社(ABBOTT ARCHITECT i2000 System)と本発明の前記前処理液の、本発明の前記FK506-TRFIAにおける校正曲線とサンプル測定値に対する影響を比較する。

【0090】

ソウリン前処理液でサンプルを処理する:遠心試験管に50µl全血サンプルと300µl酵素分解液(ソウリン医療(上海)有限会社から購入、許可番号305102)を添加し、20秒振動しつつ均一に混合し、室温で15min放置してから、75°Cの水浴

50

鍋に入れて、15 min 加熱し、試験管から取り出して、20 秒振動しつつ均一に混合し、 $1800 \times g$ で 10 min 遠心処理する。上澄みを取ってサンプルとする。

【0091】

ABBOTT 前処理液でサンプルを処理する：遠心試験管に $200 \mu\text{l}$ 全血サンプルと $200 \mu\text{l}$ 全血沈殿剤（アボット貿易（上海）有限公司から購入、309221）を添加し、10 秒振動しつつ均一に混合し、 $10000 \times g$ で 5 ~ 6 min 遠心処理する。上澄みを取ってサンプルとする。

【0092】

本発明の前記抽出試薬でサンプルを処理する：実施例 1 と同様である。

【0093】

上述した 3 種類の方法で 55 個の HPLC - MS 方法で測定した EDTA 抗凝固全血臨床サンプル（中国人民解放軍第二軍医大学第三附属病院から取得）を処理し、実施例 1 に記載の工程に従って処理後の各サンプルを検出した。HPLC - MS を参照方法として、異なる前処理液による FK506 - TRFIA における校正曲線（各校正品について平行する 4 孔を測定）（図 6）と測定値に対する影響を観察した（図 7 A、7 B、7 C）。

【0094】

図 6 に示すように、前記 FK506 検出方法において、有機溶剤を主な成分とする ABBOTT - i2000 前処理液による検出に対する影響が大きく、校正曲線の蛍光強度が最も低く、平行する 4 孔を測定した各校正品の蛍光強度の平行性は悪く、有機溶剤が反応体系に不良な影響を与えることを表す。ソウリン前処理液と本発明の前記抽出試薬に基づく FK506 検出は略平行する校正曲線を有し、校正品の各点の精密性が優れているが、本発明の前記抽出試薬によって取得した蛍光強度が最も高く、本発明の前記抽出試薬が薬物を有効に放出できるとともに、反応体系に対するその媒体の影響が更に穏やかであることを表す。

【0095】

図 7 A、7 B、7 C に示すように、3 種類の方法で処理した 55 個のサンプルにおいて、本発明の前記抽出試薬、ABBOTT - i2000 前処理液、ソウリン前処理液に基づく FK506 - TRFIA 検出値と HPLC - MS 測定値の相関係数はそれぞれ、0.981、0.957、0.951 であって、本発明の前記抽出試薬に基づく FK506 - TRFIA 検出値と HPLC - MS 方法の測定値との一致性が最も優れていることを表す。

10

20

30

【 図 1 】

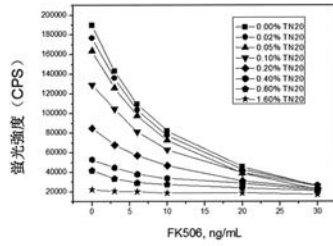


図 1

【 図 2 】

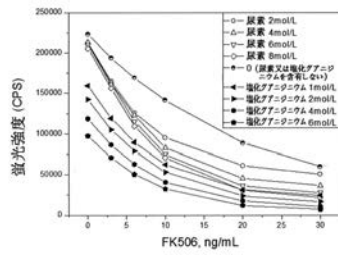


図 2

【 図 3 】

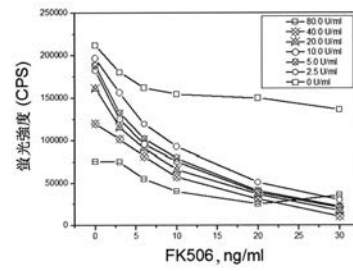


図 3

【 図 4 】

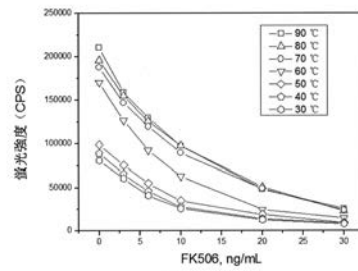


図 4

【 図 5 】

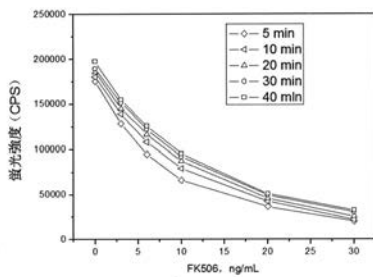


図 5

【 図 7 A 】

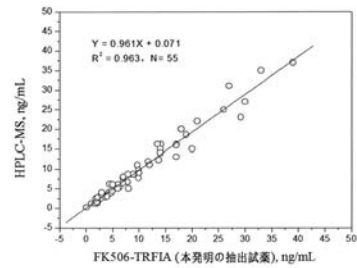


図 7A

【 図 6 】

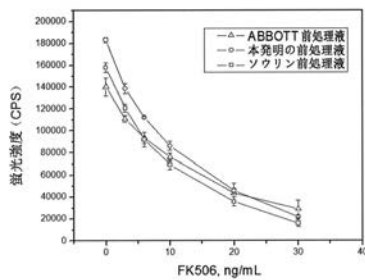


図 6

【 図 7 B 】

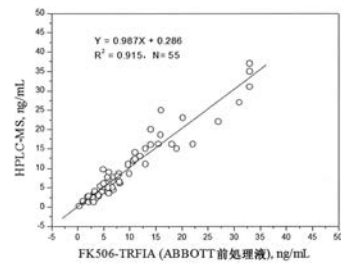


図 7B

【 図 7 C 】

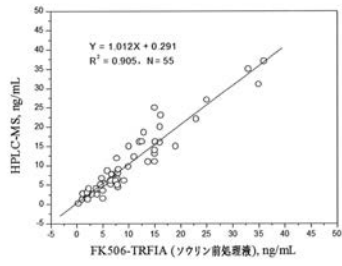


図 7C

【 国际調查報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2015/080330
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
G01N 1/28 (2006.01) i; G01N 33/577 (2006.01) i 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)		
G01N 33; G01N 1		
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 practicable, search terms used) CNABS, CNTXT, CNKI, EPODOC, WPI, ISI Web of Knowledge: drug concentration, immunization, inhibit, extract, release, protein denaturation, guanidine hydrochloride, therapeutic drug monitoring, TDM, immunosuppressant medicine, drug, extracting reagent, albuminous, degeneration, protein, denaturant, urea, guanidine, proteolytic enzyme?, subtilisin, protease K, dispase		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 102939524 A (HITACHI HIGH-TECHNOLOGIES CORPORATION), 20 February 2013 (20.02.2013), description, paragraphs [0055] and [0080-0082], and figures 3 and 5	1, 5-18
Y	CN 102939524 A (HITACHI HIGH-TECHNOLOGIES CORPORATION), 20 February 2013 (20.02.2013), description, paragraphs [0055] and [0080-0082], and figures 3 and 5	2-4, 19-20
Y	LI, Xiangrong et al., "Denaturation Study of Bovine Serum Albumin Induced by the Guanidine Chloride or Urea by Microcalorimetry", ACTA CHIMICA SINICA, volume 66, number 5, 14 March 2008 (14.03.2008), page 516	2-4
Y	CN 101946179 A (ABBOTT LABORATORIES), 12 January 2011 (12.01.2011), claim 29, and description, paragraph [0066]	19-20
A	CN 101664394 A (SONG, Hongtao), 10 March 2010 (10.03.2010), the whole document	1-20
A	CN 104160273 A (SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.), 19 November 2014 (19.11.2014), the whole document	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family 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 application or patent 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 28 December 2015 (28.12.2015)	Date of mailing of the international search report 06 January 2016 (06.01.2016)	
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer ZHANG, Jing Telephone No.: (86-10) 62085648	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/080330

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5089390 A (SYNTEX INC.), 18 February 1992 (18.02.1992), the whole document	1-20
A	EP 0717850 B1 (CIBA GEIGY AG et al.), 28 May 1997 (28.05.1997), the whole document	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2015/080330

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102939524 A	20 February 2013	CN 102939524 B	07 October 2015
		US 2013130401 A1	23 May 2013
		JP 5452383 B2	26 March 2014
		WO 2011158738 A1	22 December 2011
		JP 2012002593 A	05 January 2012
		EP 2584337 A1	24 April 2013
CN 101946179 A	12 January 2011	WO 2009078875 A1	25 June 2009
		JP 2011508209 A	10 March 2011
		BR PI0722361 A2	29 April 2014
		CN 101946179 B	13 August 2014
		EP 2232264 A1	29 September 2010
		JP 5134692 B2	30 January 2013
		CA 2709272 A1	25 June 2009
		CA 2709272 C	10 March 2015
		EP 2232264 A4	20 April 2011
CN 101664394 A	10 March 2010	None	
CN 104160273 A	19 November 2014	US 8586322 B2	19 November 2013
		JP 2015512049 A	23 April 2015
		EP 2823304 A1	14 January 2015
		US 2013236918 A1	12 September 2013
		WO 2013133917 A1	12 September 2013
		KR 20140137423 A	02 December 2014
US 5089390 A	18 February 1992	US 5401649 A	28 March 1995
EP 0717850 B1	28 May 1997	CZ 9600662 A3	11 September 1996
		CZ 289434 B6	16 January 2002
		AT 153769 T	15 June 1997
		FI 961004 A	04 March 1996
		CA 2169162 C	03 February 2004
		FI 961004 A0	04 March 1996
		FI 111035 B	15 May 2003
		GR 3023578 T3	29 August 1997
		HU 218743 B	28 November 2000
		NO 960924 A	07 March 1996
		JP H09502272 A	04 March 1997
		HU 9600564 D0	28 May 1996
		PL 176727 B1	30 July 1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2015/080330

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		CA 2169162 A1	16 March 1995
		SK 281369 B6	12 February 2001
		DE 69403484 D1	03 July 1997
		DK 0717850 T3	20 October 1997
		ES 2103136 T3	16 August 1997
		HU T73692 A	30 September 1996
		RU 2138052 C1	20 September 1999
		AU 7694894 A	27 March 1995
		PL 313392 A1	24 June 1996
		HK 1005754 A1	22 January 1999
		BR 9407422 A	09 April 1996
		SK 31096 A3	03 July 1996
		AU 680946 B2	14 August 1997
		WO 9507468 A1	16 March 1995
		CN 1130425 A	04 September 1996
		NZ 273595 A	27 August 1996
		DE 69403484 T2	04 December 1997
		GB 9318612 D0	27 October 1993
		CN 1088196 C	24 July 2002
		NO 960924 D0	07 March 1996
		EP 0717850 A1	26 June 1996
		JP 2892503 B2	17 May 1999

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2015/080330

A. 主题的分类 G01N 1/28(2006.01)i; G01N 33/577(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) G01N33;G01N1 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, CNTXT, CNKI, EPODOC, WPI, ISI Web of Knowledge: 药物浓度, 药浓度, 免疫, 抑制, 提取, 释放, 蛋白变性, 尿素, 盐酸胍, 蛋白水解酶, 枯草杆菌蛋白酶, 蛋白酶K, 分散酶, therapeutic drug monitoring, TDM, immunosuppressant medicine, drug, extracting reagent, albuminous, degeneration, , protein, denaturant, urea, guanidine, proteolytic enzyme?, subtilisin, protease K, dispase		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 102939524 A (株式会社日立高新技术) 2013年 2月 20日 (2013-02-20) 说明书[0055]段, [0080-0082]段, 图3, 5	1, 5-18
Y	CN 102939524 A (株式会社日立高新技术) 2013年 2月 20日 (2013-02-20) 说明书[0055]段, [0080-0082]段, 图3, 5	2-4, 19-20
Y	李向荣等. "牛血清蛋白在盐酸胍和尿素体系中变性的微量热研究" 化学学报, 第66卷, 第5期, 2008年 3月 14日 (2008-03-14), 第516页	2-4
Y	CN 101946179 A (雅培制药有限公司) 2011年 1月 12日 (2011-01-12) 权利要求29, 说明书[0066]段	19-20
A	CN 101664394 A (宋洪涛) 2010年 3月 10日 (2010-03-10) 全文	1-20
A	CN 104160273 A (西门子医疗保健诊断公司) 2014年 11月 19日 (2014-11-19) 全文	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。		<input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件		"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件
国际检索实际完成的日期 2015年 12月 28日	国际检索报告邮寄日期 2016年 1月 6日	
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 张晶 电话号码 (86-10)62086648	

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2015/080330

c. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	US 5089390 A (SYNTEX INC) 1992年 2月 18日 (1992 - 02 - 18) 全文	1-20
A	EP 0717850 B1 (CIBA GEIGY AG等) 1997年 5月 28日 (1997 - 05 - 28) 全文	1-20

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/080330

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利		公布日 (年/月/日)	
CN	102939524	A	2013年 2月 20日	CN	102939524	B	2015年 10月 7日
				US	2013130401	A1	2013年 5月 23日
				JP	5452383	B2	2014年 3月 26日
				WO	2011158738	A1	2011年 12月 22日
				JP	2012002593	A	2012年 1月 5日
				EP	2584337	A1	2013年 4月 24日
CN	101946179	A	2011年 1月 12日	WO	2009078875	A1	2009年 6月 25日
				JP	2011508209	A	2011年 3月 10日
				BR	PI0722361	A2	2014年 4月 29日
				CN	101946179	B	2014年 8月 13日
				EP	2232264	A1	2010年 9月 29日
				JP	5134692	B2	2013年 1月 30日
				CA	2709272	A1	2009年 6月 25日
				CA	2709272	C	2015年 3月 10日
				EP	2232264	A4	2011年 4月 20日
CN	101664394	A	2010年 3月 10日	无			
CN	104160273	A	2014年 11月 19日	US	8586322	B2	2013年 11月 19日
				JP	2015512049	A	2015年 4月 23日
				EP	2823304	A1	2015年 1月 14日
				US	2013236918	A1	2013年 9月 12日
				WO	2013133917	A1	2013年 9月 12日
				KR	20140137423	A	2014年 12月 2日
US	5089390	A	1992年 2月 18日	US	5401649	A	1995年 3月 28日
EP	0717850	B1	1997年 5月 28日	CZ	9600662	A3	1996年 9月 11日
				CZ	289434	B6	2002年 1月 16日
				AT	153769	T	1997年 6月 15日
				FI	961004	A	1996年 3月 4日
				CA	2169162	C	2004年 2月 3日
				FI	961004	A0	1996年 3月 4日
				FI	111035	B	2003年 5月 15日
				GR	3023578	T3	1997年 8月 29日
				HU	218743	B	2000年 11月 28日
				NO	960924	A	1996年 3月 7日
				JP	H09502272	A	1997年 3月 4日
				HU	9600564	D0	1996年 5月 28日
				PL	176727	B1	1999年 7月 30日
				CA	2169162	A1	1995年 3月 16日
				SK	281369	B6	2001年 2月 12日
				DE	69403484	D1	1997年 7月 3日
				DK	0717850	T3	1997年 10月 20日
				ES	2103136	T3	1997年 8月 16日
				HU	T73692	A	1996年 9月 30日
				RU	2138052	C1	1999年 9月 20日
				AU	7694894	A	1995年 3月 27日
				PL	313392	A1	1996年 6月 24日
				HK	1005754	A1	1999年 1月 22日
				BR	9407422	A	1996年 4月 9日
				SK	31096	A3	1996年 7月 3日
				AU	680946	B2	1997年 8月 14日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/080330

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		WO 9507468 A1	1995年 3月 16日
		CN 1130425 A	1996年 9月 4日
		NZ 273696 A	1996年 8月 27日
		DE 69403484 T2	1997年 12月 4日
		GB 9318612 D0	1993年 10月 27日
		CN 1088196 C	2002年 7月 24日
		NO 960924 D0	1996年 3月 7日
		EP 0717850 A1	1996年 6月 26日
		JP 2892503 B2	1999年 5月 17日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 二工 永 艶

中華人民共和国 201112 上海市 閔 行区 三 魯 公路 3 2 7 9 号 明 浦 広 場 2 号 楼 2 楼

(72)発明者 史 小 娟

中華人民共和国 201112 上海市 閔 行区 三 魯 公路 3 2 7 9 号 明 浦 広 場 2 号 楼 2 楼

专利名称(译)	免疫抑制药物用于免疫分析药物提取试剂		
公开(公告)号	JP2018507422A	公开(公告)日	2018-03-15
申请号	JP2017564786	申请日	2015-05-29
[标]发明人	史小娟		
发明人	▲吳▼ ▲馮▼波 ▲二工▼ 永▲艶▼ 史小娟		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/487 G01N33/50 G01N33/5306 G01N33/533 G01N33/5375 G01N33/54333 G01N33/9493 G01N1/28 G01N33/577 G01N1/2806 G01N1/4022 G01N1/4044 G01N1/44 G01N33/5044 G01N2001/388		
FI分类号	G01N33/53.S G01N33/532.A		
代理人(译)	村山彦 安倍晋三龙彦		
优先权	201510145431.1 2015-03-30 CN		
其他公开文献	JP6605627B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种用于免疫测定的血液样品免疫抑制剂药物提取试剂，其包含蛋白质变性剂，蛋白质水解酶，表面活性剂和pH缓冲剂。本发明进一步提供了一种使用提取试剂检测全血样品中免疫抑制剂浓度的方法，以及包含该提取试剂的免疫检测试剂盒。本发明的提取试剂避免了传统提取方法中有机溶剂的使用，从而避免了有机溶剂对检测系统中抗体活性的影响。本发明的药物提取步骤不需要离心，可以将处理后的样品直接用于免疫检测，操作简单，检测结果准确可靠。有。

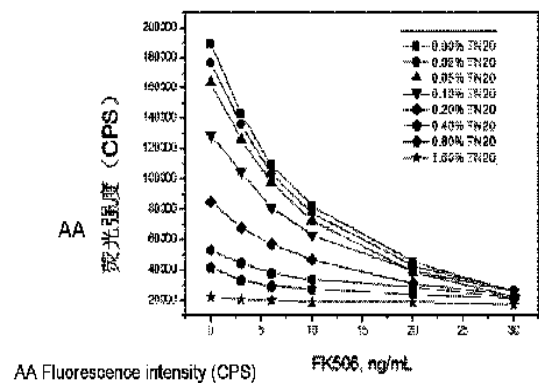


图 1