

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6605627号
(P6605627)

(45) 発行日 令和1年11月13日(2019.11.13)

(24) 登録日 令和1年10月25日(2019.10.25)

(51) Int.Cl. F I
 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

請求項の数 15 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2017-564786 (P2017-564786)	(73) 特許権者	517310636
(86) (22) 出願日	平成27年5月29日 (2015. 5. 29)		上▲海▼云▲澤▼生物科技有限公司
(65) 公表番号	特表2018-507422 (P2018-507422A)		中華人民共和国201112上▲海▼市▲
(43) 公表日	平成30年3月15日 (2018. 3. 15)		閔▼行区三▲魯▼公路3279号明浦▲広
(86) 国際出願番号	PCT/CN2015/080330		▼▲場▼2号楼2楼
(87) 国際公開番号	W02016/155111	(74) 代理人	100108453
(87) 国際公開日	平成28年10月6日 (2016. 10. 6)		弁理士 村山 靖彦
審査請求日	平成29年9月4日 (2017. 9. 4)	(74) 代理人	100110364
(31) 優先権主張番号	201510145431.1		弁理士 実広 信哉
(32) 優先日	平成27年3月30日 (2015. 3. 30)	(74) 代理人	100133400
(33) 優先権主張国・地域又は機関	中国 (CN)		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) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

尿素または塩化グアニジニウムである蛋白質変性剤と、スブチリシンである蛋白質加水分解酵素と、ツイーン20である界面活性剤と、pH緩衝液と、を含み、免疫抑制剤がタクロリムスである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】

前記尿素の前記抽出試薬中のモル濃度は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であることを特徴とする請求項2に記載の抽出試薬。

【請求項 4】

前記スブチリシンの前記抽出試薬中の量は2.5 U/ml ~ 10 U/ml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 5】

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】

前記ツイーン 20 の前記抽出試薬中の体積分率は 0.02% ~ 0.1% (v/v) であることを特徴とする請求項 5 に記載の抽出試薬。

【請求項 7】

前記 pH 緩衝液の pH が 6.5 ~ 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 8】

請求項 1 乃至 7 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。

10

【請求項 9】

前記免疫抑制剤がタクロリムスであることを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記抽出試薬と前記血液サンプルを混合する時、前記血液サンプルと前記抽出試薬の体積比は 1/1 ~ 1/10 であることを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記抽出試薬と前記血液サンプルを混合する時、前記血液サンプルと前記抽出試薬の体積比は 1/2 ~ 1/5 であることを特徴とする請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記加熱方式による温度は 50 ~ 90 であって、前記加熱方式による時間は 5 min ~ 50 min であることを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

20

【請求項 13】

前記加熱方式による温度は 60 ~ 80 であって、前記加熱方式による時間は 10 min ~ 30 min であることを特徴とする請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

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 7 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 15】

30

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 Eu^{3+} 、 Sm^{3+} 、 Tb^{3+} 、 Dy^{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 14 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。

40

【背景技術】

【0002】

免疫抑制剤 (Immunosuppressant) 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 (Tacrolimus, FK506)、シクロスポリン (Cyclosporine A, CsA)

50

、ラパマイシン (Rapamycin , RPM) 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を発生し、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

10

【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 (HPLC-MS)、微粒子酵素免疫測定 (MEIA)、化学発光微粒子免疫測定 (CMIA) 及び酵素結合免疫吸着法 (ELISA) 等がある。ここで、受容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

20

【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 (10 mM - 100 mM) に依存し、且つ、二価金属イオンの濃度が変化すると

30

40

【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ない、該工程も操作の難易度を向上させ、検出時間を延長する。

【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

50

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。

10

【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】

【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

20

【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】

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。

30

【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。

40

【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。

【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：

50

【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。

【0019】

本発明によると、前記尿素の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、前記尿素の前記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。

10

【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。

【0021】

本発明によると、前記スブ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。

20

【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。

30

【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。

40

【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 mi

50

n ~ 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。

10

【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。

20

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。

30

【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剤で標記し、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。

40

【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⁺、

50

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。

【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。

【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。

【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。

【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 - M

10

20

30

40

50

S 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】

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

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。

【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。

【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。

【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

10

20

30

40

50

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、6 mol/L ~ 10 mol/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、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。

10

【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（牛樹苓、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）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（牛樹苓、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。

20

【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

30

【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。

【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。

40

【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

50

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。

【0064】

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、0.05%ツイーン20を含有する。

【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 $^{\circ}$)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 μ g/ml含有するTBST-BSA溶液50 μ l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- Eu^{3+} (蘇州新波生物技術有限公司)を2 μ g/ml含有するTBST-BSA緩衝液を150 μ l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

10

20

30

40

50

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いが、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。

10

【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緩衝液であって、ツイーン20 0.05%(v/v)と、スプチリシン5U/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。

20

【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。

30

【0076】

図2に示すように、抽出試薬中の尿素の濃度が2mol/Lから8mol/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、3ng/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の抑制作用が低いことを表すが、高濃度のFK506校正品(20ng/mL~30ng/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6mol/Lから8mol/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6mol/L~8mol/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1mol/Lから6mol/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。

40

【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

50

FK506を高効率に放出でき、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ナーゼの濃度は、短時間で細胞を破裂し、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。

10

【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、濃度の異なるスブチリシンと、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】

図3に示すように、抽出試薬にスブ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、スブ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。抽出試薬中のスブチリシンの濃度が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、抽出試薬中のスブ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、スブ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高速に低下し、高濃度のスブチリシンは抗体-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ブ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。

20

【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

30

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、スブチリシン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。

40

【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 / m L)に対する影響

HPLC-MS測定値 (n g / m l)		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 / m l)		1.0	1.3	2.6	3.2	3.4	5.0	6.1	9.2	13.5	15.8	20.1	>30	10
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 / m l)	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	20
	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	

【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、短時間内にプロテイ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イ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イ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イ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、スブチリシン 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】

10

20

30

40

50

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。

【0088】

10

【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)													
	1.3	2.6	3.2	3.4	5	6.1	9.2	13.5	15.8	20.1	>30		
異なる孵化時間で本方法で検出した血液サンプル濃度	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

【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。

40

【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の水浴鍋に入れて、15min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、1800xgで10min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200μl全血サンプルと

50

200 μ l 全血沈殿剤 (アボット貿易 (上海) 有限会社から購入、309221) を添加し、10秒振動しつつ均一に混合し、10000 \times g で5~6min 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7A、7B、7C)。

10

【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。

20

【0095】

図7A、7B、7C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。

【 図 1 】

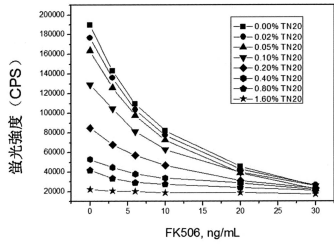


図 1

【 図 3 】

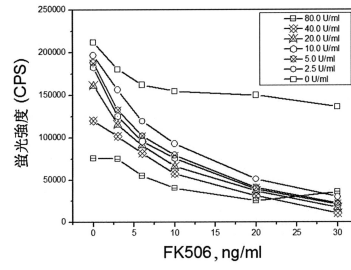


図 3

【 図 2 】

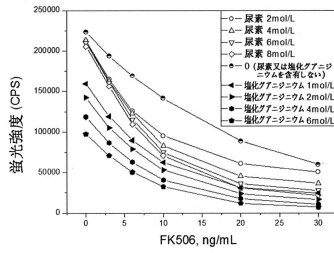


図 2

【 図 4 】

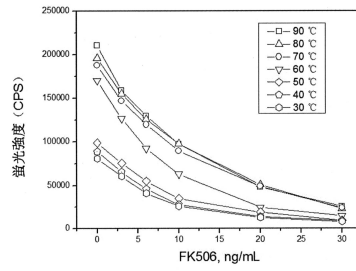


図 4

【 図 5 】

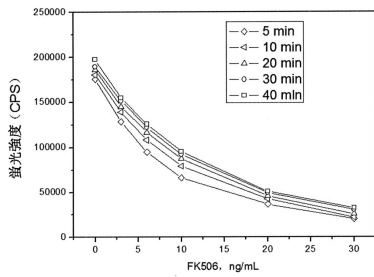


図 5

【 図 7 A 】

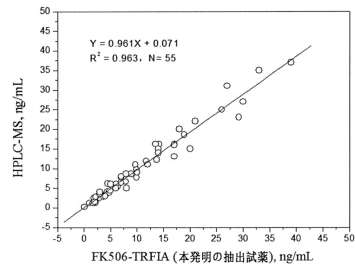


図 7A

【 図 6 】

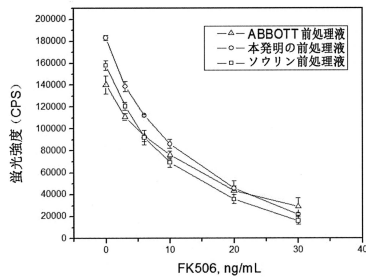


図 6

【 図 7 B 】

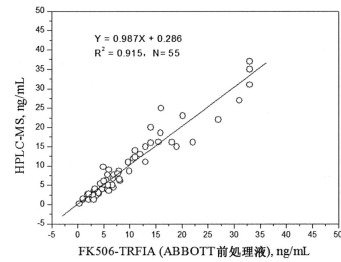

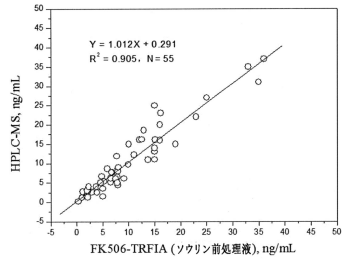


図 7B

【 7C】



 7C

フロントページの続き

(72)発明者 ニエ 永 艶

中華人民共和国201112上海市闵行区三魯公路3279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上海市闵行区三魯公路3279号明浦広場2号楼2楼

審査官 草川 貴史

(56)参考文献 特表2010-515063(JP,A)

特表2010-515065(JP,A)

特開2003-235587(JP,A)

特表2009-511919(JP,A)

米国特許出願公開第2008/0020401(US,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

专利名称(译)	用于免疫分析的免疫抑制剂药物提取试剂		
公开(公告)号	JP6605627B2	公开(公告)日	2019-11-13
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	JP2018507422A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开提供了一种用于从全血样品中提取免疫抑制剂药物以进行免疫测定的试剂。提取试剂包括蛋白质变性剂，蛋白水解酶，表面活性剂和pH缓冲液。本公开还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和免疫测定试剂盒。本公开的提取试剂不需要像传统提取方法中那样使用有机溶剂，因此该有机溶剂对检测系统中抗体活性的不利影响以及与其使用相关的其他相对缺陷是消除了。本公开的药物提取过程不需要离心，处理后的样品可直接用于免疫测定。本发明的药物提取操作简单，基于该提取方法的检测结果准确。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6605627号 (P6605627)
(45) 発行日 令和1年11月13日(2019.11.13)	(24) 登録日 令和1年10月25日(2019.10.25)	
(51) Int. Cl. G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/532 (2006.01)	F I G O I N 33/53 S G O I N 33/532 A	
請求項の数 15 (全 18 頁)		
(21) 出願番号 特願2017-564786 (P2017-564786)	(73) 特許権者 517310636	
(86) (22) 出願日 平成27年5月29日(2015.5.29)	上▲海▼云▲澤▼生物科技有限公司	
(65) 公表番号 特表2018-507422 (P2018-507422A)	中華人民共和國201112上▲海▼市▲	
(43) 公表日 平成30年3月15日(2018.3.15)	閔▼行区三▲雲▼公路3279号明浦▲広	
(86) 国際出願番号 PCT/CN2015/080330	▼▲場▼2号樓2樓	
(87) 国際公開番号 W02016/155111	(74) 代理人 100108453	
(87) 国際公開日 平成28年10月6日(2016.10.6)	弁理士 村山 彦彦	
審査請求日 平成29年9月4日(2017.9.4)	(74) 代理人 100110364	
(31) 優先権主張番号 201510145431.1	弁理士 実広 信哉	
(32) 優先日 平成27年3月30日(2015.3.30)	(74) 代理人 100133400	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 中国 (CN)	弁理士 阿部 達彦	
	(72) 発明者 ▲吳▼▲馮▼波	
	中華人民共和國201112上▲海▼市▲	
	閔▼行区三▲雲▼公路3279号明浦▲広	
	▼▲場▼2号樓2樓	
	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		