

(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2015-512049

(P2015-512049A)

(43) 公表日 平成27年4月23日(2015.4.23)

(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	G
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/536	C
	GO 1 N 33/536	E

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願2014-560916 (P2014-560916)	(71) 出願人	507269175
(86) (22) 出願日	平成25年1月31日 (2013.1.31)		シーメンス・ヘルスケア・ダイアグノステ
(85) 翻訳文提出日	平成26年11月10日 (2014.11.10)		ィックス・インコーポレーテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/024054		SIEMENS HEALTHCARE
(87) 国際公開番号	W02013/133917		DIAGNOSTICS INC.
(87) 国際公開日	平成25年9月12日 (2013.9.12)		アメリカ合衆国、ニューヨーク 1059
(31) 優先権主張番号	13/413, 925		1、タリータウン、ベネディクト・アベニ
(32) 優先日	平成24年3月7日 (2012.3.7)		ュー 511
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100114890
			弁理士 アインゼル・フェリックス＝ライ
			ンハルト
		(74) 代理人	100099483
			弁理士 久野 琢也

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫抑制薬のためのサンドイッチアッセイ

(57) 【要約】

免疫抑制薬を含んでいる疑いのある試料において免疫抑制薬を測定するための方法を開示している。該方法は、媒体中で試料、免疫抑制薬についての一次モノクローナル抗体、及び免疫抑制薬についての二次モノクローナル抗体の組合せを提供することを含む。二次モノクローナル抗体は、一次モノクローナル抗体が免疫抑制薬に結合する部分以外の、免疫抑制薬の部分に結合する。媒体を、一次モノクローナル抗体及び二次モノクローナル抗体の免疫抑制薬への結合のための条件下でインキュベートする。媒体を、免疫抑制薬、一次モノクローナル抗体及び二次モノクローナル抗体を含む免疫複合体の存在について試験する。免疫複合体の存在及び/又は量は、試料中の免疫抑制薬の存在及び/又は量を示す。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

免疫抑制薬を含有する疑いのある試料において免疫抑制薬を測定するための方法であって、以下、

(a) 媒体中で、

(i) 試料と

(ii) 免疫抑制薬のための一次モノクローナル抗体と

(iii) 免疫抑制薬のための二次モノクローナル抗体と

を組み合わせ提供すること、ここで、二次モノクローナル抗体は、一次モノクローナル抗体が免疫抑制薬に結合する部分以外の免疫抑制薬の一部に結合し、

(b) 前記媒体を、免疫抑制薬への一次モノクローナル抗体及び二次モノクローナル抗体の結合のための条件下でインキュベートすること、並びに

(c) 免疫抑制薬、一次モノクローナル抗体及び二次モノクローナル抗体を含む免疫複合体の存在について前記媒体を試験すること、ここで、免疫複合体の存在及び/又は量は、試料中の免疫抑制薬の存在及び/又は量を示す、

を含む、前記方法。

【請求項 2】

前記免疫抑制薬が、タクロリムス、シクロスポリン、ラパマイシン及びエベロリムスからなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記一次モノクローナル抗体及び二次モノクローナル抗体の 1 つが、シグナル発生システムの一端をなす、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記一次モノクローナル抗体及び二次モノクローナル抗体の 1 つが、支持体に結合される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記免疫抑制薬がタクロリムスであり、かつ前記一次モノクローナル抗体が、実質的にメトキシ官能基及びヒドロキシ官能基を含む C 2 9 ~ C 3 4 環及びメトキシ官能基を含む C 1 5 からなるタクロリムスの一部に結合する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記免疫抑制薬がタクロリムスであり、かつ前記二次モノクローナル抗体が、実質的に C 1 0 ~ C 1 4 環のメトキシ、及び C 2 2 ケト酸素を含む C 1 ~ C 2 6 環の C 1 9 ~ C 2 7 からなるタクロリムスの一部に結合する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記免疫抑制薬がタクロリムスであり、かつ前記一次モノクローナル抗体は、C 2 2 でタクロリムスに連結した免疫原キャリアーを含む免疫原に対して生じたものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記免疫抑制薬がタクロリムスであり、かつ前記二次モノクローナル抗体は、C 3 2 でタクロリムスに連結した免疫原キャリアーを含む免疫原に対して生じたものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記免疫抑制薬がタクロリムスであり、前記一次モノクローナル抗体が 1 4 H 0 4 であり、かつ前記二次モノクローナル抗体が 1 E 2 である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

タクロリムスを含有する疑いのある試料においてタクロリムスを測定するための方法であって、以下、

(a) 媒体中で、

(i) 試料と

(ii) タクロリムスのための一次モノクローナル抗体と

10

20

30

40

50

(i i i) タクロリムスのための二次モノクローナル抗体とを組み合わせて提供すること、ここで、二次モノクローナル抗体は、一次モノクローナル抗体がタクロリムスに結合する部分以外のタクロリムスの一部に結合し、
 (b) 前記媒体を、試料中でのタクロリムスへの一次抗体及び二次抗体の結合のための条件下でインキュベートすること、並びに
 (c) タクロリムス、一次モノクローナル抗体及び二次モノクローナル抗体を含む免疫複合体の存在について前記媒体を試験すること、ここで、免疫複合体の存在及び / 又は量は、試料中のタクロリムスの存在及び / 又は量を示す、
 を含む、前記方法。

【請求項 11】

前記一次モノクローナル抗体及び二次モノクローナル抗体の 1 つが、シグナル発生システムの一端をなす、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記一次モノクローナル抗体及び二次モノクローナル抗体の 1 つが、支持体に結合される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

前記一次モノクローナル抗体が、実質的にメトキシ官能基及びヒドロキシ官能基を含む C 2 9 ~ C 3 4 環及びメトキシ官能基を含む C 1 5 からなるタクロリムスの一部に結合する、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 14】

前記二次モノクローナル抗体が、実質的に C 1 0 ~ C 1 4 環のメトキシ、及び C 2 2 ケト酸素を含む C 1 ~ C 2 6 環の C 1 9 ~ C 2 7 からなるタクロリムスの一部に結合する、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 15】

前記一次モノクローナル抗体は、C 2 2 でタクロリムスに連結した免疫原キャリアーを含む免疫原に対して生じたものである、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 16】

前記二次モノクローナル抗体は、C 3 2 でタクロリムスに連結した免疫原キャリアーを含む免疫原に対して生じたものである、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 17】

前記一次モノクローナル抗体が 1 4 H 0 4 であり、かつ前記二次モノクローナル抗体が 1 E 2 である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 18】

タクロリムスを含有する疑いのある試料においてタクロリムスを測定するための方法であって、以下、

(a) 媒体中で、

(i) 試料と

(i i) 磁性粒子を伴うクロリムスのための一次モノクローナル抗体と

(i i i) タクロリムスのための二次モノクローナル抗体と

を組み合わせて提供すること、ここで、二次モノクローナル抗体は、一次モノクローナル抗体がタクロリムスに結合する部分以外の他のタクロリムスの一部に結合し、かつ二次モノクローナル抗体は酵素を伴い、

(b) 前記媒体を、タクロリムスへの一次モノクローナル抗体及び二次モノクローナル抗体の結合のための条件下でインキュベートすること、並びに

(d) タクロリムス及び一次モノクローナル抗体及び二次モノクローナル抗体を含む免疫複合体の存在について前記媒体を試験すること、ここで、免疫複合体の存在及び / 又は量は、試料中のタクロリムスの存在及び / 又は量を示す、

を含む、前記方法。

【請求項 19】

前記一次モノクローナル抗体が、実質的にメトキシ官能基及びヒドロキシ官能基を含む

10

20

30

40

50

C 2 9 ~ C 3 4 環及びメトキシ官能基を含む C 1 5 からなるタクロリムスの一部に結合し、かつ前記二次モノクローナル抗体が、実質的に C 1 0 ~ C 1 4 環のメトキシ、並びに C 2 5 ヒドロキシ及び C 2 2 ケト酸素を含む C 1 ~ C 2 6 環の C 1 9 ~ C 2 7 からなるタクロリムスの一部に結合する、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記一次モノクローナル抗体が 1 4 H 0 4 であり、かつ前記二次モノクローナル抗体が 1 E 2 である、請求項 1 8 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、免疫抑制薬の、かかる免疫抑制薬の 1 つ以上を含むことが公知である又は含む疑いのある試料、例えば患者試料中での測定のための化合物、方法及びキットに関する。

【0 0 0 2】

身体は、自己と非自己を識別するための複雑な免疫応答に依存する。時々、身体の免疫系を、不十分な反応を増加し又は過剰反応を抑制するために制御する必要がある。例えば、臓器、例えば腎臓、心臓、心臓、心臓、骨髄及び肝臓をヒトに移植する場合に、身体は、しばしば、同種異系移植片拒絶と言われるプロセスによって移植組織を拒絶する。

【0 0 0 3】

同種異系移植片拒絶の治療において、免疫系は、しばしば薬物療法で制御される方法で抑制される。免疫抑制薬は、非自己組織の同種異系移植片拒絶を妨げることを助けるために移植レシピエントに注意深く投与される治療薬である。免疫抑制薬を、次のように分類してよい：グルココルチコイド、細胞増殖阻害薬、抗体、イムノフィリンに対して作用する薬剤、及び他の薬剤、例えばインターフェロン、オピエート I N F 結合タンパク質、ミコフェノール酸塩、F T Y 7 2 0 等。特定の分類の免疫抑制薬は、イムノフィリンに対して作用する薬剤を含む。イムノフィリンは、生理学的意義を有する高い親和性の特異的結合タンパク質の一例である。イムノフィリンの 2 つの異なるファミリー：シクロフィリン及びマクロフィリンが現在公知であり、後者は例えばタクロリムス又はシロリムスを特異的に結合する。

【0 0 0 4】

2 つの最も一般的な、移植患者において臓器拒絶を妨げるために投与される免疫抑制薬は、C y c l o s p o r i n e (C S A) 及び F K - 5 0 6 (F K 又はタクロリムス) である。米国及び他国において免疫抑制剤としての使用を見出している他の薬剤は、ラパマイシンとしても公知のシロリムスである。シロリムスの誘導体も、免疫抑制剤として有用である。かかる誘導体は、例えば E v e r o l i m u s 等を含む。

【0 0 0 5】

ある免疫抑制薬に関連する副作用を、患者中に存在する薬剤のレベルを注意深く制御することによってある程度制御することができる。血中の免疫抑制薬及び関連する薬剤の濃度の治療モニタリングは、最小の毒性で最大の免疫抑制を確実にするための投与レジームを最適化することを要求する。免疫抑制薬は非常に有効な免疫抑制剤であるが、有効投与範囲がしばしば狭く、かつ過剰な投与量は深刻な副作用をもたらすために、それらの使用を注意深く管理しなければならない。一方で、免疫抑制剤の少なすぎる投与は、組織拒絶を導くことができない。免疫抑制薬の分布及び代謝が、患者間で大きく変動するため、及び副作用の幅広さ及び厳しさのために、薬物レベルの正確なモニタリングが必須である。

【0 0 0 6】

従って、患者における免疫抑制薬又はそれらの誘導体のレベルを測定するための早く正確な診断方法を開発する継続的な必要がある。該方法は、その代謝物の交叉反応性をもたらす又は免疫抑制薬を含む疑いのある試料における構成物をもたらす誤差を最少化すると同時に、完全に自動化することができるべきであり、かつ親薬物を選択的に検出すべきで

10

20

30

40

50

ある。

【0007】

要約

本明細書において記載された原理に従ったいくつかの実施例は、免疫抑制薬を含んでいる疑いのある試料において免疫抑制薬を測定するための方法に関する。該方法は、媒体中で試料、免疫抑制薬についての一次モノクローナル抗体、及び免疫抑制薬についての二次モノクローナル抗体の組合せを提供することを含む。二次モノクローナル抗体は、一次モノクローナル抗体が免疫抑制薬に結合する部分以外の、免疫抑制薬の部分に結合する。媒体を、一次モノクローナル抗体及び二次モノクローナル抗体の免疫抑制薬への結合のための条件下でインキュベートする。媒体を、免疫抑制薬、一次モノクローナル抗体及び二次モノクローナル抗体を含む免疫複合体の存在について試験する。免疫複合体の存在及び/又は量は、試料中の免疫抑制薬の存在及び/又は量を示す。

10

【0008】

本明細書において記載された原理に従ったいくつかの実施例は、タクロリムスを含んでいる疑いのある試料においてタクロリムスを測定するための方法に関する。該方法は、媒体中で試料、タクロリムスについての一次モノクローナル抗体、及びタクロリムスについての二次モノクローナル抗体の組合せを提供することを含む。二次モノクローナル抗体は、一次モノクローナル抗体がタクロリムスに結合する部分以外の、タクロリムスの部分に結合する。媒体を、試料中での一次モノクローナル抗体及び二次モノクローナル抗体のタクロリムスへの結合のための条件下でインキュベートし、そしてその媒体を、タクロリムス、一次モノクローナル抗体及び二次モノクローナル抗体を含む免疫複合体の存在について試験する。免疫複合体の存在及び/又は量は、試料中のタクロリムスの存在及び/又は量を示す。

20

【0009】

本明細書において記載された原理に従ったいくつかの実施例は、タクロリムスを含んでいる疑いのある試料においてタクロリムスを測定するための方法に関する。該方法は、媒体中で試料、磁性粒子を伴うタクロリムスについての一次モノクローナル抗体、及び磁性粒子を伴うタクロリムスについての二次モノクローナル抗体の組合せを提供することを含む。二次モノクローナル抗体は、一次モノクローナル抗体がタクロリムスに結合する部分以外の、タクロリムスの部分に結合する。媒体を、試料中での一次モノクローナル抗体及び二次モノクローナル抗体のタクロリムスへの結合のための条件下でインキュベートし、そしてその媒体を、タクロリムス、一次モノクローナル抗体及び二次モノクローナル抗体を含む免疫複合体の存在について試験する。免疫複合体の存在及び/又は量は、試料中のタクロリムスの存在及び/又は量を示す。

30

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】ナンバリングを有するタクロリムスについての化学式を示す図。

【図2】モノクローナル抗体が本明細書に記載の原理に従って結合する分子の位置を示す図1の化学式を示す図。

【図3】本明細書に記載の原理に従ってタクロリムスサンドイッチ免疫アッセイのシグナル用量反応を示すグラフ。

40

【図4】本明細書に記載の原理に従ってタクロリムスELISAサンドイッチ免疫アッセイのシグナル用量反応を示すグラフ。

【0011】

特定の実施態様の詳細な説明

一般議論

本発明は、免疫抑制薬分子の一部を分離するために特異的に結合するモノクローナル抗体を製造することができることを見出している。この発見は、免疫抑制薬が、比較的小分子（分子量約2500未満、又は約2000未満、又は約1500未満、又は約1000未満）であり、かつ抗体が結合できる1つ以上の部位を有することが考慮されないハプテ

50

ンであるために、驚くべきことである。本明細書に記載の原理に従って、同時に免疫抑制薬分子の別の部分に結合する少なくとも2つの異なる抗体を製造することができる。“免疫抑制薬のための抗体”の語句は、免疫抑制薬に特異的に結合し、かつ任意の著しい程度まで免疫抑制薬のための抗体を変形する他の物質に結合しない抗体を意味する。特異的結合は、他の分子の実質的に少ない識別と比較して他のための2つの異なる分子の1つの特異的な認識を含む。一方で、非特異的結合は、比較的特定の表面構造と無関係である分子間の非共有結合を含む。非特異的結合は、分子間の疎水性相互作用を含むいくつかの因子によりもたらされてよい。

【0012】

ハプテンは、対応する抗体に特異的に結合できる化合物であるが、それ自体、抗体の製造のための免疫原（又は抗原）として作用しない。従って、ハプテンは、抗体を生じるために使用される免疫原キャリアーに連結される。

10

【0013】

同時に免疫抑制薬上で2つの異なる部位に結合するモノクローナル抗体の製造は、免疫抑制薬を2つの異なる抗体で同時に結合して免疫複合体を形成する、サンドイッチアッセイにおけるかかる抗体の使用を可能にする。免疫抑制薬に対してサンドイッチアッセイを実施する能力は、免疫抑制薬のためのアッセイの感受性を高める。さらに、支持体に結合した1つのモノクローナル抗体を含むサンドイッチアッセイの場合に、該アッセイを、不純物及び試料の妨害物質の存在で実施してよく、それというのも支持体を、試料から分離し、そして免疫抑制薬を支持体のモノクローナル抗体に結合させた後に、しかし二次モノクローナル抗体の導入前に、洗浄することができるからである。

20

【0014】

“免疫抑制薬”の用語は、イムノフィリンに対して作用するもの、例えば、制限されることなく、シクロスポリン（シクロスポリンA、シクロスポリンB、シクロスポリンC、シクロスポリンD、シクロスポリンE、シクロスポリンF、シクロスポリンG、シクロスポリンH、シクロスポリンIを含む）、タクロリムス（FR-900506、FK506、PROGRAF（登録商標））、シロリムス（ラパマイシン、RAPAMUNE（登録商標））、及びエベロリムス（RAD、CERTICAN（登録商標））を含む。

【0015】

抗体は、完全な免疫グロブリン又はそれらの断片を含んでよく、免疫グロブリンは、種々の分類及びアイソタイプ、例えばIgA、IgD、IgE、IgG1、IgG2a、IgG2b及びIgG3、IgM等を含む。それらの断片は、Fab、Fv及びF(ab')₂、Fab'等を含む。さらに、免疫グロブリン又はそれらの断片のアグリゲート、ポリマー及び接合体を、適宜、特定の分子についての結合親和性を維持する限り使用することができる。

30

【0016】

モノクローナル抗体を、当業者によく知られている技術、例えば連続雑種細胞系列を製造し、分泌されたタンパク質を採取すること（体細胞雑種形成技術）によって製造できる。モノクローナル抗体を、Koehler及びMilstein（Nature 265：495-497、1975年）の標準技術に従って製造してよい。モノクローナル抗体の報告を、Lymphocyte Hybridomas, ed. Melchers, et al. Springer-Verlag (New York 1978年)、Nature 266：495（1977年）、Science 208：692（1980年）、及びMethods of Enzymology 73（Part B）：3-46（1981年）において見いだせる。

40

【0017】

抗体の製造のための他のアプローチにおいて、抗体結合部位についてコードする配列を、染色体DNAから切除し、そして細菌中で発現して、対応する抗体結合部位を有する組換えタンパク質を製造することができる、クローニングベクター中に挿入してよい。このアプローチは、少なくとも天然の抗体の特異的結合のために要求されるアミノ酸配列につ

50

いてコードする核酸配列又はそれらの突然変異変種をクローニング及び発現することを含む。

【0018】

モノクローナル抗体の製造のための1つのアプローチにおいて、第一の工程は、抗体を製造する動物、例えば抗原を有する、例えば免疫原を有するマウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、又は雌牛の免疫化を含む。免疫化を、アジュバント、例えばフロインドアジュバント又は他のアジュバント、例えばモノホスホリルリピドA及び合成トレハロースジコリノミコレート(dicorynomycolate)アジュバントで、又はアジュバントなしで実施してよい。次の工程は、抗体を製造する動物から脾臓細胞を単離し、そして抗体を製造する脾臓と適した融合パートナー、典型的に骨髓腫細胞とを、例えばポリエチレングリコール又は他の技術を使用することによって融合することを含む。典型的に、使用される骨髓腫細胞は、通常、ヒポキサンチンチミジン(HT)培養液中で成長するものであるが、しかし、融合細胞の選択のために使用される、ヒポキサンチンアミノピテリンチミジン(HAT)培養液中で成長できない。次の工程は、典型的にHAT培養液中での選択による融合細胞の選択を含む。次の工程は、クローニングした雑種を、免疫アッセイ、例えば固相酵素免疫測定法(ELISA)又はスクリーニングのために適した他の免疫アッセイを使用する適した抗体製造のためにスクリーニングすることを含む。

10

【0019】

“免疫原キャリアー”の用語は、ハプテンに接合され、哺乳動物中に注射されるか又は免疫原として使用される場合に、免疫応答を含み、かつハプテンに結合する抗体の製造を誘発する群又は成分を意味する。免疫原キャリアーは、時に抗原キャリアーとも言われる。本明細書において記載されている原理に従ったいくつかの例において、特定の部位で免疫抑制化合物に連結される、ポリ(アミノ酸)及び非ポリ(アミノ酸)(non-poly(amino acid))免疫原キャリアーを含有する免疫原キャリアーを含む免疫原を合成紙、かつ抗体を製造するために使用する。

20

【0020】

免疫原キャリアーであるポリ(アミノ酸)についての分子量範囲(ダルトン)は、例えば、約5000~約10000000、又は約20000~約600000、又は約25000~約250000の分子量である。ポリ(アミノ酸)免疫原キャリアーは、タンパク質、例えばアルブミン、血清タンパク質、例えばグロブリン、眼球水晶体タンパク質(ocular lens protein)及びリボタンパク質を含む。例示的なタンパク質は、制限されることなく、例えば、ウシ血清アルブミン(BSA)、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、卵オバルブミン、及びウシガンマグロブリン(BGG)を含む。非ポリ(アミノ酸)免疫原キャリアーは、多糖、核酸、及び粒子(生体及び合成材料)を含む。広範な免疫原キャリアーは、Davalian, et al., 米国特許番号第5,089,390号、4段57行目~5段5行目において開示されており、参照をもって本明細書に組み込まれたものとする。

30

【0021】

前記のように、免疫原は、天然又は合成的に製造されてよい単糖の高分子量ポリマーであり、単糖の繰り返した縮合を含む多糖であってよい。多糖の例は、デンプン、グリコーゲン、セルロース、炭水化物ガム、例えばアラビアガム、寒天等である。多糖は、ポリ(アミノ酸)残基及び/又は脂質残基を含んでもよい。

40

【0022】

前記のように、本明細書において記載された原理に従ったいくつかの例において、免疫原キャリアーを、連結基によって免疫抑制化合物上の予め決められた位置で、免疫抑制化合物に連結してよい。いくつかの例において、連結基は、水素を数えずに約2~約50原子、又は4~約30原子を含んでよく、かつそれぞれ独立して、通常、炭素、酸素、硫黄、窒素及びリンからなる群から選択される、2~約30原子、又は3~約20原子の鎖を含んでよい。連結基の一部又は全ては、免疫抑制化合物に連結している分子の一部、例えば制限されることなく、ポリ(アミノ酸)上のアミノ酸残基である。いくつかの例におい

50

て、連結基は、オキシム基を含む。

【0023】

連結基におけるヘテロ原子の数は、0～約20、又は1～約15、又は約2～10の範囲であってよい。連結基は、脂肪族又は芳香族であってよい。ヘテロ原子が存在する場合に、酸素は、通常、炭素、硫黄、窒素又はリンに結合したオキシ又はオキシとして存在し、窒素は、通常、炭素、酸素、硫黄又はリンに結合したニトロ、ニトロソ又はアミノとして存在し、硫黄は、酸素に類似し、一方、リンは、炭素、硫黄、酸素又は窒素に、通常ホスホネート及びホスフェートモノエステル又はジエステルとして結合される。結合基と接合されるべき分子との間の共有結合の形成における通常の官能基は、アルキルアミン、アミジン、チオアミド、エーテル、尿素、チオ尿素、グアニジン、アゾ、チオエーテル及びカルボキシレート、スルホネート、及びホスフェートエステル、アミド及びチオエステルである。ヘテロ原子を有する結合基の特定の一実施態様は、前記のようにオキシム官能基である。

10

【0024】

大部分は、連結基が、連結官能基（成分と反応するための官能基）、例えば窒素及び硫黄類似体を含む非オキシカルボニル基、ホスフェート基、アミノ基、アルキル化剤、例えばハロ又はトシルアルキル、オキシ（ヒドロキシル又は硫黄類似体、メルカプト）、オキシカルボニル（例えばアルデヒド又はケトン）、又は活性オレフィン、例えばビニルスルホン又は -、 - 不飽和エステルを有する場合に、これらの官能基を、アミノ基カルボキシル基、活性オレフィン、アルキル化剤、例えばプロモアセチルに連結させる。アミン及びカルボン酸もしくはその窒素誘導体又はリン酸を連結させる場合に、アミジン及びホスホラミドが形成される。メルカプタン及び活性オレフィンを連結させる場合に、チオエーテルが形成される。メルカプタン及びアルキル化剤を連結させる場合に、チオエーテルが形成される。アルデヒド及びアミンを反応条件下で連結させる場合に、アルキルアミンが形成される。ケトン又はアルデヒド及びヒドロキシアミン（置換基がヒドロキシル基の水素の代わりである場合にそれらの誘導体を含む）を連結させる場合に、オキシム官能基（=N-O-）が形成される。カルボン酸又はリン酸及びアルコールを連結させる場合に、エステルが形成される。種々の連結基は、当業者によく知られている；例えば、Cautrecasas, J. Biol. Chem. (1970) 245:3059を参照。

20

30

【0025】

特定の例としてタクロリムス

次の特定の記載は、本発明の範囲の説明を目的とし、本発明の範囲を制限しない。免疫抑制薬、及び特にタクロリムスの選択は、本発明が、抗体を生じることができ、かつかかる生じた抗体が化合物のためのアッセイ中に特異的に結合する空間的に分けられた領域を有するあらゆるハプテンの検出への一般の適用を有するための説明のためであり、制限するものではない。

【0026】

タクロリムス分子の一部を分けるために結合したモノクローナル抗体を製造してよい（図1）。モノクローナル抗体が結合する分かれた部位を、例えばタクロリムスの代謝を使用する交差反応試験によって測定してよい。図2に関して、製造されてよい1つのモノクローナル抗体は、実質的に、メトキシ基及びヒドロキシ基を含むC29～C34環及びメトキシ基を含むC15からなるタクロリムスの一部（14位）に結合する。実質的にC10～C14環のメトキシ、及びC22ケト酸素を含み、かつC24ヒドロキシ基及びC26エステル酸素も含むC1～C26環のC19～C27からなるタクロリムスの一部（12位）に結合する他のモノクローナル抗体を、製造してよい。三次元解析によるタクロリムス構造の試験は、12位及び14位の配座を示す。

40

【0027】

14位に方向付けられたモノクローナル抗体を、タクロリムスのC19～C27位における位置でタクロリムスを直接結合によって又は連結基を介して免疫原キャリアーに連結

50

する免疫原から製造してよい。

【0028】

特定の例において、説明のために及び制限することなく、本明細書において記載された原理に従って、タクロリムス分子のC22位でタクロリムスを、直接結合によって又は連結基を介して免疫原キャリアーに連結する。特定の例において、説明によって及び制限されることなく、C22位でケト基をアミンと反応させて、オキシムを製造する。アミンは、制限されることなく、例えばカルボキシメトキシルアミンであってよい。

【0029】

1つのアプローチにおいて、タクロリムスとカルボキシメトキシルアミンとの反応は、カルボキシメチルオキシムを生じる。この特定の例において、タクロリムスを、アルコール性媒体、例えばメタノール、エタノール又はプロパノール中で、緩衝塩、例えば酢酸ナトリウムの存在で、カルボキシメトキシルアミンと反応させて、カルボキシメチルオキシムを得てよい。このオキシムを、免疫原キャリアー、例えば、制限されることなく、ウシ血清アルブミン、チログロブリン、オバルブミン、フィブリノーゲン又はキーホールリンペットヘモシアニンであってよい高分子量タンパク質に連結してよい。一例として、タンパク質はキーホールリンペットヘモシアニンである。

10

【0030】

一例として、タクロリムスと高分子量タンパク質との接合体の製造方法は、以下である：
（1）前記のようなタクロリムスのカルボキシメチルオキシムの製造；
（2）カルボキシメチルオキシムを活性化させて、反応性N-ヒドロキシスクシンイミドエステルを製造すること；及び
（3）N-ヒドロキシスクシンイミドエステルと高分子量タンパク質とを反応させて接合体を製造すること。カルボキシメチルオキシムを活性化してN-ヒドロキシスクシンイミドエステルを製造することを、例えば、カップリング剤、例えば水溶性カルボジイミド、例えば3-(3-ジメチルアミノプロピル)-1-エチル-3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミドヒドロクロリド(EDAC)を使用することによって実施する。

20

【0031】

他の例として、タクロリムスのC19～C27内の炭素原子で誘導されたタクロリムスの接合体は、プロモアセチル誘導体である。タクロリムスのプロモアセチル誘導体の製造は、
（1）タクロリムスとカルボキシメトキシルアミンとを反応させてタクロリムスのカルボキシメチルオキシム誘導体を製造すること、
（2）カルボキシメチルオキシムを活性化させて、反応性N-ヒドロキシスクシンイミドエステルを製造すること、及び
（3）N-ヒドロキシスクシンイミドエステルとプロモアセチルエチレンジアミンのトリフルオロ酢酸塩とを反応させてプロモアセチル誘導体を製造することを含む。この方法において使用されるカルボキシメチルオキシム誘導体を前記のように製造する。かかるプロモアセチル誘導体を使用して、プロモアセチル成分とタンパク質のスルフヒドリル基とを反応させることによって、タクロリムスのタンパク質接合体を製造することができる。

30

【0032】

14位のモノクローナル抗体を、次のスクリーニング法によって同定してよい：抗体クローンの結合部位を、種々のタクロリムス誘導体、例えば代謝物及び免疫原へのその結合特性に基づいて同定した。14位を、以下に基づく14H04クローンについての結合部位として同定した：
（a）使用した免疫原は、タクロリムスのC22ケト基を介して連結した免疫原キャリアータンパク質を有し、
（b）タクロリムスC22オキシムは、抗体結合がC22位の付近で生じない（代わりにその領域が抗体結合を中断しない）ことを示すモノクローナル抗体14H04への強い結合を示し、
（c）タクロリムスC32カルバメート化合物が、モノクローナル抗体14H04及び抗体結合を徹底的に減少させたC31メトキシ基の脱メチル化を含む代謝物を結合せず（その双方は、14H04がC29～34環を結合することを示す）、及び
（d）15-O-デメチルタクロリムスとの非交差反応は、14H04がC15隣接部位に結合する（代わりに、15-O-メチル基が、抗体の結合能力を除去した）ことを示す。

40

50

【0033】

12位に方向付けられたモノクローナル抗体を、タクロリムスのC29～C34位における位置でタクロリムスを直接結合によって又は連結基を介して免疫原キャリアーに連結する免疫原から製造してよい。連結基及び連結のための方法は、タクロリムスのC19～C27位における部位を介した連結について前記している。一例として、成分を、ヒドロキシル基を使用してタクロリムス分子のC32位を介してタクロリムスに連結させる。

【0034】

12位についてのモノクローナル抗体を、次のスクリーニング法によって同定してよい。12位を、次に基づいて1E2クローンに対しての結合領域として同定した：(a)使用した免疫原を、C32位を介して連結し、そして代わりにC32(例えばタクロリムスC32カルバメート化合物)は、モノクローナル抗体1E2の結合を変更せず、(c)1E2は、タクロリムスのC32エステル誘導体に100%結合し、かつ(d)代わりにC31メトキシ基(31-O-デスメチル)は、モノクローナル抗体1E2の結合を減少しない。前記の全ては、モノクローナル抗体1E2が、タクロリムスのC29～C34環を結合しないことを示す。C24に連結するヒドロキシル基の改質は、モノクローナル抗体1E2のタクロリムスへの結合を弱めた。タクロリムスC22オキシム化合物は、1E2に結合せず、モノクローナル抗体1E2がタクロリムスのC22～C24位に結合する個を示す。C13メチル基の代わりは、M1(13-O-デスメチル)及びMVI(13,31ジデスメチル)の場合におけるように、タクロリムスのモノクローナル抗体1E2の結合を除去し、モノクローナル抗体1E2がタクロリムスのC13位に結合することを示した。

10

20

【0035】

前記の点で、モノクローナル抗体1E2及び14H04は、タクロリムス薬のためのサンドイッチアッセイを可能にするタクロリムス分子上で別々の結合領域を有する。

【0036】

ACMIAアッセイフォーマットによるタクロリムス誘導体の測定を、次の方法に従って実施した。代謝物を、Isotechnika Pharma Inc (Alberta, Canada)及びコロラド州デンバーのコロラド大学のDr. Christians Laboratoryから得た。タクロリムス誘導体化合物、例えば免疫原を、Siemens AG (Glasgow, DE)から得た。代謝物及び免疫原交差反応を、米国特許番号第7,186,518号(参照をもって本明細書に組み込まれたものとする)において記載されたACMIA方法を使用して測定した。簡単に、双方のクローンを、公知の技術に従って、標準のヘテロ二官能SMCC(スクシンイミジルトランス-4-(N-マレイミジルメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート)リンカーを使用して-ガラクトシダーゼに接合させた。クロム粒子(免疫アッセイ固相)を、タクロリムス類似体をウシ免疫グロブリンに、そして二酸化クロム粒子を被覆したポリアルデヒドデキストランに接合することによって製造した。モノクローナル抗体14H04のために使用したタクロリムス類似体は、タクロリムスC22オキシム化合物であった。モノクローナル抗体1E2のために使用した類似体は、二酸化クロム粒子を被覆した抗蛍光抗体上で固定したタクロリムスC32蛍光誘導体であった。交差反応を、添加した代謝物及び他のタクロリムス誘導体、例えば免疫原を含む試料を試験することによって検出した。添加した代謝物を含む試料から得られたアッセイシグナルを、タクロリムス標準を含む試料から得られたシグナルと比較した。交差反応を、添加した代謝物の濃度によって見かけのタクロリムス濃度を割り、そしてパーセンテージとして結果を示すことにより測定した。

30

40

【0037】

本明細書において記載されている原理に従ったサンドイッチアッセイが、1つ以上の他の前記モノクローナル抗体試薬を使用する比較アッセイと比較して、タクロリムスの代謝物と低い交差反応を呈することを注意すべきである。サンドイッチアッセイにおいて、代謝物は、双方の抗体に結合して、交差反応を呈する必要がある。代謝物が1つの抗体のみに結合し、他に結合しない(又は他への弱い結合を有する)場合に、アッセイシグナルは

50

生じず、かつ従って非交差反応を示す。代謝物が抗体への100%の結合を示すが、他への弱い結合（例えば30%）を有する場合に、アッセイによって測定された交差反応性は、弱い結合である（すなわち30%）。さらに、代謝物が一方の抗体への低い結合（例えば40%）を示し、かつ他へのさらに弱い結合（例えば20%）を有する場合に、サンドイッチアッセイにおける交差反応は、より弱い結合である（前記例において、 $40\% \times 20\% = 8\%$ ）。交差反応の研究において、2つの抗体、1E2及び14H04は、代謝物M1 13-O-デスメチルタクロリムス、MII 31-O-デスメチルタクロリムス、MIII 15-O-デスメチルタクロリムス、MIV 12-OH-タクロリムス、M-VI 13, 31-O-ジデスメチルタクロリムス、及びM-VII 15, 31-O-ジデスメチルタクロリムスとの、種々の交差反応プロフィールを呈する。サンドイッチアッセイにおいて測定された交差反応は、代謝物へのより低い結合を呈する抗体と同等か又は低くあるべきである。

10

【0038】

免疫抑制薬のためのアッセイの一般記載

前記のように、本明細書において記載された原理に従った例は、免疫抑制薬を含んでいる疑いのある試料における免疫抑制薬の測定のためのサンドイッチアッセイを可能にする。サンドイッチアッセイにおいて、2つのモノクローナル抗体を使用し、それぞれ、同時に免疫抑制薬分子の別々の領域に結合して、免疫複合体を形成する。免疫複合体の検出は、試料中の免疫抑制薬の測定を可能にする。

20

【0039】

試験されるべき試料は、通常生物学的試料である。“生物学的試料”の語句は、あらゆる生物学的材料、例えば血液、体液、身体化合物及び媒体をいう。該試料は、あらゆる源からの固体、半固体、又は流体（液体又はガス）であってよい。いくつかの実施態様において、試料は、身体排出物（body excretion）、身体吸引物（body aspirant）、身体摘出物（body excisant）、又は身体抽出物（body extractant）であってよい。身体は、通常、哺乳動物であり、ある実施態様において、身体はヒトである。身体排出物は、身体から排出された（しかし、切除又は摘出によって得られてもよい）物質、例えば、尿、大便、糞、腔粘膜、精液、呼吸、汗、水疱液及び炎症性浸出物である。身体摘出物は、身体から摘出材料、例えば、皮膚、髪、及び臓器及び他の身体の部位からのバイオプシーを含む組織試料である。身体吸引物は、身体から吸引された材料、例えば粘液、唾液及び痰である。身体抽出物は、身体から抽出された材料、例えば全血、血漿、血清、髄液、脳脊髄液、リンパ液、滑液及び腹膜液である。ある例において、試料は、全血、血漿又は血清である。

30

【0040】

アッセイの前に又はアッセイ中のある段階で、試料を、1つ以上前処理して、細胞を溶解及び/又は内在性結合物質から免疫抑制薬を放出してよい。溶解細胞を、赤血球の膜の完全性を破壊して、それによって細胞の細胞内含有物を放出する化合物又は化合物の混合物である、溶血剤の使用によって得てよい。溶血剤は、制限されることなく、例えば、非イオン性洗浄剤、アニオン洗浄剤、両親媒性洗浄剤、低イオン濃度水溶液（低張液）、細菌剤、及び完全な依存性溶解を生じる抗体を含む。

40

【0041】

溶血剤として使用してよい非イオン性洗浄剤は、合成洗浄剤及び天然洗浄剤の双方を含む。合成洗浄剤の例は、TRITON™X-100、TRITON™N-101、TRITON™X-114、TRITON™X-405、TRITON™SP-135、TWEEN（登録商標）20（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート）、TWEEN（登録商標）80（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノオレート）、DOWFAX（登録商標）、ZONYL（登録商標）、ペンタエリトリルパルミテート、ADOGEN（登録商標）464、ALKANOL（登録商標）6112界面活性剤、アシルアルコール1,2-ブトキシレート-ブロック-エトキシレートHLB6、BRIJ（登録商標）、エチレンジアミンテトラキス（エトキシレート-ブロック-プロボキシレ

50

ート)テトロール、IGEPA L (登録商標)、MERPOL (登録商標)、ポリ(エチレングリコール)、2-[エチル[(ヘプタデカフルオロオクチル)スルホニル]アミノ]エチルエーテル、ポリエチレン-ブロック-ポリ(エチレングリコール)、ポリオキシエチレンソルビタンテトラオレート、ポリオキシエチレンソルビトールヘキサオレート、TERGITOL (登録商標) NP-9、GAFAC (登録商標)(RHODAFAC (登録商標)、アルキルポリオキシエチレングリコールホスフェートエステル、例えば、アルファ-ドデシル-オメガ-ヒドロキシポリ(オキシ-1,2-エタンジイル)ホスフェート)、及びEP110 (登録商標)等を含む。溶血剤として使用してよい天然に生じる洗浄剤は、例えば、サポニン、ナトリウム又はカリウム中和脂肪酸、中和リン脂質、ジアシルグリセロール、中和ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸塩、蛛和ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルコリン、胆汁酸塩、非エステル化コレステロール、中和スフィンゴシン、セラミド等を含む。1つ以上の合成洗浄剤又は1つ以上の天然に生じる洗浄剤の組合せ、及び合成洗浄剤と天然に生じる洗浄剤との組合せを使用してもよい。

10

20

30

40

50

【0042】

使用される溶血剤の性質及び量又は濃度は、試料の1つ以上の性質、例えば免疫抑制薬の性質、試薬化合物の残りの性質、及び反応条件に依存する。溶血剤の量は、少なくとも、赤血球の溶解を生じて細胞の内容物を放出するために十分である。ある例において、溶血剤の量は、例えば、約0.0001%~約0.5%、約0.001%~約0.4%、約0.01%~約0.3%、約0.01%~約0.2%、約0.1%~約0.3%、約0.2%~約0.5%、又は約0.1%~約0.2%(パーセントは質量/体積である)である。

【0043】

放出剤は、内在性結合成分から免疫抑制薬を置き換える化合物又は化合物の混合物である。放出剤は、多くの場合に、内在性結合成分から免疫抑制薬の代謝物を置き換えることができる。多くの例において、放出剤は、内在性結合タンパク質への高い結合親和性を有し、従って、免疫抑制薬及びその代謝物を、所望の場合に、内在性結合タンパク質から容易に置き換える。さらに放出剤は、アッセイにおいて使用される薬物のためのモノクローナル抗体に任意の有意な程度まで結合しない。“任意の有意な程度まで結合しない”の語句に関しては、結合の程度が十分に低くあるべきであり、その結果薬物のための正確な圧政を実施できることを意味する。従って、放出剤は、任意の成分、アッセイ抗体への有意な結合を有さない置換の所望の結果を達成するシグナル化合物又は化合物の混合物であってよい。

【0044】

ある例において、放出剤は、免疫抑制薬の構造類似体を含む類似体である。免疫抑制薬類似体は、結合タンパク質から類似免疫抑制薬を置き換えることができるが、免疫抑制薬のためのモノクローナル抗体について任意の実質的な程度まで競合しない改質薬物である。改質は、免疫抑制薬類似体を他の分子に接合することによって提供する。一例として、免疫抑制薬類似体は、例えば、連結基を介して他の分子に接合される免疫抑制薬であってよい。ヒドロキシ又はカルボン酸官能基を含有する免疫抑制薬について、放出剤は、検出されるべき免疫抑制薬に関連する内在性結合タンパク質についての高い結合親和性を有し、かつ免疫抑制薬について有意な結合親和性を有さない免疫抑制薬のエステルであってよい。例えば、タクロリムスについての測定において、タクロリムスのエステルを、前記要求を満たす限り放出剤として使用してよい。構造類似体は、免疫抑制薬と、同様又は類似した構造又は空間的特徴を有する成分であり、その結果、構造類似体は、免疫抑制薬の類似体と同一又は類似の結果を得る。構造類似体は、例えば、免疫抑制薬に関連する他の化合物であってよい。例えば、タクロリムスについての測定において、シロリムスのエステルを、放出剤として使用してよい。前記エステルは、例えば、C₁~C₆カルボン酸のカルバメート、カーボネート、エステルなどであってよい。例えば、米国特許番号第7,186,518号(参照をもって本明細書に組み込まれたものとする)を参照。放出剤の他の

例は、シクロスポリンAのための[Thr₂、Leu₅、D-Hiv₈、Leu₁₀]-シクロスポリンA、シロリムスのためのFK506、FK506のためのシロリムス等を含む。例えば、米国特許番号第6,187,547号(参照をもって本明細書に組み込まれたものとする)を参照。

【0045】

媒体中の放出剤の濃度は、免疫抑制薬、及びある場合に免疫抑制薬の代謝物を、内因性結合成分から置き換えて、前記で議論した薬物のための抗体に結合しやすい薬剤及び代謝物にする、所望の結果を得るために十分である。使用される放出剤の量又は濃度は、試料の1つ以上の性質、例えば免疫抑制薬の性質、薬剤代謝物の性質、他の試薬化合物の性質、及び反応条件に依存する。ある実施態様において、放出剤の量は、例えば約0.000001%~約0.5%、約0.0001%~約0.4%、約0.001%~約0.3%、約0.01%~約0.2%、約0.1%~約0.3%、約0.2%~約0.5%、約0.1%~約0.2%等(パーセントは質量/体積である)である。

10

【0046】

アッセイは、任意のアッセイ成分又は生成物を分離せずに(相同)、又は分離して(異種)実施してよい、免疫アッセイである。相同又は異種アッセイを、一般に最適なアッセイ感受性を提供する中程度のpHで、水性緩衝媒体中で実施する。水性媒体は、単に水であってよく、又は助溶剤0.1~約40体積パーセントを含んでよい。媒体のためのpHは、通常、約4~約11の範囲、又は約5~約10の範囲、又は約6.5~約9.5の範囲であってよい。pHは、通常、モノクローナル抗体及び免疫抑制薬の最適な結合、及びアッセイのための他の試薬、例えばシグナル発生システムの要素のために最適なpHを折衷する。

20

【0047】

種々の緩衝液を、所望のpHを得るため及び測定中のpHを維持するために使用してよい。例示的な緩衝液は、ボレート、ホスフェート、カーボネート、トリス、バルビタール等を含む。使用される特定の緩衝液は、本発明に対して重要でないが、しかし個々のアッセイにおいて1つ以上の緩衝液を使用してよい。種々の補助材料を前記方法において使用してよい。例えば、緩衝液に加えて、媒体は、媒体のための及び使用した試薬のための安定剤を含んでよい。しばしば、これらの添加剤に加えて、タンパク質、例えばアルブミン;有機溶剤、例えばホルムアミド;四級化アンモニウム塩;ポリアニオン、例えばデキストランスルフェート;界面活性剤、特に非イオン性界面活性剤;結合増強剤、例えばポリアルキレングリコールを含んでよい。

30

【0048】

1回以上のインキュベーション期間を、前記種々の試薬の添加の間のあらゆる合間を含む1回以上の合間で媒体に適用してよい。媒体を、通常、試薬の種々の成分の結合のために十分な温度で、及び時間でインキュベートして生じてよい。中温を、通常、前記方法を実施するために使用してよく、通常、測定中に一定の温度、有利には室温である。インキュベーション温度は、約5~約99、又は約15~約70、又は約20~約45の範囲である。インキュベーションのための時間は、約0.2秒~約6時間、又は約2秒~約1時間、又は約1~約5分である。時間は、媒体の温度、及び会合定数速度、濃度、結合定数及び解離速度定数によって測定される種々の試薬の結合速度に依存する。測定中の温度は、約10~約50、又は約15~約40の範囲である。

40

【0049】

アッセイされてよい免疫抑制薬分析物の濃度は、一般に、約 10^{-5} ~約 10^{-17} M、又は約 10^{-6} ~約 10^{-14} Mまで変動する。アッセイが質的、半量的又量的(試料中に存在する分析物の量に関連する)であるかどうかのような考察、特定の検出技術及び分析物の濃度は、通常、種々の試薬の濃度を測定する。

【0050】

アッセイ媒体中の種々の試薬の濃度は、一般的に、関心のある免疫抑制薬分析物の濃度範囲によって測定される。しかしながら、それぞれの試薬の最終濃度は、通常、範囲を超

50

えたアッセイの感受性を最適化するために経験的に測定される。すなわち、有意性のある分析物の濃度における変異は、正確に測定できるシグナルの差を提供すべきである。考察、例えばシグナル発生システムの性質、及び免疫抑制分析物の性質は、通常、種々の試薬の濃度を測定する。

【0051】

添加の順序を広く変動してよい一方で、アッセイの性質に依存する確かな性能がある。添加の単純な順序は、同時に全ての材料を添加すること、及びアッセイ媒体が相同アッセイにおけるようなシグナルで有する効果を測定することである。代わりに、試薬を順次合わせることができる。場合により、インキュベーション工程を、前記で定義したようにそれぞれ添加した後に含んでよい。

10

【0052】

前記で議論したアッセイにおいて、1つ以上のラベルを使用してよく、該ラベルは、通常、シグナル発生システム(“sps”)の一部である。ラベルの性質は、特定のアッセイ形式に依存する。spsは、通常、1つ以上の成分を含み、少なくとも1つの成分は検出可能なラベルであり、それは、結合した及び/又は結合していないラベルの量、すなわち、検出される免疫抑制薬に結合した又は結合していないラベルの量に、又は検出されるべき免疫抑制薬の量を反映する作用剤に関連する検出可能なシグナルを生じる。ラベルは、シグナルを製造する、又はシグナルを製造するために含んでよいあらゆる分子であり、例えば蛍光体、放射性同位元素識別、酵素、化学ルミネセンス又は光増感剤であってよい。従って、シグナルは、場合によっては、酵素活性、蛍光性、光吸収又は放射活性を検出することによって検出及び/又は測定される。

20

【0053】

適したラベルは、例証のため及び制限されずに、酵素、例えば - ガラクトシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、グリコール - 6 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ(“G6PDH”)及びホスラディッシュペルオキシダーゼ; リボザイム; レプリカーゼのための物質、例えばQBレプリカーゼ; プロモーター; 染料; 蛍光剤、フルオレセイン、イソチオシアネート、ローダミン化合物、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルデヒド、及びフルオレスカミン; 複合体、例えば量子ドットとして公知の半導体ナノ結晶において存在するCdSe及びZnSから製造されるもの; 化学ルミネセンス、例えばイソルミノール; 増感剤; 補酵素; 酵素基質; 放射性同位元素識別、例えば¹²⁵I、¹³¹I、¹⁴C、³H、⁵⁷Co及び⁷⁵Se; 粒子、例えばラテックス粒子、炭素粒子、磁性粒子を含む金属粒子、例えばクロム粒子等; 金属ゾル; 晶子; リポソーム; 細胞等を含み、さらに染料、触媒又は他の検出可能な基であってよい。適した酵素及び補酵素は、Litman, et al., 米国特許番号第4,275,149号、19~28段落、及びBoguslaski, et al., 米国特許番号第4,318,980号、10~14段落において開示されており、適した蛍光剤及び化学ルミネセンスは、Litman, et al., 米国特許番号第4,275,149号、30及び31段落において開示されており、参照をもって本明細書に組み込まれたものとする。

30

【0054】

ラベルは、シグナルを直接生じ、従って、追加の成分を、シグナルを生じるために要求しない。多くの有機分子、例えば蛍光剤は、紫外線及び可視光を吸収することができ、光吸収は、これらの分子にエネルギーを移し、それらを励起したエネルギー状態まで高める。そして、これらの吸収したエネルギーを、第二波長での光の放出によって散らす。直接シグナルを生じる他のラベルは、放射活性同位体及び染料を含む。

40

【0055】

代わりに、ラベルは、シグナルを生じる他の成分を要求してよく、そしてシグナル発生システムは、測定可能なシグナルを製造するために要求される全ての成分を含む。かかる他の成分は、基質、補酵素、増強剤、追加の酵素、酵素生成物と反応する基質、触媒、活性剤、補因子、阻害剤、捕捉剤、金属イオン、及びシグナルを生じる物質の結合のために要求される特異結合物質を含んでよい。適したシグナル発生システムの詳細な議論は、U

50

Ilman, et al.、米国特許番号第5,185,243、11~13段落(参照をもって本明細書に組み込まれたものとする)において見いだせる。

【0056】

ラベル又は他のsps種又は1つ以上のモノクローナル抗体を、支持体に結合してよい。モノクローナル抗体は、当業者に公知の任意の方法で個体支持体に結合してよいが、ただし結合は、実質的に免疫抑制薬の領域と結合する能力を邪魔しない。ある例において、ラベル又は他のsps種又はモノクローナル抗体を、直接固相被覆又は共有結合してよく、又は1つ以上のキャリアー分子、例えばタンパク質、例えば血清アルブミンもしくは免疫グロブリンを含むポリ(アミノ酸)、又は多糖(炭水化物)、例えばデキストランもしくはデキストラン誘導体の層を有してよい。連結基を、固体支持体及び連結されるべき成分を共有的に連結するために使用してもよい。連結基は、免疫抑制薬分子への免疫原の連結についての前記1つであってよい。支持体への結合の他の方法を使用してもよい。例えば、固体支持体は、小分子、例えばアビジン又は抗体のためのバインダーのコーティングを有してよく、その際、小分子、例えばビオチン又はハプテンを、連結されるべき成分に結合してよく、又はその逆である。成分の支持体表面への結合は、直接又は非直接、共有又は非共有であってよく、かつ通常文献において得られる、よく知られている技術によって得られてよい。例えば、“Immobilized Enzymes”、Ichiro Chibata、Halsted Press、New York(1978)及びCautrecasas、J. Biol. Chem.、245:3059(1970)を参照。

10

20

【0057】

支持体は、透明又は部分的に透明であってよい、有機又は無機の固体又は液体、水不溶性材料から構成されてよい。支持体は、任意の数の形状、例えばビーズ、フィルム、膜、管、ウェル、ストライプ、棒状、平面状表面、例えばプレート、 dendrimer等を含む粒子を有してよい。アッセイのタイプに依存して、支持体は、使用される媒体中で懸濁されてよく、又は懸濁してはいけない。懸濁可能な支持体の例は、例証のためであり、制限されることなく、ポリマー材料、例えばラテックス、脂質二重層又はリポソーム、油状液滴、細胞及びヒドロゲル、及び磁性粒子である。他の支持体組成物は、例えば、ニトロセルロース、セルロースアセテート、ポリ(ビニルクロリド)、ポリアシルアミド、ポリアクリレート、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ(4-メチルブテン)、ポリスチレン、ポリメタクリレート、ポリ(エチレンテレフタレート)、ナイロン、ポリ(ビニルブチレート)を含み、それ自体で使用され、又は他の材料と接合して使用する。

30

【0058】

支持体は粒子であってよい。粒子は、少なくとも約0.02ミクロン及び多くても約100ミクロンの平均直径を有するべきである。ある実施態様において、粒子は、約0.05ミクロン~約20ミクロン、又は約0.3ミクロン~約10ミクロンの平均直径を有する。粒子は、有機又は無機の、膨潤又は膨潤しない、多孔質又は多孔質でない、有利には水に近い、一般に約0.7g/mL~約1.5g/mLの密度であってよく、かつ透明、部分的に透明又は不透明であってよい材料から構成される。粒子は、生物学的材料、例えば細胞及び微生物、例えば赤血球、白血球、リンパ球、ハイブリドーマ、連鎖球菌、黄色ブドウ球菌及び大腸菌、ウイルスであってよい。粒子は、有機及び無機ポリマー、リポソーム、ラテックス粒子、磁気又は磁気でない粒子、リン脂質小囊、キロミクロン、リポタンパク質等から構成される粒子であってよい。ある例において、粒子は、クロム粒子又はラテックス粒子である。

40

【0059】

ポリマー粒子を、追加の又は集合ポリマーから形成してよい。粒子は、水性媒体中で容易に分散可能であり、かつ吸着性又は官能化可能であってよく、直接又は非直接的に連結基を介して免疫抑制薬のためのモノクローナル抗体に接合を可能にする。連結基は、免疫抑制薬分子への免疫原の連結のための前記の1つであってよい。粒子は、自然に生じた材料、合成的に改質した自然に生じた材料、合成材料にも由来してよい。特に関心のある

50

有機ポリマーは、多糖、特に架橋多糖、例えば *Sepharose* として入手できるアガロース、*Sephadex* 及び *Sephacryl* として入手できるデキストラン、セルロース、デンプン等；追加のポリマー、例えばポリスチレン、ポリビニルアルコール、ホモポリマー、及びアクリレートとメタクリレートの誘導体のコポリマー、特定のエステル及び遊離ヒドロキシ官能基を有するアミドである。

【0060】

ラベル及び/又は他の *s p s* 種を、2つの異なるモノクローナル抗体の1つ又は双方に結合してよい。ラベルの *s b p* 種への結合を、ラベルの水素原子をモノクローナル抗体への結合に置き換えることをもたらす化学反応によって得てよく、又はラベルとモノクローナル抗体との間に連結基を含んでよい。連結基は、免疫抑制薬分子への免疫原の連結のための前記の1つであってよい。他の *s p s* 種を、モノクローナル抗体に共有的に結合してもよい。例えば、他の *s p s* 種、例えば蛍光剤及び消光剤は、それぞれ、モノクローナル抗体に結合してよく、その際蛍光剤は一方のモノクローナル抗体に結合し、かつ消光剤は、他方のモノクローナル抗体に結合する。2つの異なるモノクローナル抗体が免疫抑制薬に結合する場合に、サンドイッチ複合体の形成は、近くに蛍光剤及び消光剤をもたらす、従って消光剤を蛍光剤と相互作用させてシグナルを生じる。接合の方法は当業者によく知られている。例えば、*Rubenstein, et al.*、米国特許番号第3,817,837号(参照をもって本明細書に組み込まれたものとする)を参照。

10

【0061】

ラベルタンパク質として特に関心のある酵素は、酸化還元酵素、特にデヒドロゲナーゼ、例えばグルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、ラクターテデヒドロゲナーゼ等、及び染料前駆体を染料に酸化するための過酸化水素の製造及び過酸化水素の使用を含む酵素である。特定の組合せは、制限されることなく、糖オキシダーゼ、例えばグルコース及びガラクトースオキシダーゼ、又は染料前駆体を酸化するために過酸化水素を使用する酵素と結合した複素環式オキシダーゼ、例えばウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ、すなわちペルオキシダーゼ、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ、ラクトペルオキシダーゼ又はミクロペルオキシダーゼを含む。追加の酵素の組合せは当業者に公知である。シグナル酵素をラベルとして使用する場合に、他の酵素、例えばヒドロラーゼ、トランスフェラーゼ、及びオキシドレダクターゼ、有利にはヒドロラーゼ、例えばアルカリホスファターゼ及びベータ-ガラクトシダーゼの使用を見いだしてよい。代わりに、ルシフェラーゼ、例えばホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼを使用してよい。

20

30

【0062】

使用を見いだせる例示的な補酵素は、*NAD[H]*、*NADP[H]*、ピリドキサル、ホスフェート、*FAD[H]*、*FMN[H]*等を含み、通常補酵素はサイクル反応を含む。例えば、米国特許番号第4,318,980号(参照をもって本明細書に組み込まれたものとする)を参照。

【0063】

シグナル発生システムの活性化は、シグナル発生システム膜の性質に依存する。光で活性化されるシグナル発生システムの種類については、光で照射される。粒子の表面上であるシグナル発生システムの種類については、塩基の添加が活性化をもたらしてよい。他の活性化法は、本明細書における開示の点で当業者に示唆されている。いくつかのシグナル発生システムについて、活性化のための作用剤は、ラベル、すなわち放射活性ラベル、酵素を含むかかるシステムを必要とする。酵素システムについて、基質の添加及び/又は補因子が必要であってよい。

40

【0064】

シグナルの存在及び量についての試験は、一般に単にシグナルを読む工程である、シグナルの検出も含む。シグナルは、通常、装置を使用して読まれ、その性質は、シグナルの性質に依存する。装置は、分光光度計、蛍光測定器、吸収分光計、照度計、化学照度計、光量計、写真装置等であってよい。検出されるシグナルの存在及び量は、試料中に存在するシロリムスの存在及び量に関連する。測定中の温度は、約10 ~ 約70、又は約2

50

0 ~ 約 45、又は約 20 ~ 約 25 の範囲であってよい。1つのアプローチにおいて、標準曲線を、スクリーニングされる解析物の公知の濃度を使用して作成する。前記のように、校正器及び他の対照を使用してもよい。

【0065】

“免疫抑制薬の量を測定”の語句は、免疫抑制薬の量的、半量的及び質的測定をいう。量的、半量的及び質的である方法、並びに免疫抑制薬を測定するための他の方法は、免疫抑制薬の量を測定するための方法であると考えられる。例えば、単に免疫抑制薬を含有する疑いのある試料中で免疫抑制薬の存在又は不在を検出する方法は、本開示の範囲内に含まれると考えられる。“検出”及び“測定”の用語、並びに測定のための通常の種類語は、本開示の範囲内と考えられる。

10

【0066】

本明細書において記載された原理に従った一例において、免疫抑制薬の領域に特異的なモノクローナル抗体の1つを、支持体に結合し、かつ他のモノクローナル抗体が結合する免疫抑制薬の領域とは空間的に分けた免疫抑制薬の領域に特異的な他のモノクローナル抗体を、s p s種、例えばラベルに結合する。免疫抑制薬を含む疑いのある試料を、適した媒体中で2つの接合したモノクローナル抗体及び媒体と組合せて、媒体をインキュベートする。そして、媒体を、2つの異なるモノクローナル抗体及び試料からの免疫抑制薬によって形成された免疫複合体の存在及び量の一方又は双方について試験する。支持体を、試験前に媒体から分離してよく、又は分離してはいけない。免疫複合体の存在及び/又は量を、媒体中の又は支持体上のラベルの存在及び/又は量を測定することによって測定する。

20

【0067】

1つの特定の例において、キャプチャアッセイを使用する。このアッセイ形式において、1つのモノクローナル抗体を、磁性粒子、例えばクロム(二酸化クロム)粒子に共有結合する。試料を、この粒子でインキュベートし、試料中の免疫抑制薬を磁性粒子上でモノクローナル抗体に結合させる。続いて、酵素、例えば -ガラクトシダーゼに接合した二次モノクローナル抗体を、磁性粒子とインキュベートする。磁石の適用及び磁性粒子の洗浄後に、磁性粒子に結合した酵素の量を測定し、そしてそれは、試料中の免疫抑制薬の存在及び/又は量に直接関連する。このアプローチにおいて、レポーター酵素の基質を、最終反応容器に添加し、そして酵素活性を、経時的な不在への変化として分光光度的に測定する。

30

【0068】

代替のアプローチにおいて、磁性粒子試薬を過剰量で、すなわち、試料中に存在しうる全ての免疫抑制薬を結合するために要求されるよりも多い量で添加する。そして、磁石を適用して、磁性粒子を媒体から分離し、そして磁性粒子を洗浄し、そしてアッセイ媒体中で再懸濁する。二次モノクローナル抗体に接合した酵素を添加し、そして媒体をインキュベートし、前記のようにシグナル検出する。

【0069】

他の例において、例証のため及び制限なく、それらに関連する、例えばそれらへの導入又はそれらへの付着によって化学発光化合物を含む、化学発光粒子を使用する。免疫抑制薬のためのモノクローナル抗体の1つを、粒子に、例えば粒子を被覆する多糖の仲介を介して結合する。免疫抑制薬に結合する他のモノクローナル抗体は、ビオチン接合体の一部である。ストレプトアビジンを、それらに関連する光感受性を有する粒子の第二のセットに接合する。化学発光粒子を、免疫抑制薬を含む疑いのある試料及び光増感剤粒子と混合する。反応媒体をインキュベートして、モノクローナル抗体の免疫抑制薬への結合によって粒子を免疫抑制薬に結合させる。そして、媒体を、光で照射して光増感剤を励起させ、その励起した状態で、シングレット状態まで酸素を活性化することができる。粒子のセットの1つの化学発光化合物が現在免疫抑制薬の存在によって光増感剤に近いために、それは、シングレット酸素によって活性化され、そして発光を放出する。そして、媒体を、放出された発光又は光の存在及び/又は量について試験し、その際それらの存在は、試料中

40

50

の免疫抑制薬の存在及び／又は量に関連する。

【0070】

アッセイを導入するためのキット

特定のアッセイを導入するための試薬が、免疫抑制薬分析物の測定のためのアッセイを簡便に実施するために有用なキットにおいて存在してよい。一例において、キットは、分析物、特定のアッセイ形式に依存する性質について分析するためのパッケージ化された組合せ試薬を含む。試薬は、例えば、ラベル又は支持体に接合してよい、本明細書において記載された原理に従った2つ以上のモノクローナル抗体を含んでよい。試薬はそれぞれ別々の容器にあってよく、又は種々の試薬を、交差反応及び試薬の安定性に依存して2つ以上の容器中で合してよい。さらに、キットは、アッセイを導入するための他の別々パッケージ化した試薬、例えば追加の結合膜及び補助試薬を含んでよい。

10

【0071】

キット中の種々の試薬の相対量は、前記方法中に生じ、かつさらに実質的にアッセイの感受性を最適化するために必要である反応を実質的に最適化する試薬の濃度について提供するために広く変動してよい。適した状況下で、キット中の1つ以上の試薬を、付形剤を含む通常凍結乾燥させた乾燥粉末として提供してよく、溶解して、方法又はアッセイを実施するために適した濃度を有する試薬溶液を提供する。該キットは、さらに、前記のように本実施態様に従った方法の記載された記述を含む。

【0072】

本明細書において使用される“少なくとも”の語句は、特定の品目の数が、挙げられた数と同等又はそれ以上であってよいことを意味する。本明細書において使用される“約”の語句は、挙げられた数が、プラス又はマイナス10%だけ異なってよいことを意味し、例えば、“約5”は、4.5～5.5の範囲を意味する。“一次”及び“二次”の名称は、完全に任意であり、前記用語、例えば“一次及び二次モノクローナル抗体”又は“一次モノクローナル抗体”及び“二次モノクローナル抗体”に関連する群のあらゆる種類の任意の順序又はランキングを示唆することを意味しない。

20

【0073】

次の実施例は、さらに、例証のため及び制限のない本発明の特定の実施態様を記載し、かつ本発明の範囲の記載を意図し及び範囲の限定を意図しない。本明細書において開示されている部及びパーセンテージは、特に示されていない限り、体積である。

30

【0074】

実施例

全ての化学物質を、特に記載されていない限りSigma - Aldrich Company (St. Louis MO) から得た。タクロリムスを、Astellas Pharma US, Inc., (Deerfield, IL) から得た。

【0075】

試験を、Siemens AG (Newark DE) から得たDIMENSION (登録商標) R x L分析器を使用して実施した。装置を、サンドイッチ免疫アッセイ形式を有する酵素検出システムを使用して実施した。本明細書において使用された及び以下でより詳細に記載されたサンドイッチ法の実施態様において、酵素(接合体)に接合したラベルした抗体(Ab)と患者試料中のタクロリムス薬(TACRO)との間の結合、及び続く、クロム粒子上での得られた免疫複合体のキャプチャ抗体との結合は、患者試料中のタクロリムスの量で測定した。未結合のタグ抗体酵素接合体を、自動的に3～4回混合/洗浄することによって及び磁気分離サイクルによって取り出した。クロム粒子上に残っている接合体からの酵素活性を測定し、そして患者試料中のタクロリムスの量に直接比例した。

40

【0076】

実施例1

自動化ACMIAサンドイッチアッセイを使用したタクロリムスの測定

タクロリムス-キーホールリンペットヘモシアニン接合体の製造。無水ジメチルホルムアミド1.05 mL中でタクロリムスモノオキシム(32.3 mg、36.8 μmol)

50

に、1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドヒドロクロリド (E D A C) (1 1 m g 、 5 7 . 4 μ M 、 1 . 5 当量) 及び N - ヒドロキシスクシニミド (7 . 3 m g 、 6 3 . 4 μ M 、 1 . 7 当量) を添加した。連結をタクロリムス分子の C 2 2 位で実施した。反応物を、アルゴン下で 1 時間室温で撹拌した。そして、その混合物を、シリンジを介して、キーホールリンペットヘモシアニン (7 4 m g 、 5 4 % 純度) のリン酸緩衝食塩水 (0 . 1 M 、 p H 8 . 0) 及びジメチルホルムアミド 0 . 2 5 m L の溶液に滴下した。室温で 2 時間の撹拌後に、得られた懸濁液を P B S (リン酸緩衝食塩水) (1 0 m M 、 p H 7 . 0) に対して透析した (1 \times 4 L 、 4 、 2 時間) 。

【 0 0 7 7 】

そして、得られた混合物を、メチレンクロリドで 3 回抽出して、あらゆる微量の未反応のタクロリムスモノオキシムを取り出した。その混合物の量的分析を、ピシンコニン酸 (B C A) タンパク質アッセイ溶液を使用して実施して、P B S (1 0 m M 、 p H 7 . 0) 8 m l 中で免疫原 5 0 m g を得た。

【 0 0 7 8 】

T N B S 法 (A . F . S . A . H a b e e b 、 A n a l . B i o c h e m . 1 4 : 3 2 8 (1 9 6 6)) を使用したハプテン数の測定は、1 3 0 0 個のハプテンの数を得た。免疫原を、直接、氷 - アセトン浴を使用して凍結し、貯蔵のために - 2 0 で維持した。

【 0 0 7 9 】

タクロリムスの 3 つの位置の異性体 (C 3 2 位で連結した K L H 、 C 2 4 で連結した K L H 、 C 3 2 位及び C 2 4 で連結した K L H) を含む免疫原混合物を、次のように製造した：丸底フラスコ中でタクロリムス (3 0 1 . 3 m g) を 1 . 5 時間真空で乾燥させた。そのフラスコに、撹拌バー、コハク酸無水物 (5 6 8 . 2 m g) 、 4 - (ジメチルアミノ) ピリジン (4 6 . 3 m g) 、ジクロロメタン (2 m L 、 無水物) 及びピリジン (2 . 0 9 3 m L) を添加した。その反応混合物を、室温 (2 4) で窒素雰囲気下で 2 4 . 5 時間撹拌した。3 種の位置の異性体は、この反応の生成物であった：タクロリムス - 3 2 - スクシネート、タクロリムス - 2 4 - スクシネート及びタクロリムス 2 4 , 3 2 - ジ - スクシネート。一度反応を止め、溶剤を、回転蒸発によって取り出し、そしてその生成物を、さらに真空ポンプによって 2 時間乾燥した。

【 0 0 8 0 】

バイアルに、前記からのタクロリムス - スクシネート混合物 (2 . 5 m g 、 2 . 8 μ m o l) 、 N - ヒドロキシスクシニイミド (1 . 0 m g 、 8 . 7 μ m o l) 及び無水アセトニトリル (2 5 0 μ L) を添加した。その混合物をキャップし、室温で撹拌した。撹拌混合物に、N , N - ジシクロヘキシルカルボジイミド (3 . 0 m g 、 1 5 μ m o l) を添加した。バイアルをキャップし、その混合物を室温で撹拌した。

【 0 0 8 1 】

2 時間後に、その混合物を乾燥状態まで蒸発した。得られた材料を、無水 N , N - ジメチルホルムアミド (2 5 0 μ L) 中で溶解した。これは、活性化 F K 5 0 6 - スクシネートの作業溶液であった。

【 0 0 8 2 】

2 0 m L バイアル中で、1 0 m M リン酸緩衝液 p H 8 の 8 m L 中で K L H (8 m g) 及び D M F (1 . 5 m L) を添加した。その混合物を、約 4 まで冷却し、前記からの作業溶液 2 0 0 μ L を、冷却した溶液に撹拌しながら滴加した。その混合物を、1 6 ~ 2 4 時間 4 で撹拌し、そして水で 3 0 m L まで希釈し、2 つの C E N T R I C O N (登録商標) 3 0 フィルターで脱塩し、そして 3 倍以上の新鮮な水で再構築した。最終材料を、水 1 0 m L で希釈した。タンパク質濃度を、B C A タンパク質アッセイ法によって測定した。

【 0 0 8 3 】

タクロリムスに対するモノクローナル抗体の製造。タクロリムス分子の別々の部位に結合するモノクローナル抗体を次ぎのように製造した。免疫原は、前記で製造したタクロリムス - キーホールリンペットヘモシアニン接合体であった。この免疫原を、B a l b / c マウスを免疫化するために使用した。最初の免疫化は、モノホスホリル脂質 A 及び腹腔内

10

20

30

40

50

の合成トレハロースジコリノミコレートアジュバント (R I B I M P L + T D M E m u l s i o n、R I B I I m m u n o C h e m R e s e a r c h I n c .、H a m i l t o n M T) を有する 200 μ l の体積中で 25 μ g であった。5 週間後の増加した免疫化は、モノホスホリル脂質 A 及び腹腔内の合成トレハロースジコリノミコレートアジュバントの 200 μ l 中で免疫原 25 μ g で得た。続いて、さらに 8 週間後に、前融合ブーストを、静脈内及び腹腔内で Hank ' s B l a n c e d S a l t S o l u t i o n 200 μ l 中で免疫原 25 μ g を得た。

【0084】

3 日後に、融合を、P 3 x 6 3 - A G 8 . 6 5 3 を設計する分泌しないマウスミエローマを使用する標準方法によって実施した。クローニングを、標準方法で実施した。

10

【0085】

クローンを、次のプロトコルに従った次の逆 E L I S A 免疫アッセイ法によってスクリーニングした。プレートを、ポリクローマルヤギ耐マウス I g G (I g G + I g A + I g M) (Z y m e d L a b o r a t o r i e s、S o u t h S a n F r a n c i s c o C A) で、5 μ g / m l で、ウェルごとに 100 μ l でのリン酸緩衝食塩水中で被覆した。プレート被覆を、2 時間以上室温で、又は一昼夜約 4 で実施し、そのプレートを、数日間約 4 でフィルムに巻いて貯蔵した。そのプレートを、そして軽く乾燥し、そしてブロッキング緩衝希釈液 (0 . 5 % 牛血清アルブミン、P B S 中で 0 . 0 5 % T W E E N (登録商標) 20) のウェルごとに 300 μ l でブロックした。プレートブロッキングを、15 分間以上、室温で、プレートを攪拌しながらインキュベートした。プレートを軽く乾燥させる。そして、スクリーニングされるべきモノクローナル抗体を、それぞれのウェルに次のように添加した：ブロッキング緩衝希釈液のウェルごとに 50 μ l を、融合成長プレート中の対応するウェルから移したウェル培養上澄み 50 μ l と一緒に添加した。インキュベートは約 1 時間室温で攪拌しながらであった。プレートを、T I T E R T E C K P L U S (登録商標) プレート洗浄剤を使用して、S 20 スタッカーで洗浄し、洗浄緩衝液は、0 . 0 5 % T W E E N (登録商標) 20 を有する P B S であった。ブロッキング緩衝希釈液中で 1 : 4000 まで希釈したグルコース - 6 - ホスフェートデヒドロゲナーゼに共有的に結合したタクロリムスの酵素接合体を、ウェルごとに 100 μ l 添加した。インキュベートを約 1 時間室温で攪拌しながら実施した。そして、プレートを洗浄し、そして色素生成溶液を、ウェルごとに 100 μ l の体積で添加した。色素生成溶液は、0 . 5

20

30

【0086】

スクリーニングのために、適したモノクローナル抗体を製造するハイブリドーマを選択した。これは、14H04 抗体として設計されている。

【0087】

タクロリムスを設計する 1E2 のためのモノクローナル抗体を、同様の方法で、前記のようにタクロリムス分子の C 3 2、C 2 4 及び C 3 2、並びに C 2 4 の位置で連結した K L H を有する免疫原混合物を使用して製造した。

40

【0088】

溶血性前処理溶液の製造。この前処理溶液は、5 μ g / m l のシロリムス (S I R O)、6 . 8 m g / m l の P I P E S TM 1 . 5 ナトリウム塩、0 . 3 m g / m l の E D T A D i s o d i u m、1 . 0 m g / m l の S a p o n i n、0 . 2 % の P R O C L I N (登録商標) 300、0 . 0 2 4 m g / m l N e o m y c i n s u l f a t e 及び 0 . 9 9 m g / m l の N a N 3、p H 6 . 5 を含んだ。最終反応混合物中の S I R O 濃度は 1 . 1 μ g / m l であった。表 1 は、タクロリムスのためのアッセイのための全体の血液試料の

50

一部を溶血することにおいて使用するための溶血試薬の組成を示す (A I = A s i n d i c a t e d (示したように))。C h o l は、コレステロールであり、T r i g はトリグリセリドである。

【 0 0 8 9 】

【表 1】

表 1

名前	量(1mLあたり)	機能
シロリムス	5 µg	結合タンパク質からFK506を分離する
アジ化ナトリウム	0.99 mg	マトリックスの効果的な遊走
PIPES™ 1.5 ナトリウム塩	6.8 mg	緩衝液
EDTA 二ナトリウム二水和物	0.3 mg	コルト形成の防止
サポニン	1 mg	血液細胞溶解
PLURONIC® 25R2	0.9 mg	chol/Trig 干渉
PROCLIN® 300	0.4 mg	防腐剤
ネオマイシンスルフェート	0.024 mg	防腐剤

10

20

30

40

50

【 0 0 9 0 】

1 4 H 0 4 クローンを使用する抗タクロリムス F (a b ')₂ - - ガラクトシダーゼ接合体の製造。モノクローナル抗タクロリムス抗体 1 4 H 0 4 (前記で製造) を、リシル - エンドペプチド (W a k o、R i c h m o n d、V A) 消化を使用して F (a b ')₂ に断片化し、そして公知の技術に従って標準ヘテロ二官能性 S M C C (スクシンイミジルトランス - 4 - (N - マレイミジルメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート) リンカーを使用して - ガラクトシダーゼに接合した。抗体接合体溶液は、約 2 . 0 µ g / m L の抗タクロリムス抗体 - ガラクトシダーゼ接合体、3 0 m g / m L のプロテアーゼフリーウシ血清アルブミン、0 . 1 2 6 m g / m L の M g C l₂、0 . 0 3 m L / m L のエチレングリコール、2 4 . 5 m g / m L の H E P E S、3 8 . 5 m g / m L の N a H E P E S、5 0 m g / m L の N a C l 及びベータ - ガルムテイン (g a l m u t e i n) (非活性化ベータ - ガラクトシダーゼ)、p H 7 . 8 を含んだ。

【 0 0 9 1 】

磁気クロム粒子の製造。クロム粒子 (免疫アッセイ固相) を、モノクローナル抗タクロリムス抗体 1 E 2 (前記のように製造した) を、グルタルデヒドを被覆した二酸化クロム粒子に接合することによって製造した。クロム試薬は、クロム粒子、及び 6 0 . 4 m g / m L のトレハロースジヒドレート、及び 7 . 2 m g / m L のポリエチレングリコール (P E G) 8 0 0 0 を含む。3つのクロム粒子濃度、すなわち 5 m g / m L、2 . 5 m g / m L 及び 1 . 6 7 m g / m L を、研究において使用した。

【 0 0 9 2 】

サンドイッチタクロリムスアッセイ。タクロリムスのためのサンドイッチアッセイの原理及び操作は以下である：タクロリムスを含有する全血試料 (5 0 µ L) を、前記で製造した溶血性前処理試薬と、D I M E N S I O N (登録商標) R x L 分析器上で反応容器中で混合した。全血を、超音波試料プローブで血液を最初に混合することによって標準カップから試した。全血試料と前処理溶液の混合は、全血試料の溶血及びタンパク質が結合したタクロリムス分子のそれらの結合部位からの置き換えを確実にした。

【 0 0 9 3 】

1 4 H 0 4 抗体クローン (5 0 µ L) を使用して製造した抗タクロリムス F (a b ')₂ - - ガラクトシダーゼ接合体を、反応容器に添加し、その混合物を、時間 (3 5 秒) で、及び 4 3 の温度で維持して、タクロリムスを、存在する場合に抗体酵素接合体と反応させた。固定した 1 E 2 モノクローナル抗体を有するクロム粒子を、反応容器に添加 (5 0 µ L) 添加し、そして、タクロリムス - 1 4 H 0 4 F (a b ')₂ - - ガラクトシダーゼ複合体を結合して、クロム - 1 E 2 A b : : タクロリムス : : 1 4 H 0 4 A b サンドイッチを形成させた。この反応混合物を、1 4 分間 4 3 の温度で、自動化磁気分離の前に、インキュベートし、混合し、そして洗浄し、その際サイクルは D i m e n s i o

n装置であった。合計4つの分離/洗浄サイクルを実施して、未結合の抗タクロリムスF (a b ')₂ - - ガラクトシダーゼ接合体及び試料からのデブリを取り出した。自動化クロム洗浄を、広範な化学洗浄溶液を使用して、H E P E S 緩衝液中でp H 8 . 0で実施し、双方は、D I M E N S I O N (登録商標) 相同免疫アッセイモジュールを提供した。そして、洗浄したクロム粒子を、化学洗浄溶液中で、超音波混合によって再懸濁し、そして懸濁したクロム粒子の一部(5 4 μ L) を、測光キュベットに移して、 - ガラクトシダーゼ基質溶液(クロロフェノールレッド - - D - ガラクトピラノシド、又はC P R G) と混合した。クロム粒子表面上で1 4 H 0 4 抗タクロリムスF (a b ')₂ - - ガラクトシダーゼ接合体に結合したタクロリムスを、C P R G の存在で接合体の酵素的速度を測定することによって検出した。それぞれの反応容器についての速度を、5 7 7 n m 及び 7 0 0 n m で重クロムで測定した。シグナルは、タクロリムスサンドイッチ免疫アッセイの曲線に対応し、図3において示す。

【0094】

実施例2

自動化E L I S A サンドイッチアッセイを使用したタクロリムスの測定

1 E 2 クローンを使用する抗タクロリムス抗体 - - ガラクトシダーゼ接合体の製造。マウスモノクローナル抗タクロリムス抗体、クローン1 E 2 (前記のように製造した) を、3 0 0 m M の塩化ナトリウムを添加した1 0 m M のリン酸ナトリウム、p H 6 . 7 から構成される媒体中で、ヘテロ二官能価リンカーS M C C (スクシンイミジル4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (E M D B i o s c i e n c e s , I n c . , L a J o l l a C A) で誘導した。誘導反応を6 0 分間2 5 で進行させた後に、得られたマレイミド - 活性化抗体を、前記媒体中に緩衝変化によって再精製して、未反応のリンカー及び遊離N - ヒドロキシスクシンイミドを取り出し、続いて濃度を1 . 0 m g / m L に調整した。

【0095】

そして、大腸菌から組み換えて製造した - ガラクトシダーゼ酵素 (R o c h e D i a g n o s t i c s , I n d i a n a p o l i s I N) を、1 . 0 m g / m L の濃度で同一のホスフェート/塩化ナトリウム媒体中で溶解し、マレイミドを活性化した抗体を1 : 1 の抗体 : 酵素のモル比で混合した。混合物を、2 5 で穏やかに攪拌し、経時的に接合を、合体種の発生を、9 . 4 × 2 5 0 m m Z O R B A X (登録商標) G F - 4 5 0 H P L C カラム (A g i l e n t T e c h n o l o g i e s , S a n t a C l a r a C A) を使用するクロマトグラフィーによって監視した。少量の低分子量接合体が生じた場合に、接合反応を急冷した。この急冷は、N - エチルマレイミド (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c , R o c k f o r d I L) 及びヒドラジンの十分な量の反応混合物の添加により得た。急冷した反応混合物を、0 . 2 ミクロンのフィルターを通して濾過し、約1 5 m g (合計タンパク質) / m L まで濃縮した。そしてその混合物を、移動相として同一のホスフェート/塩化ナトリウム接合反応媒体を使用して、2 1 . 2 × 3 0 0 m m B I O S E P TM - S E C - S - 4 0 0 0 H P L C カラム (P h e n o m e n e x , T o r r a n c e C A) を使用する半調整サイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。所望の分子量の接合体材料を含む画分をプールした。そして、使用するために生成物接合体プールを希釈した。

【0096】

タクロリムスのためのサンドイッチ固相酵素免疫測定法 (E L I S A) 。次の工程を使用した : 工程 1 : 精製した1 4 H 0 4 (前記で製造した) (P B S 中で1 0 μ g / m L) の5 0 μ L を、E L I S A プレート上で一昼夜4 で被覆した。プレートを、0 . 0 5 % T W E E N (登録商標) 2 0 を含むM i l l i Q 水を使用して洗浄した。工程 2 : 2 0 0 μ L のP C T B l o c k e r 溶液 (0 . 0 5 % のT W E E N (登録商標) 2 0 を含有するリン酸緩衝液中で0 . 5 % カゼイン (乳タンパク質)) をそれぞれのウェルに添加し、そして媒体を、室温で3 0 分間インキュベートした。プレートを、0 . 0 5 % T W E E N (登録商標) 2 0 を含むM i l l i Q 水を使用して洗浄した。工程 3 : P B S 中で

希釈した所望の濃度の薬物（FK506）の50 μ Lを、それぞれのウェルに添加し、そして媒体を、室温で30分間インキュベートした。プレートを、0.05% TWEEN（登録商標）20を含むMilliQ水を使用して洗浄した。使用したタクロリムス（TACR）薬濃度は、それぞれ、0 ng/mL、0.01 ng/mL、0.02 ng/mL、0.04 ng/mL、0.08 ng/mL、0.16 ng/mL、0.31 ng/mL、0.63 ng/mL、1.25 ng/mL、2.50 ng/mL、5.0 ng/mL及び10.0 ng/mLであった。工程4：モノクローナル抗体1E2 - -ガラクトシダーゼ接合体（前記に類似した方法で製造）（PCT Blocker 溶液中で1:300の希釈）を添加し、そしてその媒体を室温で30分間インキュベートした。プレート

10

【0097】

非特異的結合を除外するための対照試験。非特異的結合を除外するための対照試験を、前記の実験条件下で実施した。一試験において、モノクローナル抗体14H04を、ELISAプレート上で被覆し、そして洗浄した。タクロリムス及び抗タクロリムス14H04 F(ab')₂ - -ガラクトシダーゼ接合体を添加し、そして得られた混合物をインキュベートし、そして前記のように洗浄した。第二の試験において、モノクローナル抗体1E2を、ELISAプレート上で被覆し、そして洗浄した。タクロリムス及び抗タクロリムス1E2 - -ガラクトシダーゼ接合体を添加し、そして得られた混合物をインキュベートし、そして前記のように洗浄した。第三の試験において、キャプチャしていないモノクローナル抗体を、ELISAプレート上で被覆したが、タクロリムス薬及び前記のモノクローナル抗体接合体のいずれかを添加せず、続いて洗浄し、そして前記のようにインキュベートした。全てのこれらの対照試験について、ELISAシグナルが、 - ガラクトシダーゼ基質溶液を添加した後の期間を読み取る577 nmで20分間のプレートリーダー上での読取りで検出されなかった。これらの結果は、サンドイッチが前記条件下で形成されなかったことを示す。

20

【0098】

本明細書において挙げた全ての文献及び特許明細書は、それぞれ個々の文献又は特許明細書が参照をもって組込まれたことを明確に及び個々に示すように、参照をもって本明細書に組み込まれたものとする。

30

【0099】

前記発明は、理解を明確にする目的のための詳細及び例示によって、いくつか詳細に記載されているが、本発明の技術の権利において当業者に通常のものであると容易に理解でき、明らかな変更及び改変は、付属の特許請求の趣旨又は範囲から逸脱しない限りそれらに実施してよい。さらに、前記記載は、説明の目的のために、本発明の理解を通して提供する特定の名称を使用した。しかしながら、特定の記載が本発明の実施のために要求されないことは当業者に明らかである。従って、本発明の特定の実施態様の前記記載は、例示及び説明の目的のためであり、それらは、開示された正確な形式に本発明を除外又は制限することを意図しない。多くの改変及び変更が、前記技術の点で可能である。前記実施態様は、本発明の原理及びその実施例を説明するために、並びにそれによって他の当業者が本発明を使用することを可能にするために選択及び記載されている。

40

【 図 1 】

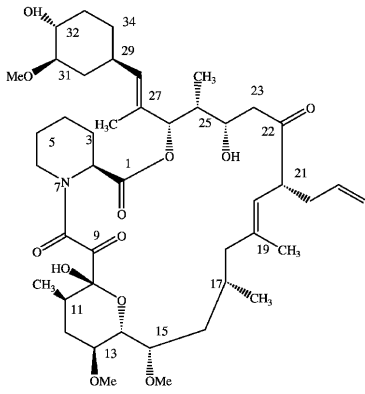


FIG. 1

【 図 2 】

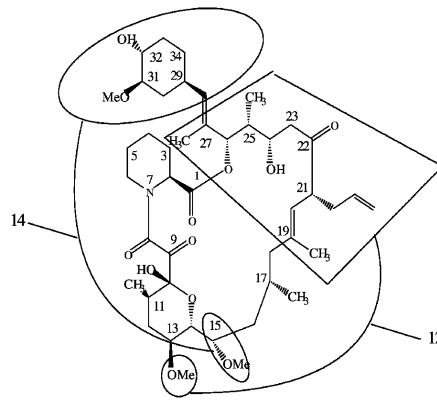
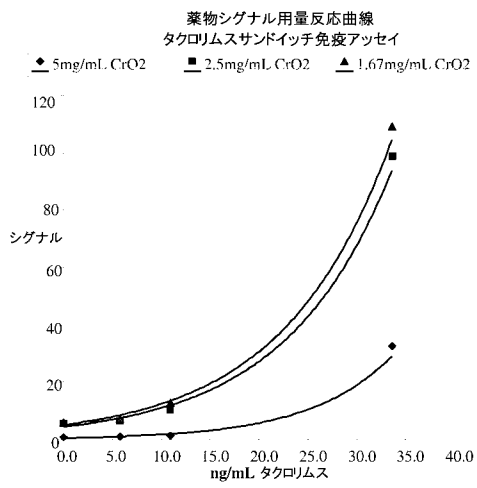
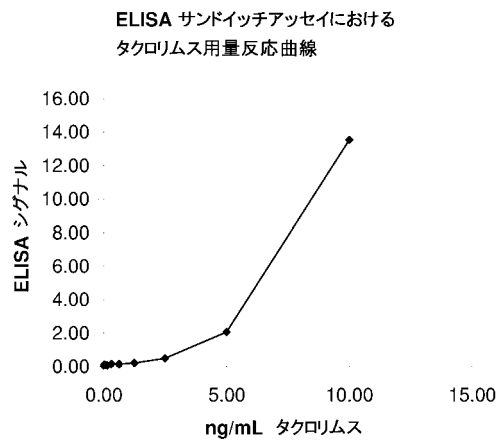


FIG. 2

【 図 3 】



【 図 4 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 13/24054

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - G01N 33/53, C12P 21/08, C07K 16/00 (2013.01) USPC - 435/7.9 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(8): G01N 33/53, C12P 21/08, C07K 16/00 (2013.01) USPC: 435/7.9 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 530/388.1, 530/391.3; 435/501 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST, PatBase, Google Scholar Search terms: support, solid surface, antibody, immunosuppressant drug\$2, tacrolimus, Fk506, FK-506, fujimycin, prograf, advagraf, protopic, cyclosporin, rapamycin, everolimus, detect\$4, determin\$4, identif\$4, 1E2, 14H04		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2009/0087865 A1 (KASPER et al.) 02 April 2009 (02.04.2009); para [0122]-[0131], [0133], [0138]-[0139], Table 1	1-20
Y	US 7,592,186 B2 (DREGLER et al.) 22 September 2009 (22.09.2009); col 6, ln 32-55	1-20
Y	US 2011/0318754 A1 (WEI) 29 December 2011 (29.12.2011); para [0116], [0119]	6, 8-9, 14, 16-20
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 18 March 2013 (18.03.2013)		Date of mailing of the international search report 19 APR 2013
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

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, 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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72)発明者 ティエ チュアン ウエイ
アメリカ合衆国 デラウェア ウィルミントン アセンション ドライブ 97

专利名称(译)	免疫抑制剂的夹心测定		
公开(公告)号	JP2015512049A	公开(公告)日	2015-04-23
申请号	JP2014560916	申请日	2013-01-31
[标]申请(专利权)人(译)	西门子医疗保健诊断公司		
申请(专利权)人(译)	西门子医疗诊断公司		
[标]发明人	テイエチュアンウェイ		
发明人	テイエ チュアン ウェイ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/536		
CPC分类号	G01N33/9493 G01N2333/36		
FI分类号	G01N33/53.G G01N33/536.C G01N33/536.E		
优先权	13/413925 2012-03-07 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了用于确定疑似含有免疫抑制剂药物的样品中的免疫抑制剂药物的方法。该方法包括在培养基中组合提供样品，免疫抑制剂药物的第一单克隆抗体和免疫抑制剂药物的第二单克隆抗体。除了第一单克隆抗体与免疫抑制剂药物结合的部分之外，第二单克隆抗体结合免疫抑制剂药物的一部分。培养基在第一单克隆抗体和第二单克隆抗体与免疫抑制剂药物结合的条件下孵育。检查培养基中是否存在包含免疫抑制剂药物，第一单克隆抗体和第二单克隆抗体的免疫复合物。免疫复合物的存在和/或量指示样品中免疫抑制剂药物的存在和/或量。

名前	量(1mLあたり)	機能
シリムス	5 µg	結合タンパク質からFK506を分離する
アジ化ナトリウム	0.99 mg	マトリックスの効果的な遊走
PIPEST TM 1.5 ナトリウム塩	6.8 mg	緩衝液
EDTA 二ナトリウム二水和物	0.3 mg	コルト形成の防止
サボニン	1 mg	血液細胞溶解
PLURONIC® 25R2	0.9 mg	chol/Trig 干渉
PROCLIN® 300	0.4 mg	防腐剤
ネオマイシンスルフェート	0.024 mg	防腐剤