

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4862038号  
(P4862038)

(45) 発行日 平成24年1月25日 (2012. 1. 25)

(24) 登録日 平成23年11月11日 (2011. 11. 11)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/53 (2006. 01)

GO 1 N 33/53 S

GO 1 N 33/543 (2006. 01)

GO 1 N 33/543 5 O 1 D

GO 1 N 33/15 (2006. 01)

GO 1 N 33/15 Z

請求項の数 43 (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願2008-505563 (P2008-505563)  
 (86) (22) 出願日 平成18年4月5日 (2006. 4. 5)  
 (65) 公表番号 特表2008-536126 (P2008-536126A)  
 (43) 公表日 平成20年9月4日 (2008. 9. 4)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/012988  
 (87) 国際公開番号 W02006/108130  
 (87) 国際公開日 平成18年10月12日 (2006. 10. 12)  
 審査請求日 平成20年12月17日 (2008. 12. 17)  
 (31) 優先権主張番号 60/668, 714  
 (32) 優先日 平成17年4月6日 (2005. 4. 6)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 391008788  
 アボット・ラボラトリーズ  
 ABBOTT LABORATORIES  
 アメリカ合衆国 イリノイ州 アボット  
 パーク アボット パーク ロード 10  
 O  
 (74) 代理人 100062007  
 弁理士 川口 義雄  
 (74) 代理人 100114188  
 弁理士 小野 誠  
 (74) 代理人 100140523  
 弁理士 渡邊 千尋  
 (74) 代理人 100119253  
 弁理士 金山 賢教

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液検体中の免疫抑制性タクロリムス、シロリムスおよびシクロスポリンA複合体の測定方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

免疫抑制療法を必要とする未処置患者からの血液検体中に存在する免疫抑制薬に対して特異的な免疫抑制剤複合体成分の量を測定する方法において、

a) 前記検体中の血球を溶解させる段階；

b) 前記溶解血球に過剰量の免疫抑制薬を加えて、薬剤特異的な免疫複合体を形成する段階；

c) 段階 b) の混合物を、前記複合体を形成する血液成分の一つに対して特異的な抗体に連結した固体表面に結合させる段階；

d) 段階 c) の混合物に検出マーカーと接合した抗体を加える段階であって、前記接合抗体が、前記固体表面に直接結合していない前記複合体を形成する前記血液成分の一つに対して特異的である段階；ならびに

e) 段階 d) の混合物中の前記接合検出マーカーの量を測定する段階であって、その量が前記血液検体中に存在する免疫抑制剤複合体成分の量に比例するものである段階を有することを特徴とする方法。

## 【請求項 2】

前記血液が抗凝血剤処理した容器中にある請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記抗凝血剤処理した容器が EDTA を含まない容器である請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

10

20

前記血液検体の溶解前に赤血球および免疫細胞を分離する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記方法の段階 (c)、(d) および (e) を、自動手段を用いて行う請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記固体表面が微粒子を含む請求項 5 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る請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

段階 (c) の微粒子に結合した前記抗体が、抗 F K B P 1 2 抗体および抗カルシニューリン A または B 抗体からなる群から選択され；

段階 (d) のマーカーでタグ付けされた前記抗体が抗 F K B P 1 2 抗体および抗カルシニューリン A または B 抗体の群から選択され；

段階 (d) の前記検出マーカーがアクリジニウム、ルミノール、西洋わさびペルオキシダーゼ、フルオレセイン、アルカリホスファターゼおよび放射性標識接合抗体からなる群から選択される請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記微粒子に結合した前記抗体がヤギ抗マウス抗体およびマウス抗 F K B P 抗体をさらに含む請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記微粒子に結合した前記抗体がヤギ抗マウス抗体およびマウス抗カルシニューリン A または B 抗体をさらに含む請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記免疫抑制薬がシロリムスである請求項 6 に記載の方法。

【請求項 12】

段階 (c) の微粒子に結合した前記抗体が、抗 F K B P 1 2 抗体および抗 m T O R 抗体の群から選択され；

段階 (d) のマーカーでタグ付けされた前記抗体が、抗 F K B P 1 2 抗体および抗 m T O R 抗体の群から選択され；および

段階 (d) の検出マーカーが、アクリジニウム、ルミノール、西洋わさびペルオキシダーゼ、フルオレセイン、アルカリホスファターゼおよび放射性標識抗体からなる群から選択される請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記微粒子に結合した前記抗体が、ヤギ抗マウス抗体およびマウス抗 F K B P 抗体を含む請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記微粒子に結合した前記抗体が、ヤギ抗マウス抗体およびマウス抗 m T O R 抗体をさらに含む請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

前記免疫抑制薬がシクロスポリン A である請求項 6 に記載の方法。

【請求項 16】

段階 (c) の微粒子に結合した前記抗体が、抗シクロフィリン抗体および抗カルシニューリン抗体からなる群から選択され；

段階 (d) のマーカーでタグ付けされた前記抗体が、抗シクロフィリン抗体および抗カルシニューリン抗体の群から選択され；

段階 (d) の前記マーカーがアクリジニウム、ルミノール、西洋わさびペルオキシダーゼ、フルオレセイン、アルカリホスファターゼおよび放射性標識抗体からなる群から選択される請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記微粒子に結合した前記抗体が、ヤギ抗マウス抗体およびマウス抗シクロフィリン抗

10

20

30

40

50

体をさらに含む請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記微粒子に結合した前記抗体が、ヤギ抗マウス抗体およびマウス抗カルシニューリン A または B 抗体をさらに含む請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

未処置であり処置を必要とする患者に投与すべき治療上有効なタイプの免疫抑制薬を選択する上での請求項 1 に記載の方法の使用であって、前記薬剤がタクロリムス、シロリムスおよびシクロスポリン A からなる群から選択される使用。

【請求項 20】

薬剤による免疫抑制療法を受けている患者が形成することができる、ある特定の薬剤によって形成される免疫抑制複合体の最大量を自動システムで測定する方法において、

a) その検体中の血球を溶解させる段階；

b) 前記溶解血球を 2 個の異なる容器で等量の小分け試料に分ける段階；

c) 前記 2 個の容器のうちの第 2 の容器に、前記患者の治療に用いられている免疫抑制薬の過剰量とともに、ある容量の適切な基質を加える段階；

d) 前記 2 個の容器のうちの第 1 の容器に、免疫抑制薬を含まない、前記第 2 の容器の場合と同じ容量の適切な基質を加える段階；

e) 前記免疫抑制薬と複合体を形成する血液成分に特異的な抗体をタグ付けした固体表面に、段階 (c) および (d) の前記第 1 および第 2 の容器の内容物を結合させる段階；

f) 段階 (e) の両方の容器の内容物に、前記固体表面の抗体に結合しない、前記複合体を形成する成分に特異的な検出マーカーでタグ付けした抗体を加える段階；

g) 段階 (f) の前記 2 個の容器それぞれにおける検出マーカーの量を測定する段階であって、前記第 1 の容器の検出マーカーの量は前記免疫抑制薬で形成される実際の複合体の総数に比例し、前記第 2 の容器の検出マーカーの量は過剰の免疫抑制薬で形成され得る複合体の理論上最大数に比例する段階；

h) 第 1 の容器中で形成されている実際の複合体の総量と第 2 の容器で形成される複合体の理論上最大量との間の差を求める段階であって、前記の差が、前記免疫抑制薬による治療を受けている前記患者が形成する可能性がある免疫抑制複合体の可能な増加量を表す段階

を有することを特徴とする方法。

【請求項 21】

前記血液が抗凝血剤処理した容器中にある請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記抗凝血剤処理した容器が EDTA を含まない容器である請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記血液検体の溶解前に赤血球および免疫細胞を分離する請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記方法の段階 (c) ~ (h) を、自動手段を用いて行う請求項 20 に記載の方法。

【請求項 25】

前記固体表面が微粒子を含む請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記免疫抑制薬がタクロリムスである請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

段階 (e) の微粒子に結合した前記抗体が、抗 F K B P 12 抗体および抗カルシニューリン抗体からなる群から選択され；

段階 (f) のマーカーでタグ付けされた前記抗体が抗 F K B P 12 抗体および抗カルシニューリン抗体からなる群から選択され；

段階 (f) の前記マーカーがアクリジニウム、ルミノール、西洋わさびペルオキシダーゼ、フルオレセイン、アルカリホスファターゼおよび放射性標識接合抗体からなる群から選択される請求項 26 に記載の方法。

## 【請求項 28】

前記免疫抑制薬がシロリムスである請求項 25 に記載の方法。

## 【請求項 29】

段階 (e) の微粒子に結合した前記抗体が、抗 F K B P 1 2 抗体および抗 m T O R 抗体からなる群から選択され；

段階 (f) のマーカーと接合した前記抗体が、抗 F K B P 1 2 抗体および抗 m T O R 抗体からなる群から選択され；および

段階 (f) のマーカーが、アクリジニウム、ルミノール、西洋わさびペルオキシダーゼ、フルオレセイン、アルカリホスファターゼおよび放射性標識抗体からなる群から選択される請求項 28 に記載の方法。

10

## 【請求項 30】

前記免疫抑制薬がシクロスポリン A である請求項 25 に記載の方法。

## 【請求項 31】

段階 (e) の微粒子に結合した前記抗体が、抗シクロフィリン抗体および抗カルシニューリン A または B 抗体からなる群から選択され；

段階 (f) のマーカーと接合した前記抗体が、抗シクロフィリン抗体および抗カルシニューリン抗体からなる群から選択され；

段階 (f) の前記マーカーがアクリジニウム、ルミノール、西洋わさびペルオキシダーゼ、フルオレセイン、アルカリホスファターゼおよび放射性標識抗体からなる群から選択される請求項 30 に記載の方法。

20

## 【請求項 32】

免疫抑制効果が不十分である治療を受けている患者に投与すべき免疫抑制薬の追加量を選択する上での請求項 20 に記載の方法の使用であって、前記免疫抑制薬がタクロリムス、シロリムスおよびシクロスポリン A からなる群から選択される使用。

## 【請求項 33】

二重治療を受けている患者からの血液検体における、2 種類の免疫抑制薬によって形成される複合体の相対的割合を自動システムで測定する方法において、

a) 前記血液検体中の血球を溶解する段階；

b) 前記溶解血球を 2 つの異なる容器で等量ずつの小分け試料に分ける段階；

c) 前記 2 種類の免疫抑制薬によって形成される複合体中の血液成分に特異的な抗体でタグ付けされた固体表面に段階 b) の内容物を結合させる段階；

30

d) 前記測定される免疫複合体に特異的な検出マーカーにタグ付けされた抗体を第 1 の容器に加える段階であって、前記抗体が前記固体表面に結合した抗体とは異なるものである段階；

e) 前記測定される免疫複合体に特異的なマーカーにタグ付けされた抗体を第 2 の容器に加える段階であって、前記抗体が前記固体表面に結合した抗体とは異なるものである段階；；および

f) 第 1 の容器および第 2 の容器中の検出マーカーの量を適切な校正基準と比較して、前記二重治療で使用されている前記免疫抑制薬のそれぞれによって形成される複合体の相対的割合を得る段階

40

を有することを特徴とする方法。

## 【請求項 34】

前記 2 種類の免疫抑制薬がタクロリムス、シロリムスおよびシクロスポリン A からなる群から選択される請求項 33 に記載の方法。

## 【請求項 35】

前記固体表面が微粒子を含む請求項 34 に記載の方法。

## 【請求項 36】

前記二重治療で使用される前記 2 薬剤のそれぞれの複合体およびその量を測定する上での請求項 34 に記載の方法の使用。

## 【請求項 37】

50

固体表面に結合した、F K B P 1 2 に対して特異的である抗体、および検出マーカーにタグ付けされ、カルシニューリンに対して特異的な抗体を含む、請求項 1 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の方法に使用するキット。

【請求項 3 8】

固体表面に結合した、F K B P 1 2 に対して特異的である抗体、および検出マーカーにタグ付けされ、m T O R に対して特異的な抗体を含む、請求項 1 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の方法に使用するキット。

【請求項 3 9】

固体表面に結合した、カルシニューリンに対して特異的である抗体、および検出マーカーにタグ付けされ、F K B P 1 2 に対して特異的な抗体を含む、請求項 1 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の方法に使用するキット。

10

【請求項 4 0】

固体表面に結合した、m T O R に対して特異的である抗体、および検出マーカーにタグ付けされ、F K B P 1 2 に対して特異的な抗体を含む、請求項 1 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の方法に使用するキット。

【請求項 4 1】

固体表面に結合した、シクロフィリンに対して特異的である抗体、および検出マーカーにタグ付けされ、カルシニューリンに対して特異的な抗体を含む、請求項 1 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の方法に使用するキット。

【請求項 4 2】

20

固体表面に結合した、カルシニューリンに対して特異的である抗体、および検出マーカーにタグ付けされ、シクロフィリンに対して特異的な抗体を含む、請求項 1 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の方法に使用するキット。

【請求項 4 3】

前記検出試薬が、アクリジニウム、アルカリホスファターゼ、ルミノール、西洋わさびペルオキシダーゼ、フルオレセインおよび放射性標識接合抗体からなる群から選択される請求項 3 7 ~ 4 2 のいずれか 1 項に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

30

本発明は、免疫抑制薬であるタクロリムス、シロリムスまたはシクロスポリン A を含む（個別または組み合わせで）免疫抑制複合体の血液検体中の量を測定する方法および診断アッセイに関するものである。

【背景技術】

【0 0 0 2】

シクロスポリン A（C s A）、タクロリムス（F K 5 0 6、プログラフ（登録商標））およびシロリムス（ラパマイシン）は、T - リンパ球増殖を阻害する強力な免疫抑制薬である。これら薬剤の作用には、イムノフィリン類と称される細胞内タンパク質が介在している。これらのイムノフィリンはロータマーゼ類（タンパク質折り畳みに関与する酵素）である。

40

【0 0 0 3】

シロリムスおよびタクロリムスは、F K 5 0 6 結合タンパク質または F K B P と称されるイムノフィリン類のファミリーに関して構造的相同性および阻害結合ドメインを共有している（Abraham et al., *Ann Rev. Immunol.* Vol. 14, 483 (1996)）。シクロスポリン A は、別のイムノフィリンであるシクロフィリンに結合し、それを阻害する。結合タンパク質との複合体において、これらの薬剤はシグナル伝達経路を調節する 2 次標的を阻害することで、免疫細胞周期進行の阻害を生じる。これらの経路は、所望の免疫抑制に介在し、それを調節する。これらおよび他の要素および経路は、免疫および他の細胞型を介して望ましくない薬剤効果も全身的に生じる。

【0 0 0 4】

50

シロリムスおよびタクロリムスはいずれも、ヒト血液中で発現されるFKBPイムノフィリン類の一つの構成員であるFKBP12と相互作用する。シロリムス/FKBP12およびタクロリムス/FKBP12の二量体は、別個の標的分子と複合体形成し、それらを阻害する。シロリムス/FKBP12二量体の標的は、ラパマイシンの哺乳動物標的(mTOR)と称される。タクロリムス/FKBP12二量体は、カルシニューリンを標的とする(アブラハム(Abraham)ら(上記); Chung et al., *Cell* Vol. 69, 1227 (1992))。シクロスポリンA-シクロフィリン二量体およびタクロリムス/FKBP12二量体は別個に、共通の標的であるカルシニューリン、セリン-トレオニンホスファターゼと5量体複合体を形成し、それを阻害することができる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

mTORに対するシロリムス/FKBP12二量体の結合は、T細胞細胞周期進行を阻害する。T細胞では、タクロリムス/FKBP12複合体またはシクロスポリンA/シクロフィリン複合体のいずれかに結合したカルシニューリン/カルシウム/カルモジュリンが免疫調節剤インターロイキン-2(IL-2)の転写を刺激するNFATなどのいくつかの全身シグナル伝達分子の脱リン酸化を防止することから、その活性化を低下させる。これら薬剤の免疫抑制効果は、これら薬剤とそれらの結合タンパク質、それらの標的(それらが阻害する酵素)および他の必要な補因子とによって形成される前述の多量体複合体によって達成される。タクロリムスは、治療範囲が狭いことから、タクロリムス免疫抑制療法を受けている患者でのタクロリムスレベルのモニタリングが標準的な実務として行われる。現行の方法は、血液中の総(複合体化および非複合体化)薬剤濃度を測定するものである。米国特許第6338946号は、イン・ビトロでの免疫抑制薬(カルシニューリン阻害活性を有する)の手動によるアッセイ方法に関するものであり、それはすなわち、固体容器中で外因性結合成分免疫抑制薬、関与する特異的イムノフィリン(ウシカルシニューリン、カルモジュリン、カルシウム)と単離タクロリムスの複合体を形成し、検出システムにタグ付けされた抗カルシニューリン抗体でその複合体を検出することで行われる。他の利用可能な方法は、タクロリムス投与を受けている患者から得られた血液検体からタクロリムスを抽出し、上記の方法によってイン・ビトロ複合体を形成することで抽出されたタクロリムスの量を測定するものである(Armstrong et al., *Clin. Chemistry* Vol. 44, pages 2516-2523 (1998))。次に、これらの測定値を、人口統計学的に求めた薬剤毒性濃度範囲と比較し、可能な毒性効果を推定するのに用いる。

【0006】

総薬剤濃度と免疫抑制の間には相関がないことが明らかになっている。従って、薬剤の総血中濃度の測定値は、個々の免疫抑制応答を予測するものではない。免疫抑制薬応答における変動性は、アッセイにおいて親薬剤に対する特異的抗体と交差反応する親薬剤の不活性代謝物、アッセイ抗体に結合しない親薬剤の活性代謝物(測定されない)といういくつかの要素の発見、ならびにかなりの割合で、これらアッセイが機能的免疫抑制複合体ではなく検体中の総親薬剤を測定するという事実によるものであった。留意すべき点として、タクロリムス、シロリムスおよびシクロスポリンAおよびそれらの活性代謝物は、それらの特定の結合イムノフィリンおよび免疫細胞抑制において関与する標的酵素とそれらが多量体複合体を形成する場合にのみ、免疫抑制剤として作用する。

【0007】

各患者は、これら結合タンパク質および標的成分の異なる血中濃度を有する(年齢、性別、人種、疾患状態などのため)。従って、免疫抑制複合体を形成する能力およびこれら各薬剤の存在下で形成される複合体の数は、各個々の患者で個別(遺伝的に、および/または環境的に)に決定される。従って、各患者は固有の免疫抑制応答度を有し、それは部分的に、免疫抑制性複合体を形成するのに必要な成分の存在および豊富さによって決まる。

【0008】

10

20

30

40

50

患者をこれらの疎水性免疫抑制薬で処置すると、薬剤の一部が機能性結合タンパク質に結合し、免疫抑制シグナル伝達経路に影響するが、かなりの割合の薬剤が非特異的にタンパク質、脂質および膜に結合して、免疫抑制作用が起こる免疫細胞から隔離されてしまう。現在利用可能な方法による免疫抑制薬の総血中濃度の測定では、それらの方法が機能的に不活性な薬剤も免疫抑制に関与する薬剤も測定することから、血液中に存在する機能性薬剤の量が過剰に計算されることになる(Alak, A., *Therap. Drug, Monit.*, Vol. 19, pages 338-351 (1997))。さらに、親薬剤の活性代謝物を測定する現在の方法では、それらの薬理活性とそれらの免疫学的交差反応性の間に相関がない(Amstrong et al., *Clin. Chemistry* Vol. 44, pages 2516-2523 (1998))。さらに言及すべき重要な点として、患者の血液検体における総免疫抑制薬を測定する現在の方法は、可能な毒性効果を予測するのに用いられるものであって、免疫抑制治療効果の測定に用いられるものではない。

10

#### 【0009】

以上の点を考慮すると、機能的に活性である免疫抑制複合体、すなわち患者自身の血液中で形成される複合体の定量を可能にするアッセイ方法が必要とされている。理論に拘束されるものではないが、この定量を通して、特異的結合タンパク質および標的成分の推定値および免疫抑制療法前および療法中の可能な免疫抑制の推定値が得られるものと予想される。具体的には、免疫抑制療法を開始していなかった患者では、機能的に活性な免疫抑制複合体の定量によって、現行の試行錯誤的な薬剤選択方法によって生じる不必要な毒性薬剤効果を患者に与えることなく、患者がタクロリムス、シロリムスまたはシクロスポリンAまたはそれらの組み合わせと活性な複合体を形成する能力に基づいて各患者に固有の最も適切な薬剤治療を選択することが可能になるものと考えられる。すでに免疫抑制療法を受けている患者では、理論的最大免疫抑制複合体の定量によって、血液中の薬剤の薬理学的に活性な割合と患者においてイン・ビボで観察される免疫抑制との間のより信頼性の高い相関を得ることが可能となると考えられる。療法を受けている患者の血液検体に飽和量の薬剤を加え、初期検体および薬剤飽和検体で形成される複合体を比較的に評価することで、患者に対する望ましくない効果が高くなる危険性なく、免疫抑制向上を生じる免疫抑制薬の用量における上昇に関してデータが得られる。さらに、機能的に活性な免疫抑制複合体を形成する薬剤の割合の測定を可能とする方法を調整して、二重療法を行っている時に各免疫抑制薬について形成される複合体の割合を定量できるようにすることが可能である。

20

30

#### 【0010】

本明細書で言及されている全ての米国特許および刊行物は、参照によって本明細書にその全体が組み込まれるものとする。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0011】

本発明は、免疫抑制療法を必要とする未処置患者からの血液検体中に存在する免疫抑制薬に対して特異的な免疫抑制剤複合体成分の量を測定する方法を包含するものである。この方法は、採血を行う段階；血球を溶解させる段階；前記溶解血球に過剰量の免疫抑制薬を加えて、薬剤特異的免疫複合体を形成する段階；前記複合体を、その複合体を形成する血液成分の一つに対して特異的な抗体に連結した固体表面に結合させる段階；前記複合体を形成する血液成分の一つに対して特異的で前記固体表面に直接結合しない検出マーカーと接合した抗体を加える段階；ならびに最終混合物中の前記接合検出マーカーの量を測定する段階を有する。検出マーカーの量は、前記血液検体中に存在する免疫抑制複合体成分の量に比例する。

40

#### 【0012】

留意すべき点として、本発明は処置を必要とする未処置患者に投与すべき最も治療上有効な免疫抑制薬を選択する上での前記方法の使用をも包含するものである。

#### 【0013】

本発明はさらに、ある特定の免疫抑制薬による免疫抑制療法を受けている患者が形成することができる、その薬剤によって形成される免疫抑制複合体の最大量を測定する方法を

50

包含するものである。この方法は、採血を行う段階；その検体中の血球を溶解させる段階；前記溶解血球を2個の異なる容器で等量の小分け試料に分ける段階；前記2個の容器のうちの第2の容器に、前記患者の治療に用いられているものと同じ免疫抑制薬の過剰量とともに、ある容量の適切な基質を加える段階；前記2個の容器のうちの第1の容器に、前記過剰量の免疫抑制薬を含まない、前記第2の容器の場合と同じ容量の適切な基質を加える段階；前記免疫抑制薬と複合体を形成する血液成分に特異的な抗体をタグ付けした等しい固体表面に、前記第1および第2の容器を付着させる段階；両方の容器のそれぞれを洗浄して、未反応成分および干渉物質を除去する段階；両方の容器のそれぞれに、前記固体表面の抗体に結合しない、前記複合体を形成する成分に特異的な検出マーカーをタグ付けした抗体を加える段階；前記2個の容器それぞれにおける検出マーカーの量を別個に測定する段階であって、前記第1の容器の検出マーカーの量は前記免疫抑制薬で形成される複合体の総数に比例し、前記第2の容器の検出マーカーの量は別の免疫抑制薬で形成され得る複合体の理論上最大数に比例する段階；第1の容器中で形成されている実際の複合体の総量と第2の容器で形成され得る可能な複合体の量との間の差を求める段階を有する。その差は、その免疫抑制薬治療を受けている患者が形成可能であると考えられる免疫抑制複合体の増加を表す。

10

#### 【0014】

留意すべき点として、本発明は、必要な治療効果が得られていない治療下の患者に対する現在投与されている免疫抑制薬の追加の有効性を予め確認する上での前記方法の使用をも包含する。

20

#### 【0015】

本発明はさらに、二重薬剤治療を受けている患者からの血液検体における、2種類の免疫抑制薬によって形成される複合体の相対的割合を測定する方法を含む。この方法は、採血を行う段階；前記血球を溶解する段階；前記溶解血球を2つの異なる容器で等量ずつの小分け試料に分ける段階；前記2種類の免疫抑制薬に共通の血液成分に特異的な抗体でタグ付けされた固体表面に前記溶解血球を結合させる段階；前記測定される免疫複合体に特異的な検出マーカーがタグ付けされた抗体を第1の容器に加える段階であって、その抗体は前記固体表面に結合した抗体とは異なる複合体成分を標的とするものである段階；前記固体表面に結合した抗体とは異なる複合体成分を標的とする、前記測定される免疫複合体に特異的なマーカーにタグ付けされた接合抗体を第2の容器に加える段階；および第1の容器および第2の容器中の検出マーカーの量を適切な校正曲線と比較して、前記二重薬剤治療で使用されている前記免疫抑制薬のそれぞれによって形成される複合体の相対的割合を得る段階を有する。本発明はまた、薬剤併用療法での治療効果に關与する免疫抑制複合体の量を確認する上での前記方法の使用をも包含する。

30

#### 【0016】

留意すべき点として、前記の本発明のいずれの方法も、タクロリムス、シロリムスおよびシクロスポリンAから選択される免疫抑制薬に適用可能である。

#### 【0017】

やはり留意すべき点として、本発明は自動システムと適合する本発明の方法に基づいた診断アッセイを包含する。本発明はさらに、ある抗体でタグ付けされた固体表面および検出マーカーでタグ付けされた異なる抗体を有するキットであって、前記抗体が上記で開示の前記免疫抑制薬で形成された前記複合体のそれぞれの異なる成分に特異的であるキットをも包含する。

40

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0018】

本発明は、(i)免疫抑制療法を必要とする未処置患者、(ii)所期の免疫抑制効果が得られていないすでに治療を受けている患者および(iii)薬剤併用療法を受けている患者からの血液検体における免疫抑制薬（またはその薬剤の活性代謝物）、すなわち、タクロリムス、シロリムスおよびシクロスポリンAを含む免疫抑制複合体を測定することで、免疫抑制複合体成分の相対量を測定する方法に関するものである。本発明はさらに、

50

( i ) 療法開始に先だって、特定の免疫抑制薬と複合体を形成する、免疫抑制療法を必要とする患者からの血液検体中に存在する特定の血液成分の最大量を測定することで、その療法に最も有用な免疫抑制薬を確認し、( i i ) 患者が所期の免疫抑制効果に到達していない場合に、免疫抑制薬による治療をすでに受けている患者に対してすでに投与されている免疫抑制薬の量を増加させることの有用性を確認し、( i i i ) 二重薬剤療法を受けている患者での各薬剤による免疫抑制複合体の相対的割合を確認する上での、これらの方法の使用に関するものである。

【 0 0 1 9 】

本発明の好ましい実施形態では、各薬剤で形成された免疫抑制複合体の測定を用いて、患者に対して特定の療法を行う前に、各薬剤に対する個体の応答を推定する。

10

【 0 0 2 0 】

各個々の患者が有する細胞成分を合成する能力は異なっているというのは、公知の事実である。薬理学的には、薬剤が血流に進入した後に有効になる異なる隔離もしくは失活機序のために、適切な作用部位で働くのに生体的に利用可能なのは、投与された薬剤のうちのごくわずかな割合である。薬剤が他の組織と相互作用すると薬剤毒性が生じる。毒性は、薬剤が利用可能な隔離部分を飽和させて、血液中での遊離薬剤濃度に急激な上昇が生じた時に強くなる。これらの免疫抑制薬の親油性、それらの酵素阻害薬としての機能および標的の豊富さによって、それらは複数のシグナル伝達経路で主要な役割を果たす。これは、治療ウィンドウ内に留まる上で必要な用量が繊細なものであることを示している。

【 0 0 2 1 】

20

治療の前段階として、3種類の候補薬剤、すなわちタクロリムス、シロリムスおよびシクロスポリンAのそれぞれに特有の患者の血液成分の分析を用いて、各薬剤の存在下に各薬剤に特有の各アッセイを用いて形成可能な複合体の最大数を求めることができると考えられる。このデータを用いて、ある患者においてどのシグナル伝達経路成分がより豊富であり、どの経路(すなわち、どの薬剤)の抑制が最大の効果を与え得るかを確認することができるものと考えられる。これは、有効性の低い候補薬剤による治療を回避することで、不必要な毒性を回避するものであると考えられる。

【 0 0 2 2 】

抗凝血剤処理した管に免疫抑制療法を受ける患者候補からの採血を行って、採血時の凝血を防止することができる。本発明で使用可能な抗凝血剤には、EDTAおよびヘパリンなどがあるが、これらに限定されるものではない。カルシニューリン複合体の形成はカルシウム依存性であることから、EDTAの使用はタクロリムスおよびシクロスポリンAには禁忌である可能性がある。

30

【 0 0 2 3 】

対象とする免疫抑制複合体が白血球中にあることから、分析のために白血球を赤血球から単離するための分離段階が望ましいと考えられる。分離によって、対象とする種類の血球が濃縮されて、検体中に存在する可能性のある血液干渉物質が低減され、薬剤複合体濃度が高まることでアッセイ感度が上昇するものと考えられる。

【 0 0 2 4 】

温和な洗剤または何らかの他の手段を用いて、白血球を溶解させ、細胞から作用を受けていない細胞内未複合体化成分を放出することができる。使用可能な温和な洗剤の例には、Triton X - 100およびサポニンなどがあるが、これらに限定されるものではない。薬剤と血液成分との間で免疫抑制複合体を形成するのに適した時間および条件下で、適切な基質中の細胞成分に過剰な免疫抑制薬を加える。本明細書で使用される場合、基質は、単離された複合体と免疫交差反応を有する固体表面および標識抗体と薬剤複合体を形成する上で適切な環境を形成する非常に多くの成分と定義することができる。その成分の例としては、塩、緩衝剤、保存剤などがある。反応用の基質の種類、インキュベーションの時間および温度は、当業者には公知である。その方法の定量部分は、薬剤が付着する結合タンパク質または標的酵素のいずれかに向かう抗体によって受動的に形成される免疫抑制複合体の固体表面への付着によって開始する。固体表面の種類には、マイクロタイター

40

50

プレート、微粒子およびコーティングされた試験管などがあるが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 2 5 】

固体表面は、自動洗浄段階中にそれに結合した複合体を保持して、不活性な代謝物および干渉物質を除去できるようにするものである。洗浄段階後、固体表面（標的タンパク質または標的酵素）に直接結合しない複合体の側に向かう標識抗体を加え、混合し、そうして二重抗体サンドイッチアッセイを形成する。標識抗体を検出分子に連結し、それにより、固体表面によって捕捉された免疫抑制複合体の定量が可能となる。これらの抗体は、例えばポリクローナルまたはモノクローナル抗体であることができる。本発明はさらに、キメラ、一本鎖およびヒト化抗体、ならびに F a b 断片または F a b 発現ライブラリの産生物をも含むものである。そのような抗体および断片の製造には、当業界で公知の各種手順を用いることができる。

10

【 0 0 2 6 】

二重抗体「サンドイッチ」アッセイ技術を用いる免疫抑制複合体の単離および定量の基礎は、特有の血液タンパク質に対する各免疫抑制薬の高アフィニティおよびこれら複合体のそれぞれの、それらの特有の標的タンパク質に対する高アフィニティである。

【 0 0 2 7 】

シロリムスおよびタクロリムスは、F K B P 1 2 上の結合ドメインおよびそれを阻害する能力を共有する。F K B P 1 2 に結合したシロリムスは、ラパマイシンの哺乳動物標的（m T O R）と称される標的タンパク質と複合体を形成する。F K B P 1 2 に結合したタクロリムスは、カルシニューリン、複数のサブユニットからなるセリン/トレオニンホスファターゼ、カルシニューリン A およびカルシニューリン B、カルモジュリンおよびカルシウムを標的とする。

20

【 0 0 2 8 】

タクロリムス、カルシニューリンおよび F K B P 1 2 の複合体を含む血液の小分け検体を toa 固体表面結合抗カルシニューリン A または B 抗体に加えることで、免疫抑制複合体が固体表面に付着する。標識抗 F K B P 1 2 の添加によって、単離された複合体への検出分子の付着が可能となると考えられる（カルシニューリン - シクロスポリン A - シクロフィリン複合体の場合、標識抗体は抗シクロフィリンであると考えられる）。同じ原理を用いて、抗 F K B P 1 2 標識抗体とともに用いられる固体表面上の抗 m T O R 抗体が、F K B P - シロリムス - m T O R 免疫抑制複合体のアッセイを形成すると考えられる。

30

【 0 0 2 9 】

同一検体中のタクロリムスおよびシクロスポリン A の測定を可能とするには、微粒子抗体は抗カルシニューリン A または B であると考えられ、標識抗体は C s A には抗シクロフィリンであり、タクロリムスには抗 F K B P 1 2 であると考えられる。

【 0 0 3 0 】

同一検体中のタクロリムスおよびシロリムスの測定を可能とするには、固体表面抗体は抗 F K B P 1 2 であることができると考えられ、標識抗体はシロリムスには抗 m T O R であり、タクロリムスには抗カルシニューリン A または B であると考えられる。

【 0 0 3 1 】

40

本発明は、固体表面に共有結合的に付着した二次ヤギ抗マウスモノクローナル抗体を用いて、一次非共有結合的マウス抗体の添加によって、対象とする抗原（選択されたイムノフィリンまたは選択された標的）に特異的である抗体を有する固体表面を得ることを想到するものである。この方法によって、アッセイにおけるバックグラウンド比に対して高いシグナルとすることができる。

【 0 0 3 2 】

免疫複合体、固体表面および標識抗体の間の相互作用を、固体表面への検体の添加と標識抗体の添加の間の洗浄と同時（1 段階）または順次に（2 段階）行うことができる。

【 0 0 3 3 】

結合した標識抗体の量に比例するシグナルを生成する試薬の添加によって、検出および

50

定量が可能となる。

#### 【0034】

検出分子は、定量可能なシグナルを生成するものであればいかなるものであっても良い。シグナル発生分子には、アルカリホスファターゼ、ルミノール、西洋わさびペルオキシダーゼ、フルオレセイン、アクリジニウムおよび適切な抗体に結合した放射性標識などがあり得るが、それらに限定されるものではない。

#### 【0035】

複合体は、および対照と比較することで定量することができる。キャリブレーションおよび対照は、例えばタクロリムス測定の場合、精製カルシニューリンA & B、カルモジュリン、FKBP12、カルシウム、所定pHの緩衝液（サンプル結合環境を模倣する洗剤中でも可能）のカクテル中に滴定して校正用の複合体を形成する既知レベルのタクロリムスからなる。

#### 【0036】

免疫抑制薬タクロリムス、シロリムスおよびシクロスポリンAで形成された複合体の測定のためのアッセイの各種成分を示す例を、下記の表に挙げてある。

#### 【0037】

【表1】

| 薬剤       | 酵素結合タンパク質 | 酵素標的                                 | 必要な補因子                         | 固体表面抗体選択肢                  | 標識抗体選択肢                    |
|----------|-----------|--------------------------------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| タクロリムス   | FKBP12    | カルシニューリンA (CaNA)<br>カルシニューリンB (CaNB) | カルモジュリン<br>カルシウム <sup>2+</sup> | 抗FKBP12<br>抗CaNA<br>抗CaNB  | 抗FKBP12<br>抗CaNA<br>抗CaNB  |
| シロリムス    | FKBP12    | mTOR                                 |                                | 抗FKBP12<br>抗mTOR           | 抗FKBP12<br>抗mTOR           |
| シクロスポリンA | シクロフィリン   | カルシニューリンA<br>カルシニューリンB               | カルモジュリン<br>カルシウム <sup>2+</sup> | 抗CaNA<br>抗CaNB<br>抗シクロフィリン | 抗CaNA<br>抗CaNB<br>抗シクロフィリン |

#### 【0038】

留意すべき重要な点として、固体表面および標識抗体の両方を免疫抑制複合体に付着させるには2個の固有のエピトープが必要であることから、同じ抗体が標識抗体と固体表面抗体の両方であることはできない。

#### 【0039】

留意すべき点として、本明細書に記載の方法は、手動または自動の手段を用いることで実施することが可能である。自動手段とは、高い効率で生体液から成分を分析および測定するよう設計された技術的装置を意図したものである。

#### 【0040】

免疫抑制療法を受けていない患者からの無処理の血液中の血液免疫抑制複合体の検出を参照することによって、上記の好ましい実施形態を説明しているが、特定の免疫抑制薬の免疫抑制複合体が、前記薬剤による治療をすでに受けている患者でどの程度の量存在するかを測定するのに本発明を用いることができる。さらに、同じ血液検体を分割し、一つの部分を飽和濃度の薬剤で処理して、患者が固有の利用可能な成分とどの程度の量で免疫抑制複合体を形成可能であるかを予測することが可能であると考えられる。

#### 【0041】

これは、療法を受けている患者が所望の免疫抑制効果を達成できない場合には特に重要である。形成可能な理論上最大量の複合体の測定は、不十分な用量または免疫抑制応答を生じるのに必要な免疫複合体を形成する特定の血液成分の結合の間で区別を行う上で役立つ。

#### 【0042】

上記の薬剤タクロリムス、シロリムスまたはシクロスポリン A のいずれかによる免疫抑制療法を受けている患者から、採血を行うことができる。検体の一部を、適切な基質に溶かした療法で使用する過剰量の免疫抑制薬とともにインキュベートし、固体表面に結合した特異的抗体および検出マーカーにタグ付けされた抗体を用いて、上記の方法に従って複合体を測定する。これらの疎水性薬剤を可溶化する上で適切な基質には、有機溶媒または担体タンパク質を含む水系緩衝液などがあると考えられる。これによって、現在利用可能な未複合体化成分のかなりの割合が、「複合体の理論的最大数」として測定される複合体を形成することができる。検体の他の部分は、適切な基質中で用いられる過剰量の免疫抑制薬を使用せずに、適切な基質中でインキュベートし、複合体を上記の方法に従って測定する。これは、療法中に形成される（そして、患者の血液検体中にすでに存在する）複合体、すなわち「複合体の総数」を測定するものである。「複合体の理論的最大数」の分析および「複合体の総数」の比較によって、各患者について個別化した「理論的最大複合体のパーセント」の測定が可能となると考えられる。治療効果の範囲を確立することが可能であると考えられる。

10

#### 【0043】

複合体は、校正曲線との比較および較正值から逸脱した濃度の比較によって求められるものと考えられる。

#### 【0044】

この方法を用いて、免疫抑制効果が不十分である治療中の患者に対して投与すべき免疫抑制薬の追加量を選択することが可能であることは明らかであり、その場合に前記免疫抑制薬は、タクロリムス、シロリムスおよびシクロスポリン A からなる群から選択される。

20

#### 【0045】

本発明の別の実施形態では、上記の方法を、二重薬剤療法を受けている患者で用いることができる。これらの方法およびアッセイは、各薬剤によって形成される免疫抑制複合体の量の割合を測定することが可能であることは明らかであろう。対象の2薬剤を含む免疫複合体を、上記の複合体単離後に別個のアッセイで測定することが可能であると考えられる。2種類の複合体の測定には、固体表面に結合した抗体が2つの薬剤が共通に有するものである必要があると考えられる。2つの検体を固体表面に結合させ、洗浄した後、特異的標識抗体を加え、結果を各種の複合体についての別個の較正值と比較することになると考えられる。作製されたキャリブレーションと比較すると、同一検体中の2薬剤の割合の推定値を得ることができる。

30

#### 【0046】

本発明はまた、自動システムで用いられる上記の方法に基づいた診断アッセイをも包含するものである。これは、労働集約性および人力によるアッセイの経費を克服し、同時に比較的多数の検体の所定時間でのアッセイを可能にするものである。自動システムに使用可能な固体表面には、微粒子などがあるが、それに限定されるものではない。自動システムには、例えばIMx（登録商標）システム、アーキテクト（Architect）i2000およびアーキテクトi8000などがあるが、それらに限定されるものではない。

#### 【0047】

本発明の別の実施形態には、本明細書に開示の各免疫抑制薬に特異的な各標的酵素または標的タンパク質に向かう抗体を含む診断キットであって、そのキットにおいて一方の抗体が固体表面に結合し、他方の抗体が検出マーカーにタグ付けされる診断キットも含まれる。

40

#### 【0048】

以下、特に一つの薬剤の測定または同時に投与される2以上の薬剤の測定のためのアッセイの実施例によって本発明を説明する。これら実施例は、特許請求の範囲に対して制限を加えるものと解釈すべきではない。

#### 【0049】

##### 実施例 I

#### 【0050】

50

【表 2】

| アッセイ              | リガンドの単離            | 固体表面抗体              | 単離複合体<br>(リガンド)       | 標識抗体       |
|-------------------|--------------------|---------------------|-----------------------|------------|
| タクロリムス<br>(FK506) | 緩衝洗剤および／または有機溶媒混合物 | 抗カルシニューリンB (CnB) 抗体 | カルシニューリン／FK506／FKBP12 | 抗FKBP12抗体  |
| シクロスポリンA (CsA)    | 緩衝洗剤および／または有機溶媒混合物 | 抗カルシニューリンB抗体        | カルシニューリン／CsA／シクロフィリン  | 抗シクロフィリン抗体 |
| シロリムス<br>(ラパマイシン) | 緩衝洗剤および／または有機溶媒混合物 | 抗mTOR抗体             | mTOR／ラパマイシン／FKBP12    | 抗FKBP12抗体  |

【0051】

実施例 I I

【0052】

【表 3】

| アッセイの組み合わせ     | リガンドの単離             | 固体表面抗体           | 単離複合体<br>(リガンド)                                      | 接合抗体                          |
|----------------|---------------------|------------------|------------------------------------------------------|-------------------------------|
| タクロリムスおよびシロリムス | 温和な洗剤および／または有機溶媒混合物 | 抗FKBP12抗体        | FKBP12／ラパマイシン／mTOR<br>および<br>FKBP12／FK506／カルシニューリン   | 1) 抗mTOR抗体<br>2) 抗カルシニューリンB抗体 |
| タクロリムスおよびCsA   | 温和な洗剤および／または有機溶媒混合物 | 抗カルシニューリンAまたはB抗体 | カルシニューリン／FK506／FKBP12<br>および<br>カルシニューリン／CsA／シクロフィリン | 1) 抗シクロフィリン抗体<br>2) 抗FKBP12   |

10

20

---

フロントページの続き

(74)代理人 100103920

弁理士 大崎 勝真

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72)発明者 ドレングラー, スーザン・エム

アメリカ合衆国、イリノイ・60046、リンデンハースト、テイル・ロード・422

(72)発明者 ボージャー, ベネット・ダブリュ

アメリカ合衆国、イリノイ・60087、ウオーキガン、ドロシー・コート・4825

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 国際公開第95/024645 (WO, A1)

国際公開第96/018102 (WO, A1)

J. Biol. Chem., 2004年, Vol.279, No.1, p.772-778

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/53-579

G01N 33/15

|                |                                                  |         |            |
|----------------|--------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 測定血液标本中免疫抑制剤他克莫司，西罗莫司和环孢菌素A复合物的方法                |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP4862038B2</a>                      | 公开(公告)日 | 2012-01-25 |
| 申请号            | JP2008505563                                     | 申请日     | 2006-04-05 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 雅培公司                                             |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 雅培制药                                             |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 雅培制药                                             |         |            |
| [标]发明人         | ドレングラー・スーザン・エム<br>ボージャー・ベネット・ダブリュ                |         |            |
| 发明人            | ドレングラー,スーザン・エム<br>ボージャー,ベネット・ダブリュ                |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/53 G01N33/543 G01N33/15                   |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/9493 G01N2800/52 Y10T436/25 Y10T436/25375 |         |            |
| FI分类号          | G01N33/53.S G01N33/543.501.D G01N33/15.Z         |         |            |
| 代理人(译)         | 小野 诚<br>金山 贤教<br>Masarushin大崎                    |         |            |
| 优先权            | 60/668714 2005-04-06 US                          |         |            |
| 其他公开文献         | JP2008536126A                                    |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>                        |         |            |

# 摘要(译)

本发明提供了基于所述方法的方法，诊断测定和诊断试剂盒，以确定含有免疫抑制药物他克莫司，西罗莫司和环孢菌素A的免疫抑制复合物的水平，所述免疫抑制药物分别和组合，在药物治疗的患者的血液中或在患者候选人进行免疫抑制药物治疗。当使用自动化系统时，这些方法，测定和试剂盒特别有用。

| 薬剤       | 酵素結合タンパク質 | 酵素標的                                 | 必要な補因子                         | 固体表面抗体選択肢                  | 標識抗体選択肢                    |
|----------|-----------|--------------------------------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| タクロリムス   | FKBP12    | カルシニューリンA (CaNA)<br>カルシニューリンB (CaNB) | カルモジュリン<br>カルシウム <sup>2+</sup> | 抗FKBP12<br>抗CaNA<br>抗CaNB  | 抗FKBP12<br>抗CaNA<br>抗CaNB  |
| シロリムス    | FKBP12    | mTOR                                 |                                | 抗FKBP12<br>抗mTOR           | 抗FKBP12<br>抗mTOR           |
| シクロスポリンA | シクロフィリン   | カルシニューリンA<br>カルシニューリンB               | カルモジュリン<br>カルシウム <sup>2+</sup> | 抗CaNA<br>抗CaNB<br>抗シクロフィリン | 抗CaNA<br>抗CaNB<br>抗シクロフィリン |