

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5863047号
(P5863047)

(45) 発行日 平成28年2月16日 (2016. 2. 16)

(24) 登録日 平成28年1月8日 (2016. 1. 8)

(51) Int. Cl.	F 1		
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53	G	
GO 1 N 33/48 (2006. 01)	GO 1 N 33/48	B	
C 1 2 Q 1/32 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/32		
A 6 1 K 31/513 (2006. 01)	A 6 1 K 31/513		
A 6 1 P 35/00 (2006. 01)	A 6 1 P 35/00		

請求項の数 28 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2012-520842 (P2012-520842)	(73) 特許権者	304057634
(86) (22) 出願日	平成22年7月19日 (2010. 7. 19)		ミリアド ジェネティクス, インコーポ レイテッド
(65) 公表番号	特表2012-533739 (P2012-533739A)		アメリカ合衆国 ユタ 84108, ソ ルト レイク シティ, ワカラ ウェ イ 320
(43) 公表日	平成24年12月27日 (2012. 12. 27)	(74) 代理人	110001302
(86) 国際出願番号	PCT/US2010/042485		特許業務法人北青山インターナショナル
(87) 国際公開番号	W02011/009140	(72) 発明者	サロモーネ, サルヴァトーレ, ジェイ, アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 18 015, ベスレヘム, リサーチドライブ 116
(87) 国際公開日	平成23年1月20日 (2011. 1. 20)	(72) 発明者	ロア, ベンジャミン アメリカ合衆国 ユタ州 84108, ソ ルトレイクシティ, ワカラウェイ 320
審査請求日	平成25年7月19日 (2013. 7. 19)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	61/226, 589		
(32) 優先日	平成21年7月17日 (2009. 7. 17)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/324, 241		
(32) 優先日	平成22年4月14日 (2010. 4. 14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 5-FUをアッセイする方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

5 - フルオロウラシルまたはそのプロドラッグを投与された患者からの総ての血液サンプルにおける 5 - フルオロウラシルをアッセイする方法であって、前記方法が：

総ての血液サンプルが、取得された後 0 . 5 時間以内に、前記サンプル中の 5 - フルオロウラシルの劣化が 1 0 % 以下となるように、前記サンプル中のジヒドロピリミジン - デヒドロゲナーゼの活性を阻害するのに十分な量で、ジヒドロピリミジン - デヒドロゲナーゼの 1 以上の不活性化剤と体外で混合されるステップと；

前記総ての血液サンプル中の 5 - フルオロウラシルの量を決定するステップと；
を具えることを特徴とする方法。

【請求項 2】

5 - フルオロウラシルまたはそのプロドラッグを投与された患者からの総ての血液サンプルにおける 5 - フルオロウラシルをアッセイする方法であって、前記方法が：

5 - フルオロウラシルまたはそのプロドラッグを投与された前記患者から得られたサンプル中の 5 - フルオロウラシルを測定するステップであって、該サンプルが前記患者から取得された後 0 . 5 時間以内に、前記サンプル中の 5 - F U の劣化が 1 0 % 以下となるように、前記サンプル中のジヒドロピリミジン - デヒドロゲナーゼの活性を阻害するのに十分な量で、前記サンプルが前記患者から得られた後ジヒドロピリミジン - デヒドロゲナーゼの 1 以上の不活性化剤と体外で混合されるステップ；

を具えることを特徴とする方法。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載の方法において、該決定ステップまたは該測定ステップが、前記サンプルを 5 - フルオロウラシルと免疫反応性の抗体と接触させる工程を具えることを特徴とする方法。

【請求項 4】

請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の方法において、前記サンプルが取得後 10 時間以内に凍結されないことを特徴とする方法。

【請求項 5】

請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の方法において、前記不活性化剤がピリミジンまたはピリジンの誘導体であることを特徴とする方法。

10

【請求項 6】

請求項 5 に記載の方法において、前記不活性化剤がエニルウラシルまたはギメラシルであることを特徴とする方法。

【請求項 7】

請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の方法において、前記不活性化剤の存在下で 5 - フルオロウラシルが測定されることを特徴とする方法。

【請求項 8】

請求項 1 又は 2 に記載の 5 - フルオロウラシルをアッセイする方法において、該 5 - フルオロウラシルのアッセイのため研究室へ、ジヒドロピリミジン - デヒドロゲナーゼの 1 以上の不活性化剤と体外で混合させた前記総ての血液サンプルを送るステップを具えることを特徴とする方法。

20

【請求項 9】

請求項 8 に記載の方法において、前記サンプルが取得後 10 時間以内に凍結されないことを特徴とする方法。

【請求項 10】

請求項 8 又は 9 に記載の方法において、前記不活性化剤がピリミジンまたはピリジンの誘導体であることを特徴とする方法。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の方法において、前記不活性化剤がエニルウラシルまたはギメラシルであることを特徴とする方法。

30

【請求項 12】

請求項 1 又は 2 に記載の方法で用いるための組成物であって、該組成物が、ジヒドロピリミジン - デヒドロゲナーゼの不活性化剤と混合された、5 - フルオロウラシルを投与した患者から分離された総ての血液サンプルであり、前記不活性化剤が前記総ての血液サンプルと体外で混合されることを特徴とする組成物。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の組成物において、前記不活性化剤がピリミジンまたはピリジンの誘導体であることを特徴とする組成物。

【請求項 14】

請求項 1 又は 2 に記載の方法で用いるための組成物であって、ジヒドロピリミジン - デヒドロゲナーゼの不活性化剤と混合した 5 - フルオロウラシルと選択的な免疫反応性を有する抗体を含むことを特徴とする組成物。

40

【請求項 15】

請求項 14 に記載の組成物が、ポリマーまたは基板と結合された複数の 5 - フルオロウラシル分子を更に含み、前記抗体が固体支持体に取り付けられることを特徴とする組成物。

【請求項 16】

請求項 1 又は 2 に記載の方法で用いるためのキットであって、容器中に：
前記総ての血液サンプルと体外で混合されるジヒドロピリミジン - デヒドロゲナーゼの不活性化剤と；

50

前記総ての血液サンプルを10以下の温度に冷却するための冷却材と；
を含むことを特徴とするキット。

【請求項17】

請求項16に記載のキットにおいて、前記不活性化剤がピリミジンまたはピリジンの誘導体であることを特徴とするキット。

【請求項18】

請求項16又は17に記載のキットにおいて、前記不活性化剤が少なくとも850ng/mlの濃度であることを特徴とするキット。

【請求項19】

請求項1又は2に記載の方法で用いるためのアッセイ用のキットであって、コンパートメントに分けられたコンテナ内に、(1)5-フルオロウラシルと選択的に免疫反応性を有する抗体と、(2)ジヒドロピリミジン-デヒドロゲナーゼの不活性化剤とを含むことを特徴とするキット。

10

【請求項20】

請求項19に記載のキットが、ポリマーまたは基板と結合された複数の5-フルオロウラシル分子を更に含み、前記抗体が固体支持体に取り付けられることを特徴とするキット。

【請求項21】

請求項19又は20に記載のキットが、別のコンパートメントに、5-フルオロウラシルを更に含むことを特徴とするキット。

20

【請求項22】

請求項19ないし21のいずれか1項に記載のキットにおいて、5-フルオロウラシル抗体およびジヒドロピリミジン-デヒドロゲナーゼの不活性化剤がキット中の別のコンパートメントに存在することを特徴とするキット。

【請求項23】

請求項1又は2に記載の方法で用いるための転送シリンジアセンブリであって：

転送シリンジのチャンバーを規定するバレルであって、前記バレルの終端から延びる端部を有するバレルと；

前記バレルのチャンバー内に摺動自在に挿入されたプランジャと；

端部に装着され、前記端部に沿って縦方向に前記バレルの終端から延びる端部シールドと；

30

前記端部または端部シールドと駆動可能に接続され、前記端部シールドと結合することで前記端部をシールする端部キャップと；

を具備することを特徴とする転送シリンジアセンブリ。

【請求項24】

請求項23に記載の転送シリンジアセンブリが、前記チャンバー中に、ジヒドロピリミジン-デヒドロゲナーゼの不活性化剤の溶液を更に含むことを特徴とする転送シリンジアセンブリ。

【請求項25】

請求項1又は2に記載の方法で用いるための転送シリンジアセンブリであって：

40

転送シリンジのチャンバーを規定するバレルであって、前記バレルの終端から延びる端部を有するバレルと；

前記バレルのチャンバー内に摺動自在に挿入されたプランジャと；

前記端部と駆動可能に接続した針状部を有する針状部カバーであって、前記針状部カバーが、針状部の周りに同軸状に配置された通常チューブ状の部材と、針状部に沿って針状部の尖った先端部を超えて延びる針状部の壁部と、を有する針状部カバーと；

を具備することを特徴とする転送シリンジアセンブリ。

【請求項26】

請求項25に記載の転送シリンジアセンブリが、患者サンプルを含む、穴明け可能なキャップを有するサンプル収集チューブであって、前記サンプル収集チューブが針状部カバ

50

ー内に挿入され、針状部が穴明け可能なキャップを介してサンプル収集チューブに挿入されるサンプル収集チューブを更に具えることを特徴とする転送シリンジアセンブリ。

【請求項 27】

請求項 25 又は 26 に記載の転送シリンジアセンブリが、前記チャンバー中に、ジヒドロピリミジン - デヒドロゲナーゼの不活性化剤の溶液を更に含むことを特徴とする転送シリンジアセンブリ。

【請求項 28】

請求項 16 ないし 22 のいずれか 1 項に記載のキットが、請求項 23 ないし 27 のいずれか 1 項に記載の転送シリンジアセンブリを更に具えることを特徴とするキット。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般的には診断テストに関し、特に患者試料中の 5 - フルオロウラシルをアッセイするための組成物および診断方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

5 - フルオロウラシル (5 - F U) は、がん治療の中で最も重要な化学療法剤の一つである。それは、一般的に、大腸、胃、乳がん、膵臓がんの様々な化学療法レジメンで使用されている。例えば、単独の 5 - F U、または、F O L F O X および F O F I R I などの併用レジメンにおける 5 - F U は、転移性結腸直腸がんにおける標準的な一次治療法である。しかし、5 - F U は、頻繁に骨髄抑制、粘膜炎、皮膚炎、下痢、心毒性や死を含めた重篤な副作用に関連付けられている。これらの副作用は、個々の患者のための線量測定への現在のアプローチによって少なくとも部分的に引き起こされる。投与ボディ表面積 (B S A) のための現在の標準治療は患者の身長と体重のみを考慮している。B S A は、遺伝子型、年齢、性別、疾患の状態、薬物相互作用、臓器機能、合併症などの 5 - F U の代謝と薬効に影響を与える要因の多くは考慮されていない。そのため、異なった患者の 5 - F U の血中濃度が、B S A ベースで等しい用量投与にもかかわらず、10 倍以上異なることは、そう驚くことではない。

20

【0003】

最近の学術研究は、血漿 5 - F U 濃度の薬物動態学的モニタリングに基づく個々の 5 - F U の用量調整は、大幅に改善された 5 - F U の客観的奏効率の結果となることを示している。例えば、Gemelin et al., J. Clin. Oncol., 26 (13) : 2099 - 2105 (2008) ; Climente - Marti et al., J. Pharmaceut. Sci., 92 (6) : 1155 - 1165 (2003) ; Milano et al., Int. J. Cancer, 41 : 537 - 541 (1988) を参照のこと。これらの研究は、5 - F U 療法を受けた個々の患者における 5 - F U の血中濃度の臨床試験が、5 - F U の投与量の調節の目的、治療効果の最適化、および重篤な副作用の軽減のために明らかに望ましいことを示唆している。

30

【発明の概要】

【0004】

本発明は、一般的に、患者のサンプルで 5 - フルオロウラシル (5 - F U) を測定する方法を提供する。

40

【0005】

第一の態様において、5 - F U および任意に他の治療薬を投与した患者からのサンプルにおいて 5 - F U をアッセイする方法が提供される。この方法では、サンプルは 5 - F U 投与患者から取得される。次いで、サンプルはジヒドロピリミジン - デヒドロゲナーゼ (D P D) の不活性化剤と混合され、5 - F U の量は、サンプル好ましくは D P D 不活性化剤との混合物で測定される。

【0006】

50

他の態様において、本発明は以下の工程を備える 5 - F U で患者を治療する方法を提供する：5 - フルオロウラシルの第 1 の量を投与する工程；5 - F U を投与した患者から得られたサンプル中の 5 - F U の量を決定する工程であって、前記サンプルが D P D の不活性化剤と体外で混合され、前記サンプル中の 5 - F U の量が好ましくは不活性化剤の存在で測定される工程；および、5 - F U の第 2 の量を患者に投与する工程。第 2 の量で投与された 5 - F U の量は、所定の最適なターゲットとなる 5 - F U A U C を参照して、患者のサンプルで測定された 5 - F U のレベルに基づいて決定することができる。

【 0 0 0 7 】

また、本発明は、5 - F U のアッセイのために、5 - F U および任意の他の薬剤で治療を受けている患者からの血液サンプルを処理する方法を提供する。一実施形態において、この方法は以下の工程を含む：5 - F U を投与した患者から 5 - F U を含む血液サンプルを得る工程；血液サンプルから血漿を分離する工程；D P D の不活性化剤と分離した血漿を混合して混合物を形成する工程；および、混合物中の 5 - F U のレベルの診断テストのための研究室へ混合物を送る工程。

10

【 0 0 0 8 】

別の実施形態において、この方法は以下の工程を含む：5 - F U を投与した患者から 5 - フルオロウラシルを含む血液サンプルを得る工程；D P D 不活性化剤と血液サンプルを混合して混合物を形成する工程；および、混合物から 5 - フルオロウラシルおよび不活性化剤を含む血漿を分離する工程。こうして得られた血漿は 5 - F U をアッセイするための研究室に送ることができる。

20

【 0 0 0 9 】

さらに別の実施形態において、5 - F U を投与した患者から血液サンプルを処理する方法は以下の工程を必要とする：患者から 5 - F U を含む血液サンプルを得る工程；D P D 不活性化剤と血液サンプルを混合して混合物を形成する工程；および、5 - F U をアッセイするための研究室に混合物を送る工程。

【 0 0 1 0 】

本発明のさらに別の態様において、ジヒドロピリミジン - デヒドロゲナーゼの不活性化剤と混合して、5 - F U を投与した患者から分離されたサンプルを含む組成物が提供され、前記試料が血液、血漿、または血清であり、不活性化剤は組成物中において少なくとも 8 5 0 n g / m l の濃度である。

30

【 0 0 1 1 】

別の態様において、本発明は、容器中に以下のものを有するキットを提供する：(a) 少なくとも 8 5 0 n g / m l の濃度の D P D の不活性化剤との混合物中で、5 - F U 投与患者から分離されたサンプル(血液、血漿または血清)；および(b) 前記サンプルを 1 0 以下の温度に冷却するための手段。

【 0 0 1 2 】

本発明の種々の態様において、好ましくは、試料は、前記患者から分離した後 5 乃至 1 0 時間以内に凍結されていない。不活性化剤の例としては、例えば、ピリミジンまたはピリジン誘導体、特に、エニルウラシル、ギメラシルなどのウラシル類縁体を含む。5 - F U は、5 - F U に対する抗体を用いて、例えば、H P L C、質量仕様、またはイムノアッセイなどの任意の公知技術によって、サンプルでアッセイすることができる。

40

【 0 0 1 3 】

特に定義しない限り、ここで使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する当業者によって理解されるものと同じ意味を持っている。ここに記載されている方法および材料と類似または等価の方法および材料は、本発明の実施または試験において使用することができるが、好適な方法および材料は以下のとおりである。不一致の場合には、定義を含む本明細書が制御する。さらに、材料、方法、および実施例は一例であり、限定されることは意図されていない。

【 0 0 1 4 】

本発明の他の特徴及び利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかであ

50

ろう。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】図1は、クリニックの設定で実装されたサンプル処理方法の一例を示す図である。

【図2】図2は、エニルウラシルが血液サンプル中の5-FUの分解を防ぐのに有効であることを示すグラフである。

【図3】図3は、5-ビニルウラシル、5-ヨードウラシルおよびギメラシルが、すべての血液サンプルで5-FUの安定化に有効であったことを示すグラフである。

【図4】図4は、血液中のギメラシルの低濃度が、5-FUのDPD介在分解の阻害に有効であることを示すグラフである。

【図5】図5は、長時間の間血漿分離することなく血液中にギメラシルを維持する効果を示すグラフである。

【図6】図6は、シリンジアセンプリを転送する実施形態を示す図である。

【図7】図7A及び図7Bは、シリンジアセンプリを転送する実施形態を示す図である。

【図8】図8は、シリンジアセンプリを転送する実施形態を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

I. サンプルの調製、5-FUのアッセイ、組成物およびキット

本発明の第一の態様において、5-FUアッセイで使用するために（例えば、5-FUまたは5-FUのプロドラッグで治療した患者から）5-FUを含む患者サンプルを処理する方法が提供されている。方法は、サンプル中の5-フルオロウラシルの安定性の向上、および、5-FUの測定精度の大幅な改善をもたらす。従って、別の態様において、本発明は、また、処理方法に従って処理した患者サンプルを用いて5-FUをアッセイする方法を提供する。一般に、処理方法は、（例えば、5-FUまたは5-FUのプロドラッグを投与した患者から）5-FUを含むサンプルを得る工程；サンプルをジヒドロピリミジン-デヒドロゲナーゼの不活性化剤と混合して混合物を形成する工程；および、混合物中の5-FUをアッセイするために研究室に混合物を送る工程；を含む。

【0017】

なお、本発明の実施形態は5-FUで処理された患者から得られた患者サンプルに関連して詳細に説明しているが、本発明は、また、5-FUのプロドラッグで処理された患者から得られた患者サンプルを包含することに留意されたい。このようなプロドラッグ（例えば、テガフル、ドキシフルリジン、およびカペシタピン）は、代謝的に患者の体内で活性化し、5-FUに変換される。

【0018】

本発明で用いられる5-FUを含む患者のサンプルは、5-FUのレベルが測定される5-FUを投与されたすべての患者から得ることができる。それは、また、テガフル、ドキシフルリジンおよびカペシタピンなどの一またはそれ以上の5-FUのプロドラッグを投与した患者から得ることができる。例えば、5-FUは、一般的に、乳がん、肺がん、大腸がん、膵臓がんや頭頸部がんの患者を含むがん患者の化学療法で使用されている。5-FUはまた、線維柱帯切除術のサイトで抗がん痕化剤として緑内障患者の眼科手術に使用されている。さらに、5-FUは、ポーエン病、日光角化症、皮膚の基底細胞がんを治療するためのクリームとして局所的に使用されている。本発明の方法は、特に、がん患者のサンプルにおける5-FUのアッセイのために有利である。これに関連して、患者は5-FUを含む治療レジメンを受けているがん患者にすることができる。たとえば、5-FUは、通常、葉酸またはロイコボリンと一緒に投与される。転移性大腸がんにおいて、5-FUは、しばしば、FOLFOX（5-FU+オキサリプラチンとロイコボリン）とFOLFIRI（5-FU+イリノテカンおよびロイコボリン）などの併用療法で使用されている。ペバシズマブ、セツキシマブおよびパニツムマブのような新しい薬は、また、レジメンに追加することができる。本発明は、このようなレジメンで治療を受けている患

10

20

30

40

50

者から得られたサンプルで5-FUをアッセイすることにおいて、また特定の患者への投与量を最適化するために適用可能である。

【0019】

本発明での使用に適した患者サンプルは、患者の身体の中の部分からも得ることができる。例えば、適当なサンプルは、腫瘍組織、血液、血漿、血清、尿などの組織または体液サンプルとすることができる。

【0020】

がん治療において、5-フルオロウラシルは、通常、静脈内ボラス注射または静脈内注入により投与される。投与は、治療法の選択に応じて、毎日、毎週、4週間毎に繰り返すことができる。ボラス注射は、1から10分以上または20から60分以上与えることができ、例えば、5日間連続して6サイクルごとに4週間繰り返すことができる。連続点滴静脈注入において、5-FUは、数時間を超えて、例えば、毎週8時間かけて投与することができる。血液サンプルは、5-FUの投与前、投与後または投与中にいつでも、患者から取得することができる。多くの場合、定常状態で血液の5-FU濃度を測定することが望ましく、その場合、定常状態に達した後の血液サンプルを取得する。8時間持続注入の例では、定常状態は注入の開始後2時間で到達することができる。

10

【0021】

一般に、血液サンプルは、末梢静脈血を取得する任意の従来の方法で収集することができる。例えば、血液サンプルは、通常、クリニックで使用されているチューブまたはバイアルに収集することができる。採取した血液の量は、特定の5-FUのアッセイに必要な量に依存する。例えば、1ミリリットル、2ミリリットル、5ミリリットル、10ミリリットルは、5-FUアッセイのほとんどの種類に十分な量である。必要に応じて、EDTAまたはヘパリンは、血液凝固を防ぐために血液サンプルと混合することができる。混合は、例えばヘパリン化チューブまたはEDTAチューブを用いることによって、達成することができる。

20

【0022】

本発明によれば、5-FUを含む得られた患者のサンプルが、次にジヒドロピリミジン-デヒドロゲナーゼ(DPD)の不活性化剤と体外で混合され、DPDの活性化を阻害するとともに5-FUの劣化を防ぐ。DPD不活性化剤が患者サンプルに添加され共に混合される前に、患者のサンプルは約0℃の温度で例えば約5分間以上冷却される。しかし、好ましくは、患者のサンプルは、患者の身体から分離した後迅速に、DPD不活性化剤と混合される。得られた混合物(DPD不活性化剤と混合した患者サンプル)はその後、サンプル中の5-FUの量またはレベルまたは濃度を測定するための研究室に送られる。

30

【0023】

一実施形態において、5-FUのアッセイのために患者のサンプルを処理する方法は、5-FUまたは5-FUのプロドラッグを投与した患者から5-フルオロウラシルを含む血液サンプルを得る工程と、血液サンプルをDPD不活性化剤と混合して混合物を形成する工程と、必要に応じて患者サンプル中の5-FUの量を測定するため研究室に混合物を送る工程と、を備える。

【0024】

別の実施形態において、5-FUのアッセイのために患者のサンプルを処理する方法は、5-FUまたは5-FUのプロドラッグで処理された患者から5-FUを含む血液サンプルを得る工程と、血液サンプルをジヒドロピリミジン-デヒドロゲナーゼの不活性化剤と混合して混合物を形成する工程と、混合物から5-FUおよび不活性化剤を含む血漿を分離する工程と、必要に応じて5-FUレベルをアッセイするために血漿を研究室に送る工程と、を備える。好ましい実施形態において、混合ステップは、血液サンプルは患者から引き出された後迅速に実行される。すなわち、血液サンプルが患者の身体から分離された後、DPD不活性化剤が添加され、できるだけ早く採取した血液サンプルと混合すべきである。また、好ましくは、DPD不活性化剤と混合された血液サンプルから血漿を分離するステップは、血液が取り出された時点から、4乃至5時間以内、好ましくは1時間以内に

40

50

実行される。

【0025】

別の実施形態において、5-FUのアッセイのために患者のサンプルを処理する方法は、5-FUまたは5-FUのプロドラッグで処理された患者からの5-FUを含む血液サンプルを得る工程と、血液サンプルから血漿を分離する工程と、分離した血漿をDPD不活性化剤と混合して混合物を形成する工程と、5-FUのレベルを測定するために研究室に混合物を送る工程と、を備える。

【0026】

図1は、サンプルの処理方法が診療所でどのように実施することができるかを示している。図1に示すように、DPD不活性化剤注射器（DPD不活性化溶液を含む）と転送デバイス
10
を準備する。具体的には、DPD不活性化剤注射器（図6も参照）のキャップがはずされ、注射器はBD転送デバイス（図7も参照）に接続され、血液サンプルが収集されるまで組み合わせたユニットを保持する。図1に示すように、患者の血液を取り出すことができる。具体的には、患者が所定の注入速度で5-FUを連続的に注入されている間に、血液を6-mLのK2-EDTA Vacutainer（登録商標）チューブに取り出すことができる。血液は、5-FUの連続注入を開始した後少なくとも2時間で、注入ポートからではなく、末梢静脈から引き出される。血液は、例えば少なくともチューブが全量の3/4、好ましくはmg/m²換算で投与された5-FUの正確な量となるまで、引き出され、総注入時間が記録される。図1に示すように、DPD不活性化溶液は、次いで、
20
直ちに血液サンプルチューブに分注される。具体的には、結合された注射器転送装置ユニットは、K2-EDTAチューブを介して接続され、しっかりとチューブストッパーを介して挿入されており、その後注射器プランジャが完全に押される。次いで、サンプルは、少なくとも3回反転させることで静かに混合される。血漿は、10分間で1500g乃至2000gに遠心分離により分離される。最後に、図1に示すように、半分以下の血漿が、使い捨てピペットで除去され、3-mLのCryovial（登録商標）チューブに移される。具体的には、血漿中に先端を挿入する前に、使い捨てピペットのバルブが絞られる。その後、ピペットの先端が透明な血漿層の上部の下に挿入され、バルブはゆっくりと解放される。血漿が引かれるので、ピペットはチューブを追跡する。透明な血漿層の半分以下がピペットに引き取られ、繰り返し吸引は、血漿と赤血球との間の軟膜/細胞層を乱さないように、回避される。血漿は、ピペットからストレージおよび5-FUの分析用の
30
3-mLのクライオバイアルチューブに転送される。

【0027】

DPDの不活性化剤は一般に当該分野で知られている。DPD（ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ、EC 1.3.1.2）は、5,6-ジヒドロピリミジンにピリミジンの可逆的な還元
40
の触媒作用を及ぼす酵素である。ここで使用されるように、用語「DPDの不活性化剤」やその言い換えは、DPDの酵素活性化すなわちピリミジンまたは5-FUの還元
の触媒作用を及ぼす能力を阻害する、任意の有機または無機分子を意味する。用語「DPDの不活性化剤」は、5-FUを包含していない。不活性化の例としては、例えば、ピリミジン誘導体、ピリジン誘導体およびバルビツリック酸誘導体がある。いくつかの実施形態において、DPD不活性化剤は、DPD阻害剤、好ましくは不可逆的なDPD
40
阻害剤である。いくつかの実施形態において、DPD不活性化剤は、ウラシル誘導体、すなわち、ハロゲン原子、C₂₋₄アルケニル基、C₂₋₄ハロアルケニル、C₂₋₆アルキニル基、C₂₋₆ハロアルケニル基、シアノ基、C₁₋₄アルキル基、および、C₁₋₄ハロアルキル基から選択された構成成分により5位で置換されたウラシル化合物である。特定の実施形態において、DPD不活性化剤は、エニウラシル、5-プロピニルウラシル、5-シアノウラシル、5-プロモエチニルウラシル、5-(1-クロロビニル)ウラシル、5-ヨードウラシル、5-プロモビニルウラシル、(E)-5-(2-プロモビニル)ウラシル、5-ヘキサ-1-イニルウラシル、5-ビニルウラシル、5-トリフルオロウラシル、5-プロモウラシル、および5-(2-プロモ-1-クロロビニル)ウラシルからなる群から選択されたウラシル誘導体である。いくつかの実施形態において、使用
50

されるDPD不活性化剤は、バルビツール酸の誘導体、2,4-ジヒドロキシピリジンの誘導体、および2,6-ジヒドロキシピリジンの誘導体から選択される。いくつかの実施形態において、DPD不活性化剤はピリジン誘導体である。特定の実施形態において、使用されるDPD不活性化剤は、ギメラシル(5-クロロ-2,4-ジヒドロキシピリジン)または3-シアノ-2,6-ジヒドロキシピリジンである。

【0028】

語句「DPD不活性化剤」が本明細書中で使用されているが、この開示を知らされた当業者には明らかなように、実際には「一またはそれ以上のDPD不活性化剤」を意味している。具体的には、単一のDPD不活性化剤または二またはそれ以上のDPD不活性化剤の組み合わせが、単一の患者サンプルと混合することができる。一般に、一またはそれ以上のDPD不活性化剤は、患者サンプル(例えば、尿、全血、血清または血漿)中のDPD活性を実質的に抑制するのに十分で、サンプルの取り扱いと保管の通常の下で、5-FUのアッセイが完了できる十分な時間の間、重要で有意義なサンプル中の5-FUの劣化の防止のために十分な混合物の最終濃度に到達するように、全量で使用される。例えば、患者サンプル内の任意のDPD不活性化剤の合計最終濃度は、約1ng/ml乃至約60μg/mlまたはそれ以上までの範囲に及ぶ。別の例においては、一またはそれ以上のDPD不活性化剤が、患者サンプル中のDPD活性を阻害するのに十分な量で、患者サンプル中に添加され混合され、その結果、サンプルが患者から取得され室温(約25℃)以下の温度に置かれた後、約0.5時間以内に患者サンプル中の5-FUの劣化は10%以下であり、好ましくは、サンプルが患者から取得され室温以下の温度に置かれた後、約10時間以内に患者サンプル中の5-FUの劣化は10%以下である。当業者には明らかなように、使用されるDPD不活性化剤の量は、特定のDPD不活性化剤の阻害活性、および、特定のサンプル中のDPDの量に応じて異なる。以下の例に示すように、当業者であれば、日常的な実験により、容易に、いかなるDPD不活性化剤の最適用量をも決定することができる。

【0029】

本発明の方法によって処理されたサンプルは、それらが引き取られた後であってアッセイ前におけるサンプル中の5-FUの劣化が最小となるため、5-FUレベルのアッセイで使用するのに特に適している。従って、本発明は、さらに5-FUまたはそのプロドラッグを投与した患者から患者サンプル中の5-FUを測定する方法を提供する。方法は、一般的に少なくとも以下の工程を含む: 上述したように5-FUまたはそのプロドラッグを投与した患者から得られた処理された患者サンプルを提供する工程であって、サンプルが体外でジヒドロピリミジン-デヒドロゲナーゼ(DPD)酵素の不活性化剤と混合される工程; および、サンプル中の5-FUの量を測定する工程。いくつかの実施形態において、試料中の5-FUの量は、DPD不活性化剤の存在下で測定される。

【0030】

一実施形態において、5-FUをアッセイする方法は、5-FUを投与した患者から5-フルオロウラシルを含む血液サンプルを得る工程と; 血液サンプルをDPD不活性化剤と混合して混合物を得る工程と; 混合物中の5-FUの量を測定する工程と; を備える。

【0031】

別の実施形態において、5-FUをアッセイする方法は、5-FUで治療された患者から5-FUを含む血液サンプルを得る工程と; 血液サンプルをDPD不活性化剤と混合して混合物を得る工程と; 混合物から血液サンプルと不活性化剤とを含む血漿を分離する工程と; 血漿中の5-FUの量を測定する工程と; を備える。好ましい実施形態において、DPD不活性化剤と混合した血液サンプルから血漿を分離するステップは、血液が取り出された時点から4乃至5時間以内、好ましくは1時間以内実施される。

【0032】

別の実施形態において、5-FUをアッセイする方法は、5-FUで治療された患者から5-FUを含む血液サンプルを得る工程と; 血液サンプルから血漿を分離する工程と; 分離した血漿をDPD不活性化剤と混合して混合物を形成する工程と; 混合物中の5-FU

10

20

30

40

50

の量を測定する工程と；を含む。

【0033】

当技術分野で公知の任意の5-FUアッセイ技術は、本発明の方法によって得られたサンプル中の5-FU濃度を測定するために使用される。例えば、HPLCにより定量的に5-FUをアッセイするための方法は、一般に当該分野で知られている。ガス液体クロマトグラフィー（GLC）およびGC-MSは、一般的に5-FU濃度を測定するために使用されている。液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC-MSMS）は、5-FUの定量化のためにますます人気がある。また、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第7,205,116号は、5-FUと特異的に免疫反応性を示す抗体を使用して血漿サンプル中の5-FUの定量化のための5-FUイムノアッセイを開示している。

10

【0034】

従って、一実施形態において、本発明の5-FUをアッセイする方法は、イムノアッセイを用いて5-FUまたはそのプロドラッグを投与した患者から得られた5-FUを含む患者サンプル中の5-FUを測定する工程を含み、患者サンプルは患者から取得された後DPD不活性化剤と体外で混合される。すなわち、測定ステップは、5-FUを含む患者のサンプルを5-FUと免疫学的に活性な抗体に接触させる工程と、抗体に対する5-FUの結合を決定する工程と、を含む。5-FU抗体は当技術分野で知られており、例えば、米国特許第7,205,116号に開示されている。患者サンプルは、血液、血清、血漿、尿等が挙げられ、好ましくは上記のサンプル処理方法によって調製された血漿サンプルとすることができる。好ましくは、5-FU抗体に対し5-FUの結合を決定するステップは、上述したように、例えば5-ヨードウラシル、5-ビニルウラシル、エニルウラシルまたはギメラシルなどのDPD不活性化剤の存在下で行われる。

20

【0035】

以下に例示の例において、5-FUは、米国特許第7,205,116号に開示された抗体を用いて、オリンパスAU680アナライザにより抗体ベースの凝集アッセイを用いて測定された。具体的には、2つの独立した試薬が提供されており：第1試薬は、ポリマーまたは基板に結合した5-FUの複数の分子を含み、第2試薬は、固体支持体（例えば、ナノ粒子またはビーズ）に接続された複数の5-FU抗体を含む。2種類の試薬が遊離5-FUの不存在下で混合されると、それらはナノ粒子の大きな凝集体を形成して光を散乱させ、結果として高い吸収値を示す。遊離5-FUの存在下、例えば、5-FUを含む患者サンプルと混合させたとき、凝集反応がやや抑制され、光の散乱もほとんどなく、低吸収値を示す。従って、サンプル中の5-FUの濃度は、第1及び第2の試薬による凝集の量によって決定されているサンプルの吸光度に基づいて測定される。機器は5-FUの異なる既知濃度の複数の標準サンプルで較正され、標準曲線が生成される（5-FU濃度対吸光度）。個々のサンプルからの吸光度の値は、濃度を決定するために、この曲線と比較される。

30

【0036】

従って、特定の態様において、本発明のアッセイ法における5-FUを測定する工程は、ポリマーまたは基板と接合した複数の5-FU分子を有する第1試薬と、固体支持体に取り付けられた複数の5-FU抗体を有する第2試薬とを、5-FUを含む患者サンプルの存在下で接触させる工程と、第1および第2試薬の凝集を決定する工程と、を備える。患者サンプルは、血液、血清、血漿、尿等が挙げられ、好ましくは上記のサンプル処理方法によって調製された血漿サンプルとすることができる。好ましくは、5-FU抗体に対する5-FUの結合を決定する工程は、上述したように例えば5-ヨードウラシル、5-ビニルウラシル、エニルウラシルまたはギメラシルなどのDPD不活性化剤の存在下で実行される。

40

【0037】

従って、別の態様において、本発明はまた、(1)5-FUと選択的に免疫学的に活性な抗体および(2)DPD不活性化剤を備える組成物を提供する。一実施形態において、組成物は、(1)5-FUと選択的に免疫学的に活性な抗体および(2)DPD不活性化

50

剤の混合物中に、5-FUを含み5-GUまたはそのプロドラッグから取得された患者サンプル（血液、血清、血漿、尿など）を備える。好ましくは、抗体は、実質的にDPD不活性化剤と免疫学的に活性でなく、組成物中の実質的にすべての5-FU分子に結合するのに十分な組成物の量である。好ましくは、組成物中の抗体が、25%未満好ましくは15%未満であり、DPD不活性化剤との交差反応性を持っている。抗体の例としては、米国特許第7,205,116号に開示されているものを含む。好適なDPD不活性化剤は、上述したように、例えばギメラシル、5-ヨードウラシル、5-ビニルウラシル、エニルウラシルを含むが、上記に限定されない。組成物に含まれるDPD不活性化剤の量もまた上述されている。好ましくは、DPD不活性化剤が、少なくとも600ng/mlまたは少なくとも850ng/mlの量で組成物中に含まれている。

10

【0038】

一実施形態において、組成物は、(1)固体支持体に取り付けられ、5-FUと選択的な免疫反応の活性を有する複数の抗体；(2)ポリマーまたは基板と結合した複数の5-FU分子；および(3)DPD不活性化剤；を備える。好ましくは、組成物中の抗体が、25%未満、好ましくは15%未満の、DPD不活性化剤との交差反応性を有している。必要に応じて、組成物は、さらに5-FUを含み5-FUまたはそのプロドラッグで治療された患者から得られた、患者サンプル（血液、血清、血漿、尿等）を含む。

【0039】

また、本発明は、DPD不活性化剤との混合物中に、5-FUあるいはそのプロドラッグを投与した患者から分離されたサンプルを含む組成物を提供する。好ましくは、DPD不活性化剤はギメラシルである。また好ましくは、試料は、血液、血漿、または血清であり、不活性化剤は、組成物中少なくとも600、850、1000、1200、2000または4000ng/mlの濃度である。

20

【0040】

別の態様において、本発明は、容器中に：少なくとも600ng/ml、850ng/ml、1000ng/ml、1200ng/ml、2000ng/mlまたは4000ng/mlの濃度のDPD不活性化剤との混合物中に、5-FUまたはそのプロドラッグを投与した患者から分離されたサンプル（血液、血漿または血清）を有するキットを提供する。必要に応じて、キットはさらに10以下の温度に試料を冷却するための手段を含む。発泡スチロールの箱または宅配便の封筒などの容器に試料を冷却するために、Polar Pack（登録商標）（テグラント）やThermoSafe（登録商標）などの冷却パックを使用することができる。定期的に氷またはドライアイスを使用することもできる。

30

【0041】

区分容器中に、(1)固体支持体に取り付けられ、5-FUと選択的な免疫反応の活性を有する複数の抗体；(2)ポリマーまたは基板と結合した複数の5-FU分子；および(3)DPD不活性化剤；を備えるアッセイキットも提供される。好ましくは、組成物中の抗体が、25%未満、好ましくは15%未満の、DPD不活性化剤との交差反応性を有する。キットはまた、必要に応じて、標準材料として使用するための5-FUを独立したコンパートメントに含む。キットは、与えられた任意の患者サンプル中の5-FUレベルを決定するための便利で使いやすい方法の使用を可能とする。

40

【0042】

本発明の各種の態様において、DPD不活性化剤との混合物中の患者サンプルは、好ましくは、患者から分離した後1時間、2時間、3時間、4時間以内または5乃至48時間以内に凍結されない。

【0043】

5-FUをアッセイする方法は、5-FUまたは5-FUのプロドラッグによる治療を最適化するために特に有用であり、血液の5-FUレベルは、薬剤のある投与後に決定され、薬剤の次の投与を調整/決定するための参照として使用される。このように、本発明のさらに別の態様において、5-FUまたは5-FUのプロドラッグで患者を治療する方

50

法も提供される。一般的に、この方法は、(1)治療を必要とする患者に5-FUまたは5-FUのプロドラッグの第1の用量を投与する工程と；(2)患者から得られたサンプル中の5-FUの量を決定する工程であって、サンプルはジヒドロピリミジン-デヒドロゲナーゼの不活性剤と体外で混合される工程と；(3)患者に5-FUまたはそのプロドラッグの第2の用量を投与する工程と；を含む。第2の用量で投与した5-FUまたはそのプロドラッグの量は、所定の最適なターゲットである5-FUのAUCを参考にして、患者サンプルで測定された5-FUのレベルに基づいて決定される。第2の用量は、ターゲット濃度内で血液の5-FU濃度を提供するための量で投与することができる。この治療方法において、患者から得られたサンプル中の5-FU量を決定する工程は、上述したように本発明のサンプルの処理が組み込んだ、上述した本発明のアッセイ方法に従って、患者サンプルの5-FUをアッセイする。しかし、医師は、診断ラボからのこのようなアッセイをオーダーし、ラボから送られたアッセイレポートから5-FUのレベルを決定する。

10

【0044】

たとえば、5-FUを含む治療において、曲線下面積(AUC)で表される5-FUの定量的な目標血中濃度は、20乃至24mg·h/Lまでのものであることが提案されている。一実施形態において、本発明の治療方法は、5-FUの用量を最適化するために使用されるとともに、以下の工程：(1)例えばBSA(体表面積)で決定された量である、5-FUの第1の用量を患者に投与する工程と；(2)患者から得られたサンプル中の5-FUの量を決定する工程であって、サンプルはDPDの不活性化剤と体外で混合される工程と；(3)工程(2)で求めた5-FUの量に基づいて、20乃至25mg·h/Lの範囲内で血液/血漿5-FUのAUCを提供できると計算され予測される量で、5-FUの第2の用量を患者に投与する工程；を含む。すなわち、患者サンプル中の測定された5-FUレベルが20mg·h/L以下の血液/血漿5-FUのAUCを示す場合、医師が第1の投与量を超える第2の投与量で投与すべき5-FUの量を増加することを勧める。患者サンプル中の測定された5-FUレベルが25mg·h/L以上の血液/血漿5-FUのAUCを示す場合、医師が第1の投与量と比較して第2の投与量で投与すべき5-FUの量を減少することを勧める。5-FUをアッセイするための、アッセイ方法とその様々な実施形態は、上述されており、繰り返すことなく、本明細書に援用する。好ましい実施形態において、治療法の決定ステップは、5-FUで治療された患者から5-FUを含む血液サンプルを得る工程と、血液サンプルをDPD不活性化剤と体外で混合して混合物を形成する工程と、混合物から5-FUを含む血漿および不活性化剤を分離する工程と、血漿中の5-FUの量を測定する工程と、を備えている。

20

30

【0045】

別に述べたように、本発明は、5-FUまたはそのプロドラッグで患者の治療を導くための患者サンプルにおける5-FUを測定するためのアッセイキットを製造するためのDPD不活性化剤の使用を提供し、治療は、(1)治療に必要な患者に、5-FUまたは5-FUのプロドラッグの第1の用量を投与する工程と；(2)患者から得られたサンプル中の5-FUの量を決定する工程であって、サンプルがDPD不活性化剤と体外で混合される工程と；(3)工程(2)で決定された5-FUの量に基づいて決定された量であって、所定の基準範囲内、例えば、20乃至25mg·h/Lの範囲内の血液/血漿5-FUのAUCの結果となるよう計算され予想された量で、患者に5-FUまたはそのプロドラッグの第2の用量を投与する工程と；を備える。アッセイキットの構成要素は、上述したものまたは以下に記載するものである。

40

【0046】

II. デバイスおよびキット

本発明は、また、患者血液サンプルにDPD不活性化剤を転送し、患者血液サンプルとDPD不活性化剤を混合させるための転送装置を提供する。本発明は、その中のDPD不活性化剤の有無にかかわらず、後述の転送シリンジアセンブリを包含する。図6を参照すると、転送シリンジアセンブリ600および600'は、DPD不活性化剤の溶液をクリ

50

ニックまたは試験ラボに保管および出荷するために、および、保管されたDPD不活性化剤の溶液を患者サンプルに転送するために、特に有益である。転送シリンジアセンブリ600(600および600')は、DPD不活性化剤の溶液620(例えば、DMSOまたはメタノール溶媒中のギメラシルまたはエニウラシルの溶液)が事前に充填される、転送シリンジのチャンバーを画定するバレル610を含んでいる。バレル610は、遠位端から延びる先端部630を有している。先端部630は、使用時に注射針と作動可能に接続される。さらに、転送シリンジアセンブリは、先端に取り付けられたあるいはバレル610の遠位端から延びる先端シールド640を含む。先端シールド640は、先端部630を超えて縦方向に延びている。さらに、転送シリンジアセンブリ600は、操作可能に先端630または先端シールド640に接続する、先端キャップ650を含んでいる。好ましい実施形態において、先端シールド640および先端キャップ650は、嵌合溝を持ち、一緒に連結している。例えば、先端シールド640は内側に向く溝を有し、先端キャップ650は外側に向く溝を有し、あるいはその逆の溝を有し、先端キャップ650は、先端シールド640としっかりとねじ込まれて固定され、バレルチャンバーの先端部630を封止する。プランジャ660は、バレル610のチャンバー内に摺動自在に挿入される。

10

【0047】

転送シリンジアセンブリ600'は、注射針670がシリンジ先端部630に接続されている以外、転送シリンジアセンブリ600と同じである。注射針は、好ましくは、注射針キャップでシールドされる。注射針は、患者サンプルを含む別の容器(バイアルまたはチューブ)を穿刺するために使用され、プランジャ660をスライドさせるか押すことにより患者のサンプル容器にDPD不活性化溶液を供給する。

20

【0048】

図7は別の転送シリンジアセンブリ700を示しており、転送シリンジアセンブリ600の先端キャップ650が注射針カバー710に置き換えられている点、注射針カバー710'が転送シリンジアセンブリ600'の上に搭載されている点、以外は転送シリンジアセンブリ600および600'と同じである。注射針カバー710を参照すると、それは、注射針740の周りに同軸状に配置され、注射針740に沿って注射針の尖った先端を超えて延びる、管状体730を通常含む。注射針カバー710'は注射針740が欠けている以外注射針カバー710と同じである。注射針カバーは、転送シリンジアセンブリ700を形成する転送シリンジアセンブリ600または600'上に作動可能に接続され搭載される。例えば、一実施形態において、転送シリンジアセンブリ600の先端シールド640は、注射針740のルアーアダプタ720を結合するための内側に向く溝を有する。別の実施形態において、転送シリンジアセンブリ600'の先端シールド640はルアーアダプタ720'を結合するための内側に向く溝を有し、注射針カバー710'が注射針670をシールドする転送シリンジアセンブリ600'上に載置される。また、720または720'は注射針740の周りに同軸状に載置されたコネクタとすることができる。

30

【0049】

転送シリンジアセンブリ700は、図8に示すように、便利かつ安全に患者のサンプルチューブにDPD不活性化剤の溶液を転送するために使用することができる。図8における転送シリンジアセンブリ800は、転送シリンジアセンブリ700および患者サンプル(例えば、血液)を含むチューブ810を含み、チューブ810は注射針カバー710または710'に挿入され、注射針740または670はチューブの穴をあけることが可能なキャップ812を介してサンプルチューブ810内に挿入される。このようにして、DPD不活性化溶液が転送シリンジアセンブリ700に含まれている場合、プランジャ660は押されて、サンプルチューブにDPD不活性化溶液を供給する。

40

【0050】

さらに別の態様において、本発明は、上述した一またはそれ以上の転送シリンジアセンブリを含むキットを提供する。キットは、どのような形態(例えば、溶液中)においても

50

、D P D不活性化剤を含むことができあるいは含まないこともできる。含まれている場合は、D P D不活性化剤は、転送シリンジアセンブリ中または別のコンパートメント中に保存することができ、患者血液サンプル中におけるD P D酵素活性を阻害するために十分で、サンプル中での5 - F U劣化を避けるのに十分な量である。キットは、さらに、以下のアイテムを一またはそれ以上含む：使い捨てピペット、採血管、血漿サンプルを受け取り保管するためのクライオバイアルチューブ、輸送チューブ、患者サンプルを輸送するための吸収性材料からなるバッグなど。キットはさらに、医療専門家に、サンプル中の5 - F Uアッセイの目的で患者サンプルをどのようにして取得して処理するのかを説明するインストラクションシートを含むことができ、それらはすべて上記に詳細に記載されている。さらに、キットは5 - F Uと選択的に免疫学的活性を有する抗体を含むことができる。このキットは、また、必要に応じて標準材料として使用するため、独立したコンパートメントに5 - F Uを含んでいる。

10

【0051】

一実施態様において、キットは、コンテナ内に、(1)図6または図7に示すような転送シリンジアセンブリ、(2)D P D不活性化剤、および(3)5 - F Uと選択的に免疫反応性を有する抗体、を備える。別の実施形態において、キットは、コンテナ内に、(1)図6または図7に示した転送シリンジアセンブリ、(2)D P D不活性化剤、(3)固体支持体に結合されて5 - F Uと選択的に免疫反応性を有する複数の抗体、(4)ポリマーまたは基板に結合された複数の5 - F U分子、を備える。好ましくは、キット内の抗体が、25%未満、好ましくは15%未満の、D P D不活性化剤との交差反応性を有する。キットはまた、独立したコンパートメント内に、標準材料として使用するための5 - F Uを含む。また、好ましくは、D P D不活性化剤は、転送シリンジアセンブリのバレルに含まれている溶液中に存在する。

20

【0052】

以下の例示の例において、5 - F Uは、米国特許第7, 205, 116号に開示された抗体を用いて、オリンパスAU680アナライザで抗体ベースの凝集アッセイを用いて測定された。具体的には、サンプル中の5 - F Uの濃度は、ナノ粒子が凝集の量によって決定されるサンプルの吸光度に基づいて決定される。システムは、遊離5 - F Uのない状態で混合したとき、ナノ粒子の大きな凝集体を形成し光を散乱して高い吸収値となる2種類の試薬を必要とする。遊離5 - F Uの存在下では、凝集反応がやや抑制されて光の散乱も少なくなり低い吸収値となる。機器は毎月2回キャリブレーションされ、曲線(5 - F U濃度対吸光度)が生成される。個々のサンプルからの吸光度の値は、濃度を決定するために、この曲線と比較される。

30

【0053】

一般に、凝集アッセイにおいて、5 - F U標識アミノデキストランを含有する緩衝液の95 μ lがキュベットにピペットで採取され、次いで濾過した血漿試料の7 μ lもピペットで採取される。サンプルと試薬を混合し、その後約3.5分間インキュベートする。5 - F U抗体結合ナノ粒子の95 μ lがキュベットにピペットで採取し混合される。完全な反応は約6.2分間インキュベートする。600nmでの一連の27回の測定は、このプロセスを通してAU680アナライザにより定期的な間隔で行われ、5 - F U濃度は、2つの特定の時点からの測定値を使用して計算される。

40

【0054】

III. 実施例

1. 安定剤としてのエニルウラシルの使用

血液の6つのチューブ(スプレーオンK₂EDTAチューブ、6mL)が6人のドナーのそれぞれから引き出され、血液チューブが穏やかに抗凝固剤を混合するために数回反転された。血液はプールされ、ドナーから分離された。各血液サンプルの等分量は新しいコニカルチューブに転送され、在庫の5 - F Uの計算量(200ng/ μ Lの)が、500ng/mLの5 - F Uの最終濃度のために各血液サンプルに添加された。各血液サンプルは、以下の条件でエニルウラシルを含む6本のチューブ(チューブ当たりの血液5mL)

50

のセットに小分けされた：

高濃度（最終的に4000 ng/mLの血液）、DMSO溶媒；

低濃度（最終的に1000 ng/mLの血液）、DMSO溶媒。

【0055】

また、血液は、陰性コントロールとして機能するように、DMSOのみ（無エニルウラシル）を含むチューブに添加された。すべての血液チューブは反転することにより混合された。血液チューブは45分または24時間室温でインキュベートされ、適切な時期に、チューブは、血漿を分離するために室温で10分間2000 x gで遠心分離された。血漿は、遠心分離の直後に吸引され、クリーンなクリオバイアルに分注した。サンプルは、オリンパスアナライザAU680（200 μL、12,500 rpmで15分間スピン）の10
ための標準的な条件の下で実行された。測定は、血漿の収集直後および最初の読み込みの24時間後に行われた。血漿は室温で保存された。図2は、エニルウラシルが血液サンプル中の5-FUの分解を防ぐのに有効であったことを示している。

【0056】

2. 安定剤としての5-ビニルウラシル、5-ヨードウラシルおよびギメラシルの使用

血液の3つのチューブ（スプレーオンK₂EDTAチューブ、10 mL）が6人のドナーのそれぞれから引き出され、血液チューブが穏やかに抗凝固剤を混合するために数回反転された。血液はプールされ、ドナーから分離された。各血液サンプルの等分量は新しいコニカルチューブに転送され、在庫の5-FUの計算量（200 ng/μLの）が、50
0 ng/mLの5-FUの最終濃度のために各血液サンプルに添加された。各血液サンプルは、4本のチューブ（チューブ当たり5 mLの血液）のセットに小分けされた。チューブの各セットは異なっていたが、下記の条件の組み合わせを含んでいた：

5-ヨードウラシルの低濃度（血液中で最終的に10 μg/mL）；

5-ヨードウラシルの高濃度（血液中で最終的に40 μg/mL）；

5-ビニルウラシルの低濃度（血液中で最終的に5 μg/mL）；

5-ビニルウラシルの高濃度（血液中で最終的に20 μg/mL）；

ギメラシルの低濃度（血液中で最終的に300 ng/mL）；

ギメラシルの高濃度（血液中で最終的に1,200 ng/mL）。

【0057】

チューブは反転により混合された。血液チューブは45分間室温でインキュベートされた。適切なタイミングで、血液チューブは、血漿を分離するために、室温で10分間20
00 x gで遠心分離された。血漿は遠心分離の直後に吸引され、新しいコニカルチューブに分注された。血漿サンプルは、オリンパスアナライザAU680（200 μL、12,500 rpmで15分間スピン）の30
ための標準的な条件の下で実行された。血漿は室温で保存された。図3は、5-ビニルウラシル、5-ヨードウラシルおよびギメラシルが、すべての血液サンプルで5-FUの安定化に有効であったことを示している。

【0058】

3. 必要なDPD不活性化剤の量

血液の4つのチューブ（スプレーオンK₂EDTAチューブ、10 mL）が6人のドナーのそれぞれから引き出され、穏やかに抗凝固剤を混合するために数回反転された。すべてのドナーの血液は、1つの大きなチューブにプールされ、そのプールされた血液の2つ
40
の等分量が2つの新しいチューブに転送された。残りの血液は、白血球（WBC）/バフィーコートを分離するために使用された。WBC/バフィーコートは、残りの血液チューブを遠心分離し、各チューブからWBC層を抽出してプールし、WBC/バフィーコートを濃縮するために再び遠心分離し、クリーンなチューブに濃縮したWBC/バフィーコート層を分離する、ことにより単離した。血液の1つのボリュームは、500 ng/mLの最終濃度の在庫5-FUの計算量（200 ng/μLの）に添加され、血液の他のボリュームは、1500 ng/mLの最終濃度の在庫5-FUの計算量（200 ng/μLの）に添加された。8つのチューブごとに3セットが、分注した血液を等分にするために準備された。さらに、ギメラシルの代わりに300 μLの30%メタノール/水を接種された
50

ネガティブコントロールが用いられた。セットごとの8つのチューブの4つに、低濃度の5-FUの血液が、各チューブに6 mL分注された。高濃度の5-FUの血液が、6 mLごとのネガティブコントロールチューブに対してと同様に、セットごと残りの4つのチューブに分注された。8つのチューブは、その後、30%のMeOH/水中0.12 mg/mLギメラシルの溶液300 µLまたは0.04 mg/Lのギメラシルの300 µLいずれかを接種された。血液チューブはギメラシルを混合させるために反転され、45分間室温で置かれた。血液チューブは10分間室温で2000×gで遠心分離された。血漿は、遠心分離した直後に吸引され、クリーンなクリオバイアルに分注された。WBC/バフィーコートは、プラズマの指定されたチューブに添加され、均一に混合するためにボルテックスされた。血漿サンプルは、AU680アナライザ(200 µL、12,500 rpmで15分間スピン)の標準的な条件の下で実行された。測定は、WBC/バフィーコートを添加した後24時間(「24時間」とともにWBC/バフィーコートを添加した直後(「初期」))に行われた。24時間の測定では、血漿は、一晚環境での出荷をシミュレートするため、実験の最初の24時間室温で保存された。下記の表1はその結果をまとめたものである。

表 1

ターゲット5-FU 濃度	ギメラシル 濃度 (ng/mL)	WBC	平均 5-FU 測定		% 変化 (初期対24時間)
			初期	24時間	
500 ng/mL	2000	w/ WBC	465.8	478.6	2.7%
	2000	NO WBC	488.3	474.3	-2.9%
	6000	w/ WBC	473.7	478.6	1.0%
	6000	NO WBC	479.1	487.3	1.7%
1500 ng/mL	2000	w/ WBC	1377.7	1418.1	2.9%
	2000	NO WBC	1434.9	1427.3	-0.5%
	6000	w/ WBC	1402.9	1390.1	-0.9%
	6000	NO WBC	1430.3	1458.3	2.0%
	0	w/WBC	1267.4	856	-32.5%

【 0 0 5 9 】

血液の4つのチューブ(スプレーオンK₂EDTAチューブ、10 mL)が5人のドナーのそれぞれから引き出され、穏やかに抗凝固剤を混合するために数回反転された。血液はコニカルチューブにドナーによってプールされた。各ドナーの血液の等分量はクリーンなチューブに転送された。在庫の5-FUの計算量(200 ng/µLの)が、500 ng/mLの5-FUの最終濃度を達成するために各血液サンプルに添加され、チューブは混合のために反転された。混合された血液は、ドナーあたり9チューブであってチューブあたり血液3.5 mLとなるように、クリーンなチューブ中に等分に分注された。ギメラシルは、各チューブに対し、200、400または600 ng/mLの最終濃度でチューブに添加された。さらに、対照サンプルでは、ネガティブコントロールとして使用するために、ギメラシルの代わりにメタノールが血液に添加された。血液チューブは、ギメラシルまたはメタノールの添加後45分間室温に置かれた。適切なタイミングで、血液チューブは、血漿を分離するために、室温で10分間2000×gで遠心分離された。血漿は遠心分離した直後に吸引され、血漿はクリーンなチューブに分注された。血漿サンプルは、オリンパスAU680アナライザ(200 µL、12,500 rpmで15分間スピン)のための標準条件を用いて実行した。5-FU濃度の測定は、血漿の収集後(「初期」)

、その後24時間(「24時間」)に実施された。24時間測定では、血漿は、24時間室温で保存された。結果を表2にまとめる。表2と図4に示すように、血液中の低濃度のギメラシルは、5-FUのDPD介在劣化を阻害するために有効である。200ng/mLおよび600ng/mLのギメラシルを含有するサンプル間の5-FU濃度の全体的なパーセントの差は1%未満である。

表2

ギメラシル濃度	初期	24時間
200ng/mL	518.7	523.4
400ng/mL	523.0	521.6
600ng/mL	519.5	523.3

10

【0060】

4. 血漿分離の前における血液中のギメラシルの拡張インキュベーションの効果

血液の6つのチューブ(スプレーオンK₂EDTAチューブ、6mL)が6人のドナーのそれぞれから引き出され、血液チューブは抗凝固剤を血液中に混合するために数回反転された。血液チューブはプールされドナーによって分離された。各ドナーの血液の等分量は新しいチューブに転送され、在庫の5-FUの計算量(200ng/μLの)が、500ng/mLの5-FUの最終濃度を達成するために各血液サンプルに添加された。混合された血液サンプルは、ドナーあたり8チューブであってチューブあたり血液4mLとなるように、クリーンなチューブ中に等分に分注された。メタノール溶液中のギメラシルが、1200ng/mLの最終濃度に達するように血液チューブに添加された。ネガティブコントロールのために、メタノールのみがコントロールされる血液チューブに添加された。血液チューブは、血漿分離後45分間、24時間または48時間室温に置かれた。適切なタイミングで、血液チューブは、血漿を分離するために、室温で10分間2000xgで遠心分離された。血漿は遠心分離した直後に吸引され、クリーンなクリオバイアルに分注された。5-FUのアッセイのために、血漿サンプルは、上述したオリンパスAU680アナライザのための標準条件(200μL、12,500rpmで15分間スピン)を用いて実行した。5-FU濃度の測定は、血漿の収集後および最初の測定から2日の間実施された。血漿は、測定間隔の間室温で保存された。この実施例の結果は以下の表3と図5にまとめられる。

20

30

表3

血液中の インキュベーション 時間	5-FU 濃度 (ng/ml)	
	血漿分離後	血漿分離後24時間
45分	533.3	538.1
24時間	551.8	551.9
48時間	581.3	578.4

40

【0061】

図5からわかるように、長い時間血漿分離することなく血液中にギメラシルを維持することは、5-FU濃度を人為的に高める可能性がある。血液サンプルは、好ましくは、ギメラシル阻害剤が追加されているのと同じ日以内に遠心分離される。

【0062】

5. 患者サンプルでの5-FUのアッセイ

サンプルの収集は、定常状態のレベルを(5-FUの平均 $t_{1/2}$ は~13分)を確認

50

するため、5-FU治療の開始後および薬剤注入の終了前の少なくとも2時間の間に臨床医学者の現場で取り出された静脈血で構成される。オンドーズサンプルスタビライザーが、採血に続きすぐに血液サンプルに注入され混合されて、血液サンプルは最大4時間まで室温で残ることができる。サンプルは、その後遠心分離される(1500-2000g、10分間)。血漿の約半分は、バーコードで標識された血漿輸送チューブに転送され、分析のために、Myriad Genetic Laboratories, Inc.に周囲温度で一晩で出荷される。

【0063】

受け取り時に、サンプルのバーコードがスキャンされ追跡される。サンプルは、分析のために使用される得られた濾液のフィルター膜を介して遠心分離される。オンドーズアッセイは、競争力のある均質な2試薬ナノ粒子凝集免疫測定法である。第1試薬は、5-FU主導の抗体結合ナノ粒子からなる第2試薬と結合した5-FUを含んでいる。血漿中の遊離5-FUの量は2つのアッセイ試薬の凝集を阻害する。ナノ粒子の凝集から特定の波長における吸光度の量は、血漿中の薬物の量に依存する。この吸光度は、定量するために標準化された検量線と比較される。Gamelin E, et al., J Clin Oncol. 26(13):2099-105(2008)に基づいて、曲線(AUC)下の面積で表される、定量的なターゲット範囲は、5-FUの測定された濃度およびテスト要求フォームで臨床医によって提供された注入時間のから計算される。

10

【0064】

明細書に記載したすべての刊行物および特許出願は、本発明が属する当業者のレベルを示すものである。個々の刊行物または特許出願が具体的かつ個別に参考として援用されることが示されたかのように、全ての刊行物および特許出願は、本明細書中と同程度に参考として援用される。刊行物および特許出願の単なる言及は、必ずしも本出願に先行技術であることを承認するものではない。

20

【0065】

前述の発明は、理解の明確さの目的で図面および実施例により詳細に記載されているが、特定の変更および修正が添付の特許請求の範囲内で実施できることは明らかである。

【図1】

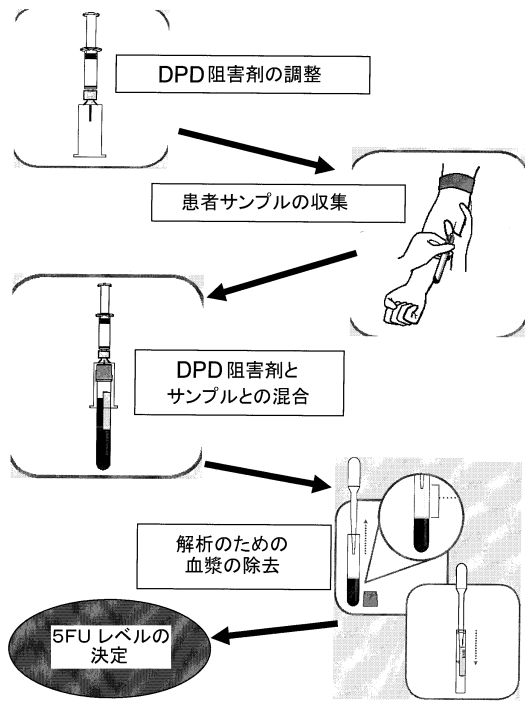


Figure 1

【図2】

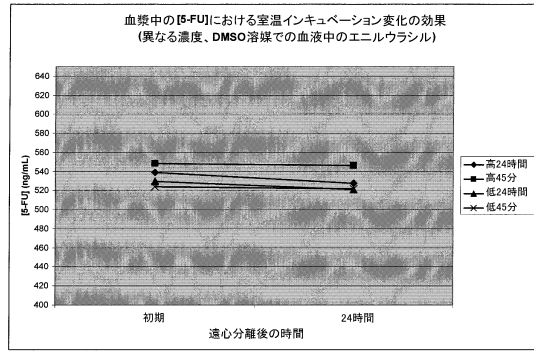


Figure 2

【図3】

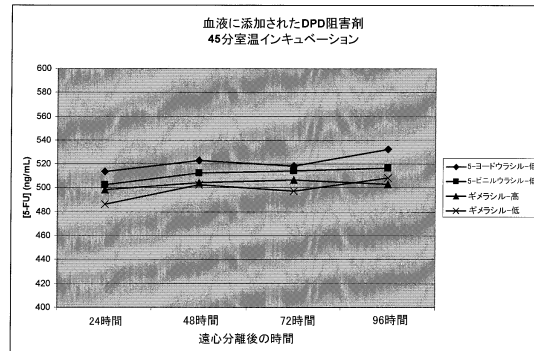


Figure 3

【図4】

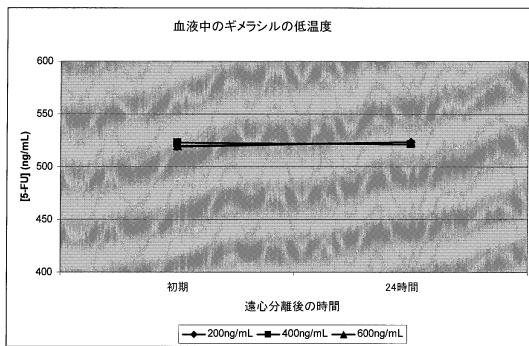


Figure 4

【図6】

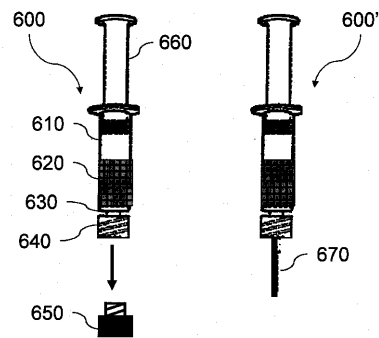


Figure 6

【図5】

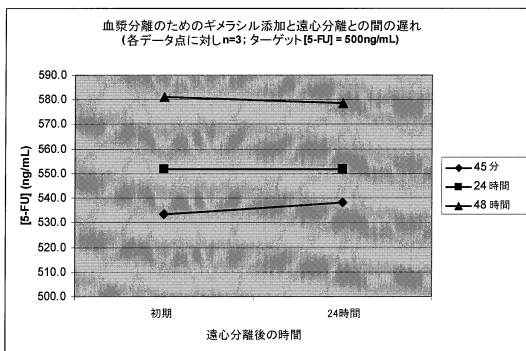


Figure 5

【 図 7 A 】

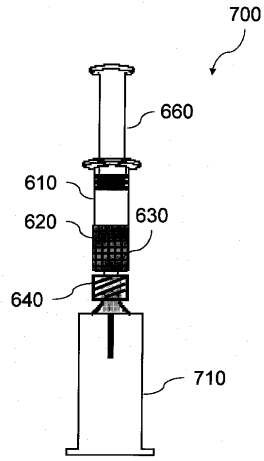


Figure 7A

【 図 7 B 】

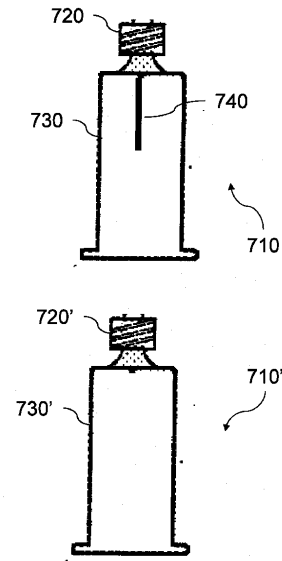


Figure 7B

【 図 8 】

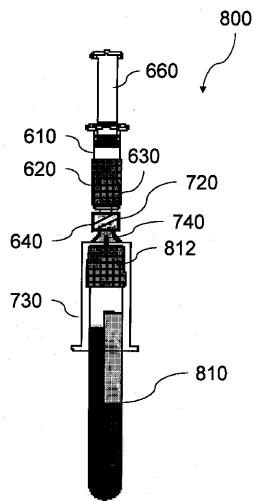


Figure 8

フロントページの続き

- (72)発明者 コルヴィン, キャリー
アメリカ合衆国 ユタ州 84108, ソルトレイクシティ, ワカラウェイ 320
- (72)発明者 オーバーフィールド, マイケル
アメリカ合衆国 ユタ州 84108, ソルトレイクシティ, ワカラウェイ 320
- (72)発明者 マクラウド, ハワード
アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 27514, チャペルヒル, カーホール3203, ボックス 7360

審査官 草川 貴史

- (56)参考文献 特表2008-530528(JP, A)
米国特許出願公開第2007/0225245(US, A1)
特表2007-534634(JP, A)
特開2007-117272(JP, A)
特開2007-222472(JP, A)
JOSEPH BERTINO et al, Highlights from: 5-Fluorouracil Drug Management Pharmacokinetics and Pharmacogenomics Workshop; Orlando, Florida; January 2007., Clin Colorectal Cancer., 2007年 3月 1日, Vol.6, No.6, Page.407-422
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48 - 33/98

专利名称(译)	測定5-FUの方法		
公开(公告)号	JP5863047B2	公开(公告)日	2016-02-16
申请号	JP2012520842	申请日	2010-07-19
[标]申请(专利权)人(译)	美瑞德生物工程公司		
申请(专利权)人(译)	无数的遗传学公司		
当前申请(专利权)人(译)	无数的遗传学公司		
[标]发明人	サロモーネサルヴァトーレジェイ ロアベンジャミン コルヴィンキャリー オーバーフィールドマイケル マクラウドハワード		
发明人	サロモーネ,サルヴァトーレ,ジェイ. ロア,ベンジャミン コルヴィン,キャリー オーバーフィールド,マイケル マクラウド,ハワード		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/48 C12Q1/32 A61K31/513 A61P35/00		
CPC分类号	A61B5/15003 A61B5/150236 A61B5/150244 A61B5/150351 A61B5/150389 A61B5/150503 A61B5/150717 A61B5/150755 A61B5/153 A61B5/154 A61K31/505 A61K31/513 A61P35/00 C12Q1/32 G01N33/94		
FI分类号	G01N33/53.G G01N33/48.B C12Q1/32 A61K31/513 A61P35/00		
優先権	61/226589 2009-07-17 US 61/324241 2010-04-14 US		
其他公开文献	JP2012533739A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本發明提供了用于測定5-FUの方法，組合物，装置和试剂盒。

(21) 出願番号	特願2012-520842 (P2012-520842)	(73) 特許権者	304057634
(86) (22) 出願日	平成22年7月19日 (2010. 7. 19)		ミリアド ジェネティクス, インコーポ レイテッド
(65) 公表番号	特表2012-533739 (P2012-533739A)		アメリカ合衆国 ユタ 84108, ソ ルト レイク シティ, ワカラ ウェ イ 320
(43) 公表日	平成24年12月27日 (2012.12.27)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2010/042485		
(87) 国際公開番号	W02011/009140	(74) 代理人	110001302
(87) 国際公開日	平成23年1月20日 (2011. 1. 20)		特許業務法人北青山インターナショナル
審査請求日	平成25年7月19日 (2013. 7. 19)	(72) 発明者	サロモーネ, サルヴァトーレ, ジェイ. アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 18 015, ベスレヘム, リサーチドライブ 116
(31) 優先権主張番号	61/226, 589		
(32) 優先日	平成21年7月17日 (2009. 7. 17)	(72) 発明者	ロア, ベンジャミン アメリカ合衆国 ユタ州 84108, ソ ルトレイクシティ, ワカラウェイ 320
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/324, 241		
(32) 優先日	平成22年4月14日 (2010. 4. 14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く