

(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2009-507234
(P2009-507234A)

(43) 公表日 平成21年2月19日(2009.2.19)

(51) Int.Cl. F I テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 S
GO 1 N 33/543 (2006.01) GO 1 N 33/543 5 7 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 29 頁)

(21) 出願番号 特願2008-529530 (P2008-529530)
 (86) (22) 出願日 平成18年9月6日(2006.9.6)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年4月21日(2008.4.21)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2006/008664
 (87) 国際公開番号 W02007/028580
 (87) 国際公開日 平成19年3月15日(2007.3.15)
 (31) 優先権主張番号 60/714, 712
 (32) 優先日 平成17年9月7日(2005.9.7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 591003013
 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
 F. HOFFMANN-LA ROCH
 E AKTIENGESELLSCHAFT
 スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
 グレンツアーヘルストラッセ124
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節

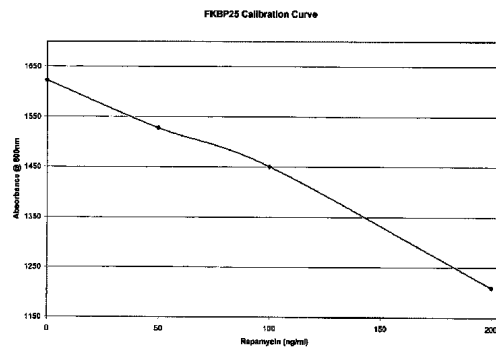
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫抑制剤のための単一受容体アッセイ

(57) 【要約】

イムノフィリンを用いた免疫抑制剤のための高度に特異的な均質アッセイ法を単一受容体フォーマットで提供する。もっとも簡単なフォーマットでは、単一受容体を、イムノフィリンを抗体の代わりに用いる競合免疫アッセイ法のように利用し、薬剤コンジュゲートと薬剤分析物との間で限られた数のイムノフィリン結合部位について競合が生じる。微粒子凝集アッセイフォーマットでは、イムノフィリンは、粒子に結合するか、又は溶液中に存在する。イムノフィリンが粒子に結合している場合、薬剤分析物の多価コンジュゲートが溶液中に存在する。

【選択図】 なし



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

サンプル中の免疫抑制剤の存在又は量を決定する方法であって、
免疫抑制剤を含有する疑いのあるサンプルを準備するステップ、
サンプルをコンジュゲート及び免疫抑制剤に特異的なイムノフィリン受容体と混合して懸濁液又は溶液を形成させるステップであって、前記コンジュゲートは外来性免疫抑制剤又は薬剤類似物を含み、サンプル中に存在する免疫抑制剤及び前記外来性免疫抑制剤又は薬剤類似物がイムノフィリン受容体との結合について競合するものである前記ステップ、
イムノフィリン受容体に結合した免疫抑制剤の量、又は遊離状態の免疫抑制剤の量を測定するステップ、並びに

測定された免疫抑制剤の量とサンプル中の免疫抑制剤の存在又は量とを相関させるステップ

を含む前記方法。

【請求項 2】

前記イムノフィリン受容体が検出粒子に結合し、前記コンジュゲートが高分子担体に結合する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記コンジュゲートが検出粒子に結合し、前記イムノフィリン受容体が多量体型、好ましくは二量体型である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

粒子の凝集量が懸濁液中で測定される、請求項 2 又は 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記イムノフィリン受容体に結合した免疫抑制剤の量、又は遊離状態の免疫抑制剤の量が蛍光又は化学発光検出系を利用することにより測定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記サンプルが免疫抑制剤を投与されている患者から採取された血液サンプルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記高分子担体がペプチド、タンパク質、及び多糖からなる群より選択される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 8】

前記免疫抑制剤がシクロスポリン、タクロリムス、ラパマイシン、及びエベロリムスからなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記免疫抑制剤がラパマイシン又はエベロリムスであり、前記イムノフィリン受容体がラパマイシン特異的 F K 結合タンパク質である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記免疫抑制剤がラパマイシンであり、前記イムノフィリン受容体が F K B P 2 5 及び F K B P 2 5 C からなる群より選択されるラパマイシン特異的 F K 結合タンパク質である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記免疫抑制剤がタクロリムスであり、前記イムノフィリン受容体がタクロリムス特異的 F K 結合タンパク質である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記免疫抑制剤がタクロリムスであり、前記イムノフィリン受容体がタクロリムス特異的 F K B P 1 2 変異体又は F K B P 1 4 からなる群より選択されるタクロリムス特異的 F K 結合タンパク質である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記イムノフィリン受容体が蛍光共鳴エネルギー移動対の第 1 のメンバーと結合され、前記コンジュゲートが蛍光共鳴エネルギー移動対の第 2 のメンバーと結合されており、前

10

20

30

40

50

記イムノフィリンタンパク質と前記外来性免疫抑制剤又は薬剤類似物との結合によって蛍光共鳴エネルギー移動対のメンバーが蛍光エネルギー移動関係に配置されて検出可能なシグナルが発生するものであり、

溶液中で発生したシグナルの量を測定し、

測定されたシグナルの量とサンプル中の免疫抑制剤の存在又は量とを相関させる、

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記外来性免疫抑制剤又は薬剤類似物がフルオロフォアで標識され、イムノフィリンタンパク質と外来性免疫抑制剤又は薬剤類似物との結合がフルオロフォアの蛍光偏光に変化を引き起こすものであって、

溶液中で発生した蛍光偏光の変化を測定し、

蛍光偏光の変化の量とサンプル中の免疫抑制剤の存在又は量とを相関させる、

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

サンプル中のラパマイシンの存在又は量を決定するものであって、

ラパマイシンを含有する疑いのあるサンプルを準備するステップ、

サンプルをラパマイシン二量体及びラパマイシンに特異的なイムノフィリン受容体と混合して懸濁液を形成させるステップであって、前記イムノフィリン受容体は検出粒子と結合され、サンプル中のラパマイシン及びラパマイシン二量体がイムノフィリン受容体との結合について競合し、イムノフィリン受容体とラパマイシン二量体との結合によって検出粒子が凝集するものである前記ステップ、

懸濁液中の粒子の凝集量を測定するステップ、並びに

測定された凝集量とサンプル中のラパマイシンの存在又は量とを相関させるステップ

を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

サンプル中の免疫抑制剤の存在又は量を決定するためのキットであって、

前記薬剤に特異的なイムノフィリン受容体、

外来性免疫抑制剤又は薬剤類似物を含むコンジュゲート、及び

アッセイを実行するための使用説明書

を含んでなる前記キット。

【請求項 1 7】

前記イムノフィリン受容体が検出粒子に結合されており、前記コンジュゲートが高分子担体に結合されている、請求項 1 6 に記載のキット。

【請求項 1 8】

前記イムノフィリン受容体が多量体型であり、前記コンジュゲートが検出粒子に結合されている、請求項 1 6 に記載のキット。

【請求項 1 9】

前記免疫抑制剤がラパマイシン又はエベロリムスであり、前記イムノフィリン受容体がラパマイシン特異的 F K 結合タンパク質である、請求項 1 6 に記載のキット。

【請求項 2 0】

前記免疫抑制剤がラパマイシンであり、前記イムノフィリン受容体が F K B P 2 5 及び F K B P 2 5 C からなる群より選択されるラパマイシン特異的 F K 結合タンパク質である、請求項 1 6 に記載のキット。

【請求項 2 1】

前記免疫抑制剤がタクロリムスであり、前記イムノフィリン受容体がタクロリムス特異的 F K 結合タンパク質である、請求項 1 6 に記載のキット。

【請求項 2 2】

前記免疫抑制剤がタクロリムスであり、前記イムノフィリン受容体がタクロリムス特異的 F K B P 1 2 変異体又は F K B P 1 4 からなる群より選択されるタクロリムス特異的 F K 結合タンパク質である、請求項 1 6 に記載のキット。

10

20

30

40

50

【請求項 2 3】

前記免疫抑制剤がラパマイシン又はエベロリムスであり、前記イムノフィリン受容体がラパマイシン特異的 F K 結合タンパク質である、請求項 1 6 に記載のキット。

【請求項 2 4】

前記イムノフィリン受容体が蛍光共鳴エネルギー移動対の第 1 のメンバーと結合され、前記コンジュゲートが蛍光共鳴エネルギー移動対の第 2 のメンバーと結合されている、請求項 1 6 に記載のキット。

【請求項 2 5】

外来性免疫抑制剤又は薬剤類似物がフルオロフォアで標識されている、請求項 1 6 に記載のキット。

【請求項 2 6】

ラパマイシンに特異的なイムノフィリン受容体、検出粒子に結合されたイムノフィリン受容体

ラパマイシン二量体、及び

アッセイを実行するための使用説明書

を含んでなる、請求項 1 6 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、治療薬モニタリングの分野、特に免疫抑制剤を検出し、定量するためのアッセイに関する。

【背景技術】**【0002】**

免疫抑制剤は、免疫系の活性を抑制又は防止するために免疫抑制療法において使用される。臨床的には、それらは移植された器官や組織（例えば、骨髄、心臓、腎臓、肝臓）の拒絶の防止に、及び自己免疫疾患又は恐らくは自己免疫起源であろうと思われる疾患（例えば、関節リウマチ、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、クローン病、及び潰瘍性大腸炎）の治療に使用される。

【0003】

F K 5 0 6（タクロリムス）及びラパマイシン（シロリムス）のような免疫抑制剤に関する単一受容体アッセイには、イムノフィリン、例えば F K B P（F K 結合タンパク質）が使用されているが、F K B P は、二以上の免疫抑制剤又は不活性な代謝産物に対して著しい交差反応性を示す。免疫抑制剤は、しばしば互いに併用されるので、親薬物に対する特異性は重要であり、前述のアッセイは、通常の治療薬モニタリングでの使用で大幅に制限されている。この問題は、単一受容体アッセイに特異的 F K B P を使用することで解決される。他には、抗体を用いた単一受容体アッセイ、すなわち、目的の免疫抑制剤に特異的な免疫アッセイを開発することによって、この問題を解決することが試みられている。免疫アッセイは、親薬物に対して優れた選択性を示すが、ほとんどの場合、一以上の不活性代謝産物に対して著しい交差反応性を示す。この交差反応性は、クロマトグラフィー基準アッセイと比較した場合に、免疫アッセイにおいて望ましくない正のバイアスを与える傾向にある。免疫抑制剤に関する特異的、高感度及び安定的なアッセイ、特にハイスループット臨床分析器に適用できるようなアッセイが必要とされている。

【0004】

F K B P 2 5 は、ラパマイシン特異的であることが知られていたが、この性質は、これまでラパマイシンに特異的なアッセイに利用されていなかった。ラパマイシン（シロリムス）及び F K 5 0 6（タクロリムス）の双方に対して高い交差反応性をもつ F K B P が、異種単一受容体アッセイで使用されてきた。抗体を利用する同種又は異種フォーマットでの免疫抑制剤のための単一受容体アッセイは、当該分野では公知である。

【発明の開示】**【発明が解決しようとする課題】**

10

20

30

40

50

【 0 0 0 5 】

上記背景において、本発明は、前記先行技術を超えるいくつかの自明でない利点と進歩性を提供する。特に、免疫抑制剤物質に関する単一受容体アッセイの改善が必要と考えられている。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 6 】

本発明は、特定の利点又は機能性に限定はされないが、本発明が F K B P を用いる免疫抑制剤に関して高度に特異的な均質アッセイ法を単一受容体フォーマットで提供することに留意されたい。最も簡単なフォーマットでは、競合免疫アッセイに似た単一受容体を利用される。そのためイムノフィリンが抗体の代わりとなり、薬剤コンジュゲートと薬剤との間で、限られた数のイムノフィリン結合部位についての競合が起こる。微粒子凝集アッセイでは、イムノフィリンは、粒子に結合しているか又は溶液中に存在している。イムノフィリンが粒子に結合する場合には、薬剤の多価コンジュゲートを分析対象のサンプルに添加する。イムノフィリンが溶液中に存在する場合には、前記コンジュゲートを粒子に結合し、イムノフィリンは、粒子を架橋するために二量体化（又は重合化）する。これは、融合タンパク質技術又は化学的架橋によって達成される。

【 0 0 0 7 】

薬物ラパマイシン及びタクロリムスに関する単一受容体フォーマットの主な課題は、特異性である。これらの薬物に結合するイムノフィリンのクラス（いわゆる F K 結合タンパク質若しくは F K B P ）は、これらの薬物の構造的な類似性のため、通常、ラパマイシンとタクロリムス間のいかなる有意な程度も識別しない。唯一の例外が、ラパマイシン選択的イムノフィリン F K B P 2 5 である。ペプチジルプロリルイソメラーゼ（ロータマーゼ）アッセイでは、ラパマイシンに 0 . 9 n M の K_i であるのに対してタクロリムスには 2 0 0 n M の K_i であることが報告されている（J. Liang et al, J. Am. Chem. Soc. 118. 1231-1232, 1996）。

【 0 0 0 8 】

タクロリムスについては、選択的な F K B P 1 2 変異体を設計することができる（M.T. DeCenzo et al, Protein Engineering, 9, 173-180, 1996参照）。あるいは、F K B P 1 4 が、タクロリムスについてはシロリムス（4 0 n M）よりも約 2 0 倍低い K_d （すなわち、1 . 8 n M）を有することが報告されている（Davis, D. et al., Clin. Therapeutics 22, Suppl. B, B62-B70, 2000）。また、この報告に基づいて、F K B P 1 4 が F K 5 0 6（タクロリムス）単一受容体アッセイの候補として提案されている。

【 0 0 0 9 】

本発明の第 2 の態様は、単一受容体フォーマットの F K B P を用いた免疫抑制剤のための高感度均質アッセイ法である。感度の増大は、アッセイ対象の免疫抑制剤、他の免疫抑制剤、又は免疫抑制剤の断片の二量体コンジュゲートの使用により達成できることが予想される。例えば、ラパマイシンは、様々なリンカーで C - 4 0 の位置を介して二量体化でき、F K B P 2 5 を用いたラパマイシン単一受容体アッセイで、通常三つ以上の薬物が付加されるアミノデキストランコンジュゲートの代わりに、使用される。遊離状態のラパマイシンは、通常のアミノデキストランコンジュゲートよりも、これらの二量体化したコンジュゲートと、より良好に競合することが期待される。

【 0 0 1 0 】

F K B P 2 5 ペプチドの C 末端（F K B P 2 5 C）である P 1 0 9 - D 2 2 4（J. Liang et al.）もまた、ラパマイシンアッセイに有用である。J. Liangらは、「C末端ドメインは、全長タンパク質と同じ結合選好性を示すことから、N末端ドメインは、結合特異性に影響しない。」と報告している。F K B P 2 5 の N 末端ドメイン（P 1 0 9 の近くにある約 1 3 k D a のペプチド）は、結合したラパマイシンの C - 4 0 位の近くに位置してもよく、また、C - 4 0 位でコンジュゲートされたアミノデキストランラパマイシンの結合を妨げ、又は低減し、それによってアッセイの感度を低減する可能性がある。J. Liang は、論文の補足資料中で「組換え h F K B P 2 5 は不安定であり、精製後すぐに分解する

10

20

30

40

50

。時間経過と共に、オリジナルのFKBP25サンプル中で確認できるのは、分子量13.7～15kDaの断片の混合物のみとなる。」という状況を記載していることから、FKBP25Cを使用する利点は、安定性を改善できることである。FKBP25Cの他の可能性のある利点は、FKBP25のN末端ドメインは、塩基性アミノ酸に富んでいるので、pI（等電点）の僅かな減少があり得る（Galat et. al.1992）。低pIは、患者サンプル中のタンパク質（低pIを有するもの）に対する非特異的結合を低減することができる。

【0011】

FKBP25及びFKBP25Cは、それぞれラパマイシン用アッセイにおいて、GST（グルタチオンSトランスフェラーゼ）融合タンパク質として有用である。GSTの完全アミノ酸配列を含む融合タンパク質は、二量体を形成できる（Amersham Biosciences, GST Gene Fusion System Handbook, page 27）。GSTは、天然には二量体酵素として見出される（D. B. Smith, K.S. Johnson, Gene, 67, 31, 1988）。二量体化したFKBP25を用いる利点は、ラパマイシン用アッセイの感度を改善することである。FKBP25-GST又はFKBP25C-GST融合タンパク質の二量体化の結果、高分子あたり2つの結合部位が形成され、それにより交差反応又は抗体に類似した2つの同一リガンドとの結合が可能となる。二量体化したFKBP25-GST又はFKBP25C-GST融合タンパク質は、溶液中で使用され、ラパマイシン結合微粒子と交差反応する又はそれを凝集させることができる。サンプル中のラパマイシンは、溶液中で二量体化したFKBP25-GST又はFKBP25C-GSTと結合でき、それ故ラパマイシン結合微粒子の凝集を抑制することができる。

10

20

【0012】

本発明の一実施形態によれば、サンプル中の標的免疫抑制剤の存在又は量を決定する方法であって、免疫抑制剤を含有する疑いのあるサンプルを準備するステップ、免疫抑制剤に特異的なイムノフィリン受容体と、免疫抑制剤又は免疫抑制剤の類似体及び高分子担体を含むコンジュゲートとをサンプルに加えるステップ（このステップでは、前記標的免疫抑制剤と前記コンジュゲートが限られた数の受容体結合部位について競合する）、イムノフィリンに結合したコンジュゲートの量を測定するステップ、並びに、測定されたコンジュゲートの量と、サンプル中の免疫抑制剤の存在又は量とを相関させるステップを含む方法を提供する。

30

【0013】

本発明の他の実施形態において、サンプル中の標的免疫抑制剤の存在又は量を決定する方法であって、免疫抑制剤を含有する疑いのあるサンプルを準備するステップ、免疫抑制剤に特異的なイムノフィリン受容体、及び外来性免疫抑制剤又は薬剤類似物をサンプルに加えるステップ（このステップでは、前記イムノフィリンが二量体化され、前記免疫抑制剤と前記外来性薬剤又は薬剤類似物が限られた数の受容体結合部位について競合する）、並びにサンプル中の免疫抑制剤の存在又は量の測定として、イムノフィリンに結合した外来性薬剤又は薬剤類似物の量を測定するステップを含む方法を提供する。

【0014】

本発明のこれらの又は他の特徴及び利点は、添付した特許請求の範囲と共に以下の本発明の詳細な説明からより十分に理解できるであろう。特許請求の範囲は、その詳述によって定義されるのであって、本明細書で説明する特定の特徴及び利点に関する議論によって定義されるのではないことに留意されたい。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

「好ましくは」、「一般的には」、及び「通常」のような用語は、本明細書では、発明の範囲を限定するために、或いはいくつかの特徴が発明の構造又は機能に重大であり、必須であり、又は重要でさえあることを意味するために用いるのではない。むしろ、これらの用語は、本発明の特定の実施形態で利用することのできる又は利用することのできない別の又はさらなる特徴を単に強調することが目的である。

50

【0016】

本明細書で使用する場合、用語「検出粒子」とは、均質アッセイにおいて凝集状態と非凝集状態との区別が可能な直径約10nm～約1000nmの範囲で、通常球形状を有しているあらゆる粒子を言う。検出粒子のサイズ(直径)は、ナノメートル又はマイクロメートルの範囲にあるが、便宜上、このような粒子の全てを本明細書では「微粒子」と呼ぶ。検出粒子は、マイクロ粒子及びナノシェルを含む。検出粒子の表面は、官能化されていてもよく、様々な化合物がその表面に付着していてもよい。そのような化合物としては、例えば、フルオロフォア、化学発光物質、抗体、ビオチン、又はストレプトアビジンが含まれる。

【0017】

エピトープは、特定の免疫反応を刺激し、かつそれに対する反応を誘導する抗原性分子の表面上の領域である。エピトープタグgingは、クローン化された遺伝子にコードされたタンパク質が公知の抗体に対して免疫反応性となるようにする組換えDNA法である。融合タグシステムの開発によって、アフィニティマトリクス及び特異的抗体を用いた簡便な精製及び組換えタンパク質の検出に大きな自由度がもたらされる。エピトープタグは、10～15アミノ酸長であり、タンパク質に分子ハンドルを取り付けるように設計される。それらは、通常、アミノ末端又はカルボキシル末端のいずれかに配置され、三次構造においてはそのタンパク質の機能におけるあらゆる潜在的な破壊を最小限にしている。前記タグは小さいので、さらに組換えタンパク質の構造及び機能を妨げる可能性は低い。したがって、エピトープタグは、一般的には、その後の実験を行う前に取り除く必要がない。多くの様々なタグが使用されている。例えば、His6(6つのヒスチジンの配列で、Ni²⁺又はCo²⁺などの金属イオンを含むマトリクスに対して強いアフィニティを有する)、HA(ヒトインフルエンザウイルス血球凝集素タンパク質に由来するペプチド配列)、及びAvitag(大腸菌のビオチンタンパク質リガーゼ(BirA)によってその内部のリジン残基を酵素的にモノビオチン化することができる配列)が挙げられる。酵素BirAは発現混合物に添加され、ビオチン化は*in situ*で行われる。

【0018】

用語「特異的結合」とは、2つの対を成す種間の高アビディティ及び/又は高アフィニティ結合を言う。そのような対を成す種としては、例えば、リガンド/標的部分、酵素/基質、受容体/アゴニスト、抗体/抗原、及びレクチン/炭水化物(糖)等が挙げられる。結合相互作用は、共有結合性若しくは非共有結合性相互作用、又は共有結合性及び非共有結合性相互作用の組み合わせによって仲介されていてもよい。特に、特異的結合は、ある対の一方のメンバーが特定の種には結合するが、その結合メンバーの対応するメンバーが属する化合物のファミリー内の他の種とは結合しないことを特徴とする。したがって、例えば、抗体は、タンパク質ファミリー内の単一エピトープと結合し、他のエピトープとは結合しないことが好ましい。

【0019】

用語「受容体」又は「結合部分」とは、本明細書で使用する場合、標的化合物に特異的に結合する抗体以外のタンパク質又は糖タンパク質をいう。受容体の例は、免疫抑制剤と結合するイムノフィリンである。

【0020】

用語「ナノシェル」とは、本明細書で使用する場合、超薄金属層(例えば、金)で被覆された誘電体コア(例えば、シリカ又はリン酸カルシウム)から構成される微粒子をいう。本発明での使用に適したナノシェルは、約10nm～約250nmの範囲から選択される直径をもつ。微粒子の表面は、官能化されていてもよく、また様々な化合物(例えば、抗体又はストレプトアビジンなど)がその表面に付着されていてもよい。

【0021】

用語「微粒子」とは、本明細書で使用する場合、直径約100nm～約1000nmの固体粒子をいう。本発明での使用には、通常、微粒子は約100nm～約600nmの直径を有する。微粒子は、様々な物質から形成することができ、例えばポリスチレン及びラ

10

20

30

40

50

テックス微粒子などである。その表面は、任意で官能化されてもよく、また様々な化合物（例えば、抗体又はストレプトアビジンなど）がその表面に付着されていてもよい。

【0022】

本明細書で使用する場合、用語「抗体」とは、抗原との免疫反応を可能にする、少なくとも一の結合ドメインから構成されるポリペプチド又はポリペプチド群である。抗体の結合ドメインは、抗体分子の可変ドメインのフォールディング（折りたたみ）によって形成され、抗原の抗原決定基の特徴に相補的な内部表面形状及び電荷分布をもつ三次元結合空間を形成する。特に明記しない限り、抗体は、通常、ポリクローナル抗体、並びにモノクローナル抗体を包含する。用語「抗体」とは、結合ドメインを含む組換えタンパク質、並びにFab、Fab'、F(ab)₂、及びF(ab')₂フラグメントなどのを含む抗体フラグメントも含む。

10

【0023】

本明細書で使用する場合、「リンカー」は、2つの分離した構成要素を互いに結合する結合分子、又は結合分子群をいう。リンカーは、2つの構成要素に最適な間隔を提供するものであってもよいし、又はさらに2つの構成要素が互いから分離できるようにする不安定な連結を供給するものであってもよい。不安定な連結としては、光分解基、酸不安定部分、塩基不安定部分、及び酵素切断基が挙げられる。

【0024】

本明細書で使用する場合、用語「均質アッセイ」とは、サンプル中の化合物の存在又は濃度を決定するための定量又は定性検査をいう。このアッセイでは、未反応の検査試薬を、標的化合物を検出するため又は標的化合物の濃度を測定するために、標的化合物と反応した試薬から分離する必要はない。

20

【0025】

本明細書で使用する場合、「イムノフィリン」という総称は、特異的かつ可逆的に免疫抑制剤に結合する抗体以外のあらゆるタンパク質受容体を意味する。例えば、この用語は、免疫抑制剤であるシクロスポリン、タクロリムス、ラパマイシン、及びエベロリムスに結合する公知のタンパク質受容体にも及ぶことを目的としており、例えばFK506結合タンパク質(FKBP)、シクロフィリン、カルシニューリン、及びラパマイシンの標的タンパク質(TOR)、又はそれらのイムノフィリンの免疫抑制剤結合類似体を含む。かかる類似体は、親イムノフィリンの標的免疫抑制剤に対して高いアフィニティを保持しているが、親タンパク質の断片若しくは融合タンパク質（親タンパク質の少なくとも一部を含む）に相当するタンパク質、又は親イムノフィリンの誘導体（このような誘導体は、親タンパク質と比較して一以上のアミノ酸置換、欠失、若しくは挿入を含んでいる）であるタンパク質を包含する。

30

【0026】

本明細書で使用する場合、「免疫抑制剤類似物」とは、親薬剤のイムノフィリンに対し高いアフィニティを保持している親免疫抑制剤の二量体、断片、二量体化した断片、又は他の誘導体をいう。

【0027】

本明細書で使用する場合、用語「ラパマイシン特異的FKBP」とは、可逆的かつ特異的にラパマイシンに結合するタンパク質をいう。ラパマイシン特異的FKBPの例としては、FKBP25、FKBP25C、FKBP25及びFKBP25Cの断片、並びにFKBP25及びFKBP25のラパマイシン結合断片を含む融合タンパク質が挙げられる。

40

【0028】

用語「外来性免疫抑制剤」とは、免疫抑制剤の存在についてアッセイしようとするサンプル中に最初は存在していなかったが、通常、コンジュゲートの形で、アッセイの間に添加される免疫抑制剤をいう。外来性免疫抑制剤コンジュゲートは、イムノフィリンとの結合についてのサンプル中に存在する免疫抑制剤の競合相手として機能する。

【0029】

50

本明細書で使用する場合、用語「高分子担体」とは、二以上の化合物と連結できるが、その連結した各化合物がそれらに対応する受容体と特異的に結合することを可能にし得る高度に分岐したポリマー骨格（例えば、ポリペプチド又は炭水化物など）をいう。

【0030】

本明細書で使用する場合、用語「蛍光エネルギー移動関係」とは、ドナーフルオロフォアが入射光によって励起された時に、ドナー由来の励起状態エネルギーがアクセプターフルオロフォアに移動するように互いが十分に近位に位置しているドナー及びアクセプターフルオロフォアをいう。

本発明は、サンプル中に存在する免疫抑制剤（標的薬物）を検出するための、及びその量を測定するための均質競合アッセイに関する。一実施形態において、サンプルは、血液のような患者から採取された生体液を意味している。前記アッセイは、サンプルをコンジュゲート（第二の部分に結合した免疫抑制剤類似物を含む）及び標的薬物に特異的な受容体タンパク質と混合することを含む。このコンジュゲートは、受容体タンパク質への結合についてサンプル中に存在する遊離状態の免疫抑制剤と競合する。そして、混合ステップ後に受容体タンパク質に結合したコンジュゲートの量を検出することを利用して、サンプル中の免疫抑制剤の最初の濃度を決定する。通常、2つのアッセイ試薬（すなわち、タンパク質受容体とコンジュゲート）が別々の成分としてサンプルに添加される。しかしながら、一実施形態では、この2つの試薬が一つの組成物として添加される。受容体タンパク質又はコンジュゲートのいずれかを、受容体がコンジュゲートへ結合したときに検出可能なシグナルを生じるマーカーで標識する。サンプル中に存在する免疫抑制剤は、受容体タンパク質への結合についてコンジュゲートと競合する。それにより、サンプル中に存在する免疫抑制剤の濃度に比例したシグナルの減少が生じる。それ故、本明細書で開示される方法は、サンプル中に存在する薬物の量を精製若しくは洗浄ステップなしに測定することを可能にする。

10

20

【0031】

2つの高分子が相互作用したときに検出可能なシグナルを生じる標識系は、当業者には公知であり、これを開示された組成物及び方法における使用に適合させることができる。一実施形態において、本方法は、均質粒子をベースとするアッセイを含む。この方法では、受容体タンパク質（例えば、イムノフィリン）又は免疫抑制剤コンジュゲートが検出粒子に結合されている。受容体タンパク質とコンジュゲート種との結合によって凝集が起こるが、サンプル中に存在する免疫抑制剤と受容体との結合が、コンジュゲートと受容体タンパク質との結合を置換又は阻害する結果、凝集の減少が起こる。この実施形態において、サンプル中に存在する免疫抑制剤の量は、検出された凝集の量に基づいて決定することができる。より具体的には、サンプル中の免疫抑制剤は、受容体タンパク質への結合について免疫抑制剤コンジュゲートと競合し、その結果サンプル中に存在する免疫抑制剤の増加によって、標準的な濁度解析によって検出できる凝集量が減少する。

30

【0032】

一実施形態において、受容体タンパク質は、検出粒子で標識され、また免疫抑制剤コンジュゲートは、リンカーを介して互いが結合した二以上の免疫抑制剤化合物（又は2つの免疫抑制剤類似物）を含む。一実施形態において、免疫抑制剤コンジュゲートは、高分子担体に結合した複数の免疫抑制剤化合物を含む。一実施形態において、高分子担体は、アミノデキストランである。しかしながら、あらゆるポリマー構造を高分子担体として使用することができる。ただし、高分子担体は、免疫抑制剤がそれに対応するイムノフィリンと特異的に結合できるような形で、この担体上に多数の免疫抑制剤化合物を結合させることができるものである。あるいは、免疫抑制剤は、高分子担体に結合するよりもむしろ二量体として形成され得る。例えば、ラパマイシンは、様々なリンカーを用いてC-40の位置を介して二量体化され、ラパマイシン単一受容体アッセイにおいてアミノデキストランコンジュゲートに代わって使用することができる。遊離ラパマイシンは、通常のアミノデキストランコンジュゲートを用いるよりも、これらの二量体コンジュゲートを用いた方がより良好な競合が期待される。

40

50

【0033】

他の実施形態において、コンジュゲート種は、検出粒子に結合した標的免疫抑制剤を含む。そして、受容体タンパク質は、二以上の受容体タンパク質が互いに連結している複合体の形態で存在する。一実施形態において、受容体タンパク質多量体は、標的免疫抑制剤に特異的な2つの受容体タンパク質の間で形成される二量体である。他の実施形態において、受容体タンパク質多量体は、連結した各受容体タンパク質がその能力を維持して免疫抑制剤に特異的に結合するように、互いに連結された複数の受容体タンパク質を含む。

【0034】

別の実施形態において、受容体タンパク質と免疫抑制剤コンジュゲートの結合を検出するアッセイステップは、蛍光又は化学発光検出系、例えば、蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer: FRET) を利用する。FRETは、ドナーフルオロフォアからアクセプターフルオロフォアへの励起状態エネルギーの距離依存的な移動に基づく。ドナーフルオロフォアは入射光によって励起され、アクセプターが20 ~ 60 の範囲内に存在する場合には、ドナー由来の励起状態エネルギーは移動することができる。分子間距離の最適範囲を超えると、エネルギー移動効率は、距離の6乗に反比例して減少する。この移動は、ドナーの蛍光強度及び励起状態の寿命の低減、並びにアクセプターの発光強度の増大をもたらす (Selvin, P.R., Nature Structural Biology, 2000, 7, 9, 730-734)。このアッセイフォーマットは、一組のFRETフルオロフォアで、それぞれ一方のメンバーが受容体タンパク質に、他方がコンジュゲートに結合していることが必要である。ユーロピウムのようなドナーフルオロフォア及びCy5のようなアクセプターフルオロフォアでは、340nmでの光励起、及び665nmでの発光検出が用いられている (Pulli, T., et. al., Analytical Chemistry, 2005, 77, 2637-2642)。いくつかの市販のキットを、タンパク質をドナーフルオロフォア及びアクセプターフルオロフォアで標識するために利用することができる。例えば、LANC E u - W 1 0 2 4 - I T C キレート (Perkin Elmer, AD0013) は、少なくとも1つの脂肪族第1アミン (N末端又はリジン残基) を有するタンパク質をユーロピウムで共有結合で標識するために最適化されている。さらに、Cy Dye Cy 5 mono - Reactive Dye pack (Amersham, Product Code PA23500) は、タンパク質上のアミン基をCy5で共有結合で標識するために利用できる。他の化学物質を利用して、アミノ基 (NHSEステル色素を使用)、チオール基 (マレイミド色素を使用)、又は、アルデヒド基 (ヒドラジド色素を使用) を用いて標識することができる。

【0035】

受容体タンパク質及びコンジュゲートが蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) フルオロフォア対のそれぞれ一メンバーで標識された場合、受容体タンパク質とコンジュゲートの結合によって励起光によりドナーフルオロフォアを励起したときに2つのフルオロフォアが互いに十分近位な範囲内となり、蛍光エネルギー移動が生じる。このような事象は、ドナーフルオロフォア発光の減少、又はアクセプターフルオロフォア発光の増加を検出することで測定することができる。遊離状態の薬物の存在下では、蛍光共鳴エネルギー移動は、標識された受容体上の限られた数の結合部位についての遊離薬物と標識コンジュゲートの競合によって抑制される。

【0036】

本発明の他の実施形態において、蛍光偏光受容体法及び検査キットは、蛍光偏光の原理を利用した免疫抑制剤検出のための即時使用可能な液体試薬を含む。このアッセイフォーマットでは、免疫抑制剤がフルオロフォアでタグを付けられるか又は標識されている。そして、対応するイムノフィリン受容体がバッファ系内で調合される。薬物 - フルオロフォアをもつ免疫抑制剤とサンプル中のあらゆる遊離状態の免疫抑制剤との間で、反応液中で限られた量の対応する特異的なイムノフィリンへの結合について競合反応が起こる。

【0037】

蛍光分子、すなわちフルオロフォアが、適切な波長 (励起波長) の光で照射されると、

長波長（発光波長）でその光の一部が放射される。放射された光が偏光されているか否かは、溶液中で回転するフルオロフォアの自由度に依存する。フルオレセインのような小さな分子は、光放射が起こる以前に急速に回転することができ、その結果、放射光の脱分極をもたらす。一方、イムノフィリンに結合したフルオレセイン標識免疫抑制剤のような蛍光高分子は、よりゆっくりと回転する。それ故、励起から放射の時間枠内で前記高分子はほんの僅かだけ回転し、その放射光は偏光となる。蛍光偏光は、薬物濃度の再生可能な機能であり、サンプル中の薬物濃度の定量的測定に適している。したがって、このアッセイフォーマットにおいて、サンプル中の免疫抑制剤のレベルが増加したとき、蛍光偏光の量は減少する。

【0038】

本発明において、サンプルは、免疫抑制剤を含むと考えられるあらゆる水性サンプルでありうる。一実施形態において、サンプルは、血液、血漿、血清、尿、精液、脳脊髄液、唾液等液を含む、患者から分離された生体液である。一実施形態において、サンプルは、全血である。一実施形態において、血液サンプルは、細胞に結合した免疫抑制剤を遊離させるためにアッセイ試薬と接触させる前に前処理される。より具体的には、一実施形態において、血液サンプルは、メタノール及び水性硫酸亜鉛を含む溶液で抽出され、細胞残屑は、サンプルを検出試薬と混合する前に除かれる。

【0039】

全血をサンプルとして使用し、かつアッセイが微粒子凝集検出方法に基づく場合、血液サンプルは、通常、サンプルとアッセイ試薬とを接触させる前に、細胞に結合した薬物を遊離させるために前処理される。この手順は、全血サンプルと沈殿剤とを混合することを含む。沈殿剤は、当該分野で公知のものから選択され、それには、例えば、メタノール、エタノール、エチレングリコール、アセトニトリル又は同様の水混和性有機溶媒に溶解した水性の硫酸銅又は硫酸亜鉛が含まれる。その後、全血混合物を十分に混合し、遠心する。続いて、上澄をサンプルカップに移し、アッセイを実行するため分析器に置く。一実施形態において、全血サンプルを前処理するために用いる組成物は、メタノールと硫酸亜鉛を含む。サンプルを前処理した後、細胞残屑がアッセイ試薬を加える前に除去される。一実施形態において、細胞残屑は、低速（およそ12,000rpm）での5分間の遠心によって除去される。一実施形態においては、検出粒子がナノシェルであり、かつ血液サンプルがアッセイ試薬の添加前に前処理されない凝集アッセイ法を、免疫抑制剤を検出するために用いる。

【0040】

一実施形態によれば、溶液中に存在する免疫抑制剤の量を定量する方法は、サンプルを免疫抑制剤コンジュゲート及び標的免疫抑制剤に特異的なイムノフィリンと混合することを含む。一実施形態において、コンジュゲートは、高分子担体に結合した標的免疫抑制剤（又は免疫抑制剤類似物）を含み、イムノフィリンは、検出粒子に結合されており、ここで、サンプル中に存在する免疫抑制剤とコンジュゲートは、イムノフィリンとの結合について競合する。その後、イムノフィリンに結合したコンジュゲートの量を、懸濁液中に生じた凝集の量を検出することによって直接測定する。続いて、検出された凝集量を、サンプル中に存在する免疫抑制剤の量と相関させる。一実施形態において、高分子担体はアミノデキストランであり、検出粒子は微粒子又はナノシェルである。

【0041】

一実施形態によれば、受容体タンパク質は、リガンド又はタグのいずれかに相当して検出粒子又は他の検出部分を受容体タンパク質と連結するのに使用されるペプチド配列を含む組換え融合タンパク質として発現される。一実施形態において、融合タンパク質は、ビオチン分子の付着に最適な部位を提供する。この実施形態において、ストレプトアビジン又はアビジンで標識された検出粒子は、検出粒子を受容体タンパク質に結合させるのに用いられる。例えば、受容体タンパク質は、ビオチン化シグナル配列の融合パートナーを含む組換えタンパク質とすることができる。この融合タンパク質は、大腸菌内で、又は無細胞系内で、ビオチンリガーゼ（例えば、Avitag）と共に共発現される。このビオチ

10

20

30

40

50

ンリガーゼは、シグナル配列中のリジン残基にビオチン部分を共有結合で付加するのを触媒する。一実施形態において、このアッセイで使用される受容体タンパク質は、A v i T a gでビオチン標識されたタンパク質であって、A v i T a gが付加される配列は、C末端又はN末端のいずれかに付着されている。

【0042】

本明細書で記載された方法を使用して、シクロスポリン、タクロリムス、ラパマイシン、及びエベロリムスからなる群より選択される免疫抑制剤を、これらの薬剤に特異的な受容体タンパク質を用いて検出することができる。一実施形態において、凝集アッセイ試薬が、サンプル中のラパマイシン又はエベロリムスの量を定量するために提供される。この実施形態において、タンパク質受容体は、検出粒子に結合されたラパマイシン特異的F K B Pを含む。ラパマイシン特異的F K B Pは、標準的方法（共有結合、受動的結合、又はビオチン/（ストレプト）アビジンのような二次的結合相互作用を介する方法など）を用いて検出粒子に結合される。一実施形態において、検出粒子は微粒子であり、さらなる実施形態においては、検出粒子は、ビオチン-ストレプトアビジン又はビオチン-アビジン連結を介してイムノフィリンと結合する。ストレプトアビジン微粒子は、購入することもできるし、あるいは活性化微粒子とある量のストレプトアビジンとの反応を用いることによって調製することもできる。一実施形態によれば、ラパマイシン特異的F K B Pは、F K B P 2 5及びF K B P 2 5 Cからなる群より選択される。アミノデキストラン（A D）又は別の高分子担体（すなわち、ペプチド、タンパク質、及び他の多糖）と結合したラパマイシンを含むコンジュゲートが、他のアッセイ試薬として用いられる。典型的なアミノデキストランコンジュゲートを図1に示す。図2、3及び4は、ラパマイシンのアミノデキストランコンジュゲートの合成を説明している。ラパマイシンのC-40位におけるヒドロキシル基を、ピリジンに溶解したp-ニトロフェニルクロロホルメートを用いて活性化した。その生成物をジメチルアミノピリジンの存在下でDMSO中でアミノデキストランと結合させた。図2は、C-40位でウレタン結合を介したアミノデキストラン-ラパマイシンコンジュゲートの合成を説明している。アミノデキストラン-ラパマイシンコンジュゲートは、ラパマイシンとアミノデキストランとの間にリンカーを用いて作製することもできる（図3）。免疫抑制剤をアミノデキストラン分子から分離するのに親水性PEGリンカーを用いることによって、より高い感度が予測される（図4）。あるいは、ラパマイシン二量体（ラパマイシン-L-ラパマイシン、Lはリンカー）又は他の適当なラパマイシン多量体をラパマイシン-アミノデキストランと置換することができる（図5）。粒子凝集がコンジュゲートの存在下で生じ、サンプル中に存在する遊離状態のラパマイシンによって抑制される。

【0043】

1つの典型的なアッセイフォーマットにおいて、F K B P 2 5を、共有結合でポリスチレン微粒子に結合した。F K B P 2 5の共有結合は、まず、カルボキシ基で修飾した微粒子を活性化剤（例えば、E D C / N H S : 1 - エチル - 3 (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド / N - ヒドロキシスクシンイミド)を用いて活性化し、続いてF K B P 2 5との反応によって行った。この粒子は、ラパマイシン-アミノデキストランコンジュゲートの存在下で凝集した。凝集は、分析対象のサンプル中に存在する遊離ラパマイシンの存在下で抑制される。ラパマイシンアッセイは、0 ~ 2 0 0 n g / m Lの範囲で達成された（図7参照）。

【0044】

親水性リンカーを共有結合によって粒子に連結し、その後F K B P 2 5と結合することもできる。この設計は、ポリスチレン微粒子上に共有結合で連結されている一方で、十分なタンパク質活性を保持しているだけでなく、アッセイにおいてもより良好な感度を実現する。ポリエチレングリコール（PEG）は、親水性スペーサーとして利用され、非特異的結合を低減することが文献で知られている。

【0045】

上述したように、微粒子へのタンパク質の付着は、ストレプトアビジン微粒子及びビオ

10

20

30

40

50

チン標識された受容体タンパク質を使用しても達成することができる。FKBP25は、化学的に、モノビオチン化することができ、また、それを用いてストレプトアビジン微粒子と反応させることができる。FKBP25のモノビオチン化は、ビオチンマレイミド又はビオチンNHSEステルを等量で適量用いて達成することができる。

【0046】

他のアッセイフォーマットにおいて、ラパマイシンは、共有結合で微粒子に結合している。これは、まず、ラパマイシンの活性化エステルとBSA（ウシ血清アルブミン）との反応と、続くカルボキシ基で修飾された微粒子へのBSAの共有結合による付着によって達成される。また、ラパマイシン-微粒子試薬を提供するために、ラパマイシンのビオチン化（図6）及びストレプトアビジン微粒子との反応によって達成することもできる。

10

【0047】

他の実施形態においては、凝集アッセイ試薬をサンプル中のタクロリムスの量を定量するために提供する。この実施形態において、タンパク質受容体は、検出粒子に結合したタクロリムス特異的FKBPを含む。より具体的には、一実施形態において、タクロリムス特異的FKBPは、タクロリムスに選択性を有するように改変されたFKBP12変異体（M.T. DeCenzo et al, Protein Engineering 9, 173-180, 1996参照）を含む。他の実施形態において、タクロリムス特異的FKBPは、FKBP14である。タクロリムス特異的FKBPは、標準的方法（共有結合、受動的結合、又はビオチン/（ストレプト）アビジンのような二次的結合相互作用を介する方法など）を用いて検出粒子に結合される。一実施形態において、検出粒子は微粒子であり、またさらなる実施形態において、検出粒子はビオチン-ストレプトアビジン又はビオチン-アビジン連結を介して受容体タンパク質に結合されている。アミノデキストラン（AD）又は別の高分子担体（すなわち、ペプチド、タンパク質、及び他の多糖）に結合されたタクロリムスを含むコンジュゲートが、他のアッセイ試薬として用いられる。アミノデキストラン-タクロリムスコンジュゲートは、タクロリムスとアミノデキストランとの間に親水性リンカーを用いて作ることもできる。

20

【0048】

本発明は、親薬物に対する選択性を強化した受容体変異体の作製をも意図している。一実施形態によれば、FKBP12ペプチド変異体を、ラパマイシンの親薬物に対するアッセイの特異性を強化するために部位特異的変異誘発を用いて作製する。ラパマイシンの親薬物に対する受容体複合体の特異性を強化するために受容体タンパク質を変異させるという概念は、本明細書で開示されたいずれの受容体タンパク質にも適用することができる。したがって、免疫抑制剤タクロリムスを検出するために、FK506結合タンパク質（FKBP）変異体を用いられ、免疫抑制剤シクロスポリンについては、シクロフィリン変異体を用いられる。

30

【0049】

結晶構造の刊行物を、突然変異誘発の研究補助として使用することができる。変異体結合タンパク質は、当該分野で周知の組換え方法を用いて作製することができ、また、当該分野で周知の方法を用いてその精製を容易にするために組換え方法によって付加されるアフィニティタグを有していてもよい。したがって、以下の表を参照して、以下のアミノ酸残基（すなわち、FKBP12の54位のグルタミン酸、及び87位のヒスチジン）を修飾し、ラパマイシン受容体タンパク質の特異性を強化できることが期待される。

40

【0050】

以下の表は、ラパマイシン代謝産物とFKBP12間で測定されたC-C距離を示す。RCSB PDB（タンパク質データベース）で公開された結晶構造1fapを用いてラパマイシン代謝産物のC-C距離を測定した。

【表 1】

	PDB 1fap C-C 距離	C 部分	FKBP12 (Å)
M1	12-ヒドロキシ-Rapa	C12	H87 (7.12) I90 (6.90)
M2	24-ヒドロキシ-Rapa	C24	E54 (7.69)
M4	39-O-デスメチル-Rapa	C52	E54 (6.79)

10

【 0 0 5 1 】

他の実施形態によれば、サンプル中の免疫抑制剤の存在又は量を決定する方法が提供される。この方法では、検出試薬は、免疫抑制剤に特異的なタンパク質受容体、及び検出粒子に結合した免疫抑制剤を含むコンジュゲートを含む。この実施形態では、タンパク質受容体が、多量体型（例えば、受容体タンパク質の二量体型）である。アッセイ試薬は、サンプルと混合され、コンジュゲートと免疫抑制剤が受容体結合部位への結合について競合する懸濁液を形成する。通常、2つの試薬（すなわち、タンパク質受容体とコンジュゲート）は、別々の成分としてサンプルに加えられる。しかしながら、一実施形態において、2つの試薬は単一組成物として添加される。前記懸濁液中で受容体タンパク質に結合したコンジュゲートの量を直接測定することによって（凝集を測定することによって検出されるように）、サンプル中の標的免疫抑制剤の濃度を決定することができる。一実施形態において、検出粒子は、微粒子又はナノシェルであり、また一実施形態において、検出粒子は、ポリスチレンラテックス微粒子である。さらなる実施形態において、サンプルは、免疫抑制剤を投与されている患者から採取される血液サンプルである。ここで、血液サンプルは、メタノールと水性硫化亜鉛を含む溶液で抽出され、細胞残屑は、サンプルをアッセイ試薬と混合する前に除去される。さらなる実施形態において、検出対象の免疫抑制剤は、ラパマイシンであり、イムノフィリンは、FKBP25の二量体又はより高次の多量体である。他の実施形態において、検出対象の免疫抑制剤は、タクロリムスであり、イムノフィリンは、タクロリムス特異的FKBP12変異体又はFKBP14の二量体若しくはより高次の多量体である。受容体タンパク質二量体及び多量体複合体は、個々の受容体タンパク質を当業者に公知の標準的なリンカーを用いて種々の長さのリンカーで互いに連結することによって形成することができる。

20

30

【 0 0 5 2 】

本発明は、サンプル中の免疫抑制剤を測定するためのアッセイ試薬を含む検査キットも包含する。キットは、さらに、様々な容器（例えば、バイアル、チューブ、ボトル等）を含んでいてもよい。キットは、使用説明書も含んでいることが好ましい。一実施形態において、キットは、標的免疫抑制剤に特異的なタンパク質受容体、及びコンジュゲートを含んでいる。このキットでは、タンパク質受容体が検出粒子に結合しており、またコンジュゲートは多量体型の標的免疫抑制剤を含んでいる。より具体的には、一実施形態において、多量体型の免疫抑制剤は、高分子担体に結合したその薬剤の二量体又は複数の薬剤化合物である。別の実施形態において、キットは、標的免疫抑制剤に特異的なタンパク質受容体、及びコンジュゲート種を含む。このキットでは、タンパク質受容体は、二量体又はより高次の多量体として提供され、コンジュゲートは、検出粒子に結合した標的免疫抑制剤を含んでいる。一実施形態において、ラパマイシンに特異的なタンパク質受容体、及びコンジュゲート種を含むラパマイシン検出用キットが提供される。このキットでは、タンパク質受容体は、検出粒子に結合されており、またコンジュゲートは、高分子担体に結合したラパマイシンを含んでいる。より具体的には、一実施形態において、ラパマイシン特異的なタンパク質受容体は、FKBP25及びFKBP25Cからなる群より選択される。

40

50

他の実施形態において、ラパマイシン特異的なタンパク質受容体は、FKBP25である。他の実施形態において、タクロリムスに特異的なタンパク質受容体及びコンジュゲート種を含むタクロリムス検出用キットが提供される。このキットでは、タンパク質受容体は検出粒子に結合されており、またコンジュゲートは高分子担体に結合したタクロリムスを含んでいる。より具体的には、一実施形態において、タクロリムス特異的なタンパク質受容体は、FKBP14である。

【0053】

本発明をより容易に理解できるように、以下に実施例を挙げて説明する。以下の実施例は、本発明を説明することを目的としており、その範囲を限定するものではない。

【実施例1】

【0054】

<ラパマイシン40-O-p-ニトロフェニルカーボネート(1)の調製>

100mg(0.109mmol)のラパマイシンに2.5mLの新たに蒸留したジクロロメタン(C_2H_2 を通して蒸留されたもの)、33 μ L(0.40mmol)の無水ピリジン、及び33mg(0.16mmol)のp-ニトロフェニルクロロホルメートを-78で加えた。反応混合物を-78で1時間、その後室温にて1時間攪拌した。50mLの水を用いて室温で反応を止めた。生じた混合物を4x50mLのジクロロメタンで抽出した。有機部分を(無水 Na_2SO_4)乾燥して濃縮した。残渣を0.1%トリフルオロ酢酸を含む水及びアセトニトリルの勾配管を用いて分取HPLCで精製した。生成物を含んだ分画を混ぜ合わせ、ロータリーエバポレータ内で濃縮した。その後、凍結乾燥して82mg(0.074mmol、69%)のラパマイシンp-ニトロフェニルカーボネート(1)を白色固体として得た(LC-MS: M+H 1101.5)。

【実施例2】

【0055】

<40-O-ウレタン結合ラパマイシン-アミノデキストランコンジュゲート(2)の調製>

50mg(1.25×10^{-3} mmol)のアミノデキストラン(40,000)(米国特許第6,653,456号に記載のように調製)に2mLの無水DMSOを加えた。混合物を5分間室温で攪拌した。反応混合物に10.7mg(0.087mmol)の4-ジメチルアミノピリジンを、続いて0.5mLの無水DMFに溶解した20mg(0.018mmol)のラパマイシンp-ニトロフェニルカーボネートの溶液を添加した。室温で2日間攪拌して反応を行った。生じた黄色溶液をSpectrapor透析チューブ(分子量カットオフ2000)に入れ、脱イオン水に溶解した90%DMSO(2x3時間)、脱イオン水に溶解した70%DMSO(1x3時間)、脱イオン水に溶解した50%DMSO(1x3時間)、脱イオン水に溶解した30%DMSO(1x3時間)、及び脱イオン水に溶解した10%DMSO(1x3時間)で透析した。続いて、これを脱イオン水で透析し(6x6時間)、得られた溶液を凍結乾燥して、39mgのラパマイシン-アミノデキストランコンジュゲート(2)を白色固体として得た。アミノデキストランへのラパマイシン誘導体の組み込みをUV光280nm($\epsilon = 56,522$)で測定したところ、アミノデキストラン分子あたり3.8モルのラパマイシンが組み込まれた。

【実施例3】

【0056】

<ラパマイシン40-O-グルタレートNHSエステル(3)の調製>

4mLのジクロロメタン(新たに C_2H_2 を通して蒸留されたもの)に溶解した150mg(0.164mmol)のラパマイシンの溶液を-78に冷却した。反応混合物に、61mg(0.25mmol)のスクシンイミド-オキシカルボニル-ブチリルクロリド、15mg(0.12mmol)の4-ジメチルアミノピリジン、及び50 μ Lのピリジンを加えた。スクシンイミド-オキシカルボニル-ブチリルクロリド、すなわち、5-(2,5-ジオキソ-1-ピロリジニル-オキシ)-5-オキソ-ペンタノイルクロリドを、Antonianaらの欧州特許第0503454号に従って調製した。生じた反応混

10

20

30

40

50

合物を - 78 で2時間攪拌した。粗製反応混合物のLC-MSは、不完全な反応を示した。反応混合物に、さらに61mg (0.25mmol)のスクシンイミド-オキシカルボニル-ブチリルクロリドと50 μ L (0.60mmol)のピリジンを-78で添加した。得られた反応混合物を-78で2時間攪拌し、その後、50mLの水で反応を止めた。水層を5 \times 50mLのジクロロメタンで抽出し、有機層と合わせ、乾燥(無水Na₂SO₄)した後、減圧下で濃縮した。生じた無色油を5mLの4:1アセトニトリル:水に溶解し、分取RP HPLCによって、0.1%トリフルオロ酢酸を含む水とアセトニトリルから成る溶媒系で勾配管を用いて精製した。生成物を含む分画を混ぜ合わせ、ロータリーエバポレータで濃縮した。そして凍結乾燥して70mg (0.062mmol, 38%)のラパマイシンNSHエステル(3)を白色固体として得た(LR-ES; M+Na 1147.2)。

【実施例4】

【0057】

<40-O-グルタリルラパマイシンアミノデキストランコンジュゲート(4)の調製>
50mg (2.5 \times 10⁻⁵mmol)のアミノデキストラン(40,000)、及び7.5mg (0.062mmol)の4-ジメチルアミノピリジンに2mLの無水DMSO(ジメチルスルホキシド)を加え、室温で15分間攪拌した。反応混合物に、1mLの無水DMFに溶解した20mg (0.017mmol)のラパマイシン40-O-グルタレートNHSエステル(3)を滴下し、反応混合物を室温で2日間攪拌した。生じた反応混合物をSpectrapor透析チューブ(分子量カットオフ2000)に入れ、脱イオン水に溶解した90%DMSO(2 \times 3時間)、脱イオン水に溶解した70%DMSO(1 \times 3時間)、脱イオン水に溶解した50%DMSO(1 \times 3時間)、脱イオン水に溶解した30%DMSO(1 \times 3時間)、及び脱イオン水に溶解した10%DMSO(1 \times 3時間)で透析した。続いて、これを脱イオン水で透析し(6 \times 6時間)、得られた溶液を凍結乾燥して、49mgのアミノデキストランコンジュゲート(4)を白色固体として得た。アミノデキストランへのラパマイシン誘導体の組み込みをUV光280nm(=56,522)で測定したところ、アミノデキストラン分子あたり5.4モルのラパマイシンが組み込まれた。

【実施例5】

【0058】

<N-スクシニル-NH-(PEG)₂-NH-トリチル(6)の調製>
3mLの新たに蒸留したジクロロメタンに溶解した100mg (0.21mmol)のN-トリチル-4,7,10-トリオキサ-1,13-トリデカン-ジアミン(Trt-NH-(PEG)₂-NH₂;NOVA Biochem)(5)の溶液に、35 μ L (0.42mmol)のピリジン、13.2mg (0.108mmol)の4-ジメチルアミノピリジン及び32.4mg (0.32mmol)の無水コハク酸を加えた。反応混合物を室温で18時間攪拌し、濃縮した。残渣を分取RP HPLCでアセトニトリルと水から成る勾配を用いて精製した。所望の生成物を含む分画を混ぜ合わせた後、凍結乾燥し、119mg (0.21mmol, 99%)のN-スクシニル-NH-(PEG)₂-NH-トリチル(6)を無色油として得た(LC-MS: M+H 563.3)。

【実施例6】

【0059】

<トリチル-NH-(PEG)₂-N-スクシニル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(7)の調製>

115mg (0.20mmol)のN-スクシニル-NH-(PEG)₂-NH-トリチル(6)に、5mLの新たに蒸留したTHF及び114 μ L (0.64mmol)のN,N-ジイソプロピルエチルアミン及び192mg (0.63mmol)のO-(N-スクシンイミジル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレータを加えた。反応混合物を室温で3時間攪拌し、濃縮した。残渣に15mLの水を加え、水性反応混合物を2 \times 15mLのジクロロメタンで抽出した。有機層を合わせて、2 \times

10

20

30

40

50

15 mLの飽和NaHCO₃溶液、続いて1×15 mLの水で洗浄した。有機層を乾燥させ(無水Na₂SO₄)、濃縮し、90 mg (0.136 mmol、67%)のトリチル-NH-(PEG)₂-N-スクシニル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(7)を無色油として得た。これを、さらに精製をすることなく直ちに次のステップで用いた(LC-MS: M+H 660.3)。

【実施例7】

【0060】

<トリチル-NH-(PEG)₂-N-スクシニル-アミノデキストランコンジュゲート(8)の調製>

200 mg (5×10⁻³ mmol)のアミノデキストラン(40,000)に、10 mLのDMSOを加え、室温で攪拌して溶解した。そして、280 μL (1.9 mmol)のトリエチルアミンを加えた。反応混合物に、5 mLの無水DMSOに溶解した90 mg (0.136 mmol)のトリチル-NH-(PEG)₂-N-スクシニル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(7)の溶液を加え、生じた反応混合物を室温で3日間攪拌した。得られた反応混合物をSpectrapor透析チューブ(分子量カットオフ2000)に入れ、脱イオン水に溶解した90% DMSO(2×3時間)、脱イオン水に溶解した70% DMSO(1×3時間)、脱イオン水に溶解した50% DMSO(1×3時間)、脱イオン水に溶解した30% DMSO(1×3時間)、及び脱イオン水に溶解した10% DMSO(1×3時間)で透析した。続いて、これを脱イオン水で透析し(6×6時間)、生じた溶液を凍結乾燥して、180 mgの白色固体を得た。アミノデキストランへのトリチルPEG誘導体の組み込みをUV光230 nm(=2727)で測定したところ、アミノデキストラン分子あたり9.6モルのTrit-PEGが組み込まれた。

10

20

【実施例8】

【0061】

<アミノ-(PEG)₂-N-スクシニル-アミノデキストランコンジュゲート(9)の調製>

180 mgのトリチル-NH-(PEG)₂-N-スクシニル-アミノデキストランコンジュゲート(8)に10 mLのジクロロメタンを添加し、室温で15分間攪拌した。この反応混合物に10 mLのトリフルオロ酢酸を加え、室温で45分間攪拌した。反応混合物を濃縮し、10 mLのジクロロメタンを加えて、減圧下で濃縮した。ジクロロメタンの添加及び濃縮工程をさらに2回繰り返した。残渣に10 mLの水を加え、生じた反応混合物をSpectrapor透析チューブ(分子量カットオフ2000)に入れ、脱イオン水に溶解した90% DMSO(2×3時間)、脱イオン水に溶解した70% DMSO(1×3時間)、脱イオン水に溶解した50% DMSO(1×3時間)、脱イオン水に溶解した30% DMSO(1×3時間)、脱イオン水に溶解した10% DMSO(1×3時間)で透析した。続いて、これを脱イオン水で透析し(6×6時間)、生じた溶液を凍結乾燥して、140 mgのアミノ-(PEG)₂-N-スクシニル-アミノデキストランコンジュゲートトリフルオロ酢酸塩(9)を白色固体として得た。

30

【実施例9】

【0062】

<ラパマイシン-(PEG)₂-N-スクシニル-アミノデキストランコンジュゲート(10)の調製>

50 mg (1.25×10⁻³ mmol)のアミノ-(PEG)₂-N-スクシニル-アミノデキストランコンジュゲートトリフルオロ酢酸塩(9)に2 mLの無水DMSOを加え、5分間攪拌して溶解させた。反応混合物に、7.6 mg (0.062 mmol)の4-ジメチルアミノピリジンを含む1 mLの無水DMFに溶解した20 mg (0.018 mmol)のラパマイシンp-ニトロフェニルカーボネート(1)の溶液を加えて、室温で2日間攪拌した。得られた反応混合物をSpectrapor透析チューブ(分子量カットオフ2000)に入れ、脱イオン水に溶解した90% DMSO(2×3時間)、脱イオン水に溶解した70% DMSO(1×3時間)、脱イオン水に溶解した50% DMSO

40

50

(1 × 3 時間)、脱イオン水に溶解した 30% DMSO (1 × 3 時間)、及び脱イオン水に溶解した 10% DMSO (1 × 3 時間) で透析した。続いて、これを脱イオン水で透析し (6 × 6 時間)、生じた溶液を凍結乾燥して、52 mg のラパマイシン - (PEG)₂ - N - スクシニル - アミノデキストランコンジュゲート (10) を白色固体として得た。アミノデキストランへのラパマイシンの組み込みは、UV 光 280 nm (= 56, 522) で測定したところ、アミノデキストラン分子あたり 2.9 モルのラパマイシンが組み込まれた。

【実施例 10】

【0063】

<ラパマイシンピオチンコンジュゲート (11) の調製>

2.5 mL の無水 N, N - ジメチルホルムアミドに溶解した 59 mg (0.052 mmol) のラパマイシン 40 - O - グルタレート NHS エステル (3) に、30 mg (0.09 mmol) の EZ 連結 5 - (ピオチンアミド) ペンチルアミン (Pierce) を加え、続いて 10 mg (0.081 mmol) の 4 - ジメチルアミノピリジン及び 23 µL (0.27 mmol) の無水ピリジン加えた。得られた反応混合物を室温で 2 時間攪拌して、濃縮した。残渣を分取 RP HPLC で 0.1% トリフルオロ酢酸を含む水とアセトニトリルから成る勾配を用いて精製した。所望の生成物を含む分画を濃縮して凍結乾燥し、23 mg (0.017 mmol, 33%) のラパマイシンピオチンコンジュゲート (11) を白色固体として得た (LC-MS: M+Na 1361.7)。

【実施例 11】

【0064】

<ラパマイシン二量体 (12) の調製>

6 mL の新たに蒸留した THF に溶解した 2.0 mg の p - キシレンジアミンのストック溶液を調製した。混合物を 10 分間室温で攪拌した後、20 mg の 4 - ジメチルアミノピリジンを添加した。別のフラスコで 5 mL の新たに蒸留した THF に溶解した 30 mg (0.026 mmol) のラパマイシン 40 - O - グルタレート NHS エステル (3) の溶液を調製した。反応混合物に、2.5 mL の p - キシレンジアミン (6.1 × 10⁻³ mmol) / 4 - ジメチルアミノピリジン (0.068 mmol) ストック溶液を 4 で加え、反応混合物を 4 で 18 時間攪拌した。反応混合物を減圧下で濃縮し、分取薄層クロマトグラフィーにより、溶離液として酢酸エチルを用いて精製し、20 mg (9.27 × 10⁻³ mmol, 35%) のラパマイシン二量体 (12) を白色固体として得た (HR-MS (+) C₁₂₀H₁₇₈N₄O₃₀ [M+2Na]²⁺ 計算値 1100.6155; 実測値 1100.6151)。

【実施例 12】

【0065】

<FKBP 25 微粒子の調製>

0.216 meq/g のカルボキシル含有量を有する 10% カルボキシル基修飾ポリスチレン微粒子 (0.302 µm) (Seradyn, Indianapolis) 5 mL に、45 mL の脱イオン水を加えた。これを 14,000 rpm にて 4 で 45 分間遠心し、上清を注ぎ除いた。これを 50 mM MES バッファ (pH 6.3) に再懸濁し、遠心した。この工程を 2 回繰り返し、微粒子の濃度を 1% (w/v) に調整した。濃度測定は、COBAS MIRA アナライザ (Roche Diagnostics, Indianapolis) で行った。45 mL の 1% カルボキシル化微粒子調製物の懸濁液に、45 mL の 50 mM MES バッファ (pH 6.3) に溶解した 939 mg の EDC 及び 563 mg の N - ヒドロキシスクシンイミドの溶液を室温に加えた。反応混合物を 18 時間室温で攪拌した。反応混合物を遠心チューブに注ぎ、14,000 rpm で 4 にて 45 分間遠心した。固形物を 50 mM MOPS (pH 7.9) バッファに再懸濁し、上記のように遠心した。この工程を 2 回繰り返し、活性化微粒子調製物を 50 mM MOPS (pH 7.9) 中 1% (w/v) の濃度に調整した。

【0066】

50 mM MOPS バッファ (pH 7.9) に懸濁した 1% 活性化微粒子調製物 8 mL

に4 mLの50 mM MOPSバッファ中に溶解した1 mgのFKBP25溶液を室温で一度に全量加えた。反応混合物を室温で2時間攪拌し、反応混合物を5 mLの1 M水性エタノールアミン(pH9)でクエンチさせた。反応物を室温で18時間攪拌した。これを遠心チューブに移し、14,000 rpmで4 にて45分間遠心した。固形物を50 mM MOPS(pH7.9)バッファに再懸濁し、上記のように遠心した。この工程を2回繰り返し、活性化微粒子調製物を50 mM MOPS(pH7.9)中0.14%(w/v)の濃度に調整した。総計38 mLの0.14%(w/v)FKBP25微粒子調製物が得られた。このFKBP25微粒子調製物を以下の実施例14で記載したようにラパマイシンアッセイの開発におけるR2試薬として用いた。

【実施例13】

【0067】

<PEG修飾FKBP25微粒子の調製>

50 mM MOPSバッファ(pH7.9)に懸濁した1%(w/v)活性化微粒子(実施例12に記載したように調製されたもの)10 mLに、pH9で50 mMリン酸カルシウム溶液中の21 mg(0.047 mmol)のdPEG8(Quanta Biodesign)の10 mL溶液を加えた。反応混合物を室温で18時間攪拌した。これを遠心チューブに移し、14,000 rpmで4 にて45分間遠心した。固形物を50 mM MES(pH6.3)バッファに再懸濁し、上記のように遠心した。この工程を2回繰り返し、PEG修飾微粒子調製物を50 mM MESバッファ(pH6.3)中0.9%(w/v)の濃度に調整した。0.9%(w/v)PEG修飾微粒子調製物が総計10 mL得られた。

【0068】

上記の全てに、50 mM MESバッファ(pH6.3)に溶解した187 mgのEDCと112 mgのNHSの10 mLの溶液を加えた。反応混合物を室温で18時間攪拌した。反応混合物を遠心チューブに注ぎ、14,000 rpmで4 にて45分間遠心した。固形物を50 mM MOPS(pH7.9)バッファに再懸濁し、上記のように遠心した。この工程を2回繰り返し、活性化微粒子を50 mM MOPS(pH7.9)中0.88%(w/v)の濃度に調整した。50 mM MOPSバッファ(pH7.9)中0.88%(w/v)の濃度の活性化PEG結合微粒子調製物が総計で10 mL得られた。

【0069】

4 mLの0.88%(w/v)活性化PEG-微粒子に、2 mLの50 mM MOPS(pH7.9)に溶解した424 µgのFKBP25の溶液を加えた。反応混合物を室温で2時間攪拌し、反応を5 mLの1 Mエタノールアミン(pH9)で止めた。これを遠心チューブに注ぎ、14,000 rpmで4 にて45分間遠心した。固形物を50 mM MOPS(pH7.9)バッファに再懸濁し、上記のように遠心した。この工程を2回繰り返し、活性化微粒子を50 mM MOPS(pH7.9)中0.14%(w/v)の濃度に調整した。0.14%(w/v)のFKBP25-PEG微粒子調製物が総計16 mL得られた。このFKBP25-PEG微粒子調製物をラパマイシンアッセイの開発でR2試薬として使用した。

【実施例14】

【0070】

<FKBP25微粒子及びラパマイシン-アミノデキストランに関する用量反応曲線(ラパマイシン用アッセイ)>

第1標準試薬(R1試薬)は、175 mM PIPESバッファ(pH7.4)を作製することによって調製された。これに、ラパマイシン-アミノデキストランコンジュゲートを400 ng/mLの濃度となるように加えた。また、これに、ポリアクリル酸を1.3%の濃度となるように添加した。

【0071】

第2標準試薬(R2試薬)については、実施例12に記載したように調製し、pH7.9の50 mM MOPSバッファに懸濁して最終濃度0.14%(w/v)で使用した。

【0072】

10

20

30

40

50

ラパマイシンのストック溶液は、DMSO (100 µg/mL) に溶解して作製された。較正溶液は、ストックから0.9%の食塩水に溶解した50、100及び200 ng/mLのラパマイシン溶液を作製することによって調製された。

【0073】

アッセイは、Hitachi 917自動アナライザ (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis) を使用し、35 µLのサンプル容量、180 µLの第1標準試薬及び80 µLの第2標準試薬を用いて (OD 800 nmで測定) 行われた。その結果を図7に示す。

【0074】

次に、既知量のタクロリムスを上記のようにアッセイした。得られたラパマイシン曲線からの測定値とアッセイしたサンプル中のタクロリムスの実際の量とを比較することによって、タクロリムス交差反応性が、このアッセイでは7%であることが決定された。つまり、1000 ng/mLのタクロリムスを含むサンプルは、70 ng/mLのラパマイシンの曲線から読み取れる。それ故、交差反応性は、 $(70 / 1000) \times 100\% = 7\%$ である。

【0075】

本発明を詳細に、かつ特定の実施形態に関して説明したが、これらは、添付の特許請求の範囲で明示した本発明の範囲を逸脱しない範囲で、修飾及び変化することができることは明らかである。特に、本明細書では本発明のいくつかの態様を好ましい又は特に有利なものとしているが、本発明は、必ずしもこれらの好ましい態様に限定されるものではない。

【図面の簡単な説明】

【0076】

前述した本発明の実施形態における詳細な説明は、以下の図によって一層よく理解できる。

【図1】本発明の代表的なアミノデキストランコンジュゲートを説明する図である。

【図2】ウレタン結合型ラパマイシンアミノデキストランコンジュゲートの調製を説明する図である。

【図3】エステル結合型ラパマイシンアミノデキストランコンジュゲートの調製を説明する図である。

【図4】PEGリンカーを用いたラパマイシンアミノデキストランコンジュゲートの調製を説明する図である。

【図5】ラパマイシン二量体の調製を説明する図である。

【図6】ラパマイシンピオチンの調製を説明する図である。

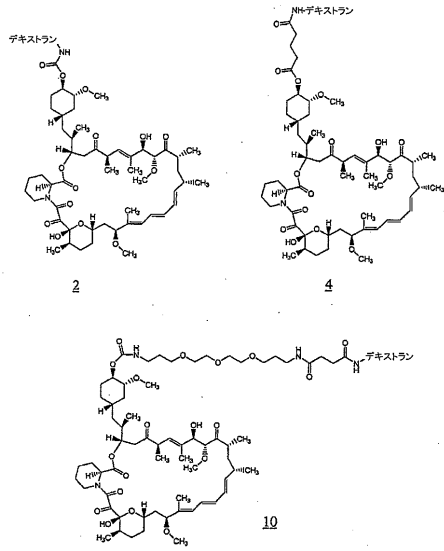
【図7】実施例14に記載の用量反応曲線を示す。

10

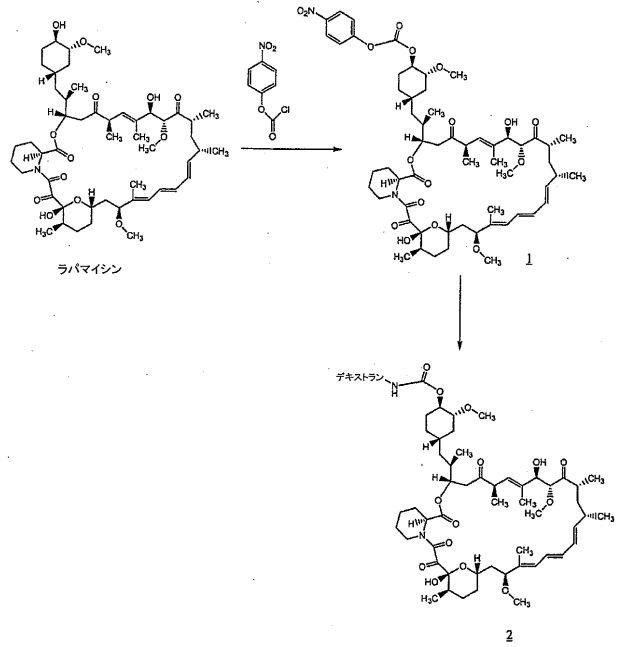
20

30

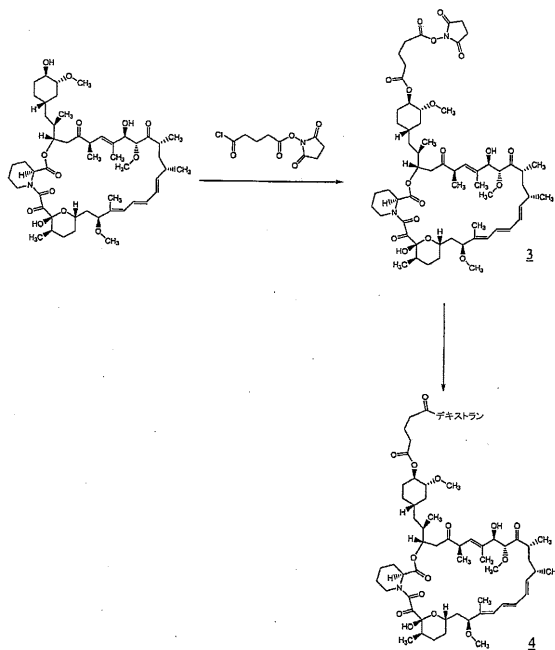
【 図 1 】



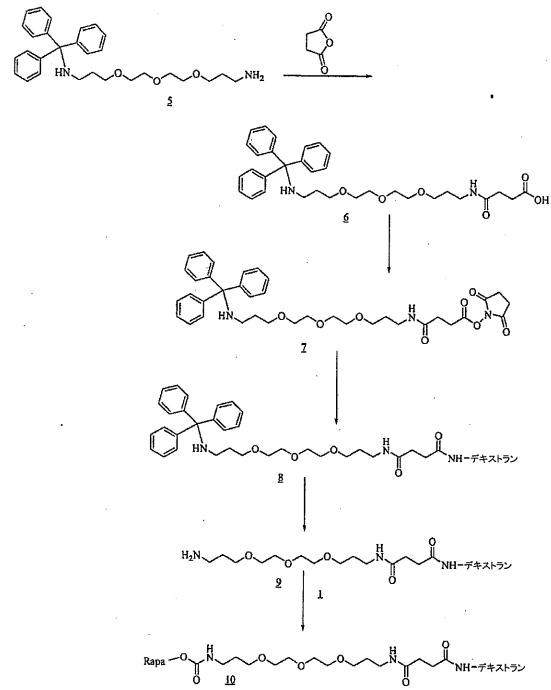
【 図 2 】



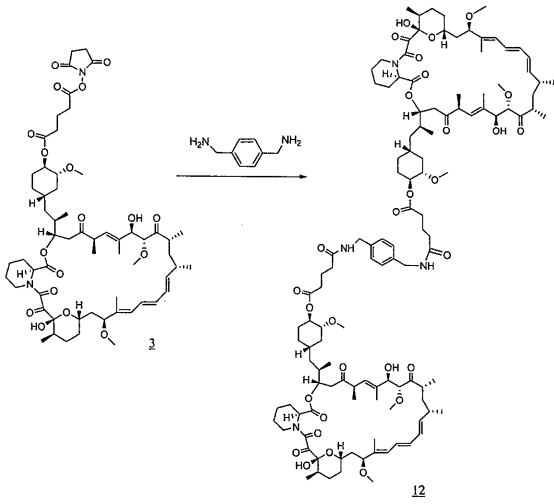
【 図 3 】



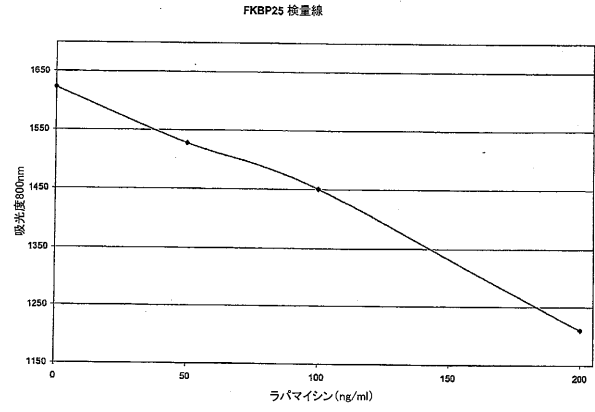
【 図 4 】



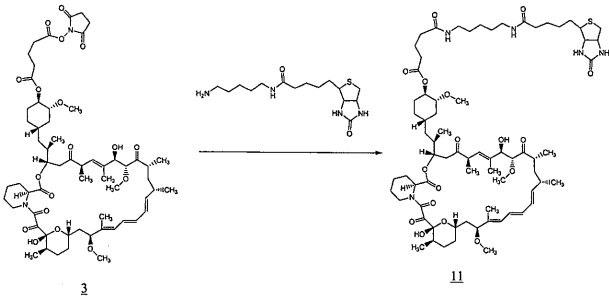
【 図 5 】



【 図 7 】



【 図 6 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/EP2006/008664
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/94 C12Q1/533		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 322 772 A (SOLDIN STEVEN J [US]) 21 June 1994 (1994-06-21)	1,5,6,8, 9,14,16, 19,23,25
Y	page 3, lines 4-23 page 11, line 6 page 11, line 21 - page 12, line 1 page 16, lines 13-24 page 6, lines 6-25 claims 11-14	1-10, 13-20, 23-26
----- /---		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document 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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
16 February 2007		26/03/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Schlegel, Birgit

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/EP2006/008664

G(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LIANG J ET AL: "Structure of the human 25 kDa FK506 binding protein complexed with rapamycin" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY 1996 UNITED STATES, vol. 118, no. 5, 1996, pages 1231-1232, XP002405244 ISSN: 0002-7863 cited in the application page 1231, column 1	10,20
Y	EP 1 239 285 A (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]) 11 September 2002 (2002-09-11) the whole document	2-4,7, 15,17, 18,26
X	EP 0 372 862 A2 (CHILDREN S NATIONAL MEDICAL CE [US]) 13 June 1990 (1990-06-13) the whole document	1,5,6,8, 14,16,25
Y		2-4,7, 13,17, 18,24
Y	SITTAMPALAM G S ET AL: "HIGH-THROUGHPUT SCREENING: ADVANCES IN ASSAY TECHNOLOGIES" CURRENT OPINION IN CHEMICAL BIOLOGY, CURRENT BIOLOGY LTD, LONDON, GB, vol. 1, 1997, pages 384-391, XP002940175 ISSN: 1367-5931 abstract	13,24
X	WO 91/17439 A (CHILDRENS RES INST [US]) 14 November 1991 (1991-11-14)	1,5,6,8, 11,14, 16,21,25
Y	the whole document	2-4,7, 12,13, 17,18, 22,24
Y	DAVIS ET AL: "An immunophilin-binding assay for sirolimus." CLINICAL THERAPEUTICS. 2000, vol. 22 Suppl B, 2000, pages B62-B70, XP002405243 ISSN: 0149-2918 cited in the application page B66, column 1, lines 11-17 - column 2, lines 1-6; table 2 page B67, column 1, paragraph 2	12,22
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/008664

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>DECENZO M T ET AL: "FK506-binding protein mutational analysis: defining the active-site residue contributions to catalysis and the stability of ligand complexes." PROTEIN ENGINEERING. FEB 1996, vol. 9, no. 2, February 1996 (1996-02), pages 173-180, XP002061407 ISSN: 0269-2139 cited in the application table 2 abstract</p>	12,22
Y	<p>ARMSTRONG V W ET AL: "Drug monitoring of sirolimus and everolimus" LABORATORIUMSMEDIZIN 2003 GERMANY, vol. 27, no. 5-6, 2003, pages 222-227, XP002420543 ISSN: 0342-3026 page 223, column 1, paragraph 1 - column 2, paragraph 1; figure 1 page 225, column 1, paragraph 3 - page 226, column 2, paragraph 3 abstract</p>	1,5,6,8, 9,13,14, 16,19, 23-25
P,Y	<p>US 2005/208607 A1 (ROBERTS MARK [US] ET AL) 22 September 2005 (2005-09-22)</p> <p>paragraphs [0008], [0009], [0047] - [0089], [0108] - [0149]</p>	1-9,13, 14, 16-19, 23-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2006/008664**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2006/008664

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCTISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-7, 13, 14, 16-18, 24, 25 (all fully) and 8 (partially)

method and corresponding kit for determining the presence or amount cyclosporin

2. claims: 1-7, 11-14, 16-18, 21, 22, 24, 25 (all fully), 8 (partially)

method and corresponding kit for determining the presence or amount tacrolimus

3. claims: 1-7, 10, 13-18, 20, 24, 25, 26 (all fully) and 8, 9, 19, 23 (all partially)

method and corresponding kit for determining the presence or amount rapamycin

4. claims: 1-7, 13, 14, 16-18, 24, 25 (all fully) and 8, 9, 19, and 23 (all partially)

method and corresponding kit for determining the presence or amount everolimus

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2006/008664

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5322772	A	21-06-1994	AU 1773692 A	17-11-1992
			WO 9218527 A1	29-10-1992
EP 1239285	A	11-09-2002	NONE	
EP 0372862	A2	13-06-1990	AU 630901 B2	12-11-1992
			AU 4560789 A	07-06-1990
			CA 2004387 A1	02-06-1990
			JP 2209897 A	21-08-1990
WO 9117439	A	14-11-1991	AU 657096 B2	02-03-1995
			AU 8186491 A	27-11-1991
			CA 2063580 A1	10-11-1991
			EP 0482189 A1	29-04-1992
			JP 5502101 T	15-04-1993
			JP 3240135 B2	17-12-2001
US 2005208607	A1	22-09-2005	US 2006141548 A1	29-06-2006

フロントページの続き

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

(72)発明者 シグラー, ジェラルド, エフ.

アメリカ合衆国 4 6 0 3 3 インディアナ州, カーメル, アイアンウッド ドライブ 8 8 8

(72)発明者 ゴーシャル, ミタリ

アメリカ合衆国 4 6 0 6 0 インディアナ州, フィッシャーズ, パークショア ドライブ 1 0 1 5 3

(72)発明者 ドーン, アラン

アメリカ合衆国 4 6 0 3 3 インディアナ州, カーメル, ダブ ドライブ 1 4 2 4 1

(72)発明者 ラシド, シェイカー

アメリカ合衆国 4 6 0 3 8 インディアナ州, フィッシャーズ, ビックネル サークル 1 0 3 9 1