

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

G01N 33/94

G01N 33/68

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 94193303.2

[45]授权公告日 2002年7月24日

[11]授权公告号 CN 1088196C

[22]申请日 1994.9.7

[21]申请号 94193303.2

[30]优先权

[32]1993.9.8 [33]GB [31]9318612.0

[86]国际申请 PCT/EP94/02986 1994.9.7

[87]国际公布 W095/07468 英 1995.3.16

[85]进入国家阶段日期 1996.3.7

[73]专利权人 诺瓦蒂斯有限公司

地址 瑞士巴塞尔

[72]发明人 F·勒盖 R·文格

审查员 王 奕

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 关立新 谭明胜

权利要求书2页 说明书13页 附图页数0页

[54]发明名称 血液中与免疫亲和素结合的药物浓度的测定方法及试剂盒

[57]摘要

本发明提供了测定免疫亲和素结合的药物(如环孢多肽类、纳巴霉素类和FK 506类化合物)其血液含量的新方法,该方法包括通过应用结合竞争剂从免疫亲和素结合的药物中置换出药物的新步骤。因此不需要萃取步骤并提高了测定的简化程度和准确度。测定试剂盒包括结合竞争剂和受体(即单克隆抗体),受体能与药物结合但与结合竞争剂不明显地结合,在所述测定中提供了免疫亲和素结合的化合物作为结合竞争剂的新用途。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

知识产权出版社出版

权 利 要 求 书

1. 一种血液中与免疫亲和素结合的药物浓度的测定方法，所述药物选自环孢多肽类、纳巴霉素、40-氧-(2-羟乙基)纳巴霉素和 FK506，所述方法包括在血液样品中加入结合竞争剂，所述结合竞争剂通过与样品中免疫亲和素结合而从药物-免疫亲和素复合物中置换出药物；所述方法还包括向血液样品加入能与药物结合但与结合竞争剂不明显结合的受体，形成药物-受体复合物，从样品中分离出受体-药物复合物；测定该药物的含量。

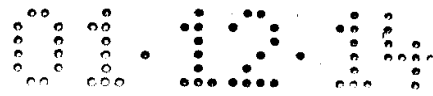
2. 权利要求 1 所述的测定方法，其中免疫亲和素结合的药物是环孢多肽 A，结合竞争剂是[Thr², Leu⁵, D-Hiv⁸, Leu¹⁰]一环孢多肽 A，并且受体是单克隆抗体。

3. 权利要求 1 所述的测定方法，其中免疫亲和素结合的药物是 FK506，结合竞争剂是纳巴霉素，并且受体是单克隆抗体；或者免疫亲和素结合的药物是纳巴霉素或 40-氧-羟乙基纳巴霉素，结合竞争剂是 FK506，并且受体是单克隆抗体。

4. 适用于测定血液中与免疫亲和素结合的药物含量的测定试剂盒，所述药物选自环孢多肽类、纳巴霉素、40-氧-(2-羟乙基)纳巴霉素和 FK506，该试剂盒包括能够在血液中从药物-免疫亲和素复合物中置换出药物的结合竞争剂；能与药物结合但与竞争剂不明显结合的受体。

5. 权利要求 4 所述的测定试剂盒，其中免疫亲和素结合药物是环孢多肽 A，结合竞争剂是[Thr², Leu⁵, D-Hiv⁸, Leu¹⁰]一环孢多肽 A，并且受体是单克隆抗体。

6. 权利要求 4 所述的测定试剂盒，其中免疫亲和素结合的药物是 FK506，结合竞争剂是纳巴霉素，并且受体是单克隆抗体；或者免疫亲和素结合的药物是纳巴霉素或 40-氧-羟乙基纳巴霉素，结合竞争剂是 FK506，并且受体是单克隆抗体。



7. 一种免疫亲和素结合化合物，它是[Thr², Leu³, D-Hiv⁸, Leu¹⁰]—环孢多肽 A，在测定环孢多肽类的血液含量的测定试剂盒或方法中用作免疫亲和素结合的竞争剂。

说明书

血液中与免疫亲和素结合的药物浓度的测定方法及试剂盒

本发明是关于在特异性结合蛋白存在的情况下用于测定未经萃取的血液中药物的测定方法和测定试剂盒。该测定方法尤其适合于测定与免疫亲和素结合药物（如环孢多肽素、纳巴霉素类或FK 506类化合物）的血中浓度。

环孢多肽类包括一类结构上不同的环状聚N-甲基化的十一肽，它们通常具有免疫抑制作用、抗炎作用、抗病毒作用和/或抗寄生虫作用，其作用较大或较小。第一个被鉴定的环孢多肽类药物是真菌代谢产物环孢多肽A（或称为Ciclosporin），其结构已在默克公司索引（Merck Index，第11版，默克公司，Rahway，新泽西，美国，1989）中在编号(listing)2759下给出。后来被鉴定的环孢多肽有环孢多肽B、C、D和G，它们也列在Merck Index 2759中。大量合成的类似物也是已知的，具有代表性的实例已在EP 296123、EP 484281和GB 2222770中公开。

纳巴霉素是由吸水链霉菌产生的大环内酯免疫抑制剂，已发现它在药学上有许多用途，尤其可作为免疫抑制剂，用于治疗 and 预防器官移植排斥反应和自身免疫性疾病。纳巴霉素的结构见Kessler, H., 等1993; *Helv. Chim. Acta*; 76: 117。已合成了大量的纳巴霉素的衍生物，包括例如某些酰基和氨酰基-纳巴霉素（见美国专利4316885、4650803和5151413）、27-脱甲基-纳巴霉素（见WO 92/14737）、26-二氢-纳巴霉素（见美国专利5138051）、某些吡啶类衍生物

(见美国专利5164399)、某些烷氧基酯衍生物(见美国专利5233036)和4-O-烷基化的衍生物(WO 94/09010)。纳巴霉素及其结构类似物和衍生物在本申请说明书中总起来称为“纳巴霉素类”。

FK 506是由津岛链霉菌No 9993产生的大环内酯免疫抑制剂。FK 506的结构见Merck Index的附录A 5。保留有FK 506的基本结构和免疫学性质的大量有相关化合物也是已知的。这些化合物在许多专利(例如EP 184162、EP 315973、EP 323042、EP 423714、EO 427680、EP 465426、EP 474126、WO 91/13889、WO 91/19495、EP 484936、EP532088、EP 532089、WO 93/5059等)中已经公开。这些化合物在本申请说明书中总起来称为“FK 506类化合物”

由于它们十分有用的药学特性,因此环孢多肽类(尤其是环孢多肽A和G)、纳巴霉素类和FK 506类化合物广泛地用于例如防止移植排斥反应和治疗自身免疫疾病。但是,在较大剂量下这些化合物有副作用,因此它们在血液中的浓度必须保持在某一治疗的范围内。由于生物利用度和代谢转化速率对各个患者是特有的,所以给药剂量对各个患者也应是特定的。因此每隔一定间隔监测上述免疫抑制剂在血液中的浓度是必须的。

虽然以高压液相色谱法(HPLC)为基础的某些测定方法已经被建立,但是都存在应用麻烦,或者没有足够专一性的缺点。对于环孢多肽和FK-506,已经制备出其特异性单克隆抗体,并已建立了以该抗体为基础的测定方法。但是,至今提供的所有这些测定方法均需要首先对血液或血浆样品用溶剂(如甲醇)进行萃取,然后用蒸发或稀释法将溶剂除去。最后才能将抗体加到样品中进行放射免疫测定(RIA)。虽然这种以特异性单克隆抗体为基础的测定方法证明是很好的,但是它需要萃取步骤,下一步又要除去溶剂,如果不小心的话,将会导致

测定变得不敏感和不精确。因此，该测定方法必须由熟练的技术人员操作，并且该方法很耗费时间。

鉴于环孢多肽、纳巴霉素和FK 506类化合物作为药物应用的重要性，因此需要建立一种简单的、灵敏的检测方法，用于测定它们在血液中的浓度。

因此，本发明提供了一种检测血液中与免疫亲和素结合的药物浓度的测定方法，该方法包括：加入结合竞争剂，从血液中的免疫抑制剂-免疫亲和素复合物中置换出该药物；再加入一个能与该药物结合但与结合竞争剂不明显结合的受体；然后从样品中分离出受体-药物复合物；测定该药物的量。

现已发现，在血液中，环孢多肽、纳巴霉素或FK 506化合物的一部分是以药物-免疫亲和素复合物的形式存在。如果用结合竞争剂从上述复合物中置换出药物，那么就不需要用甲醇萃取血样，这样就消除了由于甲醇萃取和除去甲醇而造成的不利影响。据此原理而设计的检测方法能给出准确的结果，并且方法简单，因此对环孢多肽、纳巴霉素或FK 506类化合物的检测本方法是一个惊人的突破。例如，本发明测定方法可检测低至0.7ng（环孢多肽A）/ml（全血）的浓度，并且变异系数小于30%。与目前市场上提供的环孢多肽A检测方法相比，本发明方法好得多。

免疫亲和素是一类能与环孢多肽、纳巴霉素或FK 506类化合物结合的细胞内结合蛋白质。现已知道存在两类不同的免疫亲和素；能与环孢多肽类结合的为环亲合因子（cyclophilin），以及能与纳巴霉素和FK 506类化合物结合的巨亲合因子（macrophilin）。某些免疫亲和素的结构已由Walkinshaw等叙述（Transplantation Proceedings, 24, 4(2), 8-13, (1992)）。具体的实例是环亲合因子A和巨

亲和因子-12（通常称为FKBP-12）。

用于从免疫亲和素-药物复合物中置换出药物的结合竞争剂的用量可能随药物不同而改变，也可能随结合竞争剂不同而不同。但是在所有情况下。若同时以几个药物浓度（包括空白）和以几个结合竞争剂浓度进行检测，可以容易地确定结合竞争剂的最佳用量范围。然后将样品稀释2-3倍，并在每一稀释浓度下再次进行测定。比较各次测定的灵敏度，并将使测定灵敏度降低的结合竞争剂的那些浓度排除。

识别并与药物结合的受体可以是用于常规测定中的任何一种可特异性结合的化合物，例如多克隆、单克隆或重组的抗体、抗体片段或分子印迹聚合物（例如由Vlatakis等所述（Nature, 361: 645, (1993)），其中最好是单克隆抗体。

一旦药物从药物-免疫亲和素复合物中释放出来，与受体结合的药物量就可以用任何一种测定方法来检测，最好是用基于单克隆抗体的测定方法，例如用测定药物竞争性与抗体或受体结合能力的竞争性检测法，或者是非竞争性检测法进行测定。最好采用竞争性检测法，例如在有或没有待测样品的情况下，以一个标记的药物（示踪体）作为抗体的竞争剂。示踪体可以用能够提供适当示值读数（例如放射性的、荧光的、发光的或比色示值读数）的标记物作为常规技术进行标记。另外，受体的竞争剂可以是包被在测定室表面的未标记的药物（为用于产生抗体的任选的药物-蛋白免疫原结合物），例如在酶联免疫吸附测定法（ELISA）中或者在一个其药物抗体本身被标记的系统中。抗体或受体在测定溶液中可能是游离的，或者被包被在测定室壁的表面，这取决于所用的检测系统。在竞争性测定中，示值读数（例如，结合于抗体或受体的示踪物的量）与待测样品中药物的量成反比。含有已知浓度药物的标准溶液可以象常规一样用来使测定标准

化。

在我们提到与药物结合但与结合竞争剂不明显结合的受体时，我们意指在药物和结合竞争剂之间的受体交叉反应性的程度不足以明显地影响本测定的灵敏度。对结合竞争剂与药物（和/或在竞争性测定中是结合竞争剂与示踪体）之间的可以容许的交叉反应性的精确量当然可以在某种程度上随结合竞争剂对免疫亲和素的相对亲合性（与对药物的亲合性相比较）而改变：亲合性越高，置换药物所需要的结合竞争剂的浓度越低，因此可以容许的不影响该测定方法准确度的受体交叉反应性也越大。实际上，交叉反应性的显著性最好用不同量的结合竞争剂通过比较标准曲线来进行测定。一旦得到置换药物的结合竞争剂的最小浓度，由于结合竞争剂浓度已增加到预期用于本测定的最高水平，因此标准曲线将不会显著地变化，由此可证明，在本测定中与抗体的任何交叉反应性是不显著的（如果有与抗体的交叉反应性，那么存在的高浓度结合竞争剂就会使药物含量的观察测量值升高，因为该检测法测定的是药物加结合竞争剂）。在存在和不存在结合竞争剂的情况下，各标准曲线之间的任何差异的显著性可以用标准的统计学方法（例如 t - 测验）进行评估。但是，由于与待测样品中的药物相比较，结合竞争剂通常是以更高浓度存在，因此作为一个准则，当以缓冲液中的竞争性检测法测定时，在药物和结合竞争剂之间的受体交叉反应性应低于例如 1%，最好低于 0.1%。

本发明的一个方面，所述药物为环孢多肽，而结合竞争剂是能与免疫亲和素结合环孢多肽类似物。最好的结合竞争剂是在 EP296123 中叙述的 [Thr² , Leu⁵ , D-Hiv⁸ , Leu¹⁰] - 环孢多肽 A，它能竞争性与亲环合因子 (cyclophilin) A 结合。最好的受体是特异性的环孢多肽单克隆抗体，如在 WO 86/2080 中叙述。环孢多肽类的实例

是在EP 484281 中描述的免疫抑制剂环孢多肽 A 和环孢多肽 G，以及抗 HIV 复制化合物 [Meile⁴] - 环孢多肽 A。

如果竞争性检测法被用来测定环孢多肽，那么受体竞争剂可以是结合在测定板孔表面的环孢多肽（例如在 WO 86/2080 中叙述的环孢多肽 - 蛋白质结合物），或者是标记的环孢多肽（示踪体），例如（i）放射性标记的环孢多肽如氚化的二氢环孢多肽 A，或(ii)标记的 [Thr²] - 环孢多肽 A，[(D) Lys⁸] - 环孢多肽 A，或 [氧 - 2 - 羟乙基 (D) Ser⁸] - 环孢多肽 A 衍生物，例如具有能提供荧光、发光或比色信号标记的衍生物，如丹酰基或生物素基衍生物，例如 [ε - N - 生物素基 (D) Lys⁸] - 环孢多肽 A，或 [氧 - (2 - 生物素酰氧基乙基) Thr²] - 环孢多肽 A。这些标记的环孢多肽一般可以按 WO 86/2080 中叙述的方法制备，或用市场上有出售的许多用于标记化合物的试剂盒（例如 Sigma 或 Amersham 公司产品）。

一个测定环孢多肽 A 含量特别好的方法包括用环孢多肽 A - 特异性单克隆抗体包被检测板（如微量滴定板）孔的表面（例如先用山羊抗小鼠抗体包被该检测板，然后使环孢多肽 A - 特异性单克隆抗体的 Fc 区域与山羊抗小鼠抗体结合，这样环孢多肽 A 抗体的结合区域是游离的）。然后将待测样品（例如患者的血液）、结合竞争剂（例如 [Thr² 、 Leu⁵ 、 D-Hiv⁸ 、 Leu¹⁰] - 环孢多肽 A）和标记的（例如生物素标记的）环孢多肽示踪体（例如 [氧 - (2 - 生物素酰氧基乙基) Thr²] - 环孢多肽 A）在检测板孔中合并，并保温 - 恒定的时间。保温时间是足以使抗体与药物和示踪体结合的时间，例如至少 1 小时，最好至少 2 小时。然后清洗检测板孔。结合的示踪体的量可根据所用标记的类型用常规的方法进行测定，例如生物素标记可以用市场上提供的带有酶链亲合素（一种与生物素具有高度亲合力的细菌

蛋白)的检测试剂来识别,因为该亲合素连接了一个能分解底物给出荧光、发光或比色示值读数的酶(辣根过氧化物酶)。

本发明的第二方面是,药物为FK 506类化合物,例如FK 506,结合竞争剂是能与巨亲合因子1 2结合的化合物。任何合适的结合巨亲合因子12,并能置换FK 506的化合物都可以应用。纳巴霉素与FK 506竞争结合巨亲合因子-12,可首选用作为结合竞争剂。合适的FK 506化合物抗体也可用于测定;最好是特异性抗体如在EP-A 0293892中所述的。如果应用竞争性检测法,那么抗体的竞争剂可以是结合于测定板上的FK 506化合物,或者最好是FK 506的标记衍生物,例如放射性标记的衍生物(如氟标记的FK 506),或其他标记的衍生物,如POD-FK 506(在EP-A 0293892中叙述的是POD-标记的FR-900506)。

本发明的第三方面是,药物为纳巴霉素,例如纳巴霉素或4 0-氧-羟乙基纳巴霉素(WO 94/09010)。结合竞争剂是能与巨亲合因子1 2结合的化合物。可以应用任一合适的结合巨亲合因子1 2的,并能够取代纳巴霉素的化合物。FK 506与纳巴霉素竞争结合巨亲合因子-1 2,因此可首选用作结合竞争剂。受体最好是纳巴霉素特异性单克隆抗体[注:纳巴霉素选择性单克隆抗体在文献中未见叙述。但是我们已应用标准的Köhler-Milstein技术制得具有高选择性的抗体,其中所用抗原是纳巴霉素的免疫原结合物,例如通过纳巴霉素上的一个羟基,将纳巴霉素连接到一个免疫原蛋白上,最好是通过位于纳巴霉素的环己基位置(纳巴霉素的4 0位)上的羟基,或相应于纳巴霉素2 8位上的羟基。使纳巴霉素连接到蛋白质上的方法是,首先通过制备带有活性偶合基团的纳巴霉素,然后使活化的纳巴霉素偶合到蛋白质上。活性偶合基团是能够与蛋白质直接反应形成共价连接而无需应用使之能够、影响或促进与蛋白质反应的偶合剂(如碳二亚胺类试



剂)的基团。例如40-氧-活化的纳巴霉素是用琥珀酸酐在DMAP和吡啶存在下氧-酰基化的,结果形成纳巴霉素半琥珀酸酯(40-氧-(3-羧基)丙酰基纳巴霉素);然后用N-羟基琥珀酰亚胺于EDC、Et₃N和CH₂Cl₂存在下使其活化,形成琥珀酰亚胺基氧琥珀酰纳巴霉素(40-氧-(3-羧基)丙酰基纳巴霉素N-羟基琥珀酰亚胺酯)。通过在40-羟基上优先保护,同样可制备28-氧-活化的纳巴霉素,然后连接到蛋白质上,制得28-氧-连接的免疫原结合物,此结合物可用于制备用40-氧-连接的结合物得到的具有不同特异性的抗体,例如在纳巴霉素不同的环己基位置有高度敏感性]。如果应用竞争性测定法,那么对抗体的竞争剂可以是结合于测定板的纳巴霉素,或者最好是标记的纳巴霉素,例如荧光标记的纳巴霉素,例如可通过如上所述,使活化的纳巴霉素与标记的基团(如生物素或丹酰基)反应来制备,或通过放射性标记(如氘标记)的纳巴霉素来制备。

本发明的测定方法具有许多优点,它可以应用标准的生物分析仪器迅速、简便地完成,得到精确和具有重现性的结果。此外,本方法可以应用全面而无需萃取。

本发明还提供了一套适合于检测血中亲免疫因子结合药物量的测定试剂盒,该试剂盒包括一个结合竞争剂,用于从血液中置换药物-免疫亲和素复合物中的药物;一个抗体,它能与药物结合但不明显地与结合竞争剂结合。

抗体最好是对药物具有特异性的单克隆抗体。

如果药物是环孢多肽,那么结合竞争剂可以是能与环亲合因子结合环孢多肽类似物。优选的结合竞争剂是[Thr²,Leu⁵,D-Hiv⁸,Leu¹⁰]-环孢多肽A。优选的抗体是W0 86/2080中叙述的环孢多

肽 A - 特异性单克隆抗体。

如果药物是FK 506化合物或纳巴霉素，那么结合竞争剂可以分别是纳巴霉素或FK 506，或为其能与巨亲合因子 1 2 结合的类似物。可以应用任何对FK 506化合物或纳巴霉素合适的抗体；最好是特异性抗体例如上述用于纳巴霉素制备的抗体或如EP-A 0293892 中所述制备的抗体。

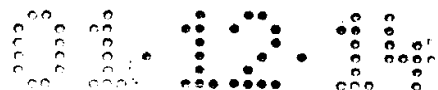
本试剂盒还可进一步包括一个合适的标记示踪体、一个标准品以及应用指南。示踪体的标记可以用任一合适的标记，例如放射性、荧光或比色标记。如果方便，试剂盒中的成分可以为冷冻干燥的形式。

最后，在进一步的实施方案中，本发明还提供了以一种免疫亲和素结合的化合物作为免疫亲和素结合的竞争剂，在用于测定另一种免疫亲和素结合的化合物血液含量的检测试剂盒或方法中新的用途，例如在测定环孢多肽血液含量的试剂盒或方法中应用 [Thr², Leu⁵, D-Hiv⁸, Leu¹⁰] - 环孢多肽 A；在测定FK 506化合物血液含量的试剂盒或方法中应用纳巴霉素；在测定纳巴霉素血液含量的试剂盒或方法中应用FK 506。

下面通过实施例的方式叙述本发明，但不限制本发明。很显然，对于熟悉本技术领域的专业人员，试剂的精确浓度和反应的条件是容许改变的，只要该改变对每次测定是恒定的。应用结合竞争剂以便从免疫亲和素-药物复合物中释放药物的其他测定系统被认为是属于本发明的范围；一旦药物从免疫亲和素-药物结合复合物中释放，当然可以用任一常用的方法测定它。

实施例 1 - 环孢多肽 A 测定法

标定样品：向 1 ml 70% v/v 乙醇水溶液中加入 16 μg 环孢多肽 A 并于 4 °C 贮藏。取 50 μl 环孢多肽 A 溶液置于 1 ml 人血（从



Blutspendezentrum Basel公司得到)中稀释,得到浓度为800ng/ml的环孢多肽A。然后将500 μl 环孢多肽A 溶液于1 ml人血中经连续稀释制备浓度为400ng/ml、200ng/ml、100ng/ml、50ng/ml、25ng/ml、12.5ng/ml、6.2ng/ml、3.1ng/ml、1.6ng/ml、0.8ng/ml、和0.4ng/ml的标定样品。另制备一个不含环孢多肽A的血样作为空白对照。

条件化的微量滴定板: 将100 μl 山羊抗小鼠抗体(未结合的GaM IgG Fc, Pierce 31170)用磷酸盐缓冲液(PBS)稀释至10 μg/ml, 包被几块96孔微量滴定板的每个孔。将微量滴定板于4 °C保温过夜。山羊抗小鼠抗体被弃去,并向各个孔内加入200 μl 封闭溶液(2g 牛血清白蛋白溶于100ml PBS中)。微量滴定板于37 °C保温2小时,然后在培养板洗涤器上用3 × 300 μl PBS/吐温20溶液(0.5g 吐温20于1L PBS中)洗涤。将此条件化的微量滴定板于4 °C贮藏。

抗体板: 将1 ml PBS/吐温20溶液加到装有冷冻干燥的环孢多肽A 特异性单克隆抗体的小试管中。该抗体已在W086/2080中叙述,并成为市场上提供的Sandimmun® 试剂盒的一部分。然后抗体溶液用PBS/吐温20溶液按1:10稀释,吸取100 μl加到条件化的微量滴定板选定的几个孔内。吸取100 μl PBS/吐温20溶液至其余的孔内。微量滴定板于4 °C保温过夜。

环孢多肽示踪体: 从市场上提供的Sandimmun® 试剂盒中可得到含1 ml放射性二氢化环孢多肽A的9.6%v/v乙醇水溶液的小试管。

竞争剂溶液: 将4.2mg [Thr², Leu⁵, D-Hiv⁸, Leu¹⁰] - 环孢多肽A (按EP 296,123所述方法制备)溶于1 ml甲醇中,于4 °C贮藏。

吸取125 μl各个标定样品(包括空白)至未条件化的微量滴定板

的孔内。吸取125 μ l待测血样至其余的各个孔内。将100 μ l PBS/吐温20溶液和25 μ l环孢多肽示踪体加到各孔中。微量滴定板振摇5分钟，然后于室温保温15分钟。向各孔中加入3 μ l竞争剂溶液，微量滴定板振摇5分钟，并将这些经处理的标定样品和经处理的血样于4 $^{\circ}$ C保温过夜。

将一块抗体板用PBS/吐温20溶液洗涤3次，每次300 μ l，向各孔中加入100 μ l经处理的标定样品或经处理的血样。将此微量滴定板于4 $^{\circ}$ C保温3小时，然后用PBS/吐温20溶液洗涤3次，每次300 μ l。将100 μ l 1g 十二烷基硫酸钠的100ml水溶液加到各孔中，微量滴定板于室温振摇5分钟，然后于37 $^{\circ}$ C保温15分钟。再从各孔中吸100 μ l溶液用Packard 2000 CA液体闪烁分析仪分析。

用从标定样品获得的结果制作校准曲线。该曲线表示以结合的示踪体抗体与空白比较的百分数对环孢多肽A浓度的对数作图。

在0.7ng 环孢多肽A/ml血液~400ng 环孢多肽A/ml血液的测定范围内结果的偏差系数小于30%。该工作范围表明，即使在很低浓度下仍可获得非常好的准确度。

通过重复试验证实所述测定方法具有一致性。100ng和400ng环孢多肽A分别重新置于1ml人血中以得到100ng/ml和400ng/ml的浓度。每个样品用实施例1所述方法分析4次，以测定其浓度。结果列于表1中。

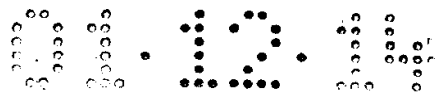


表 1：准确度

试验	对照 (ng/ml)	平均测定值 (ng/ml)	% 偏差
1	100	99.0	1
	400	450.0	12.5
2	100	102.0	2
	400	405.5	1.4
3	100	99.5	0.5
	400	429.5	7.4
4	100	90.0	10
	400	385.5	3.6

对于100ng/ml浓度，总的测定平均值为97.6ng/ml，平均偏差为2.4%，对于400ng/ml，总的测定平均值为417.6ng/ml，平均偏差为4.4%。

结果表明，可稳定地得到高准确度的结果。

实施例 2 - FK 506测定法

微量滴定板的制备：用含100 μ g/ml山羊抗兔抗体的磷酸盐缓冲液（PBS）包被各个孔。微量滴定板于4 $^{\circ}$ C保温过夜。山羊抗兔抗体被弃去，将200 μ l封闭溶液（2g牛血清白蛋白溶于100ml PBS中）加到各孔中。微量滴定板于37 $^{\circ}$ C保温2小时，然后在培养板洗涤器

上用 $3 \times 30 \mu\text{l}$ PBS/吐温 20 溶液 (0.5g 吐温 20 于 1 L PBS 中) 洗涤。微量滴定板于 4°C 贮藏。

将用 PBS/吐温 20 溶液稀释 1000 倍的兔抗 - FK 506 抗体 $100 \mu\text{l}$ 加到各孔中。微量滴定板于 4°C 保温过夜。

标定样品：FK 506 或用人全血稀释，或用 PBS/吐温 20 稀释成 $200\text{ng}/\text{ml}$ 、 $20\text{ng}/\text{ml}$ 和 $2\text{ng}/\text{ml}$ 。制备不含 FK 506 的血样作为空白。

竞争剂溶液：将用氘标记的 FK 506 稀释，以获得 $10000\text{cpm}/25\text{ml}$ 。

测定：加入 $125 \mu\text{l}$ 全血或缓冲液的标定样品，并与含 50、10、1 和 $0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 纳巴霉素 的 $100 \mu\text{l}$ PBS/吐温 20 混合。将 $25 \mu\text{l}$ 竞争剂溶液加到各孔中。微量滴定板于 4°C 保温 3 小时，然后用 $300 \mu\text{l}$ PBS/吐温 20 洗涤 3 次。将 $100 \mu\text{l}$ 1g 十二烷基硫酸钠的 100ml 水溶液加到各孔中，微量滴定板振摇 5 分钟，然后于 37°C 振摇 15 分钟。从各孔中取 $100 \mu\text{l}$ 溶液用 Packard 2000 CA 液体闪烁分析仪分析。

结果：用在缓冲液中的样品进行测定，得到与用不同浓度纳巴霉素作为置换剂时类似的标准曲线。该结果表明，兔抗 - FK 506 抗体与纳巴霉素不发生交叉反应。

当不用纳巴霉素作为置换剂时，因为 FK 506 与含在全血中的结合蛋白结合，并且不能与抗体反应，因此用在全血中的样品进行测定得到十分低的信号。当加入纳巴霉素作为巨亲合因子的结合竞争剂时，得到的标准曲线与在缓冲液中获得的曲线类似。