

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5993382号
(P5993382)

(45) 発行日 平成28年9月14日 (2016.9.14)

(24) 登録日 平成28年8月26日 (2016.8.26)

(51) Int. Cl.		F I		
GO 1 N 33/48	(2006.01)	GO 1 N 33/48		Z
GO 1 N 30/88	(2006.01)	GO 1 N 30/88		I O I P
CO 7 K 1/14	(2006.01)	CO 7 K 1/14		

請求項の数 9 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2013-554909 (P2013-554909)	(73) 特許権者	398048914
(86) (22) 出願日	平成24年2月24日 (2012.2.24)		ジーイー・ヘルスケア・ユーケイ・リミテッド
(65) 公表番号	特表2014-508933 (P2014-508933A)		イギリス国 エイチ ビー 7 9 エヌ
(43) 公表日	平成26年4月10日 (2014.4.10)		エイ バッキンガムシャー リトル チ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/053170		ヨーフォント アメルシャム プレイス
(87) 国際公開番号	W02012/113911		(無番地)
(87) 国際公開日	平成24年8月30日 (2012.8.30)	(74) 代理人	100137545
審査請求日	平成27年2月23日 (2015.2.23)		弁理士 荒川 聡志
(31) 優先権主張番号	1103256.2	(74) 代理人	100105588
(32) 優先日	平成23年2月25日 (2011.2.25)		弁理士 小倉 博
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100129779
			弁理士 黒川 俊久

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 固体支持体、及びそこから生物学的材料を回収する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生物学的材料の貯蔵のための固体支持体であって、前記固体支持体が少なくとも1つの表面を有しており、前記表面が、前記表面からの生物学的材料の回収率を高める化学物質混合物で被覆されており、前記化学物質混合物が、ポリビニルピロリドン(PVP)とTween(登録商標)20、ポリビニルピロリドン(PVP)とアルブミン、Tween(登録商標)20とアルブミン、ポリ-2-エチル-2-オキサゾリン(PEOX)とTween(登録商標)20、ポリ-2-エチル-2-オキサゾリンPEOXとアルブミン、ポリエチレンイミン(PEI)とTween(登録商標)20、及びポリエチレンイミン(PEI)とアルブミンからなる群から選択される混合物である、固体支持体。

10

【請求項 2】

前記固体支持体が、紙、ガラス極細繊維及び膜からなる群から選択される、請求項1記載の固体支持体。

【請求項 3】

前記固体支持体が、セルロース紙、又はポリエステル、ポリエーテルスルホン(PES)、ポリアミド(ナイロン)、ポリプロピレン、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)、ポリカーボネート、ニトロセルロース、酢酸セルロース及び酸化アルミニウムからなる群から選択される膜である、請求項1記載の固体支持体。

【請求項 4】

固体支持体から生物学的材料を回収する方法であって、

20

i) 請求項 1 乃至請求項 3 のいずれか 1 項記載の固体支持体の表面を、生物学的材料を含む試料と接触させる工程と、
 ii) 前記固体支持体の表面上の試料を乾燥させる工程と、
 iii) 前記固体支持体を貯蔵する工程と、
 iv) 生物学的材料を表面から抽出する工程とを含む方法。

【請求項 5】

工程 iii) が、15 ~ 40 の範囲の温度で紙支持体を貯蔵することを含む、請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

前記試料が組織、細胞、血液、血漿、唾液及び尿からなる群から選択される、及び / 又は前記生物学的材料が生体分子、合成的に誘導された生体分子、細胞成分及びバイオ医薬品からなる群から選択される、請求項 4 又は請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

前記支持体の少なくとも 1 つの表面を、前記表面からの生物学的材料の回収率を高める化学物質混合物の溶液で被覆することを含む、請求項 1 乃至請求項 3 のいずれか 1 項記載の固体支持体を製造する方法であって、前記化学物質混合物が、ポリビニルピロリドン (PVP) と Tween (登録商標) 20、ポリビニルピロリドン (PVP) とアルブミン、Tween (登録商標) 20 とアルブミン、ポリ - 2 - エチル - 2 - オキサゾリン (PEOX) と Tween (登録商標) 20、ポリ - 2 - エチル - 2 - オキサゾリン PEOX とアルブミン、ポリエチレンイミン (PEI) と Tween (登録商標) 20、及びポリエチレンイミン (PEI) とアルブミン からなる群から選択される、方法。

【請求項 8】

前記固体支持体が紙である、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

請求項 1 乃至請求項 3 のいずれか 1 項記載の固体支持体の、その表面からの生物学的材料の回収率を高めるための使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、固体支持体に関し、特に、バイオ医薬品のような生物学的材料の貯蔵、回収、さらなる加工処理に使用することができる固体支持体に関する。

【背景技術】

【0002】

ヒトの血液の収集及び分析のためのろ紙のような固体支持体の使用は、Dr. Robert Guthrie がフェニルケトン尿症の検出のために新生児のフェニルアラニンを測定するのに乾燥血液スポット (DBS) 試料を用いた 1960 年代初期に遡る (Mei, J. ら, 2001; Journal of Nutrition, 131: 1631S - 1636S)。この血液を収集するための新たな応用の結果、治療可能な遺伝性代謝異常の検出のための新生児の集団検診が導入された。今や DBS は 40 年以上にわたって広範な新生児代謝異常をスクリーニングするために使用されている。

【0003】

DBS 試料は、静脈血から、または直接指若しくは踵の穿刺により、膜、ガラス繊維または紙のような固体支持体に全血をスポット状に染み付けることによって収集され、そのためこの方法は末端の診療所から中央検査室への試料の輸送に特に適している。また、乾燥剤と共にファスナー式プラスチックバッグに包装された DBS は周囲温度で貯蔵・輸送することができ、従って i) コールドチェーン貯蔵及び ii) 急速な特殊輸送の必要性が回避される。Whatman 903 Neonatal STD 紙のような吸収材料に一

10

20

30

40

50

滴の血液を付けることにより収集されたDBSはIATA Dangerous Goods Regulations (Addendum II, Mar 2005)の対象とならない。

【0004】

新生児のスクリーニング目的でDBSその他の体液を収集、輸送及び貯蔵するために使用される別の固体の紙支持体としては次のものがある。

1. Ahlstrom 226

2. Munktell TFN (CE 標識)

3. Toyo Roshigレード545 Advantec Toyo, Tokyo (Elvers Lら 2007; J. Inherit Medtab Dis 30, 4, 609 参照)。

10

【0005】

これらのWhatman 903 Neonatal STD紙のような紙の全てが木綿リターからなっている。Whatman 903 Neonatal STD及びAhlstrom 226紙はクラスIIの医療デバイスに分類されている。新生児のスクリーニング目的のためのデバイスに開発される可能性がある固体の紙支持体には、Macherey Nagel (例えばMN818)、Reeve Angel (例えばDoubleリング)及びHahnemuhle (Grade 2292)により製造されているものがある。

【0006】

20

DBSにかかるコストは一回の試験当たりUS1ドル未満であり、輸送コストは液体方式及び特殊な輸送条件を必要とする血漿と比較して顕著に低減する (Johannessen, A.ら, 2009; J Antimicrobial Chemotherapy, 64, 1126 - 1129)。実際のアッセイコストは変わらないし、DBSからの検体の抽出には集中実験室において余分な実践時間が幾らか必要であるが、DBS及び特に固体の紙支持体の利用は核酸、タンパク質等のような生物学的材料の貯蔵及び/又は分析において増大し続けている。加えて、DBSはまた、候補とされる低分子量の薬剤化合物が試験動物に導入されその血液中の濃度レベルをモニターする創薬プロセスにも利用されている。

【0007】

30

近年、バイオテクノロジーで誘導された組換えタンパク質、ペプチド及び抗体系医薬、並びに遺伝子療法のためのアンチセンスオリゴヌクレオチド及びDNAが主流の治療薬として開発され、今では臨床開発中の化合物のかなりの部分を構成している。これらの薬剤は一般に低分子量医薬化合物と区別するために「バイオテク医薬」又は「バイオ医薬品」といわれている。

【0008】

バイオテク医薬及び低分子量医薬化合物の薬物代謝及び薬物動態 (DMPK) 分析は重要である。すなわち、DMPK分析は、候補薬剤がどのように身体に吸収され、代謝され、分泌されるかに対して見通しを提供するので新薬発見にとって極めて重要であるからである。分析は新薬発見段階において日常的に行われ、対象の化合物を動物に投与し、生物学的流体中のその薬剤 (又は代謝物質) の濃度を時間の関数として測定する。これにより薬物クリアランス、バイオアベイラビリティ等のような価値のある情報が得られるが、多くの量の時間と資力が必要とされる (Beaudette, P.ら, 2004; J. of Chromatography B 809, 153 - 158)。

40

【0009】

通例薬剤スクリーニングプログラムで実施されるDMPK分析に伴う主要な問題は、分析に先立って血液試料における安定性及び安全性を維持するのに適した貯蔵媒体が明らかでないことである。現行の方法では、投薬した動物から決まった時間に採取した血漿又は全血が使用される。しかしながら、この方法は、分析プロセスの障害となる時間がかかる手順を必要とすることを含めて幾つかの欠点がある。加えて、経時変化実験のために個々

50

の動物から多数回血を抜くことは限定的である。これにより、スループットが限定され、動物の使用が増大し、その結果少しのリード化合物しか推進することができない。

【0010】

DBSに必要なとされる血液量が小さいため、幾つかの動物からの複雑な採血ではなく一匹の動物から連続して血液試料を採取することが可能になり、このためDMPK並びに薬物動態学的データ及び評価の質が大幅に改良される。DBSに必要なとされる低下した血液量（通例スポット当たり15～20µl）の「3R」（低減、洗練、及び交換）に関する倫理上の利益は前臨床的医薬開発において明白である。試験動物の数は大幅に低減することができる。加えて、小児科用の医薬の安全性評価の一部として当局により要求されることが増大している若年性毒性研究において非末端血液試料採取が可能である。規制の動物毒物学研究の別の利点はデータの質の上昇である。

10

【0011】

従って、薬物動態研究において大量の血液試料の迅速な分析の必要性が増大しているので、DBSは魅力的な選択肢となっている。紙がDBSのための固体支持体として機能するためには、紙は、満足な機械的性質と、対象の生物学的材料を貯蔵後にさらなる加工処理及び/又は分析に付すことができるように安定な状態に保持することができる能力とを併せ持つのが望ましい。DMPK分析に使われるかかる紙の例は、903 Neonatal試料収集紙といわれるもの、並びに例えば米国特許第575126号及び同第5939259号に記載されているFTA及びFTA Eluteといわれる紙である。

【0012】

DMPK分析に使われる別の固体紙支持体として以下のものがある。

20

【0013】

1. Ahlstromグレード226紙：

臨床研究での薬物動態の測定における乾燥血漿スポットの使用：定量的生物分析方法の検証。Barfield, M.ら, (2011), Anal., Chem., 83, 118-124。

【0014】

2. 標準化されたる紙：

妊娠中のラモトリジン及びオキシカルバゼピンの組合せの薬剤モニタリング。Wegner, I.ら, (2010), Epilepsia, 51, 2500-2502。

30

【0015】

3. Whatman 903、FTA (DMPK-A) 及びFTA Elute (DMPK-B)：

様々なセルロース系基材上の乾燥血液スポット試料の重量及び外観に対する影響。Denniff, P.ら, (2010), Bioanalysis, 2, 11, 1817-22。

【0016】

4. Whatman DMPK-A、-B、-C：

ペプチドエキセンジン-4の定量的評価に対するDBSの応用；UHPLC-MS/MSによる血漿及びDBS法の比較。Kehler, R.ら, (2010), 2, 8, 1461-1468。

40

【0017】

5. Ahlstromグレード237紙：

液体抽出に基づくシーリング表面試料採取用プローブのDBS及びマウス全身の薄い組織切片の質量分光分析のための応用。Van Berkel, G.ら, (2009), Anal., Chem., 2009, 81, 21, 9146-9152。

【0018】

6. Whatman FTA血液スポットカード：

臨床研究における薬物動態の測定のための試料収集技術としての乾燥血液スポット：定量的生物分析方法の検証のための検討。Spooner, N.ら, (2009), Anal

50

Chem. 81, 1557-63。

【0019】

7. Whatman FTA Elute Microカード：
LC-MS/MSによるヒト全血中のデキストロメトルファン及びその代謝物質デキストロファンの測定のための乾燥血液スポット技術の研究。Liang, X.ら, (2009), J. Chrom B, Anal. Tech Biomed & Life Sci, 877, 799-806。

【0020】

8. Whatmanる紙カード：
乾燥血液スポットにおける25-ヒドロキシビタミンD2及び25-ヒドロキシビタミンD3の測定のための液体クロマトグラフィー/タンデム質量分光分析方法：糖尿病及び心血管代謝のリスクのスクリーニングに対する潜在的補助剤。Newman, M.ら, (2009), J. Diabetes Sci and Tech. 3, 156-162。

10

【0021】

9. Toyo Roshi No. 545る紙 (Advantec Toyo, Tokyo)：
LC-MS/MSを用いた低出産体重児のDBS中の17β-ヒドロキシプレグネノロン及び17β-ヒドロキシフロゲステロンの同時測定。Higashi, T.ら, (2008), J. Pharm and Biomedical Analysis, 48, 1, 177-182。

20

【0022】

10. Whatman試料収集紙BFC 180：
乾燥血液スポットを用いた血液中のモルヒネ及び6-アセチルモルヒネの測定。Garcia-Boy, R.ら, (2008), Therapeutic Drug Monitoring, 30, 6, 733-739。

【0023】

11. Whatmanる紙 (カタログno. 10535097)：
タンデム型質量分光分析と結合したカチオン交換クロマトグラフィーを用いたいろいろなヒトの生物学的マトリックス中のカチオン性抗-マラリヤ剤メチレンブルーの定量化。Burhenne, J.ら, (2008), J. Chrom B, Anal. Tech Biomed & Life Sci, 863, 273-282。

30

【0024】

12. Whatman 3MM：
ステロイド薬理学における試料収集及び輸送のためのろ紙の使用。Howe, C.ら, (1997), Clin Chem. 43, 1408-15。

【0025】

13. Whatman FTA、FTA Elute、DMPK-A、B、C、Ahlstrom 226 - SCAPTM DBSシステム及びカラム-スイッチングLC-MS/MSを用いた乾燥血液スポットにおけるTami flu (登録商標) 及び活性な代謝物質の測定。Heinig, K.ら, F. Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland。(参照)。

40

【0026】

DMPKの目的用のデバイスに開発される可能性がある固体の紙支持体には、Munktell TFNグレード、Toyo Roshiグレード545、Macherey Nagel (例えばMN818)、Reeve Angel (例えばDoubleリング) 及びHahnemuhle Grade 2292)がある。

【0027】

効果的な下流の処理及び分析のために、対象の検体 (例えば内因性タンパク質又はバイオテク薬剤) は、高スループット処理可能な比較的簡単な技術を用いて固体の紙支持体が

50

ら抽出するのが容易でなければならない。

【0028】

DBSと内因性タンパク質の検出との組合せが科学文献に記載されている。例えば、・胞性線維症(CF)のバイオマーカーである免疫反応性トリプシン(IT)に関して、DBSからの内因性ITのCFスクリーニングのための使用について最初の報告がRyleyらにより1981年に公表された(J. Clin. Pathol. 34, 906-910)。それ以来、ITは、新生児のDBSを用いたCFの指示薬として広く使用されている。幾つかの商業組織がこの用途向けのFDAにより承認されたイムノアッセイキットを供給している。多くが単に「ペーパーイン」アプローチを利用しており、DBSを含有する紙パンチを直接イムノアッセイにかけ、対象の検体をその場で抽出する。最近(Lindau-Shepard & Pass, 2010, Clinical Chem. 56, 445-450)、ITが2つの異なるアイソフォームで存在することが立証された。これらの著者は、ITのこれら2つの異なるアイソフォームを用いたCFの診断のための懸濁液(又はペーパーイン)アレイに基づくイムノアッセイの開発を報告した。これらのタンパク質に基づく研究は全てコートされてないGuthrieカード(Whatman 903紙)で行われた。

10

【0029】

ヒト免疫不全(HIV)スクリーニングの開始以来、妊娠中の母親の血液中の内因性の抗-HIV抗体の血清学的検出のために120万を超えるDBS試験が行われている。

【0030】

これらの研究により、i)対象の血液及び関連するタンパク質の長期貯蔵に関する懸念は根拠がないこと、及び、ii)DBS内のヘムの存在はアッセイ性能に干渉しない、ということが確かめられた。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0031】

【特許文献1】米国特許第6086748号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0032】

従って、i)内因性部分及びii)生物製剤又はバイオテク薬剤を含む生物学的材料のための簡単で安定な貯蔵媒体を提供し、さらなる処理の際にその生物学的材料の高い収率又は回収率を与える固体支持体を製造することが望ましい。本発明は、これらのニーズに関連し、固体支持体、特に固体の紙支持体上にDBSとして貯蔵された生物学的な試料からのバイオ医薬品のような生物学的材料の回収レベルを高める方法を提供する。

30

【課題を解決するための手段】

【0033】

定義

本明細書で使用する用語「生物学的材料」は、以下に定義するような「生体分子」、「合成により誘導された生体分子」、「バイオ医薬品」又は「細胞成分」を意味する。

40

i) 生体分子は、タンパク質、多糖、及び核酸のような大きいポリマー性分子、並びに一次代謝産物、二次代謝産物、及び天然物のような小さい低分子量分子を含めて、生存生物により生産されるあらゆる有機分子である。

ii) 合成により誘導された生体分子は、組換えDNA技術を用いて生成されるか、又は他の非生存インビトロ方法により化学的に合成された上記i)に定義した「生体分子」である。

iii) バイオ医薬品(又は「バイオテク医薬」)は、バイオテクノロジーで誘導された組換えタンパク質、ペプチド若しくは抗体系医薬、又は遺伝子療法用のアンチセンスオリゴヌクレオチド、タンパク質核酸(PNA)若しくはデオキシリボ核酸(DNA)である。

iv) 細胞成分は、独特な高度に組織化された物質又は細胞、従って生存生物を構成する物

50

質である。例としては、膜、オルガネラ、タンパク質、及び核酸がある。大部分の細胞成分は細胞自身内に位置するが、中には生物の細胞外領域に存在するものもある。

【0034】

本発明の概要

本発明の第1の態様では、少なくとも1つの表面からの生物学的材料の回収率を高める化学物質混合物で被覆された前記表面を有する固体支持体が提供され、化学物質混合物は、ビニルポリマーと非イオン性洗剤、ビニルポリマーとタンパク質、非イオン性合成ポリマーと非イオン性洗剤、非イオン性合成ポリマーとタンパク質、ポリエーテルイミン(PEI)と非イオン性洗剤、非イオン性洗剤とタンパク質、及びポリエーテルイミン(PEI)とタンパク質からなる群から選択される混合物である。

10

【0035】

ある態様では、固体支持体は紙、ガラス極細繊維及び膜からなる群から選択される。

【0036】

好ましくは支持体は紙、より好ましくはセルロース紙である。

【0037】

別の態様では、固体支持体は、ポリエステル、ポリエーテルスルホン(PES)、ポリアミド(ナイロン)、ポリプロピレン、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)、ポリカーボネート、ニトロセルロース、酢酸セルロース及び酸化アルミニウムからなる群から選択される膜である。

【0038】

さらに別の態様では、ビニルポリマーはポリビニルピロリドン(PVP)である。

20

【0039】

別の態様では、非イオン性洗剤はTween 20である。

【0040】

別の態様では、タンパク質はアルブミンである。

【0041】

ある態様では、非イオン性合成ポリマーはポリ-2-エチル-2-オキサゾリン(PEOX)である。

【0042】

別の態様では、化学物質混合物はポリビニルピロリドン(PVP)とTween 20である。

30

【0043】

別の態様では、化学物質混合物はポリビニルピロリドン(PVP)とアルブミンである。

【0044】

ある態様では、化学物質混合物はTween 20とアルブミンである。別の態様では、化学物質混合物はポリ-2-エチル-2-オキサゾリン(PEOX)とTween 20である。

【0045】

別の態様では、化学物質混合物はポリ-2-エチル-2-オキサゾリンPEOXとアルブミンである。

40

【0046】

ある態様では、化学物質混合物はポリエーテルイミン(PEI)とTween 20である。

【0047】

別の態様では、化学物質混合物はポリエーテルイミン(PEI)とアルブミンである。

【0048】

別の態様では、支持体は紙、例えばセルロース紙である。セルロース紙の例としては903 Neonatal STDカードがある。

【0049】

50

本発明の第2の態様では、

- i) 上記のような固体支持体の表面を、生物学的材料を含有する試料と接触させ、
 - ii) 前記固体支持体の表面上の試料を乾燥させ、
 - iii) 固体支持体を貯蔵し、
 - iv) 前記表面から生物学的材料を抽出する
- 工程を含む、固体支持体から生物学的材料を回収する方法が提供される。

【0050】

ある態様では、工程iii)は、紙支持体を15~40の範囲の温度で貯蔵することを含む。好ましくは、温度は20~30の範囲である。別の態様では、紙支持体は生物学的材料の熱的安定性に応じてより低い温度で貯蔵される。

10

【0051】

試料の性質は生物学的材料の起源に依存する。例えば、起源は、限定されることはないがウイルス、細菌、植物及び動物を始めとするある範囲の生物学的生物に由来し得る。好ましくは、起源は哺乳類又はヒト被験者である。哺乳類及びヒトの起源の場合、試料は組織、細胞、血液、血漿、唾液及び尿からなる群から選択され得る。

【0052】

別の態様では、生物学的材料は生体分子、合成的に誘導された生体分子、細胞成分及びバイオ医薬品からなる群から選択される。

【0053】

本発明の第3の態様では、上記のような固体支持体を作成する方法が提供され、この方法は、支持体の少なくとも1つの表面を、この表面からの生物学的材料の回収率を高める化学物質混合物の溶液で被覆することを含んでおり、化学物質混合物は、ポリビニルピロリドン(PVP)とTween 20、ポリビニルピロリドン(PVP)とアルブミン、Tween 20とアルブミン、ポリ-2-エチル-2-オキサゾリン(PEOX)とTween 20、ポリ-2-エチル-2-オキサゾリンPEOXとアルブミン、ポリエーテルイミン(PEI)とTween 20、及びポリエーテルイミン(PEI)とアルブミンからなる群から選択される混合物である。

20

【0054】

ある態様では、固体支持体は紙、好ましくは903 Neonatal STD紙のようなセルロース紙である。

30

【0055】

本発明の第3の態様では、上記のような固体支持体の、その表面からの生物学的材料の回収率を高めるための使用が提供される。

【0056】

ある態様では、生物学的材料はバイオ医薬品である。

【図面の簡単な説明】

【0057】

【図1】図1は、様々な紙マトリックスに適用した乾燥血液スポットからの外因的に加えたIL-2の回収率を表す。

【図2】図2は、様々な化学物質で被覆された903 Neonatal STD紙に適用した乾燥血液スポットからの外因的に加えたIL-2の回収率を表す。

40

【図3】図3は、いろいろな化学物質の組合せ対で被覆された903 Neonatal STD紙に適用した乾燥血液スポットからの外因的に加えたIL-2の回収率を表す。

【発明を実施するための形態】

【0058】

組換えIL-2キャリア(R & D Systems。それぞれ、Cat. 202-IL-CF-10µg;ロットAE4309112及びCat. 202-IL-10µg;ロットAE4309081)を、カルシウム及びマグネシウムを含まないDulbecco's PBS(PAA。Cat. H15-002、ロットH00208-0673)、EDTA-抗凝固剤処理したヒト、ウサギ又はウマの血液(TCS Bioscie

50

nces)に50pg又は100pg/μlで溶解した。

【0059】

部分試料(0、50又は100pgのIL-2を含有する1μl)を次のGE Health careの紙に塗布適用した。903 Neonatal STDカード、Cat. 10538069、ロット6833909 W082; DMPK-Aカード、Cat. WB129241、ロットFT6847509; DMPK-Bカード、Cat. WB129242、ロットFE6847609及びDMPK-Cカード、Cat. WB129243、ロットFE6847009。試料を周囲温度及び湿度で一晩乾燥させた。

【0060】

適当な大きさのHarris Uni-coreパンチ(Sigma、Cat. Z708860-25ea、ロット3110)を用いて各々の紙タイプからパンチ(直径3mm)を抜き出した。ヒトIL-2 Quantikine ELISA(R & D Systems、Cat. D0250、ロット273275)から得られたIL-2マイクロプレートの個々のウェルに単一のパンチを入れた。これらのプレートはIL-2に対するマウスモノクローナル抗体が被覆されている。Quantikineキットと共に供給されたアッセイ緩衝液(100μl)を用いてIL-2タンパク質を紙パンチから溶出した。その後の工程は全て、「ペーパーイン」方法を用いて、Quantikineキットと共に供給された指示書に従って行った(紙パンチを直接アッセイ緩衝液に入れ、直接その場で検体を溶出する)。アッセイの完了時Thermo Electron Corporation, Multiskan Ascentを用いてマイクロプレートの光学密度を450nmでモニターした。IL-2の回収率は既知のIL-2濃度の標準曲線に対して値を比較することで決定した。個々の実験毎に新たなIL-2標準曲線を作成した。

【0061】

追加の実験では、903 Neonatal STDカードを幾つかの化学物質溶液(以下に記載する)中に飽和浸漬した後にこれらのカードにIL-2を添加した血液を加えた。幾つかの例では、紙を、これらの化学物質の幾つかを含有する混合溶液中にも飽和浸漬して、化学物質が乾燥血液スポットからのIL-2の回収に対して相加又は相乗効果を示すか否かを決定した。

【0062】

使用した化学物質

化学物質及びその出所のリストは次の通り。

ポリビニルアルコール(Sigma; Cat. P8136、ロット039k0147)

ポリエチレンイミン、水中50%(Fluka; Cat. P3143、ロット29k1492)

ポリビニルピロリドン、水中1%(Sigma; Cat. PVP40-100mg、ロット11pk0097)

イヌリン、水中1%(Sigma; Cat. I2255-100g、ロット079F7110)

ポリ-2-エチル-2-オキサゾリン、水中1%(Aldrich Cat. 372846、ロット30498PJ)

Tween 20、水中1%(Sigma, Cat. P7949-100ml、ロット109k01021)

- -トレハロース、10mg/ml(Sigma, Cat. T0299-50mg、ロット128k1337)

アルブミン、水中1%(Sigma、Cat A2153-10g、ロット049k1586)

ウシ乳カゼイン、水中1%(Sigma、Cat. C5890-500g、ロット089k0179)

ポリエチレングリコール1000、水中1%(Biochemika、Cat. 81189、ロット1198969)

10

20

30

40

50

ポリエチレングリコール200、水中1% (Fluka, Cat. 81150、ロット1384550)。

【0063】

実験結果

IL-2をEDTA-抗凝固剤処理した血液に溶解したとき、903及びDMPK-Cカードは45~55%のサイトカイン回収率を促進したが、DMPK-A及びBカードからは2~3%しか回収されなかった(表1及び図1参照)。903及びDMPK-Cカードは基本的な原紙であり、化学物質を浸漬も被覆もしていないが、DMPK-A及びBカードはそれぞれタンパク質、微生物及び細胞の変性及び不活性化を促進する化学物質の独特の混合物で被覆されている。DMPK-A及びBカードは核酸の貯蔵を促進するように設計されている。従って、DMPK-A及びBカードを用いて観察された低いIL-2の回収率レベルは、実際、これらの変性試薬の存在及び使用したELISAに基づく抗体検出系を反映している可能性がある。ELISA検出系では溶出されるIL-2が生来の完全な構造を示すことが必要である。

10

【0064】

【表1】

紙タイプ	IL-2 回収率 (%)	p 値
903; マイナスキャリア	46.9 ± 13.3	> 0.05
903; プラスキャリア	50.7 ± 5.8	
DMPK A; マイナスキャリア	2.0 ± 0.0	> 0.05
DMPK A; プラスキャリア	2.0 ± 0.0	
DMPK B; マイナスキャリア	2.0 ± 0.0	> 0.05
DMPK B; プラスキャリア	2.0 ± 0.0	
DMPK C; マイナスキャリア	53.9 ± 4.8	> 0.05
DMPK C; プラスキャリア	45.2 ± 5.4	

20

表1 - 様々な紙タイプに適用した乾燥血液スポットからの外因的に加えたIL-2の回収率。p値は各紙タイプに対する±キャリアを比較する。キャリアの存在はIL-2の回収率に有意な影響を示さなかった(p値 > 0.05)。

30

【0065】

サイトカインをリン酸緩衝食塩水(PBS)に溶解したときには使用した紙タイプに関わらずIL-2の回収は観察されなかった(データは示さない)。加えたIL-2が存在しないときに観察されたIL-2回収レベルは本質的にバックグラウンドレベルと同等であったが、これはEDTA-抗凝固剤処理した血液が含有する内因性のIL-2は無視できる量であることを示している(データは示さない)。

【0066】

幾つかの化学物質を用いて、903 Neonatal STDカードを飽和浸漬した。そのうちの幾つかは浸漬していない紙と比較して高まったIL-2レベルの回収を促進するように見えた(p値 < 0.05)。903 Neonatal STDカードで(表2及び図2)、ポリピニルアルコール、ポリピニルピロリドン、ポリ-2-エチル-2-オキサゾリン、Tween 20、- -トレハロース、アルブミン及びカゼインのような化学物質は対応する浸漬していない紙で観察された~45%と比較して>55%の増大した平均IL-2回収率を促進した。

40

【0067】

【表 2】

化学物質	IL-2 回収率 (%)	p 値
浸漬せず	44.9 ± 6.5	n/a
ポリビニルアルコール (PVA)	62.6 ± 11.2	< 0.05
ポリエチレンイミン (PEI)	41.8 ± 6.0	> 0.05
ポリビニルピロリドン (PVP)	62.0 ± 10.9	< 0.05
イヌリン	50.4 ± 7.6	> 0.05
ポリ-2-エチル-2-オキサゾリン (PeOX)	66.1 ± 12.6	< 0.05
Tween 20	67.1 ± 9.0	< 0.05
α-β-トレハロース	54.8 ± 8.6	< 0.05
アルブミン	73.8 ± 13.6	< 0.05
カゼイン	55.0 ± 7.8	< 0.05
ポリエチレングリコール 1000 (PEG 1000)	42.5 ± 9.1	> 0.05
ポリエチレングリコール 200 (PEG 200)	43.3 ± 11.0	> 0.05

10

表 2 - 様々な化学物質を被覆した 903 Neonatal STD 紙に適用した乾燥血液スポットからの外因的に加えた IL-2 の回収率。この表は 2 つの独立した実験 (n = 6) から誘導される。p 値は浸漬した紙から誘導された値を浸漬していない 903 紙から誘導された値と比較する。

20

【0068】

2 つの異なる化学物質の組合せによる 903 Neonatal STD 紙の飽和浸漬は IL-2 回収レベルの点で相加効果を示した。例えば、表 2 は、Tween 20 及びアルブミンで被覆した 903 Neonatal STD 紙の回収率がそれぞれ 67% 及び 74% であることを示している。これらの値は等価な浸漬していない 903 紙よりそれぞれ 22% 及び 29% 大きい。表 3 は、外因的に加えた IL-2 を含有する乾燥血液スポットを両方の化学物質に浸漬した 903 Neonatal STD 紙に適用したときのサイトカイン回収率を示す。Tween 20 / アルブミンを被覆した紙の回収率の値は 92% であり、これは対応する浸漬していない紙と比較して ~ 40% の増大を表している。

30

【0069】

903 紙を以下の化学物質の組合せ、すなわちポリビニルピロリドン (PVP) と Tween 20、ポリビニルピロリドン (PVP) とアルブミン、Tween 20 とアルブミン、ポリ-2-エチル-2-オキサゾリン (PeOX) と Tween 20、ポリ-2-エチル-2-オキサゾリン (PeOX) とアルブミン、ポリエチレンイミン (PEI) と Tween 20、及びポリエチレンイミン (PEI) とアルブミンに浸漬したとき大きく増大した IL-2 の回収率 (p 値 < 0.05) が観察された。

【0070】

【表 3】

化学物質	IL-2 回収率 (%)	p 値
浸漬せず	50.7 ± 4.9	n/a
ポリビニルピロリドン(PVP)とポリ-2-エチル-2-オキサゾリン(PeOX)	48.1 ± 13.4	> 0.05
ポリビニルピロリドン(PVP)と Tween 20	79.4 ± 18.8	< 0.05
ポリビニルピロリドン(PVP)とアルブミン	70.5 ± 13.2	< 0.05
Tween 20 とアルブミン	92.0 ± 11.0	< 0.05
ポリ-2-エチル-2-オキサゾリン(PeOX)と Tween 20	80.9 ± 21.1	< 0.05
ポリ-2-エチル-2-オキサゾリン(PeOX)とアルブミン	89.3 ± 18.9	< 0.05
ポリ-2-エチル-2-オキサゾリン(PeOX)とポリエチレンイミン(PEI)	61.8 ± 15.8	> 0.05
ポリエチレンイミン(PEI)と Tween 20	66.8 ± 6.2	< 0.05
ポリエチレンイミン(PEI)とアルブミン	75.8 ± 13.1	< 0.05
ポリビニルピロリドン(PVP)とポリエチレンイミン(PEI)	56.4 ± 11.0	> 0.05

10

表 3 - 化学物質の対の組合せで被覆された 903 Neonatal STD 紙に適用した乾燥血液スポットからの外因的に加えた IL-2 の回収率 (n = 4)。

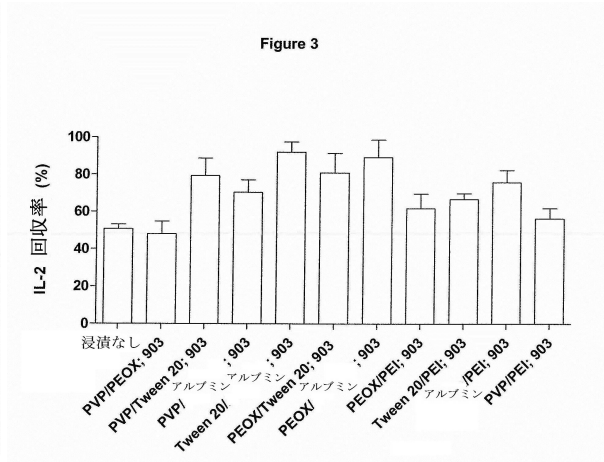
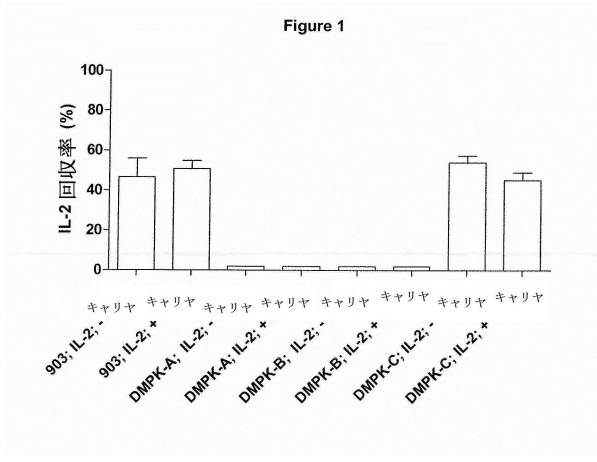
【 0 0 7 1 】

20

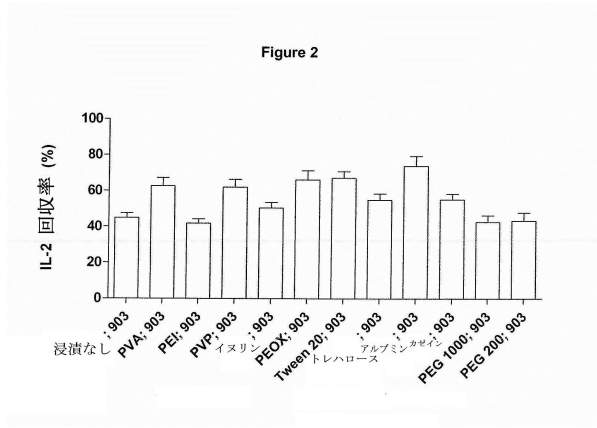
本発明の好ましい具体的な実施形態について説明して来たが、当業者には理解されるように、本発明は、例示の目的のみで示した限定するものではない記載した実施形態以外にも実施することができる。本発明は後続の特許請求の範囲によってのみ制限される。

【 図 1 】

【 図 3 】



【 図 2 】



フロントページの続き

- (72)発明者 ホートン, ジェフリー・ケネス
カーディフ・サウス・グラモーガン・シーエフ14 7ワイティ、ホイトチャーチ、フォーレスト・ファーム・イーステート、ザ・メイナード・センター、ジーイー・ヘルスケア・ユークエイ・リミテッド
- (72)発明者 タットネル, ピーター・ジェイムズ
カーディフ・サウス・グラモーガン・シーエフ14 7ワイティ、ホイトチャーチ、フォーレスト・ファーム・イーステート、ザ・メイナード・センター、ジーイー・ヘルスケア・ユークエイ・リミテッド
- (72)発明者 スタッブス, サイモン・ローレンス・ジョン
カーディフ・サウス・グラモーガン・シーエフ14 7ワイティ、ホイトチャーチ、フォーレスト・ファーム・イーステート、ザ・メイナード・センター、ジーイー・ヘルスケア・ユークエイ・リミテッド

審査官 赤坂 祐樹

- (56)参考文献 米国特許第06086748(US, A)
特開平01-291164(JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- | | |
|---------|-----------|
| G 0 1 N | 3 3 / 4 8 |
| C 0 7 K | 1 / 1 4 |
| G 0 1 N | 3 0 / 8 8 |