

(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2004-500581  
(P2004-500581A)

(43) 公表日 平成16年1月8日(2004.1.8)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/66	GO 1 N 33/66	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/26	C 1 2 Q 1/26	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/28	C 1 2 Q 1/28	
C 1 2 Q 1/527	C 1 2 Q 1/527	
GO 1 N 33/50	GO 1 N 33/50	D
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 53 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2001-574480 (P2001-574480)	(71) 出願人	502354672 アーボガスト ファーマシューティカルズ 、インコーポレイティド アメリカ合衆国、テネシー 37601、 ジョンソン シティ、ウッドランド アベ ニュー 1316
(86) (22) 出願日	平成13年3月13日 (2001.3.13)	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬
(85) 翻訳文提出日	平成14年9月30日 (2002.9.30)	(74) 代理人	100092624 弁理士 鶴田 準一
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/007967	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(87) 国際公開番号	W02001/077675	(74) 代理人	100082898 弁理士 西山 雅也
(87) 国際公開日	平成13年10月18日 (2001.10.18)		
(31) 優先権主張番号	09/540, 809		
(32) 優先日	平成12年3月31日 (2000.3.31)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(81) 指定国	EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) , EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR) , AT, CA, CN, JP, MX		

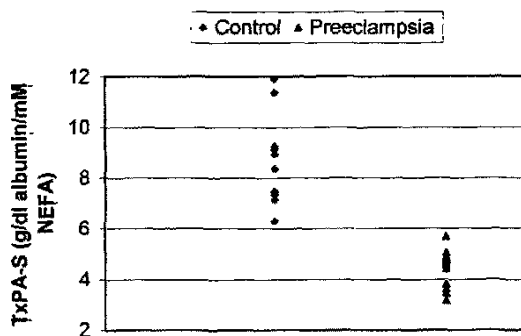
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 子かん前症及び他の疾患の予測方法

(57) 【要約】

開示した発明は、内皮細胞の破壊を防ぎ、そして多くの疾患、例えばアテローム性動脈硬化症、子かん前症、浮腫、ネフローゼ症候群及び脳卒中 (stroke) の発症を未然に防ぐ血漿の細胞保護活性の測定方法である。本発明は、患者の血清中のVLDLに結合していないpI 5.6アルブミン(「遊離pI 5.6アルブミン」)の濃度を示す値を測定することによりその血漿中のpI 5.6アルブミン濃度の減少に関連を持つ疾患にかかる患者の傾向の診断方法を含む。上記方法の好ましい態様を、上記遊離pI 5.6アルブミン濃度の直接計測に代えて遊離pI 5.6アルブミンの指標を得るためのインビトロにおける方法に利用する。

TxPA-S in Severe Preeclampsia



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

血漿中の p I 5 . 6 アルブミン濃度の減少に関連を持つ疾患に

対する血漿の毒性阻止能力の測定方法であって、以下のステップ：

( a ) 遊離アルブミン、6 ~ 20 炭素長のアシル鎖を持つ遊離非エステル化脂肪酸、6 ~ 20 炭素長のアシル鎖を持つトリグリセリド、超低密度リポタンパク質、低密度リポタンパク質、及び高密度リポタンパク質を含む血漿サンプルを準備し；

( b ) 上記遊離アルブミン濃度を測定し；

( c ) 上記遊離非エステル化脂肪酸濃度を測定し；そして

( d ) 上記遊離アルブミン濃度と上記遊離非エステル化脂肪酸濃度の比較により上記血漿の毒性阻止能力を示す値を計算する、を含む前記方法。

10

**【請求項 2】**

前記計算ステップが前記遊離アルブミン濃度を前記遊離非エステル化脂肪酸濃度で割り、それにより指示値として T x P A - S を示すことを含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記遊離非エステル化脂肪酸濃度測定ステップを、前記血漿サンプルからの超低密度リポタンパク質の除去ステップの後に実施する、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記遊離アルブミン濃度測定ステップを、前記血漿サンプルからの超低密度リポタンパク質の前記除去ステップの後に実施する、請求項 3 に記載の方法。

20

**【請求項 5】**

前記超低密度リポタンパク質除去ステップが、前記血漿サンプルからの低密度リポタンパク質の除去をさらに含む、請求項 3 に記載の方法。

**【請求項 6】**

トリグリセリド及び H D L の濃度測定ステップをさらに含み、さらにここで前記計算ステップ ( d ) が前記値の計算の中にトリグリセリド及び H D L の濃度のファクタリングを含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記ステップ ( d ) で計算した値を前記疾患の存在又は発症について既知の診断を受けた患者から回収したそれぞれ多数の血漿サンプルを用いた、多数の血漿サンプルでの前記各ステップの実施により測定した基準と比較することを含む前記疾患に対する血漿の毒性阻止能力の評価であるステップ ( e ) をさらに含む、請求項 1 又は 6 に記載の方法。

30

**【請求項 8】**

前記基準が 1 つの値、値の 1 つの範囲又は値の複数の範囲である、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記複数の範囲が本質的に重複しない、請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記疾患が、子かん前症、アテローム性動脈硬化症、脳卒中、末梢血管疾患、糖尿病性血管疾患、ネフローゼ症候群、敗血症、ショック、癌、加齢、死亡又は罹患である、請求項 1 に記載の方法。

40

**【請求項 11】**

前記ステップ ( a ) を沈殿法により実施し、前記ステップ ( b ) を比色色素結合アッセイ、E L I S A 又は放射免疫アッセイを行うことにより実施し、前記ステップ ( c ) を滴定アッセイ、放射性同位体アッセイ又は酵素的比色分析を含む比色分析を行うことにより実施する、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記血漿サンプルがアスコルビン酸を含み、そして前記遊離非エステル化脂肪酸濃度測定

50

ステップを前記血漿サンプルからのアスコルビン酸除去ステップの後に実施する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

血漿中の p I 5 . 6 アルブミン濃度の減少と関連を持つ疾患に対する血漿の毒性阻止能力の測定方法であって、以下のステップ：

( a ) 遊離 p I 5 . 6 アルブミン濃度及び遊離 p I 4 . 8 アルブミン濃度を含む総遊離アルブミン濃度、6 ~ 20 炭素の長さのアシル鎖を持つトリグリセリド、超低密度リポタンパク質、低密度リポタンパク質、高密度リポタンパク質、及び 6 ~ 20 炭素の長さのアシル鎖を持つ、総遊離アルブミンに結合した非エステル化脂肪酸を含む血漿サンプルを準備し；

10

( b ) 上記遊離 p I 5 . 6 アルブミン濃度を示す値を測定し；そして

( c ) 上記値と前記疾患についての既知の診断を受けた患者から回収した多数の各血漿サンプルを用いた、多数の血漿サンプルでの前記ステップ ( a ) 及び ( b ) それぞれの実施により得られた基準値とを比較することにより前記疾患に対する前記血漿の毒性阻害能力を評価する、を含む前記方法。

【請求項 14】

前記測定ステップ ( b ) を総遊離アルブミン濃度の測定及び総遊離アルブミンに結合した非エステル化脂肪酸濃度の測定、並びに前記総遊離アルブミン濃度を前記総遊離アルブミンに結合した非エステル化脂肪酸濃度と比較することにより実施する、請求項 13 に記載の方法。

20

【請求項 15】

前記 ( b ) で測定された値が血漿中の遊離 p I 5 . 6 アルブミン濃度であり、ここで前記ステップ ( b ) が血漿から V L D L 及び p I 4 . 8 アルブミンを除去し、血漿上清を準備し、そしてその後前記上清中に残留するアルブミン濃度を測定することを含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

前記疾患が、子かん前症、アテローム性動脈硬化症、脳卒中、末梢血管疾患、糖尿病性血管疾患、ネフローゼ症候群、敗血症、ショック、癌、瀕死の状態又は病的状態である、請求項 13 に記載の方法。

30

【請求項 17】

以下の：

( a ) 脂質沈殿剤；

( b ) p I 5 . 6 アルブミンへの結合により発色するが p I 4 . 8 アルブミンに結合しても前記の色を発色しない試薬；及び

( c ) 非エステル化脂肪酸への結合により発色する試薬、を含む血液の毒性阻止能力の測定に有用なアッセイ・キット。

【請求項 18】

前記試薬 ( a ) が、硫酸デキストラン、ヘパリン、コンドロイチン硫酸 A & B、ヘパリン硫酸、及びそれらの組合せ物から成る群から選ばれる硫酸化グリカン、並びにマグネシウム、カルシウム、及びそれらの組合せ物から成る群から選ばれる二価のカチオン塩を含み；

40

前記試薬 ( b ) が、プロムクレゾール・グリーン、プロムクレゾール・パープル、及びそれらの組合せ物から成る群から選ばれ；そして

前記試薬 ( c ) がアシル補酵素 A シンテターゼ、アデノシン三リン酸、及び補酵素 A 及びそれらの組合せ物から成る群から選ばれる化合物を含む混合物である、

請求項 17 に記載のアッセイ・キット。

【請求項 19】

アスコルビン酸酸化酵素、例えばアスコルビン酸オキシダーゼ又は他のアスコルビン酸酸

50

化酵素及びそれらの組合せ物をさらに含む、請求項 17 に記載のアッセイ・キット。

【請求項 20】

前記 T x P A - S を含む診断的要素を、アルブミン阻害性疾患に対する既知の毒性阻止活性を持つ多数の血漿サンプルでの請求項 1 の方法を実施することにより決定された基準と比較することによる前記血漿の毒性阻止活性の診断をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明の分野

本発明は病気を予防及び追跡するための方法に関する。より特に、本発明は子かん前症及び他の疾患の診断に関する。 10

【0002】

本発明の背景

血管疾患は多くの場合そこを通る血流の組成に関係する。特に、血中の高濃度の超低密度リポタンパク質 (VLDL) は血管の完全な状態に有害な影響を持つ。血中の超低密度リポタンパク質は、血管内壁を破壊する傾向にあり、子かん前症、アテローム性動脈硬化症、脳卒中 (stroke)、末梢血管疾患、糖尿病性血管疾患等を含む血管疾患を引き起こす。血管疾患の早期検出を提供する方法、及び人生の晩年での血管疾患を患う方向に向かう患者の傾向を診断するための方法は、上記疾患をより良く制御し又はさらに回避することもできるため望ましい。子かん前症の早期検出は特に重要である。 20

【0003】

子かん前症は特に着目の中毒性血管疾患である。子かん前症は妊娠晩期に罹患し、そして血圧の急激な上昇、体重の極度な増加、全身性浮腫、蛋白尿、重い頭痛、及び視覚障害に特徴づけられる。彼女の胎盤及び胎児へ血液を供給する妊婦の子宮内の血管は子かん前症の間制限され、それにより上記胎児へ減少した量の血液及び酸素しかデリバリーされない。子かん前症は不十分な胎児の成長に関係し、その最も重い状態では、胎児と母親の両者の命を失いかねない。

【0004】

VLDL の破壊的な効果に対する内皮細胞及び白血球によるヒト血液の持つ天然の防御は血中の「毒性阻止活性」又は「T x P A」として知られる指標又は因子により定量化されている。 (Arbogast, B. W., and Dreher, N. J. Coronary Disease Prediction Using a New Atherogenic Index. Atherosclerosis, Vol. 73 (1988) 259-267)。 (Chi, D. S., et al. Decreased Lymphocyte Response in Streptozotocin Induced Diabetic Rats: A Function of Very Low Density Lipoproteins. Diabetes 31 (1982) 1098-1104)。米国特許第 4,699,878 号は、血液サンプルの T x P A を、毒性を持つ量の VLDL により処理した細胞培養物と同じ毒性の量の VLDL により処理され無血液基準細胞培養物の「ゼロ」成長まで変更した量の血液サンプルにより処理した細胞培養物の増殖を比較することにより評価しうることを開示する。 30 40

【0005】

VLDL 対 T x P A の比はインビトロにおけるその血液の細胞毒性を決定する。VLDL 対 T x P A の比はインビトロにおける血管疾患の予測に有効でもある。子かん前症の存在又は将来的な発生を VLDL 対 T x P A の比を用いて 90% の精度で予測しうる。 (Arbogast, B. W., Leeper, S. C., Merrick, R. D., Olive, K. E. and Taylor, R. N Plasma Factors that Determine Endothelial Cell Lipid Toxicity in vitro Correctly Identify Women with Preeclampsia in Early and Late Pregnancy. 50

Hypertension in Pregnancy Vol. 15 (1996) 263 - 279)。同様の精度をアテローム性動脈硬化症によっても達成した。(Arbogast, B.W., Gill, L.R. and Schwertner, H.A. A New Protective Factor in Coronary Artery Disease: Very-Low-Density Lipoprotein Toxicity-Preventing Activity. Atherosclerosis Vol. 57 (1985) 75 - 86)。(Arbogast, B.W. and Dreher, N.J. Coronary Disease Prediction Using a New Atherogenic Index. Atherosclerosis Vol. 66 (1987) 55 - 62)。この細胞培養法の欠点は、それが比較的高価なアッセイであること、及びそれが細胞育成時間を必要とすることである。また、不正確性のレベルが約10%であり、臨床アッセイとして望ましくない程に高い。 10

#### 【0006】

血漿はアルブミン、非エステル化脂肪酸(NEFA)、及びトリグリセリドを含む成分を含み、これらはさまざまな量で超低密度リポタンパク質(VLDL)、低密度リポタンパク質(LDL)、及び高密度リポタンパク質(HDL)により運搬される。ヒト血液アルブミンは2種類存在し、pH4.8とpH5.6の等電点へのそれらの電気泳動により分離される。(Basu, S.P., Rao, S.N. and Hartsuck, J.A. Influence of Fatty Acid and Time of Focusing on the Isoelectric Focusing of Human Plasma Albumin. Biochim Biophys Acta, Vol. 533 (1978) 66)。ヒト血液の毒性阻止活性がpI5.6アルブミンにより主に提供されることが発見されている。Arbogastは、pI5.6アルブミン種が血管内皮細胞及び白血球へのVLDL損傷に対する保護効果を提供することを開示した。(Arbogast, B.W. Purification and Identification of Very Low Density Lipoprotein Toxicity Preventing Activity. Atherosclerosis Vol. 7 (1988) 259 - 267 and Chi, D.S., Berry, D.L., Dillon, K.A. and Arbogast, B.W.: Decreased Lymphocyte Response in Streptozotocin Induced Diabetic Rats: A Function of Very Low Density Lipoproteins. Diabetes 31: 1098 - 1104, 1982)。従って、血中pI5.6アルブミン濃度の測定は血管及び白血球関連疾患の診断に大きな利益となるであろう。 20 30

#### 【0007】

pI5.6とpI4.8アルブミン種はヒト血漿中に予測不可能な割合で存在するため、pI5.6アルブミンの濃度は総アルブミン濃度から決定できない。サンプルの血漿のTPAを、等電点集束液体カラムを用いてpI5.6アルブミンからpI4.8アルブミンを分離し、そして吸光度分光分析を用いてpI5.6画分の濃度を測定することにより測定しうる。次に、血漿中のpI5.6アルブミン濃度を、動脈疾患と診断されている患者と動脈疾患と診断されなかったヒトの間の境界を示すことが知られている基準濃度と比較する。(Arbogast, B.W., Leeper, S.C., Merrick, R.D., Olive, K.E. and Taylor, R.N.: Plasma Factors that Determine Endothelial Cell Lipid Toxicity in vitro Correctly Identify Women with Preeclampsia in Early and Late Pregnancy. Hypertension in Pregnancy 15: 263 - 279, 1996)。Arbogastにより開示された電気泳動法は相当扱いにくく、そして臨床運用には高価である。上記電気泳動法の不正確性の程度は約10%である。 40

#### 【0008】

上記の観点から、血管及び非血管疾患及び症状を含むアルブミン阻害性VLDL感受性疾患の存在又はそれを患う方向に向かう傾向を診断するための簡単な方法を持つことが望ましいであろう。細胞培養物の育成又は等電点集束を必要としない方法がより有用であろう。このような新規診断方法に関して従来の方法よりも正確であることがさらに望まれるであろう。

#### 【0009】

本発明の概要

本発明は、血漿中pI5.6アルブミン濃度の低下に関連を持つ疾患に対する血漿の毒性阻止能力を測定するための方法である。本法は以下のステップを含む：

(a) 遊離アルブミン、遊離非エステル化脂肪酸、トリグリセリド、超低密度リポタンパク質、低密度リポタンパク質、及び高密度リポタンパク質を含む血漿サンプルを準備し；

10

(b) 上記遊離アルブミンの濃度を測定し；

(c) 上記遊離非エステル化脂肪酸の濃度を測定し；そして

(d) 遊離アルブミンの濃度対遊離非エステル化脂肪酸の濃度の比較により上記血漿の毒性阻止能力を示す値を計算する。

より好ましい指標値は「T x P A - S比」であり、遊離アルブミンの濃度を遊離非エステル化脂肪酸の濃度により割ることで計算される。

#### 【0010】

本発明は本法の実施に有用なアッセイ・キットをさらに含む。上記アッセイ・キットは以下の：

20

(a) 脂質沈殿剤；

(b) アルブミンとの結合により発色する試薬；及び

(c) 非エステル化脂肪酸との結合により発色する試薬、を含む。

#### 【0011】

本発明の詳細な説明

本出願人は血液毒素から、特にVLDL細胞毒性に対して有害な細胞損傷を防ぐ血漿の能力を予測する新規方法を発見した。本発明の方法は、血液の毒性阻害能力が特にVLDLに結合されないpI5.6アルブミンにより示されることができるといふ本出願人の発見に基づく。VLDLに結合しないアルブミンを本明細書で「遊離アルブミン」と言及する。本出願人は遊離pI5.6アルブミンの直接測定が本発明の下で毒性阻害活性の指標を提供することを発見したとはいえ、上記直接測定はpI5.6アルブミンのpI4.8アルブミンからの分離、並びに遊離アルブミンのVLDL結合アルブミンからの分離を必要とする。pI5.6アルブミンのpI4.8アルブミンからの分離のための扱いにくい電気泳動集束アッセイに対する代替アッセイを見つける試みの中で、本出願人は、遊離(総)アルブミン濃度と遊離アルブミンに結合した非エステル化脂肪酸(「NEFA」)の濃度を比較して、遊離pI5.6アルブミンの濃度の非常に優れた概算を提供しうることを発見した。これらの量の両方が簡単なインビトロにおける技術により計測可能であるため、これは容易な方法を提供する。本出願人は遊離アルブミンの濃度と遊離アルブミンに結合したNEFA(本明細書中では「遊離NEFA」と言及される)の濃度の比が血液毒素からの細胞損傷を防ぐ血漿の能力の改良された指標であることを発見した。しかしながら、主として遊離アルブミン及び遊離NEFA濃度に基づいて計算された他の診断値は本発明の改変であると考えられる。

30

40

#### 【0012】

本法により測定される診断上の比は、米国特許第4,699,878号又はpI5.6アルブミンの単離のために使用した等電点集束法において血液の毒性阻害能力を示すために以前に使用したT x P A値と異なるパラメーターに基づいていることに留意すべきである。従って、上記の2種類の値は比較できない。本発明により測定される新しい毒性阻害能力の診断上の比を本技術分野で以前に使用されていたT x P A値とはっきり区別するため

50

に、本発明により診断上の比を以下、アッセイされる血漿上清を示す「S」を伴う「T x P A - S比」と称する。本発明による上記T x P A - S比の決定及びそれらのベースとなる診断は、電気泳動及び細胞培養よりも簡単なアッセイ法を用いてアルブミン阻害性疾患罹患の可能性の正確な表示を提供する。

#### 【0013】

本発明は血液についてT x P A - S比の測定方法、及びその結果測定されるT x P A - S比に基づく医療用診断を行う方法を含む。本法は血液、血清又は血漿のサンプルを試験することにより実施される。凝固のせいで血液は分析が困難であるため、全血から処理された血清及び血漿が好ましい。本発明の方法の実施のために使用される特定の種類のアッセイが血清又は血漿のいずれが最も好ましい血液の形態であるか決定するであろう。血漿が本法に関して最も好ましい血液の形態ではあるが、用語「血漿」は以下血液、血清、及び/又は血漿を示すために使用される。

10

#### 【0014】

本発明においてアッセイされる血漿の最も関連のある成分は、遊離アルブミン、6~20炭素の長さのアシル鎖を持つNEFA、6~20炭素の長さのアシル鎖を持つトリグリセリド、低密度リポタンパク質(「LDL」)、超低密度リポタンパク質(「VLDL」)、及び高密度リポタンパク質(「HDL」)である。VLDLは約1.066 gm/ml未満の密度を有する。LDLは約1.006~約1.063 gm/mlの密度を有する。HDLは約1.063 gm/mlより高い密度を有する。上記NEFA成分はVLDL結合NEFAとVLDLに結合されないNEFAにより構成される。VLDLに結合されないNEFAの圧倒的多数が遊離NEFAであることが発見されているので、用語「遊離NEFA」は以下、別段の指示のない限り、両方の種類のNEFAの実体をも言及するために互換性を持って使用される。

20

#### 【0015】

本法は、血漿サンプル中の遊離アルブミン(pI 4.8及びpI 5.6アルブミンの両方)の濃度及び遊離NEFAの濃度の測定、並びに遊離アルブミン濃度を遊離NEFA濃度で割ることにより上記血漿のT x P A - S比の計算を含む。遊離NEFAの濃度はその血漿からのVLDLの除去の後に好ましくは測定される。上記アルブミン濃度はVLDLを除去する前に総血漿アルブミンとしてか又はVLDLの除去後に残存する遊離アルブミンとしてかのいずれかで計測される。しかしながら、より正確なT x P A - S比は上記遊離NEFA濃度と上記遊離アルブミン濃度を用いてT x P A - S比を計算することで得られる。

30

#### 【0016】

上記遊離アルブミン及び遊離NEFA濃度はLDLに結合されたアルブミン又はNEFAを含まずに計測することがより好ましい。従って、LDLはVLDLと一緒に血漿から除去されることが好ましい。LDLに結合された実体を含まずに遊離アルブミン及び遊離NEFAを計測した場合に、上記T x P A - S比が正確であることは知られている。

#### 【0017】

T x P A - S比の測定の後、このT x P A - Sは、特定の疾患についての基準T x P A - Sと上記T x P A - S比を比較することにより特にアルブミン阻害性疾患又は症状に対するその血漿の毒性阻止能力の分類に好ましくは使用される。上記基準T x P A - Sは、疑わしいアルブミン阻害性疾患又は症状の可能性が知られている統計的に有意な多数の血漿サンプルにおいて本発明の方法を実施することにより決定される。各血漿基準に対して決定されるT x P A - S比は、疑わしいアルブミン阻害性疾患について独立の医療用診断により分類される。上記疑わしいアルブミン阻害性疾患についての陽性診断は特定期間内のその疾患の実際の罹患に典型的には基づく。上記疑わしいアルブミン阻害性疾患についての陰性診断は特定期間内のその疾患の罹患のないことに典型的には基づく。上記基準はシングル・ベンチマークT x P A - S比又は好ましくは、アルブミン阻害性疾患に対する高い可能性を示すT x P A - S比の範囲である。最も好ましい基準は、T x P A - S比の範囲のペアであり、一方の範囲はアルブミン阻害性疾患について高い可能性を示すT x P A

40

50

- S比を示し、そしてもう一方の範囲は同じ疾患について低い可能性を示す。

【0018】

本発明の方法は、上述の高い又は低い可能性の $T \times PA - S$ 比の基準範囲のペアの間に意外に大量の分類を提供する。上記 $T \times PA - S$ 基準比は基準血漿の十分に大きな集団から得られ、最も好ましくは、2の本質的に重複しない範囲に集まる、つまり、この2の範囲の間で統計的に少数の外れ値を除いて重複しない。

【0019】

よって、本法を用いた診断における正確性は従来法よりも高い。上記高値基準範囲内に収まるサンプル $T \times PA - S$ 比は、その患者が疑わしい疾患の罹患についての有意に低い可能性を有することを示す。上記低値基準範囲内に収まるサンプル $T \times PA - S$ 比は、その患者が上記疾患の罹患について有意に高い可能性を有することを示す。2の基準範囲の間に収まる試験 $T \times PA - S$ 比は上記疾患の罹患の危険性が不確定である。

10

【0020】

アルブミン阻害性疾患の罹患に向かう患者の傾向のさらにより正確な測定は、上記本法が血漿中の総トリグリセリド濃度の計測、及びに上記診断方程式にそのトリグリセリド濃度の組み込みのステップをさらに含む場合に成される。上記トリグリセリド濃度は $T \times PA - S$ 比対トリグリセリド濃度のプロットの評価による患者の疾患の可能性の決定において考慮される。上述のプロットから、低い疾患可能性の血漿から高い疾患可能性の血漿を線引きする一次方程式を計算しうる。血漿サンプルの診断は $T \times PA - S$ 比とトリグリセリド濃度の両方を上記方程式内に入れることにより容易に成されうる。上記高い及び低い疾患可能性の基準範囲は、上記トリグリセリド濃度の結果を診断に含む時、さらに狭められ、そして互いから分離される。しかしながら、 $T \times PA$ 値に代えて $T \times PA - S$ 比を用いた診断の正確性の明らかな改善は、トリグリセリド濃度が、 $T \times PA$ 値の基準範囲へのその影響に比べて、 $T \times PA - S$ 比に基づく診断基準範囲の線引きの量に明らかに小さい影響を有する事実よりさらに明らかである。

20

【0021】

本法により診断される疾患は、その血漿中の $pI 5.6$ アルブミンの濃度の減少に関連を持つ疾患である。上記方法は、 $VLDL$ の作用による内皮細胞の破壊により引き起こされた血管疾患の予測に特に有用である。用語「疾患」は疾患及び医学的に診断されうる症状を言及するために本明細書中で使用される。上述の疾患の例は、子かん前症、アテローム性動脈硬化症、脳卒中、ネフローゼ症候群（腎疾患）、末梢血管疾患、及び糖尿病性血管疾患である。血管疾患と認識されないがアルブミン濃度と関連を持つ非血管疾患の例は、癌、死亡、罹患、敗血症、ショック、及び加齢である。 $VLDL$ の除去、遊離 $NEFA$ の計測、及びアルブミンの計測に使用される特定の方法は重要ではない。本法の各ステップを実施するためのさまざまな方法が本技術分野で知られている。好適な方法及び試薬の例を以下に示すが、本発明の範囲を制限しない。

30

【0022】

着目の $NEFA$ 濃度は遊離アルブミンに結合した $NEFA$ ではあるが、非 $VLDL$ 結合 $NEFA$ 濃度の測定が、本法のために遊離アルブミンに結合した $NEFA$ の概算に有用であることが知られている。よって、 $VLDL$ 結合 $NEFA$ と非 $VLDL$ 結合 $NEFA$ の分離を提供するあらゆる方法が遊離 $NEFA$ 濃度の測定に好適である。 $VLDL$ 結合 $NEFA$ は血漿からの $VLDL$ の除去の後に遊離 $NEFA$ と区別されうる。

40

【0023】

$VLDL$ は多くの技術により血漿サンプルから除去される。上述の分離手段の例は、超遠心分離、二価のカチオンの存在下での硫酸化グリカン又はリンタングステン酸による沈殿、免疫沈降、電気泳動、等電点集束、荷電分離技術、例えばイオン交換クロマトグラフィー、サイズ分離技術、例えばゲルろ過クロマトグラフィー等を含む $LDL$ 及び/又は $VLDL$ 除去のためのあらゆる既知の技術を含む。 $VLDL$ は最も好ましくは沈殿、それに続く沈殿した固体からの上清のろ過、吸い上げ又はデカンテーションを手段としてサンプル血漿から除去される。

50

## 【0024】

VLDLを非アルブミン結合性の脂質沈殿剤の使用により沈殿させる。好ましい試薬は硫酸化グリカン、例えば硫酸デキストラン、及び二価のカチオン、例えば塩化マグネシウムを含む。VLDLの沈殿に有用な市販の沈殿剤の例は、HDL-コレステロール沈殿剤であり、これは硫酸デキストラン、塩化マグネシウム、塩化ナトリウム、及びポリエチレン・グリコールを含み、Ref Lab Medical Analysis Systems, Inc. から市販されている。この好ましい沈殿剤は硫酸デキストラン(0.2 mM)、塩化マグネシウム(63.9 mM)、塩化ナトリウム(63.3 mM)、及びポリエチレン・グリコール(3.3 mM)の混合物である。LDLをVLDLと一緒に血漿サンプルから除去することは望ましい。LDLを典型的にはVLDLと一緒に溶液から沈殿する。沈殿したVLDL及びLDLの固体は既知の方法、例えばその溶液の遠心分離に続いて血漿上清のデカンテーションにより除去される。代替のVLDL及びLDL沈殿剤は30.3 mM リンタングステン酸、及び100 mM 塩化マグネシウムから成る。この溶液は1:5のサンプル対試薬比で混合され、そして沈殿したVLDL及びLDL固体をデキストラン-マグネシウム沈殿について先に定めたのと同様に除去する。

10

## 【0025】

VLDLの除去後、遊離NEFA濃度を、脂肪酸濃度の測定のために知られるいずれかの方法により上記上清から測定する。上述の方法の例が米国特許第4,071,413号;同第4,360,591号;同第4,349,625号;同第4,301,244号;及び同第4,229,538号に開示されている。NEFA濃度計測の好適な方法は、滴定、比色分析、及び放射同位体法を含み、比色分析が好ましい。NEFAを抽出するための適当な溶媒系はDole, V. P. J. Clin. Invest Vol 35 (1956) 150により開示されている。抽出されたNEFAは酸-塩基指示薬の終点への基準アルカリ性物質を用いた滴定により計測される。

20

## 【0026】

NEFA濃度測定のための放射化学法はDove抽出物のヘプタン相にNEFAを抽出し、そしてそれからリン脂質を除くことを含む。次に上記抽出物を放射性硝酸ニッケルと混合することで放射性 $^{63}\text{Ni}$ により標識する。ニッケル-脂肪酸複合体を含む上方の有機相をその後放射活性についてアッセイする。 $^{60}\text{Co}$ を $^{63}\text{Ni}$ と置き換えることができるが、ガンマ放射体であるためさらに危険である。

30

## 【0027】

NEFA濃度の比色測定のままさまざまな方法が本技術分野で知られ、そして上記上清から抽出されたNEFA又はインビトロにおいて上記上清中に存在するNEFAに対して実施される。抽出法は典型的には銅又はコバルト塩の形成、及び非極性有機溶媒中へのその塩の抽出に基づき、ここで、比色計測のための色素体染料と複合体を形成する。あるいは、より好ましくは、NEFAはインビトロにおいて酵素的比色法を用いて計測される。ある上述の方法は、アシルCoAとして知られるCoAのチオール・エステルを形成するために加えたアデノシン三リン酸(ATP)、マグネシウム・カチオン、及びCoA、並びに副産物であるアデノシン一リン酸(AMP)及びピロリン酸塩(PPi)の存在下でアシル補酵素A合成酵素による上記上清の処理を含む。それにより産生されたアシルCoAを次に過酸化水素の産生を伴い、アシルCoAオキシダーゼにより酸化する。ペルオキシダーゼの存在下で、過酸化水素は3-メチル-N-エチル-N-ヒドロキシエチル-アニリンと4-アミノアンチピリンの酸化縮合をもたらす、その結果紫色の付加化合物を形成する。上記上清中のNEFA濃度は550 nmの最大吸光度で計測される光学密度から測定される。

40

## 【0028】

この比色分析を用いた場合、血漿中のアスコルビン酸(ビタミンC)の存在がNEFA濃度の測定 of 明らかな妨害の原因となることが多いことが知られている。これは、抗酸化剤としてのアスコルビン酸の生物学的役割及び過酸化水素と反応するその能力に大いに原因がある。このため、NEFA濃度測定のためにこの種の比色法を使用する場合、NEFA

50

濃度の比色測定に先立ち、血漿又は血漿からアスコルビン酸を除去することが好ましい。アスコルビン酸オキシダーゼ (AOD) の添加はアスコルビン酸除去の便利な方法である。

【0029】

アルブミン濃度の測定ステップにおいて、測定されるアルブミン濃度は遊離アルブミンの濃度であることが望ましい。従って、上記アルブミン濃度は好ましくはVLDLの除去後に、より好ましくはVLDL及びLDLの両方の除去後に残留した血漿上清から計測される。アルブミン濃度は既知の方法、例えば酵素連結免疫吸着法 (ELISA)、免疫測定、放射免疫測定、色素結合比色分析、及び沈殿、電気泳動、焦点電気泳動、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティー・クロマトグラフィー等を用いたアルブミンの精製後のタンパク質又はアミノ酸の量の計測により計測される。色素結合比色分析はアルブミン濃度の測定のための好ましいアッセイ方法論である、なぜならばこれは他の手順よりも簡単でそして時間の浪費が少ないからである。一般的に、色素がアルブミン分子上の部位に結合する場合、アルブミン塊及び溶液中のpH環境の違いによりそれが検出可能となる。上述の比色色素結合アルブミン・アッセイの例は、米国特許出願第5,182,214号；同第4,568,647号；同第3,873,272号；同第3,884,637号；同第5,194,390号；同第4,337,064号；及び同第4,230,456号に開示されている。アルブミン濃度測定のための好ましい比色分析は、約1~約10 $\mu$ Lの上清又は血漿を約50~約200 $\mu$ Lの0.030mmol/リットル、ブロムクレゾール・グリーン (pH4.2) アルブミン試薬と混合することを含む。上記アルブミン濃度は628nmの最大吸収での光学密度の計測により測定される。

10

20

【0030】

遊離pI5.6アルブミン濃度を示す値の代替の測定方法は、VLDLに結合されたアルブミン及びNEFAの濃度を測定し、そして血清中のアルブミン及びNEFAの合計濃度からそれらの濃度を引き、それにより遊離アルブミンの濃度及び遊離NEFAの濃度を得ることを含む。よって、これらの濃度を先に示したとおりTxPA-S値の計算に使用しうる。

【0031】

与えられた血漿サンプルのTxPA-S比は遊離アルブミンの濃度を遊離NEFAの濃度によって割ることで本発明に従い計算される。使用される濃度単位は、基準TxPA-S比を得るために使用される同じ単位である限り重要ではない。例えば、TxPA-S値は、mgアルブミン/mgNEFA又は吸光度アルブミン/吸光度NEFAで表されるか、あるいは上記単位の組合せで表される。

30

【0032】

TxPA-S比の測定を含む上記方法の好ましい態様を先に記載したが、本発明は、遊離pI5.6アルブミンの実際の濃度、あるいはそれらのその他の指標を測定し、そして特定の疾患に対する血液の毒性阻止能力の指標の値として使用する方法をも含む。本発明の上述の態様は、上記のとおり血漿サンプルを準備し、上記血漿中の遊離pI5.6アルブミンの濃度の指標を測定し、そしてその遊離pI5.6アルブミン濃度を、上記疾患の存在又は発生についての既知の診断を受けた患者から採取されたそれぞれ複数の血漿サンプルを用いて、複数の血漿サンプルで上記ステップ(a)及び(b)のそれぞれを実施することにより得られた基準と比較することにより上記疾患に対する上記血漿の毒性阻止能力を評価するステップを含む。遊離pI5.6アルブミン濃度の直接的な測定が、pI4.8アルブミンからpI5.6アルブミンを分離するための電気泳動集束の実施の組合せの結果遊離アルブミン及び遊離NEFAの計測ほど採算性はないであろう。

40

【0033】

本発明の好ましい方法は、トリグリセリド濃度の計測、及びその診断で見られるレベルのファクタリングを含む。上記トリグリセリド濃度は酵素的比色終点アッセイの実施により測定される。

【0034】

50

本発明は、本発明の好ましい方法を実施するために有用な試薬の特定の組合せであるアッセイ・キットをさらに含み、ここで、VLDLは沈殿により除去され、その後比色分析を用いて測定されるその上清に残留したNEFA及びアルブミンの濃度を測定される。本発明のアッセイ・キットはVLDL沈殿試薬、アルブミン結合pH感受性色素、及び酵素的脂肪酸比色試薬を含む。本発明のアッセイ・キットは、アスコルビン酸酸化剤、例えばアスコルビン酸オキシダーゼを好ましくは含む。

#### 【0035】

上記アッセイ・キットはトリグリセリドの酵素的比色終点試薬をも好ましくは含む。トリグリセリドとの結合及びトリグリセリドの表示に好適な比色試薬は、トリグリセリドをグリセロールと脂肪酸に加水分解するために一緒に働く成分及び酵素を含む。アデノシン三リン酸(ATP)及びグリセロールをグリセロキナーゼと反応させてグリセロール-1-リン酸及びアデノシン二リン酸を形成させる。グリセロール-1-リン酸(G-1-P)は過酸化水素に酸化され、この過酸化水素はNEFA試薬に簡単に計測されうる。あるいは、G-1-Pはニコチン・アデニン・ジ-ヌクレオチド(NAD)と反応し還元ニコチン・アデニン・ジ-ヌクレオチド(NADH)を産生しうる。次にNADHは、ホルムアザンを形成する還元で変色する色素を還元する。あるいは、先のアッセイにおいて、ピルビン酸を乳酸デヒドロゲナーゼの存在下でNADHに添加し、そして得られたNADを紫外光を用いて測定しうる。代替法において、トリグリセリドをアルコールKOHにより加水分解しグリセロール及び脂肪酸を形成させる。次にグリセロール及びATPをグリセロキナーゼ存在下で反応させてグリセロール-1-リン酸及びADPを形成させる。次のステップにおいて、ピルビン酸キナーゼの存在下でADPをホスホエノール・ピルビン酸と結合させてピルビン酸とATPを形成させる。次にピルビン酸を乳酸デヒドロゲナーゼの存在下でNADHと反応させて乳酸とNADを形成させる。次にNADを紫外光により計測する。

#### 【0036】

本診断試験キットのVLDL沈殿試薬は、硫酸化グリカンとして硫酸デキストラン及び二価のカチオンとして塩化マグネシウム、あるいはリンタングステン酸及び塩化マグネシウムの両方を好ましくは含む。

#### 【0037】

上記pH感応性アルブミン結合色素はブロムクレゾール・グリーン、ブロムクレゾール・パープル等から成る群から好ましくは選ばれる。好ましい酵素的脂肪酸比色試薬は、アシル補酵素A合成酵素、アデノシン三リン酸、及び補酵素Aを含む混合物である。本発明のキット中のさまざまな試薬について、本明細書中において、上記試薬と血漿との接触の結果としてその血漿内容物で生じた化学反応により発色がいずれかの時点で示される場合、化合物が血漿内容物との結合で色を示していると考えられる。

#### 【0038】

本願発明は、その好ましい態様を説明する以下の実施例によりさらに説明されうる。しかしながら、これらの実施例は説明の目的のために単に含まれるだけであるため、別段の指示がない限り本発明の範囲を制限しないことは理解されるであろう。

#### 【0039】

##### 実施例

以下の実施例において、血液サンプルをその時点で子かん前症を持たない妊婦から得た。これらの患者における子かん前症の発症又は子かん前症の発症のないことを診断の終わりに確認した。実施例1~6は、重度の子かん前症を持つ女性から得た血液サンプルを含む、上記重度の子かん前症は、晩期妊娠高血圧(最初の20週における少なくとも140/90トールの絶対血圧又は収縮期に少なくとも30トール若しくは拡張期に少なくとも15トールの上昇を上回る値)、蛋白尿(カテーテル挿入標本中、少なくとも30mgタンパク質/dL尿又は排泄尿中、少なくとも60mg/dL)、及び高尿酸血(血清尿酸>1標準偏差で妊娠期間中正常値を上回る)を有し、そして出産しなかった女性と定義された。実施例7~9は軽度の子かん前症を持つ女性から得た血液サンプルを含み、上記軽

10

20

30

40

50

度の子かん前症は、彼女らが出産できたことを除いて重度子かん前症について定義されたのと同じ基準を持つと定義された。

【0040】

以下の試薬を上記実施例に使用した：

沈殿剤 -

Ref LabブランドのHDL - コレステロール沈殿剤はMedical Analysis System, Inc, (USA)から入手でき、0.2 mM硫酸デキストラン、63.9 mM塩化マグネシウム、63.3 mM塩化ナトリウム、及び3.3 mMポリエチレン・グリコールを含む。

【0041】

アルブミン結合試薬 -

Wako chemicals USA, Inc、から入手可能なアルブミン・アッセイ・キットは50 mmole / Lクエン酸バッファー中、pH 3.8でプロムクレゾール・グリーンの0.2 mmole / L溶液を含む。

【0042】

アスコルビン酸除去剤を伴うNEFA結合試薬 -

アッセイ・キットはWako Chemicals USA, Inc, Richmond, VAから入手できる。試薬Aを、NEFAの測定のためのアスコルビン酸の酸化及び補酵素Aのアセチル化の目的のために調製した。試薬Bを、NEFAの測定のためのアシルCoAの酸化及び過酸化水素の産生の目的のために調製した。次に過酸化水素を3 - メチル - N - エチル - N - - ヒドロキシエチル - アニリン及び4 - アミノアンチピリンと反応させて紫色を生じさせた。

【0043】

試薬A：

ACS (アシル補酵素Aシンテターゼ)	3 U / バイアル
AOD (アスコルビン酸オキシダーゼ)	15 U / バイアル
CoA (補酵素A)	7 mg / バイアル
ATP (アデノシン三リン酸)	30 mg / バイアル
4 - アミノアンチピリン	3 mg / バイアル

10 mlの希釈液(0.05 Mリン酸バッファー、pH 6.9、3 mM塩化マグネシウム、界面活性剤、及び安定化剤)を試薬Aの各バイアルに添加して実際に使用する溶液Aを作製した。

【0044】

試薬B：

ACOD (アシル補酵素Aオキシダーゼ)	132 U / バイアル
POD (ペルオキシダーゼ)	150 U / バイアル
MEHA (3 - メチル - N - エチル - N - - ヒドロキシエチル - アニリン)	4 mg / バイアル

実際に使用する溶液Bを20 mlのフェノキシエタノール(0.3% v / v)及び界面活性剤により試薬Bを希釈することにより調製した。

【0045】

実施例1 - (比較)

図1は、11の子かん前症の女性及び11の対照対照からの血漿中の総アルブミン濃度の単純な計測によって生じる診断上の線引きがないことを明らかにする。

【0046】

実施例2 - (比較)

同様の(総)アルブミン計測方法を、アルブミン濃度の計測に先立ちVLDLをその血漿から除去したことを除き、同じ血漿サンプルについて実施例1と同様に実施した。遠沈管中で100 µLの上記血漿と100 µLの沈殿剤(1:1又は1:5のいずれかのサンプル対試薬比がその試薬濃度に依存して許容される)の組合せることによりVLDLを各血

10

20

30

40

50

漿サンプルから沈殿させた。上記遠沈管を十分な混合を得るまでボルテックス・ミキサーにより振とうし、次に3,000rpmで10分間遠心分離した。その上清をピペティングにより新しい試験管に静かに移した。アルブミン濃度を得られた上清を用いて測定した。その結果を図2に示す。

【0047】

図1と2に示されたデータの比較は、アルブミンの計測に先立ちVLDL成分を除去した場合、子かん前症血液サンプルと対照血液サンプルの群の間のアルブミン濃度の線引きにいくらかの改善があることを示す。図1よりも図2の方が重複が少ない。上記対照患者の血液サンプルについての平均アルブミン濃度は、子かん前症患者の血液サンプルについての平均アルブミン濃度より高い。

10

【0048】

実施例3 - (比較)

この実施例は実施例1の11の子かん前症及び11の対照患者の血液サンプルの間のNEFA濃度の分離を明らかにする。上記血液サンプルから処理した血漿をNEFA濃度について試験した(VLDLの除去なし)。NEFA濃度の計測のために、5 $\mu$ Lの血漿を平底マイクロタイター・プレートのウェルにピペットで移した。試験Aの実際に使用する溶液を添加し(70 $\mu$ L)、その溶液を十分に混合し、そして上記プレートを37で10分間インキュベートした。次に試薬Bの実際に用いる溶液を添加し(140 $\mu$ L)、そのプレートを十分に混合し、そして37でさらに10分間インキュベートした。光学密度をマイクロタイター・プレート・リーダーにより550nmの波長で計測した。水ブランクからの吸光度を差し引き、そしてNEFA濃度を既知の基準と比較して得られた吸光度に応じて記録した。

20

【0049】

この結果を図3に図式を用いて示す。

【0050】

実施例4

実施例4は本発明の方法を実施するために使用される方法を説明する。

【0051】

22の血漿サンプルを、NEFA濃度の計測前にVLDLを上記血漿から除去して結合アルブミンを含まない上清を準備したことを除いて、実施例3と同様に試験した。遠沈管中で100 $\mu$ Lの血漿と100 $\mu$ Lの沈殿試薬を組合せることによりVLDLを血漿サンプルから沈殿させた。この遠沈管をボルテックス・ミキサーにより十分な混合が得られるまで振とうし、次に3,000rpmで10分間遠心分離した。この上清をピペティングにより新しい試験管に静かに移した。この上清のNEFA濃度を実施例3で用いた方法により計測した。その結果を図4に示す。

30

【0052】

図3と図4の比較は、VLDLをその血漿から最初に除去した場合、患者サンプル中のNEFA濃度が子かん前症サンプルと対照サンプルの間で有意に線引きすることを明らかにする。これは血漿中の有意な量のNEFAがアルブミンに結合されていることに加え、VLDLに結合されていることを示唆している。このため、VLDL結合NEFA及びVLDL結合アルブミンの除去は血液の毒性阻止能力と強い関連がある遊離アルブミンに結合したNEFA濃度のより正確な計測をもたらす。

40

【0053】

実施例5

アルブミン対NEFA比を実施例1~4の結果を用いて上記22の患者のサンプルのそれぞれについて計算した。実施例1(血漿サンプル)において測定したアルブミン濃度を実施例3(血漿サンプル)において測定したNEFA濃度によって割ることで上記比をまず計算した。これらの結果を図5にプロットする。

【0054】

実施例2(上清を計測)において測定したアルブミン濃度を実施例4(上清を計測)にお

50

いて測定したNEFA濃度によって割ることで22の患者のサンプルのそれぞれについて本発明に従いT x P A - S比を計算した。これらの結果を図6にプロットする。

【0055】

図5と6の比較は、VLDLが除去された上でのみ、本法によるアルブミン濃度及びNEFAの両者の計測により得た有意な量の線引きを説明する。図6は子かん前症サンプルと対照サンプルの間の完全な線引きを示す。

【0056】

図6に示された結果の分析は、約1.17~約1.78に収まるT x P A - S比は約100%の確度で子かん前症の通常危険性を示すことを示唆した。約0.63~約0.9に収まるT x P A - S比は約100%の確度で子かん前症の高い危険性を示す。これら2つの範囲の間に収まるT x P A - S比は不確定である。

10

【0057】

図6に示したプロットは本法を用いた診断に有用なT x P A - S比基準の例である。例えば、必要に応じて、1.0の単独のT x P A - S比切り捨て値が診断目的のための分離試験T x P A - S比に対して使用されうる。しかしながら、特にT x P A - S基準範囲を導き出すための参照サンプルの大集団による、慎重な範囲の使用がよりの確である。

【0058】

実施例6

本実施例はカラムT x P Aの以前使用されていた測定方法を説明し、そしてその結果をT x P A - Sと比較する。重度の子かん前症と診断された11の妊婦患者、及び妊娠期間、母親の年齢、及び人種について対応した11の患者から得た血液サンプルの(総)アルブミン濃度をHypertension in Pregnancy Vol. 15中にArbogastにより開示された方法に従い、等電点集束により上記血漿(VLDLの除去なし)のアリコート(10:1)から直接的に計測した。10 $\mu$ lの血漿をpI4~6.5の0.25mlアンホラインを伴う10mlのショ糖密度(5%~50%)勾配中に移す。18時間流し、そしてそのカラムをマイクロタイター・プレート内に溶出させた。1滴づつ画分を回収した。200 $\mu$ Lのアルブミン試薬を溶出サンプルと混合し、そして約660nmで発色を計測した。

20

【0059】

図7に示したプロットは、本発明による上清アリコートでのT x P A - Sの比色測定についての図6に示した結果とHypertension in Pregnancy Vol. 15中にArbogastにより開示された方法による同じ患者サンプルからの血漿アリコートでのT x P Aのカラム法測定の高い相関関係を明らかにする。上記2セットの結果の間に見られる相関係数( $R^2$ )は0.66であった。反復試験での変化はカラムT x P A法により約10%であるのに対して上清を用いた本比色法では約2%の変化しかない。

30

【0060】

実施例7~9は後日軽度子かん前症を持つことが診断された女性における本法の使用を説明する。

【0061】

実施例7 - (比較)

図8は、実施例1で使用したのと同じ方法を実施することにより得られた妊娠の妊娠第3期にある25の子かん前症の及び25の対照の女性における総血清アルブミン・レベルを示す。図に示すように、多くの子かん前症の女性が上記対照の基準範囲より低い総アルブミン・レベル(<4g/dl)を有する。しかしながら、総血清アルブミン・レベルを子かん前症の診断に不十分にさせる上記の群の間の明らかな重複が存在する。

40

【0062】

実施例8

実施例7でアッセイした同じ50の血液サンプルのT x P A - Sを実施例5で用いたのと同じ方法を用いて測定した。図9は、これらの同じ2の群の女性について測定したT x P

50

A - S が、実施例 7 での総血清アルブミン・レベルの測定よりも上記の群の優れた線引きをするという結果をもたらした。診断ベンチマークとして図 9 に示した水平線を用いて、76% (25 の中の 19) の上記対照の女性を 68% (25 の中の 17) の子かん前症の女性から分離しうる。これは実施例 7 を上回る著しい改善である。

【0063】

実施例 9

本実施例において、実施例 8 で測定した T x P A - S データを ( V L D L 及び L D L の除去後の ) 上清中の H D L 濃度を各 T x P A - S 比に掛けることによりさらに評価した。上記 H D L コレステロール濃度を Lopes - Virella M F , Stone P , Ellis S , Colwell J A . Cholesterol Determination in High Density Lipoproteins Separated by Three Different Methods . Clin Chem 23 : 882 - 6 ( 1977 )、及び Allain C A , Poon L S , Chan C S G , Richmond W . F u P C . Enzymatic Determination of Total Serum Cholesterol . Clin Chem 20 : 470 - 5 ( 1974 ) に開示のとおり、リタングステン酸を用いた V L D L 及び L D L の沈殿後の上清で計測し、上記文献を本明細書中に援用する。

10

【0064】

図 10 は、さらなる改善が上記方程式に H D L レベルを組み込むことにより得られたことを示す。この場合、76% (25 の中の 19) の対照の女性が 88% (25 の中の 22) の子かん前症の女性から線引きされる。

20

【0065】

本発明を明細書中及び実施例中の目下の好ましい態様に関して説明してきたが、上述の開示は本明細書中に記載した発明を制限しないことは理解される。もちろん、本開示を読んだ後、本発明に関するさまざまな変更及び修飾が当業者にとって明らかになるであろう。添付した請求項が本発明の本質及び範囲の中にある全ての変更及び修飾に及ぶと解釈されることを意図する。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

診断上の分離の欠落が重度子かん前症患者と対照患者の血漿アルブミン濃度の比較により生じることを示すプロットを表す。対照患者は、妊娠期間、母親の年齢、及び人種の観点から子かん前症患者と一致する。

30

【図 2】

そのアルブミン濃度が沈殿及び遠心分離による V L D L 及び L D L 除去後の血漿上清中に見られるアルブミンであることを除いて、図 1 と同様のプロットを表す。

【図 3】

いくらかの診断上の分離が重度子かん前症患者と対照患者の血漿 N E F A 濃度の比較により生じることを示すプロットを表す。

【図 4】

その N E F A 濃度が V L D L 及び L D L の沈殿後の血漿上清中に見られる N E F A であることを除いて、図 3 と同様のプロットを表す。

40

【図 5】

血漿アルブミン濃度対血漿 N E F A 濃度の比をプロットする場合に子かん前症患者と対照患者の間に改善された診断上の線引きを示すグラフを表す。

【図 6】

上清アルブミン濃度対上清 N E F A 濃度の比 ( T x P A - S 比 ) をプロットする場合に重度子かん前症患者と対照患者の間にさらに改善された診断上の線引きを示すグラフを表す。

。

【図 7】

血液サンプルの同じセットで計測した T x P A - S 比 ( 上清 ) とカラム T x P A 値 ( 血漿

50

から)の間の線形相関プロットを表す。

【図8】

軽度子かん前症を持つ女性の異なるセット及び対照の女性のセットから得た血液サンプルについての図1と同様のプロットを表す。

【図9】

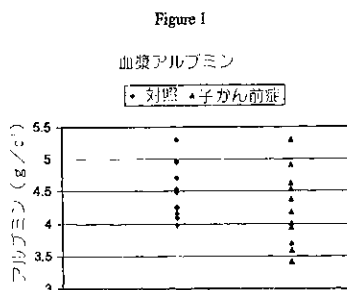
図8で用いたのと同じ群の血液サンプルから得た血液サンプルについての図6と同様のプロットを表す。

【図10】

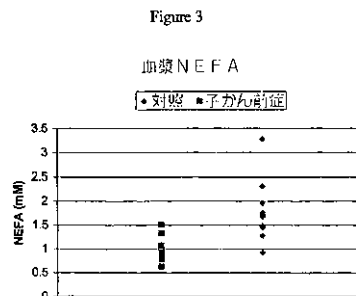
HDL濃度を掛けたT x P A - S比の商をT x P A - S単独に代えてプロットしたことを除いて、図9と同様のプロットを表す。血液サンプルのこのセットは米国以外の女性の群由来であった。HDLがこれらの女性の分類に明らかな貢献をする上記観察は、上記サンプルを集めた世界の地域の作用か又はT x P A - Sの計測についての新しい方法論のなくてはならない部分であるかのいずれかでありうる。

10

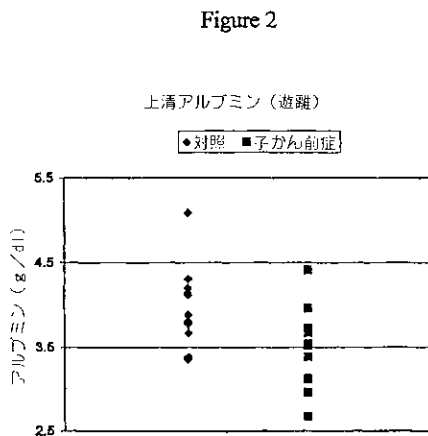
【図1】



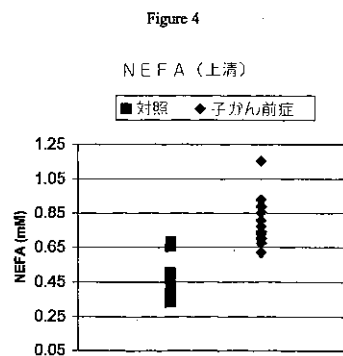
【図3】



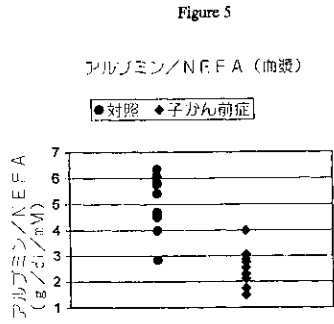
【図2】



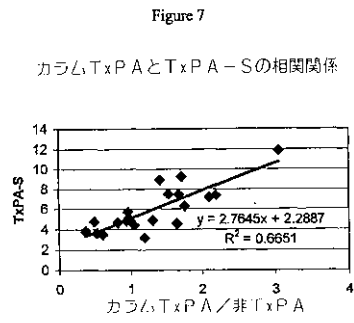
【図4】



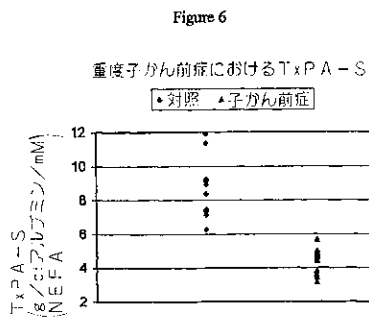
【 図 5 】



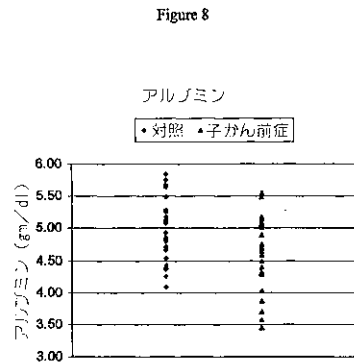
【 図 7 】



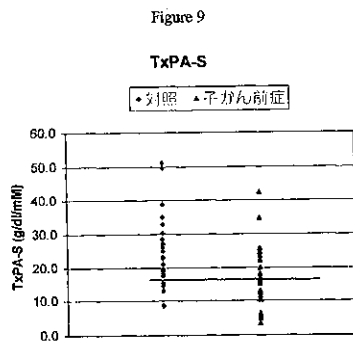
【 図 6 】



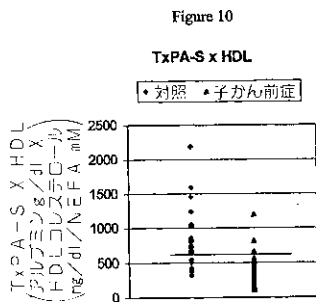
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
18 October 2001 (18.10.2001)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 01/77675 A2

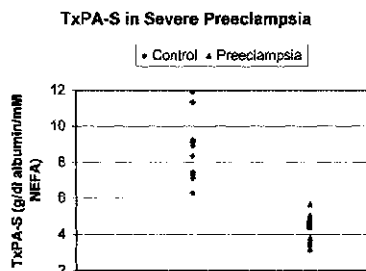
- (51) International Patent Classification: G01N 33/50
- (74) Agents: JOHNSTON, Susan, K., P.O. Box 4349, Johnson City, TN 37602-4449 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/07967
- (81) Designated States (national): AT, CA, CN, JP, MX.
- (22) International Filing Date: 13 March 2001 (13.03.2001)
- (84) Designated States (regional): Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 31 March 2000 (31.03.2000) (US 09/540,809)
- (71) Applicant: ARBOGAST PHARMACEUTICALS, INC. (US); 1316 Woodland Avenue, Johnson City, TN 37601 (US).
- (72) Inventor: ARBOGAST, Bradley, W.; 1316 Woodland Avenue, Johnson City, TN 37601 (US).

Published: — without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/77675 A2

(54) Title: METHOD FOR PREDICTION OF PREECLAMPSIA AND OTHER DISEASES



(57) Abstract: The invention disclosed is a process for determining the cytoprotective activity of plasma that prevents the destruction of endothelial cells and forestalls the development of a number of diseases such as atherosclerosis, preeclampsia, edema, nephrotic syndrome, and stroke. The present invention includes a method of diagnosing a patient's proclivity to develop a disease having a correlation to a reduction in the concentration of pl 5.6 albumin in the plasma by determining a value indicative of the concentration of the pl 5.6 albumin that is not bound to VLDL ("free pl 5.6 albumin") in the patient's blood serum. The preferred embodiment of the process utilizes *in vitro* methods to obtain an indicator of the free pl 5.6 albumin instead of directly measuring the concentration of the free pl

5.6 albumin. The preferred method comprises the steps of: (a) providing a plasma sample containing free albumin, triglycerides, very low density lipoproteins, low density lipoproteins, and non-esterified fatty acids bound to the free albumin; (b) determining the concentration of the free albumin; (c) determining the concentration of the non-esterified fatty acids bound to the free albumin; and (d) calculating a value indicative of the toxicity preventing ability of the plasma by comparing the concentration of the free albumin to the concentration of the non-esterified fatty acids bound to the free albumin. The present process does not provide direct measurement of the cytoprotective activity of plasma, but rather, an empirical value which has clinical relevance in identifying patients with a high chance of developing diseases inhibited by pl 5.6 albumin.

WO 01/77675

PCT/US01/07967

1

METHOD FOR THE PREDICTION OF  
PREECLAMPSIA AND OTHER DISEASES

## FIELD OF THE INVENTION

5 The present invention relates to methods for predicting and following illnesses. More particularly, the present invention relates to the diagnosis of preeclampsia and other diseases.

## BACKGROUND OF THE INVENTION

10 Vascular disease is often related to the composition of blood flowing therethrough. In particular, high concentrations of very low density lipoproteins (VLDL) in blood have a deleterious effect on vascular integrity. Very low density lipoproteins in blood tend to break down the inner vascular walls causing vascular diseases including preeclampsia, atherosclerosis, stroke, peripheral vascular disease, 15 diabetic vascular disease, and such.

Methods providing earlier detection of vascular diseases, and methods for diagnosing a patient's proclivity toward developing a vascular disease at a later point in his life are desirable so that such disease may be better controlled, or even avoided. The early detection of preeclampsia is particularly important.

20 Preeclampsia is a toxic vascular disease of particular interest. Preeclampsia develops in late pregnancy and is characterized by a sudden rise in blood pressure, excessive increase in weight, generalized edema, albuminuria, severe headaches, and visual disturbances. The blood vessels in a pregnant woman's uterus supplying blood to her placenta and fetus become restricted during preeclampsia, thereby delivering 25 reduced amounts of blood and oxygen to the fetus. Preeclampsia is linked to poor fetal growth and, in its most severe form, can be fatal to both the fetus and the mother.

Human blood's natural defense against the destructive effect of VLDL on Endothelial cells and Leukocytes has been quantified by an index or factor known as the "toxicity preventing activity" or "TxPA" of the blood. (Arbogast, B.W., and 30 Dreher, N.J. *Coronary Disease Prediction Using a New Atherogenic Index. Atherosclerosis*, Vol. 73 (1988) 259-267). (Chi, D.S., et al. *Decreased Lymphocyte Response in Streptozotocin Induced Diabetic Rats: A Function of Very Low Density*

*Lipoproteins. Diabetes* 31 (1982) 1098-1104). U.S. Patent 4,699,878 discloses that the TxPA of a blood sample can be estimated by comparison of the growth of a culture of cells treated with a toxic quantity of VLDL and varying amounts of the blood sample to the "zero" growth of a reference culture of cells which was treated with the same toxic quantity of VLDL and no blood.

5 The ratio of VLDL to TxPA determines the cytotoxicity of the blood *in vitro*. The ratio of VLDL to TxPA has also been effective in predicting vascular disease *in vitro*. The presence of or future development of preeclampsia can be predicted with a 90% accuracy using the ratio of VLDL to TxPA. (Arbogast, B.W., Leeper, S.C., Merrick, R.D., Olive, K.E. and Taylor, R.N. *Plasma Factors that Determine Endothelial Cell Lipid Toxicity in vitro Correctly Identify Women with Preeclampsia in Early and Late Pregnancy. Hypertension in Pregnancy* Vol. 15 (1996) 263- 279). Similar accuracy has been achieved with atherosclerosis. (Arbogast, B.W., Gill, L.R. and Schwertner, H.A. *A New Protective Factor in Coronary Artery Disease: Very-*

10 *Low-Density Lipoprotein Toxicity-Preventing Activity. Atherosclerosis* Vol. 57 (1985) 75-86). (Arbogast, B.W. and Dreher, N.J. *Coronary Disease Prediction Using a New Atherogenic Index. Atherosclerosis* Vol. 66 (1987) 55-62). The drawbacks of this cell culture method are that it is a relatively expensive assay and that it requires cell growth time. Also, the level of uncertainty is about 10%, undesirably high for a

15 20 medical assay.

Blood plasma contains components including albumin, non-esterified fatty acids (NEFA), and triglycerides which are carried in varying amounts on very low density lipoproteins (VLDL), low density lipoproteins (LDL), and high density lipoproteins (HDL). Human blood albumin exists as two species that may be separated by their electrophoretic migration to isoelectric points of pH 4.8 and pH 5.6.

25 (Basu, S.P., Rao, S.N. and Hartsuck, J.A. *Influence of Fatty Acid and Time of Focusing on the Isoelectric Focusing of Human Plasma Albumin. Biochim Biophys Acta*, Vol. 533 (1978) 66). It has been found that the toxicity preventing activity of human blood is mainly provided by pl 5.6 albumin. Arbogast disclosed that the pl 5.6

30 albumin species provides the protective effect against VLDL damage to vasculature endothelial cells and leukocytes. (Arbogast, B.W. *Purification and Identification of Very Low Density Lipoprotein Toxicity Preventing Activity. Atherosclerosis* Vol. 7

WO 01/77675

PCT/US01/07967

3

(1988) 259-267 and Chi, D.S., Berry, D.L., Dillon, K.A. and Arbogast, B.W.: *Decreased Lymphocyte Response in Streptozotocin Induced Diabetic Rats: A Function of Very Low Density Lipoproteins. Diabetes* 31: 1098-1104, 1982). Accordingly, the determination of the pI 5.6 albumin concentration in blood would be greatly beneficial in diagnosing vascular and leukocyte associated diseases.

The concentration of pI 5.6 albumin is not determinable from the total albumin concentration, due to the fact that the pI 5.6 and pI 4.8 albumin species exist in human plasma in unpredictable ratios. The TxPA of a sample of plasma can be determined by separating the pI 4.8 albumin from the pI 5.6 albumin via liquid column isoelectric focusing and determining the concentration of the pI 5.6 albumin fraction via absorbance spectrometry. The concentration of pI 5.6 albumin in plasma is then compared to a standard concentration known to indicate delineation between patients having been diagnosed with arterial disease and those not diagnosed with arterial disease. (Arbogast, B.W., Leeper, S.C., Merrick, R.D., Olive, K.E. and Taylor, R.N.: *Plasma Factors that Determine Endothelial Cell Lipid Toxicity in vitro Correctly Identify Women with Preeclampsia in Early and Late Pregnancy. Hypertension in Pregnancy* 15:263-279, 1996). The electrophoretic method disclosed by Arbogast is quite cumbersome and expensive for clinical operation. The degree of uncertainty of the electrophoresis method is about 10%.

In light of the above, it would be desirable to have a simpler process for diagnosing the presence of or the proclivity toward developing albumin-inhibited VLDL-sensitive diseases, including vascular and non-vascular diseases and conditions. A process not requiring cell culture growth or an isoelectric focusing separation would be more useful. It would be further desirable for such new diagnostic process to be more accurate than previous processes.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention is a process for determining the toxicity preventing ability of plasma against a disease having a correlation to a reduction in the concentration of pI 5.6 albumin in the plasma. The present process comprises the steps of:

WO 01/77675

PCT/US01/07967

4

- (a) providing a plasma sample containing free albumin, free non-esterified fatty acids, triglycerides, very low density lipoproteins, low density lipoproteins, and high density lipoproteins;
- (b) determining the concentration of the free albumin;
- 5 (c) determining the concentration of the free non-esterified fatty acids; and
- (d) calculating a value indicative of the toxicity preventing ability of the plasma by comparing the concentration of the free albumin to the concentration of the free non-esterified fatty acids. The preferred indicator value is a "TxPA-S ratio", calculated by
- 10 dividing the concentration of the free albumin by the concentration of the free non-esterified fatty acids.

The present invention further includes an assay kit useful for conducting the present process. The assay kit comprises the following:

- (a) a lipid-precipitating reagent;
- (b) a reagent that displays a color upon binding with albumin; and
- 15 (c) a reagent that displays a color upon binding with non-esterified fatty acids.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1 illustrates a plot showing the lack of diagnostic separation that occurs by comparing the plasma albumin concentration of severe preeclampsia patients and

20 control patients. Control patients are matched with preeclamptic patients on the basis of gestational age, maternal age and race.

FIG. 2 illustrates a plot similar to FIG. 1 except that the albumin concentration is the albumin found in the plasma supernatant after removing VLDL and LDL by precipitation and centrifugation.

FIG. 3 illustrates a plot showing that some diagnostic separation occurs by comparing the plasma NEFA concentration of severe preeclampsia patients and

25 control patients.

FIG. 4 illustrates a plot similar to FIG. 3 except that the NEFA concentration is the NEFA found in the plasma supernatant after precipitation of VLDL and LDL.

FIG. 5 illustrates a graph showing improved diagnostic separation between preeclampsia patients and control patients when a ratio of plasma albumin

30 concentration to plasma NEFA concentration is plotted.

WO 01/77675

PCT/US01/07967

5

FIG. 6 illustrates a graph showing further improved diagnostic separation between severe preeclampsia patients and control patients when a ratio of supernatant albumin concentration to supernatant NEFA concentration (TxPA-S ratio) is plotted.

5 FIG. 7 illustrates a linear correlation plot between the TxPA-S ratios (supernatant) and the column TxPA values (from plasma) measured on the same set of blood samples.

FIG. 8 illustrates a plot similar to FIG. 1, for blood samples taken from a different set of women having mild preeclampsia and a set of control women.

10 FIG. 9 illustrates a plot similar to FIG. 6, for blood samples taken from the same group of blood samples used in FIG. 8.

FIG. 10 illustrates a plot similar to FIG. 9, except that a quotient of TxPA-S ratio multiplied by the HDL concentration was plotted instead of TxPA-S alone. This set of blood samples was from a group of women who were outside of the United States. The observation that HDL has a significant contribution to the classification of these women can be either a function of the area of the world where the samples were  
15 collected or it may be an integral part of the new methodology for measuring TxPA-S.

#### DETAILED DISCLOSURE OF THE INVENTION

The applicant has discovered a new process for predicting the ability of plasma  
20 to prohibit deleterious cell injury from blood toxins, particularly against VLDL-cytotoxicity. The process of the present invention is based upon the applicant's discovery that the toxicity inhibiting ability of blood can be indicated by the particular pI 5.6 albumin that is not bound to VLDL. Albumin not bound to VLDL is referred to herein as "free albumin". While the Applicant has found that direct measurement of  
25 free pI 5.6 albumin provides an indication of the toxicity inhibiting activity under the present invention, such direct measurement would require separation of the pI 5.6 albumin from the pI 4.8 albumin as well as separating the free albumin from the VLDL-bound albumin. In an effort to find an alternative to a cumbersome electrophoretic focusing assay for separating pI 5.6 albumin from pI 4.8 albumin, the  
30 applicant has found that the concentration of free (total) albumin and the concentration of non-esterified fatty acids ("NEFA") bound to free albumin can be compared to provide a very good estimation of the concentration of free pI 5.6

WO 01/77675

PCT/US01/07967

6

albumin. This provides an easier process since both of these quantities are measurable by simple *in vitro* techniques. The applicant has found that a ratio of the concentration of free albumin to the concentration of NEFA bound to free albumin (referred to herein as "free NEFA") is an improved indicator of the ability of plasma to prohibit cell injury from blood toxins. However, other diagnostic values calculated largely based on the free albumin and free NEFA concentration are considered to be modifications of the present invention.

It should be noted that the diagnostic ratio determined by the present process is based upon different parameters than the TxPA value previously used to indicate the toxicity inhibiting ability of blood in U.S. Patent 4,699,878 or the isoelectric focusing method used to isolate pI 5.6 albumin. Accordingly, the two values are not comparable. In order to clearly distinguish the new toxicity inhibiting ability diagnostic ratio determined by the present invention from the TxPA value previously used in the art, the diagnostic ratio determined by the present invention is hereinafter referred to as the "TxPA-S ratio", with the "S" indicating that a plasma supernatant is assayed. Determination of the TxPA-S ratio and diagnosis based thereon, according to the present invention, provides an accurate indication of the potential for developing an albumin-inhibited disease using assay methods much simpler than electrophoresis and cell culturing.

The present invention includes a process for determining a TxPA-S ratio for blood and a method of making a medical diagnosis based on the TxPA-S ratio thus determined. The present process can be conducted by testing a sample of blood, serum, or plasma. Since blood is difficult to analyze due to coagulation, serum and plasma processed from whole blood are preferable. The specific type of assays used to conduct the process of the present invention will determine whether serum or plasma would be the most preferable blood form. Although plasma is the most preferred blood form for the present process, the term "plasma" is hereinafter used to indicate blood, serum, and/or plasma.

The most pertinent components of plasma assayed in the present invention are free albumin, NEFA having an acyl chain length of 6 to 20 carbons, triglycerides having an acyl chain length of 6 to 20 carbons, low density lipoproteins ("LDL"), very low density lipoproteins ("VLDL"), and high density lipoproteins ("HDL"). VLDL

WO 01/77675

PCT/US01/07967

7

have a density less than about 1.006 gm/ml. LDL have a density of about 1.006 to about 1.063 gm/ml. HDL have a density greater than about 1.063 gm/ml. The NEFA component is made up of VLDL-bound NEFA and NEFA not bound to VLDL. Since it has been found that the overwhelming majority of NEFA not bound to VLDL is free NEFA, the term "free NEFA" is hereinafter used interchangeably to refer to either

5 NEFA, the term "free NEFA" is hereinafter used interchangeably to refer to either type of NEFA entity, unless otherwise specified.

The present process comprises determining the concentration of free albumin (both pl 4.8 and pl 5.6 albumin) and the concentration of free NEFA in a plasma sample and calculating the TxPA-S ratio of the plasma by dividing the concentration of free albumin by the concentration of free NEFA. The concentration of free NEFA is preferably determined after removal of the VLDL from the plasma. The albumin concentration may be measured either as the total plasma albumin before the VLDL is removed or as the free albumin remaining after the removal of VLDL. However, a more accurate TxPA-S ratio is obtained using the free NEFA concentration and the free albumin concentration to calculate the TxPA-S ratio.

10

15

It is more preferable that the free albumin and free NEFA concentrations measured do not include albumin or NEFA bound to LDL. Accordingly, it is preferred that the LDL is removed from the plasma along with the VLDL. The TxPA-S ratio has been found to be accurate when the free albumin and free NEFA measured does not include LDL-bound entities.

20

After determining the TxPA-S ratio, the TxPA-S is preferably used to classify the toxicity preventing ability of the plasma for a particular albumin-inhibited toxic disease or condition by comparing the TxPA-S ratio to a standard TxPA-S for that specific disease. The standard TxPA-S is determined by conducting the process of the present invention on a statistically significant plurality of plasma samples having known potentials for the suspected albumin-inhibited disease or condition. The TxPA-S ratio determined for each of the plasma standards is categorized according to an independent medical diagnosis for the suspected albumin-inhibited disease. A positive diagnosis for the suspect albumin-inhibited disease is typically based on the actual development of the disease within a given period. A negative diagnosis for the albumin-inhibited disease is typically based upon the non-development of the disease over a given period. The standard may be a single benchmark TxPA-S ratio or,

25

30

WO 01/77675

PCT/US01/07967

8

preferably, a range of TxPA-S ratios indicative of a high potential for the albumin-inhibited disease. The most preferable standard is a pair of TxPA-S ratio ranges, with one of the ranges representing TxPA-S ratios indicating a high potential for the albumin-inhibited disease and the other range indicating a low potential for the same disease.

5 The process of the present invention provides an unexpectedly high amount of separation between such a pair of high and low potential TxPA-S ratio standard ranges. The TxPA-S standard ratios obtained from a sufficiently large population of plasma standards, most preferably aggregate into two essentially exclusive ranges, i.e.,  
10 no overlapping between the two ranges except for a statistically minor number of outliers.

Thus, the accuracy in diagnosis using the present process is higher than previous processes. A sample TxPA-S ratio falling within the higher standard range indicates that the patient has a significantly low potential for developing the suspected disease. A sample TxPA-S ratio falling within the lower standard range indicates that the patient has a significantly high potential for developing the disease. A test TxPA-S ratio falling between the two standard ranges would be indeterminate of the risk of development of the disease.

20 An even more accurate determination of a patient's proclivity toward developing an albumin-inhibited disease is made when the present process further comprises the step of measuring the total triglyceride concentration in the plasma and incorporating the triglyceride concentration into the diagnostic equation. The triglyceride concentration may be taken into consideration in determining the patient's disease potential by evaluating a plot of TxPA-S ratio versus triglyceride  
25 concentration. From such a plot, a linear equation separating the high disease potential plasma from the low disease potential plasma can be calculated. Diagnosis of a plasma sample can be easily made by entering both the TxPA-S ratio and the triglyceride concentration into the equation. The high and low disease-potential standard ranges are further narrowed and separated from each other when the  
30 triglyceride concentration effect is included in the diagnosis. However, the stark improvement in diagnosis accuracy using TxPA-S ratios instead of TxPA values is further evidenced by the fact that the triglyceride concentration has significantly less

of an effect on the amount of separation between diagnosis standard ranges based on TxPA-S ratios, compared to its effect on TxPA value standard ranges.

The diseases that may be diagnosed by the present process are diseases having a correlation to a reduction in the concentration of pl 5.6 albumin in the plasma. The process is especially useful in predicting vascular diseases caused by the breakdown of endothelial cells due to VLDL attack. The term "disease" is used herein to refer to diseases and other medically diagnosable conditions. Examples of such diseases are preeclampsia, atherosclerosis, stroke, nephrotic syndrome (kidney disease), peripheral vascular disease, and diabetic vascular disease. Examples of non-vascular diseases and conditions not recognized as vascular diseases but which have a correlation to the albumin concentration are cancer, mortality, morbidity, sepsis, shock and aging.

The particular methods used to remove the VLDL, measure free NEFA, and measure albumin are not critical. Various methods for conducting each step in the present process are known in the art. Examples of suitable methods and reagents are provided below, but should not be construed to be limiting on the scope of the present invention.

Even though the NEFA concentration of interest is the NEFA bound to free albumin, a determination of non-VLDL bound NEFA concentration has been found to be a useful approximation of the NEFA bound to free albumin, for the present process. Thus, any technique that provides differentiation between the VLDL-bound NEFA and the non-VLDL bound NEFA is suitable for determining the concentration of free NEFA. The VLDL-bound NEFA can be distinguished from the free NEFA after removing the VLDL from the plasma.

The VLDL may be removed from the plasma sample by a number of techniques. Examples of such separation means include any known techniques for removing LDL and/or VLDL, including ultracentrifugation, precipitation by sulfated glycans or phosphotungstic acid in the presence of divalent cations, immunoprecipitation, electrophoresis, isoelectric focusing, charge separation techniques such as ion exchange chromatography, size separation techniques such as gel filtration chromatography, and the like. The VLDL is most preferably removed from the plasma sample by way of precipitation, followed by filtration, siphoning or decantation of the supernatant from the precipitated solids.

WO 01/77675

PCT/US01/07967

10

The VLDL may be precipitated by use of a non-albumin binding lipid precipitating reagent. A preferred reagent includes a sulfated glycan such as dextran sulfate, and a divalent cation such as magnesium chloride. An example of a commercially available precipitating reagent useful for precipitating VLDL is the HDL-Cholesterol Precipitating Reagent comprised of dextran sulfate, magnesium chloride, sodium chloride, and polyethylene glycol, available commercially from RefLab Medical Analysis Systems, Inc. This preferred precipitating reagent is a mixture of dextran sulfate (0.2 mM), magnesium chloride (63.9 mM), sodium chloride (63.3 mM), and polyethylene glycol (3.3 mM). It is preferable to remove LDL from the plasma sample along with VLDL. LDL typically precipitates out of solution along with VLDL. The precipitated VLDL and LDL solids may be removed by known methods such as by centrifugation of the solution followed by decantation of the plasma supernatant. An alternative VLDL and LDL precipitation reagent is composed of 30.3 mM phosphotungstic acid and 100 mM magnesium chloride. This solution is mixed in a 1:5 sample to reagent ratio and the precipitated VLDL and LDL solids removed as stated above for the dextran-magnesium precipitation.

After removing the VLDL, the free NEFA concentration may be determined from the supernatant by any method known to determine fatty acid concentration. Examples of such methods are disclosed in U.S. Patents 4,071,413; 4,360, 591; 4,349,625; 4,301,244; and 4,229,538. Suitable methods of measuring NEFA concentration include titration, colorimetry, and radioisotope methods, with colorimetry being preferred. Appropriate solvent systems for extracting NEFA are disclosed by Dole, *V.P.J. Clin. Invest* Vol 35 (1956) 150. Extracted NEFA may be measured by titration with standard alkali to an acid-base indicator endpoint.

Radiochemical methods for determining NEFA concentration involve extracting the NEFA into the heptane phase of a Dove extract and freeing it of phospholipids. The extract is then labeled with radioactive  $^{63}\text{Ni}$  by mixing it with radioactive nickel nitrate. The upper, organic phase containing the nickel-fatty acid complex is thereafter assayed for radioactivity.  $^{60}\text{Co}$  can replace  $^{63}\text{Ni}$ , but is more hazardous because it is a gamma emitter.

Various methods of colorimetric determination of NEFA concentration are known in the art and may be conducted on NEFA extracted from the supernatant or on

the NEFA as it exists *in vitro* in the supernatant. Extraction methods are typically based on the formation of copper or cobalt salts and the extraction of the salt into a non-polar organic solvent where it is complexed with a chromogen dye for colorimetric measurement. Alternatively, and more preferably, the NEFA may be measured *in vitro* using an enzymatic colorimetric method. One such method involves treating the supernatant with acyl Coenzyme A synthetase in the presence of added adenosine triphosphate (ATP), magnesium cations and CoA, to form the thiol esters of CoA known as Acyl CoA as well as the by products adenosine monophosphate (AMP) and pyrophosphate (PPi). The Acyl CoA thereby produced is then oxidized with Acyl CoA Oxidase, with the generation of hydrogen peroxide. Hydrogen peroxide, in the presence of peroxidase, permits the oxidative condensation of 3-methyl-N-ethyl-N- $\beta$ -hydroxyethyl-aniline with 4-aminoantipyrine thus forming a purple-colored adduct. The concentration of NEFA in the supernatant may be determined from the optical density measured at a maximum absorbance of 550nm.

It has been found that ascorbic acid (Vitamin C) existing in plasma often causes significant interference in the determination of NEFA concentration when using this colorimetric assay. This is largely due to the biological role of ascorbic acid as an antioxidant and its ability to react with hydrogen peroxide. Therefore, when using this type of a colorimetric method to determine NEFA concentration, it is preferable to remove ascorbic acid from the plasma or the plasma supernatant prior to colorimetric determination of NEFA concentration. The addition of ascorbate oxidase (AOD) is a convenient way of removing ascorbic acid.

In the step of determining the albumin concentration, it is preferable that the albumin concentration determined is the concentration of free albumin. Accordingly, the albumin concentration is preferably measured from the plasma supernatant remaining after removal of VLDL more preferably after removed of both VLDL and LDL. Albumin concentration may be measured by known methods such as an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), immunoassay, radioimmunoassay (RIA), dye binding colorimetric analysis, and through measuring the amount of protein or amino acid after purification of the albumin using precipitation, electrophoresis, electrofocusing, gel filtration, ion exchange chromatography, affinity chromatography and such. A dye binding colorimetric assay is the preferred assay methodology for

WO 01/77675

PCT/US01/07967

12

determining albumin concentration since it is simpler and less time consuming than other procedures. In general, when a dye binds to a site on the albumin molecule it becomes detectable due to the difference in the pH environment on the albumin mass and in the solution. Examples of such colorimetric dye binding albumin assays are disclosed in U.S. Patents 5,182,214; 4,568,647; 3,873,272; 3,884,637; 5,194,390; 4,337,064; and 4,230,456. A preferred colorimetric assay for determining albumin concentration includes mixing about 1 to about 10 $\mu$ L of supernatant or plasma with about 50 to about 200  $\mu$ L of a 0.030 mmol/liter bromocresol green (pH 4.2) albumin reagent. The albumin concentration may be determined by measuring optical density at a maximum absorbance of 628 nm.

An alternative means of determining a value indicative of the free pI 5.6 albumin concentration comprises measuring the concentrations of albumin and NEFA bound to VLDL and subtracting those concentrations from the total concentrations of albumin and NEFA in serum, thereby obtaining a concentration of free albumin and a concentration of free NEFA. These concentrations could thus be used to calculate a TxPA-S value as provided above.

The TxPA-S ratio for a given sample of plasma is calculated according to the present invention by dividing the concentration of free albumin by the concentration of free NEFA. The concentration units used are not important, as long as the same units are used to obtain the TxPA-S ratio standard. For example, the TxPA-S value may be expressed as mg albumin/mg NEFA or absorbance albumin/absorbance NEFA or as a combination of the above units.

It should be understood that, although the preferred embodiment of the process which includes the determination of the TxPA-S ratio is described above, the present invention also includes a process wherein the actual concentration of the free pI 5.6 albumin, or else any other indicator of such, is determined and used as the value indicative of the toxicity preventing ability of blood for the particular disease. Such an embodiment of the present invention comprises the steps of providing a plasma sample as described above, determining an indication of the concentration of free pI 5.6 albumin in the plasma, and evaluating the toxicity preventing ability of the plasma against the disease by comparing the concentration of the free pI 5.6 albumin to a standard obtained by conducting each of said steps (a) and (b) on a plurality of plasma

samples, with each of the plurality of plasma samples being withdrawn from a patient having a known diagnosis for the presence of or the development of said disease. One skilled in the art would realize that the direct measurement of the concentration of free pi 5.6 albumin would not be as economically feasible as the measurement of free  
5 albumin and free NEFA due to the complexity of conducting electrophoretic focusing to separate the pi 5.6 albumin from the pi 4.8 albumin.

The preferred process of the present invention includes measuring the triglyceride concentration and factoring the level found into the diagnosis. The triglyceride concentration may be determined by conducting an enzymatic  
10 colorimetric endpoint assay.

The present invention further includes an assay kit which is a particular combination of reagents useful for conducting the preferred process of the present invention wherein VLDL are removed via precipitation prior to determining the concentration of NEFA and albumin remaining in the supernatant determined via  
15 colorimetric assays. The assay kit of the present invention includes a VLDL precipitating reagent, an albumin binding pH-sensitive dye, and an enzymatic fatty acid, a colorimetric reagent. The assay kit of the present invention preferably includes an ascorbic acid oxidizing agent such as ascorbate oxidase.

The assay kit also preferably includes a triglyceride enzymatic colorimetric endpoint reagent. A colorimetric reagent suitable for binding with and indicating triglyceride includes a compound and enzyme that work together to hydrolyze triglycerides to glycerol and fatty acids. Adenosine tri-phosphate (ATP) and glycerol are reacted with glycerokinase to form glycerol-1-phosphate and adenosine di-phosphate. Glycerol-1-phosphate (G-1-P) can be oxidized to produce hydrogen  
20 peroxide, which is measured similarly to the NEFA reagent. Alternatively, G-1-P can react with nicotine adenine di-nucleotide (NAD) to produce reduced nicotine adenine di-nucleotide (NADH). NADH then reduces a dye that changes color upon reduction forming formazan. Or in the preceding assay pyruvate can be added to NADH in the presence of lactate dehydrogenase and the resulting NAD can be determined using  
25 ultraviolet light. In an alternative method triglycerides are hydrolyzed with alcoholic KOH to form glycerol and free fatty acids. Glycerol and ATP then react in the presence of glycerokinase to form glycerol-1-phosphate and ADP. In the next step  
30

WO 01/77675

PCT/US01/07967

14

ADP combines with phosphoenol pyruvate in the presence of pyruvate kinase to form pyruvate and ATP. Pyruvate then reacts with NADH in the presence of lactic dehydrogenase to form lactate and NAD. NAD is then measured with ultraviolet light.

5 The VLDL precipitating reagent of the present diagnostic test kit preferably includes either dextran sulfate as the sulfated glycan and magnesium chloride as the divalent cation or phosphotungstic acid and magnesium chloride.

The pH-sensitive albumin binding dye is preferably selected from the group of dyes consisting of bromocresol green, bromocresol purple and the like. The preferred enzymatic fatty acid colorimetric reagent is a mixture including acyl coenzyme A  
10 synthetase, adenosine triphosphate, and coenzyme A. In regard to the various reagents in the kit of the present invention, a compound is herein considered to have displayed a color upon binding with a plasma entity when a color is displayed at any time due to a chemical reaction occurring on the plasma entity as a result of contacting the reagent  
15 with the plasma.

This invention can be further illustrated by the following examples, illustrating preferred embodiments thereof. However, it should be understood that these examples are included merely for purposes of illustration and are not intended to limit the scope of the invention unless otherwise specifically indicated.

20

#### EXAMPLES

In the following examples, blood samples were drawn from pregnant women who did not have preeclampsia at that time. The development of preeclampsia or lack of development of preeclampsia in these patients was confirmed at the end of the pregnancies. Examples 1-6 involve blood samples drawn from women having severe  
25 preeclampsia, defined as women who had late-pregnancy hypertension (an absolute blood pressure of at least 140/90 torr or a rise of at least 30 torr systolic or at least 15 torr diastolic over values in the first 20 weeks), proteinuria (at least 30 mg protein/dL urine in a catheterized specimen or at least 60 mg/dL in voided urine), and  
30 hyperuricemia (serum uric acid > 1 standard deviation above normal for gestational age) and did not carry to term. Examples 7-9 involve blood samples drawn from

WO 01/77675

PCT/US01/07967

15

women having mild preeclampsia, defined as having the same criteria as defined for severe preeclampsia, except they were able to carry their pregnancies to term.

The following reagents were used in the examples:

- 5 Precipitating reagent-  
 RefLab brand HDL-cholesterol precipitating reagent, available from Medical Analysis Systems, Inc, (USA), containing 0.2 mM dextran sulfate, 63.9 mM magnesium chloride, 63.3 mM sodium chloride, and 3.3 mM polyethylene glycol.
- 10 Albumin Binding Reagent-  
 Albumin assay kit available from Wako chemicals USA, Inc, contains a 0.2 mmole/L solution at pH 3.8 of bromocresol green in 50 mmole/L citrate buffer.
- NEFA binding reagent with ascorbic acid remover -  
 15 assay kit available from Wako Chemicals USA, Inc, Richmond, VA.  
 Reagent A was prepared for the purpose of oxidizing ascorbic acid and acetylating Co enzyme A for determination of NEFA. Reagent B was prepared for the purpose of oxidizing acyl CoA and generating hydrogen peroxide for determination of NEFA. The hydrogen peroxide then reacts with 3-methyl-N-ethyl-N-β-hydroxyethyl-aniline and 4-aminoantipyrine to form a purple color.
- 20
- Reagent A:
- |                                  |            |
|----------------------------------|------------|
| ACS (Acyl Coenzyme A Synthetase) | 3 U/vial   |
| AOD (Ascorbate Oxidase)          | 15 U/vial  |
| 25 CoA (Coenzyme A)              | 7 mg/vial  |
| ATP (Adenosine Triphosphate)     | 30 mg/vial |
| 4-Aminoantipyrine                | 3 mg/vial  |
- A 10 ml diluent (0.05 M phosphate buffer, pH 6.9, 3 mM magnesium chloride, surfactant and stabilizers) was added to each vial of reagent A to make working  
 30 Solution A.

WO 01/77675

PCT/US01/07967

16

## Reagent B:

ACOD (Acyl Coenzyme A Oxidase)	132 U/vial
POD (peroxidase)	150 U/vial
MEHA (3-methyl-N-ethyl-N-β-hydroxyethyl-aniline)	4 mg/vial

5 Working Solution B was prepared by diluting reagent B with 20 ml of phenoxyethanol (0.3% v/v) and a surfactant.

## Example 1 (comparison)-

10 Figure 1 illustrates the lack of diagnostic separation that occurred by simply measuring the total albumin concentration in plasma from 11 preeclamptic women and 11 matched controls.

## Example 2- (comparison)

15 The same process of measuring (total) albumin was conducted as in Example 1 on the same plasma samples, except that the VLDL was removed from the plasma prior to measuring the albumin concentration. The VLDL was precipitated from each plasma sample by combining 100 μL of the plasma and 100 μL of precipitating reagent in a centrifuge tube (either the 1:1 or 1:5 sample to reagent ratio is acceptable depending on the concentration of the reagent). The centrifuge tube was shaken on a  
20 vortex mixer to obtain thorough mixing and then centrifuged for 10 minutes at 3,000 rpm. The supernatant was decanted by pipetting into a clean test tube. The albumin concentration was determined using the resultant supernatant. The results are shown in Figure 2.

25 Comparison of the data shown in Figures 1 and 2 show that there is some improvement in separation of albumin concentration between the group of preeclamptic blood samples and the control blood samples when the VLDL component is removed prior to measuring albumin. There is less overlap in Figure 2 than in Figure 1. The mean albumin concentration for the control, patient blood samples is higher than the mean albumin concentration for the preeclamptic patient  
30 blood samples.

WO 01/77675

PCT/US01/07967

17

## Example 3- (comparison)

This example illustrates the separation of NEFA concentration between the 11 preeclamptic and 11 control patient blood samples of example 1. The plasma processed from the blood samples was tested for NEFA concentration (no removal of VLDL). To measure the NEFA concentration, five  $\mu\text{L}$  of plasma was pipetted into the well of a flat-bottomed microtiter plate. The working solution for reagent A was added, (70  $\mu\text{L}$ ) the solution mixed well and the plate incubated at 37°C for 10 minutes. The working solution for reagent B was then added (140  $\mu\text{L}$ ), the plate mixed well and incubated at 37°C for another 10 minutes. The optical density was measured at a wavelength of 550 nm on a microtiter plate reader. The absorbance from a water blank was subtracted and the concentration of NEFA was recorded as a proportion to the resulting absorbance as compared to a known standard.

The results are graphically shown in Figure 3.

## Example 4-

Example 4 illustrates the methods used to conduct the process of the present invention.

The 22 plasma samples were tested as in example 3, except that the VLDL was removed from the plasma to provide a bound albumin free supernatant prior to measuring NEFA concentration. The VLDL was precipitated from the plasma sample by combining 100  $\mu\text{L}$  of the plasma and 100  $\mu\text{L}$  of the precipitating reagent in a centrifuge tube. The centrifuge tube was shaken on a vortex mixer to obtain thorough mixing and then centrifuged for 10 minutes at 3,000 rpm. The supernatant was decanted by pipetting into a clean test tube. The NEFA concentration of the supernatant was measured according to the method used in example 3. The results are shown in Figure 4.

Comparison of the Figure 3 to Figure 4 illustrates that the concentration of NEFA in the patient samples is significantly separated between the preeclamptic samples and the control samples when the VLDL is first removed from the plasma. This indicates that a significant amount of the NEFA in plasma is bound to VLDL, in addition to being bound to albumin. Therefore, the removal of VLDL-bound NEFA

WO 01/77675

PCT/US01/07967

18

and VLDL-bound albumin allows for a more precise measurement of the concentration of NEFA bound to free albumin, which strongly correlates with the toxicity preventing ability of the blood.

5 Example 5-

Albumin to NEFA ratios were calculated for each of the 22 patient samples using the result of Examples 1-4. The ratio was first calculated by dividing the albumin concentration determined in example 1 (plasma sample) by the NEFA concentration determined in Example 3 (plasma sample). These results are plotted in  
10 Figure 5.

TxPA-S ratios were calculated according to the present invention for each of the 22 patient samples by dividing the albumin concentration determined in Example 2 (supernatant measured) by the NEFA concentration determined in Example 4 (supernatant measured). These results are plotted in Figure 6.

15 Comparison of Figures 5 and 6 illustrates the significant amount of separation gained by measuring both the albumin concentration and NEFA in the present process only after the VLDL has been removed. Figure 6 shows a complete separation between the preeclampsia samples and the control samples.

20 Analysis of the results shown in Figure 6 indicated that a TxPA-S ratio falling between about 1.17 and about 1.78 would indicate a normal risk of preeclampsia, with an approximately 100% degree of certainty. A TxPA-S ratio falling between about 0.63 and about 0.9 would indicate a high risk of preeclampsia, with an approximately 100 % degree of certainty. TxPA-S ratios falling between these two ranges would be indeterminate.

25 The plot shown in Figure 6 is an example of a TxPA-S ratio standard useful in diagnosis using the present process. For example, a single TxPA-S ratio cut-off value of 1.0 could be used to separate test TxPA-S ratios for diagnostic purposes, if desired. But the use of discreet ranges is more precise, especially with a larger population of reference samples to derive the TxPA-S standard ranges.

30

## Example 6-

The present example illustrates a previously used method of determining column TxPA and compares the results with TxPA-S. The (total) albumin concentration of plasma samples obtained from 11 pregnant female patients diagnosed for severe preeclampsia and 11 pregnant female patients matched for gestational age, maternal age and race was measured directly from an aliquot (10 :l) of the plasma (no removal of VLDL) by isoelectric focusing, according to the method disclosed by Arbogast in *Hypertension in Pregnancy* Vol. 15. Ten microliters of plasma is placed in a 10 ml sucrose density (5%-50%) gradient with 0.25 ml ampholine of pI 4-6.5. Current was applied for 18 hours and the column eluted into microtiter plates. One drop fractions were collected. Two hundred microliters of the albumin reagent is mixed with the eluted sample and the color measured at about 660nm.

The plot shown in Figure 7 illustrates the high correlation between the results shown in Figure 6 for the colorimetric determination of TxPA-S on supernatant aliquots according to the present invention versus the column method determination of TxPA on plasma aliquots from the same patient samples according to the method disclosed by Arbogast in *Hypertension in Pregnancy* Vol. 15. The correlation coefficient ( $R^2$ ) found between the two sets of results was 0.66. The variation of replicates is approximately 10% with the column TxPA method, whereas the present colorimetric method using supernatant has approximately a 2% variation.

Examples 7-9 illustrate use of the present process in women later diagnosed to have mild preeclampsia.

## Example 7 (Comparison)-

Figure 8 shows total serum albumin levels in 25 preeclamptic and 25 control women in the third trimester of pregnancy obtained by conducting the same method used in Example 1. As can be seen, a number of the preeclamptic women have total albumin levels (< 4 g/dl) below the standard range of the controls. There is, however, significant overlap between the groups which makes total serum albumin levels unsatisfactory for predicting preeclampsia.

## Example 8-

The TxPA-S ratio of the same 50 blood samples assayed in Example 7 were determined via the same procedure used in Example 5. Figure 9 shows that the TxPA-S determined for these same two groups of women resulted in a better separation of the groups than did the measurement of total serum albumin levels in Example 7. Using the horizontal line shown in Fig. 9 as a diagnostic benchmark, 76% (19 of 25) of the controls can be separated from 68% (17 of 25) of the preeclampsics. This is a marked improvement over Example 7.

## 10 Example 9-

In the present Example, the TxPA-S data determined in Example 8 was further evaluated by multiplying each TxPA-S ratio by the concentration of HDL in the supernatant (after removal of VLDL and LDL). The HDL cholesterol concentration was measured on the supernatant after precipitation of VLDL and LDL using phosphotungstate acid, as disclosed in Lopes-Virella MF, Stone P, Ellis S, Colwell JA. *Cholesterol Determination in High Density Lipoproteins Separated by Three Different Methods. Clin Chem* 23:882-6 (1977), and Allain CA, Poon LS, Chan CSG, Richmond W, Fu PC. *Enzymatic Determination of Total Serum Cholesterol. Clin Chem* 20:470-5 (1974), incorporated herein.

20 Figure 10 shows the further improvement gained by incorporating the level of HDL into the equation. In this instance 76% (19 of 25) of the Control women are separated from 88% (22 of 25) of the Preeclamptic women.

25 Although the present invention has been described in terms of the presently preferred embodiment in the specification and in the examples, it is to be understood that such disclosure is not to be interpreted as limiting to the invention described herein. No doubt that after reading the disclosure, various alterations and modifications will become apparent to those skilled in the art to which the invention pertains. It is intended that the appended claims be interpreted as covering all such alterations and modifications as fall within the spirit and scope of the invention.

30

WO 01/77675

PCT/US01/07967

21

## WHAT IS CLAIMED IS:

1. A process for determining the toxicity preventing ability of plasma against a disease having a correlation to a reduction in the concentration of pl 5.6 albumin in the plasma, said process comprising the steps of :
  - 5 (a) providing a plasma sample containing free albumin, free non-esterified fatty acids having an acyl chain length of 6 to 20 carbons, triglycerides having acyl chain lengths of 6 to 20 carbons, very low density lipoproteins, low density lipoproteins, and high density lipoproteins;
  - 10 (b) determining the concentration of the free albumin;
  - (c) determining the concentration of the free non-esterified fatty acids; and
  - (d) calculating a value indicative of the toxicity preventing ability of the plasma by comparing the concentration of the free albumin to the concentration of the free non-esterified fatty acids.
- 15 2. The process according to claim 1 wherein said calculating step comprises dividing the concentration of the free albumin by the concentration of the free non-esterified fatty acids, whereby providing a TxPA-S ratio as the indicative value.
- 20 3. The process of claim 1 wherein said step of determining the concentration of the free non-esterified fatty acids is conducted after a step of removing the very low density lipoproteins from the plasma sample.
- 25 4. The process according to claim 3 wherein said step of determining the concentration of the free albumin is conducted after said removing step of removing the very low density lipoproteins from the plasma sample.
- 30 5. The process according to claim 3 wherein said step of removing the low density lipoproteins further comprises removing the low density lipoproteins from the plasma sample.

WO 01/77675

PCT/US01/07967

22

6. The process according to claim 1 further comprising a step of determining the concentration of the triglycerides and HDL, further wherein said calculating step (d) includes factoring the concentration of the triglycerides and HDL into the calculation of the value.
- 5
7. The process according to claims 1 and 6 further comprising a step (e) of evaluating the toxicity preventing ability of the plasma against said disease including comparing the value calculated in said step (d) to a standard determined by conducting each of said steps on a plurality of plasma samples, with each of the plurality of
- 10 plasma samples being withdrawn from a patient having a known diagnosis for the presence of or the development of said disease.
5. The process according to claim 1 further comprising diagnosing the toxicity preventing ability of said plasma by comparing diagnostic factors including said
- 15 TxPA-S value to a standard determined by conducting the process of claim 1 on a plurality of plasma samples having a known toxicity preventing ability for an albumin inhibited disease.
8. The process according to claim 7 wherein said standard is a single value, a
- 20 single range of values, or a plurality of ranges of values.
9. The process according to claim 8 wherein said plurality of ranges are essentially exclusive of each other.
- 25 10. The process according to claim 1 wherein said disease is preeclampsia, atherosclerosis, stroke, peripheral vascular disease, diabetic vascular disease, nephrotic syndrome, sepsis, shock, cancer, aging, mortality, or morbidity.
- 30 11. The process according to claim 1 wherein said step (a) is conducted by way of precipitation, said step (b) is conducted by performing a colorimetric dye binding assay, ELISA, or a radioimmunoassay, said step (c) is conducted by performing a

WO 01/77675

PCT/US01/07967

23

titration assay, a radioisotope assay or a colorimetric assay including an enzymatic colorimetric assay.

12. The process according to claim 1 wherein said plasma sample contains  
5 ascorbic acid and said step of determining the concentration of the free non-esterified fatty acids is conducted after a step of removing the ascorbic acid from said plasma sample.
13. A process for determining the toxicity preventing ability of plasma against a  
10 disease having a correlation to a reduction in the concentration of pl 5.6 albumin in the plasma, said process comprising the steps of :
- (a) providing a plasma sample comprising a concentration of total free albumin including a concentration of free pl 5.6 albumin and a concentration of free pl 4.8  
15 albumin, triglycerides having acyl chains having from 6 to 20 carbons, very low density lipoproteins, low density lipoproteins, high density lipoproteins, and non-esterified fatty acids bound to the total free albumin, said non-esterified fatty acids having an acyl chain length of 6 to 20 carbons;
- (b) determining a value indicative of the concentration of the free pl 5.6 albumin; and  
20 (c) evaluating the toxicity preventing ability of the plasma against said disease by comparing the value to a standard value obtained by conducting each of said steps (a) and (b) on a plurality of plasma samples, with each of the plurality of plasma samples being withdrawn from a patient having a known diagnosis for the disease.
14. The process according to claim 13 wherein said determining step (b) is  
25 conducted by determining the concentration of the total free albumin and determining the concentration of the non-esterified fatty acids bound to the total free albumin, and calculating the value by comparing the concentration of the total free albumin to the concentration of the non-esterified fatty acids bound to the total free albumin.
- 30 15. The process according to claim 13 wherein the value determined in said step (b) is the concentration of the free pl 5.6 albumin in the plasma, wherein said step (b) comprises removing the VLDL and the pl 4.8 albumin from the plasma to provide a

WO 01/77675

PCT/US01/07967

24

plasma supernatant, and thereafter measuring the concentration of the albumin remaining in the supernatant.

- 5 16. The process according to claim 13 wherein said disease is preeclampsia, atherosclerosis, stroke, peripheral vascular disease, diabetic vascular disease, nephrotic syndrome, sepsis, shock, cancer, aging, mortality, or morbidity.
- 10 17. An assay kit useful for determining the toxicity preventing ability of blood comprising:  
(a) a lipid-precipitating reagent;  
(b) a reagent that displays a color upon binding with pI 5.6 albumin but does not display the color upon binding with pI 4.8 albumin; and  
(c) a reagent that displays a color upon binding with a non-esterified fatty acid.
- 15 18. The assay kit according to claim 17 wherein said reagent (a) includes a sulfated glycan selected from the group consisting of dextran sulfate, heparin, chondroitin sulfates A & B, heparin sulfate, and combinations thereof, and a divalent cation salt selected from the group consisting of magnesium, calcium, and combinations thereof;  
20 said reagent (b) is selected from the group consisting of bromocresol green, bromocresol purple and a combination thereof; and  
said reagent (c) is a mixture containing compounds selected from the group consisting of acyl coenzyme A synthetase, adenosine triphosphate, and coenzyme A, and combinations thereof.
- 25 19. The assay kit according to claim 17 further including an ascorbic acid oxidizing enzyme such as ascorbate oxidase or other ascorbate oxidizing enzyme and combinations thereof.

Figure 1

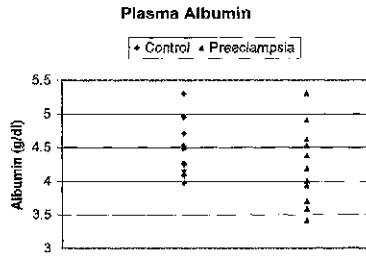


Figure 2

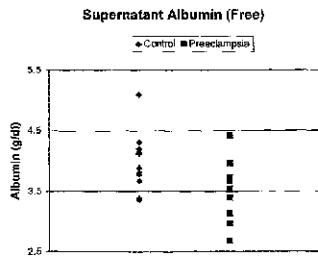


Figure 3

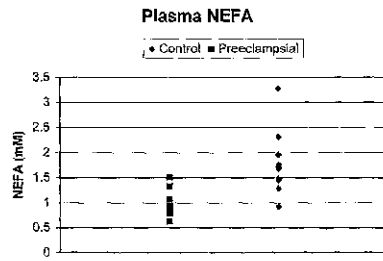


Figure 4

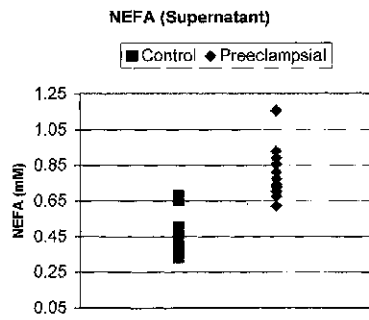


Figure 5

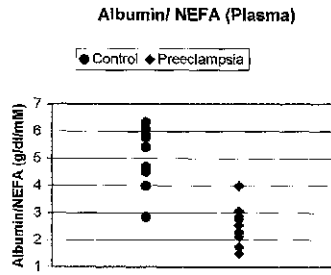


Figure 6

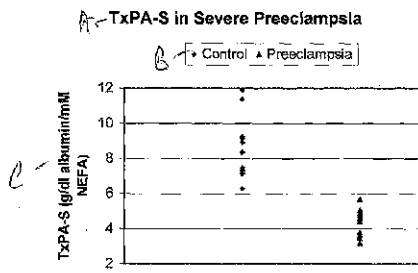


Figure 7

Correlation of Column TxPA with TxPA-S

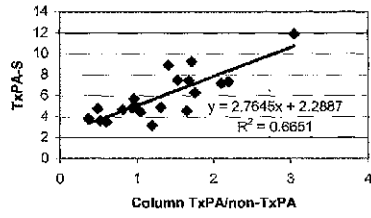
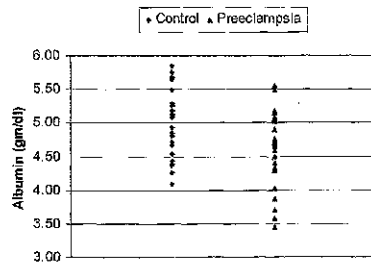


Figure 8

Albumin



WO 01/77675

5/5

PCT/US01/07967

Figure 9

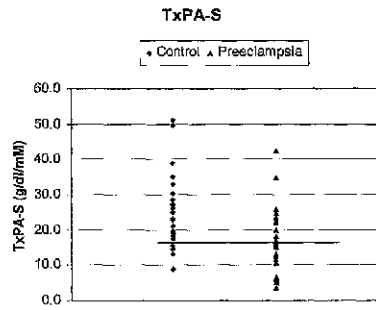
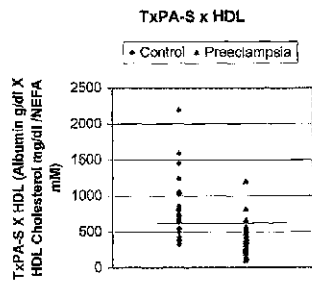


Figure 10



【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
18 October 2001 (18.10.2001)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 01/77675 A3

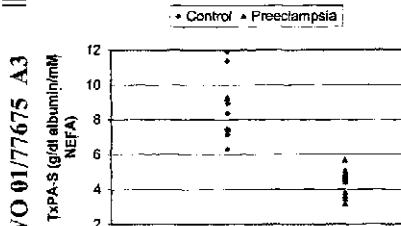
- (51) International Patent Classification: G01N 33/68. (74) Agent: JOHNSTON, Susan, F.; P.O. Box 4449, Johnson City, TN 37602-4449 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/07967 (81) Designated States (national): AT, CA, CN, JP, MX.
- (22) International Filing Date: 13 March 2001 (13.03.2001) (84) Designated States (regional): Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 31 March 2000 (31.03.2000) US — with international search report  
09/540,809
- (71) Applicant: ARBOGAST PHARMACEUTICALS, INC. (US), 1316 Woodland Avenue, Johnson City, TN 37601 (US).
- (85) Date of publication of the international search report: 7 March 2002
- (72) Inventor: ARBOGAST, Bradley, W., 1316 Woodland Avenue, Johnson City, TN 37601 (US).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



(54) Title: METHOD FOR THE PREDICTION OF PREECLAMPSIA AND OTHER DISEASES

TxPA-S in Severe Preeclampsia



(57) Abstract: The invention disclosed is a process for determining the cytoprotective activity of plasma that prevents the destruction of endothelial cells and forestalls the development of a number of diseases such as atherosclerosis, preeclampsia, edema, nephrotic syndrome, and stroke. The present invention includes a method of diagnosing a patient's proclivity to develop a disease having a correlation to a reduction in the concentration of pI 5.6 albumin in the plasma by determining a value indicative of the concentration of the pI 5.6 albumin that is not bound to VLDL ("free pI 5.6 albumin") in the patient's blood serum. The preferred embodiment of the process utilizes *in vitro* methods to obtain an indicator of the free pI 5.6 albumin instead of directly measuring the concentration of the free pI 5.6 albumin.

WO 01/77675 A3

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PL/US 01/07967

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 G01N33/68 G01N33/92		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Keyword(s) document(s) searched (classification system) followed by classification system(s) IPC 7 G01N		
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 used, where practical, search terms used) BIOSIS, EPD-Internal, MEDLINE, WPI Data, PAJ		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category <sup>1</sup>	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Hubward to claim No.	
X	WO 90 00365 A (UNIV TENNESSEE EAST) 25 January 1990 (1990-01-25) page 3, line 1 -page 4, line 6; claims 1,4-6	13, 15, 16
X	ARBOGAST BRADLEY W ET AL: "Plasma factors that determine endothelial cell leptid toxicity in vitro correctly identify women with preeclampsia in early and late pregnancy" HYPERTENSION IN PREGNANCY, vol. 15, no. 3, 1996, pages 263-279, XP001041009 cited in the application page 266; figures 1,4 --- -/--	13, 15-19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are cited in the continuation of this report		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art when as are considered to be of particular relevance. "C" earlier document that published on or after the international filing date. "I" document which may throw doubt on priority claims or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified). "O" document relating 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 which is considered 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 latest completion of the international search: 19 November 2001		Date of mailing of the international search report: 28/11/2001
Name and mailing address of the ISA: European Patent Office, P.O. Box 5818, Patentstr. 2 CH - 2000 Nyon, Switzerland Tel. (+31) (0) 341-9440, Ex. 31 421 430 int. Fax: (+31) (0) 341-9410		Authorized officer: Gunster, M

2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.  
 PCT/US 01/07967

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Category of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VIGNE JEAN-LOUIS ET AL: "Elevated nonesterified fatty acid concentrations in severe preeclampsia shift the isoelectric characteristics of plasma albumin." JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY & METABOLISM, vol. 82, no. 11, November 1997 (1997-11), pages 3786-3792, XP001041043 ISSN: 0021-972X page 3787, column 1, line 50 -column 2, line 5; figure 2 ---	13,15-19
A	ARBOGAST BRADLEY W ET AL: "Which plasma factors bring about disturbance of endothelial function in pre-eclampsia?" LANCET (NORTH AMERICAN EDITION), vol. 343, no. 8893, 1994, pages 340-341, XP001039993 ISSN: 0099-5355 the whole document ---	1-19
A	ENDRESEN M J ET AL: "INCREASED LIPOLYTIC ACTIVITY AND HIGH RATIO OF FREE FATTY ACIDS TO ALBUMIN IN SERA FROM WOMEN WITH PREECLAMPSIA LEADS TO TRIGLYCERIDE ACCUMULATION IN CULTURED ENDOTHELIAL CELLS" AMERICAN JOURNAL OF OBSTETRICS AND GYNECOLOGY, vol. 167, no. 2, 1992, pages 440-447, XP001040995 ISSN: 0002-9378 the whole document ---	1-19
A	FRAYN KEITH N ET AL: "Are increased plasma non-esterified fatty acid concentrations a risk marker for coronary heart disease and other chronic heart diseases?" CLINICAL SCIENCE, vol. 90, 1996, pages 243-253, XP001041143 London the whole document --- -/---	1-19

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PL./US 01/07967

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Caption of document, with indication, where appropriate, of the relevant passage	Relevant to claim No.
A	MASUO KAZUKO ET AL: "Nonesterified fatty acids (NEFAs) and triglyceride levels are the predictors of blood pressure elevation." JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY, vol. 33, no. 2 SUPPL. A, February 1999 (1999-02), page 272A XPO01041069 48th Annual Scientific Session of the American College of Cardiology; New Orleans, Louisiana, USA; March 7-10, 1999 ISSN: 0735-1097 abstract	1-19
A	EGAN B M ET AL: "Vascular effects of non-esterified fatty acids: Implications for the cardiovascular risk factor cluster." PROSTAGLANDINS LEUKOTRIENES AND ESSENTIAL FATTY ACIDS, vol. 60, no. 5-6, May 1999 (1999-05), pages 411-420, XPO01040974 ISSN: 0952-3278 the whole document	1-19
A	US 5 094 943 A (ROEDER ALBERT ET AL) 10 March 1992 (1992-03-10) column 4, line 49 - line 68	12,19

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
 information on patent family members

International Application No.  
 PCT/US 01/07967

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9000365	A	25-01-1990	AU 3973589 A 05-02-1990
			EP 0380633 A1 08-08-1990
			JP 3504092 T 12-09-1991
			WO 9000365 A1 25-01-1990
US 5094943	A	10-03-1992	DE 3446637 A1 03-07-1986
			AT 40835 T 15-03-1989
			DE 3568288 D1 23-03-1989
			EP 0186134 A1 02-07-1986
			ES 550288 D0 16-02-1987
			ES 8703162 A1 16-04-1987
			JP 5077399 B 26-10-1993
			JP 61146196 A 03-07-1986

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/52	G 0 1 N 33/52	A
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/92	G 0 1 N 33/92	C
	G 0 1 N 33/92	Z

(74)代理人 100081330

弁理士 樋口 外治

(72)発明者 アーボガスト, ブラッドリー ダブリュ.

アメリカ合衆国, テネシー 3 7 6 0 1, ジョンソン シティ, ウッドランド アベニュー 1 3 1  
6

F ターム(参考) 2G045 AA13 AA25 CA25 CA26 DA02 DA36 DA63 DA70 DA77  
4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ70 QQ73 QQ79 QR02 QR03 QR20 QR41  
QR42 QR43 QR54 QR65 QR66 QS13 QS36 QX01

专利名称(译)	预测先兆子痫和其他疾病的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004500581A</a>	公开(公告)日	2004-01-08
申请号	JP2001574480	申请日	2001-03-13
申请(专利权)人(译)	Abogasuto制药股份有限公司雷开球德		
[标]发明人	アーボガストブラッドリーダブリュ		
发明人	アーボガスト,ブラッドリー ダブリュ.		
IPC分类号	G01N33/66 C12Q1/26 C12Q1/28 C12Q1/527 G01N33/50 G01N33/52 G01N33/53 G01N33/68 G01N33/92		
CPC分类号	G01N33/6842 G01N33/68 G01N33/92 G01N2333/76 Y10T436/106664		
FI分类号	G01N33/66 C12Q1/26 C12Q1/28 C12Q1/527 G01N33/50.D G01N33/52.A G01N33/53.D G01N33/92.C G01N33/92.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA02 2G045/DA36 2G045/DA63 2G045/DA70 2G045/DA77 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ70 4B063/QQ73 4B063/QQ79 4B063/QR02 4B063/QR03 4B063/QR20 4B063/QR41 4B063/QR42 4B063/QR43 4B063/QR54 4B063/QR65 4B063/QR66 4B063/QS13 4B063/QS36 4B063/QX01		
代理人(译)	石田 敬 西山雅也		
优先权	09/540809 2000-03-31 US		
其他公开文献	JP4813736B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

公开的本发明是为了防止内皮细胞的破坏，和一些疾病如动脉粥样硬化，先兆子痫，水肿，肾病综合征和中风在避免血浆细胞保护活性开发（中风）这是一种测量方法。本发明没有在患者的血清白蛋白pI5.6（“自由Pi5的绑定到VLDL。6白蛋白”）来确定患者倾向于与该血浆中pI 5.6白蛋白浓度降低相关的趋势。上述方法的优选实施方案的特征在于游离的pI 5.6白蛋白浓度被游离的pI 5代替。它用于体外方法以获得6种白蛋白的指示剂。

TxPA-S in Severe Preeclampsia

