

(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2006-510896

(P2006-510896A)

(43) 公表日 平成18年3月30日(2006.3.30)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/573 (2006.01)	GO 1 N 33/573 A	2GO45
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/78 Z	2GO54
GO 1 N 30/88 (2006.01)	GO 1 N 30/88 J	4BO63
GO 1 N 33/49 (2006.01)	GO 1 N 33/49 Z	
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531 B	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 74 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-561673 (P2004-561673)  
 (86) (22) 出願日 平成15年12月22日 (2003.12.22)  
 (85) 翻訳文提出日 平成17年7月26日 (2005.7.26)  
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2003/005612  
 (87) 国際公開番号 W02004/057343  
 (87) 国際公開日 平成16年7月8日 (2004.7.8)  
 (31) 優先権主張番号 0229837.0  
 (32) 優先日 平成14年12月20日 (2002.12.20)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)  
 (31) 優先権主張番号 0229835.4  
 (32) 優先日 平成14年12月20日 (2002.12.20)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)  
 (31) 優先権主張番号 0229832.1  
 (32) 優先日 平成14年12月20日 (2002.12.20)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 505233192  
 アクシス—シールド ダイアグノスティック  
 クス リミテッド  
 英国, ダンディ ディーディー2 1エッ  
 クスエー, ザ テクノロジー パーク  
 (74) 代理人 100068618  
 弁理士 萼 経夫  
 (74) 代理人 100104145  
 弁理士 宮崎 嘉夫  
 (74) 代理人 100080908  
 弁理士 館石 光雄  
 (74) 代理人 100093193  
 弁理士 中村 壽夫  
 (74) 代理人 100104385  
 弁理士 加藤 勉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 X I I A 因子の変異体

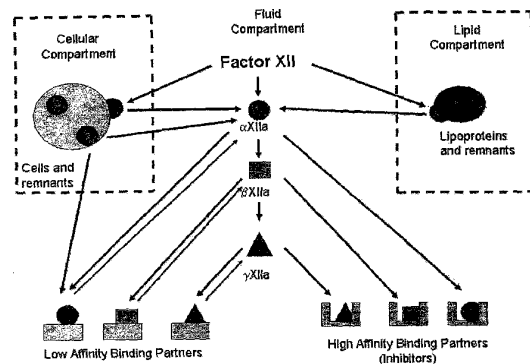
(57) 【要約】

【課題】 X I I A 因子の変異体

【解決手段】

X I I A 因子 (活性化された X I I 因子) は血中でさまざまな形態で存在する。

異なる形態の測定は、病気若しくは疾患を持っているかまたは持っていると思われる被験者の、診断、モニタリング、又は病気若しくは疾患の罹病性、進行、または転帰、または病気若しくは疾患の治療の予測に関する情報を提供する。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

試料中の一種以上の X I I a 因子形態を検出又は測定する方法であって、該方法は、他の X I I a 因子形態群に優先して、研究中の X I I a 因子形態若しくは形態群の検出又は測定を可能にする手順を実施することからなる方法。

**【請求項 2】**

他の X I I a 因子形態群に優先して、研究中の X I I a 因子形態若しくは形態群の測定を可能とする分析手法を用いて、研究中の X I I a 因子形態若しくは形態群を検出又は測定することからなる、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

他の X I I a 因子形態群から研究中の X I I a 因子形態若しくは形態群を分離すること、及び、分離された X I I a 因子形態若しくは形態群を検出又は測定することからなる、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 4】**

分離された X I I a 因子形態若しくは形態群の検出又は測定は、請求項 2 で定義された分析の手法からなる、請求項 3 に記載の方法。

**【請求項 5】**

研究中の X I I a 因子形態若しくは形態群に結合が可能でありならびに所望により他の X I I a 因子形態群にも結合できる標識化抗体と試料を接触させること、他の形態から研究中の X I I a 因子形態若しくは形態群を分離すること、及び研究中の X I I a 因子形態若しくは形態群を検出又は測定することからなる、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 6】**

研究中の X I I a 因子形態若しくは形態群は、物理的、化学的又はその免疫学的特性に基づいて、他の X I I a 因子形態群から分離される、請求項 3 ないし 5 のうちいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 7】**

研究中の X I I a 因子形態若しくは形態群は、クロマトグラフィー、フローサイトメトリー、又は超遠心分離の手順によって他の X I I a 因子形態群から分離され、所望により分離した物質の酵素活性又は免疫学的特性の評価を追従させる、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 8】**

研究中の X I I a 因子形態若しくは形態群は、研究中の X I I a 因子形態若しくは形態群に結合可能な抗体を用いた免疫親和性クロマトグラフィーによって分離され、所望により分離した物質の酵素活性又は免疫学的特性の評価を追従させる、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 9】**

分離手順は X I I a 因子形態若しくは形態群が分裂されない状況下で実施される、請求項 7 又は請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 10】**

試料は体液又は体組織の試料である、請求項 1 ないし 9 のうちいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 11】**

体液は血液、血漿、又は血清である、請求項 10 に記載の方法。

**【請求項 12】**

体液は、尿、脳脊髄液、唾液又は涙液である、請求項 10 に記載の方法。

**【請求項 13】**

研究中の X I I a 因子形態は細胞性 X I I a 因子である、請求項 1 ないし 12 のうちいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 14】**

研究中の X I I a 因子形態は細胞性 X I I a 因子であり、該細胞性 X I I a 因子は、体液の液相又は組織から細胞、細胞残片、ならびに / 又は細胞物質を分離することによって、他の X I I a 因子形態群から分離される、請求項 3 ないし 12 のうちいずれか一項に記載

10

20

30

40

50

の方法。

【請求項 15】

細胞、細胞残片、ならびに / 又は細胞物質は遠心分離によって分離される、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

細胞性 X I I a 因子は、X I I a 因子の検出又は測定の前に、他の X I I a 因子形態群から分離される、請求項 13 ないし 15 のうちいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

研究中の X I I a 因子形態は脂質結合 X I I a 因子である、請求項 1 ないし 12 のうちいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 18】

研究中の X I I a 因子形態は脂質結合 X I I a 因子であり、該脂質結合 X I I a 因子は、体液又は組織から脂質画分を単離することによって、非脂質結合 X I I a 因子から分離される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

脂質画分はリポタンパク質ならびに / 又はその残片からなる、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

脂質画分はリポタンパク質沈殿剤を用いて沈殿させる、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

脂質結合 X I I a 因子は、脂質結合 X I I a 因子が他の X I I a 因子形態群から分離される前に標識化抗体と接触される、請求項 17 ないし 20 のうちいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 22】

研究中の X I I a の形態若しくは形態群は、二個以上の X I I a 因子、低親和性結合パートナーと会合した X I I a 因子、ならびに高親和性結合パートナーと会合した X I I a 因子からなる一種以上の複合体である、請求項 1 ないし 12 のうちいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

検出又は測定は、研究中の X I I a 因子形態若しくは形態群が分裂されない状況下で実施される、請求項 1 ないし 22 のうちいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 24】

分離段階は、研究中の X I I a 因子形態若しくは形態群が分裂されない状況下で実施される、請求項 1 ないし 23 のうちいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

X I I a 因子形態若しくは形態群は免疫検定法を用いて検出又は測定される、請求項 1 ないし 24 のうちいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

分析は、他の X I I a 因子形態群に対し、優先的に研究中の X I I a 因子形態若しくは形態群を検出又は測定できる免疫検定法である、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

分析は、研究中の X I I a 因子形態若しくは形態群に結合できる抗体の使用からなる、請求項 26 に記載の方法。

40

【請求項 28】

抗体は m A b 2 / 2 1 5 又はその類似体、m A b 2 0 1 / 9 又はその類似体、又は X I I a 因子に結合できるポリクローナル抗体である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

抗体は直接的又は間接的に測定できる標識にて標識化されたものである、請求項 27 又は請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

抗体は放射能標識化されたものである、請求項 29 に記載の方法。

50

## 【請求項 3 1】

結果として生じた抗原 - 抗体複合体は直接的に検出又は測定される、請求項 2 5 ないし 3 0 のうちいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 3 2】

結果として生じた抗体 抗原複合体はフローサイトメトリー、表面プラズモン共鳴、表面弾性波手法、又は水晶振動子微量天秤法によって検出される、請求項 2 5 ないし 3 1 のうちいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 3 3】

試料は組織試料であり、ならびに研究中の X I I a 因子形態若しくは形態群は免疫組織学によって検出又は測定される、請求項 2 5 ないし 3 2 のうちいずれか一項に記載の方法。

10

## 【請求項 3 4】

抗体は捕獲抗体として固相に固定化される、請求項 5 に従属する場合を除く請求項 2 7 に記載の方法。

## 【請求項 3 5】

捕獲抗体として固相に固定化された抗体は、m A b 2 / 2 1 5 又はその類似体、m A b 2 0 1 / 9 又はその類似体、又は X I I a 因子に結合できるポリクローナル抗体である、請求項 3 4 に記載の方法。

## 【請求項 3 6】

捕獲抗体は m A b 2 / 2 1 5 又はその類似体である、請求項 3 5 に記載の方法。

## 【請求項 3 7】

捕獲抗体は m A b 2 0 1 / 9 又はその類似体である、請求項 3 5 に記載の方法。

20

## 【請求項 3 8】

固相は試料と接触され、ならびに、結果として生じた抗原 - 抗体複合体はどれでも、請求項 2 8 又は請求項 2 9 で定義された標識化抗体を用いて検出又は測定される、請求項 3 4 ないし 3 7 のうちいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 3 9】

標識化抗体は m A b 2 / 2 1 5 又はその類似体、m A b 2 0 1 / 9 又はその類似体、又は X I I a 因子に結合できるポリクローナル抗体である、請求項 3 8 に記載の方法。

## 【請求項 4 0】

検出又は測定手順のパラメーターは、研究中の X I I a 因子形態若しくは形態群が他の X I I a 因子形態群に対し優先的に検出又は測定されるように調節される、請求項 1 ないし 3 9 のうちいずれか一項に記載の方法。

30

## 【請求項 4 1】

検出又は測定の手順は界面活性剤の不存在下で実施される、請求項 4 0 に記載の方法。

## 【請求項 4 2】

検出又は測定の手順は界面活性剤の存在下で実施される、請求項 4 0 に記載の方法。

## 【請求項 4 3】

該手順は X I I a 因子の検出又は測定を優先的に可能にする、請求項 1 ないし 4 2 のうちいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 4 4】

該手順は X I I a 因子の検出又は測定を優先的に可能にする、請求項 1 ないし 4 2 のうちいずれか一項に記載の方法。

40

## 【請求項 4 5】

該手順は X I I a 因子の検出又は測定を優先的に可能にする、請求項 1 ないし 4 2 のうちいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 4 6】

該手順は低親和性結合パートナーに結合した X I I a 因子の検出又は測定を優先的に可能にする、請求項 1 ないし 4 2 のうちいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 4 7】

該手順は低親和性結合パートナーに結合した X I I a 因子の検出又は測定を優先的に可

50

能にする、請求項 1 ないし 4 2 のうちいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 8】

該手順は低親和性結合パートナーに結合した X I I a 因子の検出又は測定を優先的に可能にする、請求項 1 ないし 4 2 のうちいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 9】

該手順は高親和性結合パートナーに結合した X I I a 因子の検出又は測定を優先的に可能にする、請求項 1 ないし 4 2 のうちいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 0】

該手順は高親和性結合パートナーに結合した X I I a 因子の検出又は測定を優先的に可能にする、請求項 1 ないし 4 2 のうちいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 5 1】

該手順は高親和性結合パートナーに結合した X I I a 因子の検出又は測定を優先的に可能にする、請求項 1 ないし 4 2 のうちいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 2】

該手順は X I I a 因子の二個以上の分子を内包する分子複合体の、検出又は測定を優先的に可能とする、請求項 1 ないし 4 2 のうちいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 3】

該手順は細胞又は細胞由来物質と結合した X I I a 因子の検出又は測定を優先的に可能とする、請求項 1 ないし 4 2 のうちいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 4】

該手順は、脂質、リポタンパク質又はその残片と結合した X I I a 因子の検出又は測定を優先的に可能とする、請求項 1 ないし 4 2 のうちいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 5 5】

免疫検定法は、捕獲抗体が m A b 2 / 2 1 5 又はその類似体であり、ならびに、標識化抗体が m A b 2 / 2 1 5 又はその類似体である捕獲分析である、請求項 4 3 ないし 5 3 のうちいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 6】

X I I a 因子形態若しくは形態群は発色分析を用いて検出又は測定される、請求項 5 ならびにその従属項以外の、請求項 1 ないし 2 4 のうちいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 7】

試料は、病気若しくは疾患を持っている、病気若しくは疾患を経験している、又は病気若しくは疾患を持っていた後又は治療後であるという被験者から得られる、請求項 1 ないし 5 6 のうちいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 5 8】

病気若しくは疾患は凝固システムを含んでいる、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

病気若しくは疾患は、ヘモ凝固、繊維素溶解、キニン生成、補体活性化、又は血管形成、血管全体ならびに血圧の維持、血管内空間における構造的抗凝固性特徴の維持、又は組織防衛・修復を含んでいる、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 6 0】

病気若しくは疾患は、急性又は慢性の炎症、敗血症ショックを含むあらゆる病因のショック、糖尿病、アレルギー、血栓出血性の病気、敗血症、自然流産、又は腫瘍性疾患であるか又は含んでいる、請求項 5 7 に記載の方法。

40

【請求項 6 1】

病気若しくは疾患は、血管内血液凝固又は血栓塞栓症、心筋梗塞、急性冠不全症候群又は狭心症であるか又は含んでいる、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 6 2】

病気若しくは疾患は血栓症又は狭窄であるか又は含んでいる、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 6 3】

病気若しくは疾患は心筋梗塞又は急性冠不全症候群の疑いがあるか又は含んでいる、請求

50

項 5 7 に記載の方法。

【請求項 6 4】

病気若しくは疾患は敗血症であるか又は含んでいる、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 6 5】

治療は治療薬の投与、ならびに / 又は外科的処置を含む、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 6 6】

治療は冠状動脈血管形成術又は血栓溶解である、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

被験者から得られた一連の試料が試験される、請求項 1 ないし 6 6 のうちいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 6 8】

試料は病気若しくは疾患の経過中に得られたものである、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 6 9】

試料は、病気若しくは疾患の治療の間、治療の開始前、ならびに / 又は治療の終了後に得られたものである、請求項 6 6 又は請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 7 0】

病気若しくは疾患を持っているか又は持っていると思われる被験者の、病気若しくは疾患の罹病性、進行、又は転帰、又は病気若しくは疾患の治療についての診断、モニタリング、又は予測の方法であり、該方法は、前記被験者から得られた試料において他の X I I a 因子形態群に優先して一種以上の X I I a 因子形態群を検出又は測定すること、ならびに、前記被験者について得られた結果を、下記の少なくとも一種以上から得られた試料に対する同一の分析を用いて得られた結果と比較することからなる方法。

20

( i ) 病気若しくは疾患を持っている被験者；

( i i ) 病気若しくは疾患を持っている被験者であって、病気若しくは疾患の進行ならびに / 又は転帰に関してモニターされた被験者；

( i i i ) 病気若しくは疾患を持ち、ならびに治療を受けている被験者；

( i v ) 病気若しくは疾患を持ち、ならびに治療を受けている被験者であって、病気若しくは疾患の進行ならびに / 又は転帰に関して治療に関しモニターされた被験者；

( v ) 病気若しくは疾患をもっていない被験者；

( v i ) 病気若しくは疾患の発症前、又は、病気若しくは疾患治療の開始前の、上記の被験者；ならびに

30

( v i i ) 病気若しくは疾患、又は病気若しくは疾患の治療のより前期又はより後期のステージにある、又は病気若しくは疾患の発症前の、上記の被験者

【請求項 7 1】

請求項 1 ないし 5 6 のうちいずれか一項に記載された方法を用いて、研究中の X I I a 因子形態若しくは形態群を検出又は測定する、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

病気若しくは疾患は請求項 5 8 ないし 6 4 のうちいずれか一項に定義された通りである、請求項 7 0 又は請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 3】

治療は請求項 6 5 又は請求項 6 6 に定義された通りである、請求項 6 2 又は請求項 6 3 に記載の方法。

40

【請求項 7 4】

試料は請求項 6 7 ないし 6 9 のうちいずれか一項に定義された通りである、請求項 7 0 ないし 7 3 のうちいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 5】

試料は、心筋梗塞の疑いがある対象者の病院への入院時又は入院後に得られ、ならびに X I I a 因子の特定形態の低レベル値は、二次トロポニン陽性イベントのリスク増加と関連する、請求項 7 0 又は請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 6】

50

試料は、心筋梗塞の疑いがある対象者の病院への入院時又は入院後に得られ、並びに X I I a 因子の特定形態の高レベル値は、二次トロポニン陽性イベントのリスク増加と関連する、請求項 7 0 又は請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 7】

試料は、心筋梗塞の疑いがある対象者の病院への入院時又は入院後に得られ、並びに X I I a 因子の特定形態の低レベル値は、死のリスク増加と関連する、請求項 7 0 又は請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 8】

試料は、心筋梗塞の疑いがある対象者の病院への入院時又は入院後に得られ、並びに X I I a 因子の特定形態の高レベル値は、死のリスク増加と関連する、請求項 7 0 又は請求項 7 1 に記載の方法。

10

【請求項 7 9】

X I I a 因子の特定形態の高レベル値は敗血症と関連する、請求項 7 0 又は請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 8 0】

病気若しくは疾患又は、病気若しくは疾患の治療を行っている被験者から得られた試料における X I I a 因子に対する一連の分析を実施すること、並びに該病気若しくは疾患又は治療に関連する X I I a 因子レベル値の情報を与える分析を選択することからなる方法。

【請求項 8 1】

病気若しくは疾患を持っているか又は持っていると思われる被験者の、病気若しくは疾患の罹病性、進行、又は転帰、又は病気若しくは疾患の治療について診断、モニタリング、又は予測に関する情報を与えることに適する X I I a 因子の分析を提供する方法であり、該方法は、病気若しくは疾患を持っているか又は治療を受けている被験者から得られた試料における X I I a 因子に対する一連の分析の実施をすること、並びに、どの分析（群）が診断、モニタリング、又は病気若しくは疾患の罹病性、進行、又は転帰、又は病気若しくは疾患の治療の予測に関する X I I a 因子レベル値に関する情報を提供するのかが決定することからなる方法。

20

【請求項 8 2】

病気若しくは疾患を持っている又は治療を受けている被験者から得られた試料における X I I a 因子についての結果を、下記の少なくとも一種以上から得られた試料に対する同一分析を用いて得られた結果と比較することからなる、請求項 8 1 に記載の方法。

30

( i ) 病気若しくは疾患を持っている被験者；

( i i ) 病気若しくは疾患を持っている被験者であって、病気若しくは疾患の進行ならびに / 又は転帰に関してモニターされた被験者；

( i i i ) 病気若しくは疾患を持ち、並びに治療を受けている被験者；

( i v ) 病気若しくは疾患を持ち、並びに治療を受けている被験者であって、病気若しくは疾患の進行ならびに / 又は転帰に関して治療に関しモニターされた被験者；

( v ) 病気若しくは疾患をもっていない被験者；

( v i ) 病気若しくは疾患の発症前、又は、病気若しくは疾患の治療の開始前の、上記の被験者；並びに

40

( v i i ) 病気若しくは疾患、又は病気若しくは疾患の治療のより前期又はより後期のステージにある、又は病気若しくは疾患の発症前の、上記の被験者

【請求項 8 3】

該分析は請求項 1 ないし 5 6 のうちいずれか一項において定義された方法である、請求項 8 0 ないし 8 2 のうちいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 4】

病気若しくは疾患は請求項 5 8 ないし 6 4 のうちいずれか一項において定義された通りである、請求項 8 0 ないし 8 3 のうちいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 5】

50

治療法は請求項 6 5 又は 6 6 で定義された通りである、請求項 8 0 ないし 8 3 のうちいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 6】

試料は請求項 6 7 ないし 6 9 のうちいずれか一項において定義された通りである、請求項 8 0 ないし 8 5 のうちいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 7】

得られた結果はデータベースにまとめられる、請求項 8 0 ないし 8 6 のうちいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 8】

請求項 8 0 ないし 8 6 のうちいずれか一項に記載の方法によって得られた結果を含むデータベース。 10

【請求項 8 9】

被験者からの試料における X I I a 因子を検出又は測定することからなる方法であって、該試料は尿の試料であることを特徴とする方法。

【請求項 9 0】

病気若しくは疾患の診断又はモニタリング、又は、病気若しくは疾患の治療のモニタリングの方法であって、該方法は病気若しくは疾患を持っているか又は持っていると思われる被験者の尿中の、X I I a 因子を検出又は測定することからなる方法。

【請求項 9 1】

疾患は腎機能、腎疾患又は腎障害、又はその治療法であるか又はそれら含む、請求項 9 0 に記載の方法。 20

【請求項 9 2】

被験者から得られた結果を、下記の少なくとも一種以上から得られた試料に対する同一分析を用いて得られた結果と比較することからなる、請求項 8 9 ないし 9 1 のいずれか一項に記載の方法。 :

( i ) 損なわれた腎機能、腎疾患及び腎障害などの病気若しくは疾患を持っている被験者 ;

( i i ) 損なわれた腎機能、腎疾患及び腎障害などの病気若しくは疾患を持っている被験者であって、損なわれた腎機能、腎疾患及び腎障害などの病気若しくは疾患の進行ならびに / 又は転帰に関してモニターされた被験者 ; 30

( i i i ) 損なわれた腎機能、腎疾患及び腎障害などの病気若しくは疾患を持ち、ならびに治療を受けている被験者 ;

( i v ) 損なわれた腎機能、腎疾患及び腎障害などの病気若しくは疾患を持ち、ならびに治療を受けている被験者であって、損なわれた腎機能、腎疾患及び腎障害などの病気若しくは疾患の進行ならびに / 又は転帰に関して治療に関しモニターされた被験者 ;

( v ) 損なわれた腎機能、腎疾患及び腎障害などの病気若しくは疾患をもっていない被験者 ;

( v i ) 損なわれた腎機能、腎疾患及び腎障害などの病気若しくは疾患の発症前、又は、損なわれた腎機能、腎疾患及び腎障害などの病気若しくは疾患の治療の開始前の、上記の被験者 ; ならびに 40

( v i i ) 損なわれた腎機能、腎疾患及び腎障害などの病気若しくは疾患、又は病気若しくは疾患の治療のより前期又はより後期のステージにある、又は損なわれた腎機能、腎疾患及び腎障害などの病気若しくは疾患の発症前の、上記の被験者

【請求項 9 3】

分析は請求項 1 ないし 5 6 のうちいずれか一項に定義された方法であり、試料は尿である、請求項 9 0 ないし 9 2 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、「接触活性化システム」の構成要素である、XIIa因子に関するものである。

【背景技術】

【0002】

XIIa因子は、正常な血液中に存在する不活性なチモゲンである。それは試験管内で高分子量のキニノゲンであるカリクレインならびに陰電荷表面の存在下で、容易に酵素的に活性であるXIIa因子形態に変換される。試験管内で、XIIa因子の二種の形態がこれまでに報告されている。しばしばXIIa因子と呼ばれるセリンプロテナーゼの80Kd形態は、28Kd軽鎖に結合したジスルフィド結合によって、52Kd重鎖を有する。この因子のタンパク質分解は、該重鎖からペプチドを放ち、セリンプロテナーゼ活性を保持するXIIa因子である生成物をもたらすが、しかしながら、XIIa因子の28Kd鎖は前出の52Kd重鎖に由来する、小さなペプチド断片とジスルフィド結合する。多くの場合、小さなペプチド断片は約1000dの分子量を持っているが、異なるサイズの断片が試験管内で観測される。

10

【0003】

特許文献1はXIIa因子の免疫検定法を開示する。特許文献1はまた、それらはXIIa因子に結合するモノクローナル抗体2/215ならびに201/9を開示し、ならびにそれらの生成手法を開示する。モノクローナル抗体(mAb)2/215はハイブリドーマ2/215によって生成され、英国、ソールズベリーSP40JG, ポートンダウンの応用微生物学及び研究のためのPHLSセンターの生物学部門である欧州動物細胞カルチャーコレクション(EGCCとして知られる)へ1990年1月16日に寄託ナンバー90011606で寄託されており、ならびに、モノクローナル抗体201/9を生成するハイブリドーマ201/9はEGCCへ1990年1月18日に寄託ナンバー90011893で寄託されている。

20

【0004】

XIIa因子は生体内で血液凝固の接触システムにかかわっているとして長い間知られている。より最近の研究では、XIIa因子はまた繊維素溶解、キニン生成、ならびに補体活性化、血管形成などの他のシステムにもかかわっていることを示している。多くの臨床ならびに実験のデータが蓄積されて、接触システムは血液凝固を超えた範囲に及ぶこと、ならびにそれは血管全体ならびに血圧を維持する役割を果たしていること、内皮細胞のさまざまな機能に影響を与えること、ならびに繊維素溶解のコントロールと血管内空間における構造的抗凝固性特徴の維持にかかわっていることを示唆している。更なる臨床ならびに実験研究は、接触システムは急性あるいは慢性の炎症、異なる病因のショック状態、糖尿病、アレルギー、播種性血管内血液凝固などの血栓出血性の病気、ならびに腫瘍性疾患にかかわっていることを示唆している。そのような状態は、敗血症、自然流産ならびに血栓塞栓症を含む。加えて、XIIa因子は組織防衛・修復にかかわり得る。ヤロヴァヤら(非特許文献1)は接触システムならびに活性化メカニズム及び生物調整機能の新たな概念に関する最近の論文を著している。

30

【特許文献1】国際公開第90/08835号パンフレット

【非特許文献1】ヤロヴァヤ、G. A.、プロクヒナ、T. B. ならびにネシュコヴァ、E. A. 接触システム、活性化メカニズムと生物調整機能の新たな概念、バイオケミストリー(Mosc). 2002 1月; 67(1): 13-14

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は試料における一種以上のXIIa因子形態の検出あるいは測定の方法を提供するものであり、該方法は他のXIIa因子形態に優先して、研究中のXIIa因子形態若しくは形態群の検出あるいは測定を可能とする手順を実施することからなる。

【課題を解決するための手段】

【0006】

50

ある一つの実施態様において、本発明の方法は、他のX I I a因子形態に優先して研究中のX I I a因子形態若しくは形態群の測定を可能とする分析手法によって、研究中のX I I a因子形態若しくは形態群を検出あるいは測定することからなる。

【0007】

他の実施態様において、本発明の方法は、他のX I I a因子形態から研究中のX I I a因子形態若しくは形態群を分離すること、ならびに分離されたX I I a因子形態若しくは形態群を検出あるいは測定することからなる。

【0008】

分離されたX I I a因子形態若しくは形態群の検出あるいは測定は、他のX I I a因子形態に優先して、研究中のX I I a因子形態若しくは形態群の測定を可能にする分析手法により行うことができる。

10

【0009】

更なる実施態様において、本発明の方法は、研究中のX I I a因子形態若しくは形態群に結合可能な、また所望により他のX I I a因子形態にも結合可能な標識化抗体と試料を接触すること、他の形態からの研究中のX I I a因子形態若しくは形態群を分離すること、ならびに研究中のX I I a因子形態若しくは形態群を検出あるいは測定することからなる。

【発明の効果】

【0010】

本発明は、病気若しくは疾患を持っているか又は持っていると思われる被験者の、病気若しくは疾患の罹病性、進行、又は転帰、又は病気若しくは疾患の治療についての診断、モニタリング、又は予測に関する方法をも提供するものであり、該方法は、被験者から得られた試料において、他のX I I a因子形態に優先して、一種以上のX I I a因子を検出あるいは測定すること、ならびに、被験者から得られた結果と、下記の少なくとも一種以上から得られた試料に対する同一分析を用いて得られた結果とを比較すること：

20

( i ) 病気若しくは疾患を持っている被験者；

( i i ) 病気若しくは疾患を持っている被験者であって、病気若しくは疾患の進行ならびに/あるいは転帰に関してモニターされている被験者；

( i i i ) 病気若しくは疾患を持ち、ならびに治療を受けている被験者；

( i v ) 病気若しくは疾患を持ち、ならびに治療を受けている被験者であって、病気若しくは疾患の進行ならびに/あるいは転帰に関して治療に関しモニターされている被験者；

30

( v ) 病気若しくは疾患をもっていない被験者；

( v i ) 病気若しくは疾患の発症前、あるいは、病気若しくは疾患治療の開始前の、上記の被験者；ならびに

( v i i ) 病気若しくは疾患、又は病気若しくは疾患の治療のより前期あるいはより後期のステージにある、あるいは病気若しくは疾患の発症前の、上記の被験者。

【0011】

本発明はさらに、病気若しくは疾患を持っているかあるいは病気若しくは疾患の治療を受けている被験者から得られた試料のX I I a因子に対する一連の分析の実施、ならびに病気若しくは疾患あるいは治療に関連するX I I a因子レベル値の情報を与える分析の選択からなる方法を提供する。

40

【0012】

本発明はまた、病気若しくは疾患を持っているか又は持っていると思われる被験者の、病気若しくは疾患の罹病性、進行、又は転帰、又は病気若しくは疾患の治療法についての診断、モニタリング、又は予測に関する情報を与えるのに適する、X I I a因子の分析を与える方法を提供するものであり、該方法は、病気若しくは疾患を持っているか治療を受けている被験者から得られた試料におけるX I I a因子に対する一連の分析を実施すること、ならびに、どの分析が病気若しくは疾患の罹病性、進行、又は転帰、又は病気若しくは疾患の治療についての診断、モニタリング、又は予測に関するX I I a因子レベル値に関する情報を提供するのが決定することからなる方法を提供する。

50

## 【0013】

上記方法は、好ましくは、病気若しくは疾患を持っているかあるいは治療を受けている被験者から得られたサンプルにおけるX I I a 因子から得られた結果と、下記の少なくとも一種以上から得られた試料に対する同一分析を用いて得られた結果とを比較することからなる：

- ( i ) 病気若しくは疾患を持っている被験者；
- ( i i ) 病気若しくは疾患を持っている被験者であって、病気若しくは疾患の進行ならびに / あるいは転帰に関してモニターされている被験者；
- ( i i i ) 病気若しくは疾患を持ち、ならびに治療を受けている被験者；
- ( i v ) 病気若しくは疾患を持ち、ならびに治療を受けている被験者であって、病気若しくは疾患の進行ならびに / あるいは転帰に関して治療に関しモニターされている被験者；
- ( v ) 病気若しくは疾患をもっていない被験者；
- ( v i ) 病気若しくは疾患の発症前、あるいは、病気若しくは疾患治療の開始前の、上記の被験者；ならびに
- ( v i i ) 病気若しくは疾患、又は病気若しくは疾患の治療のより前期あるいはより後期のステージにある、あるいは病気若しくは疾患の発症前の、上記の被験者。

10

## 【図面の簡単な説明】

## 【0014】

【図1】図1は、生体中に存在するX I I a 因子の異なる形態に関する仮説の図式的表示を示す。

20

【図2】図2 a から2 d は、蛍光検出法を用いたH P L C トレースを示す：図2 a、血漿試料のみ；図2 b、F I T C 標識2 / 2 1 5 抗体；図2 c、F I T C 標識2 / 2 1 5 抗体と培養させた血漿；図2 d、図2 a ならびに図2 b で示されたトレースを差し引いた後の図2 c のトレース。

【図3】図3は、H P L C を用いて成分を分離した後の、放射能標識化2 / 2 1 5 F a b 断片と培養させた血漿における放射活性を示す。ピーク1ないし5は血漿成分に結合したm A b 2 / 2 1 5 F a b の結果であり、ピーク6はm A b 2 / 2 1 5 F a b と結合せずに残ったものである。

【図4】図4 a と4 b は、細胞性X I I a 因子の検出に対して、捕獲抗体としてm A b 2 / 2 1 5 ならびに標識化ポリクローナル抗体（ポリクローナル接合体）（図4 a ではひし形、図4 b では網掛け棒）、ならびに標識化m A b 2 / 2 1 5 （2 / 2 1 5 接合体）（図4 a では四角、図4 b では黒色棒）を使用した、マイクロタイタープレートによるX I I a 因子の免疫検定法における、異なる三試料、すなわち濃細胞血漿、希細胞血漿、洗浄細胞の標準化された応答を示す。

30

【図5】図5は、アボットラボラトリーズ社のI M x システムを用いた、細胞性X I I a 因子の免疫検定法の実施に使用されるプロトコルを示す。

【図6】図6 a と図6 b は、細胞性X I I a 因子の検出に対して、捕獲抗体としてm A b 2 / 2 1 5、ならびに標識化ポリクローナル抗体（ポリクローナル接合体）（図6 a ではひし形、図6 b では網掛け棒）、ならびに標識化m A b 2 / 2 1 5 （2 / 2 1 5 接合体）（図6 a では四角、図6 b では黒色棒）を使用した、マイクロタイタープレートによるX I I a 因子の免疫検定法における、異なる三試料、すなわち濃細胞血漿、希細胞血漿、細胞懸濁液の応答を示す。

40

【図7】図7 a と図7 b は、細胞性X I I a 因子の検出に対して、捕獲抗体としてm A b 2 / 2 1 5、ならびに標識化m A b 2 0 1 / 9 （2 0 1 / 9 接合体）（図7 a ではひし形、図7 b では網掛け棒）、ならびに標識化m A b 2 / 2 1 5 （2 / 2 1 5 接合体）（図7 a では四角、図7 b では黒色棒）を使用した、I M x 装置によるX I I a 因子の免疫検定法における、異なる三試料、濃細胞血漿、希細胞血漿、細胞懸濁液の応答を示す。

【図8】図8 a と図8 b は、血漿と培養させたF I T C 標識化m A b 2 / 2 1 5 について得られた、フローサイトメトリーデータを示す。図8 a は標識化抗体の不存在下で血漿について得られたデータを示し、図8 b は血漿が標識化された抗体とともに培養された時に

50

得られたデータを示す。分布のシフトは標識化 2 / 2 1 5 抗体が血漿の細胞成分に結合したことを示唆している。

【図 9】図 9 は、放射能標識化 m A b 2 / 2 1 5 の添加によって測定された、8 個体の血漿における細胞性 X I I a 因子の含有量を示している。

【図 10】図 10 a と図 10 b は、X I I 因子が「完全に欠乏」個体から得られた、異なる三試料、すなわち濃細胞血漿、希細胞血漿、細胞懸濁液の応答を示す。X I I a 因子の免疫検定法は、捕獲抗体として m A b 2 / 2 1 5、ならびに接合体として標識化 m A b 2 0 1 / 9 (図 10 a ではひし形、図 10 b では網掛け棒)、ならびに標識化 m A b 2 / 2 1 5 (図 10 a では四角、図 10 b では黒色棒) を使用して、I M x 分析装置で行われた。

【図 11】図 11 a と図 11 b は X I I 因子が「完全に欠乏」個体から得られた、異なる三試料、すなわち濃細胞血漿、希細胞血漿、細胞懸濁液の標準化された応答を示す。X I I a 因子の免疫検定法は捕獲抗体として m A b 2 / 2 1 5、ならびに接合体として標識化 m A b 2 0 1 / 9 (図 11 a ではひし形、図 11 b では網掛け棒)、ならびに標識化 m A b 2 / 2 1 5 (図 11 a では四角、図 11 b では黒色棒) を使用して、I M x 分析装置で行われた。

【図 12】図 12 a と図 12 b は、正常なボランティアならびに X I I 因子が「完全に欠乏」個体から得られた、異なる三試料、すなわち濃細胞血漿、希細胞血漿、細胞懸濁液の標準化された応答を示す。X I I a 因子の免疫検定法は、捕獲抗体として m A b 2 / 2 1 5、ならびに接合体として標識化 m A b 2 / 2 1 5 を使用して、I M x 分析装置で行われた。(図 12 a ではひし形ならびに図 12 b では網掛け棒が正常なボランティアからの試料を示し; 図 12 a では四角ならびに図 12 b では黒色棒が「X I I 因子欠乏」個体から得られた試料を示す。)

【図 13】図 13 a 及び図 13 b は、正常なボランティアならびに X I I 因子が完全に欠乏した個体から得られた、異なる三試料、すなわち濃細胞血漿、希細胞血漿、細胞懸濁液の標準化された応答を示す。X I I a 因子の免疫検定法は、捕獲抗体として m A b 2 / 2 1 5 ならびに接合体として標識化 m A b 2 0 1 / 9 を使用して、I M x 分析装置で行われた。(図 13 a ではひし形ならびに図 13 b では網掛け棒が正常なボランティアからの試料を示し; 図 13 a では四角ならびに図 13 b では黒色棒が「X I I 因子欠乏」個体から得られた試料を示す。)

【図 14】図 14 は、放射能標識化 2 / 2 1 5 抗体断片のクエン酸血漿への添加、細胞物質の除去、マンガノヘパリン沈殿法を用いたリポタンパク質の沈殿、及び沈殿画分の放射活性の測定によって評価された、12 人の健康なボランティアから得られた、脂質結合 X I I a 因子の濃度を示す。

【図 15】図 15 は、放射能標識化 2 / 2 1 5 抗体断片の全血への添加、それに続く細胞物質の除去、ホスホタングステート沈殿法を用いたリポタンパク質の沈殿、及び沈殿画分の放射活性の測定によって評価された、胸痛によって入院した 64 人の患者から得られた、脂質結合 X I I a 因子の濃度を示す。

【図 16】図 16 は、8 人のボランティアから得られた、E L I S A 法によって評価された、脂質結合 X I I a 因子の濃度 (550 nm における吸光度として表現) を示す。

【図 17】図 17 a から 17 d は蛍光検出法を用いた H P L C トレースを示す: 図 17 a、尿試料のみ; 図 17 b、F I T C 標識 m A b 2 / 2 1 5; 図 17 c、F I T C 標識 m A b 2 / 2 1 5 と培養させた尿; 図 17 d、図 17 a ならびに図 17 b で示されたトレースを差し引いた図 17 c のトレース。

【図 18】図 18 は、H P L C を用いて成分を分離した後の、放射能標識化 m A b 2 / 2 1 5 F a b 断片と培養させた尿における放射活性を示す。ピーク 1 は尿中の X I I a 因子と結合した m A b 2 / 2 1 5 F a b の結果であり、ピーク 2 は m A b 2 / 2 1 5 F a b と結合せずに残ったものである。

【図 19】図 19 は、経皮経管冠動脈形成 (P T C A) の直前、直後、5 日後における、患者の血漿試料の X I I a 因子濃度を測定するために、二種の異なる免疫検定法を用いて

10

20

30

40

50

得られた典型的な数値パターンを示す。分析 1 は試料の培養ステップを含む免疫検定法である。前記分析は、捕獲抗体として m A b 2 / 2 1 5、ならびに接合体として標識化 m A b 2 0 1 / 9 を用い、ならびに試料の培養ステップにトリトン添加を組み入れたものである。分析 2 は、接合体として X I I 抗因子ポリクローナル抗体とともに、捕獲抗体として m A b 2 / 2 1 5 を用いるものであり、試料の培養ステップ間にはトリトン添加を行わない。ひし形で表されたデータポイントは分析 1 から得られた結果を示し；四角で表されたデータポイントは分析 2 から得られた結果を示す。

【図 2 0】図 2 0 は、冠動脈形成 ( P T C A ) の直前、直後、5 日後に得られた血漿試料の分析によって得られた、4 人の患者 ( 患者 S 0 2 1 6、S 0 7 9 4、S 0 8 1 1、ならびに S 0 9 0 9 ) から得られた血漿試料中の X I I a 因子の濃度を示す。X I I a 因子は試料培養ステップを含む免疫検定法により測定された。分析は、試料の培養ステップ間にはトリトン添加を行わずに、捕獲抗体として m A b 2 / 2 1 5、ならびに接合体として標識化 X I I 抗因子ポリクローナル抗体を用いた。網掛け棒は P T C A 前に得られた数値を示し、斜線棒は P T C A 後に得られた数値を示し、ならびに黒色棒は P T C A 5 日後に得られた数値を示す。

10

【図 2 1】図 2 1 は、血栓溶解治療の直前、直後、5 日後に患者から得られた試料の X I I a 因子の濃度を示す。分析 1 は試料培養ステップを含む免疫検定法である。分析は、捕獲抗体として m A b 2 / 2 1 5 を、ならびに接合体として標識化 m A b 2 0 1 / 9 を用い、ならびに試料培養ステップにトリトン添加を組み入れたものである。分析 2 は、接合体として X I I 抗因子ポリクローナル抗体を用いるとともに捕獲抗体として m A b 2 / 2 1 5 を用いるものであり、試料の培養ステップ間にはトリトン添加を行わない。ひし形で表されたデータポイントは分析 1 から得られた結果を示し；四角で表されたデータポイントは分析 2 から得られた結果を示す。結果は個体から得られる典型的な数値パターンである。

20

【図 2 2】図 2 2 は、P C T A の直前、直後、5 日後から得られた試料における、3 人の患者 ( S 0 6 8 4、S 0 6 8 5、ならびに S 0 6 9 3 ) の X I I a 因子の濃度を示す。X I I a 因子は試料培養ステップを含む免疫検定法により測定された。分析は試料の培養ステップ間にはトリトン添加を行わずに、捕獲抗体として m A b 2 / 2 1 5、ならびに接合体として標識化 X I I 抗因子ポリクローナル抗体を用いた。網掛け棒は P C T A 前に得られた数値を示し、斜線棒は P C T A 後に得られた数値を示し、ならびに黒色棒は P C T A 5 日後に得られた数値を示す。

30

【図 2 3】図 2 3 は、心筋梗塞の疑いや急性冠症候群で入院した患者の初入院後の、入院期間中のトロポニン陽性イベントの反復頻度を示す。トロポニン陽性イベントの反復頻度は、X I I a 因子の濃度によって分類される。X I I a 因子は、試料培養ステップを含む免疫検定法で測定される。分析は、捕獲抗体として m A b 2 / 2 1 5、ならびに接合体としてアルカリホスファターゼで標識化された同一の抗体を用い、ならびに試料培養ステップにトリトン添加を組み入れたものである。

【図 2 4】図 2 4 は、図 2 3 の入院期間中の、それぞれ優先的に X I I a 因子の異なる形態を測定する、数種の異なる分析を用いた、トロポニン陽性イベントの反復頻度を示す。これは、X I I a 因子の特定の形態が臨床的有用性を提供するが他の形態はしないということを実証する。前記分析は試料培養ステップを含む免疫検定法であった。分析 a にて優先的に測定された X I I a 因子形態は、点を含んだ明るい棒にて示される。分析 a は、捕獲抗体として m A b 2 / 2 1 5 ( 重炭酸塩バッファー中で  $15 \mu\text{g ml}^{-1}$  にコートされる )、ならびに接合体としてアルカリホスファターゼで標識化された同一の抗体を用い、ならびに試料培養ステップにトリトン添加を組み入れたものである ( 図 2 3 に示されたデータと同様に )。分析 b にて優先的に測定された X I I a 因子形態は暗い棒にて示される。分析 b は、捕獲抗体として m A b 2 / 2 1 5 ( ホスフェートバッファー中で  $2 \mu\text{g ml}^{-1}$  にコートされる )、ならびに接合体としてアルカリホスファターゼで標識化された m A b 2 0 1 / 9 を用い、ならびに試料培養ステップにトリトン添加を組み入れないものである。分析 c にて優先的に測定される X I I a 因子形態は斜線の入った明るい棒にて示される。分析 c は、捕獲抗体として m A b 2 / 2 1 5 ( ホスフェートバッファー中で  $2 \mu\text{g}$

40

50

$\text{m l}^{-1}$ にコートされる)、ならびに接合体としてアルカリホスファターゼで標識化された X I I a 因子に対するポリクローナル抗体を用い、ならびに試料培養ステップにトリトン添加を組み入れないものである。

【図 2 5】図 2 5 は、図 2 3 で示された同一患者の、入院日 3 0 日以内の、その後のトロポニン陽性イベントの頻度を示す。トロポニン陽性イベントの反復頻度は、X I I a 因子の濃度によって分類される。X I I a 因子は、試料培養ステップを含む免疫検定法で測定される。分析は、捕獲抗体として m A b 2 / 2 1 5、ならびに接合体として標識化 m A b 2 0 1 / 9 を用い、ならびに試料培養ステップにトリトン添加を組み入れたものである。暗い棒は致命的でないトロポニン陽性イベントを示し、斜線の明るい棒は致命的なトロポニン陽性イベントを示す。

10

【図 2 6】図 2 6 は、図 2 5 と同様に入院日 3 0 日以内の、それぞれ優先的に X I I a 因子の異なる形態を測定する、数種の異なる分析を用いた、その後のトロポニン陽性イベントの頻度を示す。これは、X I I a 因子の特定の形態が臨床的有用性を提供するが、他の形態はしないということを実証する。分析 x にて優先的に測定された X I I a 因子形態は、点を含む明るい棒にて示される。分析 x は、m A b 2 / 2 1 5 (ホスフェートバッファー中で  $2 \mu\text{g m l}^{-1}$  にコートされる)、ならびに接合体としてアルカリホスファターゼで標識化された X I I a 因子に対するポリクローナル抗体を用い、ならびに試料培養ステップにトリトン添加を組み入れないものである。分析 y にて優先的に測定された X I I a 因子形態は暗い棒にて示される。分析 y は、m A b 2 / 2 1 5 (ホスフェートバッファー中で  $2 \mu\text{g m l}^{-1}$  にコートされる)、ならびに接合体としてアルカリホスファターゼ

20

【図 2 7】図 2 7 は、図 2 3 ならびに図 2 5 の患者の同一試料を用いた、臨床的エンドポイントとしての死亡頻度を示す。死亡頻度は X I I a 因子の濃度によって分類される。X I I a 因子は、試料培養ステップを含む免疫検定法で測定される。分析は、試料培養ステップにおいてトリトン添加をせずに、捕獲抗体として m A b 2 / 2 1 5、ならびに接合体

30

【図 2 8】図 2 8 は図 2 7 と同様に、それぞれ優先的に X I I a 因子の異なる形態を測定する、二種の異なる分析を用いた、臨床的エンドポイントとしての死亡頻度を表す。これは、X I I a 因子の特定の形態が臨床的優位性を提供するが、他の形態はしないということを実証する。分析 i にて優先的に測定された X I I a 因子形態は、点を含む明るい棒にて示される。分析 i は、m A b 2 / 2 1 5 (ホスフェートバッファー中で  $2 \mu\text{g m l}^{-1}$  にコートされる)、ならびに、接合体としてアルカリホスファターゼで標識化された同一の抗体を用い、ならびに試料培養ステップにトリトン添加を組み入れないものである。分析 i i にて優先的に測定された X I I a 因子形態は暗い棒にて示される。分析 i i は、試料培養ステップにおいてトリトン添加をせずに、捕獲抗体として m A b 2 / 2 1 5 (ホスフェートバッファー中で  $2 \mu\text{g m l}^{-1}$  にコートされる)、ならびに接合体として X I I a 抗因子ポリクローナル抗体を用いた。

40

【図 2 9】図 2 9 は、致命的でない心筋梗塞の反復頻度(トロポニン陽性イベント)、ならびに心筋梗塞の疑いで入院した患者の初入院後の、6 ヶ月間の心臓死を示す。イベントの反復頻度は脂質結合 X I I a 因子の濃度によって分類される。明るい棒は致命的でない心筋梗塞を示し、暗い棒は心臓死を示す。

【図 3 0】図 3 0 は、放射能標識化抗体との培養ならびに H P L C により確かめられた、5 人の健康なボランティアならびに腎疾患を持っている 5 個体に対する、尿の X I I a 因子の濃度を示す。

50

【図 3 1】図 3 1 は、マイクロタイタープレート免疫検定法にて得られた吸光度として表現された、5 人の健康なボランティアならびに腎疾患を持っている 5 個体に対する、尿の X I I a 因子の数値を示す。前記分析は、捕獲抗体として m A b 2 / 2 1 5、ならびに接合体として標識化 m A b 2 0 1 / 9 を用い、ならびに試料培養ステップにトリトン添加を組み入れないものである。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 1 5 】

定義

抗体とは、たとえば、F a b 及び F ( a b ' )<sub>2</sub> 断片、ならびに組換え型、キメラ型及びヒト化抗体などの、抗原に結合できるあらゆる抗体断片を含む。

10

【 0 0 1 6 】

抗体接合体、あるいは検出抗体とは、直接的あるいは間接的に分析できる標識を用いて標識化された抗体を意味する。

【 0 0 1 7 】

捕獲抗体とは、免疫検定法で使用するために、固相に固定化した抗体を意味する。

【 0 0 1 8 】

捕獲分析とは、固相に固定化された捕獲抗体が試料と接触する、免疫検定法を意味する。試料が固定化された抗体に結合することができる抗原からなる場合、ならびに、反応条件が適切である場合、抗原は、固定化された抗体を有する抗原 - 抗体複合体を形成し、それゆえ固相に「捕獲され」、ならびにその後検出あるいは測定されることが可能である。

20

【 0 0 1 9 】

細胞とは、他に特定されていない場合、無傷細胞、細胞残片、細胞物質を意味する。

【 0 0 2 0 】

細胞性 X I I a 因子ならびに細胞性 X I I 因子は、それぞれ細胞表面に存在する、あるいは細胞、細胞残片、又は細胞物質に結合した、X I I a 因子ならびに X I I 因子を意味する。

【 0 0 2 1 】

検出は定性的研究を意味する。

【 0 0 2 2 】

検出ならびに / あるいは測定は定量あるいは半定量的研究を意味する。

30

【 0 0 2 3 】

X I I a 因子、あるいは活性化 X I I 因子ともよばれる、とは、チモーゲン ( X I I 因子 ) の酵素的に活性なあらゆる形態あるいは断片を意味する。

【 0 0 2 4 】

高親和性結合パートナーとは、X I I a 因子と複合体を形成する分子を意味し、その複合体は、たとえば界面活性剤の添加や、他の種との競合によってなどの簡単な方法では分裂され得ない。

【 0 0 2 5 】

脂質結合 X I I a 因子とは、脂質物質と会合した、たとえば脂質、特にリポタンパク質ならびにその残片に会合している、X I I a 因子を意味する。

40

【 0 0 2 6 】

低親和性結合パートナーとは、X I I a 因子と複合体を形成する分子を意味し、その複合体は、たとえば界面活性剤の添加や、他の種との競合によってなどの簡単な方法で容易に分裂する。

【 0 0 2 7 】

モノクローナル抗体 ( m A b ) 2 / 2 1 5、あるいは抗体 2 / 2 1 5 と呼ばれる、とは、ハイブリドーマ 2 / 2 1 5 から生成された抗体であり、英国、ソールズベリー S P 4 0 J G, ポートンダウンの応用微生物学及び研究のための P H L S センターの生物学部門である欧州動物細胞カルチャーコレクション ( E C A C C として知られる ) へ 1 9 9 0 年 1 月 1 6 日に、寄託ナンバー 9 0 0 1 1 6 0 6 で寄託されている。

50

## 【0028】

モノクローナル抗体 (mAb) 2 / 2 1 5 類似体とは、実質上 mAb 2 / 2 1 5 と同様の X I I a 因子結合特性を有する抗体を意味する。

## 【0029】

モノクローナル抗体 (mAb) 2 0 1 / 9、あるいは抗体 2 0 1 / 9 と呼ばれる、とは、ハイブリドーマ 2 0 1 / 9 から生成された抗体であり、E C A C C へ 1 9 9 0 年 1 月 1 8 日に寄託ナンバー 9 0 0 1 2 5 1 2 で寄託されている。

## 【0030】

モノクローナル抗体 (mAb) 2 0 1 / 9 類似体とは、実質上 mAb 抗体 2 0 1 / 9 と同様の X I I a 因子結合特性を有する抗体を意味する。

10

## 【0031】

細胞からなる試料とは、細胞からなる体液試料ならびに単離された細胞の試料双方を意味する。

## 【0032】

種ならびに形態とは、X I I a 因子に関して交換可能に用いられる用語である。

## 【0033】

u g ならびに u l とは、それぞれマイクログラムならびにマイクロリットルを意味する。

## 【0034】

尿の X I I a 因子とは、尿中に存在する X I I a 因子を意味する。

## 【0035】

X I I a 因子形態

本発明は、X I I a 因子 (活性化 X I I 因子) が血液中でさまざまな種もしくは形態にて存在しており、異なる種もしくは形態の測定はさまざまな臨床症状に関係する情報を与えるという、われわれの驚くべき観測結果に基づいている。

20

## 【0036】

下記事項にとらわれないが、生体内のさまざまな形態での X I I a 因子の存在に関連するわれわれの仮説は次の通りである。

X I I a 因子形態変化は下記事項のどれをも反映しているとみられる：

( i ) X I I a 因子の分子量ならびにペプチド鎖長の変化、そのような変異体は X I I a 因子、 I I a 因子、ならびに X I I a 因子などである；

30

( i i ) 体液中での、たとえば複合体の形態での、X I I a 因子の、あるいは ( i ) に記載のその変異体の二個以上の分子の会合、該 X I I a 因子分子は、細胞物質あるいは脂質物質と結合していない；

( i i i ) X I I a 因子あるいは上記 ( i ) に記載のその変異体と、細胞又は細胞残片などの細胞物質あるいは特にリポタンパク質、又はその残片などの脂質との会合；

( i v ) X I I a 因子あるいは上記 ( i ) に記載のその変異体と、たとえば抑制分子といった高親和性結合タンパク質、又は低親和性結合タンパク質のような、一種以上の他の分子種との会合。

## 【0037】

すべての X I I a 因子形態が、定義された病状に関連する情報を等しく与えることはないということもまた仮定されており、そのため、特定形態を優先的に測定する分析は、たとえば、病気若しくは疾患の診断、予測、又はモニタリング、ならびにその治療法の一つ以上に関して、臨床的有用性に改善を与えるものである。

40

## 【0038】

われわれの仮説の図式的表示が図 1 に示されている。X I I a 因子の分子量ならびにペプチド鎖配列を反映した X I I a 因子形態における変化は、不活性なチモーゲン X I I 因子の進行性切断に起因する。X I I 因子は切断を受け、結果として X I I a 因子と称され、ならびに図 1 中で「 X I I a 」として言及される、ジスルフィド結合によって 2 8 K d 軽鎖に結合した 5 2 K d 重鎖からなる、8 0 K d 活性セリンプロテイナーゼとなる。この因子のタンパク質分解は重鎖からタンパク質を放出し、結果として X I I a 因子と称

50

され、ならびに図1中で「XIIa」として言及される、セリンプロテアーゼ活性を有する生成物になるが、しかし該生成物においてはXIIaの28Kd鎖は前記の52Kd重鎖に由来する小さなペプチド断片にジスルフィド結合している。XIIa因子は更なるタンパク分解的切断を受け、結果としてXIIa因子と称され、ならびに図1中で「IIa」として言及される、おおよそ15Kdの分子量を持つ断片となることが可能である。

#### 【0039】

XIIa、XIIa、又はXIIa因子のような、変異体形態のXIIa因子のいずれも、C1エステラーゼ阻害剤といった抑制剤などの高親和性結合パートナー、ならびに、低親和性結合パートナーなどの他の結合タンパク質といった、他の分子種と会合することができる。XIIa因子と、低親和性結合パートナーなどの他の結合タンパク質との結合は可逆的であり得、ならびに阻害タンパク質との会合を妨げ得、ならびにそれゆえXIIa因子活性の抑制を減少あるいは防止することが仮定される。

10

#### 【0040】

XIIa、XIIa、又はXIIa因子のような、変異体形態のXIIa因子のいずれも、リポタンパク質などの脂質と会合あるいは解離することができ、該脂質は粒子ならびに/あるいは粒子残片の形態にあり得る。XIIa、XIIa、又はXIIa因子のような、変異体形態のXIIa因子のいずれも、細胞ならびに細胞断片のいずれとも会合あるいは解離することができる。特に細胞、細胞断片、リポタンパク質、ならびにリポタンパク質残片と会合したXIIa因子の場合においては、個別粒子上にXIIa因子の一形態のいくつかの分子が存在することができる。そしてさらに、XIIa因子形態のいくつかの分子は、同一のあるいは異なる形態にかかわらず、XIIa因子分子の複合体として存在することができる。明瞭であるため、そのような複合体は図1には示されない。

20

#### 【0041】

図1はさまざまなXIIa因子形態間の仮定された相互変換を示している。明瞭であるため、細胞又はその残片、ならびにリポタンパク質又はその断片を備えた、XIIa因子とXIIa因子間の相互作用のいずれも示されていない。

#### 【0042】

図1で示されたシステムは動的システムであることが仮定される。また、XIIa因子の異なる形態は生理学ならびに病理学において異なる役割を果たすこと、ならびにXIIa因子の特定形態の優先的な測定は、定義されていないXIIa因子形態の測定と比較して、病気若しくは疾患の診断、予測、またモニタリングならびにその治療法に関する臨床的有用性の改善につながることを仮定される。

30

#### 【0043】

##### 細胞性XIIa因子

多くの著者がXII因子からXIIa因子への活性化が細胞表面で生じると示唆しており、ならびにその仮説を立証するデータを提供している。特に、著者達は、XII因子の活性化は細胞、とりわけ内皮細胞上にて、高分子量キニノゲン、プレカリクレインならびにXII因子をも含む、多分子集合体の構築を介して、生ずると示唆している。これらのモデルは、活性化後にXIIa因子は集合体から解離し、そして長期間細胞表面に残らないことを示唆しており、例としてヤロバヤラ（前掲箇所）を参照のこと。

40

#### 【0044】

本発明は、さまざまな形態でXIIa因子が存在するという、われわれの驚くべき観察に基づいたものであり、該形態の一つは、血液中を循環する細胞の表面に、ならびにその残片に、ならびにそれから由来する細胞物質に存在するXIIa因子である。このXIIa因子形態は「細胞性XIIa因子」と呼ばれている。この観察結果は、上記に記載された、細胞表面上の多分子集合体内での活性化後にXIIa因子は該集合体から解離して細胞との結合を結けてはいないというこれまでの知見と相反する。

#### 【0045】

50

更なる観察は、X I I a 因子が細胞性である場合、すべてのX I I a 因子エピトープが、X I I a 因子が細胞性でないときと同様に入手可能であるようにみえるというわけではないことである。たとえば、モノクローナル抗体 2 / 2 1 5 は効果的に細胞性X I I a 因子ならびに非細胞性X I I a 因子に結合することができる。しかしながら、モノクローナル抗体 2 0 1 / 9 ならびに X I I a 因子に対する羊ポリクローナル抗体は、非細胞性X I I a 因子に対してと同様に細胞性X I I a 因子に対して効果的に結合できるようにはみえない。

【 0 0 4 6 】

血中で、X I I a 因子は、特に顆粒球、とりわけ顆粒球の小集団に存在しているようにみえ、該小集団はフローサイトメトリーにおいて他の顆粒球よりもわずかに高い散乱度を示し、そのことは他の小集団との形態の違いを示唆する。これらの観察は臨床的な意義を有している、下記参照。

10

【 0 0 4 7 】

脂質結合X I I a 因子

X I I a 因子がさまざまな形態で存在するというわれわれの驚くべき観察の他の局面は、あるX I I a 因子は、たとえばリポタンパク質またその残片などの脂質と会合し、ならびにこの脂質結合X I I a 因子の測定はさまざまな臨床症状に関する情報を提供するということである。

【 0 0 4 8 】

尿のX I I a 因子

X I I a 因子がさまざまな形態で存在するというわれわれの驚くべき観察の更なる局面は、X I I a 因子は尿中に存在し、ならびに尿のX I I a 因子の測定はさまざまな臨床症状に関する情報を提供するということである。

20

【 0 0 4 9 】

分子複合体ならびに他の分子種とX I I a 因子との会合

われわれの観察は、X I I a 因子の二個以上の分子は複合体形態で互いに会合可能であり、ならびにまたX I I a 因子は一種以上の分子種、たとえば抑制分子などの高親和性結合タンパク質、あるいは低親和性結合タンパク質といった、分子種と会合可能であるということを示唆する。X I I a 因子の分子複合体ならびにX I I a 因子の高親和性結合パートナーとの会合は分裂させるが、低親和性結合パートナーとの会合は分裂させないと予期される界面活性剤の存在下あるいは非存在下で、免疫検定法を実施して得られた結果はまた、分子複合体ならびに結合パートナーとの会合の存在を示唆する。

30

【 0 0 5 0 】

X I I a 因子の異なる形態の検出ならびに / あるいは測定

本発明は、試料における一種以上のX I I a 因子形態の検出あるいは測定の方法を提供し、該方法は他のX I I a 因子形態に優先して、研究中のX I I a 因子形態若しくは形態群の検出あるいは測定を可能にする手順を実施することからなる。

【 0 0 5 1 】

ある実施態様においては、本発明の方法は他のX I I a 因子形態に優先して、研究中のX I I a 因子形態若しくは形態群の測定を可能にする分析手法を用いて、研究中のX I I a 因子形態若しくは形態群を検出あるいは測定することからなる。

40

【 0 0 5 2 】

他の実施態様においては、本発明の方法は他のX I I a 因子形態から研究中のX I I a 因子形態若しくは形態群を分離すること、ならびに分離されたX I I a 因子形態若しくは形態群を検出あるいは測定することからなる。

【 0 0 5 3 】

分離されたX I I a 因子形態若しくは形態群の検出あるいは測定は、他のX I I a 因子形態に優先して、研究中のX I I a 因子形態若しくは形態群を検出できる分析手法によることができる。

【 0 0 5 4 】

50

更なる実施態様において、本発明の方法は、研究中のX I I a因子形態若しくは形態群と結合可能でありならびに所望により他のX I I a因子形態とも結合できる標識化抗体と試料を接触すること、他の形態から研究中のX I I a因子形態若しくは形態群の分離すること、ならびに研究中のX I I a因子形態若しくは形態群を検出すること又は測定することからなる。

#### 【0055】

したがって、本発明によれば、研究中のX I I a因子がまず他のX I I a因子から分離され、続いて該X I I a因子が測定され得る。X I I a因子のための一般的な分析、すなわちX I I a因子のどんな特定形態にも特異的ではない分析が用いられてもよいが、他のX I I a因子形態に優先して、研究中のX I I a因子形態若しくは形態群を測定できる分析を用いることが有利であり得る。そのような分析の例は以下に示される。そのような手順は、たとえば、細胞性X I I a因子、分子複合体、ならびにX I I a因子の他の分子種との会合などの検出あるいは測定に用いることができる。

10

#### 【0056】

もう一つの方法として、他のX I I a因子形態に優先して研究中のX I I a因子形態若しくは形態群を測定できる方法は、異なるX I I a因子形態の事前分離なしに試料に直接実施され得る。そのような分析の例が以下に示される。そのような分析は試料に直接実施され得る。そのような手順は、たとえば、分子複合体ならびにX I I a因子の他の分子種との会合の検出あるいは測定に用いられ得る。

#### 【0057】

更なる別の方法は、X I I a因子形態を含む試料を、標識化抗体と接触させ、その後、分離された形態の検出あるいは測定を伴って、研究中のX I I a因子形態若しくは形態群の分離を実施することもできる。そのような手順はたとえば脂質結合X I I a因子の検出あるいは測定に使用され得る。

20

#### 【0058】

##### X I I a因子形態の分離

X I I a因子形態はそれらの物理的、化学的あるいは免疫学的な特性に基づいて分離され得る。そのような分離はすべて、一般に、研究中のX I I a因子形態若しくは形態群が変わらずに維持されるというような条件で実施されなければならない、たとえば、その条件は、複合体あるいは分子会合のいずれも分裂されず、ならびに細胞又は脂質物質などの他の物質に結合しているX I I a因子のいずれの形態もそれら他の物質から解放されないようなものでなければならない。しかしながら、ある状況では、会合あるいは結合している分子からX I I a因子の解放が望ましい場合もあり得る。

30

#### 【0059】

##### 物理的特性に基づく分離

異なるX I I a因子形態は、たとえば、高速液体クロマトグラフィー（H P L C）といったクロマトグラフィー法、フローサイトメトリー又は超遠心分離手法を用いて分子量に基づいて分離することができ、その後、分離された物質の分析が行われ得る。

#### 【0060】

分析は、たとえば分離された形態の免疫検定法の使用、あるいはS 2 3 0 2（英国、オックスブリッジ、カピ ダイアグノスティックス社）のような発色基質を用いた酵素測定の使用といった、数種の方法で行うことができる。X I I a因子に対する抗体はH P L Cとともに使用され得る。たとえば、標識化抗体は試料と反応させることができ、ならびに結果として生じた混合物はH P L C分離に付すことができる。X I I a因子の特定形態との抗体の複合体は、その後、抗体の標識に使用された物質への適切な検出システムを用いて測定することが可能である。

40

#### 【0061】

物理的特性に基づく、分子複合体ならびにX I I a因子の結合パートナーとの会合の分離、とりわけ、他のX I I a因子形態から、X I I a因子の二つ以上の分子からなる分子複合体を分離するための、ならびに高親和性あるいは低親和性結合パートナーと会合してい

50

る X I I a 因子形態の分離のための方法のような方法が、有用であり得る。

【 0 0 6 2 】

一般に、X I I a 因子複合体が分裂されず、ならびに X I I a 因子が結合パートナーから解離されないような条件下で、そのような分離を実施することが好ましい。たとえば、一般に、複合体やいくつかの分子会合を分裂させる傾向がある界面活性剤の存在を避けることが好ましい。しかしながら、ある状況下では、分裂の発生が好ましい場合もある。たとえば、低親和性結合パートナーからの X I I 因子の解放、あるいは高親和性結合パートナーと会合した X I I a 因子から低親和性結合パートナーと会合した X I I a 因子の分離が望まれる場合、界面活性剤などの適切な条件が使用され得、高親和性結合パートナーからではなく、低親和性結合パートナーからの X I I a 因子の解離が達成される。

10

【 0 0 6 3 】

物理的あるいは化学的特性に基づく、細胞性 X I I a 因子ならびに脂質結合 X I I a 因子の分離

細胞性ならびに脂質結合 X I I a 因子は物理的又は化学的方法、あるいはその組み合わせによって他の X I I a 因子から分離され得る。たとえば、細胞性 X I I a 因子は遠心分離法あるいはフローサイトメトリーによって分離され得る。脂質結合 X I I a 因子は、たとえばリポタンパク質沈殿剤ならびに、一般には遠心分離法によって、あるいは密度層超遠心分離法によって分離され得る。

【 0 0 6 4 】

一般に、X I I a 因子が細胞性あるいは脂質物質から解離されないような条件下で、分離を行うことが好ましい。たとえば、一般に、界面活性剤の存在を避けることが好ましい。しかしながら、ある状況では、分裂の発生が好ましい場合がある。結合している物質から X I I a 分子が分離することが望ましい場合に、適切な条件が使用され得る。

20

【 0 0 6 5 】

免疫学的分離

研究中の X I I a 因子形態若しくは形態群は、研究中の X I I a 因子形態若しくは形態群に対する優先的な結合を示す抗体を用いた、免疫学的手法を用いて他の形態と分離され得る。たとえば、免疫親和性クロマトグラフィーが実施され得、抗体は適切な固定票に固定化されている。結合あるいは非結合画分における酵素活性の測定はクロマトグラフィーの後に実施され得る。それらの使用において好まれる抗体は、免疫検定法に関連する以下の記載の通りである。

30

【 0 0 6 6 】

物理的あるいは化学的特性に基づく分離に関する上記の記載の通り、免疫親和性クロマトグラフィーによる分離は、一般に、たとえば複合体あるいは会合が分裂せずならびに結合分子が解放されないといった、X I I a 因子形態若しくは形態群が変化せずに維持されるような条件下で実施されるべきである。しかしながら、分裂が望ましい状況が起こることもある。その場合には、適切な条件が使用され得る。

【 0 0 6 7 】

分析の適合性の測定

X I I a 因子の検出あるいは測定方法は知られており、ならびにアミド分解分析のような発色分析又は、以下により詳細が示されているような、さまざまな免疫学的方法を含む。

40

【 0 0 6 8 】

分析が実施される前に研究中の X I I a 因子形態若しくは形態群が他の X I I a 因子形態から分離されている場合、異なる X I I a 因子形態を区別しない分析、すなわち「一般的な」X I I a 因子の分析が使用され得る。しかしながら、たとえ事前分離ステップの後においても、他の形態と比べて優先的に研究中の X I I a 因子形態若しくは形態群を検出あるいは測定できる分析の使用が有利であり得る。

【 0 0 6 9 】

分離ステップが実施されない場合には、使用される分析は研究中の X I I a 因子形態若しくは形態群の検出あるいは測定が可能なものでなくてはならない。X I I a 因子の検出あ

50

るいは測定に適切であると知られる分析は、試料中の望ましいX I I a 因子形態若しくは形態群の検出あるいは測定の能力を試験されることもある。

【0070】

たとえば、細胞性X I I a 因子を含むことが知られる試料を使用して、研究中の分析のために得られた結果は、細胞性X I I a 因子の検出に適すると知られる分析を用いて得られた結果と比較される。モノクローナル抗体2 / 2 1 5 は細胞性X I I a 因子と効果的に結合することができる。m A b 2 / 2 1 5 あるいはその類似体を含む免疫検定法は、比較分析として使用することもできる。同様の考慮事項が他のX I I a 因子形態にも当てはまる。

【0071】

他の手段は、たとえば細胞性X I I a 因子などの望ましいX I I a 因子形態を含むと知られる試料の一部に、研究中の分析を実施することである。その場合、試料は非細胞性X I I a 因子を含むべきではない。試料の他の一部は細胞からX I I a 因子を解放する処理がなされ、処理された細胞は単離され、該分析が繰り返され、ならびに二つの分析から得られた結果が比較される。細胞性X I I a 因子を含む試料に対する分析から得られた結果が、細胞性X I I a 因子を除去する処置をした試料から得られた結果よりも高い場合、その分析は細胞性X I I a 因子の検出あるいは測定に適していることを示す。同様の考慮事項が他のX I I a 因子形態にも当てはまる。

10

【0072】

一種以上のX I I a 因子形態の分析に関する特異性ある分析法の他の形態に対する一種以上のX I I 因子形態への特異性は、該分析法の設計によって達成されあるいは改善され得る。該分析法におけるパラメーターは、研究中のX I I a 因子形態若しくは形態群が他のX I I a 因子形態と比べて優先的に検出あるいは測定されるように、調節され得る。

20

【0073】

そのような分析法の最適化は、技術的に標準的技法であり、適切な技法は周知であり、たとえば以下の資料を参照されたい：免疫検定法の原理ならびに実践，プリンスC P 及びニューマンD J 編，ストックトンプレス、1991。

【0074】

免疫検定法の場合において、望ましい特異性を獲得するために調節することが可能なパラメーターは、使用される抗体あるいは抗体の組み合わせの選択；界面活性剤の存否及び選択；ならびに固相にコートされた抗体を含む抗原捕獲分析の場合の、プレートコーティングに使用される条件の、一種以上を含み得る。

30

【0075】

たとえば、マイクロタイタープレート免疫検定法の場合、他の形態に対し優先的にX I I a 因子の特定形態を測定するために変えることができる多くのパラメーターが存在する。

【0076】

一つの例は、捕獲抗体の選択に関するもので、たとえば、m A b 2 / 2 1 5 が使用されるか、あるいは、異なるX I I a 因子形態を優先的に検出する、m A b 2 0 1 / 9 又はm A b 2 / 1 5 択一的使用などがある。

40

【0077】

捕獲抗体で固相をコーティングするために使用される溶液の処方もまた、異なるX I I a 因子形態の優先的な測定に作用し、たとえば、処方に含まれる抗体の濃度、ならびにp H ならびにバッファの構成成分は重要である。

【0078】

どの形態が優先的に測定されるかに影響する更なるパラメーターは、抗体と培養する間の試料における、たとえばトリトンなどの界面活性剤の存在あるいは不存在である。界面活性剤の存在は、X I I a 因子分子複合体などの複合体を分裂させ、ならびに/あるいは前もって細胞ならびに/あるいは脂質に結合したX I I a 因子を解放すると仮定されている。界面活性剤の性質ならびに/あるいは量も、分析に影響し得る。

50

## 【0079】

X I I a 因子の特定形態の優先的な測定に作用するために操作されうるパラメーターの異なる例は、抗体 - 抗原複合体の検出に使用される接合体を形成するために標識化される抗体の選択である。

## 【0080】

分析パラメーター間に複雑な相互作用が存在すること、たとえば、分析に界面活性剤を組み込む効果は、捕獲抗体、コートされた抗体濃度、コーティングバッファー、ならびに使用される接合体抗体の組み合わせに依存することが留意されるべきである。望ましい X I I a 因子形態の検出と分析に最適な条件は、技術的に一般的な技法にしたがって、さまざまなパラメーターの適切な操作によって決定され得る。

10

## 【0081】

試料と試料調製

試料

異なる X I I a 因子形態の測定は、全血、血漿、血清、尿、脳脊髄液、唾液又は涙液、といった体液の試料；あるいは、体液から分離された細胞、すなわち、生体内で存在している液相から実質的に解放された細胞からなる試料；あるいは、組織又は組織試料から得られた細胞からなる試料に対して実施され得る。

## 【0082】

試料調製

試料は一般的な技法を用いて得られならびに調製され得、たとえば以下を参照のこと：ヤング，D．S．ならびにベルメス，E．W．，「試料の採集と加工」，臨床化学のティーツテキストブック 第二版」，パーティス，C．A．ならびにアシュウッド編，E．R．，サウンダース（1994）、また、酵素学の手法，H．ヴァン ヴナキスならびに J．J．ランゴン（編者），1981，72（B）；酵素免疫検定法の実践と理論，P ティッセン，生化学ならびに分子生物学の実験テクニク，R．J．バーデンならびに P．H．ヴァン ニッペンバーグ（編者），エルセビア，1985；放射性免疫検定法の手引きと関連テクニク，T．チャード，同書，第三版，1987；ならびに、酵素学の手法、H．ヴァン ヴナキスならびに J．J．ロンゴン（編者）1981，74（C）。

20

## 【0083】

体液

本発明によれば、一種以上の X I I a 因子形態が体液試料内で検出あるいは測定され得る。体液試料は全血、血漿、血清、尿、脳脊髄液、唾液ならびに涙液である。体液試料は、たとえば上記の参考文献に記載されているように、従来の方法によって得られならびに調製され得る。

30

## 【0084】

他の形態に優先して、X I I a 因子の特定形態の選択的な測定は、以下の分析の項に記載されるのと同様に達成され得る。

## 【0085】

細胞性 X I I a 因子

ある実施態様では、本発明は、哺乳類対象から、一般にはヒトから得られた細胞、特に血液あるいは他の体液中を循環する細胞からなる試料における X I I a 因子の検出あるいは測定からなる方法を提供する。

40

## 【0086】

細胞性 X I I a 因子の測定は体液試料で実施され得、あるいは細胞性 X I I a 因子の測定分析よりも前に細胞は全血や血漿などの体液試料から単離され、すなわち、生体中で存在する液相から実質的に解放され得る。あるいは、細胞は組織試料から得られ得る。

## 【0087】

使用される分析法が細胞性ならびに非細胞性 X I I a 因子の双方の検出あるいは測定を可能とする場合、細胞からなる試料における分析を実施すると、細胞に結合した被検体ならびに非細胞性被検体の双方が検出あるいは測定される。しかしながら、分析が単離された

50

細胞試料に対して実施される場合、その結果は細胞性検体についてのみとなる。本願において、「細胞からなる試料」という用語は、細胞からなる体液試料と、単離された細胞の試料の双方を意味するために用いられる。

【0088】

細胞残片ならびに細胞物質などの細胞は、たとえば、上記「X I I a 因子形態の分離」に記述されているように、単離され得る。たとえば、細胞は遠心分離法ならびに洗浄によって単離され得る。好ましくは、細胞は少なくとも1回、好ましくは、2回以上の遠心分離ならびに洗浄を行う。遠心分離は一般に、細胞が浮遊物から分離できる個々のペレットを成形するのに十分に高いg力をもって、実施されるべきである。ペレットは、たとえば、細胞から細胞性X I I a 因子の解離を起こさないような、細胞性X I I a 因子に影響を与えない適切な溶剤で洗浄され得る。

10

たとえば、フォスファターゼ バッファー 生理食塩水pH7.4は洗浄に、あるいは検出のための細胞の懸濁に、あるいはX I I a 因子の検出ならびに/あるいは測定に使用され得る。フローサイトメトリーは細胞の単離に使用され得る。

【0089】

細胞性X I I a 因子が、分析が実施される前に他のX I I a 因子形態から分離されている場合、細胞性X I I a 因子と他のX I I a 因子形態とを区別しない分析法、すなわち「一般的な」X I I a 因子分析法を使用され得る。しかしながら、事前分離ステップの後においても、他の形態と比べて選択的に細胞性X I I a 因子を検出あるいは測定できる分析を使用することが有利であり得る。

20

【0090】

分離ステップが実施されていない場合、用いられる分析は、研究中の細胞性X I I a 因子の検出あるいは測定が可能なものでなければならない。X I I a 因子のためのさまざまな分析法が下記に記載される。

【0091】

組織試料中の、細胞性X I I a 因子の存在は、免疫組織学的手法を用いて検出され得る。たとえば下記に記述されているような、たとえば蛍光標識のような適切な標識を用いて標識化されたモノクローナル抗体が使用され得る。

【0092】

ある場合には、X I I a 因子よりむしろX I I 因子が測定されることもある。

30

【0093】

脂質結合X I I a 因子

本発明は、組織、あるいは、特に、哺乳類対象から、一般にはヒトから得られた体液からなる試料中における、脂質結合X I I a 因子の検出あるいは測定からなる方法を提供する。

【0094】

脂質結合X I I a 因子の測定は、たとえば血液、血漿のような体液試料について実施される。あるいは、脂質画分を体液あるいは組織から単離し、該脂質画分を含むX I I a 因子を測定する。脂質画分は上記「X I I a 因子形態の分離」項に記載されているように分離され得る。たとえば、リポタンパク質は組織や血漿などの体液から、たとえば沈殿などによって単離され得る。リポタンパク質沈殿のための適切な試薬は公知であり、たとえば塩化ナトリウム、塩化マンガン又はヘパリンを含む試薬、及びタングストリン酸塩を含む試薬を包含する。さまざまな試薬ならびに方法が、デマッカー、P. N. M.ら、臨床化学、43巻、4号、1997、663-668頁、ならびに、シャーマ、A.ら、臨床化学、36巻、3号、1990、529-532頁、に記載される。

40

【0095】

血漿のような試料は、細胞成分の除去のために、たとえば12,000から16,000gの中程度から高速スピードで、遠心分離にかけることができる。リポタンパク質は、たとえば塩化ナトリウム、塩化マンガン、ならびにヘパリン(約500mN塩化ナトリウム、約215mN塩化マンガン、ならびに約500U/mlヘパリン)などの公知のリポタ

50

ンパク質沈殿剤を用いて、あるいは、タンゲストリン酸塩沈殿剤（約500mMタンゲストリン酸塩と一般には塩化マグネシウムからなる）を用いて、沈殿させ得る。

【0096】

結果として生じた沈殿物は、たとえば遠心分離によって単離され得る。所望であれば、沈殿物は沈殿剤に再懸濁され、ならびにもう一度単離されることもある。この手順は、所望であれば2回か3回、反復されることもある。洗浄は沈殿ステップの間に実施されることもある。

【0097】

分析の実施前に、すでに脂質結合XIIa因子が他のXIIa因子形態から分離されている場合、異なるXIIa因子間を区別しない分析法、すなわち「一般の」XIIa分析法が使用され得る。しかしながら、事前分離ステップの後においても、他のXIIa因子と比べて優先的に脂質結合XIIa因子を検出あるいは測定できる分析法を使用することが有利であり得る。

10

【0098】

分離ステップが実施されていない場合、使用される分析は脂質XIIa因子の検出あるいは分析が可能なものでなければならない。

【0099】

免疫検定法の場合、リポタンパク質画分は試料が抗体と接触させる前後に単離され得る。抗体接触後に脂質画分を単離することが有利であり得る。

【0100】

分子複合体ならびにXIIa因子の他の分子種との会合  
分子複合体ならびにXIIa因子の他の分子種との会合を含む試料、一般に、体液試料は、上記に示した一般的な技法による分析のために調製され得る。

20

【0101】

所望であれば、XIIa因子の二個以上の分子あるいは低親和性又は高親和性結合パートナーと会合しているXIIa因子形態からなる分子複合体は、上記「XIIa因子形態の分離」項に記載されたように、XIIa因子への分析が実施される前に、分離することができる。たとえば、低親和性結合パートナーに結合したXIIa因子、低親和性結合パートナーに結合したXIIa因子、低親和性結合パートナーに結合したXIIa因子の断片、高親和性結合パートナーに結合したXIIa因子、高親和性結合パートナーに結合したXIIa因子、ならびに高親和性結合パートナーに結合したXIIa因子の断片、が分離され得る。

30

【0102】

XIIa因子の二個以上の分子あるいは低親和性又は高親和性結合パートナーに結合しているXIIa因子形態からなる分子複合体が、分析が実施される前にすでに他のXIIa因子形態と分離されている場合、該XIIa因子形態と他のXIIa因子形態とを区別しない分析、すなわち、「一般的な」XIIa因子分析法が使用され得る。しかしながら、事前分離ステップの後においても、他の形態と比べて優先的に該XIIa因子形態の検出あるいは測定ができる分析を用いることが有利であり得る。

【0103】

他の形態から優先的に研究中のXIIa因子の形態若しくは形態群を検出あるいは測定できる分析法は、研究中のXIIa因子形態若しくは形態群の分離を先に行うことなく、使用され得る。

40

【0104】

適切な分析法、特に、免疫検定法が以下に記載される。

【0105】

免疫検定法

本発明に従い、免疫検定法は、他の形態に優先して一種以上のXIIa因子形態の検出あるいは測定に使用され得る。免疫検定法は、本発明によるあらゆる試料に関して用いられ得る。

50

## 【0106】

## 一般的な免疫学的手法

免疫検定法の実施手法は周知であり、たとえば以下の例を参照のこと：ヤング，D．S．ならびにベルメス，E．W．，「試料の採集と加工」，臨床化学のティーツテキストブック 第二版」，パーティス，C．A．ならびにアシュウッド編，E．R．，サウンダース（1994）、また、酵素学的手法，H．ヴァン ヴナキスならびにJ．J．ランゴン（編者），1981，72（B）；酵素免疫検定法の実践と理論，P．ティッセン，生化学ならびに分子生物学の実験テクニック，R．J．バーデンならびにP．H．ヴァン ニッペンバーグ（編者），エルセビア，1985；放射性免疫検定法の手引きと関連テクニック，T．チャード，同書，第三版，1987；ならびに、酵素学的手法、H．ヴァン ヴナキスならびにJ．J．ロンゴン（編者）1981，74（C）。

10

## 【0107】

定性的ならびに定量的双方の免疫学的検定手法は、ELISA（酵素結合免疫吸着分析）、ウェスタンブロット、流体相沈殿分析、被覆粒子分析、競合分析、正、逆、及び同時サンドウィッチ分析などのサンドウィッチ分析、ならびに、固相放射線免疫検定法（SPRIA）を含む。

## 【0108】

抗原 - 抗体複合体は、たとえば以下に記載の方法、あるいは標識化抗体によって直接的に検出され得る。

## 【0109】

## 二重抗体サンドウィッチ分析

本発明に従い使用されるELISA形式の例は、いわゆる「二重抗体サンドイッチ」分析であり、該分析においては、一種以上のXIIa因子形態に結合できる抗体、特にモノクローナル抗体は、プラスチックマイクロタイタープレートのウェル、又は、米国，イリノイ州，アボットパークのアボットラボラトリーズのIMxシステムなどの特許システムで用いられるようなビーズ、粒子などの、プラスチック又は他のポリマー物質といった固相支持体上に固定化される。この抗体は「捕獲抗体」と呼ばれる。試料は固定化された捕獲抗体と接触して培養される。固定化された抗体に結合できるXIIa因子形態のいずれも、固定化された抗体によって「捕獲」され、それゆえにそれ（XIIa因子）自体が固相上に固定化される。固相上に捕獲されたXIIa因子は、一種以上のXIIa因子形態に結合できる標識化抗体を用いて検出される。この標識化抗体はしばしば抗体「接合体」と呼ばれる。抗体ならびに/あるいは他の分析条件の注意深い選択によって、他の形態よりもXIIa因子の一種以上の特定形態を優先的に計測、検出ならびに/あるいは測定するように分析法を最適化することができる。

20

30

## 【0110】

## 標識化抗体

標的抗原の検出あるいは検出ならびに/あるいは測定に使用される標識化抗体は、ポリクローナルあるいはモノクローナルであり得る。抗ヒトポリクローナル抗体のような抗ヒト抗体は、しばしば臨床応用における標識化抗体としての使用において都合がよい。あるいは、研究中のXIIa因子形態に結合した抗体が使用され得る。そのような抗体は、たとえば、XIIa因子の重鎖、XIIa因子、あるいはXIIa因子の断片に結合することができる。

40

## 【0111】

標識は直接的あるいは間接的に検出可能であり得る。あらゆる適切な放射性同位体が、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>3</sup>Hもしくは<sup>14</sup>Cなどのエミッター又はエミッターなどの直接検出可能標識として使用され得る。商業使用においては、非放射性標識、一般には酵素標識が好まれる。酵素標識は間接的に検出され得る。酵素標識は、たとえばアルカリホスフォターゼ、又はホースラディッシュパーオキシダーゼのようなパーオキシダーゼである。フェノールフタレインモノホスフェートのような検出可能な光学あるいは蛍光的变化をもたらす基質、もしくは4 - メチルアンベリフェリルホスフェートのような蛍光性基質といった、選

50

ばれた酵素のための適切な基質が使用される。あるいは、電気化学的手法を用いて追跡できる、酵素反応が使用されることもある。

【0112】

標識化抗体は、抗原 - 抗体複合体の検出のために E L I S A などにおいて用いられるか、あるいは抗原との複合体を形成し、該複合体はその後検出される。フローサイトメトリーが検出に使用し得る。

【0113】

競合分析

放射能標識化あるいは酵素標識化されている、一種以上の X I I a 因子形態は、一種以上の X I I a 因子形態の測定のための競合分析において使用される。

10

【0114】

X I I a 因子の免疫検定法

X I I a 因子の免疫検定法の例は、国際公開第 90 / 08835 号パンフレットに記載された捕獲分析である。優先的に一種以上の X I I a 因子形態の検出あるいは測定をするために、特に捕獲抗体として、m A b 2 / 215 あるいはその類似体を使用することが推奨されている。ポリクローナル抗体あるいは異なるモノクローナル抗体などの異なる抗体が、研究中の X I I a 因子形態の検出あるいは / ならびに測定に使用され得、あるいは同一の抗体が使用され得る。抗体ならびに / あるいは分析条件の選択ならびに / あるいは操作は、他の形態よりも一種以上の X I I a 因子形態の検出ならびに / あるいは検出の測定を優先的に可能にする。

20

【0115】

更なる免疫学的検定手法

抗原の検出あるいは測定に関する更なる免疫学的検定手法は、結果として生じた抗原 - 抗体複合体の直接検出を利用する。そのような方法の例は、表面プラズモン共鳴法、表面弾性波法、ならびに水晶振動子微量天秤法である (スズキ M, オザワ F, スギモト W, アソウ S. Anal Bioanal Chem 372: 301-4, 2002; ペアソン J E, ケーン J W, ペトラキ - カリオティ I, ジル A, ヴァドグマ P. J Immunol Methods; 221: 87-94, 1998; ウエイシュ W, クレイン C, フォン シックフス M, フンクリンガー S. Anal Chem 199668: 2000-4, 1996; チョウ S F, ス W L, ウアン J M, チェン C Y. Clin Chem 48: 913-8, 2002)。

30

【0116】

標識化抗体が抗原と複合体を形成する場合、該複合体はフローサイトメトリーによって検出あるいは測定され得る。

【0117】

標準物質ならびにコントロール物質

免疫検定法は一般に基準点として「標準物質」が用いられる。

【0118】

一種以上の X I I a 因子形態の検出あるいは検出ならびに / あるいは測定のための分析に適する標準物質は、X I I a 因子の一種以上の適切な形態を既知量含む溶液から典型的になり得る。あるいは、標準物質は、固相のような支持物質に結合した、X I I a 因子の適切な一種以上の形態からなり得る。

40

【0119】

標準物質ならびにコントロール物質としての役割として用いた物質は、用いられる分析によってさまざまな形態を取ることができる。ある分析形式においては、適切な物質は水溶液に存在することもある。X I I 因子あるいはその断片は、さまざまな X I I a 因子形態を含む。他の形式において、同一の抗体が E L I S A において捕獲ならびに検出 (接合体) 抗体として使用される場合、たとえば直径 3 μ M のポリカーボネートビーズのようなビーズの表面に X I I a 因子を結合することによって、さまざまな X I I a 因子形態を含む多重の X I I 因子分子あるいはその断片を含む構築物を作り出すことが望ましい。

50

## 【0120】

脂質結合XIIa因子の検出あるいは検出ならびに/あるいは測定のための分析に適する標準物質は、脂質結合XIIa因子の既知量を含む溶液から典型的になる。あるいは、標準物質は、固相などの非脂質支持物質に結合したXIIa因子からなり得、あるいはXIIa因子の水溶液を標準物質として使用され得る。

## 【0121】

尿のXIIa因子の検出あるいは検出ならびに/あるいは測定のための分析に適する標準物質は、XIIa因子の既知量を含む溶液から典型的になる。

## 【0122】

免疫組織学

組織試料におけるXIIa因子形態若しくは形態群の存在は、免疫組織学的手法を用いて検出することができる。たとえば、蛍光標識のような適切な標識で標識化させた、上記に記載されたモノクローナル抗体を使用することができる。典型的には、標識化抗体は、組織試料と接触ならびに培養され、試薬はその後、形成された抗体-抗原複合体が分裂しない条件下で洗浄除去され、そしてそのような複合体のいずれも検出される。

10

## 【0123】

発色分析

一つ以上のXIIa因子形態の検出あるいは測定は、たとえば、ヴィナツァー H. , Thromb Res. , 14 , 155 - 66 , 1979に記載されたような、発色基質を用いて、その酵素活性を測定することにより実施される。

20

## 【0124】

この分析法は、一種以上のXIIa因子形態が他の形態から単離されるステップを含む、上記参照。

## 【0125】

細胞性XIIa因子の免疫検定法

細胞は、細胞から細胞性XIIa因子の解離を引き起こすことのないような、細胞性XIIa因子に影響しない適切な溶剤を用いて、好ましくは少なくとも1回ならび特に2回あるいは3回の遠心分離及び洗浄によって、血液や血漿などの体液から単離することができる。適切な液体は一般に、たとえばホスフェートバッファ生理食塩水(PBS)をpH7.4にしたようなバッファである。

30

## 【0126】

細胞からなる体液試料は洗浄され、高速で遠心分離され、そして「洗浄細胞」を与える適切な液体中に懸濁され得る。高速遠心分離の例は10分間に16,000gである。適切な洗浄ならびに懸濁液体の実施例はpH7.4のPBSである。1回以上、たとえば2回あるいは3回あるいはそれ以上の、遠心分離の反復を実施することができる。

## 【0127】

濃細胞血漿は、たとえば血液を高速遠心分離することによって、たとえば10分間1000gの速度でクエン酸塩添加血液を遠心分離することによって得ることができる。濃細胞血漿に対する更なる遠心分離、たとえば16,000gでの10分間の遠心分離などの、高速遠心分離は、希細胞血漿とよばれる上清を与える。

40

## 【0128】

試料として濃細胞、希細胞、ならびに洗浄細胞を用いた二重抗体サンドイッチ分析に対して、捕獲ならびに検出抗体の双方としてmAb2/215あるいはその類似体を使用することにより、希細胞血漿についての最小応答とともに、洗浄細胞について最大応答が得られる。対照的に、捕獲抗体としてmAb2/215あるいはその類似体を使用するとともに、ポリクローナル抗体を検出抗体として使用した際には、濃細胞ならびに希細胞の双方についてかなりの応答が得られ、しかしながら洗浄細胞については最小応答となる。

## 【0129】

更なる免疫検定法ならびにフローサイトメトリー実験は、該結果を確認する。それらの結

50

果は、X I I a 因子が細胞表面の上に存在する時に、m A b 2 0 1 / 9 に結合している X I I a 因子の上のエピトープは結合能力がより少ないのに対して、X I I a 因子が細胞性であるときに m A b 2 / 2 1 5 は X I I a 因子の上でエピトープに結合する、ということを示している。

【 0 1 3 0 】

脂質結合 X I I a 因子の免疫検定法

免疫検定法は m A b 2 / 2 1 5 あるいはその類似体あるいは F a b 断片のようなその断片を用いて実施することができる。捕獲分析において、捕獲抗体として m A b 2 / 2 1 5 あるいはその類似体を使用することが好ましい。異なる抗体、たとえばポリクローナル抗体あるいは異なるモノクローナル抗体、あるいは同じ抗体が、検出に使用され得る。

10

【 0 1 3 1 】

放射線免疫検定法のような直接的免疫検定法が使用され得る。その場合、m A b 2 / 2 1 5 あるいはその類似体あるいは F a b 断片のようなその断片を使用することが好ましい。適切な標識の例は上記に与えられている。

【 0 1 3 2 】

リポタンパク質画分は試料が抗体と接触する前あるいは後に単離され得る。抗体との接触後にリポタンパク質画分を単離することが有利であり得る。リポタンパク質画分は上記「試料調製」項に記載されたように単離される。

【 0 1 3 3 】

免疫検定法に変わるものとして、脂質結合 X I I a 因子の検出ならびに / あるいは測定が、*Vinayakumar H., Thromb Res., 14, 155-66, 1979* に記載されているような発色基質を用いてその酵素活性を測定することによって実施され得る。これは上記に記載されているような、一種以上の種が他の種から単離される段階を含む。

20

【 0 1 3 4 】

f o r m f r o m

分子複合体ならびに他の分子種と X I I a 因子の会合に対する免疫検定法

免疫検定法は、他の X I I a 因子形態から分子複合体ならびに他の分子種と X I I a 因子の会合の分離後に、あるいはそのような分離をしない試料において、実施され得る。たとえば、所望であれば、X I I a 因子の二個以上の分子、あるいは低又は高親和性結合パートナーと会合している X I I a 因子形態からなる分子複合体は、X I I a 因子の分析が実施される前に、上記「X I I a 因子形態の分離」項に記載されているように分離され得る。

30

たとえば、低親和性結合パートナーに結合している X I I a 因子、低親和性結合パートナーに結合している X I I a 因子、低親和性結合パートナーに結合している X I I a 因子断片、高親和性結合パートナーに結合している X I I a 因子、高親和性結合パートナーに結合している X I I a 因子断片、などが分離され得る。

【 0 1 3 5 】

上記に記載されたあらゆる免疫検定法は X I I a 因子の分子複合体ならびに他の分子種との会合の測定に使用され得る。上記に記載されているように、抗体として、とりわけ、捕獲免疫検定法における捕獲抗体として、m A b 2 / 2 1 5 あるいはその類似体を使用することがしばしば好ましい。検出に使用される標識化抗体は、捕獲された X I I a 因子形態に結合できなくてはならない。たとえば、標識化抗体は X I I a 因子の重鎖、X I I a 因子、あるいは X I I a 因子の断片に結合することができる。

40

【 0 1 3 6 】

尿の X I I a 因子に対する免疫検定法あるいは他の分析

上記に記載されたあらゆる免疫検定法は、他の形態と比較して優先的に、尿中の一種以上の X I I a 因子形態の測定に使用され得る。上記に記載されたように、m A b 2 / 2 1 5 あるいはその類似体を抗体として、とりわけ、捕獲免疫検定法における捕獲抗体として使

50

用することが一般に好ましい。

【0137】

キット

本発明はさらに本発明の免疫検定法を実施するためのキットを提供し、そのキットは、以下の各々別の容器内にあるか、あるいは区画化されている、以下のものからなる：

(i) 一種以上のX I I a 因子形態に結合できるモノクローナル抗体、たとえば、m A b 2 / 2 1 5 あるいはその類似体、あるいはm A b 2 / 2 1 5 又はその類似体と同様あるいは類似のX I I a 因子結合特性を持つ、他のモノクローナル抗体、ならびに

(i i) 一種以上のX I I a 因子形態が ( i ) で定義されたモノクローナル抗体に結合している場合に、一種以上のX I I a 因子形態に結合できる標識化抗体。

10

【0138】

前記キットは、上記に示したような、免疫検定法を実施するための更なる成分を含み得る。モノクローナル抗体は、固体支持体に固定化され得る。

【0139】

本発明によるキットは、たとえば以下のものからなり得る。

a) 一種以上のX I I a 因子形態に結合できるモノクローナル抗体、たとえば、m A b 2 / 2 1 5 あるいはその類似体、あるいはm A b 2 / 2 1 5 又はその類似体と同様あるいは類似のX I I a 因子結合特性を持つ、他のモノクローナル抗体、

( b ) 一種以上のX I I a 因子形態を既知量含む溶液からなる典型的な標準物質、

( c ) 一種以上のX I I a 因子形態が ( i ) で定義されたモノクローナル抗体に結合している場合に、一種以上のX I I a 因子形態と反応できる標識化抗体。

20

【0140】

標準物質ならびにコントロール物質としての役割として用いた物質は、用いられる分析によってさまざまな形態を取ることができる。ある分析形式においては、適切な物質は水性溶液に存在することもある。X I I 因子あるいはその断片は、さまざまなX I I a 因子形態を含む。他の形式において、同一の抗体がE L I S A において捕獲ならびに検出(接合体)抗体として使用される場合、たとえば直径3 μ M のポリカーボネートビーズのようなビーズの表面に X I I a 因子を結合することによって、さまざまなX I I a 因子形態のような多重のX I I 因子分子あるいはその断片を含む構築物を作り出すことが望ましい。

【0141】

更なる標準物質の例は上記に示されている。あるいは、キットは、競合分析に用いるために、標識化されたX I I a 因子形態からなることもある。

30

【0142】

キットはまた、それぞれ別の容器内にある更なる成分、たとえば、希釈剤、洗浄試薬溶液、ならびに基質溶液などを含む。

【0143】

分析デバイス

本発明はまた、本発明の分析法を実施するための適切な分析デバイスをも提供する。「分析デバイス」という用語は、ここで、適切な捕獲抗体を固定化した固相、一般には、メンブレン、シート、ストリップ、コーティング、フィルムあるいは他の層状手段のような層状固相からなる、免疫検定法の実施のための手段を表すために使用される。固定化された抗体は、好ましくは、本願において、「抗原捕獲ゾーン」と呼ばれる、定義されたゾーン内に存在する。

40

【0144】

分析デバイスは、堅い支持体あるいはハウジング内に固相を組み込むことができ、該固相はまた、分析の実施に必要ないくつかあるいはすべての試薬を含むこともできる。試料は一般に、所定の試料適用ゾーンで、たとえば該ゾーン上への試料の注入あるいは滴下によって、あるいは、試料中にデバイスの適当部分を浸すことによって、分析デバイスに適用される。試料適用ゾーンが抗体捕獲ゾーンとは異なる場所の場合、デバイスの配置は一般に、試料中の抗原が抗体捕獲ゾーンに移動するようなものとなる。必須試薬は、それから

50

適切な順番で指定の適用ゾーンへ投入され、該ゾーンは試料適用ゾーンと同一でも同一でなくてもよい。さらに、前記のあるいはいずれかの試薬適用ゾーンが抗体捕獲ゾーンとは異なる場所の場合、デバイスの配置は一般に、試薬が抗体捕獲ゾーンに移動するようなものであり、該ゾーンで形成された抗原-抗体複合体が検出される。免疫検定法に必須なあらゆるあるいはいくつかの試薬は、液体あるいは乾燥形態としてデバイスに組み込むことができる。その場合、デバイスは一般に、異なるデバイスパーツ間の相互作用（該相互作用はデバイス操作の間に自動的に起こり得る、又はデバイスの使用者によってもたらされ得る）が、さまざまな試薬を実施される免疫検定法のための正しい順序でお互いに接触させるように、配置される。

【0145】

各種さまざまな分析デバイスが免疫検定法の文献に記載されている。メンブレンデバイスの例は、米国特許第4,623,461号明細書ならびに第4,693,984号明細書に記載されている。それらの設計と反応スピードによって、ある分析デバイスは「ディップスティック (dipsticks)」デバイスと呼ばれ、ならびにあるものは「迅速分析」デバイスと呼ばれる。「迅速分析」デバイスは、一般に、試料適用10分以内で結果を提供する。（典型的なマイクロタイタープレートあるいはビーズ分析は培養ステップを必要とし、ならびに一般に結果を提供するのに少なくとも1時間を要する）。それゆえ、分析デバイスは一般にマイクロタイターやビーズ形式の分析法よりも高価ではあるものの、それらはたとえば緊急治療の場合のように結果が迅速に要求されるような、臨床試験においてとりわけ用いられる。

【0146】

分析デバイスは、複雑な実験設備を必要としない、あるいはどんな実験設備でさえも必要とせずに使用できるという特別な利点を持っている。それゆえに、それらは「ポイント・オブ・ケア (Point of care)」テストに使用され、たとえば、緊急治療室で、医師の手術中に、薬局で、あるいはあるケースでは家庭内のテストにおいて使用される。それらは特に、実験設備が少なく、又、遠く離れている地域で特に有用である。

【0147】

モノクローナル抗体

本発明は、mAb 2/215ならびに、XIIa因子との結合に関してmAb 2/215と同様あるいは類似の特性を持つモノクローナル抗体といった、他の形態に優先して、活性化XII因子の一種以上の特定形態と結合できる、モノクローナル抗体の使用に関するものである。

【0148】

上術のとおり、XIIa因子が細胞性、すなわち、細胞あるいは細胞物質に結合している場合、すべてのXIIa因子エピトープが、XIIa因子が細胞性でない場合と同様に、利用できる訳ではないようである。たとえば、モノクローナル抗体2/215は、細胞性XIIa因子ならびに非細胞性XIIa因子に効果的に結合できる。しかしながら、モノクローナル抗体201/9ならびにXIIa因子に対する羊ポリクローナル抗体は、非細胞性XIIa因子と同様に細胞性XIIa因子に効果的に結合できるようにはみえない。

【0149】

下記の仮説に拘泥しないが、mAb 2/215は、XIIa因子が、たとえば細胞物質、脂質、一個以上の他のXIIa因子分子、あるいは低又は高親和性結合パートナーとの複合体あるいは会合形態にあるときに利用できるエピトープと、効果的に結合できるようである。

【0150】

XIIa因子の特定形態に結合性に関してmAb 2/215ならびに201/9と同様あるいは類似の結合特性を持つモノクローナル抗体は、従来の方法で生成され、望ましい結合特性について従来の方法によって、選別することができる。

たとえば、XIIa因子との結合に関してmAb 2/215と同様あるいは類似の性質を

10

20

30

40

50

持つモノクローナル抗体のような、X I I a 因子の一種以上の特定形態と優先的に結合できるモノクローナル抗体は、それ自体は公知の方法で生成され得る。結果として生じた抗体は望ましい特徴を持つものが選別され得る。

【0151】

一般的に、本発明によって使用されるモノクローナル抗体は、X I I 因子チモーゲンと意味のある結合を示さないことが好ましい。X I I 因子との修正された交差反応性は、たとえば、0.1%以下である。本発明の抗体とX I I 因子との交差反応性の評価において考慮される要素は、たとえ「純」X I I 因子調製液であってもほぼ必然的に少量のX I I a 因子が混入することである（シルバークナール、カプラン、Blood 60, 1982, 64-70）。国際公開第90/08835号パンフレットは、X I I a 因子との修正された交差反応性を評価する詳細な方法を与える。その他に特定されていない場合、「交差反応性」という用語は本願において、修正された交差反応性を意味するために使用される。

10

【0152】

モノクローナル抗体の生成に使用される方法は周知であり、たとえば以下を参照のこと：酵素学的手法、H. ヴァン ヴナキス ならびに J. J. ロンゴン（編者）1981, 72 (B)、ならびに、同書、1983, 92 (E)。モノクローナル抗体は、たとえば、コーラーならびにミルステインの手法を変更することにより、生成され得る（G. コーラーならびに C. ミルステイン、Nature, 1975, 256, 495）。

【0153】

ここで参考文献に組み入れられる国際公開第90/08835号パンフレットは、一般論として、X I I a 因子ならびに X I I a 因子に結合し、ならびにX I I 因子と0.1%あるいはそれ以下の修正された交差反応性を示す、抗体の生成方法が記載されており、ならびに、m A b 2 / 2 1 5 ならびに m A b 2 0 1 / 9 の生成に関する具体的な詳細を与える。その中に記載された一般的なならびに具体的な方法は、X I I a 因子との結合に関し m A b 2 / 2 1 5 あるいは m A b 2 0 1 / 9 と同様あるいは類似の性質を持つモノクローナル抗体といった、本発明に従う使用に適するモノクローナル抗体の生成に用いることができる。

20

【0154】

モノクローナル抗体の生成に使用される方法は周知であり、たとえば以下を参照のこと：酵素学的手法、H. ヴァン ヴナキス ならびに J. J. ロンゴン（編者）1981, 72 (B)、ならびに、同書、1983, 92 (E)。モノクローナル抗体は、たとえば、コーラーならびにミルステインの手法を変更することにより、生成され得る（G. コーラーならびに C. ミルステイン、Nature, 1975, 256, 495）。

30

モノクローナル抗体の製造に用いられる免疫原は X I I a 因子であり得る、国際公開第90/08835号パンフレットを参照。生じたモノクローナル抗体は、たとえばX I I 因子との0.1%以下の修正された交差反応性を持つような、X I I 因子チモーゲンに意味のある結合を示さないものについて選別され得る。

【0155】

生じたモノクローナル抗体は、結合が望ましいX I I a 因子形態、たとえば、細胞性X I I a 因子、脂質結合X I I a 因子、あるいはX I I a 因子の他のX I I a 因子分子、あるいは高又は低親和性結合パートナーとの複合体又は会合などとの結合性について選別され得る。

40

【0156】

モノクローナル抗体 2 / 2 1 5 あるいは 2 0 1 / 9 をそれぞれ基準抗体として、X I I a 因子の特定形態に結合する抗体のスクリーニングに対して使用することが有利であり得る。選択された抗体は、それぞれ m A b 2 / 2 1 5 あるいは 2 0 1 / 9 と同様あるいは類似の、選択されたX I I a 因子形態に対して特異的な結合特性を持ち得る。

【0157】

m A b 2 / 2 1 5 生成に使用されるハイブリドーマは、マウスの脾臓細胞に由来するもの

50

ではあるが、本発明はネズミあるいはネズミの一部由来のハイブリドーマに限定されない。両融合パートナー（脾臓細胞ならびに骨髄腫）はあらゆる適切な動物から得られ得る。組み換え抗体が生成され得る。抗体は、所望の場合には、キメラあるいはヒト化形態に転換され得る。ハイブリドーマは好ましくは試験管中で培養される。

【0158】

ポリクローナル抗体

本発明はまた、ポリクローナル抗血清とも呼ばれるポリクローナル抗体を提供し、該抗体は一種以上のXIIa因子形態と選択的に反応することができる。そのような抗体は標識化され、ならびにELISAで一種以上の捕獲XIIa因子の検出に使用され得る。

【0159】

本発明はまた、そのようなポリクローナル抗血清の製造方法を与え、該方法はXIIa因子、たとえばXIIa因子を動物へ投与すること、該動物から血清を得ること、一種以上のXIIa因子形態との結合性について前期血清をスクリーニングすることからなる。いくつかの場合、XII因子は免疫原として使用することができる。

【0160】

本発明はまた、被験者から得られた尿からなる試料におけるXIIa因子を検出あるいは測定することからなる方法を含んでいる。本発明のこの実施態様において、他の形態と比べて優先的に、一種以上のXIIa因子形態若しくは形態群を検出あるいは測定する必要はない。形態を区別しない分析法が使用され得る。そのような分析法は、たとえば、発色分析法あるいは免疫検定法であり得る。免疫検定法は、たとえば国際公開第90/08835号パンフレットに記載されているものであり得る。

【0161】

「一般的な」分析あるいは異なるXIIa因子形態を区別することができる方法による、尿中のXIIa因子の分析は、尿中のXIIa因子の濃度が、特に、多量の蛋白尿が検出されない状態における、腎機能、腎疾患ならびに腎障害の敏感なマーカーであるために、腎機能、腎疾患ならびに腎障害に関する有用な情報を提供する。たとえば、健康な被験者と比べて、被験者の尿中におけるXIIa因子の高濃度は、損なわれた腎機能、腎疾患ならびに腎障害のいずれの指標にもなる。尿のXIIa因子濃度の変化は、症状の悪化あるいは治療法に依る改善といった、臨床症状の変化の指標となり得る。

【0162】

臨床あるいは他の有用性

本発明、特に上記に記載された免疫検定法は、大規模使用に対する自動化装置として容易に使用できる、異なるXIIa因子形態の検出ならびに/あるいは測定方法を提供する。

【0163】

XII因子とその活性化形態、XIIa因子は、血液凝固、ならびに、繊維素溶解、補体カスケード、炎症ならびに血管拡張などの接触相システムとしても知られている、他の接触システムを改善するとみなされており、以下を参照：ヤコブセン S. ならびにクリッツ M., Br J Pharmacol., 29, 25-36, 967; クラチ K. ならびに Biochemistry, 19, 1330-8 1980; ラドクリフ R. ならびに Blood, 50, 611-7, 1977; ゲブリヒウエット B. ならびに J Clin Invest, 71, 1450-6. 1983; Z. トーシ R., Proc Natl Acad Sci USA, 89, 11969-72, 1992; ワットフォーゲル Y. T. ならびに Blood 67, 1731-7, 1986; ワットフォーゲル Y. T. ならびに Thromb Haemost, 80, 686-91, 1998; ならびに、シュライバー R. A. D., J Clin Invest., 52, 1402-9, 1973.

【0164】

XII因子ならびにその活性形態、XIIa因子は、ヘモ凝固に関与し、ならびに血管全体ならびに血圧の維持、内皮細胞の様々な機能への影響、繊維素溶解のコントロール、また血管内空間における構造的抗凝固性特徴の維持に役割をもつために、XIIa因子の特定形態の測定は繊維素溶解、補体カスケードならびに血管拡張などを含むそれらシステム

10

20

30

40

50

の研究において、ならびにまた血栓症ならびに狭窄に関する研究において、有用である。

【0165】

臨床ならびに実験的研究は、XIIa因子を含む接触システムは急性ならびに慢性の炎症、敗血症ショックを含む異なる病因のショック状態、糖尿病、アレルギー、播種性血管内血液凝固などの血栓出血性の病気、腫瘍性疾患、心血管症状、たとえば心筋梗塞、狭心症ならびに急性冠不全症候群、血管形成、敗血症、自然流産ならびに血栓塞栓症にかかわる。

【0166】

ヘモ凝固、血管全体ならびに血圧の維持、繊維素溶解のコントロール、ならびに血管内空間における構造的抗凝固性特徴の維持へのXIIa因子の関与は、播種性血管内血液凝固などの血栓出血性の病気、腫瘍性疾患、心血管症状、たとえば心筋梗塞、狭心症ならびに急性冠不全症候群、血管形成ならびに血栓塞栓症に関するXIIa因子の関与に対する、臨床ならびに実験的観測を立証する。

10

【0167】

XIIa因子が炎症過程で活性化される/該過程に関与する顆粒球上に存在するというわれわれの驚くべき観察は、XIIa因子が急性ならびに慢性の炎症、敗血症などの異なる病因のショック状態、アレルギー、腫瘍性疾患、ならびに敗血症などの炎症を含む様々な状態にかかわるとする、臨床ならびに実験的研究を立証する。

【0168】

XIIa因子の特異的な形態の検出ならびに/あるいは測定は、それゆえに、病気若しくは疾患を持っているか又は持っていると思われる被験者の、病気若しくは疾患の罹病性、進行、又は転帰、又は病気若しくは疾患の治療についての診断、モニタリング、又は予測などの、接触システムが関与し得ると見られる病気若しくは疾患の臨床ならびに科学研究において有用である。そのような疾患ならびに病気としては、急性ならびに慢性炎症、異なる病因のショック状態、糖尿病、アレルギー、播種性血管内血液凝固ならびに血栓塞栓症などの血栓出血性の病気、血栓症ならびに狭窄、腫瘍性疾患、心血管症状、たとえば心筋梗塞、狭心症、急性冠不全症候群、血管形成、敗血症ならびに自然流産がある。

20

【0169】

一種以上のXIIa因子形態の検出あるいは測定は、それゆえに、病気若しくは疾患を持っているか又は持っていると思われる被験者の、病気若しくは疾患の罹病性、進行、又は転帰、又は病気若しくは疾患についての診断、モニタリング、又は治療の予測を助けるものとして有用であり、それら病気若しくは疾患の場合における一種以上のXIIa因子形態の量は健康な被験者のものとは異なる。一種以上のXIIa因子形態の濃度変化は、上記に言及されたあらゆる病気若しくは疾患の指標となり得る。時間経過による被験者における濃度変化は、状態の悪化、治療などに応じての改善といった、状態変化の指標となり得る。「診断、予測ならびにモニタリング」と呼ばれる、診断、モニタリング、あるいは病気若しくは疾患の罹病性、進行、又は転帰、又は病気若しくは疾患の治療の予測に関する、そのような方法は、本発明の一部である。

30

【0170】

加えて、尿中のXIIa因子は腎機能、腎疾患ならびに腎障害に関する敏感なマーカーであり、尿中のXIIa因子の検出あるいは測定は腎機能、腎疾患ならびに腎障害に関する有用な情報を与える。

40

【0171】

診断、予測ならびにモニタリング

本発明は、病気若しくは疾患を持っているか又は持っていると思われる被験者の、病気若しくは疾患の罹病性、進行、又は転帰、又は病気若しくは疾患についての診断、モニタリング、又は治療の予測をする方法を提供するものであり、該方法は、前記被験者から得られた試料において他のXIIa因子形態に優先して一種以上のXIIa因子形態を検出又は測定すること、ならびに、被験者について得られた結果と、下記の少なくとも一種以上から得られた試料に対する同一分析を用いて得られた結果を比較することからなる：

50

- ( i ) 病気若しくは疾患を持っている被験者；
- ( i i ) 病気若しくは疾患を持っている被験者であって、病気若しくは疾患の進行ならびに / あるいは転帰に関してモニターされている被験者；
- ( i i i ) 病気若しくは疾患を持ち、ならびに治療を受けている被験者；
- ( i v ) 病気若しくは疾患を持ち、ならびに治療を受けている被験者であって、病気若しくは疾患の進行ならびに / あるいは転帰に関して治療に関しモニターされている被験者；
- ( v ) 病気若しくは疾患をもっていない被験者；
- ( v i ) 病気若しくは疾患の発症前、あるいは、病気若しくは疾患治療の開始前の、上記の被験者；ならびに
- ( v i i ) 病気若しくは疾患、又は病気若しくは疾患の治療のより前期あるいはより後期のステージにある、あるいは病気若しくは疾患の発症前の、上記の被験者。 10

## 【 0 1 7 2 】

試料は上記に記載されたもののいずれでもよい。たとえば、試料は血液、血漿、血清、尿、脳脊髄液、唾液あるいは涙液のような、体液試料であり得る。

## 【 0 1 7 3 】

本分析は、一種以上の細胞性 X I I a 因子、脂質結合 X I I a 因子ならびに尿の X I I a 因子などの、一種以上の選択された形態であるような、一種以上の X I I a 因子形態の検出ならびに / あるいは検出ならびに / あるいは測定のためのものであり得る。

## 【 0 1 7 4 】

上記に記載されたように、ある分析の、他の形態と比較して一種以上の X I I 因子形態に対する特異性は、該分析法の設計によって達成あるいは改善することができる。免疫検定法の場合において、そのような設計は、使用される抗体あるいは抗体の組み合わせの選択；界面活性剤の存否及び選択；ならびに固相にコートされた抗体を含む抗原捕獲分析の場合の、プレートコーティングに使用される条件、の一種以上を含んでもよい、上記参照。 20

## 【 0 1 7 5 】

X I I a 因子の分析は、研究中の X I I a 因子形態若しくは形態群に結合できる抗体の使用からなる免疫検定法であり得る。そのような分析において、研究中の X I I a 因子形態若しくは形態群に結合できる抗体は、捕獲抗体として固相に固定化される。

## 【 0 1 7 6 】

あるいは、又は加えて、研究中の X I I a 因子形態若しくは形態群に結合できる抗体は、直接的あるいは間接的に検出可能な標識を用いて標識化される。 30

## 【 0 1 7 7 】

免疫検定法において、生じた抗体 - 抗原複合体は、たとえば上記「免疫検定法」項に記載されたように、直接的に測定され得る。

## 【 0 1 7 8 】

免疫検定法において、研究中の X I I a 因子形態若しくは形態群に結合できる抗体は、m A b 2 / 2 1 5 又はその類似体、m A b 2 0 1 / 9 又はその類似体、あるいは、X I I a 因子ならびに、所望により X I I 因子にもまた結合できる、ポリクローナル抗体であり得る。

## 【 0 1 7 9 】

m A b 2 / 2 1 5 又はその類似体、m A b 2 0 1 / 9 又はその類似体、あるいは、X I I a 因子に結合できるポリクローナル抗体が使用される免疫検定法において、抗体は、直接的あるいは間接的に検出可能な標識で標識化され、ならびに / あるいは捕獲抗体として固相に固定化され得る。 40

## 【 0 1 8 0 】

定義された抗体によって捕獲されたあらゆる X I I a 因子は、上記で定義されたような標識化抗体を用いて検出あるいは測定され得る。

## 【 0 1 8 1 】

研究中の病気若しくは疾患は、上記「臨床的有用性」項で記載されたもののいずれでもあり得、たとえば、凝固物システムの病気若しくは疾患；ヘモ凝固物、繊維素溶解、キニン 50

生成、補体活性化、あるいは血管形成、血管全体ならびに血圧の維持、血管内空間の構造性抗凝固性特徴の維持、あるいは組織防衛及び修復に関連する症状；急性又は慢性炎症、あらゆる病因のショック状態、糖尿病、アレルギー、血栓出血性の病気、敗血症、自然流産あるいは腫瘍性疾患に関連する症状；ならびに血管内血液凝固あるいは血栓塞栓症、血栓症あるいは狭窄、心筋梗塞、急性冠不全症候群あるいは狭心症に関連する症状、であり得る。

【0182】

臨床あるいは病的症状の治療は、治療薬の投与ならびに／あるいは外科的処置を含む得る。たとえば、血栓症あるいは狭窄の治療は、冠状動脈血管形成術ならびに／あるいは血栓溶解を含み得る。

10

【0183】

たとえば、病気若しくは疾患の経過中に得られた試料、ならびに／あるいは、病気若しくは疾患の治療の間ならびに／あるいは治療の開始前に得られた試料などの、被験者から得られた一連の試料を試験することが有利である得る。

【0184】

病気若しくは疾患が血栓症あるいは狭窄に関連し得、ならびに／あるいは治療が冠状動脈血管形成術あるいは血栓溶解に関連し得る。本発明の一つの実施態様において、診断、モニタリング、あるいはそのような症状の進行あるいは転帰ならびに治療の予測に対して、使用される免疫検定法は、捕獲抗体がmAb 2 / 215又はその類似体であり、標識化抗体がポリクローナルXIIa抗因子抗体であり、ならびに、試料の（最初の）培養ステップの間、試料中に界面活性剤（トリトン）が存在しないという、捕獲分析であり得る。XIIa因子濃度が血管形成術あるいは血栓溶解処置の前後に測定された場合、処置後のXIIa因子濃度の増加は、処置の有効性を示すものであることが示されている（実施例16を参照）。前記分析がXIIa因子の二個以上の分子からなる分子複合体ならびに／あるいは多重XIIa因子分子からなる粒子を測定し得ると考えられる。

20

【0185】

病気若しくは疾患は、心筋の炎症あるいは急性冠不全症候群と疑われることもある。異なるXIIa因子形態の分析は、そのような症状の進行あるいは転帰の予測について異なる情報を与える。

【0186】

本発明の一つの実施態様において、使用される免疫検定法は、捕獲抗体がmAb 2 / 215あるいはその類似体、標識化抗体がmAb 2 / 215あるいはその類似体、界面活性剤（トリトン）が試料の（最初の）培養ステップ中に試料中に存在するという捕獲分析である。試料が病院への入院時に得られた場合、2 / 215捕獲抗体2 / 215標識化抗体分析を用いて得られたXIIa因子形態の低濃度値は、初入院期間内における二次トロポニン陽性イベントのリスク増加の指標となることが指示された（（実施例17を参照））。

30

【0187】

本発明のほかの実施態様において、使用される免疫検定法は、捕獲抗体がmAb 2 / 215あるいはその類似体、ならびに標識化抗体がmAb 201 / 9、ならびに界面活性剤（トリトン）が試料の（最初の）培養ステップ中に試料中に存在するという捕獲分析であり、この分析は他と比べて優先的にXIIa因子の特定形態を検出する。試料が病院への初入院時に得られた場合、2 / 215捕獲抗体201 / 9標識化抗体分析を用いて得られたXIIa因子の高濃度値は、入院から30日以内における二次トロポニン陽性イベントのリスク増加の指標となることが指示された（実施例17を参照）。

40

【0188】

本発明の更なる実施態様において、使用される免疫検定法は、捕獲抗体がmAb 2 / 215あるいはその類似体、標識化抗体がポリクローナルXII抗因子抗体、ならびに、界面活性剤（トリトン）が試料の（最初の）培養ステップ中に試料中に存在しないという捕獲分析であり、この分析は他と比べて優先的にXIIa因子の特定形態を検出する。試料が病院への入院時に得られた場合、2 / 215捕獲抗体ポリクローナルXIIa抗因子分析

50

を用いて得られた X I I a 因子の、中間的な濃度に比較して高濃度値あるいは低濃度値は、死への高リスクの指標となることが指示れた（（実施例 17 を参照）。前記分析は、X I I a 因子の二個以上の分子からなる分子複合体ならびに / あるいは多重 X I I a 因子分子からなる粒子を測定し得ると考えられている。

【 0 1 8 9 】

病気若しくは疾患が敗血症であることもある。本発明の一つの実施態様において、試料が m A b 2 / 2 1 5 あるいはその類似体の使用を含む免疫検定法を用いて分析される場合、X I I a 因子の特定形態（細胞性 X I I a 因子形態）の濃度増加は、敗血症を示唆することが示されている。この結果は、X I I a 因子は、炎症過程において活性化 / 含有される顆粒球上に存在している、というわれわれの驚くべき観察と矛盾がなく、ならびに、X I I a 因子は炎症を含むさまざまな状態に関係しているというわれわれの仮説を立証するものである。

10

【 0 1 9 0 】

以上のように、尿中の X I I a 因子は腎機能、腎疾患ならびに腎障害に対する敏感なマーカーである。本発明は、病気若しくは疾患を持っている被験者の尿中における X I I a 因子、特に X I I a 因子濃度は健康な被験者のものとは異なるという、病気若しくは疾患の診断あるいはモニタリングの方法に関係する。

【 0 1 9 1 】

本発明は病気若しくは疾患の診断あるいはモニタリング、あるいは病気若しくは疾患治療のモニタリングの方法を提供し、該方法は病気若しくは疾患を持っているあるいは持っていると思われる被験者の尿中における、X I I a 因子、特に X I I a 因子濃度を検出あるいは測定することからなる。

20

【 0 1 9 2 】

たとえば、本発明は、損なわれた腎機能、腎疾患又は腎障害を持っているあるいは持っていると思われる被験者における、腎機能、腎疾患又は腎障害の診断あるいはモニタリング、あるいは損なわれた腎機能、腎疾患又は腎障害の治療のモニタリングの方法を提供するものであり、該方法は前記被験者から得られた試料中の X I I a 因子を検出あるいは測定することからなる。

【 0 1 9 3 】

一般に、被験者について得られた結果は、下記の少なくとも一種以上から得られた試料に対する同一の分析法を用いて得られた結果と比較される：

30

( i ) 損なわれた腎機能、腎疾患ならびに腎障害などの病気若しくは疾患を持っている被験者；

( i i ) 損なわれた腎機能、腎疾患ならびに腎障害などの病気若しくは疾患を持っている被験者であって、損なわれた腎機能、腎疾患ならびに腎障害などの病気若しくは疾患の進行ならびに / あるいは転帰に関してモニターされている被験者；

( i i i ) 損なわれた腎機能、腎疾患ならびに腎障害などの病気若しくは疾患を持ち、ならびに治療を受けている被験者；

( i v ) 損なわれた腎機能、腎疾患ならびに腎障害などの病気若しくは疾患を持ち、ならびに治療を受けている被験者であって、損なわれた腎機能、腎疾患ならびに腎障害などの病気若しくは疾患の進行ならびに / あるいは転帰に関して治療に関しモニターされている被験者；

40

( v ) 損なわれた腎機能、腎疾患ならびに腎障害などの病気若しくは疾患をもっていない被験者；

( v i ) 損なわれた腎機能、腎疾患ならびに腎障害などの病気若しくは疾患の発症前、あるいは、損なわれた腎機能、腎疾患ならびに腎障害などの病気若しくは疾患治療の開始前の、上記の被験者；ならびに

( v i i ) 損なわれた腎機能、腎疾患ならびに腎障害などの病気若しくは疾患、又は病気若しくは疾患の治療のより前期あるいはより後期のステージにある、あるいは損なわれた腎機能、腎疾患ならびに腎障害などの病気若しくは疾患の発症前の、上記の被験者。

50

## 【0194】

X I I a 因子は、他の形態と比べて優先的に一種以上の X I I a 因子を検出あるいは測定できる分析によって検出あるいは測定され得、あるいは、X I I a 因子形態間を区別しない分析手法によって検出あるいは分析され得る。

## 【0195】

臨床的に有用な情報を与える分析の決定

本発明を実施するにあたり、X I I a 因子のどの特定形態が特定の病気若しくは疾患に係るかを確認することは不可欠ではない。たとえば病気若しくは疾患の出現、進行又は転帰、あるいは病気若しくは疾患治療の有効性又は転帰などに関して、X I I a 因子の特定形態が病気若しくは疾患と関係することを簡単な手法によって知るあるいは測定すること

10

## 【0196】

上記に開示された通り、X I I a 因子は生体中の血液凝固の接触システムにかかわっていると長い間知られてきた。より近年の研究は、X I I a 因子はまた、ヘモ凝固物ならびに補体活性化に関する他のシステムにかかわっていることを示唆し、ならびに更なる臨床ならびに実験結果は接触システムが多く他の症状にかかわっていることを示している。そのような症状は上記「臨床的有用性」項に記載されている。X I I a 因子形態が病気若しくは疾患あるいは病気若しくは疾患の治療と臨床的な関係があるかどうかは、たとえば下記に記載の通り、簡単な手法で確立可能である。

## 【0197】

したがって、本発明は、X I I a 因子と関係があると現時点で知られている病気若しくは疾患に限定されない。臨床的関連性が X I I a 因子と病気若しくは疾患との間にあるかどうかは、簡単な手法によって測定可能である。

20

## 【0198】

本発明は、病気若しくは疾患を持っているあるいは病気若しくは疾患の治療を受けている被験者から得られた試料における、X I I a 因子に対する一連の分析の実施、ならびに、病気若しくは疾患あるいは治療に関する X I I a 因子レベル値の情報を提供する分析法の選択からなる方法を提供する。

## 【0199】

本発明はまた、病気若しくは疾患を持っているかあるいは持っていると思われる被験者の、病気若しくは疾患の罹病性、進行、転帰、又は病気若しくは疾患についての診断、モニタリング、又は治療の予測に関する情報提供に適した X I I a 因子の分析法を提供する方法を提供し、該方法は病気若しくは疾患を持っているあるいは治療を受けている被験者から得られた試料に対する X I I a 因子に対する一連の分析を実施すること、ならびに、どの分析(群)が病気若しくは疾患の罹病性、進行、転帰、又は病気若しくは疾患についての診断、モニタリング、又は治療の予測に関する X I I a 因子レベル値の情報を提供するかを決定することからなる。

30

## 【0200】

本方法は、好ましくは、病気若しくは疾患を持っているあるいは治療を受けている被験者から得られた試料における X I I a 因子についての得られた結果と、少なくとも一種以上の以下から得られた同一の方法を用いて得られた結果とを比較することからなる：

40

- ( i ) 病気若しくは疾患を持っている被験者；
- ( i i ) 病気若しくは疾患を持っている被験者であって、病気若しくは疾患の進行ならびに / あるいは転帰に関してモニターされている被験者；
- ( i i i ) 病気若しくは疾患を持ち、ならびに治療を受けている被験者；
- ( i v ) 病気若しくは疾患を持ち、ならびに治療を受けている被験者であって、病気若しくは疾患の進行ならびに / あるいは転帰に関して治療に関しモニターされている被験者；
- ( v ) 病気若しくは疾患をもっていない被験者；
- ( v i ) 病気若しくは疾患の発症前、あるいは、病気若しくは疾患治療の開始前の、上記の被験者；ならびに

50

(vii) 病気若しくは疾患、又は病気若しくは疾患の治療のより前期あるいはより後期のステージにある、あるいは病気若しくは疾患の発症前の、上記の被験者。

【0201】

分析される試料は、病気若しくは疾患の進行中あるいは治療中であるといった、さまざまな被験者から得られた一連の試料であることが望ましい。

【0202】

使用される分析法は、免疫検定法ならびに他の分析法などの、発明の実施に関し上記に記載されたもののいずれでもあり得る。特定の分析法を用いてXIIa因子の特定形態と病気若しくは疾患あるいは病気若しくは疾患の治療との間に臨床的関連性が発見された場合、その分析法はその後、本発明ならびに上記に記載された、病気若しくは疾患の罹病性、進行、転帰、又は病気若しくは疾患についての診断、モニタリング、又は治療の予測のために使用され得る。

10

【0203】

さまざまな分析法とさまざまな症状における関係性に関する得られた結果をデータベースに集約することは有用であり得、該データベースは続いて研究中の特定被験者から得られた結果の解釈を助けるのに使用され得る。そのような方法は、上記に記載されたような集約された結果からなるデータベースと同様に本発明の一部である。

【0204】

以上のように、XIIa因子が異なる形態で存在し、ならびに異なる形態と病気若しくは疾患ならびに病気若しくは疾患の治療の間に臨床的関連性があるという発見は、XIIa因子が従来から関係していた凝固システム、ならびにXIIa因子と関係があるとして現在までに確認されてきた病気若しくは疾患を超えた実用性を持つ。

20

【0205】

下記の限定されない実施例は本発明を説明する。

【実施例】

【0206】

実施例1

この実施例において、血漿におけるXIIa因子の多数種の存在が、蛍光標識化抗体との結合、ならびに得られた複合体の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた分子量に基づく分離によって立証された。

30

【0207】

抗体2/215を、生産者の取扱書にしたがってフルオロセインイソチオシアネート(FITC)(ピラス, イリノイ州 61105, ロックフォード, 私書箱 117, 3737 エヌ メリディアン ロード)にて標識化した。

【0208】

HPLCシステムはウォーターズ 1525 バイナリー HPLC ポンプ、ウォーターズ 2487 二重(波長)吸光度検出器、ならびにジャスコ FP1520 インテグラル 蛍光検出器からなった。

【0209】

HPLCに使用された移動相は0.1M 塩化ナトリウム 0.05M トリス塩酸、0.4%(w/v) トリス-ナトリウム クエン酸塩 pH7.5であった。固定相は一連の2x30cm バイオセップ-セック-S 3000 カラム(フェノメネクス, 英国, チェシャー エスケー10 2ビーエヌ, マックルズフィールド, ハーズフィールド イングストリアル エステート, キーンズ アベニュー)からなった。流速は1.0 ml min<sup>-1</sup>、ならびに注入量は100 µlであった。ジャスコ蛍光検出器の調整は: 励起波長494 nm、発光波長520 nm、増幅率1000、減衰1とした。

40

【0210】

HPLCシステムを通過させた試料はFITC標識化2/215のみ、血漿試料のみ、ならびにFITC標識化2/215と4時間培養させた血漿(250 µlの血漿に1 µlのFITC標識化抗体を加えた)であった。

50

## 【0211】

蛍光対時間曲線の例を図2 aないし図2 dに示す。

## 【0212】

図2 aにおいて、血漿試料のみに対するトレースから、血漿試料は内因性の蛍光を示すことがみてとれる。図2 bにおいて、FITC標識化抗体に関する蛍光が観測される。図2 cにおいて、FITC標識化抗体との事前培養がなされている血漿に関して、図2 aならびに2 bのものに追加されたいくつものピークが観測される。これはFITC標識化抗体が血漿試料中の数種の成分に結合していることを示す。このことは、さらに、図2 d中に示されたトレースによって示され、該図においては、内因性の蛍光ならびにFITC標識化抗体のみに関するシグナルが差し引かれ、結果として得られたトレースは血漿中での種

10

## 【0213】

## 実施例2

この実施例において、血漿における活性化XII因子の多数種の存在が、ラジोटレーサー(ヨウ素125)で標識化された抗体断片との結合、ならびに得られた複合体の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた分子量に基づく分離によって立証された。

## 【0214】

抗体2/215のFab抗体断片を、生産者の取扱書にしたがって「イミュノピュア Fab調製キット」(ピラス, イリノイ州 61105, ロックフォード, 私書箱 117, 3737 エヌ メリディアン ロード)を用いて調製した。これらFab断片は次にヨウ素125を用いてアマシャム ファルマシア バイオテック(英国 エッチピー8 4エスピー, チャルフォント ストリート ジャイルズ ナイチンゲールズ レーン ポラズ ウッド)によって放射能標識化した。

20

## 【0215】

1  $\mu$ lの放射能標識化抗体が多数の健康なボランティアの各々からの1 mlの血漿に添加された。4時間培養後、血漿成分は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって分離された。HPLCシステムはアジレント1100システムであった。

## 【0216】

HPLCに使用された移動相は0.1M 塩化ナトリウム 0.05M トリス塩酸、0.4% (w/v) トリス-ナトリウム クエン酸塩 pH 7.5であった。固定相は一連の2 x 30 cm バイオセップ-セック-S 3000 カラム(フェノメネクス, 英国, チェシャー エスケー10 2ピーエヌ, マックルズフィールド, ハーズフィールド イングダストリアル エステート, キーンズ アベニュー)からなった。流速は0.7 ml  $\text{min}^{-1}$ 、ならびに注入量は100  $\mu$ lであった。

30

## 【0217】

HPLC溶出画分は、20秒ごとに1画分を集めるようにセットした、自動フラクションコレクターを用いて集められた。放射能活性は次にマルチウェル シンチレーション カウンターを用いて各画分において測定された。

## 【0218】

放射能活性対時間曲線の例を図3に示す、そこにはいくつかのピークの存在がみてとれ、放射能標識化抗体断片は血漿中でいくつかの異なる種に結合していることが立証された。

40

## 【0219】

## 実施例3

細胞性XIIa因子に対するマイクロタイタープレート分析

試料の100  $\mu$ lアリコートはmAb 2/215にて事前コートされたマイクロプレートのウェルに添加された。60分間培養後、プレートはボレートバッファー 生理食塩水 洗浄溶液(pH 7.4)にて洗浄された。100  $\mu$ lの関連接合体(アルカリ ホスホターゼ標識化抗体)が各ウェルに添加され、プレートはさらに60分間培養された。プレートの再洗浄後、100  $\mu$ lのフェノールフタレイン ホスフェート基質が添加された。適切な培養期間後、アルカリ性停止溶液が更なる基質転換を抑制するために添加され、な

50

らびに吸光度が 550 nm にて記録された。

【0220】

方法

血液はボランティアから 2 本のクエン酸塩チューブの中へ集められ、赤血球が 1000 g で 10 分間の遠心分離によって分離された。これらチューブからの血漿はあらゆる収集チューブのばらつきを除去するために溜められた。血漿比率はエッペンドルフチューブ内に 1 ml アリコートとして分取され、「濃細胞血漿」と名づけられた。

【0221】

該血漿の残部は分取され、ならびに次に微量遠心機で高速 (16000 g で 10 分間) にて遠心分離された。上清は分離され、ならびに「希細胞血漿」と名づけられた。沈殿物は次に、100 mM ホスフェートバッファー 生理食塩水、pH 7.4 (PBS) に再懸濁され、ならびに 16000 g で 10 分間遠心分離され、その後上清が処分されることによって洗浄された。ペレット状物質は同様の方法でさらに 2 回洗浄され、その後 PBS に再懸濁され、「洗浄細胞」と名づけられた。

10

【0222】

3 試料 (濃細胞血漿、希細胞血漿ならびに洗浄細胞) は次に上記に記載されたマイクロタイタープレート分析を用いて分析され、該分析において、mAb 2/215 が細胞性 X I I a 因子を捕獲するために使用され、標識化 mAb 2/215 (2/215 接合体) あるいは標識化ポリクローナル抗体 (ポリクローナル接合体) のどちらか一方が捕獲された細胞性 X I I a 因子の検出に使用された。

20

【0223】

得られた結果は表 1 に示される。2/215 二重 (捕獲抗体ならびに接合体抗体) 分析に標準物質が利用できなかったため、2/215 接合体を用いた結果は吸光度として表現された。標準化されたこのデータ曲線は図 4 a ならびに図 4 b に示される。

【表 1】

異なるサンプル種について、ポリクローナルならびに 2/215 接合体を用いて、

マイクロタイタープレート X I I a 因子分析から得られた結果

試料	X I I a 因子 MTP	A 5 5 0 MTP
	ポリクローナル 接合体	2 / 2 1 5 接合体
濃細胞血漿	3. 5	0. 2 0 9
洗浄細胞	< 0. 1	1. 4 4 2
希細胞血漿	3. 6	0. 7 5 3

30

【0224】

表 1 ならびに図 4 a 及び図 4 b からみてとれるように、ポリクローナル接合体では著しい応答が濃細胞ならびに希細胞血漿の双方について得られるが、しかしながら洗浄細胞ではわずかな応答しか得られなかった。対照的に、2/215 接合体を用いた場合には、最大応答は洗浄細胞で得られ、一方で最低応答は希細胞血漿について得られた。

40

【0225】

実施例 4

細胞性 X I I a 因子の I M x 分析

アボット I M x システムは、酵素免疫学的検定法ならびに蛍光偏光免疫学的検定技術を用いて分析を実施するために設計された自動化免疫学的分析器である。

50

## 【0226】

これら実施例において使用された技術は微粒子酵素免疫学的検定法(MEIA)である。MEIA技術は測定される分子に対して特異的な捕獲分子(この場合は抗体)にてコートされた微粒子を用いた。

微粒子の有効表面積ならびに検体と固相間の拡散距離は分析動態を改善させ、MEIA分析が他の多くの免疫学的検定法よりもより迅速に完了されることを可能にした。結合検体とともに微粒子は、MEIA反応セル内で使用されたグラスファイバーマトリックスに不可逆的に結合することによって反応混合物から分離された。

## 【0227】

MEIA分析に必要とされる反応物質は

- 捕獲分子(この場合はモノクローナル抗体2/215)でコートされた微粒子
- アルカリホスファターゼ標識化接合体(この場合は活性化XII因子に対する抗体、ポリクローナル抗体又はmAb2/215のどちらでも)
- 発色基質、4-メチルアンペリフェリルホスフェート(MUP)
- 免疫複合体が結合するグラスファイバーマトリックスを含む反応セル。

希釈剤ならびに/あるいは洗浄溶液のような他の試薬もまた必要とされた。

## 【0228】

以下はMEIA反応プロセスの説明である。

1. IMxシステムは、試料ならびに微粒子(捕獲分子でコートされた)を反応セルの培養ウェルに移動させた。培養期間の間、検体は微粒子に結合し、免疫複合体を創出した。
2. IMxシステムは免疫複合体の1アリコート反応セルの不活性なグラスファイバーマトリックスに移動させた。免疫複合体は不可逆的にグラスファイバーマトリックスに結合する。IMxは非結合物質を除去するためにマトリックスを洗浄し、ならびに、過剰の反応混合物がマトリックス中の大きな孔を通して迅速に流れ出た一方で、免疫複合体はグラスファイバーに保持された。
3. IMxシステムはマトリックスにアルカリホスファターゼ標識化接合体を添加した。接合体は抗体-検体-接合体「サンドイッチ」を完成させるために免疫複合体に結合した。IMxシステムはマトリックスをさらに洗浄した。
4. IMxシステムはマトリックスに蛍光基質4-メチルアンペリフェリルホスフェート(MUP)を添加した。接合体は4-メチルアンペリフェリルホスフェート(MUP)を4-メチルアンペリフェロン(MU)にする加水分解に触媒作用を及ぼした。
5. IMx機器内部の光学MEIAは蛍光生成物(MU)がグラスファイバーマトリックス上に生成される速度を測定した。MUがマトリックス上に生成される速度はテスト試料中の検体濃度に比例した。

## 【0229】

下記に記載されたIMx実験装置を用いたプロトコルは添付図面の図5に記載されている。

## 【0230】

方法ならびに結果

ボランティアからの血液は6本のクエン酸塩チューブの中へ集められ、赤血球が1000gで10分間の遠心分離によって分離された。すべてのチューブからの血漿はあらゆる収集チューブのばらつきを除去するために溜められた。血漿比率はエッペンドルフチューブ内に1mlアリコートとして分取され、「濃細胞血漿」と名づけられた。

## 【0231】

血漿残存物は分取され、ならびに次に微量遠心機で高速(16000gで10分間)にて遠心分離された。上清は分離され、ならびに「希細胞血漿」と名づけられた。沈殿物は次に100mMホスフェートバッファー生理食塩水、pH7.4(PBS)に再懸濁され、ならびに16000gで10分間遠心分離され、その後上清が処分されることによって洗浄された。ペレット状物質は同様の方法でさらに2回洗浄され、その後PBSに再懸濁され、「細胞懸濁液」と名づけられた。

10

20

30

40

50

## 【0232】

3 試料（濃細胞血漿、希細胞血漿ならびに懸濁液）は次に、2 / 2 1 5 接合体ならびにポリクロール接合体の双方を用いて、実施例 3 に記載されたマイクロタイタープレート分析を用いて分析された。試料はまたアボット I M x 自動免疫測定機器を用いた活性化 X I I 因子に対する分析を用いて分析された。この場合に細胞性 X I I a 因子の検出に使用された接合体は、アルカリホスファターゼ標識化 m A b 2 0 1 / 9 及び 2 / 2 1 5 であり、実施例 3 を参照のこと。マイクロタイタープレート分析で得られたデータ曲線は図 6 a 及び図 6 b に示され、ならびに I M x 分析で得られたデータ曲線は図 7 a 及び図 7 b に示される。

## 【0233】

図 6 a 及び図 6 b に示された通り、ポリクロール接合体を用いたマイクロタイタープレート分析においては、わずかな応答が細胞懸濁液で得られた一方、著しい応答が濃細胞ならびに希細胞血漿について得られたが、2 / 2 1 5 接合体の使用した場合に最大応答が細胞懸濁液について得られた。2 / 2 1 5 接合体を用いた場合、より低い応答が濃細胞及び希細胞血漿について得られ、希細胞血漿は最低応答を与えた。

## 【0234】

図 7 a 及び図 7 b に示された通り、2 0 1 / 9 接合体を用いた I M x 分析においては、わずかな応答が細胞懸濁液から得られた一方、著しい応答が濃細胞血漿ならびに希細胞血漿の双方について得られた。2 / 2 1 5 接合体を I M x 分析にて用いた場合、著しい応答が細胞懸濁液ならびに濃細胞血漿にみられ、希細胞血漿はより少ない応答がみてとれる。

## 【0235】

## 実施例 5

## 細胞性 X I I a 因子のフローサイトメトリー分析

血漿中の細胞上に m A b 2 / 2 1 5 が X I I a 因子に結合していたかどうか評価する代替手法として、フローサイトメトリーが使用された。

## 【0236】

m A b 2 / 2 1 5 はフルオレセインイソチオシアネート ( F I T C ) にて標識化された。この F I T C 標識化 2 / 2 1 5 抗体は濃細胞血漿と培養され、ならびに、コントロール物質（標識化抗体を添加しない）とともにフローサイトメトリーを用いて試験された。得られたアウトプットは図 8 a 及び図 8 b に示される。図 8 a は標識化抗体の不存在下で血漿について得られたデータを示し、図 8 b は血漿が標識化抗体と培養された場合に得られたデータを示す。

## 【0237】

図 8 a 及び 8 b において、F I T C 標識化抗体の添加による右方向へのピーク移動は抗体が血漿試料中の細胞に結合していることを指す。

## 【0238】

## 実施例 6

## 放射能標識化抗体との培養による細胞性 X I I a 因子の測定

X I I a 因子の更なる立証及び定量化（測定）方法は、全血あるいは血漿への放射能標識化 2 / 2 1 5 抗体の添加、遠心分離によって細胞を分離し、ならびにこの画分に結合した放射能活性量を測定することによるものである。

## 【0239】

モノクローナル抗体 2 / 2 1 5 はヨウ素 1 2 5 にて標識化させた。血液試料は 8 人のボランティアから得られ、ならびに放射能標識化抗体と培養させた。赤血球は低遠心力（1 0 0 0 g）にての遠心分離によって除去され、ならびに他の細胞（血小板及び白血球を含む）は高遠心力（1 6 0 0 0 g）にての遠心分離によって分離された。ペレット状細胞は 1 0 0 m M ホスフェート バッファー 生理食塩水、p H 7 . 4 ( P B S ) に再懸濁され、ならびに 1 6 0 0 0 g で 1 0 分間遠心分離され、その後上清が処分されることによって洗浄された。ペレット状物質は同様の方法でさらに 2 回洗浄され、その後 P B S に再懸濁され、「細胞懸濁液」と名づけられた。

10

20

30

40

50

## 【0240】

この細胞性物質に関連する放射能活性、ならびにX I I a因子に結合した抗体の総量が測定され、ならびに細胞性画分中のX I I a因子の比率がそれに応じて計算された。

## 【0241】

表2において、細胞性X I I a因子に結合した添加抗体のパーセンテージ及び細胞性画分に関するX I I a因子と結合した抗体の比率が示される。著しいしかながらさまざまな細胞性X I I a因子の量が存在することがみてとれる。図9は8個体の細胞性X I I a因子濃度に関するグラフ表示である。

## 【表2】

10

細胞性X I I a因子に結合した添加標識化抗体のパーセンテージ及び

細胞性画分に関するX I I a因子に結合した抗体の比率

ドナー	細胞性X I I a因子に結合した添加抗体のパーセンテージ	細胞性画分中の総結合抗体の比率 (%)
5	2.99	23
6	3.96	32
7	2.30	28
8	3.77	34
9	1.81	20
10	0.68	11
11	0.86	12
12	1.20	14

20

30

## 【0242】

## 実施例7

「X I I因子欠乏」固体の細胞性X I I a因子

クエン酸塩添加した血液は「正常な」ボランティアならびにX I I因子が完全に欠乏しているとみなされる個体（E R L，英国，スウォンジー，スケルティロード15から入手可能な抗体を用いたX I I抗原E L I S Aによって立証された）から集められ、ならびに凝固分析を用いたX I I因子の測定によった（グリフィン，J．H．ならびにコックレーン，C．G．，酵素学の方法，アカデミックプレス（ニューヨーク）45，56-65，1976）。細胞は1000gにて10分間遠心分離することによって分離された。すべてのチューブからの血漿は各個体についてあらゆる収集チューブのばらつきを除去するために溜められた。血漿の一部はエッペンドルフチューブ内に1mlアリコートとして分取され、「濃細胞血漿」と名づけられた。

40

## 【0243】

血漿残存物は分取され、ならびに次に微量遠心機で高速（16000gで10分間）にて遠心分離された。上清は分離され、ならびに「希細胞血漿」と名づけられた。沈殿物は次に100mMホスフェートバッファー生理食塩水、pH7.4（PBS）に再懸濁され、ならびに16000gで10分間遠心分離され、その後上清が処分されることによって洗浄された。ペレット状物質は同様の方法でさらに2回洗浄され、その後PBSに再懸

50

濁され、「細胞懸濁液」と名づけられた。

【0244】

3 試料（濃細胞血漿、希細胞血漿ならびに懸濁液）は次に、実施例 1 に記載された 2 / 2 1 5 接合体ならびにポリクロール接合体を使用したマイクロタイタープレート分析を用いて分析された。試料はまた、実施例 4 に記載されたアボット IMx 自動免疫測定機器を用いた活性化 X I I 因子に対する分析を用いて分析された。この場合、細胞性 X I I a 因子の検出に使用された接合体は過酸化酵素標識化 m A b 2 0 1 / 及び 2 / 2 1 5 であり、実施例 3 を参照のこと。

【0245】

「完全に X I I 因子が欠乏している」個体からの細胞性 X I I a 因子の応答が存在するという驚くべき観察がなされた、図 1 0 a、1 0 b、1 1 a、1 1 b、1 2 a、1 2 b、1 3 a 及び 1 3 b に示されたデータを参照のこと。 10

【0246】

X I I 因子循環は肝臓から生ずる。「X I I 因子欠乏」個体は水相内で X I I 因子循環がないために、脂質結合 X I I a 因子は水相 X I I 因子又は X I I a 因子の吸着によって形成され得ず、それゆえに細胞性 X I I 因子及び X I I a 因子は他の源によって生成されたはずであった。リンパ球あるいは巨核球などの他の細胞株内で X I I 因子の生産が起きているらしいとみなされる。

【0247】

実施例 8

この実施例において、血漿における脂質結合 X I I a 因子の存在は、ラジオトレーサー（ヨウ素 1 2 5）で標識化されたモノクローナル抗体 2 / 2 1 5 断片の血漿への添加、リポタンパク質の沈殿、ならびに沈殿させたリポタンパク質画分に関する放射能活性量の評価によって、立証された。 20

【0248】

抗体 2 / 2 1 5 の F a b 抗体断片を、生産者の取扱書にしたがって「イミュノピュア F a b 調製キット」（ピラス、イリノイ州 6 1 1 0 5、ロックフォード、私書箱 1 1 7、3 7 3 7 エヌ メリディアン ロード）を用いて調製した。これら F a b 断片は次にヨウ素 1 2 5 を用いてアマシャム ファルマシア バイオテク（英国 エッチピー 8 4 エスピー、チャルフォント ストリート ジャイルズ ナイチンゲールズ レーン ポラズ ウッド）によって放射能標識化した。 30

【0249】

クエン酸塩添加した血漿は 1 2 人の健康なボランティアから得られた（男性 6 人及び女性 6 人）。

【0250】

1  $\mu$  l の放射能標識化抗体が各ボランティアの 1 m l の血漿に添加された。4 時間培養後、血漿は細胞性成分を除去するために 1 2, 0 0 0 g で 1 0 分間遠心分離された。リポタンパク質は、5 0 0 m M 塩化ナトリウム、2 1 5 m M 塩化マンガンならびに 5 0 0 U / m l ヘパリンを含む 3 0 0  $\mu$  l の沈殿剤の、4 0 0  $\mu$  l の血漿上清への添加によって沈殿させた。混合、ならびに 1 0 分間の培養後、試料は 1 2, 0 0 0 g で 1 0 分間遠心分離された。上清は除去され、ならびにリポタンパク質ペレットはあらゆる残留水相 X I I a 因子を除去するために、該ペレットを 1 m l の沈殿剤に再懸濁させ、1 2, 0 0 0 g で 1 0 分間遠心分離させ、ならびに上清を除去させることによって、洗浄された。この洗浄手順を 3 回実施した後、ペレット状物質に関する放射能活性がマルチウエルシンチレーションカウンターを用いて測定された。 40

【0251】

図 1 4 は 1 2 人のボランティアから得られた脂質結合 X I I a 因子レベル値を示す。図 1 4 から、脂質結合 X I I a 因子はすべてのテスト試料に見出される一方で、個体間の濃度にかなりのバリエーションがあることがみてとれる。

【0252】

## 実施例 9

この実施例において、血漿における脂質結合 X I I a 因子の存在は、ラジオトレーサー (ヨウ素 125) で標識化されたモノクローナル抗体 2 / 2 1 5 断片の血漿への添加、リポタンパク質の沈殿、ならびに沈殿させたリポタンパク質画分に関する放射能活性量の評価によって、立証された。

## 【0253】

抗体 2 / 2 1 5 の F a b 抗体断片を、生産者の取扱書にしたがって「イミュノピュア F a b 調製キット」(ピアス, イリノイ州 6 1 1 0 5, ロックフォード, 私書箱 1 1 7, 3 7 3 7 エヌ メリディアン ロード)を用いて調製した。これら F a b 断片は次にヨウ素 125 を用いてアマシャム ファルマシア バイオテク (英国 エッチピー 8 4 エスピー, チャルフォント ストリート ジャイルズ ナイチンゲールズ レーン ポラズ ウッド)によって放射能標識化した。

10

## 【0254】

クエン酸添加した血漿は胸痛で病因に入院した 6 4 人の患者から得られた。

## 【0255】

5  $\mu$  l の放射能標識化抗体が各患者の 1 m l のクエン酸添加した全血に添加された。3 時間培養後、血漿は細胞性成分を除去するために 1 6, 0 0 0 g で 1 0 分間遠心分離された。リポタンパク質は、5 1 . 5 4 m M ホスフォタングステン酸、水酸化ナトリウムを用いて p H 6 . 1 5 に調節された 0 . 0 7 M 塩化マンガンを含む 5 0 0  $\mu$  l の沈殿剤の、2 0 0  $\mu$  l の血漿上清への添加によって沈殿させた。混合、ならびに 1 0 分間の培養後、試料は 1 6, 0 0 0 g で 1 0 分間遠心分離された。上清は除去され、ならびにリポタンパク質ペレットはあらゆる残留水相 X I I a 因子を除去するために、ペレットを 1 m l の沈殿剤に再懸濁させ、1 6, 0 0 0 g で 1 0 分間遠心分離させ、ならびに上清を除去させることによって、洗浄された。この洗浄手順を 3 回実施した後、ペレット状物質に関する放射能活性がシングルウェルシンチレーションカウンターを用いて測定された (ラブ ロジック社, 英国 エス 1 1 8 ユーエックス, シェフィールド, プサルター レーン 1 3 1, セントジョーンズハウス)。

20

## 【0256】

図 1 5 は前記 6 4 人の患者から得られた脂質結合 X I I a 因子の濃度を示す。図 1 5 から、脂質結合 X I I a 因子はすべてのテスト試料に見出される一方で、個体間の濃度にかなりのバリエーションがあることがみてとれる。

30

## 【0257】

## 実施例 10

この実施例において、マイクロタイター E L I S A 免疫学的検定法が脂質結合 X I I a 因子の存在を立証するために使用された。血漿試料におけるリポタンパク質は、リポタンパク質粒子上に存在するタンパク質に対する抗体によって捕獲される。これらリポタンパク質上の X I I a 因子の存在は次にアルカリホスファターゼ標識化 m A b 2 / 2 1 5 の添加によって立証される。

## 【0258】

クエン酸塩添加した血漿は 8 人の健康なボランティアから得られた。

40

## 【0259】

1 0 0  $\mu$  l のクエン酸添加した血漿のアリコートが - リポタンパク質に対するヤギのポリクローナル抗体 (シグマ社, 英国, ドーセット, ギリンガム, ニュー ロード, ザ オールド ブリックヤード) で事前コートされたマイクロプレートのウェルに添加された。6 0 分間培養後、プレートはボレートバッファー 生理食塩水 洗浄溶液 (p H 7 . 4) にて洗浄された。アルカリホスファターゼ標識化 2 / 2 1 5 抗体を含む 1 0 0  $\mu$  l の接合体が各ウェルに添加され、プレートはさらに 6 0 分間培養された。プレートの再洗浄後、1 0 0  $\mu$  l のフェノールフタレインホスフェート基質が添加された。3 0 分間培養期間後、アルカリ性停止溶液が更なる基質転換を抑制するために添加され、ならびに吸光度が 5 5 0 n m にて記録された。

50

## 【0260】

図16は、上記に示されたELISA方法によって評価された、8人のボランティアから得られた脂質結合XIIa因子濃度を示す。図16から、脂質結合XIIa因子はすべてのテスト試料に見出される一方で、個体間の濃度にかかなりのバリエーションがあることがみてとれる。

## 【0261】

## 実施例11

尿のXIIa因子のマイクロタイタープレート分析

5人の正常なランダム尿試料は健康な男性ボランティアから得られた。これら試料は下記に記載されたようなマイクロタイタープレート分析を用いてXIIa因子の存在について試験された。

10

## 【0262】

試料の100 $\mu$ lアリコートがmAb2/215にて事前コートされたマイクロタイタープレートのウェルに添加された。60分間培養後、プレートはボレートバッファー 生理食塩水 洗浄溶液 (pH7.4) にて洗浄された。100 $\mu$ lの接合体 (ヒト XIIa に対するアルカリホスフォターゼ標識化羊ポリクローナル抗体) が各ウェルに添加され、プレートはさらに60分間培養された。プレートの再洗浄後、100 $\mu$ lのフェノールフタレインホスフェート基質が添加された。適切な培養期間後、アルカリ性停止溶液が更なる基質転換を抑制するために添加され、ならびに吸光度が550nmにて記録された。試料中のXIIa因子濃度は次に、試料の吸光度と既知濃度のXIIa因子を含む水性試料から得られたものとを比較することによって計算された。得られた尿のXIIa因子濃度は表3に示される。

20

## 【表3】

5人の男性ボランティアからのランダムな尿試料における  
マイクロプレート分析によって評価されたXIIa因子濃度

ボランティア	XIIa ng/ml
1	0.9
2	1.6
3	1.8
4	1.8
5	1.0

30

## 【0263】

## 実施例12

尿のXIIa因子のIMx分析

5人の正常なランダム尿試料が健康な男性ボランティアから得られた。これら試料は上記実施例4に記載されたようなIMx分析を用いて、ポリクローナル抗体ベースの接合体を用いて、XIIa因子の存在について試験された。尿のXIIa因子濃度の結果は表4に示される。

40

【表 4】

健康な男性ボランティアからのランダムな尿試料における

I M x 分析によって評価された X I I a 因子濃度

ボランティア	X I I a n g / m l
A	0. 5
B	3. 3
B	2. 8
D	2. 3
E	0. 9

10

## 【 0 2 6 4 】

## 実施例 1 3

この実施例において、尿の X I I a 因子の存在は、蛍光標識化抗体との結合、ならびに非結合分子から X I I a 因子に結合する抗体の、高速液体クロマトグラフィー ( H P L C ) を用いた分子量に基づく分離によって立証された。

20

## 【 0 2 6 5 】

m A b 2 / 2 1 5 を、生産者の取扱書によりフルオロセインイソチオシアネート ( ピアス , イリノイ州 6 1 1 0 5 , ロックフォード , 私書箱 1 1 7 , 3 7 3 7 エヌ メリディアン ロード ) にて標識化した。

## 【 0 2 6 6 】

H P L C システムはウォーターズ 1 5 2 5 バイナリー H P L C ポンプ、ウォーターズ 2 4 8 7 二重 吸光度検出器、ならびにジャスコ F P 1 5 2 0 インテグラル 蛍光検出器からなった。H P L C に使用された移動相は 0 . 1 M 塩化ナトリウム 0 . 0 5 M トリス塩酸、0 . 4 % ( w / v ) トリス - ナトリウム クエン酸塩 p H 7 . 5 であった。固定相は一連の 2 x 3 0 c m バイオセップ - セック - S 3 0 0 0 カラム ( フェノメネクス , 英国 , チェシャー エスケー 1 0 2 ビーエヌ , マックルズフィールド , ハーズフィールド インダストリアル エステート , キーンズ アベニュー ) からなった。流速は 1 . 0 m l m i n <sup>-1</sup>、ならびに注入量は 1 0 0 μ l であった。ジャスコ 蛍光検出器の調整は：励起波長 4 9 4 n m、発光波長 5 2 0 n m、増幅率 1 0 0 0、減衰 1 とした。

30

## 【 0 2 6 7 】

H P L C システムを通過させる試料は F I T C 標識化 2 / 2 1 5 のみ、尿試料のみ、ならびに F I T C 標識化 2 / 2 1 5 と 4 時間培養させた尿 ( 2 5 0 μ l の尿に 1 μ l の F I T C 標識化抗体を加えた ) であった。

40

## 【 0 2 6 8 】

蛍光対時間曲線の例を図 1 7 a ないし図 1 7 d に示す。

## 【 0 2 6 9 】

図 1 7 a において、尿試料のみに対するトレースは、尿試料が内因性の蛍光を示すことを示す。図 1 7 b において、F I T C 標識化抗体に関する蛍光が観測される。図 1 7 c において、F I T C 標識化抗体と事前培養がなされている尿は、図 1 7 a ならびに図 1 7 b のものに追加ピークを示す。これは F I T C 標識化抗体が尿試料中の成分に結合していることを示す。このことは、さらに、図 1 7 d においても示され、該図においては、内因性の蛍光ならびに F I T C 標識化抗体のみに関するシグナルが差し引かれ、結果として得られ

50

たトレースは尿のX I I a 因子への抗体の結合のみを反映している。

【0270】

#### 実施例14

この実施例において、血漿における尿のX I I a 因子の存在は、ラジオトレーサー（ヨウ素125）で標識化された抗体断片との結合、ならびに得られた複合体の高速液体クロマトグラフィー（H P L C）を用いた分子量に基づく分離によって立証された。

【0271】

H P L C システムはアジレント1100システムからなった。

【0272】

抗体2/215のF a b 抗体断片を、生産者の取扱書にしたがって「イミュノピュア F a b 調製キット」（ピアス，イリノイ州 61105，ロックフォード，私書箱 117，3737 エヌ メリディアン ロード）を用いて調製した。これらF a b 断片は次にヨウ素125を用いてアマシャム ファルマシア バイオテク（英国 エッチピー84 エスピー，チャルフォント ストリート ジャイルズ ナイチンゲールズ レーン ポラズ ウッド）によって放射能標識化した。

【0273】

1  $\mu$  l の放射能標識化抗体が健康なボランティアから得られた1 m l の尿に添加された。4時間培養後、血漿成分は高速液体クロマトグラフィー（H P L C）によって分離された。

【0274】

H P L C に使用された移動相は0.1 M 塩化ナトリウム 0.05 M トリス塩酸、0.4% (w/v) トリス-ナトリウム クエン酸塩 p H 7.5であった。固定相は一連の2 x 30 cm バイオセップ-セック-S 3000 カラム（フェノメネクス，英国，チェシャー エスケー10 2 ビーエヌ，マックルズフィールド，ハーズフィールド イングストリアル エステート，クィーンズ アベニュー）からなった。流速は0.7 m l m i n<sup>-1</sup>、ならびに注入量は100  $\mu$  l であった。

【0275】

H P L C 溶出画分は、20秒ごとに1画分を集めるようにセットした、自動フラクションコレクターを用いて集められた。放射能活性は次にマルチウエル シンチレーション カウンターを用いて各画分において測定された。

【0276】

放射能活性対時間曲線の例を図18に示す、該図においては非結合抗体断片のピークに追加したピークが存在することがみてとれ、放射能標識化抗体断片は尿中で存在するX I I a 因子に結合していることが立証された。

【0277】

#### 実施例15

この実施例において、経皮経管冠動脈形成（P T C A）を受けた患者におけるX I I a 因子形態の識別的応答が立証された。

【0278】

試料は冠状動脈血管形成術の直前、直後、5日後の患者から得られた。試料は次にX I I a 因子の特定形態の測定に有利にはたらくように設計された2つの分析を用いてX I I a 因子に対して分析された。

【0279】

分析1において、m A b 2/215はヌンク（ヌンク A/S，デンマーク，4000 ロスキレ，私書箱 280，カルストルプエジュ 90）マックスソープ マイクロプレート（100  $\mu$  l の抗体が各ウェルにコートされている）上に15  $\mu$  g m l<sup>-1</sup>濃度でカーボネート コーティング バッファー（p H . 9 . 6）内でコートされた。0.5% (v/v) の最終トリトン濃度で添加したトリトンX - 100（シグマ社，英国，ドーセット，ギリンガム，ニュー ロード，ザ オールド ブリックヤード）と共に75  $\mu$  l の血漿はマイクロタイタープレートのウェルに添加され、ならびに室温にて60分間培養された

。マイクロタイタープレートのウェルを洗浄後、100  $\mu$ l の接合体が添加された。この接合体はアルカリホスファターゼに接合したモノクローナル抗体 201 / 9 からなった。60 分間培養後、マイクロタイタープレートのウェルは再洗浄され、ならびにフェノールフタレインホスフェートを含む 100  $\mu$ l の基質溶液が添加された。室温にて 60 分間培養後、反応は強塩基溶液 (50 g / l の炭酸ナトリウム、pH 10.5) の添加にて停止させられ、550 nm における吸光度が測定された。

【0280】

分析 2 において、抗体 2 / 215 はヌンク マックスソープ マイクロプレート (100  $\mu$ l の抗体が各ウェルにコートされている) 上に 2  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> 濃度でホスフェート コーティング バッファー (pH . 7 . 4) 内でコートされた。トリトン X - 100 無添加の 75  $\mu$ l の血漿はマイクロタイタープレートのウェルに添加され、ならびに室温にて 60 分間培養された。マイクロタイタープレートのウェルを洗浄後、100  $\mu$ l の接合体が添加された。この接合体はアルカリホスファターゼに接合した X I I 抗因子 (エンザイム リサーチ ラボラトリーズ社, 英国, スワンジ, スケルティ ロード) に対するポリクローナル抗体からなった。60 分間培養後、マイクロタイタープレートのウェルは再洗浄され、ならびにフェノールフタレインホスフェートを含む 100  $\mu$ l の基質溶液が添加された。室温にて 60 分間培養後、反応は強塩基溶液 (50 g / l の炭酸ナトリウム、pH 10.5) の添加にて停止させられ、550 nm における吸光度が測定された。

10

【0281】

図 19 は個体から得られた典型的な数値傾向を示す。そこには血管形成術の直前、直後、ならびに 5 日後の試料間に分析 1 によって優先的に測定された X I I a 因子形態の濃度においてごく小さい変化があることがみてとれる。これは、分析 2 によって優先的に測定された X I I a 因子形態の濃度変化とは大いに異なり、分析 2 では数値の大きな増加は明らかに血管形成術直後であり、5 日間で血管形成術直前の数値に戻る。

20

【0282】

図 20 において、分析 2 によって測定した X I I a 因子の特定形態の応答は血管形成術を受けた個体間で変化することが示される。患者 S 0 2 1 6 は血管形成直後に X I I a の増加を示し、更なる数値上昇が 5 日後の試料において明白となった。患者 S 0 8 1 1 ならびに S 0 9 0 9 が血管形成直後に X I I a 因子の大きな増加を示し、5 日後の試料は血管形成術直前の試料と類似あるいはより低い数値を与える一方で、患者 S 0 7 9 4 は X I I a 因子の最小変化しか示さなかった。これらの応答の差異は X I I a 因子を含む生理学的システムの活性化の程度を反映し、ならびにそれゆえに血管形成術処置の有効性を示し得る。

30

【0283】

実施例 16

この実施例において、血栓溶解を受けた患者における X I I a 因子の識別的応答が立証された。

【0284】

試料は血栓溶解治療の直前、直後、5 日後の患者から得られた。試料は次に X I I a 因子の特定形態の測定に有利にはたらくように設計された 2 つの分析を用いて X I I a 因子に対して分析された。使用された分析 (すなわち分析 1 及び分析 2) は実施例 15 に記載された通りである。

40

【0285】

図 21 は個体から得られた典型的な数値傾向を示す。そこには血栓溶解の直前、直後、ならびに 5 日後の試料間に分析 1 によって優先的に測定された X I I a 因子形態の濃度においてほとんど変化がないことがみてとれる。これは分析 2 によって優先的に測定された X I I a 因子形態の濃度変化とは大いに異なり、分析 2 では数値の大きな増加は明らかに血栓溶解直後であり、5 日間で血栓溶解直前の数値に戻る。

【0286】

図 22 において、分析 2 によって測定した X I I a 因子の特定形態の応答は血栓溶解を受

50

けた個体間で変化することが示される。患者S0684は血栓溶解によってXIIa因子の変化を示さないが、患者S0693は血栓溶解直後に大きな増加が起こり、5日間で血栓溶解直前の数値に戻る一方で、患者S0685は血栓溶解の直後ならびに5日後の数値において連続的な減少が起こる。これらの応答の差異はXIIa因子を含む生理学的システムの活性化の程度を反映し、ならびにそれゆえに血栓溶解術の有効性を示し得る。この結論は、血栓溶解後に著しい増加を示した患者は少なくとも30日間再発せずにいる一方で、血栓溶解の直前ならびに直後に得られた数値においてほとんど変化を見せなかった2人の患者は数日で死亡したという事実によって確認された。

【0287】

実施例17

この実施例はXIIa因子の特定形態の測定は、心筋梗塞ならびに急性冠不全症候群の疑いで病院に入院した患者の、心筋梗塞の再発あるいは心臓死のリスク予測を提供することを立証する。

【0288】

データは病院に入院した820人の患者から得た。各患者はいくつかの分析を用いてXIIa因子を測定され、その結果異なるXIIa因子形態が測定された。各分析は、最初の入院期間あるいは入院30日後の間に、その後のトロポニン陽性イベント（心筋梗塞）又は心臓死における第一次臨床的エンドポイントの予測を提供するかどうかを解明するために研究された。

【0289】

分析の予測の有用性は、それぞれ異なるXIIa因子形態を優先的に測定する、各分析に対してのXIIa因子数値のランキング（最低から最高）、ならびに次に集団の四分位への分割、すなわち最もXIIa因子濃度の低い205個体は1番目の四分位に、最もXIIa因子濃度の高い205個体は4番目の四分位に分割することによって決定された。

【0290】

異なるXIIa因子形態はさまざまな臨床転帰のリスクファクターであり、それゆえに異なるXIIa因子形態を測定する異なる分析はさまざまな定義された転帰に対する最もよい臨床的有用性を提供することが見出された。

【0291】

初入院後の入院期間中におけるその後のトロポニン陽性イベントの第一次臨床的エンドポイントについて評価した場合、とりわけ、試料がXIIa因子複合体あるいは試料中に存在する粒子とのXIIa因子の会合を分裂させるような界面活性剤と接触していないので、最もよい予測指標は複合体ならびに/あるいは多数XIIa因子分子を含む粒子の測定をすると考えられる分析であることが発見された。

【0292】

使用される分析はマイクロタイタープレート形式の免疫学的検定法であり、該分析においてmAb2/215はヌック マックスソープ マイクロプレート（100 $\mu$ lの抗体が各ウェルにコートされている）上に2 $\mu$ g ml<sup>-1</sup>濃度でホスフェート コーティング バッファー（pH 7.4）内でコートされた。トリトンX-100無添加の75 $\mu$ lの血漿はマイクロタイタープレートのウェルに添加され、室温で60分間培養された。マイクロタイタープレートのウェルを洗浄後、100 $\mu$ lの接合体が添加された。この接合体はアルカリホスファターゼに接合した同一抗体、mAb2/215が使用された。60分間培養後、マイクロタイタープレートのウェルは再洗浄され、ならびにフェノールフタレインホスフェートを含む100 $\mu$ lの基質溶液が添加された。室温にて60分間培養後、反応は強塩基溶液（50g/lの炭酸ナトリウム、pH 10.5）の添加にて停止させられ、550nmにおける吸光度が測定された。

【0293】

図23から、分析によって測定された、XIIa因子の多分子からなるXIIa因子形態であると考えられ、XIIa因子分子の分子複合体として会合している、ならびに/あるいは細胞あるいは細胞残片あるいはリポタンパク質粒子あるいはその残片などの粒子表面

10

20

30

40

50

上に存在していても良いX I I a 因子形態の低い濃度値を持つ個体は、初入院期間中に二次トロポニン陽性イベントが起こるさらに増加したリスクに瀕している、ということがみてとれる。図24から、X I I a 因子の他の形態を優先的に測定する分析はこの臨床的有用性を提供しないことがみてとれる。

**【0294】**

しかしながら、使用される第一次臨床的エンドポイントが、入院期間後の、しかしながら入院日30日以内の、その後のトロポニン陽性イベントであるとき、異なるX I I a 因子形態の高い濃度値は、すなわち上記に記載された分析によって測定された形態との差異は、大きな前兆となることが発見された。

**【0295】**

このことは、4番目の四分位のイベントは最初の2つの四分位群のいずれに比べても8倍以上であるところの図25において示される。図25のマイクロタイタープレート分析の条件はヌンク マックスソープ マイクロプレート(100 $\mu$ lの抗体が各ウェルにコートされている)上に15 $\mu$ g ml<sup>-1</sup>濃度でカーボネート コーティング バッファー(pH.9.6)内でコートされたmAb2/215である。0.5%(v/v)の最終トリトン濃度で添加したトリトンX-100(シグマ社,英国,ドーセット,ギリンガム,ニューロード,ザオールドブリックヤード)と共に75 $\mu$ lの血漿はマイクロタイタープレートのウェルに添加され、ならびに室温にて60分間培養された。マイクロタイタープレートのウェルを洗浄後、100 $\mu$ lの接合体が添加された。この接合体はアルカリホスファターゼに接合したmAb201/9からなった。60分間培養後、マイクロタイタープレートのウェルは再洗浄され、ならびにフェノールフタレインホスフェートを含む100 $\mu$ lの基質溶液が添加された。室温にて60分間培養後、反応は強塩基溶液(50g/lの炭酸ナトリウム、pH10.5)の添加にて停止させられ、550nmにおける吸光度が測定された。図26から、優先的に他のX I I a 因子形態を測定する分析はこの臨床有用性を提供しないということがみてとれる。

10

20

**【0296】**

死亡が臨床的エンドポイントとして使用された場合、3番目の分析が最もよい臨床的有用性を提供することが見出された。この分析は患者にその後のトロポニン陽性イベントを起こるかどうかにかわらず、患者の死亡リスクに関するX I I a 因子形態を測定するように見える。

30

**【0297】**

図27において、U型のカーブが見られ、X I I a 因子の特定形態濃度のより低い・より高い患者のどちらも、平均値に近い特定形態濃度を持つ者と比べて、著しく増加した死のリスクに瀕していることがわかる。

**【0298】**

図27におけるイベントの特徴を提供するマイクロタイタープレート分析の分析条件は、ヌンク マックスソープ マイクロプレート(100 $\mu$ lの抗体が各ウェルにコートされている)上に2 $\mu$ g ml<sup>-1</sup>濃度でホスフェート コーティング バッファー(pH.9.6)内でコートされたmAb2/215である。トリトンX-100無添加の75 $\mu$ lの血漿はマイクロタイタープレートのウェルに添加され、ならびに室温にて60分間培養された。マイクロタイタープレートのウェルを洗浄後、100 $\mu$ lの接合体が添加された。この接合体はアルカリホスファターゼに接合したX I I 因子(エンザイム リサーチ ラボラトリーズ社,英国,スワンジ,スケルティロード)に対するポリクローナル抗体からなった。60分間培養後、マイクロタイタープレートのウェルは再洗浄され、ならびにフェノールフタレインホスフェートを含む100 $\mu$ lの基質溶液が添加された。室温にて60分間培養後、反応は強塩基溶液(50g/lの炭酸ナトリウム、pH10.5)の添加にて停止させられ、550nmにおける吸光度が測定された。図28から、優先的に他のX I I a 因子形態を測定する分析はこの臨床有用性を提供しないということがみてとれる。

40

**【0299】**

50

## 実施例 18

深刻な敗血症にて病院に入院した患者は X I I a 因子数値を測定された。

## 【0300】

細胞性 X I I a 因子レベルは、ヨウ素 125 で放射能標識化させた 2 / 2 1 5 F a b 断片 5  $\mu$ g とともに、1 ml のクエン酸添加した全血を培養し、室温で 3 時間培養することにより測定されたが、この間に試料中のトータル放射能活性が測定された。

細胞は次に 16,000 g で遠心分離することによって血漿から分離され、ならびに血漿は除去された。残った細胞は 1 ml のホスフェートバッファ生理食塩水 (pH 7.4) を添加し、混合し、16,000 g で遠心分離し、そして上清を除去することにより 6 回洗浄した。6 回洗浄後、残存細胞ペレットの放射能活性が分析され、ならびに最初のトータル試料の放射能活性のパーセンテージとして示された。これは、血液試料に添加された放射能活性化抗体量における、あらゆる小さな変化を是正するために行われた。敗血症患者からの試料にこの手順を用いたのと同様に、敗血症ではない患者 100 人からの対応試料についてもまた実施された。

10

## 【0301】

敗血症ではない患者 100 人の細胞性 X I I a 因子量が 0.51 ないし 4.10% に及ぶ (平均 1.50、標準偏差 0.75) のに対して、敗血症患者の細胞性 X I I a 因子の数値は 8.20% であった。したがって、敗血症患者はコントロール群と比べてより高い細胞性 X I I a 因子数値を持っていた。

## 【0302】

## 実施例 19

この実施例は、脂質結合 X I I a 因子が心筋梗塞あるいは急性冠不全症候群の疑いで入院した患者の、心筋梗塞の反復あるいは心臓死のリスク予測を提供するものであることを立証する。

20

## 【0303】

データは心筋梗塞の疑いで入院した 160 人の患者によって得た。各患者は脂質結合 X I I a 因子を測定された。結果は、入院後 6 ヶ月間の、その後のトロポニン陽性イベントの第一次臨床的エンドポイントあるいは心臓死の予測を提供するかどうかを解明するために研究された。

## 【0304】

分析の予測有用性は X I I a 因子数値のランキング (最低ないし最高)、ならびに次に母集団の四分位への分割、すなわち最も濃度の低い 40 個体を 1 番目の四分位に、最も濃度の高い 40 個体を 4 番目の四分位へと分割することによって、測定された。次に各四分位における二次イベントを起こした患者数が計算された。

30

## 【0305】

抗体 2 / 2 1 5 の F a b 抗体断片を、生産者の取扱書にしたがって「イミュノピュア F a b 調製キット」(ピラス, イリノイ州 61105, ロックフォード, 私書箱 117, 3737 エヌ メリディアン ロード) を用いて調製した。これら F a b 断片は次にヨウ素 125 を用いてアマシヤム ファルマシア バイオテク (英国 エッチピー 8 4 エスピー, チャルフォント ストリート ジャイルズ ナイチンゲールズ レーン ポラズ ウッド) によって放射能標識化した。

40

## 【0306】

クエン酸添加した血漿は胸痛で入院した 160 人の患者から得られた。

## 【0307】

5  $\mu$ l の放射能標識化抗体が各患者の 1 ml のクエン酸添加した全血に添加された。3 時間培養後、血漿は細胞性成分を除去するために 16,000 g で 10 分間遠心分離された。リポタンパク質は、51.54 mM ホスフォタングステン酸、水酸化ナトリウムを用いて pH 6.15 に調節された 0.07 M 塩化マンガンを含む 500  $\mu$ l の沈殿剤の、200  $\mu$ l の血漿上清への添加によって沈殿させた。混合、ならびに 10 分間の培養後、試料は 16,000 g で 10 分間遠心分離された。上清は除去され、ならびにリポタンパ

50

ク質ペレットはあらゆる残留水相 X I I a 因子を除去するために、ペレットを 1 m l の沈殿剤に再懸濁させ、16,000 g で 10 分間遠心分離させ、ならびに上清を除去させることによって、洗浄された。この洗浄手順を 3 回実施した後、ペレット状物質に関する放射能活性がシングルウェルシンチレーションカウンターを用いて (ラブ ロジック, 英国 S 1 1 8 ユーエックス, シェフィールド, プサルター レーン 1 3 1, セントジョーンズハウス) 測定された。

【0308】

データは次に上記に示されたように四分位に仕分けられ、ならびに 2 次イベントを被った個体数が各四分位において数えられた。

【0309】

図 29 から、脂質結合 X I I a 因子濃度の増加は、入院から 6 ヶ月以内の、致命的でないトロポニン陽性イベントであるか心臓死である、二次イベントのリスク増加と関係していることがみてとれる。

【0310】

実施例 20

この実施例は、放射能活性化抗体との培養とその後の H P L C によって分析された尿における X I I a 因子の特定形態の濃度は、腎疾患の患者で増加することを立証した。

【0311】

24 時間の尿試料を腎疾患の患者 5 人ならびに健康なボランティア 5 人から得た。各被験者から集められた全尿試料は十分混合され、ならびに 30 m l のアリコートが除去されならびに分析に使用された。

【0312】

抗体 2 / 2 1 5 の F a b 抗体断片を、生産者の取扱書にしたがって「イミュノピュア F a b 調製キット」(ピラス, イリノイ州 6 1 1 0 5, ロックフォード, 私書箱 1 1 7, 3 7 3 7 エヌ メリディアン ロード)を用いて調製した。これら F a b 断片は次にヨウ素 1 2 5 を用いてアマシャム ファルマシア バイオテック(英国 エッチピー 8 4 エスピー, チャルフォント ストリート ジャイルズ ナイチンゲールズ レーン ポラズ ウッド)によって放射能標識化した。

【0313】

1  $\mu$  l の放射能標識化抗体は各ボランティアならびに各患者からの 1 m l 尿試料に添加された。4 時間培養後、尿成分は高速液体クロマトグラフィー(H P L C)によって分離された。H P L C システムはアジレント 1 1 0 0 システムであった。

【0314】

H P L C に使用された移動相は 0.1 M 塩化ナトリウム 0.05 M トリス塩酸、0.4% (w/v) トリス-ナトリウム クエン酸塩 pH 7.5 であった。固定相は一連の 1 x 30 cm バイオセップ-セック-S 3000 カラムならびに 1 x 30 cm バイオセップ-セック-S 2000 カラム(フェノメネクス, 英国, チェシャー エスケー 10 2 ビーエヌ, マックルズフィールド, ハーズフィールド インダストリアル エステート, クィーンズ アベニュー)からなった。流速は 0.5 m l m i n<sup>-1</sup>、ならびに注入量は 100  $\mu$  l であった。

【0315】

溶出液の放射能活性はハイ センシティブティ ヨウ素 1 2 5 デテクション システムが組み込まれたインライン シングル-ウェル シンチレーション カウンター(ラブ ロジック, 英国 エス 1 1 8 ユーエックス, シェフィールド, プサルター レーン 1 3 1, セントジョーンズハウス)を用いてモニターされた。

【0316】

X I I a 因子に対応するピーク範囲(放射能標識化抗体と培養させた純 X I I a 因子と同一の保持時間に基づいたもの)は各尿試料について積分によって得られた。得られた数値は表 5 ならびに図として図 30 に示される。腎障害の患者について得た数値は健康なボランティアのものよりも著しく高いことがみてとれる。

10

20

30

40

50

【表 5】

放射能標識化抗体との培養ならびにHPLCによって解明された、

10の尿における尿の $\beta$ XIIa因子数値

個体	$\beta$ XIIa因子ピークに対応する 毎秒の積分値
ボランティア1	423
ボランティア2	121
ボランティア3	348
ボランティア4	196
ボランティア5	205
腎障害1	3756
腎障害2	4127
腎障害3	1876
腎障害4	849
腎障害5	7801

10

20

## 【0317】

## 実施例21

この実施例は、マイクロタイタープレート分析によって分析された尿におけるXIIa因子の特定形態の濃度は、腎疾患の患者で増加することを立証した。

30

## 【0318】

24時間の尿試料は腎疾患患者5人ならびに健康なボランティア5人から得た。各被験者からの全尿試料は完全に混合され、ならびに30mlアリコートが除去されならびに分析に使用された。

## 【0319】

抗体2/215はヌンク(ヌンク A/S, デンマーク, 4000ロスキレ, 私書箱 280, カルストルブエジュ 90)マックスソープ マイクロプレート(100 $\mu$ lの抗体が各ウェルにコートされている)上に15 $\mu$ g ml<sup>-1</sup>濃度でカーボネート コーティング バッファー(pH 9.6)内でコートされた。0.5%(v/v)の最終トリトン濃度で添加したトリトンX-100と共に75 $\mu$ lの血漿はマイクロタイタープレートのウェルに添加され、ならびに室温にて60分間培養された。マイクロタイタープレートのウェルを洗浄後、100 $\mu$ lの接合体が添加された。この接合体はアルカリホスファターゼに接合したモノクローナル抗体201/9からなった。60分間培養後、マイクロタイタープレートのウェルは再洗浄され、ならびにフェノールフタレインホスフェートを含む100 $\mu$ lの基質溶液が添加された。室温にて60分間培養後、反応は強塩基溶液(50g/lの炭酸ナトリウム、pH 10.5)の添加にて停止させられ、550nmにおける吸光度が測定された。

40

## 【0320】

吸光度値は表6に示され、図31にはグラフ表示される。腎疾患の個体は健康なボランテ

50

ィアよりも著しく高い結果を与えた。

【表 6】

マイクロタイタープレート分析で得られた吸光度として表された、  
健康なボランティア 5 人と 5 個体の尿の  $\beta$  X I I a 因子数値

個体	A 5 5 0
ボランティア 1	0. 3 7
ボランティア 2	0. 0 9
ボランティア 3	0. 2 5
ボランティア 4	0. 1 2
ボランティア 5	0. 1 9
腎障害 1	1. 7 6
腎障害 2	2. 2 0
腎障害 3	1. 8 1
腎障害 4	0. 5 6
腎障害 5	3. 4 2

10

20

【 0 3 2 1 】

実施例 2 2

この実施例は本発明による使用に適したモノクローナル抗体の製造に関する一般的なプロトコルを与える。

30

【 0 3 2 2 】

抗体の産生に用いられた抗原は X I I 因子あるいはその断片であった。X I I 因子の抗原性断片は、それ自身免疫原であってもよいし、あるいは免疫原になるには小さすぎてもよく、その場合、該断片は下記に記載されたような他のタンパク質に接合することなどによって免疫原に変換された。ここで使用されるような「X I I 因子抗原断片」とは、ペプチドなどの断片、及びそれ自身が免疫原でない場合、そのような断片の免疫原形態、の双方を含む。

【 0 3 2 3 】

X I I 因子の抗原性断片は、X I I a 因子の、たとえば X I I 因子あるいは X I I a 因子あるいはその断片、たとえば、X I I a 抗因子を認識できる少なくとも一種の抗原性決定基であるかあるいは該基を含む X I I a 因子の断片であるペプチド、であり得る。

40

【 0 3 2 4 】

免疫原の調製方法は当業者に知られている。それらの方法のいずれも、免疫原性を与えるためあるいは X I I 因子又はその抗原断片の免疫原性の改善に利用される、国際特許第 9 0 / 0 8 8 3 5 号を参照。

【 0 3 2 5 】

たとえば、X I I a 因子は X I I a 抗因子モノクローナル又はポリクローナル抗体産生のための免疫原として使用され得る。X I I a 因子は、K・フジカワならびに E・W・ダヴィ（酵素学の方法，1981，80，198-211）によって記載された方法など

50

による、アンモニウムサルフェート沈殿と陰イオン交換クロマトグラフィーの組み合わせなどによって、新鮮な又は新鮮に凍結された血漿からのXII因子を最初に単離することからなる方法で製造され得る。XII因子をXIIa因子に変換する方法ならびに得られた混合物からXIIa因子を単離する方法は、K. フジカワ及びB. A. マクマラン (Journal of Biol. Chem., 1983, 258, 10924-10933) ならびにB. A. マクマラン及びK. フジカワ (Journal of Biol. Chem., 1985, 260, 5328) によって記載されている。XIIa因子を得るために、たとえばトリプシン又はトリプシン類似の酵素を用いて(一般にはトリプシンとXII因子のモル比が1:500やトリプシンとXII因子の質量比が1:75というような高度に希薄された形態において)、化学的又は酵素学的な消化により、XII因子を一般に限定された分裂に付され、分裂生成物は一般にクロマトグラフィーによって分離された。

#### 【0326】

XIIa因子の抗原性断片は免疫学的又は化学的手法によってXIIa因子の分化によって生成され得る。たとえば、XIIa因子のジスルフィド結合軽鎖ペプチドは、XIIa因子の還元ならびにカルボキシメチル化ならびにクロマトグラフィーによる断片の分離によって得られ得る(K. フジワラならびにB. A. マクマラン Journal of Biol. Chem. 1983, 258, 10294)。

あるいは、XIIa因子の抗原性断片は、それ自身のアミノ酸配列が知られている場合、XIIa因子自身のように合成的に製造される。ペプチド合成に関する多くの公知の化学的手法のどれでも使用することができ、特に自動装置を利用したものが使用される。

#### 【0327】

XIIa因子の抗原性断片は、XIIa因子自身のように組換えDNA技術のテクニックを用いて製造された。クールら, 1985ならびに1987, 前掲箇所、はヒト血液凝固XII因子cDNA及び遺伝子の特徴づけた。組換え生成物は既知の方法により達成される、国際特許第90/08835号を参照のこと。

#### 【0328】

他に特定されなければ、ここで使用される「XIIa因子」ならびに「XIIa」という用語はXIIa因子分子の抗原性断片を含む。

#### 【0329】

本発明による使用に対するモノクローナル抗体はXII因子チモーゲンに顕著な結合を見せないということが、不可欠ではないが好ましい。後者の場合、XII因子の修正交差反応性は、たとえば0.1%以下である。本発明の抗体のXII因子との交差反応性の分析において考慮する要素は、たとえ「純」XII因子調製液であってもほぼ必然的に少量のXIIa因子にて汚染されることである(シルバーバーグならびにカプラン, Blood 60, 1982, 64-70)。国際特許第90/08835号はXII因子との修正交差反応性の分析方法の詳細を与える。他に特定されなければ、「交差反応性」という用語はここで修正した交差反応性を意味するために使用される。

#### 【0330】

モノクローナル抗体生成に使用される方法は、周知であり、たとえば以下を参照のこと：酵素学の方法, H. ヴァン ヴナキス ならびに J. J. ロンゴン(編者) 1981, 72(B) ならびに同書, 1983 92(E)。

#### 【0331】

モノクローナル抗体はたとえばコーラーならびにミルスタインの方法の変更によって生成され得る(G. コーラー ならびに C. ミルスタイン, Nature, 1975, 256, 495)。

#### 【0332】

たとえば、メスのBalb/C又はC/57マウスはXII因子又はその免疫性断片、たとえば10ないし30µg、一般には20µgのXIIa因子又は他の抗原の対応する量の腹腔内の注入によって免疫性を与えられる。XIIa因子又は他の抗原は、好まし

くは、他のタンパク質分子、たとえば、ツベルクリンの精製タンパク質誘導体、あるいは好ましくはウシチログロブリンに接合する。接合はカルボキシイミド手法あるいはヘテロ-二官能性試薬の使用などによって実施され得る。免疫原は一般に補助剤に存在し、好ましくは完全フロイント補助剤に存在する。この手順は一般に間隔を置いて、一般に同一容量で同一免疫原を用いて繰り返され、たとえば、3週間の間隔を置いてマウスは、適切な応答レベルが観測されるまで、完全フロイント補助剤中の20 µgの接合 X I I a 因子を用いて追加免疫された。

事前溶解追加免疫は、好ましくは(マウス)の屠殺前に与えられ、たとえば、屠殺前に静脈注入された。

#### 【0333】

抗体応答は、たとえば、125I放射能標識などで適切に標識化された望ましい形態のX I I a 因子、たとえば、一種以上の細胞性X I I a 因子、脂質結合X I I a 因子、ならびに複合体形態あるいはX I I a 因子の他の分子又は低もしくは高親和性結合パートナーとの会合形態のX I I a 因子を用いて、R I A 抗血清カーブ分析などによってモニターされた。ある場合においては、この段階で、125I放射能標識化されたX I I a 因子あるいはその断片、たとえば放射能標識化 X I I a 因子、あるいはクロラミン-T法を用いて調製された他の X I I a 因子抗原などを使用することが適し得る(P. J. マコナヒー ならびに F. J. ディクソン, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 1966, 29, 185)。純度は、還元状態下で稼動させたS D S - P A G E ゲルなどの自動X線撮影を用いることなどによって確かめられた。

#### 【0334】

免疫化マウスの脾臓細胞は次に骨髓腫細胞、たとえばN S Oマウス骨髓腫細胞と、40 - 50%のP E G 4, 0 0 0又は50%のP E G 1 5 0 0の存在下で、溶解させた。細胞は次に培養プレートのウェル中に蒔かれ、ならびに選択された培地上で培養された。上清は、細胞性X I I a 因子、脂質結合X I I a 因子、ならびに複合体形態あるいはX I I a 因子の他の分子又は低もしくは高親和性結合パートナーとの会合形態のX I I a 因子といった、X I I a 因子の望ましい形態に対する反応性について、ペルオキシダーゼ標識化抗マウスI g Gなどを用いた固相酵素分析などにより、テストされた。試験に使用された抗原に対する特異性を示したすべてのウェルは一般に更なる二次スクリーニングが行われた。二次スクリーニングは、溶液中で適切な抗原、たとえば細胞性X I I a 因子、脂質結合X I I a 因子、ならびに複合体形態あるいはX I I a 因子の他の分子又は低もしくは高親和性結合パートナーとの会合形態のX I I a 因子などに結合したすべての特定抗体のスクリーニングなどからなつた。これらは、好ましくは、50%のB m a xに必要な抗体希釈を測定するために滴定された。非放射性に対する用量-応答カーブ、すなわち非標識化抗原が生成され、好ましくはX I I a 因子に対して生成された(X I I a 因子の交差反応性が要求されない場合)。プラスミン及びフィブロンectinもまた使用され得る。交差反応性の範囲は以下の式によって測定され得る。

#### 【化1】

$$\frac{50\% \text{ B M a x を獲得するための非放射性標準抗原の質量}}{50\% \text{ B M a x を獲得するための交差反応物質の質量}} \times 100$$

#### 【0335】

これらの、少なくとも $10^{10} \text{ M}^{-1}$ の親和定数を持つような、望ましい抗原に結合する適切なレベルを見せる抗体は、一般にクローニングのために事前に得られる。

#### 【0336】

成功したクローンは一般にアイソタイプである。細胞は次に、望ましいX I I a 因子形態、たとえば細胞性X I I a 因子、脂質結合X I I a 因子、ならびに複合体形態あるいはX

10

20

30

40

50

II a 因子の他の分子又は低もしくは高親和性結合パートナーとの会合形態の X I I a 因子などに結合する望ましい抗体の製造のために、好ましくは、限界希釈法によってサブクローンされ、ならびに酵素免疫測定あるいは放射免疫測定を用いることなどによって、再度スクリーニングされた。各クローニングからの選択されたサブクローンは、放射免疫測定又は E R I S A を用いて、特異性ならびに用量応答について評価され得る。

【0337】

必要であれば、抗体は、好ましくは 1 . 5 % 以下、たとえば 1 % 以下、たとえば 0 . 5 % 以下、たとえば 0 . 1 % もしくはそれ以下の所定の X I I 因子に対する明白な交差反応性を示すものに対して、スクリーニングされ得る。

【0338】

上記に記載されたように、X I I a 因子の望ましい形態に対するスクリーニングは、一般に最初の実施され、しかしながら 2 回あるいは所望により 3 回のスクリーンが任意の順序で実施され得る。スクリーニングステップにおいて、適切な場合、m A b 2 / 2 1 5 又は m A b 2 0 1 / 9 は参照抗体として使用され得る。これは、m A b 2 / 2 1 5 又は 2 0 1 / 9 と同一あるいは類似の、X I I a 因子の特定形態に対する結合特性をもつ、モノクローナル抗体の入手が要求される場合に、特に有用である。

【0339】

スクッチャード分析は各抗体の親和定数値を生成するために用量応答データに使用される。

【0340】

サブクローン又はクローンハイブリドーマ細胞は、腹水製造のために B a 1 b / C マウスの腹腔内に注射される。免疫グロブリンは、4 で飽和アンモニウムスルフェート溶液（同量の）を用いるなどして腹水から沈殿させ得る。沈殿物は好ましくは精製され、たとえば遠心分離され、5 0 m M のトリス塩酸バッファー p H 7 . 5 （元の腹水量と同量）などを用いて溶解され、ならびに次に同バッファーから透析させる。免疫グロブリン画分は次に、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いてさらに精製され得、たとえば、タンパク質溶液がモノ-Q 陰イオン交換カラム（ファルマシア）に適用され、生産者の取扱書にしたがって同バッファー中で塩勾配によって溶出され得る。免疫グロブリンを含む画分は一般に溜められ、ならびに貯蔵のため - 2 0 で凍結される。あるいは、ハイブリドーマ細胞は抗体を生産するために培養液の中で成長させられ、ならびに、抗体は基本的に腹水溶液のために、上記に示されたように単離される。あるいは、ハイブリドーマは試験管内で培養される。

【0341】

ここで上記に示されているハイブリドーマはマウス脾臓細胞に由来するものであるが、本発明はネズミあるいはネズミの一部由来のハイブリドーマに限定されない。両融合パートナー（脾臓細胞ならびに骨髄腫）はあらゆる適切な動物から得ることができる。組み換え抗体が生成されることができる。抗体は、必要な場合には、キメラあるいはヒト化形態に転換され得る。ハイブリドーマは好ましくは試験管中で培養される。

【0342】

ハイブリドーマの寄託

モノクローナル抗体（m A b）2 / 2 1 5 はハイブリドーマ 2 / 2 1 5 （B F x 1 1 a）によって生産され、英国，ソールズベリー S P 4 0 J G ，ポートンダウンの応用微生物学及び研究のための P H L S センターの生物学部門である欧州動物細胞カルチャーコレクション（E C A C C として知られる）へ 1 9 9 0 年 1 月 1 6 日に寄託ナンバー 9 0 0 1 1 6 0 6 で寄託されており、ならびに、モノクローナル抗体 2 0 1 / 9 を生産するハイブリドーマ 2 0 1 / 9 （E S B T 4 1 . 1）は E C A C C へ 1 9 9 0 年 1 月 1 8 日に寄託ナンバー 9 0 0 1 1 8 9 3 で寄託されている。

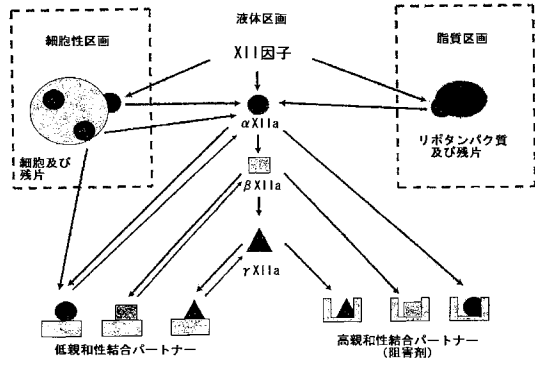
10

20

30

40

【図1】



【図2】

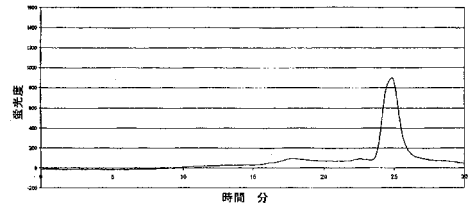


図2 a

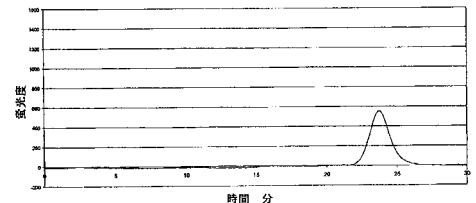


図2 b

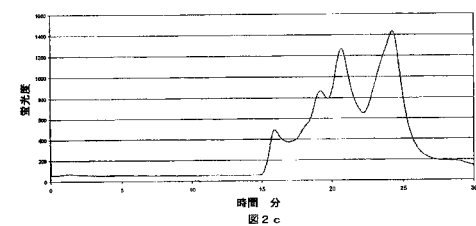


図2 c

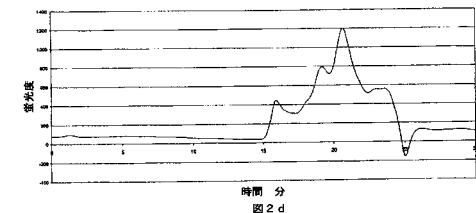
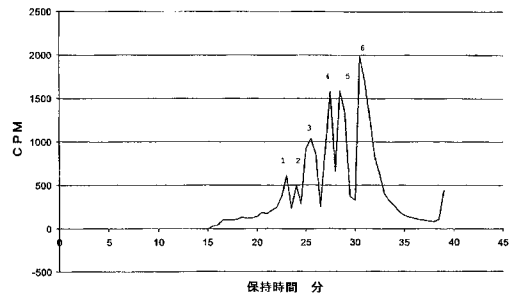


図2 d

【図3】



【図4】

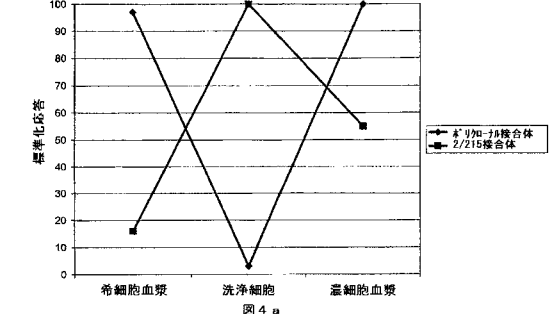


図4 a

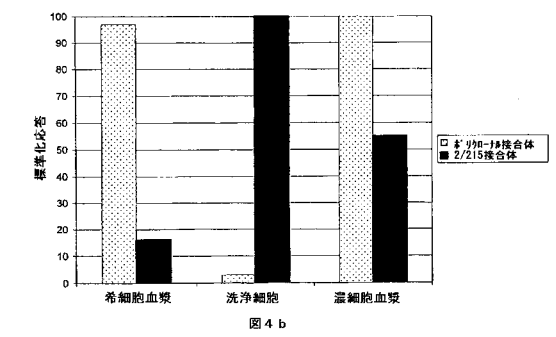
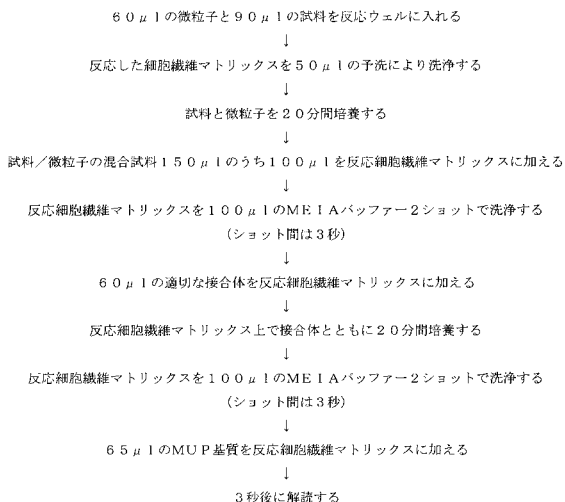


図4 b

【 図 5 】



【 図 6 】

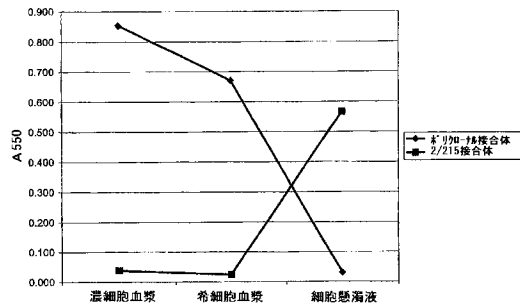


図 6 a

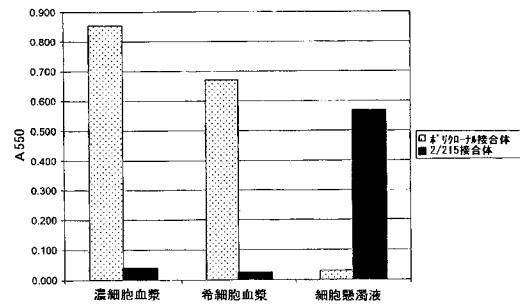


図 6 b

【 図 7 】

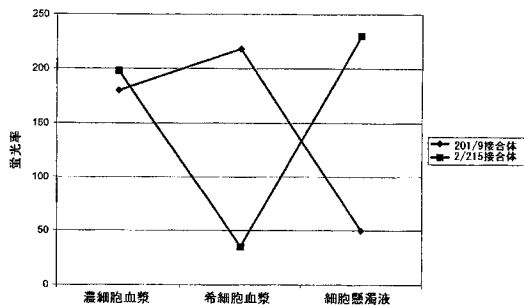


図 7 a

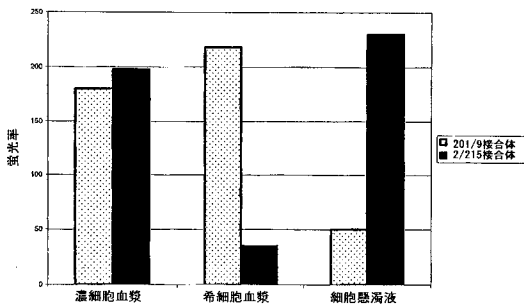


図 7 b

【 図 8 】

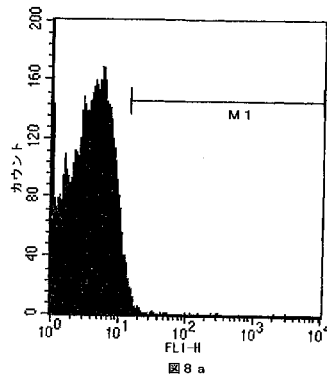


図 8 a

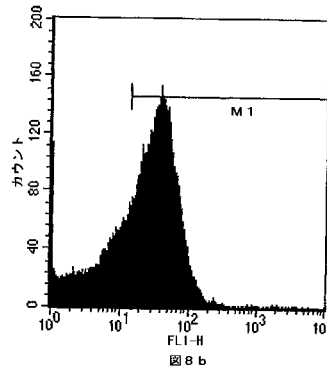
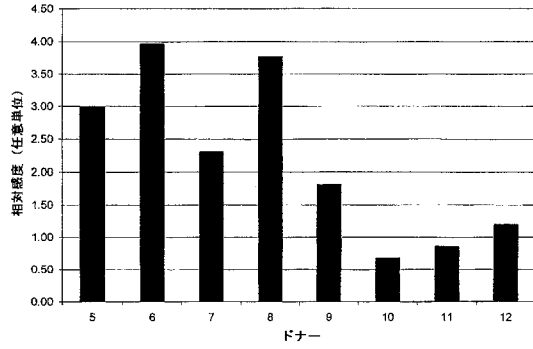


図 8 b

【 図 9 】



【 図 10 】

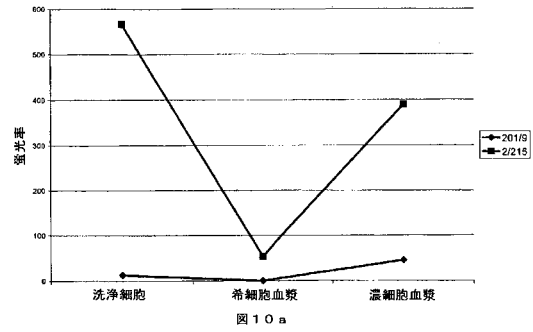


図 10 a

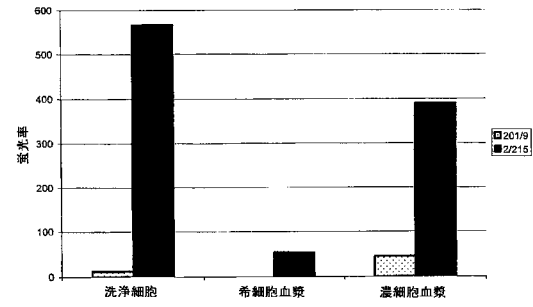


図 10 b

【 図 11 】

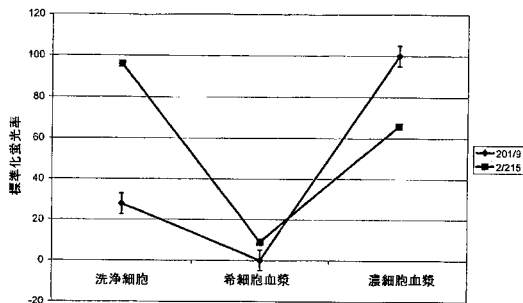


図 11 a

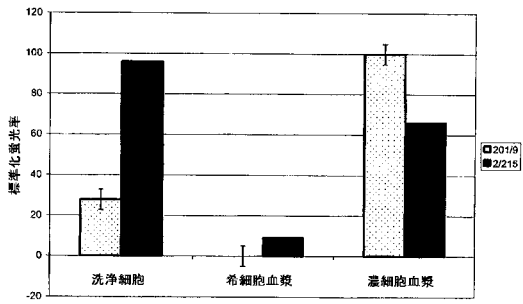


図 11 b

【 図 12 】

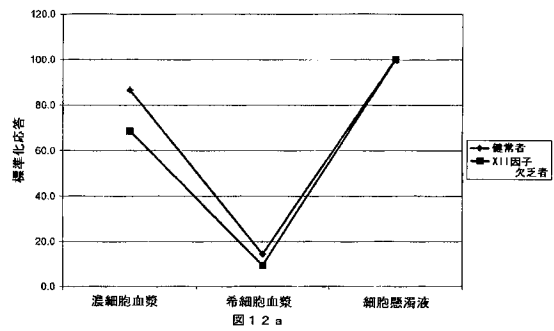


図 12 a

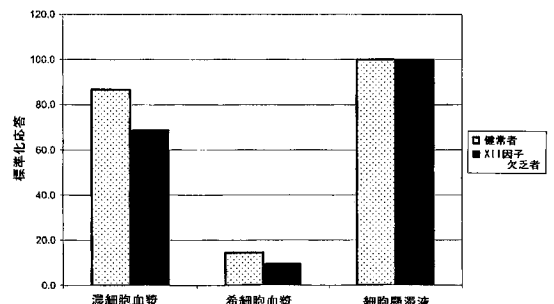
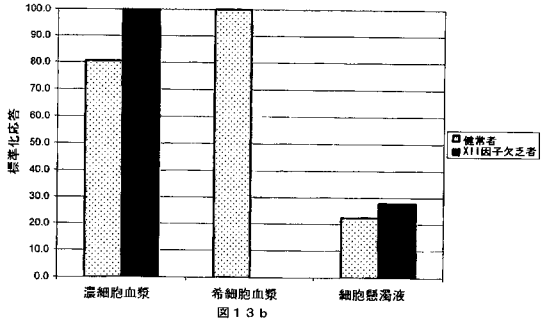
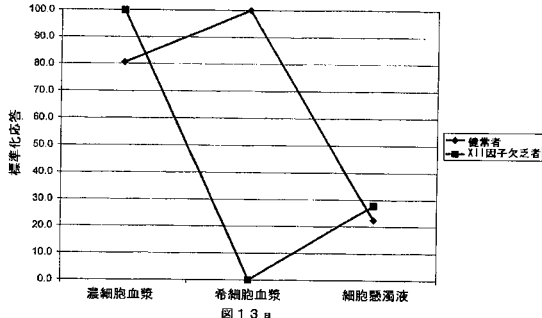
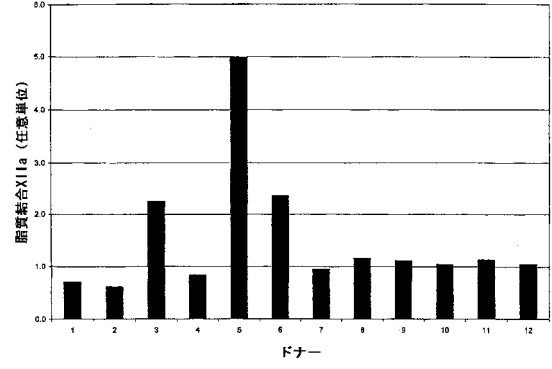


図 12 b

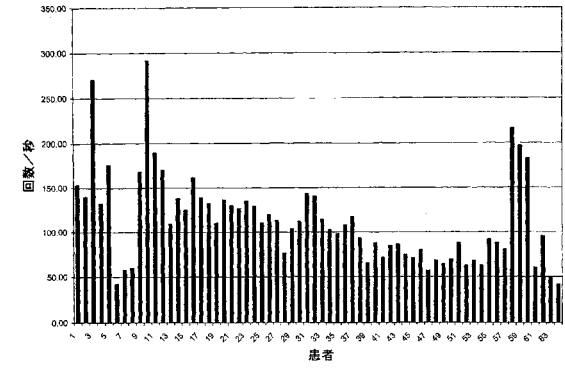
【 図 1 3 】



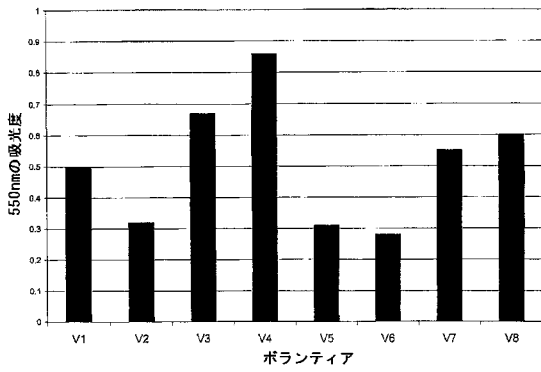
【 図 1 4 】



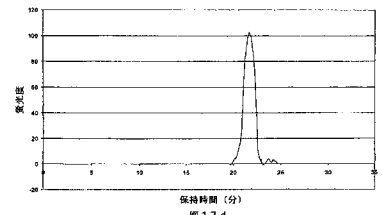
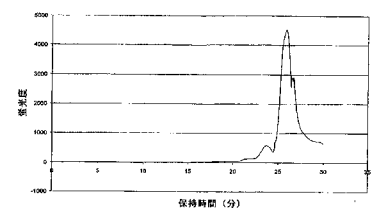
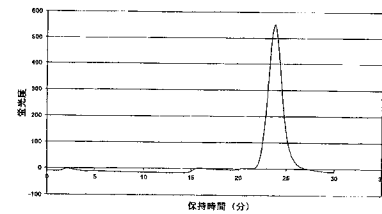
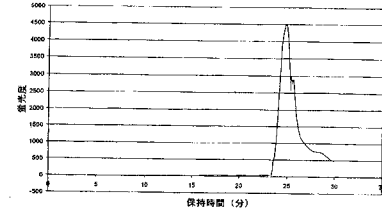
【 図 1 5 】



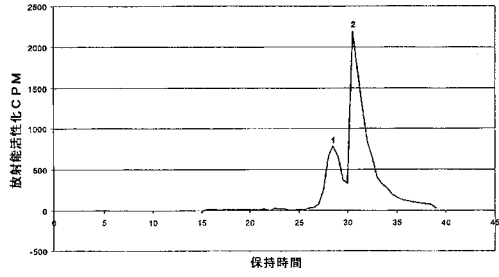
【 図 1 6 】



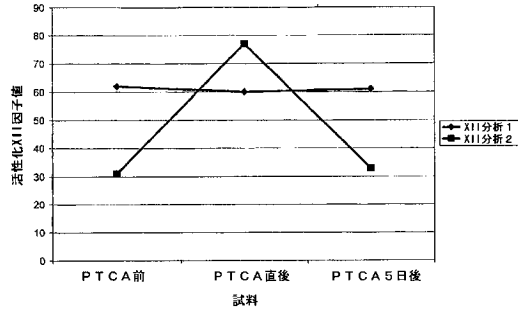
【 図 1 7 】



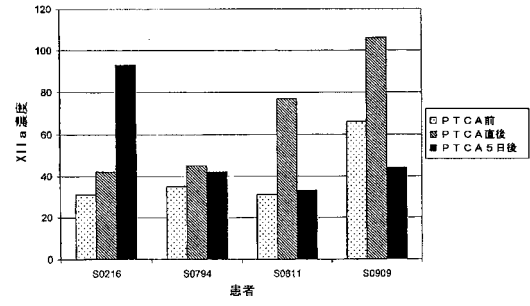
【図 18】



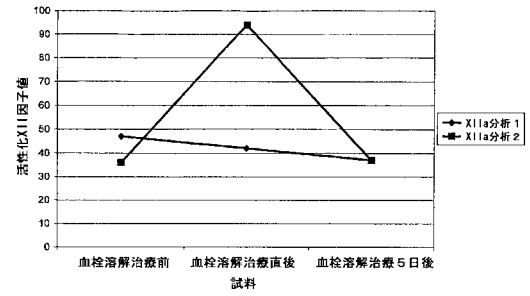
【図 19】



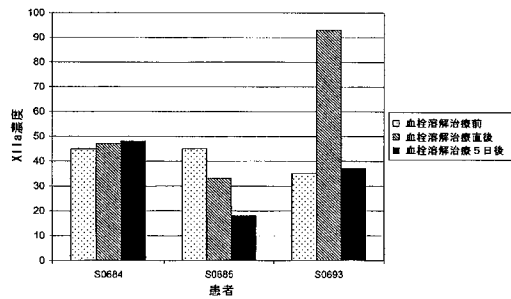
【図 20】



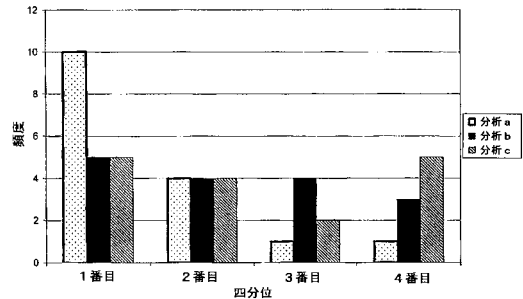
【図 21】



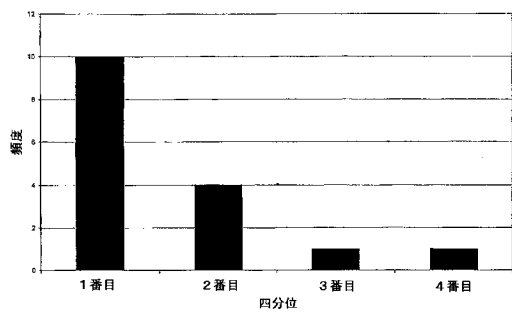
【図 22】



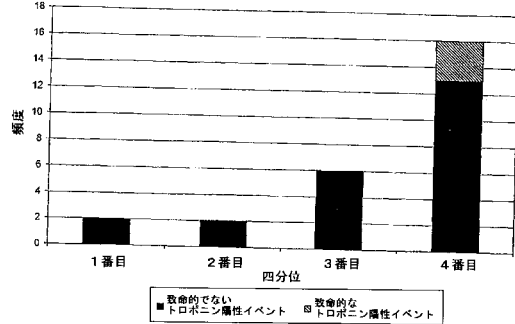
【図 24】



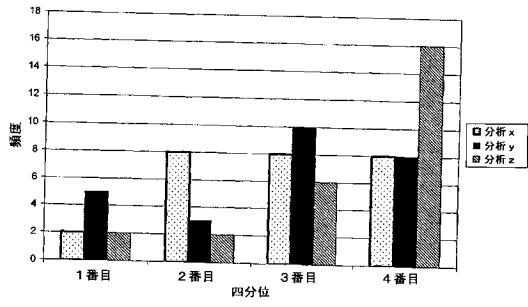
【図 23】



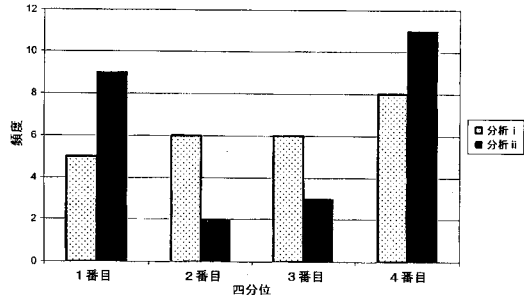
【図 25】



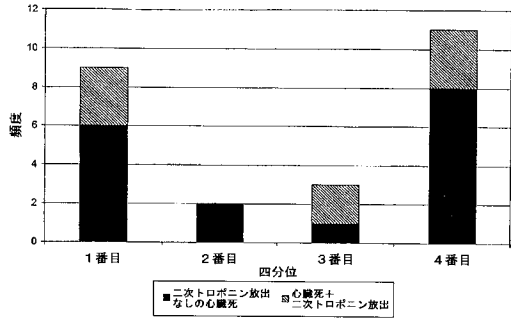
【図 26】



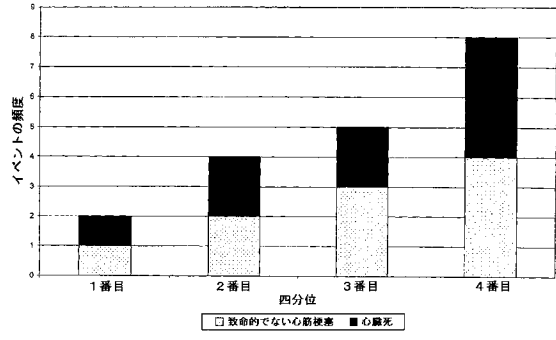
【図 28】



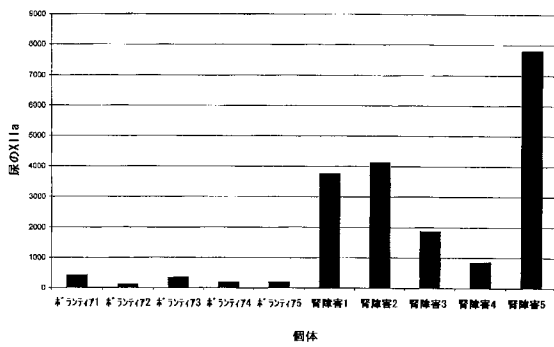
【図 27】



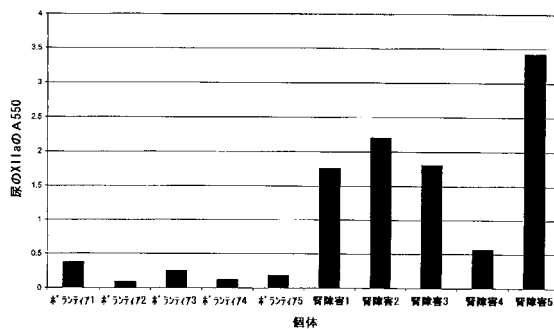
【図 29】



【図 30】



【図 31】



【手続補正書】

【提出日】平成17年7月26日(2005.7.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0014】

【図1】図1は、生体中に存在するXIIa因子の異なる形態に関する仮説の図式的表示を示す。

【図2】図2aから2dは、蛍光検出法を用いたHPLCトレースを示す：図2a、血漿試料のみ；図2b、FITC標識2/215抗体；図2c、FITC標識2/215抗体と培養させた血漿；図2d、図2aならびに図2bで示されたトレースを差し引いた後の図2cのトレース。

【図3】図3は、HPLCを用いて成分を分離した後の、放射能標識化2/215Fab断片と培養させた血漿における放射活性を示す。ピーク1ないし5は血漿成分に結合したmAb2/215Fabの結果であり、ピーク6はmAb2/215Fabと結合せずに残ったものである。

【図4】図4aと4bは、細胞性XIIa因子の検出に対して、捕獲抗体としてmAb2/215ならびに標識化ポリクローナル抗体（ポリクローナル接合体）（図4aではひし形、図4bでは網掛け棒）、ならびに標識化mAb2/215（2/215接合体）（図4aでは四角、図4bでは黒色棒）を使用した、マイクロタイタープレートによるXIIa因子の免疫検定法における、異なる三試料、すなわち濃細胞血漿、希細胞血漿、洗浄細胞の標準化された応答を示す。

【図5】図5は、アボットラボラトリーズ社のIMxシステムを用いた、細胞性XIIa因子の免疫検定法の実施に使用されるプロトコルを示す。

【図6】図6aと図6bは、細胞性XIIa因子の検出に対して、捕獲抗体としてmAb2/215、ならびに標識化ポリクローナル抗体（ポリクローナル接合体）（図6aではひし形、図6bでは網掛け棒）、ならびに標識化mAb2/215（2/215接合体）（図6aでは四角、図6bでは黒色棒）を使用した、マイクロタイタープレートによるXIIa因子の免疫検定法における、異なる三試料、すなわち濃細胞血漿、希細胞血漿、細胞懸濁液の応答を示す。

【図7】図7aと図7bは、細胞性XIIa因子の検出に対して、捕獲抗体としてmAb2/215、ならびに標識化mAb201/9（201/9接合体）（図7aではひし形、図7bでは網掛け棒）、ならびに標識化mAb2/215（2/215接合体）（図7aでは四角、図7bでは黒色棒）を使用した、IMx装置によるXIIa因子の免疫検定法における、異なる三試料、濃細胞血漿、希細胞血漿、細胞懸濁液の応答を示す。

【図8】図8aと図8bは、血漿と培養させたFITC標識化mAb2/215について得られた、フローサイトメトリーデータを示す。図8aは標識化抗体の不存在下で血漿について得られたデータを示し、図8bは血漿が標識化された抗体とともに培養された時に得られたデータを示す。分布のシフトは標識化2/215抗体が血漿の細胞成分に結合したことを示唆している。

【図9】図9は、放射能標識化mAb2/215の添加によって測定された、8個体の血漿における細胞性XIIa因子の含有量を示している。

【図10】図10aと図10bは、XII因子が「完全に欠乏」個体から得られた、異なる三試料、すなわち濃細胞血漿、希細胞血漿、細胞懸濁液の応答を示す。XIIa因子の免疫検定法は、捕獲抗体としてmAb2/215、ならびに接合体として標識化mAb201/9（図10aではひし形、図10bでは網掛け棒）、ならびに標識化mAb2/215（図10aでは四角、図10bでは黒色棒）を使用して、IMx分析装置で行われた。

【図11】図11aと図11bはXII因子が「完全に欠乏」個体から得られた、異なる三試料、すなわち濃細胞血漿、希細胞血漿、細胞懸濁液の標準化された応答を示す。XIIa因子の免疫検定法は捕獲抗体としてmAb2/215、ならびに接合体として標識化mAb201/9（図11aではひし形、図11bでは網掛け棒）、ならびに標識化mAb2/215（図11aでは四角、図11bでは黒色棒）を使用して、IMx分析装置で行われた。

【図12】図12aと図12bは、正常なボランティアならびにXII因子が「完全に欠乏」個体から得られた、異なる三試料、すなわち濃細胞血漿、希細胞血漿、細胞懸濁液の標準化された応答を示す。XIIa因子の免疫検定法は、捕獲抗体としてmAb2/215、ならびに接合体として標識化mAb2/215を使用して、IMx分析装置で行われた。（図12aではひし形ならびに図12bでは網掛け棒が正常なボランティアからの試料を示し；図12aでは四角ならびに図12bでは黒色棒が「XII因子欠乏」個体から得られた試料を示す。）

【図13】図13aおよび図13bは、正常なボランティアならびにXII因子が完全に欠乏した個体から得られた、異なる三試料、すなわち濃細胞血漿、希細胞血漿、細胞懸濁液の標準化された応答を示す。XIIa因子の免疫検定法は、捕獲抗体としてmAb2/215ならびに接合体として標識化mAb201/9を使用して、IMx分析装置で行われた。（図13aではひし形ならびに図13bでは網掛け棒が正常なボランティアからの試料を示し；図13aでは四角ならびに図13bでは黒色棒が「XII因子欠乏」個体から得られた試料を示す。）

【図14】図14は、放射能標識化2/215抗体断片のクエン酸血漿への添加、細胞物質の除去、マンガノヘパリン沈殿法を用いたリポタンパク質の沈殿、及び沈殿画分の放射活性の測定によって評価された、12人の健康なボランティアから得られた、脂質結合XIIa因子の濃度を示す。

【図15】図15は、放射能標識化2/215抗体断片の全血への添加、それに続く細胞物質の除去、ホスホタングステート沈殿法を用いたリポタンパク質の沈殿、及び沈殿画分の放射活性の測定によって評価された、胸痛によって入院した64人の患者から得られた、脂質結合XIIa因子の濃度を示す。

【図16】図16は、8人のボランティアから得られた、ELISA法によって評価された、脂質結合XIIa因子の濃度（550nmにおける吸光度として表現）を示す。

【図17】図17aから17dは蛍光検出法を用いたHPLCトレースを示す：図17a、尿試料のみ；図17b、FITC標識mAb2/215；図17c、FITC標識mAb2/215と培養させた尿；図17d、図17aならびに図17bで示されたトレースを差し引いた図17cのトレース。

【図18】図18は、HPLCを用いて成分を分離した後の、放射能標識化mAb2/215Fab断片と培養させた尿における放射活性を示す。ピーク1は尿中のXIIa因子と結合したmAb2/215Fabの結果であり、ピーク2はmAb2/215Fabと結合せずに残ったものである。

【図19】図19は、経皮経管冠動脈形成（PTCA）の直前、直後、5日後における、患者の血漿試料のXIIa因子濃度を測定するために、二種の異なる免疫検定法を用いて得られた典型的な数値パターンを示す。分析1は試料の培養ステップを含む免疫検定法である。前記分析は、捕獲抗体としてmAb2/215、ならびに接合体として標識化mAb201/9を用い、ならびに試料の培養ステップにトリトン添加を組み入れたものである。分析2は、接合体としてXII抗因子ポリクローナル抗体とともに、捕獲抗体としてmAb2/215を用いるものであり、試料の培養ステップ間にはトリトン添加を行わない。ひし形で表されたデータポイントは分析1から得られた結果を示し；四角で表されたデータポイントは分析2から得られた結果を示す。

【図20】図20は、冠動脈形成（PTCA）の直前、直後、5日後に得られた血漿試料の分析によって得られた、4人の患者（患者S0216、S0794、S0811、ならびにS0909）から得られた血漿試料中のXIIa因子の濃度を示す。XIIa因子は

試料培養ステップを含む免疫検定法により測定された。分析は、試料の培養ステップ間にはトリトン添加を行わずに、捕獲抗体としてmAb 2 / 2 1 5、ならびに接合体として標識化X I I 抗因子ポリクローナル抗体を用いた。網掛け棒はP T C A前に得られた数値を示し、斜線棒はP T C A後に得られた数値を示し、ならびに黒色棒はP T C A 5日後に得られた数値を示す。

【図 2 1】図 2 1 は、血栓溶解治療の直前、直後、5 日後に患者から得られた試料のX I I a 因子の濃度を示す。分析 1 は試料培養ステップを含む免疫検定法である。分析は、捕獲抗体としてmAb 2 / 2 1 5 を、ならびに接合体として標識化mAb 2 0 1 / 9 を用い、ならびに試料培養ステップにトリトン添加を組み入れたものである。分析 2 は、接合体としてX I I 抗因子ポリクローナル抗体を用いるとともに捕獲抗体としてmAb 2 / 2 1 5 を用いるのものであり、試料の培養ステップ間にはトリトン添加を行わない。ひし形で表されたデータポイントは分析 1 から得られた結果を示し；四角で表されたデータポイントは分析 2 から得られた結果を示す。結果は個体から得られる典型的数値パターンである。

【図 2 2】図 2 2 は、血栓溶解治療の直前、直後、5 日後から得られた試料における、3 人の患者 (S 0 6 8 4、S 0 6 8 5、ならびにS 0 6 9 3) のX I I a 因子の濃度を示す。X I I a 因子は試料培養ステップを含む免疫検定法により測定された。分析は試料の培養ステップ間にはトリトン添加を行わずに、捕獲抗体としてmAb 2 / 2 1 5、ならびに接合体として標識化X I I 抗因子ポリクローナル抗体を用いた。網掛け棒は血栓溶解治療前に得られた数値を示し、斜線棒は血栓溶解治療後に得られた数値を示し、ならびに黒色棒は血栓溶解治療 5 日後に得られた数値を示す。

【図 2 3】図 2 3 は、心筋梗塞の疑いや急性冠症候群で入院した患者の初入院後の、入院期間中のトロポニン陽性イベントの反復頻度を示す。トロポニン陽性イベントの反復頻度は、X I I a 因子の濃度によって分類される。X I I a 因子は、試料培養ステップを含む免疫検定法で測定される。分析は、捕獲抗体としてmAb 2 / 2 1 5、ならびに接合体としてアルカリホスファターゼで標識化された同一の抗体を用い、ならびに試料培養ステップにトリトン添加を組み入れたものである。

【図 2 4】図 2 4 は、図 2 3 の入院期間中の、それぞれ優先的にX I I a 因子の異なる形態を測定する、数種の異なる分析を用いた、トロポニン陽性イベントの反復頻度を示す。これは、X I I a 因子の特定の形態が臨床的有用性を提供するが他の形態はしないということを実証する。前記分析は試料培養ステップを含む免疫検定法であった。分析 a にて優先的に測定されたX I I a 因子形態は、点を含んだ明るい棒にて示される。分析 a は、捕獲抗体としてmAb 2 / 2 1 5 (重炭酸塩バッファー中で $15 \mu\text{g ml}^{-1}$ にコートされる)、ならびに接合体としてアルカリホスファターゼで標識化された同一の抗体を用い、ならびに試料培養ステップにトリトン添加を組み入れたものである (図 2 3 に示されたデータと同様に)。分析 b にて優先的に測定されたX I I a 因子形態は暗い棒にて示される。分析 b は、捕獲抗体としてmAb 2 / 2 1 5 (ホスフェートバッファー中で $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ にコートされる)、ならびに接合体としてアルカリホスファターゼで標識化されたmAb 2 0 1 / 9 を用い、ならびに試料培養ステップにトリトン添加を組み入れないものである。分析 c にて優先的に測定されるX I I a 因子形態は斜線の入った明るい棒にて示される。分析 c は、捕獲抗体としてmAb 2 / 2 1 5 (ホスフェートバッファー中で $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ にコートされる)、ならびに接合体としてアルカリホスファターゼで標識化されたX I I a 因子に対するポリクローナル抗体を用い、ならびに試料培養ステップにトリトン添加を組み入れないものである。

【図 2 5】図 2 5 は、図 2 3 で示された同一患者の、入院日 3 0 日以内の、その後のトロポニン陽性イベントの頻度を示す。トロポニン陽性イベントの反復頻度は、X I I a 因子の濃度によって分類される。X I I a 因子は、試料培養ステップを含む免疫検定法で測定される。分析は、捕獲抗体としてmAb 2 / 2 1 5、ならびに接合体として標識化mAb 2 0 1 / 9 を用い、ならびに試料培養ステップにトリトン添加を組み入れたものである。暗い棒は致命的でないトロポニン陽性イベントを示し、斜線の明るい棒は致命的なトロポニン陽性イベントを示す。

【図26】図26は、図25と同様に入院日30日以内の、それぞれ優先的にXIIa因子の異なる形態を測定する、数種の異なる分析を用いた、その後のトロポニン陽性イベントの頻度を示す。これは、XIIa因子の特定の形態が臨床的有用性を提供するが、他の形態はしないということを実証する。分析xにて優先的に測定されたXIIa因子形態は、点を含む明るい棒にて示される。分析xは、mAb2/215（ホスフェートバッファ-中で $2\mu\text{g mL}^{-1}$ にコートされる）、ならびに接合体としてアルカリホスファターゼで標識化されたXIIa因子に対するポリクローナル抗体を用い、ならびに試料培養ステップにトリトン添加を組み入れないものである。分析yにて優先的に測定されたXIIa因子形態は暗い棒にて示される。分析yは、mAb2/215（ホスフェートバッファ-中で $2\mu\text{g mL}^{-1}$ にコートされる）、ならびに接合体としてアルカリホスファターゼで標識化されたXIIa因子に対するポリクローナル抗体を用い、ならびに試料培養ステップにトリトン添加を組み入れないものである。分析zにて優先的に測定されたXIIa因子形態は斜線の入った明るい棒にて示される。分析zは、捕獲抗体としてmAb2/215（重炭酸塩バッファ-中で $15\mu\text{g mL}^{-1}$ にコートされる）、ならびに接合体として標識化mAb201/9を用い、ならびに試料培養ステップにトリトン添加を組み入れたものである（図25に示されたデータと同様に）。

【図27】図27は、図23ならびに図25の患者の同一試料を用いた、臨床的エンドポイントとしての死亡頻度を示す。死亡頻度はXIIa因子の濃度によって分類される。XIIa因子は、試料培養ステップを含む免疫検定法で測定される。分析は、試料培養ステップにおいてトリトン添加をせずに、捕獲抗体としてmAb2/215、ならびに接合体としてXIIa抗因子ポリクローナル抗体を用いた。暗い棒は二次トロポニン陽性放出を伴わない心臓死を示し、斜線の明るい棒は二次トロポニン陽性放出ならびに死亡を示す。

【図28】図28は図27と同様に、それぞれ優先的にXIIa因子の異なる形態を測定する、二種の異なる分析を用いた、臨床的エンドポイントとしての死亡頻度を表す。これは、XIIa因子の特定の形態が臨床的優位性を提供するが、他の形態はしないということを実証する。分析iにて優先的に測定されたXIIa因子形態は、点を含む明るい棒にて示される。分析iは、mAb2/215（ホスフェートバッファ-中で $2\mu\text{g mL}^{-1}$ にコートされる）、ならびに、接合体としてアルカリホスファターゼで標識化された同一の抗体を用い、ならびに試料培養ステップにトリトン添加を組み入れないものである。分析iiにて優先的に測定されたXIIa因子形態は暗い棒にて示される。分析iiは、試料培養ステップにおいてトリトン添加をせずに、捕獲抗体としてmAb2/215（ホスフェートバッファ-中で $2\mu\text{g mL}^{-1}$ にコートされる）、ならびに接合体としてXIIa抗因子ポリクローナル抗体を用いた。

【図29】図29は、致命的でない心筋梗塞の反復頻度（トロポニン陽性イベント）、ならびに心筋梗塞の疑いで入院した患者の初入院後の、6ヶ月間の心臓死を示す。イベントの反復頻度は脂質結合XIIa因子の濃度によって分類される。明るい棒は致命的でない心筋梗塞を示し、暗い棒は心臓死を示す。

【図30】図30は、放射能標識化抗体との培養ならびにHPLCにより確かめられた、5人の健康なボランティアならびに腎疾患を持っている5個体に対する、尿のXIIa因子の濃度を示す。

【図31】図31は、マイクロタイタープレート免疫検定法にて得られた吸光度として表現された、5人の健康なボランティアならびに腎疾患を持っている5個体に対する、尿のXIIa因子の数値を示す。前記分析は、捕獲抗体としてmAb2/215、ならびに接合体として標識化mAb201/9を用い、ならびに試料培養ステップにトリトン添加を組み入れないものである。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0029

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0029】

モノクローナル抗体 (mAb) 201/9、あるいは抗体201/9と呼ばれる、とは、ハイブリドーマ201/9から生成された抗体であり、E C A C Cへ1990年1月18日に寄託ナンバー90011893で寄託されている。

## 【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0263

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0263】

実施例12

尿のXIIa因子のIMx分析

5人の正常なランダム尿試料が健康な男性ボランティアから得られた。これら試料は上記実施例4に記載されたようなIMx分析を用いて、ポリクローナル抗体ベースの接合体を用いて、XIIa因子の存在について試験された。尿のXIIa因子濃度の結果は表4に示される。

【表4】

健康な男性ボランティアからのランダムな尿試料における

IMx分析によって評価されたXIIa因子濃度

ボランティア	XIIa ng/ml
A	0.5
B	3.3
C	2.8
D	2.3
E	0.9

## 【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0316

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0316】

XIIa因子に対応するピーク範囲(放射能標識化抗体と培養させた純XIIa因子と同一の保持時間に基づいたもの)は各尿試料について積分によって得られた。

得られた数値は表5ならびに図として図30に示される。腎障害の患者について得た数値は健康なボランティアのものよりも著しく高いことがみてとれる。

【表 5】

放射能標識化抗体との培養ならびにHPLCによって解明された、

10の尿における尿の $\beta$ XIIa因子数値

個体	$\beta$ XIIa因子ピークに対応する 毎秒の積分値
ボランティア1	423
ボランティア2	121
ボランティア3	348
ボランティア4	196
ボランティア5	205
腎障害1	3756
腎障害2	4127
腎障害3	1876
腎障害4	849
腎障害5	7801

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/GB 03/05612
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 G01N33/86 C12Q1/56 C07K16/40 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C12Q C07K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 90/08835 A (COAGEN LIMITED) 9 August 1990 (1990-08-09) cited in the application the whole document	1-93
Y	EP 0 078 764 A (PENTAPHARM A.G.) 11 May 1983 (1983-05-11) the whole document	1-93
Y	EP 0 259 857 A (NIPPON ZOKI PHARMACEUTICAL CO., LTD) 16 March 1988 (1988-03-16) the whole document	1-93
Y	EP 0 637 633 A (NIPPON ZOKI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 8 February 1995 (1995-02-08) the whole document	1-93
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <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 which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 June 2004		Date of mailing of the international search report 23/06/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo.nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Griffith, G

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In International Application No  
PCT/GB 03/05612

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 89/11865 A (TEMPLE UNIVERSITY OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION) 14 December 1989 (1989-12-14) the whole document	1-93
Y	----- DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; KRIZHEVSKAYA, YU. V. ET AL: "Chromatographic method for the determination of the Hageman factor (blood coagulation factor XII) in human blood serum" XP002253585 retrieved from STN Database accession no. 96:213764 abstract & VOPROSY MEDITSINSKOI KHIMII , 28(2), 128-32 CODEN: VMDKAM; ISSN: 0042-8809, 1982, -----	1-93
Y	----- DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1990, ADANY R ET AL: "INCREASED DENSITY OF HISTIOCYTES IN UTERINE LEIOMYOMAS" XP002253586 Database accession no. PREV199089128543 abstract & INTERNATIONAL JOURNAL OF GYNECOLOGICAL PATHOLOGY, vol. 9, no. 2, 1990, pages 137-144, ISSN: 0277-1691 -----	1-93

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				In International Application No PCT/GB 03/05612	
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9008835	A	09-08-1990	AT	121788 T	15-05-1995
			AU	641912 B2	07-10-1993
			AU	5030590 A	24-08-1990
			CA	2045475 A1	28-07-1990
			DE	69018968 D1	01-06-1995
			DE	69018968 T2	24-08-1995
			DK	455707 T3	26-06-1995
			EP	0455707 A1	13-11-1991
			ES	2072423 T3	16-07-1995
			WO	9008835 A1	09-08-1990
			IL	93207 A	27-02-1994
			JP	2916252 B2	05-07-1999
			JP	4503006 T	04-06-1992
			NZ	232273 A	26-03-1992
			US	5500349 A	19-03-1996
			EP 0078764	A	11-05-1983
CA	1184837 A1	02-04-1985			
DE	3268329 D1	13-02-1986			
DK	484682 A ,B,	03-05-1983			
EP	0078764 A1	11-05-1983			
ES	8400603 A1	16-01-1984			
JP	1691827 C	27-08-1992			
JP	3046119 B	15-07-1991			
JP	58086100 A	23-05-1983			
NO	823619 A	03-05-1983			
US	4598043 A	01-07-1986			
EP 0259857	A	16-03-1988	AT	100150 T	15-01-1994
			DE	3788762 D1	24-02-1994
			DE	3788762 T2	23-06-1994
			EP	0259857 A2	16-03-1988
			ES	2061459 T3	16-12-1994
			JP	1725747 C	19-01-1993
			JP	4014000 B	11-03-1992
			JP	63185398 A	30-07-1988
			KR	9609766 B1	24-07-1996
			US	4985354 A	15-01-1991
EP 0637633	A	08-02-1995	JP	3213831 B2	02-10-2001
			JP	7051097 A	28-02-1995
			AT	203277 T	15-08-2001
			CN	1110409 A ,B	18-10-1995
			DE	69427723 D1	23-08-2001
			DE	69427723 T2	08-05-2002
			EP	0637633 A2	08-02-1995
			ES	2159535 T3	16-10-2001
			KR	270161 B1	16-10-2000
			US	5599683 A	04-02-1997
WO 8911865	A	14-12-1989	US	4963657 A	16-10-1990
			AT	129902 T	15-11-1995
			CA	1315716 C	06-04-1993
			DE	68924773 D1	14-12-1995
			DE	68924773 T2	15-05-1996
			EP	0419574 A1	03-04-1991
			JP	3505665 T	12-12-1991
			WO	8911865 A1	14-12-1989

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>G 0 1 N 33/543 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/543 5 9 3	
C 1 2 Q 1/37 (2006.01)	G 0 1 N 33/543 5 9 5	
	C 1 2 Q 1/37	

(31)優先権主張番号 0229828.9

(32)優先日 平成14年12月20日(2002.12.20)

(33)優先権主張国 英国(GB)

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

(74)代理人 100109690

弁理士 小野塚 薫

(74)代理人 100131266

弁理士 高 昌宏

(74)代理人 100093414

弁理士 村越 祐輔

(74)代理人 100131141

弁理士 小宮 知明

(72)発明者 プリチャード, デイビッド, ジョン

英国, ダンディ ディーディー2 1 エクスエー, ザ テクノロジー パーク, アクシス - シールド ダイアグノスティックス リミテッド

F ターム(参考) 2G045 AA01 AA15 CB03 DA20 DA36 FB01 FB03 FB11

2G054 AB03 AB04 BB04 CA28 EA06

4B063 QA01 QQ03 QQ36 QR16 QR48 QR51 QS33

专利名称(译)	因子XIIA的突变体		
公开(公告)号	<a href="#">JP2006510896A</a>	公开(公告)日	2006-03-30
申请号	JP2004561673	申请日	2003-12-22
申请(专利权)人(译)	轴 - 盾诊断有限公司		
[标]发明人	プリチャードデイビッドジョン		
发明人	プリチャード,デイビッド,ジョン		
IPC分类号	G01N33/573 G01N21/78 G01N30/88 G01N33/49 G01N33/531 G01N33/543 C12Q1/37 C12Q1/56 G01N33/86		
CPC分类号	G01N33/86 C12Q1/56		
FI分类号	G01N33/573.A G01N21/78.Z G01N30/88.J G01N33/49.Z G01N33/531.B G01N33/543.593 G01N33/543.595 C12Q1/37		
F-TERM分类号	2G045/AA01 2G045/AA15 2G045/CB03 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB11 2G054/AB03 2G054/AB04 2G054/BB04 2G054/CA28 2G054/EA06 4B063/QA01 4B063/QQ03 4B063/QQ36 4B063/QR16 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QS33		
代理人(译)	加藤 勉		
优先权	2002029837 2002-12-20 GB 2002029835 2002-12-20 GB 2002029832 2002-12-20 GB 2002029828 2002-12-20 GB		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

因子XIIA的突变体 — 因子XIIA (活化因子XII) 以各种形式存在于血液中。不同形式的测量可以包括关于怀疑患有或患有疾病或病症的受试者的疾病或病症的易感性, 进展或结果, 或疾病或病症的治疗的诊断, 监测或预测的信息。提供。

