

(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2005-523435

(P2005-523435A)

(43) 公表日 平成17年8月4日(2005.8.4)

(51) Int. Cl. ⁷	F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	V	4 B O 6 4
CO 7 K 16/18	CO 7 K 16/18		4 H O 4 5
GO 1 N 33/577	GO 1 N 33/577	B	
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08		

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願2003-584730 (P2003-584730)	(71) 出願人	504387344
(86) (22) 出願日	平成15年4月16日 (2003.4.16)		アンティボディーショップ エー/エス
(85) 翻訳文提出日	平成16年12月17日 (2004.12.17)		デンマーク王国 ディーケー-2820
(86) 国際出願番号	PCT/EP2003/004038		ゲントフテ、グルスバッケン 6-8
(87) 国際公開番号	W02003/087838	(74) 代理人	100102842
(87) 国際公開日	平成15年10月23日 (2003.10.23)		弁理士 葛和 清司
(31) 優先権主張番号	60/373, 754	(72) 発明者	ウッテンタール, ラルス, オットー
(32) 優先日	平成14年4月18日 (2002.4.18)		デンマーク王国 ディーケー-1200
(33) 優先権主張国	米国 (US)		コペンハーゲン イースト、2. ティーエ
(31) 優先権主張番号	10/170, 317		イチ、オーステルブロッガーデ 52
(32) 優先日	平成14年6月12日 (2002.6.12)	Fターム(参考)	4B064 AG27 CA10 CA20 CC01 CC24
(33) 優先権主張国	米国 (US)		DA01 DA13
			4H045 AA11 AA30 CA40 DA76 EA20
			EA50 FA72

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マンナン結合レクチン (MBL) の免疫化学的決定のための組成物、方法およびキット

(57) 【要約】

マンナンもしくはMBLに対する抗体に結合した構造的に正常なまたは異常なMBLに対する異なる結合特性を有する種々の抗体が提供される。異なる結合特性を有するMBLに対する抗体を選択する方法、およびこれらの抗体を用いて試料中の、マンナンに結合することができるMBLを測定するための、または、正常にオリゴマー化されたMBLおよび異常な、不十分にオリゴマー化されたMBLを測定するための方法およびキットも提供される。本方法およびキットは、感染症および自己免疫疾患への増大した感受性およびこれらの悪化を診断するのに有用である。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

M B L に対して生成されたモノクローナル抗体を選択するための方法であって、M B L に対して生成された抗体を、マンナンに結合した構造的に正常なM B Lに結合するもしくは結合しないその能力について、または、可能な範囲でマンナンに結合した構造的に異常なM B Lに結合するもしくは結合しないその能力について評価することを含む、前記方法。

【請求項 2】

M B L に対して生成されたモノクローナル抗体を選択するための方法であって、M B L に対して生成された抗体を、該抗体に結合した、もしくはM B L に対する別のモノクローナル抗体に結合した構造的に正常なM B Lに結合するもしくは結合しないその能力について、または、該抗体に結合した、もしくはM B L に対する別のモノクローナル抗体に結合した構造的に異常なM B Lに結合するもしくは結合しないその能力について評価することを含む、前記方法。

10

【請求項 3】

M B L に対して生成された抗体であって、該抗体が、
(a) マンナンに結合した構造的に正常なM B Lに結合するもしくは結合しない抗体、
(b) マンナンに結合した構造的に異常なM B Lに結合するもしくは結合しない抗体、
(c) 該抗体もしくはM B L に対して生成された別のモノクローナル抗体に結合した、
構造的に正常なM B Lに結合するもしくは結合しない抗体、および
(d) 該抗体もしくはM B L に対して生成された別のモノクローナル抗体に結合した、
構造的に異常なM B Lに結合するもしくは結合しない抗体
からなる群から選択される、前記抗体。

20

【請求項 4】

請求項 3 に記載の抗体を用いて、マンナンに結合できるM B L を測定するための免疫アッセイ技法。

【請求項 5】

マンナンに結合できるM B L が、抗体による検出の前に、マンナンに結合できるM B L のための捕捉分子を介して固相に不動化されている、請求項 4 に記載の免疫アッセイ技法。

30

【請求項 6】

試料中の追加の分析物を検出するように、追加の分析物のための1種または2種以上の捕捉分子が固相にコートされている、請求項 5 に記載の免疫アッセイ技法。

【請求項 7】

請求項 3 に記載の抗体を用いて、試料中の総免疫反応性M B L を測定することができる、免疫アッセイ技法。

【請求項 8】

構造的に正常な、および異常なM B L の両方が、抗体による検出の前に、総免疫反応性M B L のための捕捉分子を介して固相に不動化されている、請求項 7 に記載の免疫アッセイ技法。

40

【請求項 9】

試料中の追加の分析物を検出するように、追加の分析物のための1種または2種以上の捕捉分子が固相にコートされている、請求項 8 に記載の免疫アッセイ技法。

【請求項 10】

請求項 3 に記載の抗体を含む、マンナンに結合できるM B L の体液中の濃度を測定するためのキット。

【請求項 11】

請求項 3 に記載の別の抗体を含む、合わせて総免疫反応性M B L と呼ぶ構造的に正常なおよび構造的に異常なM B L の両方の、体液中の濃度を測定するためのキット。

【請求項 12】

50

マンナンに結合できるMBLの体液中の濃度を、総免疫反応性MBLの濃度と比較するためのキットであって、該キットが、請求項3に記載の別の抗体を含む、前記キット。

【請求項13】

ヒト血漿または血清の試料において、請求項3に記載の抗体を用いることにより、マンナンに結合できるMBLを測定することを含む、感染症および自己免疫疾患への増大した感受性およびこれらの悪化を診断するための方法。

【請求項14】

ヒト血漿または血清の試料において、正常にオリゴマー化されたMBLおよび異常な、不十分にオリゴマー化されたMBLの両方を測定することを含む、感染症および自己免疫疾患への増大した感受性およびこれらの悪化を診断するための方法。

10

【請求項15】

ヒト血漿または血清の試料において、請求項3に記載の抗体を用いることにより、マンナンに結合できるMBLを測定すること、および、ヒト血漿または血清の試料において、正常にオリゴマー化されたMBLおよび異常な、不十分にオリゴマー化されたMBLの両方を測定することを含む、ヒト血漿または血清の試料におけるMBLの構造状態を解明するための方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

技術分野

20

マンナン結合レクチン(MBL)は、異なる個体において、異なった量および異なった遺伝的に決定された変異形態で存在し得、これによりこれらの個体の感染性疾患への感受性、および自己免疫疾患の重篤度に影響を与えている。本発明は、ヒトマンナン結合レクチン(MBL)に対する一連のモノクローナル抗体を提供するものであり、これらはこのタンパク質の濃度を、特にヒト血清または血漿などの生物学的液体において定量すること、および、該タンパク質に関する構造的および機能的情報を提供することにおいて有用である。本発明の一態様において、マンナンに結合できるオリゴマー化されたMBLを測定するための組成物、方法およびキットが提供される。別な態様では、総免疫反応性(total immunoreactive) MBLサブユニットを、これらが、完全な生物学的活性を有するMBLを特徴づける、テトラマー、ペンタマーまたはヘキサマー構造にオリゴマー化されているか否かにかかわらず測定するための組成物、方法およびキットが提供される。本発明の組成物、方法およびキットは、生化学および医学の分野で有用である。

30

【0002】

発明の背景

マンナン結合レクチン(MBL)は、先天性免疫系の重要な構成要素である。これは肝臓で合成される多量体タンパク質であるとともに、C型レクチンの1つであり、微生物表面上のある種の炭水化物(多糖類)構造へのカルシウム依存性の結合を示す。マンナンはかかる多糖類のモデルとして用いられ、そしてMBLはN-アセチル-グルコサミンおよびD-マンノースなどの単糖類成分に親和性を示す。微生物多糖類に結合すると、MBLは、会合した、MASP-1、MASP-2およびMASP-3として知られるセリンプロテアーゼにより補体を活性化し、溶解性膜攻撃複合体により微生物の殺滅を促進し、そしてそのオプソニン効果および細胞表面受容体との直接的な相互作用により食作用を促進する。

40

【0003】

MBL分子は、228アミノ酸残基の一本鎖のホモ三量体6組までのオリゴマー複合体である。各鎖は、20アミノ酸のN末端システインリッチドメインと、これに続く18~20のGly-Xxx-Yyy反復構造のコラーゲン様ドメインと、らせんに巻かれたコイルネック領域と、そして最後に炭水化物認識ドメイン(CRD)とからなる。これらの鎖の3本が構造単位または「ヘッド(head)」を形成し、ここで、コラーゲンドメインは、それぞれがCRDを担持する3つのネック領域に終止する三重らせんを形成する。N

50

- 末端ドメインは、鎖間ジスルフィド結合によって連結している。次に、6個までのかかるホモ三量体ヘッドがそのN-末端領域を介して連結し、3弁花の花束に例えられる正常なMBL分子の構造を形成する。この構造は、連結したホモ三量体の個々の鎖の間のジスルフィド結合の形成により維持されている。この形態で、MBLは、セリンプロテアーゼMASP-1、MASP-2およびMASP-3と(およびMAp19として知られる関連する非酵素ペプチドと)会合することが可能であり、この複合体は、MBLが炭水化物に結合すると、補体を活性化することが可能である。

【0004】

ヒトMBL遺伝子(mbl2)は、多くの対立遺伝子変異を示す。いくつかはプロモーター領域に生じ、最も重要な2つのものは、-550位(HまたはL)および-221位(YまたはX)に生じる。さらなる変異は、5'非翻訳領域の+4位(PまたはQ)に生じ、3つがエクソン1の+223位(AまたはD、Arg52Cys)、+230位(AまたはB、Gly54Asp)、そして+239位(AまたはC、Gly57Glu)に生じる。プロモーターハプロタイプHY、LYおよびLXは、MBLの高い、中程度のおよび低い血漿レベルにそれぞれ関連し、一方エクソン1のハプロタイプは、タンパク質鎖の構造および会合に影響する。連鎖不均衡により、いくつかの理論的に可能なMBLハプロタイプは極めてまれであり、発見されていない。デンマーク人血液提供者100人の間では、次のハプロタイプのみが検出された(括弧内は頻度):HYPA(0.285)、LYQA(0.235)、LXPA(0.195)、LYPB(0.135)、HYPD(0.085)、LYPA(0.045)、LYQC(0.020)。

10

20

【0005】

A/A遺伝子型(すなわち、正常なコラーゲン様領域を有するもの)の中では、LXP/LXP遺伝子型のみが低い血漿MBLレベルを示した。A/B、A/CおよびA/D遺伝子型(すなわち、正常および異常コラーゲン様領域のヘテロ接合)は、記載された旧式の方法で決定された、低減した血漿MBLレベルを示した。これをLXハプロタイプと組み合わせると、さらに低いレベルが記録された。B/B、C/DおよびD/D遺伝子型(すなわち、すべてのコラーゲン様領域に異常を有するもの)は、これらの対象のいずれもLXハプロタイプを示さないにもかかわらず、旧式の方法で決定された、極めて低いレベルのMBLを示した。デンマーク人提供者におけるエクソン1ハプロタイプA、B、CおよびDの頻度は、それぞれ0.76、0.135、0.020および0.085であった。これは、A/A、B/B、C/CおよびD/D遺伝子型の頻度が、この2乗であることを示す(すなわち、それぞれ人口の58.76%、1.82%、0.04%および0.72%を占めることを意味する(Steffensen, R. et al. (2000) J Immunol Meth 241:33-42からのデータ)。

30

【0006】

B/B、C/CおよびD/D遺伝子型からのヒトMBLの可能な構造は、チャイニーズハムスター卵巣細胞に発現させた対応する組み換えタンパク質を分析することによって決定された。結果は、これら3つの遺伝子型で類似しており、MBLの最も一般的な重度の構造異常の原因であるB/B遺伝子型に関して記載された。この遺伝子型からの非還元(unreduced)MBL(MBL_Bとして知られる)の分析は、これが2本の鎖の二量体として存在し得、かかる二量体が3個連結し、A/A遺伝子型からの正常MBL(MBL_Aとして知られる)の2つの三重「ヘッド」に相当する構造を形成し得ることを示す。より高いオリゴマーは形成されず、MBL_Bは、組み換え体であるかヒト提供者から調製されたかを問わず、MASPsとより弱く会合し、このため、これはin vitro試験において補体を活性化するのに失敗する。

40

【0007】

A/Bヘテロ接合体は、種々の様式で組み合わされるMBL_AおよびB一本鎖の混合物を保有するものと考えられている。正常MBLは6個の三量体ヘッドに18本までの一本鎖を含むため、すべてが正常MBL_A鎖からなるこのような分子の割合は、A/Bヘテロ接合体においては極めて小さい。理論的に50%のMBL_B鎖の混合の効果は、し

50

たがって、半分より多くのMBLオリゴマーの構造を乱すものであり、このため、MBLフェノタイプに関しては、B形質が優勢である。すなわち、大多数のMBLはMBL Bに似た構造を採用する。同様の考察がA/CおよびA/Dヘテロ接合体に適用されるが、D鎖の乱す効果は、B鎖よりもいくらか少ないようである。

【0008】

ヒトMBLを測定する既存の方法は、種々の免疫アッセイ設計において、MBLに対して生成されたポリクローナルおよび/またはモノクローナル抗体の使用に依存している。多くの場合、MBLのどの分子構造がこれらの方法で選択的に測定されているのかが明らかではない。一般的に用いられている一方法は、サンドイッチELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)における、精製ヒトMBLに対して生成されたマウスモノクローナル抗体HYB131-01の、捕捉抗体および検出抗体の両方としての使用に依存している。この手法において、HYB131-01は、ヒト血清または血漿試料中のMBLに結合できるように、マイクロタイターウェルにコートされる。結合したMBLの量は、試料中のMBL濃度の関数である。結合したMBLは、次に、検出抗体として標識したHYB131-01を加えることにより定量する。標識は、好適な基質と共にインキュベートした場合に定量的な発色反応を起こすことができる、西洋ワサビペルオキシダーゼもしくはアルカリホスファターゼなどの酵素であることができ、または、好適な酵素と複合体化したアビジンもしくはストレプトアビジンに結合することができるビオチンであることができ、または、時間分解蛍光による検出を可能にするユーロピウムであることができる。

10

【0009】

これらの方法はまた、単一のMBL分子の同一だが離れた2つの部位(エピトープ)への2つの同一の抗体分子(1つは捕捉するため、そして1つは検出するため)の結合に依存する。実際には、これは、MBL分子が三量体サブユニットのオリゴマーである場合にのみ起こり、このため、MBLオリゴマーのみがこれらのアッセイにより測定される。単一の、または不十分にオリゴマー化された(poorly oligomerized)MBL三量体サブユニットは、捕捉抗体および検出抗体の両方の同時結合を許容しないだろう。この結果、これらの方法は、不十分にオリゴマー化されたMBLを適切に測定することができないし、測定されたMBLオリゴマーが、機能的MBLの決定的な特徴の1つである、マンナンに結合することが実際に可能かどうかを直接決定することもできない。しかしながら、マンナンへの結合はMBLのオリゴマー状態と極めて強く相関しており、CRD領域の構造に影響する遺伝的変異は見出されていない。MBLの血清もしくは血漿濃度を決定するための既存のアッセイ方法はまた、低く記録されたMBLの濃度が、LXPA/LXPA遺伝子型でのように、正常MBL Aの低い濃度によるものなのか、または、A/B、A/C、A/D、B/B、C/DおよびD/D遺伝子型でのように、アッセイにおいて適切に反応しない異常構造のMBLによるものなのか決定することもできない。

20

30

【0010】

MBL Aの血漿中の低い濃度と、実際には、相当な濃度のMBL B、CおよびD変異体もしくはヘテロ接合状態のこれらの雑種形態の存在による低く記録された濃度とを識別することが望ましい。例えば、MBL BがMBL Aと同様の細胞媒介性の細胞障害活性、オプソニン活性および食作用促進活性を有することが報告されている。したがって、既存のアッセイ方法のMBL Bの検出の失敗は、このMBLのこれらの機能を反映していない。さらに、既存の免疫アッセイで測定したMBLの低い血漿濃度と、かかる低い濃度に関連するプロモーターまたはエクソン1の対立遺伝子形態の両方が、小児および免疫不全症患者における感染の増大するリスクに関連づけられている。これらはまた、慢性肉芽腫性疾患および嚢胞性線維症における疾患の進行、および全身性紅斑性狼瘡および関節リウマチなどの自己免疫疾患のより深刻な経過にも関連づけられている。既存のアッセイは、患者のMBLの状態について部分的な像をもたらすことしかできないため、この状態のより示差的な分析によって、より正確な相関が得られることが期待される。例えば、構造的な異常により低く測定されたMBLのレベルと、または、LXPA/LXPA遺伝子型による低いレベルの正常MBLと、異なる臨床的相関があるのかどうかは知られてい

40

50

ない。

【0011】

発明の要約

本発明の目的は、MBLに対して生成されたモノクローナル抗体を、その構造が許す範囲で、マンナンに結合した正常もしくは異常形態のMBLに結合するもしくは結合しないこれらの能力に基づいて選択するための方法を提供することである。

本発明の別の目的は、MBLに対して生成されたモノクローナル抗体を、該抗体もしくはMBLに対する別のモノクローナル抗体に結合した、正常もしくは異常形態のMBLに結合するもしくは結合しないこれらの能力に基づいて選択するための方法を提供することである。

10

【0012】

本発明の別の目的は、MBLに対して生成された抗体であって、

- (a) マンナンに結合したMBL Aに結合するもしくは結合しない能力、
 - (b) マンナンに結合した構造的に異常なMBLに結合するもしくは結合しない能力、
 - (c) 前記抗体もしくはMBLに対して生成された別のモノクローナル抗体に結合したMBL Aに結合するもしくは結合しない能力、または
 - (d) 前記抗体もしくはMBLに対して生成された別のモノクローナル抗体に結合した構造的に異常なMBLに結合するもしくは結合しない能力、
- を有するものを提供することである。

【0013】

本発明の別の目的は、マンナンに結合することができるMBLを試料中で測定するための、*in vitro*方法およびキットを提供することである。

本発明の別の目的は、正常なオリゴマー化MBLと、異常な、不十分にオリゴマー化されたMBLの両方を試料中で測定するための、*in vitro*方法およびキットを提供することである。

本発明の別の目的は、マンナンに結合できるMBL、および、正常なオリゴマー化MBLと異常な、不十分にオリゴマー化されたMBLとの合計の両方を試料中で同時に測定するための、*in vitro*方法およびキットを提供することである。

20

【0014】

本発明の方法、キットおよび抗体は、ヒト血漿もしくは血清試料において、マンナンに結合可能なMBLを測定することにより、または、ヒト血漿もしくは血清試料において、MBLを、正常なオリゴマー化されたMBLおよび異常な、不十分にオリゴマー化されたMBLの両方を測定することができる方法によって測定することにより、感染症および自己免疫疾患への増大した感受性およびこれらの悪化を診断するのに有用である。これらの方法の使用はまた、旧式の方法で見出されたMBL欠乏を、構造的に正常なMBLの欠乏によるものなのか、または構造的に異常なMBLの存在によるものなのか分類することを可能にする。

30

【0015】

発明の詳細な説明

本発明は、抗体、抗体を選択するための方法、および、抗体を、試料中のマンナン結合レクチン(MBL)の濃度を測定するための*in vitro*方法に用いるための方法およびキットを提供する。本発明の抗体、方法およびキットを用いて、MBLの変異形態の存在と、低濃度の正常MBLの存在とを識別することができる。さらに、MBLの総量を、MBLのオリゴマー化状態に依存せずに測定し、マンナンに結合することができるオリゴマー化されたMBLと比較することができる。

40

【0016】

本発明の抗体、方法およびキットは、生物学的液体、特にヒト血清および血漿を包含する試料中のMBLを定量し、および特徴化するのに特に有用である。血漿試料におけるマンナンに結合するMBLの能力について分析するアッセイを用いる場合、血液試料は、クエン酸塩またはEDTAなどのカルシウムキレート剤ではなく、ヘパリンにより抗凝固処

50

理するのが好ましい。なぜなら、M B Lのマンナンへの結合は、遊離イオン化カルシウムの存在に依存するからである。カルシウムキレート剤で抗凝固処理した血漿しか入手できない場合、過剰のカルシウム塩を加えてキレート剤を飽和させ、キレート剤の存在下に、遊離イオン化カルシウムの生理学的濃度を確保しなければならない。

【0017】

本発明の1側面は、異なる結合特性を有するM B Lに対して生成されたモノクローナル抗体を選択するための方法に関する。この方法の一態様では、M B Lに対して生成されたモノクローナル抗体は、構造的に正常なM B LもしくはM B L Aがマンナンに結合した場合に、当該構造的に正常なM B LもしくはM B L Aに結合するまたは結合しない、前記モノクローナル抗体の能力に基づいて選択される。この態様では、モノクローナル抗体はまた、構造的に異常なM B Lが可能な範囲でマンナンと結合した場合に、当該M B Lに結合するもしくは結合しないその能力に基づいて選択することもできる。この方法の別の態様では、M B Lに対して生成されたモノクローナル抗体は、M B L Aが同抗体もしくはM B Lに対する別のモノクローナル抗体に結合した場合に、当該M B L Aに結合するもしくは結合しないその能力に基づいて選択される。この態様では、抗体はまた、構造的に異常なM B Lが同抗体もしくはM B Lに対する別のモノクローナル抗体に結合した場合に、当該M B Lに結合するもしくは結合しないその能力に基づいて選択される。

10

【0018】

これらの選択方法を用いると、M B Lに対して生成された抗体は、1)マンナンに結合したM B L Aに結合するもしくは結合しない能力、2)マンナンに結合した構造的に異常なM B Lに結合するもしくは結合しない能力、3)同抗体もしくはM B Lに対して生成された別のモノクローナル抗体に結合したM B L Aに結合するもしくは結合しない能力、または4)同抗体もしくはM B Lに対して生成された別のモノクローナル抗体に結合した構造的に異常なM B Lに結合するもしくは結合しない能力を有するものとして同定される。典型的な構造的に異常なM B Lは、M B L Bである。構造的に正常なおよび異常なM B Lの両方が、総免疫反応性M B Lを構成する。

20

【0019】

したがって、本発明の別の側面は、M B Lに対して生成された抗体であって、構造的に正常なM B LもしくはM B L Aがマンナンと結合した場合に、当該構造的に正常なM B LもしくはM B L Aに結合するもしくは結合しない能力か、構造的に異常なM B Lがマンナンと結合した場合に、当該M B Lに結合するもしくは結合しない能力か、M B L Aが同抗体もしくはM B Lに対して生成された別のモノクローナル抗体に結合した場合に、当該M B L Aに結合するもしくは結合しない能力か、または、構造的に異常なM B Lが同抗体もしくはM B Lに対して生成された別のモノクローナル抗体に結合した場合に、当該M B Lに結合するもしくは結合しない能力を有するものに関する。

30

【0020】

本発明の抗体は、以下のように調製し、特徴化した。

免疫原として用いるヒトM B Lは、血液提供者からの血漿から精製した。精製の前に、血液の各部分を、H B s A g、およびH I V 1および2ならびにH C Vに対する抗体についてスクリーニングした。M B Lは、炭水化物カラム(セファロース)でのアフィニティークロマトグラフィーにより単離した。カラムを、塩化カルシウムを含有する生理p Hの結合バッファーで洗浄した後、M B Lを、E D T Aを含有する無カルシウムバッファーで溶出した。カルシウムを含まない、生理p Hのカルシウムキレートバッファーによる溶出は重要であり、他の手段、例えば、非生理p Hの使用またはタンパク質もしくは水の構造を変更する塩、溶質および溶媒などによる溶出は、これも炭水化物カラムに結合しているI g Mなどの抗体も溶出させ得る。溶出物は、セファロースカラムでの分子サイズクロマトグラフィーに供し、ポイド体積付近に現れるタンパク質のピークを回収した。この手順により、これも炭水化物へのカルシウム依存性の結合を示す、より低分子量の血清アミロイドタンパク質Aが除去された。得られた生成物は、限外ろ過で濃縮し、還元および非還元状態で、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(S D S - P A G

40

50

E)により分析した。

【0021】

精製したMBLは、水酸化アルミニウムゲルに吸着させ、BALB/c×CF2雌マウスに、吸着タンパク質25μgの用量で腹腔内注射した。免疫応答をモニタリングし、モノクローナル抗体を調製するための技法は、当業者に良く知られ、Harlow, E. and Lane, D. (1988; Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York)などの標準的な参考書に記載された技法に従って行った。

【0022】

ハイブリドーマ上清は、精製ヒトMBLでコートしたマイクロウェルで行ったELISAによりスクリーニングした。このスクリーニングの結果、HYB 131-01b、HYB 131-10およびHYB 131-11とコードされる新規なハイブリドーマが選択され、それぞれ同じコードの対応するマウスモノクローナル抗体をさらに特徴化した。

10

【0023】

本発明の抗体の特徴化は、先に記載されたアッセイ方法に用いられているモノクローナル抗体HYB 131-01との比較を含むものであった。この比較により、4種の抗体、HYB 131-01、HYB 131-01b、HYB 131-10およびHYB 131-11は、各々、MBL分子上の異なる、重複しないそれぞれのエピトープに結合することが明らかとなった。したがって、これらの抗体の1種のMBLへの結合は、他の3種の抗体の同じMBLへの同時結合を妨げなかった。これら4個のエピトープの、MBLモノマーの炭水化物結合部位に対する関係の研究により、HYB 131-01が緊密にこの部位に結合し、MBLのマンナンへの結合を妨げることが明らかとなった。したがって、過剰のHYB 131-01抗体と複合体化したMBLは、マンナンでコートされたマイクロウェルに結合できなかった。これに対し、過剰のHYB 131-01b、HYB 131-10またはHYB 131-11と複合体化したMBLは、依然としてマンナンでコートされたマイクロウェルに結合した。したがって、これらの実験から、HYB 131-01b、HYB 131-10またはHYB 131-11抗体のエピトープは、炭水化物結合部位と重複しないことが結論づけられた。しかしながら、コラゲナーゼによる消化に供し、コラーゲン様ドメインおよびN末端ドメインを除去したMBLのイムノプロットにおけるこれらの抗体の反応は、これらの抗体が、HYB 131-01のように、残った分子のネック+CRD部分に位置するエピトープに結合することを示している。

20

30

【0024】

モノクローナル抗体の反応性は、それぞれA/AおよびB/Bとして遺伝子タイピングされた提供者からの血清中のMBL AおよびMBL Bに対して試験した。これらの実験において、MBL Bは、構造的に異常なMBLの例として用いた。MBL AおよびMBL Bを、マンナンで、0.3マイクログラム/ミリリットルのコーティング濃度にてコートしたELISA用マイクロウェル中で1時間インキュベートした場合、西洋ワサビペルオキシダーゼと結合したHYB 131-01、HYB 131-01b、HYB 131-10およびHYB 131-11は、MBL Aとはほぼ同等の反応を示したが、MBL Bとは有意な反応を示さなかった。5マイクログラム/ミリリットルでコートすることにより、マンナンコートの密度を増加させることにより、各抗体のMBL Aへの結合によりもたらされるシグナルが増加し、より多くのMBL Aがコートに結合したことが示唆された。これはまた、単一のA/A遺伝子型の提供者からのMBL A、および健康提供者からの血清プールから精製したMBLへの別の抗体の相対的結合に若干の変化をもたらした。これは、後者のMBLが不均一であり、異なる密度のマンナンコート、および/または別の抗体に、若干異なって結合する形態を含んでいることを示唆するものである。抗体のMBL Bへの結合が検出されたケースはなかった。

40

【0025】

MBLがマンナンコートに結合している場合、当該タンパク質は、そのマンナン結合C

50

R Dが、試験した抗体のいずれも、結合したC R D上のそのエピトープへのアクセスを得ることができない方向で、保持されていると結論づけられた。十分な数のヘッドを有し、いくつかのヘッドがコートに結合する一方、他のヘッドは液相中自由に揺動することを保証できるオリゴマー化されたM B L Aのみが、抗体をその自由なヘッドを介して結合することができるのである。この仮定された自由ヘッドで試験した4種の抗体の反応性には、わずかな差異があった。最大2個のヘッドまたは異常な単一のヘッドを有するM B L Bは、いずれの抗体もC R Dへの結合ができないような様式で、マンナンコートに結合している。なぜなら、利用できる結合していないC R Dが、液相中にないからである。また、M B L Bのマンナンコート表面への結合はM B L Aより弱く、別な実験で、有効な結合を得るには、長時間のインキュベーションを要することが決定された。これは、M B L Aのマンナンコート表面への結合は、同じオリゴマーの多数のヘッドの当該表面への結合による相乗効果によって安定化しているが、M B L Bの結合は、同程度の結合上の相乗効果の対象とならないという事実に起因する。したがって、アッセイ手順のその後の洗浄工程により、実際、コーティングに結合した任意のM B L Bが除去され、これがこの手順を正常なオリゴマー化M B Lについて高度に特異的にしている可能性がある。

10

【0026】

前記4種の抗体のM B L AおよびM B L Bとの反応性は、ペアワイズ比較においても試験した。これらのアッセイにおいて、各精製抗体を、マイクロタイターウェルをコートするのに用いた。次に、M B L AまたはM B L Bのいずれかを含有するヒト血清の希釈物を加え、結合したM B Lへの、精製され、標識されたタイプの他の3種の抗体のそれぞれの結合を測定した。A / A 遺伝子型の単一の提供者からの血清におけるM B L Aの濃度は、H Y B 131 - 01をコートおよび検出抗体の両方として用い、そしてプールされた提供者血漿から精製したM B Lを重量測定の標準物質 (gravimetric standard) として用いた、先に記載されたアッセイ方法によって、760 ng / ml と決定された。これらすべてのアッセイは、カルシウムを含まない慣用の希釈バッファーおよび洗浄バッファーを用いて行なった。表1に、抗体の各組合せにより、M B L A血清およびM B L B血清について、同じ標準物質との比較により得られたM B L濃度を示す。

20

【0027】

【表 1】

表1 コーティングおよび検出抗体の異なる組合せを用いて酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) により測定した、MBL AおよびMBL Bをそれぞれ含有する血清における、ng/ml表示のMBL濃度。
SD: 標準偏差、CV: 変動係数

抗体 検出	HYB 131-01		HYB 131-01b		HYB 131-10		HYB 131-11		平均 SD
	MBL A	MBL B	MBL A	MBL B	MBL A	MBL B	MBL A	MBL B	CV
HYB 131-01	760		980		900		870		878 91 10%
		0		130		140		70	85 65 76%
HYB 131-01b	820		840		990		870		880 76 9%
		50		90		100		210	113 68 61%
HYB 131-10	790		910		920		1040		915 102 11%
		160		170		190		530	263 178 68%
HYB 131-11	1050		1100		960		790		975 136 14%
		140		80		180		0	100 78 78%
平均	855	88	958	118	943	153	893	203	
SD	132	75	111	41	40	41	105	235	
CV	15%	86%	12%	35%	4%	27%	12%	116%	

【0028】

以下の文章では、コーティング/検出抗体の組合せは、この順序で、各抗体の参照番号の最後の部分のみを用いて参照する。例えば、01/01bは、HYB 131-01をコート抗体として、そしてHYB 131-01bを検出抗体として用いたことを意味する。

【0029】

MBL Aについて得られた見かけ上の (apparent) 濃度値は、01/01での760 ng/ml (先に記載されたアッセイを用いて) から、11/01bでの1100 ng/ml

10

20

30

40

50

m lまで異なった。したがって、異なる抗体の組合せを用いることにより、この提供者からは、先に記載されたアッセイを用いて、プールされ、精製されたMBL標準物質との比較で測定したもののより45%まで多いMBL Aを検出することができた。単一の提供者の血漿中のMBLも、標準物質のMBLも同質ではないため、単一の提供者の血漿について記録された数値の増加は、部分的に、その抗体の組合せの、プールされた標準物質との反応性の低下によるものかもしれない。異なる検出抗体を同じコーティング抗体と組み合わせ用いて、および、同じコーティング抗体を、異なる検出抗体と組み合わせ用いて得たMBL A濃度についての変動係数は、コーティング抗体としてのHYB 131-01bは、最も少ない変動で異なる抗体による検出を許容するようにMBLと結合し、一方、検出抗体としてのHYB 131-10は、異なるコートに結合したMBLを検出するのに最小の変動を示すことを示している。 10

【0030】

異なるコートによりMBLが提示される様式にわずかな感受性しか示さない、HYB 131-10の検出抗体としての信頼性は、異なる遺伝子型の提供者からの多数の血清を、マンナンを異なる濃度でコートしたマイクロウェルで試験することによって確認した。4種の検出抗体の中で、HYB 131-10が、異なるマンナンコートに結合した、同じ血清からのMBLについて、最も一貫した結果をもたらした。

【0031】

MBL A濃度の最大の平均値は、4種の検出抗体で得られた結果を平均すると、HYB 131-11およびHYB 131-10をコーティング抗体として用いた場合に得られた。これは、HYB 131-11およびHYB 131-10が、HYB 131-01bおよびHYB 131-01よりもMBLに高い親和性を有することを示唆した。 20

【0032】

同じコーティング抗体に結合したMBL Aを、異なる検出抗体で測定した場合に示される記録されたMBL A濃度の差異は、一部のコーティング/検出抗体のペアが、他より高い効率でMBL Aと同時に結合することを示唆するものである。MBL Aについては、これは複数の因子の組合せに依存すると仮定される。異なる抗体が、結合したMBLのヘッドを保持する角度は、CRD上のそのエピトープの位置に依存し、これは、他のエピトープの、そのそれぞれの抗体へのアクセス可能性の程度に影響する。同時に、個々の抗体の親和性が結果に影響し得る。 30

【0033】

検出抗体の結合は、その大部分が、液相に振り出された結合していないMBLのヘッドへのその結合、コーティング抗体への結合によりブロックされているコート結合ヘッド上のエピトープに依存している。しかしながら、各ヘッドは放射相称に配置された3つのCRD領域を有するため、問題となるエピトープの位置が、三重ヘッドの、その同一エピトープの1つまたは2つを介した結合角度が、同じヘッド上の残りの2つまたは1つのエピトープへの検出抗体のアクセスを可能にするものである場合、検出抗体のコート結合ヘッドへのいくらかの結合が依然として可能であり得る。これが起こり得る程度は、同じ抗体を用いて、液相に自由に揺動するヘッドが極めて少ないか、または存在しないMBL Bの濃度を測定した場合に得られる結果が示している。表1が示すとおり、組合せ01/01も、11/11も、MBL Bを測定することができない。したがって、これらの同じ抗体の組合せは、液相中、検出抗体に露出した非結合ヘッドを有するオリゴマー化したMBLしか測定することができない。 40

【0034】

01b/01b抗体の組合せは、MBL Aについて840 ng/mlの総数値(total reading)をもたらした。これは以下のように分析できる。液相中の自由ヘッドへの結合から予想される数値 = 760 ng/ml (コート結合ヘッドに結合することができない01/01からの数値)、コート結合ヘッドへの結合から予想される数値 = 90 ng/ml (01b/01bにより、MBL Bについて得られた数値)、総予想数値 = 850 n 50

g / m l。予想数値 (8 5 0 n g / m l) と実際に見出された数値 (8 4 0 n g / m l) との間の一致は非常によい。

【 0 0 3 5 】

1 0 / 1 0 抗体の組合せは、M B L A について 9 2 0 n g / m l の総数値をもたらした。これは以下のように分析できる。液相中の自由ヘッドへの結合から予想される数値 = 7 6 0 n g / m l (コート結合ヘッドに結合することができない 0 1 / 0 1 からの数値)、コート結合ヘッドへの結合から予想される数値 = 1 9 0 n g / m l (1 0 / 1 0 により、M B L B について得られた数値)、総予想数値 = 9 5 0 n g / m l。予想数値 (9 5 0 n g / m l) と実際に見出された数値 (9 2 0 n g / m l) との間の一致も非常によい。

10

【 0 0 3 6 】

両方の場合において、計算は概算であり、M B L B 血清中の M B L B の量が、M B L A 試料中のコート結合 M B L A ヘッドの量に匹敵するという仮定に基づいている。しかしながら、M B L B 濃度の最も高い推定値 (恐らく現実に最も近いアプローチである) は 5 3 0 n g / m l であり、5 3 0 / 7 6 0 という比率は、M B L A 試料中の総ヘッドに対するコート結合ヘッドの割合からかけ離れてはいないはずである。どちらかといえば、それは、この比率より若干大きいかも知れない。

【 0 0 3 7 】

コーティングおよび検出のための異なる抗体の組合せは、非コート結合ヘッドとのその反応と、コート結合ヘッドとの、検出抗体のこれらのヘッド上のそのエピトープへのアクセス可能性に依存した反応との関数としての M B L A の数値を与える。これは、コーティング抗体のためのエピトープおよび検出抗体のためのエピトープの、これらの間の角度を支配する相対位置と、放射相称な三重ヘッドが一度コーティング抗体のための 1 つまたは 2 つのエピトープを介してコートに結合した場合の、前記三重ヘッド上の検出抗体のためのエピトープの露出とに依存する。幾何学的な考察により、ペア内の抗体の使用を逆にすることが、同じ結果をもたらさないことが明らかになった。すなわち、1 1 / 0 1 b は 1 1 0 0 n g / m l の M B L A 値を与えるが、0 1 b / 1 1 は 8 7 0 n g / m l の数値を与える。これに関するさらなる考察は、高い数値は、一般的に、より高い親和性の抗体がコートとして用いられた時に得られるということであり、これは、アッセイ手順の最中、コートとその結合 M B L とが、検出抗体よりもより多く洗浄に供されるためである。

20

30

【 0 0 3 8 】

M B L B について得られた見かけ上の濃度値は、0 1 / 0 1 および先に記載されたアッセイおよび 1 1 / 1 1 の 0 から、1 0 / 1 1 の 5 3 0 n g / m l まで変動した。M B L B は正常なネックおよび C R D メインを有し、したがって、4 種の抗体について M B L A と同様のエピトープを示す。しかしながら、M B L B は、単一の M B L 鎖の二量体と、M B L B 分子中に見出されるヘッドの最大数である、2 個の三重ヘッドで構成され得る六量体とからなる。M B L B は、抗体コーティングに、全ての二重および三重 C R D ヘッドが、コーティング抗体のための 2 個または 3 個の同一エピトープの少なくとも 1 つのエピトープを介して接触した状態にあるように結合していると考えられる。M B L ヘッドが結合している角度は、問題のエピトープの C R D 上の位置に依存し、これは、検出抗体がコーティング抗体と同じか、または異なる抗体であるか否かに関らず、他のエピトープの、そのそれぞれの検出抗体へのアクセス可能性に影響する。

40

【 0 0 3 9 】

この系における M B L B の測定は、したがって、ほとんど完全に、コーティングおよび検出抗体エピトープの相対的な位置、および検出抗体のためのエピトープの露出に対するコートへの結合の効果に依存する。組合せ 0 1 / 0 1 も 1 1 / 1 1 も M B L B を測定することはできない。これは、抗体 H Y B 1 3 1 - 0 1 および H Y B 1 3 1 - 1 1 のためのエピトープが、C R D 上に、二重または三重ヘッドのコート中の抗体への単一のエピトープを介した結合が、ヘッドを、他のエピトープまたは同じ抗体のための 2 つのエピトープが液相で利用できない位置に維持されるような位置に保持するように、位置してい

50

ることを示している。CRD上のこれらの位置は、CRDが、二重または三重ヘッドにおいて放射相称に配列された場合、これらが同じ方向を向くようなものであることが結論付けられた。

【0040】

組合せ01b/01bおよび10/10は、いくらかのMBL Bを測定することができた。これは、これらの抗体のためのエピトープが、CRD上に、CRDが二重または三重ヘッドに整列している時に異なる方向を向くように位置していることを示唆する。01b/01bは90 ng/mlの数値を与えたが、10/10は190 ng/mlの数値を与えたという事実は、抗体HYB 131-10のより高い親和性、および/またはHYB 131-10のための非コート結合エピトープが液相により良好に露出させるエピトープ位置の影響によるものであり得る。

10

【0041】

コーティングおよび検出抗体としての異なる抗体の組合せは、全ていくらかのMBL Bを測定することができた。これは、4種の異なる抗体が、全て、CRD上の重複しないエピトープに結合しているという事実によるものと考えられる。これらの間にはある角度があり、異なるエピトープの相対的な位置および角度が、得られた数値を支配する主要な因子であるとみられる。幾何学的な考察によると、ペア内の抗体の使用を逆にすると同じ結果が得られないことが明らかになった。すなわち、11/01bは、80 ng/mlのMBL B値を与え、一方01b/11は、210 ng/mlの数値を与えた。MBL Bについての最も高い数値(530 ng/ml)は、10/11で得られ、これは、MBL Bが一度HYB 131-10のコートに結合すると、HYB 131-11のためのエピトープがこの検出抗体に良好に露出されることを示唆するものである。理論的な見地からは、一連の抗体ペアから得られたMBL B濃度の最大値は、重量濃度が決定可能な場合には、重量濃度に最も近いと思われる。

20

【0042】

したがって、10/11抗体の組合せが、MBL B、そして類推的にMBL CおよびDをも測定するため、および、A/B、A/CおよびA/Dヘテロ接合体からのMBLを測定するための最も好適な抗体の組合せである。この組合せはまた、MBL Aについて1040 ng/mlという高い数値を与え、このため、これは患者試料中の総免疫反応性MBLを測定するのに好適であり得る。総免疫反応性MBL濃度を測定するのに用いることができる別の組合せは、11/01である。この組合せを用いて、異なるMBL遺伝子型の血液提供者について記録した血漿MBL濃度を表2に示す。そこでは、これらを先に記載されたアッセイを用いた01/01の組合せ、および11/11の組合せからの結果と比較してある。

30

【0043】

表2は、11/01、01/01および11/11で得られた数値が、プロモーターの欠陥に関連するかどうかに関らず、すべてのA/A遺伝子型について十分に一致していることを示している。A/B、A/D、B/BおよびB/D遺伝子型については、11/01は他の2つの抗体の組合せより顕著に多いMBLを測定するが、11/11の組合せは、B/B遺伝子型を除き、中間的な値を与えた。A/D遺伝子型は、先に記載されたアッセイによってさえ、一般的に軽度に減少したMBL値しか示さず、これは先の研究(上記Steffensen, R. et al.)を確認するものである。組換えMBL Dは、組換えMBL Bと類似しているが、D鎖はB鎖よりも、A鎖に組み合わさって、正常または略正常構造のMBLの割合を形成しやすいようである。

40

【0044】

【表 2】

表 2 異なった抗体の組合せで決定した、異なる M B L 遺伝子型の血液提供者における血漿 M B L 濃度 (ng/ml)。P D：プロモーター欠陥 (遺伝子型) L X / L X または L X / L Y。

抗体の組合せ		11/01	01/01 (旧式アッセイ)	11/11
提供者番号	遺伝子型			
1	A/A	1460	1460	1440
2	A/A	1840	2530	2330
3	A/A	1520	1800	1690
4	A/A	2950	3990	4110
5	A/A PD	510	570	580
6	A/A PD	360	340	460
7	A/B	1170	350	790
8	A/B	2100	320	880
9	A/D	2140	1030	1460
10	B/B	570	50	0
11	B/D	660	20	220
12	B/D	530	20	290

【 0 0 4 5 】

カルシウムの影響も検討した。異なる抗体のペアを用いた前記アッセイは、全て希釈および洗浄バッファー中にカルシウムの存在なしに行なった。糖の M B L への結合はカルシウム依存性であり、カルシウム自身が M B L の C R D に結合し、そのコンホメーションを変化させ、糖結合機構に参加する。したがって、カルシウム含有希釈および洗浄バッファーは M B L のマンナンコートへの結合に依存する M B L アッセイにとって重要である。専ら M B L への抗体の結合に依存する M B L アッセイでは、カルシウムは必要ない。しかしながら、C R D への抗体の結合に依存する M B L アッセイにおいて、カルシウム含有バッファーを用いた場合、カルシウムにより誘導される C R D のコンホメーションの変化が、得られる結果を変更する可能性がある。これは 2 つの様式で起こり得る：特定のモノクローナル抗体のエピトープについてのアフィニティーが、当該エピトープのコンホメーション変化により変化し得ること、および / または C R D におけるコンホメーション変化が、異なるモノクローナル抗体についてのエピトープ間の角度を変化させ得ること。これは、構造的に異常な M B L を測定するための最適な抗体の組合せの選択が、希釈および洗浄バッファー中のカルシウムの存在に影響され得ることを意味する。それ故、異なる抗体の組合せの試験を、イオン化カルシウムの生理レベルに対する過剰量である、4 mM 塩化カルシウム含有バッファー中で繰り返した。多数の結果からの主要な結論は、カルシウムの存在下で、構造的に異常な M B L を測定するための最適な抗体の組合せは 1 1 / 0 1 であり

、一方、カルシウム非存在下における最適な組合せは10/11であるということであった。

【0046】

本発明の別の側面は、試料中で、マンナンに結合することができるMBLを測定するための、または、試料中で、正常なオリゴマー化MBLおよび異常な、不十分にオリゴマー化されたMBLの両方を測定するためのin vitro方法およびキットに関する。これらの方法は、感染性疾患および自己免疫性疾患に対する増大した感受性およびこれらの疾患の悪化を診断するのに有用である。

【0047】

よく知られた任意の種類免疫アッセイ技術を、本発明の方法に用いることができる。本発明の免疫アッセイに関して、マンナンに結合できるMBLもしくは試料中の総免疫反応性MBLが、マンナンもしくは本発明の抗体などの捕捉分子を介して、それぞれ固相に不動化されているのが好ましい。不動化された、マンナンに結合できるMBLもしくは試料中の総免疫反応性MBLは、その後、検出可能に標識された本発明の二次抗体を介して検出することができる。

10

【0048】

一つの好ましい態様では、前記方法は、マンナンもしくはMBLに対する選択されたモノクロナール抗体でプレコートされたマイクロタイターウェル、MBLに対する選択されたモノクロナール抗体の溶液であって、この抗体が例えばビオチン、またはアルカリホスファターゼもしくは西洋ワサビペルオキシダーゼなどの検出可能な酵素、または時間分解蛍光放射による検出を可能にするユーロピウムで検出可能に標識されているもの、標準物質および対照としてのヒトMBLの溶液、および用いる酵素のための発色基質の溶液、を含有するELISAアッセイキットからなる酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)を含む。ビオチン標識抗体の場合、上記酵素の一つに結合したストレプトアビジンの溶液も提供される。希釈および洗浄バッファーも提供される。

20

【0049】

ELISAに用いられ、当業者に良く知られている検出可能な酵素の例は、限定されることなく、アセチルコリンエステラーゼ、アルカリホスファターゼ、グリセロリン酸デヒドロゲナーゼ、アスパラギナーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 α -V-ステロイドイソメラーゼ、カタラーゼ、グルコアミラーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、リボヌクレアーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ウレアーゼ、および酵母アルコールデヒドロゲナーゼを包含する。

30

【0050】

ELISAを用いてマンナン結合MBLを測定することができる。マンナン結合MBLを測定するために、ELISAプレートのマイクロタイターウェルもしくはウェルのストリップは、捕捉分子としてのマンナンでプレコートされる。好ましくは、マンナンは *Saccharomyces cerevisiae* から調製され、適切なコーティングバッファー中、 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲、より好ましくは $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で、当業者に良く知られた手順に従って適用される。ウェルを、従来の組成の洗浄バッファー、例えば、ブロッッキング剤として非イオン性溶剤を、および、イオン化カルシウムを $0.5 \text{mM} \sim 5 \text{mM}$ の間の濃度にて、しかし、好ましくは 4mM にて、可溶性カルシウム塩の形で含有するもので洗浄した後、分析すべき血清もしくはヘパリンで抗凝固処理した血漿試料および標準物質および対照であって、すべて、イオン化カルシウムを上記の濃度範囲内であるが好ましくは 4mM で含有する希釈バッファーで希釈したもの(MBLのマンナンへの結合はカルシウム依存性であるため)を、それぞれのウェルに加える。ウェルは、室温で1時間までの期間インキュベートし、そして洗浄する。

40

【0051】

HYB131-10などの本発明の選択されたモノクローナル抗体であって、例えばビオチンなどで検出可能に標識されたものの希釈物を各ウェルに加え、1時間までの間イン

50

キュベートする。この抗体の適切な希釈は経験的に決定され、その濃度は、 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲であり得る。ウェルを洗浄し、結合抗体をよく知られた技法に従って検出する。例えば、ビオチン化抗体については、西洋ワサビペルオキシダーゼが結合したストレプトアビジンの溶液を各ウェルに加え、1時間までの間インキュベートする。ウェルを洗浄し、発色基質溶液を各ウェルに加え、30分までの間インキュベートする。色の生成は、各ウェルに強酸を加えて停止させ、生成した色の光学密度をマイクロプレートリーダーで読み取る。各試料ウェルにおけるマンナンに結合したMBLの量は、そのウェルの光学密度を、重量測定的に (gravimetrically) 調製した精製MBLの標準物質に由来する標準物質を含有するウェルについての光学密度を介して描いた標準曲線と対比することにより計算した。検出のための代替的な手段は、何ら限定されることなく、抗体を酵素もしくはユーロピウムと直接結合させ、上記手順をしかるべく、当業者に良く知られているように適合させることを包含する。

10

【0052】

また、ELISAを用いて総免疫反応性MBLを測定することもできる。総免疫反応性MBLを測定するために、ELISAプレートのマイクロタイターウェルもしくはウェルのストリップは、捕捉分子としての、MBLに対する選択されたモノクローナル抗体、例えば、HYB 131-10もしくは類似の選択された抗体を、適切なコーティングバッファ中、好ましくは $0.1 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲、より好ましくは $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で、当業者に良く知られた手順に従って適用してプレコートする。ウェルを、当業者に良く知られ、ブロッキング剤として非イオン性溶剤を含有する従来の組成の洗浄バッファで洗浄した後、すべて従来の組成の希釈バッファで希釈した分析すべき血清もしくは血漿試料および標準物質および対照を、それぞれのウェルに加える。ウェルは、室温で1時間までの期間インキュベートし、そして洗浄する。例えばビオチンなどで検出可能に標識された異なるモノクローナル抗体であって、HYB 131-11もしくは類似の基準に従って選択された別の抗体であってよいものの希釈物を各ウェルに加え、1時間までの間インキュベートする。この抗体の適切な希釈は経験的に決定され、その濃度は、 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲であり得る。

20

【0053】

ウェルを洗浄し、結合抗体を検出する。ビオチン化抗体については、西洋ワサビペルオキシダーゼが結合したストレプトアビジンの溶液を用い、これを各ウェルに加え、1時間までの間インキュベートすることによって行う。ウェルを洗浄し、発色基質溶液を各ウェルに加え、30分までの間インキュベートする。色の生成は、各ウェルに強酸を加えて停止させ、生成した色の光学密度をマイクロプレートリーダーで読み取る。各試料ウェルにおける、コーティングおよび検出抗体の両方に同時に結合できるMBLの量は、そのウェルの光学密度を、重量測定的に調製した精製MBLの標準物質に由来する標準物質を含有するウェルについての光学密度を介して描いた標準曲線と対比することにより計算した。代替的に、抗体を酵素もしくはユーロピウムと直接結合させ、上記手順を、他のよく知られた技法にしたがって、検出のために適合させることができる。

30

【0054】

特に有用で好都合なELISA法は、マンナンを捕捉分子として用いたマンナン結合MBLアッセイと、捕捉抗体としてHYB 131-11を用いたMBL総免疫反応性アッセイとの組み合わせである。この方法においては、1組のELISAウェルをマンナンで上記のようにプレコートし、第2の組をHYB 131-11抗体により、 $1 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の間の濃度で、当業者に良く知られた手順に従ってプレコートする。次に、同じ希釈の血清もしくは血漿試料を、前記2組のウェル中並行して、同じ希釈および洗浄バッファおよび同じ試薬を用いてアッセイする。これにより、正常にオリゴマー化された、マンナン結合MBLと、総MBL免疫反応性が、同時に、同じ血清もしくは血漿試料中で測定される。希釈バッファおよび洗浄バッファは、両方ともイオン化カルシウムを、 $0.5 \text{mM} \sim 5 \text{mM}$ の間だが、好ましくは 4mM の濃度で含有し、バッファの他の成分は、カルシウムを沈殿させないように、またはカルシウムに別の仕方で影響しな

40

50

いように選択される。

【0055】

ウェルを、ブロッキング剤として非イオン性溶剤を含有する従来の組成の洗浄バッファーで洗浄した後、すべて従来の組成のカルシウムを含有する希釈バッファーで希釈した、分析すべき血清もしくは血漿試料および標準物質および対照を、3つの組の各々におけるそれぞれのウェルに加える。ウェルは、室温で1時間までの期間インキュベートし、そして洗浄する。例えばビオチンなどで検出可能に標識された、モノクローナル抗体HYB 131-11もしくは上記に概説した基準に従って選択された別の抗体の希釈物を各ウェルに加え、1時間までの間インキュベートする。この抗体の適切な希釈は経験的に決定され、その濃度は、 $0.1 \mu\text{g/ml} \sim 2 \mu\text{g/ml}$ の範囲であり得る。ウェルを洗浄し、結合抗体を検出する。ビオチン化抗体については、西洋ワサビペルオキシダーゼが結合したストレプトアビジンの溶液を用い、これを各ウェルに加え、1時間までの間インキュベートすることによって行う。ウェルを洗浄し、発色基質溶液を各ウェルに加え、30分までの間インキュベートする。

10

【0056】

色の生成は、各ウェルに強酸を加えて停止させ、生成した色の光学密度をマイクロプレートリーダーで読み取る。各ウェルに最初に添加されたMBLの量は、そのウェルの光学密度を、重量測定的に調製した精製MBLの標準物質に由来する標準物質を含有する、同じ組の(同じ捕捉分子でコートされた)ウェルについての光学密度値を介して描いた標準曲線と対比することにより計算する。代替的に、検出抗体を酵素もしくはユーロピウムと直接結合させ、上記プロトコルを、他のよく知られた技法にしたがって、検出のために適合させることができる。この方法は、抗体HYB 131-01でコートされたウェルの追加の組を用いて、旧式の方法と組み合わせることもできる。MBLマンナン結合(MBL mannan-binding)および総免疫反応性アッセイを組み合わせることは、HYB 131-01を用いる旧式の方法とも組み合わせるか否かにかかわらず、多数の利点を提供する。

20

【0057】

特に、MBLマンナン結合法は、正常にオリゴマー化されたMBLに高度に選択的であり、旧式の方法と一般的に類似の結果を与える。

さらに、MBLマンナン結合法は、旧式の方法と異なり、試料中に存在し得るいずれのリウマチ因子からの影響の対象とならない。旧式の方法では、免疫グロブリンに結合するリウマチ因子がコーティング抗体を検出抗体に架橋する可能性があり、それ故、偽の高い陽性値を与え、これが、MBLの存在によるものと解釈されていた。リウマチ因子はマンナンに結合しないため、これはマンナン結合アッセイでは生じ得ず、それ故、前記アッセイはリウマチ因子の発生と関連している、関節リウマチなどの自己免疫症状を有する患者において、正常にオリゴマー化されたMBLを決定するためにより適している。免疫グロブリンもしくは熱処理免疫グロブリンのインキュベーション培地への添加は、リウマチ因子のいくらかを吸収し、捕捉および検出抗体に基づくアッセイに対するこれらの影響を減少させることができる。しかしながら、かかる影響はこの手順により減少させることができるが、それを完全に除去することはできない。この理由により、免疫グロブリンではない捕捉分子の使用が好ましい。

30

40

【0058】

さらに、MBLマンナン結合アッセイおよび/または旧式の方法の結果を、MBL総免疫反応性アッセイの結果と比較することにより、旧式の方法により記録されたMBLの低い血清もしくは血漿レベルの背景にある遺伝的欠陥の性質が明らかになる。このタイプの比較は、総免疫反応性アッセイからの結果を、旧式の方法からの結果と比較する、表2の第3(11/01)および第4列(01/01、旧式の方法)により例証される。例えば、旧式アッセイにより、もしくはマンナン結合アッセイにより記録された高いレベル(例えば、 1100 ng/ml 超)は、総免疫反応性アッセイにおける類似の高いレベルと関連している。これらの対象(表2の提供者1~4)は、プロモーターの欠陥のない、構造

50

的に正常なMBL A (A/A遺伝子型)を有する。旧式アッセイにより、もしくはマンナン結合アッセイにより記録されたより低いレベル(例えば1100 ng/ml以下)を有する対象は、総免疫反応性アッセイにおいて類似の低いレベルか、または、はるかに高いレベルのいずれかを示し得る。総免疫反応性アッセイにおける類似の低いレベル(表2の提供者5および6)は、構造的に正常なMBLの減少した濃度、すなわち、プロモーターの欠陥が存在するA/A遺伝子型を示し、これは、LX/LXもしくはLX/LYであり得る。

【0059】

総免疫反応性アッセイにおける、旧式アッセイもしくはマンナン結合アッセイにおけるよりもはるかに高いレベルは、構造的に異常なMBLの顕著なレベルの存在を示す。B鎖が正常構造に高度に破壊的である(highly disruptive)A/Bヘテロ接合遺伝子型(表2の提供者7および8)は、典型的に、旧式アッセイにより、もしくはマンナン結合アッセイにより記録された1000 ng/mlよりかなり低いレベルのMBLと関連している。総免疫反応性アッセイにより記録された値は、3~7倍高くなり得る。D鎖が、BもしくはC鎖より、正常構造に破壊的でないA/Dヘテロ接合遺伝子型(表2の提供者9)は、典型的に、旧式アッセイにより、もしくはマンナン結合アッセイにより記録された1500 ng/mlより低いレベルのMBLと関連している。総免疫反応性アッセイにより記録された値は、2倍高くなり得る。B/B、D/DおよびC/Cホモ接合体、およびB/D、B/CおよびD/Cヘテロ接合体は、構造的に異常な鎖のみを有し、表2の提供者10~12により例示される。これらの遺伝子型は、典型的に、旧式アッセイにより記録された100 ng/ml未満のMBLレベルと関連しているが、総免疫反応性アッセイにより記録される値は、10~30倍高くなり得るものの、1000 ng/ml未満にとどまっている。

【0060】

例示されたELISAアッセイの検出限界は、1/10の希釈を用いた場合、当初の血漿もしくは血清試料において0.5 ng/mlのオーダーにあり、動作範囲の上限は、試料の希釈率を適切に増大させることにより生じ得る任意の濃度へ拡張することができる。

【0061】

当業者がこの開示を読んで理解するとおり、上記のELISA形式で用いた原理は、別の固相免疫アッセイ形式で用いるために、よく知られた手順に従い、日常的に変更することができる。例えば、1つの態様においては、マンナンもしくはMBLに対するモノクローナル抗体である捕捉分子は、ポリスチレンマイクロスフェアまたは微粒子または磁性ビーズまたは常磁性ビーズ上にコートされる。別の態様では、捕捉分子は、ポリスチレンスライド上にコートされる。次に、試料を、コートされた微粒子、ビーズもしくはスライドに加え、そして、試料中の、マンナンに結合可能なMBLもしくは正常のオリゴマー化されたMBLおよび異常な、不十分にオリゴマー化されたMBLを、本発明の抗体を用いて測定する。

【0062】

さらに、当業者がこの開示を読んで理解するとおり、対象となる他の分析物のための追加の捕捉分子を、複数分析物の自動分析のために、プレート、微粒子、ビーズもしくはスライド上にコートすることもできる。かかる分析物は、限定されることなく、先天性免疫系の他の成分、例えば、界面活性タンパク質(surfactant protein)AおよびD、フィコリンH、LおよびM、および補体成分および因子、ならびに適応免疫系の成分、凝固および血栓溶解系の成分、および分析上の利益を有する實際上すべての血清もしくは血漿成分を包含する。

【0063】

本発明の抗体に有用であり、当業者に良く知られたその他の免疫アッセイ技法は、限定されることなく、ラジオイムノアッセイ、磁気分離と例えばルビジウムで標識された抗体の電気化学発光測定、免疫沈降、ウェスタンブロット分析(イムノブロットティング)、および蛍光活性化セルソーティング(FACS)を包含する。免疫沈降法は、当該技術分野

10

20

30

40

50

において標準的であり、例えば、Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Volume 2, pp. 10.16.1-10.16.11, John Wiley & Sons, Inc., 1998に見出すことができる。ウェスタンブロット(イムノブロット)分析もまた、当該技術分野において標準的であり、例えば、Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Volume 2, pp. 10.8.1-10.8.21, John Wiley & Sons, Inc., 1997に見出すことができる。MBLレベルは、感染症ならびに自己免疫障害および疾患への増大した感受性、およびこれらの悪化に関連している。したがって、ヒト血漿もしくは血清試料中の、マンナンに結合できるMBL、または、正常なオリゴマー化されたMBLおよび異常な、不十分にオリゴマー化されたMBLの両方を測定するのに用いることができる本発明の方法、キットおよび抗体は、感染症および自己免疫疾患への増大した感受性、およびこれらの悪化を診断するのに有用である。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 03/04038
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/564 C07K14/47 C07K16/18		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIPSCOMBE R.J. ET AL.: "Distinct physicochemical characteristics of human mannose binding protein expressed by individuals of differing genotype." IMMUNOLOGY, vol. 85, no. 4, August 1995 (1995-08), pages 660-667, XP000518005 page 660 -page 661 page 664, column 2 -page 665, column 1 --- -/--	3,4,7
<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		Date of mailing of the international search report
19 November 2003		19/12/2003
Name and mailing address of the ISA		Authorized officer
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		Giry, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/EP 03/04038

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZIMMERMANN-NIELSEN E. AND AL.: "Complement activation mediated by mannan-binding lectin in plasma from healthy individuals and from patients with SLE, Crohn's disease and colorectal cancer. Suppressed activation by SLE plasma." SCAND. J. IMMUNOL., vol. 55, January 2002 (2002-01), pages 105-110, XP002261993	3,4,7
Y	abstract page 106, column 1 -page 107, column 1 ---	13-15
X	STEFFENSEN R. ET AL.: "Detection of structural gene mutations and promoter polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain reaction with sequence specific primers." J. IMMUNOL. METH., vol. 241, 2000, pages 33-42, XP004213709	3,4,7
Y	abstract page 34, column 1 page 35, column 2 ---	13-15
X	WO 00 69894 A (THIEL S. ET AL.) 23 November 2000 (2000-11-23) page 18	3,4,7
Y	the whole document ---	1,2,5,6, 8-15
Y	WO 02 05833 A (NATLMMUNE APS) 24 January 2002 (2002-01-24) the whole document ---	1-15
Y	HANSEN S. ET AL.: "Purification and characterization of two mannan-binding lectins from mouse serum." J. IMMUNOL., vol. 164, 2000, pages 2610-2618, XP002261994 the whole document ---	1-15
Y	KURATA H. ET AL.: "Role of the collagen-like domain of the human serum mannan-binding protein in the activation of complement and the secretion of this lectin." BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMM., vol. 191, no. 3, 31 March 1993 (1993-03-31), pages 1204-1210, XP002261995 the whole document ---	1-15
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/EP 03/04038

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>KOCH C. ET AL.: "Immunological detection and quantification of abnormal forms of mannan-binding lectin in human serum and plasma" INTERLEC 20 ,THE TWENTIETH INTERNATIONAL LECTIN MEETING., 'Online! 20 - 25 May 2002, XP002261996 COPENHAGEN, DENMARK Retrieved from the Internet: <URL:plab.ku.dk/tcbh/interlec20Koch.htm> 'retrieved on 2003-11-20! the whole document ---</p>	1-15
P,X	<p>ANONYMOUS: "HBT elisa test kit for human MBL (Lectin assay)" HYCULT BIOTECHNOLOGY B.V., 'Online! October 2002 (2002-10), XP002261997 Retrieved from the Internet: <URL:www.caltag.com/pdf/HK323.pdf> 'retrieved on 2003-11-20! the whole document ---</p>	1-15
T	<p>ANONYMOUS: "MBL oligomer ELISA" ANTIBODYSHOP, 'Online! August 2003 (2003-08), XP002261998 Denmark Retrieved from the Internet: <URL:www.antibodyshop.com> 'retrieved on 2003-11-20! the whole document ---</p>	1-15
T	<p>TERAI I. ET AL.: "Relationship between gene polymorphisms of mannose-binding lectin (MBL) and two molecular forms of MBL." EUR. J. IMMUNOL., vol. 33, October 2003 (2003-10), pages 2755-2763, XP009021264 . the whole document -----</p>	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 03/04038**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

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

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

2. Claims Nos.: 1-15
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

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

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

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

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

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

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

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/EP 03 04038

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1-15

Present claims 1-15 relate to an extremely large number of possible antibodies and methods. Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the antibodies and methods claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to antibodies HYB131-01, HYB131-01b, HYB131-10 and HYB131-11 and methods using the same which are mentioned in the description.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 03/04038

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0069894	A	23-11-2000	AU 4393500	A 05-12-2000
			AU 4393600	A 05-12-2000
			CA 2372128	A1 23-11-2000
			CA 2372435	A1 23-11-2000
			CN 1359420	T 17-07-2002
			CN 1359298	T 17-07-2002
			WO 0070043	A1 23-11-2000
			WO 0069894	A2 23-11-2000
			EP 1181363	A1 27-02-2002
			EP 1181038	A2 27-02-2002
			JP 2002544286	T 24-12-2002
			JP 2002543837	T 24-12-2002
			NO 20015481	A 11-01-2002
			NO 20015506	A 09-01-2002
			US 2003191052	A1 09-10-2003
			US 6562784	B1 13-05-2003
WO 0205833	A	24-01-2002	AU 7841601	A 30-01-2002
			WO 0205833	A1 24-01-2002
			EP 1303288	A1 23-04-2003

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ, EC,EE,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,M W,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

专利名称(译)	用于免疫化学测定甘露聚糖结合凝集素 (MBL) 的组合物 , 方法和试剂盒		
公开(公告)号	JP2005523435A	公开(公告)日	2005-08-04
申请号	JP2003584730	申请日	2003-04-16
申请(专利权)人(译)	安特车身车间ER / ES		
[标]发明人	ウッテンタールラルスオットー		
发明人	ウッテンタール, ラルス, オットー		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 C12P21/08 G01N33/577 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/68 C07K16/18 Y10S435/81 Y10S435/96 Y10S435/975		
FI分类号	G01N33/53.V C07K16/18 G01N33/577.B C12P21/08		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72		
优先权	60/373754 2002-04-18 US 10/170317 2002-06-12 US		
其他公开文献	JP2005523435A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了各种抗体，其对于结合抗甘露聚糖或MBL的抗体的结构正常或异常MBL具有不同的结合特性。选择具有不同结合特性的MBL抗体的方法和使用这些抗体选择能够结合样品中甘露聚糖的MBL或测量通常寡聚化和异常的MBL的方法还提供了用于测量低聚化的MBL的方法和试剂盒。该方法和试剂盒可用于诊断对感染性和自身免疫性疾病及其恶化的易感性增加。

		(43) 公表日 平成17年08月	
(51) Int. Cl. ⁷	F I		テーマコー
G01N 33/53	G O 1 N 33/53	V	4 B O 6 4
C07K 16/18	C O 7 K 16/18		4 H O 4 5
G01N 33/577	G O 1 N 33/577	B	
// C12P 21/08	C 1 2 P 21/08		
審査請求 未請求 予備審査請求 有			
(21) 出願番号	特願2003-584730 (P2003-584730)	(71) 出願人	504387344
(86) (22) 出願日	平成15年4月16日 (2003. 4. 16)		アンティボディーショップ
(85) 翻訳文提出日	平成16年12月17日 (2004. 12. 17)		デンマーク王国 ディーケー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2003/004038		ゲントフテ、グルスバック
(87) 国際公開番号	W02003/087838	(74) 代理人	100102842
(87) 国際公開日	平成15年10月23日 (2003. 10. 23)		弁理士 葛和 清司
(31) 優先権主張番号	60/373, 754	(72) 発明者	ウッテンタール, ラルス,
(32) 優先日	平成14年4月18日 (2002. 4. 18)		デンマーク王国 ディーケー
(33) 優先権主張国	米国 (US)		コペンハーゲン イースト、
(31) 優先権主張番号	10/170, 317		イチ、オーステルプロガー
(32) 優先日	平成14年6月12日 (2002. 6. 12)	F ターム (参考)	4B064 AG27 CA10 CA20
(33) 優先権主張国	米国 (US)		DA01 DA13
			4H045 AA11 AA30 CA40
			EA50 FA72