

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6329127号
(P6329127)

(45) 発行日 平成30年5月23日 (2018. 5. 23)

(24) 登録日 平成30年4月27日 (2018. 4. 27)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/53 (2006. 01)
CO 7 K 16/18 (2006. 01)
CO 7 K 7/08 (2006. 01)
CO 7 K 14/47 (2006. 01)

GO 1 N 33/53 V
CO 7 K 16/18 Z N A
CO 7 K 7/08
CO 7 K 14/47

請求項の数 13 (全 23 頁)

(21) 出願番号 特願2015-505033 (P2015-505033)
(86) (22) 出願日 平成25年4月11日 (2013. 4. 11)
(65) 公表番号 特表2015-514986 (P2015-514986A)
(43) 公表日 平成27年5月21日 (2015. 5. 21)
(86) 国際出願番号 PCT/IB2013/001164
(87) 国際公開番号 W02013/153457
(87) 国際公開日 平成25年10月17日 (2013. 10. 17)
審査請求日 平成28年2月10日 (2016. 2. 10)
(31) 優先権主張番号 13/506, 357
(32) 優先日 平成24年4月13日 (2012. 4. 13)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 514258823
ブレディクション ビオシアンズ ソシエ
テ パ アクシオンス シンプリフィエ
フランス国, エフ-69008 リヨン,
アブニュ ロックフェラー 60
(74) 代理人 100099759
弁理士 青木 篤
(74) 代理人 100077517
弁理士 石田 敬
(74) 代理人 100087871
弁理士 福本 積
(74) 代理人 100087413
弁理士 古賀 哲次
(74) 代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞フィブロネクチンについての迅速な検査

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト検査被験者から採取した検査試料中のヒト細胞フィブロネクチン (c - F n) のレベルを 60 分以内で決定する、ヒト検査被験者における出血を予測するための迅速なアッセイであって、

前記検査試料は、全血、血清、および血漿試料からなる群から選択され、

前記アッセイは、以下の工程を含み：

(a) ヒト検査被験者から得られた検査試料を抗体および標準エピトープと混合すること、

ここで、前記抗体は、単離したヒトモノクローナル抗体、もしくはその抗原結合部分、または抗体およびその抗原結合部分の両方であり、前記抗体は、血漿フィブロネクチンに対する親和性よりも少なくとも 100 倍を超える親和性を持って c - F n に結合し、当該抗体は、c - F n 分子のアミノ酸配列 1631 - 1721 (「EDA 領域」) に結合する、

ここで、前記標準エピトープは

左から右にアミノ末端からカルボキシ末端の方向で、

i) D G E E D T A E L Q G L R P G S E C (配列番号 1)、

i i) E S P Q G Q V S R Y R V T Y S S P E D C (配列番号 2)、

i i i) H D D M E S Q P L I G T Q S C (配列番号 3)、

および

10

20

i v) N I D R P K G L A F T D V D V D S I K I A W E S P Q G Q V S R Y R V T
Y S S P E D G I H E L F P A P D G E E D T A E L Q G L R P G S E Y T V S V V A L
H D D M E S Q P L I G T Q S T A (配列番号 4)

からなる群より選択されるアミノ酸配列から成る合成ポリペプチドであり；

ここで、(1) 前記抗体もしくはその抗原結合部分は磁性粒子に結合し、かつ前記標準エピトープは標識されている、又は(2) 前記標準エピトープは磁性粒子に結合し、かつ前記抗体もしくはその抗原結合部分は標識されており、

ここで、前記アッセイは、前記抗体が、前記検査試料において c - F n 分子の E D A 領域又は標準エピトープと免疫反応するために固体マトリクスに固定されることを必要とせず、

10

ここで、前記抗体が E D A 領域及び標準エピトープに結合する場合、前記アッセイは、検査試料の c - F n 抗原の E D A 領域が前記抗体上の結合部位をめぐり標識エピトープと競合する競合アッセイである；

(b) その後、前記抗体と、前記検査試料の c - F n の E D A 領域又は i)、i i)、i i i)、もしくは i v) の標準エピトープのいずれかとの複合体を形成し、磁性粒子に結合した標識エピトープもしくは磁性粒子に結合したその標識抗原結合部位の量を測定すること、

ここで、結合した標識抗原または結合した標識エピトープの量が、前記検査試料中のヒト細胞フィブロネクチンの量に逆相関し、前記ヒト検査被験者における出血の予測因子となり、

20

ここで、前記得る、混合する、形成するおよび測定する工程は、60分以内に起こる、前記アッセイ。

【請求項 2】

前記検査試料の E D A 領域又は i)、i i)、i i i)、もしくは i v) の標識標準エピトープのいずれかと結合した標識抗体の量を 20 分以内で決定する、請求項 1 に記載の迅速なアッセイ。

【請求項 3】

前記被験者は、神経系疾患を有する、請求項 1 に記載の迅速なアッセイ。

【請求項 4】

前記検査被験者はアルツハイマー病又はパーキンソン病を有する、請求項 1 に記載の迅速なアッセイ。

30

【請求項 5】

前記アッセイは、液体媒体中を自由に流動する常磁性ビーズを用いる流体アッセイである、請求項 1 に記載の迅速なアッセイ。

【請求項 6】

前記単離したヒトモノクローナル抗体は I S T - 9 もしくは I S T - 9 の抗原結合部分、または I S T - 9 およびその抗原結合部分の両方である、請求項 1 に記載の迅速なアッセイ。

【請求項 7】

前記検査試料中において c - F n は 0 ~ 20 mg / ml の範囲内にあると決定される、請求項 1 に記載の迅速なアッセイ。

40

【請求項 8】

ヒト検査被験者から採取した検査試料中のヒト細胞フィブロネクチン (c - F n) のレベルを 60 分以内で決定する、ヒト検査被験者における出血を予測するための迅速なアッセイであって、

前記検査試料は、全血、血清、および血漿試料からなる群から選択され、

前記アッセイは、以下の工程を含み：

ヒト検査被験者から得られた検査試料を単離したヒトモノクローナル抗体、もしくはその抗原結合部分、または当該抗体およびその抗原結合部分の両方と混合すること、ここで、当該抗体および/またはその抗原結合部分は、血漿フィブロネクチンに対する親和性よ

50

りも少なくとも100倍を超える親和性を持ってc-Fnに結合し、当該抗体および/またはその抗原結合部分(「捕捉抗体」)は、左から右にアミノ末端からカルボキシ末端の方向で、

i) D G E E D T A E L Q G L R P G S E C (配列番号1)、

ii) E S P Q G Q V S R Y R V T Y S S P E D C (配列番号2)、

iii) H D D M E S Q P L I G T Q S C (配列番号3)、

および

iv) N I D R P K G L A F T D V D V D S I K I A W E S P Q G Q V S R Y R V T Y S S P E D G I H E L F P A P D G E E D T A E L Q G L R P G S E Y T V S V V A L H D D M E S Q P L I G T Q S T A (配列番号4)

10

からなる群より選択されるアミノ酸配列に結合し、

その後、前記捕捉抗体と前記検査試料のc-Fnとの複合体を形成し、当該複合体を、前記捕捉抗体に結合するコーティングされた常磁性粒子と混合し、そして前記検査試料における複合体を検出すること；

ここで、前記アッセイは、前記捕捉抗体が、前記検査試料においてc-Fn分子と免疫反応するために固体マトリクスに固定されることを必要とせず、

ここで、前記検査試料中の複合体の量が前記検査試料中のc-Fnレベルを示し、これが前記ヒト検査被験者における出血の予測因子となり、

ここで、前記得る、混合する、形成するおよび測定する工程は、60分以内に起こる、前記アッセイ。

20

【請求項9】

前記抗体は標識されている、請求項1に記載の迅速なアッセイ。

【請求項10】

前記捕捉抗体と前記検査試料のc-Fnとの複合体は、当該複合体に結合した標識抗体の量を検出することによりサンドイッチアッセイで検出される、請求項9に記載の迅速なアッセイ。

【請求項11】

前記標識抗体は前記捕捉抗体またはc-Fnに結合する、請求項10に記載の迅速なアッセイ。

【請求項12】

30

ヒト検査被験者から採取した検査試料中のヒト細胞フィブロネクチン(c-Fn)のレベルを60分以内に決定する、ヒト検査被験者における出血を予測するための迅速なアッセイであって、

前記検査試料は、全血、血清、および血漿試料からなる群から選択され、

前記アッセイは、以下の工程を含み：

(a) ヒト検査被験者から得られた検査試料を抗体および標準エピトープと混合すること、

ここで、前記抗体は、単離したヒトモノクローナル抗体、もしくはその抗原結合部分、または抗体およびその抗原結合部分の両方であり、前記抗体は、血漿フィブロネクチンに対する親和性よりも少なくとも100倍を超える親和性を持ってc-Fnに結合し、当該抗体は、c-Fn分子のアミノ酸配列1631-1721(「EDA領域」)に結合し、かつ標準エピトープに結合し、

40

ここで、前記標準エピトープは

左から右にアミノ末端からカルボキシ末端の方向で、

T Y S S P E D G I H E L F P A P D G E E D T A E L Q G C (配列番号5)のアミノ酸配列から成る合成ポリペプチドであり；

ここで、前記アッセイは、前記抗体が、前記検査試料においてc-Fn分子のEDA領域または標識エピトープと免疫反応するために固体マトリクスに固定されることを必要とせず、

ここで、前記アッセイは、検査試料のc-Fn抗原のEDA領域が前記抗体上の結合部

50

位をめぐり標識エピトープと競合する競合アッセイである；

(b) 前記抗体と、前記 c - F n の E D A 領域または標準エピトープのいずれかとの複合体を形成すること；および、

(c) 磁性粒子に結合した標識エピトープまたは磁性粒子に結合した標識抗体もしくはその標識抗原結合部位の量を測定すること、

ここで、磁性粒子に結合した標識抗原もしくは標識エピトープの量が、前記検査試料中のヒト細胞フィブロネクチンの量に逆相関し、前記ヒト検査被験者における出血の予測因子となり、

ここで、前記得る、混合する、形成するおよび測定する工程は、60分以内に起こる、前記アッセイ。

10

【請求項13】

ヒト検査被験者から採取した検査試料中のヒト細胞フィブロネクチン(c - F n)のレベルを60分以内に決定する、ヒト検査被験者における出血を予測するための迅速なアッセイであって、

前記検査試料は、全血、血清、および血漿試料からなる群から選択され、

前記アッセイは、以下の工程を含み：

(a) ヒト検査被験者から得られた検査試料を単離したヒトモノクローナル抗体、もしくはその抗原結合部分、または当該抗体およびその抗原結合部分の両方と混合すること、ここで、当該抗体および/またはその抗原結合部分は、血漿フィブロネクチンに対する親和性よりも少なくとも100倍を超える親和性を持ってc - F nに結合し、当該抗体および/またはその抗原結合部分(「捕捉抗体」)は、

20

左から右にアミノ末端からカルボキシ末端の方向で、

T Y S S P E D G I H E L F P A P D G E E D T A E L Q G C (配列番号5)から成るアミノ酸配列に結合する；

(b) その後、前記捕捉抗体と前記検査試料のc - F nとの複合体を形成すること；および、

(c) 前記検査試料中における複合体を検出すること；

ここで、前記アッセイは、前記捕捉抗体が、前記検査試料においてc - F n分子と免疫反応するために固体マトリクスに固定されることを必要とせず、

ここで、前記検査試料中の複合体の量が前記検査試料中のc - F nレベルを示し、これが前記ヒト検査被験者における出血の予測因子となり、

30

ここで、前記得る、混合する、形成するおよび測定する工程は、60分以内に起こる、前記アッセイ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、米国仮特許出願第60/505,606号および第60/556,411号に基づく米国実用特許第7,634,360号の一部継続出願である米国実用特許第7,392,140号の一部継続出願である米国実用特許出願第11/890,134号の一部継続出願である。これらの出願の全ての内容は、本明細書の全ての表、図面、および特許請求の範囲を含め、全体が本願に組み込まれる。

40

【0002】

本発明は、一般に、ヒトの体内に入る治療薬または装置、特に、心血管系または神経系疾患を治療するために設計された治療薬または装置、による出血事象を予測する迅速な検査に関する。

【0003】

様々な態様において、本発明は、特に、(1)ヒトの血液または血漿における細胞フィブロネクチンのレベルを検出するための迅速なアッセイの構築方法；(2)治療前に、患者内の出血事象および/または脳内出血(ICH)を予測するための、当該迅速なアッセ

50

イの使用；（３）当該迅速なアッセイに使用するための抗体；ならびに、（４）細胞フィブロネクチンを検出するための、当該迅速なアッセイについての異なるアッセイ様式に関する。

【背景技術】

【０００４】

以下の背景技術に関する説明は、単に読者が本発明を理解する助けとなるべく提供されており、本発明の先行技術を記述または構成すると認めるわけではない。

【０００５】

診断アッセイは、医療および研究分野において、生体液および組織試料中の様々な構成成分、例えば、薬物、ホルモン、酵素、タンパク質、抗体、および感染因子などを検出するための不可欠の一助となっている。数多くのこれらのアッセイの操作の基礎となる基本原理は、２つ以上の成分の間で起こる特異的な認識および結合反応であり、ここで形成される複合体を後で検出できる。通常は、流体検査試料（例えば、全血、血漿、血清、尿、唾液など）中の対象の標的検体（例えばリガンド）を特異的に認識し結合する捕捉試薬（例えば、受容体）を成分中に含む。また、捕捉試薬と複合体を形成する任意の検体を認識して結合し、視覚により検出可能な指示薬も反応中に含んでおり、この指示薬が、陽性反応が起こったことを示す信号を生成する。特に、免疫学的アッセイは、抗体認識および抗原に対する選択的結合反応に基づいて機能するように設計されており、長年にわたって数多くの疾患状態の検出用の臨床用途において非常に価値あることが証明されている。

【０００６】

フィブロネクチンは、血漿中、細胞表面上、および細胞外マトリックス中に見られる大きな糖タンパク質である。フィブロネクチンは、細胞のみならず他の高分子にも結合するので、細胞を基質に固定するのを促進するのに役立つ。Cochrane et al., J. Clin. Invest. 1: 754 - 61 (1983); Hynes et al., J. Cell Biol. 5: 369 - 77 (1982)。フィブロネクチンは、可変一次構造のサブユニット [平均相対分子量 250 キロダルトン (kDa)] で構成され、それらサブユニットがジスルフィド結合により二量体または多量体を形成する。Hynes, in Cell Biology of the Extracellular Matrix, Hay ed., Plenum Press, pages 295 - 334 (1982); Hynes, et al., Cell Biol. 95: 369 - 77 (1982); Ruoslahti et al. Meth. Enzy. 82: 803 - 30 (1982); Schwarzbauer et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 1424 - 28; Kornblihtt et al. EMBO J., 4 (7): 1755 - 59 (1985)。血漿フィブロネクチン (p-Fn) は、肝細胞が分泌するのに対し、細胞フィブロネクチン (c-Fn) は、内皮細胞および線維芽細胞を含む様々な培養細胞が分泌する。Tamkun et al. J. Biol. Chem. 58 (7): 4641 - 47; Jaffe et al. J. Exp. Med. 147: 1779 - 91 (1978); Birdwell, et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 97 (2): 574 - 8 (1980)。

【０００７】

フィブロネクチンは、生体内の傷害および炎症部位に蓄積し [Pettersson et al., Clin. Immunol. Immunopath. 11: 425 - 436 (1978); Grinnell et al. J. Invest. Derm. 76: 181 - 189 (1981); Repesh et al. J. Histochem. Cytochem. 30 (4): 351 - 58 (1982); Torikata et al., Lab. Invest. 52 (4): 399 - 408 (1985); Carsons et al. Arth. Rheum. 24 (10): 1261 - 67 (1981)]、これらの部位における血管壁内の細胞によって産生される。Clark et al., J. Exp. Med. 156: 646 - 51 (1982); Clark et al.,

10

20

30

40

50

J. Immunol. 126(2):787-93(1981); Clark et al., J. Invest. Derm. 79:269-76(1982); Clark et al., J. Clin. Invest. 74:1011-16(1984)。

【0008】

本発明は、新規な合成ポリペプチドの細胞フィブロネクチン(c-Fn)の迅速な検出への使用に関する。Peters, et al. は、米国特許第4,980,279号において、ポリペプチド配列が、左から右にアミノ末端からカルボキシ末端の方向で、ELFPAPDGEEDTAELQGCGおよびTYS SPEDGIHELFPAPDGEEDTAELQGCGである合成ポリペプチド、抗体、そしてこれらを細胞フィブロネクチンに使用する方法について記載している。同著者らはさらに、正常なヒト血液に含まれるc-FNは微量だが、血管炎を伴う膠原病の患者の血液ではc-Fnレベルが著しく上昇していることを実証した[Am. Rev. Respir. Dis., 138, 167-174(1988); J. Lab. Clin. Med., 113(5), 586-597(1989)]。

10

【0009】

この研究に続き、幾人かの著者が、さらに、様々な疾患過程におけるc-Fnの役割を示唆している。Senyei, et al. は、米国特許第5,079,171号において子癰前症におけるc-Fnの役割について記載している。Kanters, et al. は、糖尿病におけるc-Fnの役割について記載している[Diabetes Care February 2001 vol. 24 no. 2 323-327]。Castellanos et al. は、出血性変化の予測におけるc-Fnの役割について記載している[Stroke. 2004; 35:1671-1676]。最後に、米国特許出願第11/890,134号において、本発明の発明者であるDiamond et al. は、心筋梗塞後の心血管系の大出血の予測におけるc-Fnの役割を実証した。

20

【0010】

ELISAベースのアッセイが、細胞の生体液を検出および測定するために開発されてきたが、これらの方法では実用的な臨床診断で使用するのに時間がかかりすぎる。したがって、c-Fnを検出および測定するより良い方法が必要である。

【0011】

疾病管理を決定するためにc-Fnの使用を示唆する従前からのデータにもかかわらず、本発明までは、ヘルスケアにおけるc-Fnの役割は研究用のみに限定されていた。というのは、迅速、効率的、かつ正確に、ヒト試料中のc-Fnのレベルを測定するためのアッセイが作成されなかったからである。BioHit OyのELISAキットのような従来から作成されているアッセイは、(1)ヒト血漿試料においてc-Fnが変動する全範囲(0~20mg/ml)と比較して狭い範囲(1~3mg/ml)での反応についてのみ直線的である、(2)実施するのに特別な訓練を要する、そして(3)結果を得るのに数時間が必要である。狭い範囲で直線的であるということは、単に準最適であるのみならず、出血の予測におけるc-Fn変動の測定に全く不適切であるということである。というのは、アッセイが不適切となるこのような高濃度の血漿c-Fnの範囲それぞれが将来の出血リスクが高いことを示唆するからである。簡単に言えば、従来のアッセイは、(1)脳卒中発症後のように、今すぐにでも起こりかねない出血リスクを迅速に決定することが今後の医療介入計画に欠かせないとき、許容できないほど遅い；そして(2)高いc-Fn濃度、つまり出血を予測するのに医学的に一番重要なc-Fn濃度の範囲において効果がない、という2つの問題がある。

30

40

【0012】

対照的に、本発明は、(1)特に、高c-Fn濃度を含む、対象の全範囲にわたる血漿c-Fn濃度について、定量的な尺度を与える抗体および方法を提供し、そして、(2)治療上の意思決定を迅速にしなければならない(さもなくば、負の結果が避けられない)脳卒中などの多くの場合において迅速な検査の実施が必須である、患者のポイントオブケ

50

アが、20分未満で特別な訓練なしに臨床医によって実施可能になるものとして理解されるであろう。

【発明の概要】

【0013】

本発明は、ヒト被験者における出血を予測するための装置に関する。この装置は、ヒト細胞フィブロネクチンを迅速に検出するためのアッセイである。好ましいアッセイは、例えば20分未満といった迅速なアッセイを実施できるものである。また、当該装置またはアッセイは、先に記載のような将来の出血を予測するために重要なc-Fn濃度の全範囲にわたって有効である。

【0014】

本発明の別の態様は、そのような迅速なアッセイの存在を可能にする合成ポリペプチドから誘導される抗体に関する。これらの抗体は、本発明の合成ポリペプチドおよび変性ヒト細胞フィブロネクチンと免疫反応する、そして、好ましくは、天然非変性ヒト細胞フィブロネクチンとも免疫反応するが、変性または天然のいずれの状態のヒト血漿フィブロネクチンとは実質的に免疫反応しない。抗体は、宿主動物の血清中に存在可能で、また、宿主の血清タンパク質、ポリペプチド、および細胞破片を実質的に含まない、実質的に純粋な形態であり得る。特に好ましい合成ポリペプチドは、左から右にアミノ末端からカルボキシ末端の方向で、サブ配列：a) D G E E D T A E L Q G L R P G S E C ; b) E S P Q G Q V S R Y R V T Y S S P E D C ; および c) H D D M E S Q P L I G T Q S C ; ならびに配列：N I D R P K G L A F T D V D V D S I K I A W E S P Q G Q V S R Y R V T Y S S P E D G I H E L F P A P D G E E D T A E L Q G L R P G S E Y T V S V V A L H D D M E S Q P L I G T Q S T A からなる群のうち1つまたは複数の配列を有する。

【0015】

本発明のさらに別の態様は、本発明の抗ポリペプチド抗体が、血液、血漿、または他の体液試料と免疫反応するために固体マトリクスに固定されることを必要としないアッセイ方法に関する。このアッセイ方法の一つの変形では、濃度が未知の細胞フィブロネクチンを有する試料を、過剰量の捕捉抗体および標識抗体と混合する。混合物を指定時間インキュベートして、両方の抗体をサンドイッチ様式で細胞フィブロネクチンに結合させる。次いで、混合物をコーティングされた常磁性粒子と接触させる。常磁性粒子は、捕捉抗体（したがって細胞フィブロネクチン）に結合する。結合していない抗体を除去するための洗浄において、常磁性粒子は、磁場のため、結合しサンドイッチされあた細胞フィブロネクチンとともに、固定された位置で保持される。最後に、標識抗体と反応し、試料中の細胞フィブロネクチン濃度と正比例する光を放出する基質溶液を加える。

【0016】

このアッセイ方法の別の変形では、患者試料中の抗原は、磁性粒子に結合した抗体上の結合部位をめぐり、標識抗原と競合する。前記試料中の抗原は、細胞フィブロネクチンの標識抗体上の結合部位をめぐり、磁性粒子に結合した抗原と競合する。この方法では、細胞フィブロネクチンレベルが、患者試料中の抗原の量に逆相関する。抗原の量は、標識抗体を調べることにより決定される。

【0017】

本発明は、いくつかの利益および利点を提供する。

【0018】

一つの利点は、患者のヒト細胞フィブロネクチンのレベルが、迅速な時間規模、しばしば20分未満、で評価できるということであり、これにより臨床医が急性の神経系または心血管系の事象に対する治療についての判断ができるようになる。

【0019】

別の利点は、細胞フィブロネクチンのレベルを患者のポイントオブケアで決定できることである。

【0020】

さらに別の利点は、細胞フィブロネクチンのレベルを、「ワンタッチ」のポイントオブ

10

20

30

40

50

ケア装置により自動化された方法で測定できることであり；このような装置は、最小限の技術訓練を受けた者でも使用可能である。必要なのは、患者試料を抽出し、事前に組み立てたポーチまたはカートリッジに小分けして配置することのみである。

【 0 0 2 1 】

さらにまた別の利点は、患者が将来心血管系または神経系疾患に対する治療または外科的処置を受ける場合に、当該心血管系または神経系疾患の治療または外科的処置を行う前に患者の出血を予測することである。

【 0 0 2 2 】

本発明のさらなる利益および利点は、以下の発明の詳細な説明から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 3 】

以下、図面について説明する。

【 0 0 2 4 】

【図 1】図 1 は、競合方法およびサンドイッチ方法の 2 つのアッセイ様式のイラストである。これら両者を、迅速なアッセイの開発において検討した。

【 0 0 2 5 】

【図 2】図 2 は、本発明の実施に使用した原材料を示す。

【 0 0 2 6 】

【図 3】図 3 は、実施例 I で参照した表 1 ~ 2 を示す。

【 0 0 2 7 】

【図 4】図 4 は、実施例 I で参照した表 3 ~ 4 を示す。

【 0 0 2 8 】

【図 5】図 5 は、実施例 I で参照した表 5 ~ 6 を示す。

【 0 0 2 9 】

【図 6】図 6 は、実施例 I で参照した表 7 を示す。

【 0 0 3 0 】

【図 7】図 7 は、実施例 I で参照した表 8 ~ 10 を示す。

【 0 0 3 1 】

【図 8】図 8 は、実施例 I で参照した表 11 ~ 13 を示す。

【 0 0 3 2 】

【図 9】図 9 は、実施例 I で参照した置換曲線 (displacement curve) のグラフを示す。

【 0 0 3 3 】

【図 10】図 10 は、実施例 I I で参照したシグナルインキュベーション時間のグラフであり、血漿中 c - F n の測定可能値が 15 分未満で得られることを示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 4 】

1. 定義

本明細書で使用する場合、用語「抗体」は、特に明記しない限り、抗体の断片または部分（これらの断片または部分が特定されているか否かにかかわらず）、そして一本鎖形態を含む。あるタンパク質が特異的または優先的に c - F n 分子の E D A 領域と結合する能力を保持し、かつ本明細書に開示の 1 つまたは複数の配列を含む限り、そのタンパク質は、用語「抗体」に含まれる。抗体は、例えば、任意の真核生物、原核生物、またはファージクローン等の単一コピー又はクローン由来であってもよい。好ましくは、本発明の抗体は、均一または実質的に均一な集団内に存在する。抗体は、F c 領域を含むインタクトで完全または完全長の定常領域を含んでいてもよく、あるいは任意の短縮形態が抗原結合部分を含みかつ抗原結合能力を保持するように設けられた抗体の部分または断片を含むものであってもよい。このような短縮形態としては、例えば、開示された抗 c - F n の抗体の C D R または可変領域を含む F a b 断片、F a b ' 断片、または F (a b ') 2 断片が挙

10

20

30

40

50

げられる。さらに、そのような短縮抗体の形態は、LCVR及びHCVRをコードするDNAをリンカー配列でつなげることにより作成できる一本鎖Fv断片であってもよい(Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, N.Y., pp 269-315, 1994参照)。本発明の抗体は、当該技術分野において周知の技術、例えば、組換え技術、ファージディスプレイ技術、合成技術、またはこれらの技術と当該技術分野において容易に思いつく他の技術の組み合わせ、を用いて製造することができる。

【0035】

本発明で使用する場合、用語「抗原」は、天然か合成にかかわらず、検体抗体が特異的に反応する対象である抗原決定基を指す。合成抗原には、従来の化学合成によって構築されたもの、ならびに組換えDNA技術によって構築されたものが含まれる。抗原材料はまた、本発明に従い、コロイド粒子、蛍光マーカー、または化学発光粒子で標識してもよく、抗体検体を検出するためのサンドイッチ型アッセイ、または抗原検体を検出するための競合アッセイで用いてもよい。

10

【0036】

本明細書で使用する場合、用語「標識」は、特定の結合物質に結合または結合体を形成して信号を生成可能な任意の分子、粒子、あるいは一般的なマーカータンパク質を指す。また、標識は、一般的なマーカータンパク質と結合した酵素と反応すると、視覚により検出可能なシグナルを生成できる基質をも含み得る。一実施形態では、標識は好ましくは補助試薬を添加することなく検出可能なシグナルを自発的に生成可能であり、かつ機器の助けを借りずに視覚的手段によって容易に検出される「直接」標識である。例えば、コロイド金粒子が、標識として使用できる。他の適切な標識としては、他の種類のコロイド金属粒子、染料ゾルなどの微小着色粒子、着色ラテックス粒子が挙げられる。多くのこのような物質が、当業者に周知であろう。

20

【0037】

用語「ヒト改変抗体」は、ヒトゲノム配列に由来するフレームワーク領域および定常領域と同一であるか又は実質的に同一（実質的にヒト由来）のフレームワーク領域、ヒンジ領域、および定常領域を有する抗体を指す。完全なヒトのフレームワーク領域、ヒンジ領域、および定常領域は、ヒト生殖細胞系列の配列ならびに自然発生的な体細胞変異を有する配列の領域のことである。ヒト改変抗体は、完全なヒトのフレームワーク領域、ヒンジ領域、または定常領域由来であって、その中に1つまたは複数のアミノ酸の置換、欠失、または付加を含むフレームワーク領域、ヒンジ領域、または定常領域を含むものでもよい。しばしば、ヒト改変抗体は、好ましくは、ヒトにおいて実質的に非免疫原性である。

30

【0038】

用語「予測」は、本明細書では、投与または外科的手技による治療後、患者が1つの薬物または複数の薬物のセットに対し有利又は不利のいずれに作用する可能性があるのか、そしてその作用はどの程度なのか、あるいは患者が生存する可能性を示すために使用する。本発明の予測方法は、患者が治療レジメンまたは外科的介入に対し出血の副作用を被る可能性があるか否かを予測するのに貴重なツールである。

40

【0039】

本明細書で使用する場合、用語「迅速なアッセイ」は、60分未満、好ましくは20分未満で実施可能なアッセイを指す。

【0040】

本明細書で使用する場合、用語「治療」は、医学的または外科的手段を介して患者を管理することと定義する。治療は、医学的状态または疾患の少なくとも1つの症状を改善または軽減するものであり、治癒をもたらすことが必要というわけではない。本明細書で使用する場合、用語「治療転帰」とは、治療した患者に対する物理的な効果のことである。

【0041】

本明細書で使用する場合、用語「試料」は、ヒト患者由来の体液、最も好ましくは、全

50

血、血漿、または血清、を含む患者試料を指す。

【 0 0 4 2 】

2 . 詳細な説明

2 . 1 抗体 (a b) の開発および評価

我々は、いくつかの抗体開発方法を使用した。我々が試みた最初の 2 つの方法では、スクリーニング対象の抗原を認識可能な抗体が得られたが、しかしこれらの抗体の c - F n 分子全体に対する親和性は弱く、c - F n 分子全体を認識することはできなかった。追加として 3 つの方法を試みた。5 つの異なる抗体開発手法を、抗体を生成するのに使用した抗原と共に、以下記載する。

【 0 0 4 3 】

使用した方法は以下の通りである：

- ペプチド A 1 を使用した A B D S e r o t e c H U C A L ライブラリのパニング
- p - F n 分子全体への結合に対してネガティブスクリーニングした、c - F n 分子全体に対するマウスの標準的な免疫法
- 完全 E D - A 領域を使用した A B D S e r o t e c H U C A L ライブラリのパニング
- 3 種ペプチド混合物 (B 1 , B 2 , B 3) に対するマウスの標準的な免疫法
- ペプチド A 2 および完全 E D - A 領域に対するマウスの標準的な免疫法

【 0 0 4 4 】

A b 陽性だと、c - F n 分子全体へは強い正の結合を示し、p - F n への結合はゼロということになる。最終的に 4 個のクローンがこの基準を満たしたので選択し、市販の I S T - 9 A b と共に、精製および継続的な検査に用いた。

【 0 0 4 5 】

抗 c - F N 抗体の通過スクリーニング (p a s s i n g s c r e e n i n g) は、以下を用いた：

- P 4 F 6
- P 3 A 3
- P 1 H 1 1
- 1 9 B 1 2 - 3 H 5
- 市販の I S T - 9

【 0 0 4 6 】

広範な親和性検査の後、3 つの捕捉抗体：a) 抗ペプチド P 3 A 3 ; b) 抗ペプチド P 4 F 6 ; および、c) 市販の抗 c - F N クローン I S T - 9 (マイクロプレート上にさまざまな条件でコーティングした) について、捕捉抗体としての評価を、ウサギ抗フィブロネクチン検出システムを用いて行った。現在、B I O F I I T 製の市販 c - F n E L I S A キットが 1 つ存在するが、そのアッセイ結果は、直線範囲、正確性、対照、および試料培地について多くの制限事項があった。よって、正確な E L I S A キットの開発は、最終的に迅速な免疫アッセイに関し重要度が高い。

【 0 0 4 7 】

全体的な検査の結果により、P 4 F 6 捕捉抗体は、ウサギ抗フィブロネクチンを捕捉したことが実証され、最適な組み合わせとしての二次抗体は、1) c - F n に特異性があり、かつフィブロネクチンと交差反応性がないこと、2) ゼロ標準で低いバックグラウンドを有すること、並びに 3) 適切なスパイクおよび回復値を有することがわかった。

【 0 0 4 8 】

最初の検査により、記載の抗体ペアは、我々の基準範囲である 0、0 . 1 0 ~ 2 0 . 0 u g / m L において許容できる結果；1) ゼロと低基準との間を許容可能な程度に識別できること (感度) ；2) c - F n を認識するが、フィブロネクチンと交差反応性がないこと；そして、3) P 4 F 6 が、血清および血漿の両方における c - F n を認識できること、をもたらしたことを実証した。

【 0 0 4 9 】

10

20

30

40

50

我々は、かなり多くの検査をして、条件およびバッファーを最適化し、様々な血液、血清、血漿マトリックスにおいて許容範囲以上のスパイクおよび回収率について、標準及び試料の両方で一貫した%CVを得ることができた。このプロセスの結果として、我々は対照を標準化し、直線性と正確性の両方で現在市販のBiohit製のキットよりも優れたc-Fn ELISAキットを作成することができた。

【0050】

POCプラットフォーム特有の性質および構成成分の適合性検査

2つの重要な理由のため、c-Fnに対して質の高い抗体を得るのは非常に困難である。c-Fnには存在するがp-Fnには存在しないED-A領域は、抗体結合にとって非常にありふれた領域というわけではない。加えて、このように結合のための領域が小さいので、c-Fnのみに特異的に高い親和性を有する抗体ペアを取得することが不可能である。よって、ELISAシステムにおける抗体の一つは、非特異的であろうと思われる。さらに、我々は、凍結融解サイクルで、c-fnが急速に劣化し、および/または、急速にED-A抗原性を失うことを発見した。

【0051】

ペアとして結合する2つの独立したc-Fn特異的モノクローナル抗体を取得することができないと、血液中のp-FNの存在量が多いために重大な問題となる。p-FNの存在量は100倍多いので、二次抗体を排除してしまい、このシステムでの検出の妨害となるだろう。これは、非特異的な抗体を用いる前に全ての未結合のp-Fnを取り除く洗浄工程によるものであり、ELISAの問題ではない。したがって、これらの理由から、我々は本発明を実証する際のプラットフォームとしてQualigen社のFASTPACK (登録商標) IPシステムを選択した。

【0052】

「競合」および「サンドイッチ」型の化学発光アッセイは、両者とも、FASTPACK (登録商標) IPシステムで実行できる。このシステムは、注入ポートに取り付けられたフラットパッケージ内に6つの独立したチャンバーを有する。注入ポート内の血液/血清/血漿試料は、チャンバー1内に挿入される。サンドイッチアッセイでは、未知の検体濃度を有する試料を、過剰量の捕捉抗体および標識抗体と混合する。(チャンバー2において)混合物を指定時間インキュベートして、両方の抗体をサンドイッチ様式で検体に結合させる。次いで、混合物を、コーティング済みの常磁性粒子と接触させる。常磁性粒子が捕捉抗体(加えて、つまり検体)に結合する。この分析装置は、(チャンバー4から)繰り返しの洗浄中に、サンドイッチされた検体を付けたまま常磁性粒子を保持するため小さな磁石を使用する。洗浄により、全ての未結合の抗体を廃棄チャンバー(チャンバー5)に除去する(全てチャンバー3で行う)。最後に、(チャンバー6から出る)基質溶液を加え、この溶液が標識抗体と反応して発光し、この光が試料中の検体濃度に正比例する(全てチャンバー3で行う)。

【0053】

FASTPACK (登録商標) IPシステムは流体用の検査であるため、我々の抗体を検査するのに物理的な媒体(すなわち試料パッド、結合パッド、および側方流動ストリップ)は用いず、用いたのはプラスチック袋および化学発光試薬のみであった。

【0054】

c-Fn分子の安定性の問題を克服するために、我々はc-Fn対照および標準物質を凍結乾燥させた。次に、広範な安定性試験および溶液中においてそれらを比較検査したところ、凍結乾燥した対照は安定であったという結論になった。最終的に我々のELISAおよび迅速なアッセイの流通および利用に際し、これらは新鮮な状態で再構成されることだろう。

【0055】

3. 実施例

本発明は、以下の実施例に記載された特定の実施形態を参照してより良く理解されるであろう。

【 0 0 5 6 】

3 . 1 実施例 I

本実施例において、我々は、c - F n の迅速な検査用に競合アッセイ様式を実施した。開発において、2つの基本的な競合アッセイ様式を用いた。1つの形式（図1の画像d）では、「試料」中の抗原は、磁性粒子に結合した抗体上の結合部位をめぐり、標識抗原と競合する。類似の様式（図1の画像c）では、「試料」中の抗原は、標識抗体上の結合部位をめぐり、磁性粒子に結合した抗原と競合する。両方の様式において、アッセイ応答は、試料中の抗原の量に逆相関する。

【 0 0 5 7 】

材料および方法

10

原材料

材料を、図2aおよび図2bに示す。プライマーペプチドは、Affinity Life Sciences, Inc. から入手した。

【 0 0 5 8 】

ビオチンおよび結合方法

表1は、実施したビオチン化およびアルカリホスファターゼ結合をまとめたものである。c F n 抗原のビオチン化は、PEG 4 ビオチンを用い、抗原：ビオチンのモル比を1：5、1：10、1：20、および1：50にして実施した。P 4 F 6 抗体のビオチン化は、PEG 4 ビオチンを用い、抗体：ビオチン比を1：5および1：20にして実施した。P 1 H 1 およびP 3 A 3 のビオチン化は、抗体でPEG 4 ビオチンを用い、抗体：ビオチン比を1：20にして実施した。アルカリホスファターゼ結合は、SMCCおよびSPDPヘテロ二官能性試薬を利用した酵素 - 抗体結合についてQualigenプロトコルに従い酵素アルカリホスファターゼ（ALP）を用いて実施した。

20

【 0 0 5 9 】

FASTPACK（登録商標）試薬およびアッセイプロトコル

FASTPACK（登録商標）システムで使用する試薬パックを、フィラーIIに充填した。開発に際し、ビオチン化およびALP結合した試薬について複数の組み合わせを検査した。構成成分の概要は以下の通りである：

- ・ バッファー溶液中にALP結合体（抗原、ペプチドまたは抗体）を含む抗体溶液（100 μ L / pack）
- ・ 常磁性粒子（150 μ L / pack）：バッファー溶液中に、ビオチン化抗原、ビオチン化ペプチド、またはビオチン化抗体のいずれかを含む、ストレプトアビジンに結合（カップリング）した0.5 mg / mLのSpeedbead PMP（Seradyn）
- ・ 洗浄液（2.1 mL / pack）：洗浄剤入りトリスバッファー
- ・ 基質（140 μ L / pack）：Immuglow Plus

30

【 0 0 6 0 】

表2は、基本的なFASTPACK（登録商標）アッセイプロトコルをまとめたものである。見てわかるように、合計時間は完了まで約18分である。

【 0 0 6 1 】

開発および最適化試験

40

スクリーニング試験

抗原、ペプチド、および抗体スクリーニング

ビオチン化抗原、ペプチド、および抗体を、対応する抗体、抗原およびペプチドアルカリホスファターゼ（ALP）結合体とペアにして、最適なアッセイ性能を生みだすペアの組み合わせを決定した。表3は、開発において検査した、ビオチンと結合体のペアについて詳しく説明するものである。ペアは、最大アッセイ応答および既知のc F n濃度を有するスパイクした試料の%相対置換（% relative displacement）について検査した。これらの分析の結果を、本報告に添付の付記1に詳述する。これらのスクリーニング評価から、以下の2組のペアを最終的な継続評価用に選択した：

- 1) EDA - F c ビオチン / P 4 F 6 抗体結合体

50

2) c F n ビオチン / P 4 F 6 抗体結合体

【 0 0 6 2 】

a) バッファー試験

安定性、応答、および c F n 抗原の % 相対置換を最適化するために、様々な pH バッファー、洗浄剤、タンパク質、および他の添加剤を、c F n F A S T P A C K (登録商標) アッセイで検査した。ビオチン溶液を常磁性粒子 (P M P) にカップリングするのにカップリングバッファーを使用し、A L P 結合体を希釈するのに結合体バッファーを使用した。

【 0 0 6 3 】

カップリングバッファーおよび結合体バッファーの組成を、以下に詳述する：

10

カップリングバッファー：

1) 0 . 1 M T B S p H 8 + 0 . 1 % P r i o n e x + 0 . 0 2 % T w e e n 2 0

2) 2 5 m M P B S p H 6 + 1 % B S A + 0 . 1 % P r i o n e x + 0 . 0 2 % T w e e n 2 0

3) 2 5 m M P B S p H 6 + 0 . 1 % P r i o n e x + 0 . 0 2 % T w e e n 2 0

4) B B C p H 8 (トリス + 3 % B S A) + 0 . 0 2 % T w e e n 2 0

5) B B C p H 8 (トリス + 3 % B S A) + 0 . 2 5 m g / m L α - シクロデキストリン + 0 . 0 2 % T w e e n 2 0

6) B B C p H 8 (トリス + 3 % B S A) + 5 % トレハロース + 0 . 0 2 % T w e e n 2 0

20

結合体バッファー：

1) P B S p H 6 + 1 % B S A

2) P B S p H 6 + 0 . 1 % P r i o n e x

【 0 0 6 4 】

カップリングバッファーおよび結合体バッファーの各組み合わせは、6 日間にわたる安定性を実証するために、2 0 1 1 年 1 1 月 2 2 日および 2 0 1 1 年 1 1 月 2 8 日に検査した。表 4 は、バッファーブランクの R L U および 1 0 μ g / m L の c - F n フィブロネクチンを含む試験のデータを示す。

【 0 0 6 5 】

カップリング / 結合体バッファー試験の結果は、バッファー中に B S A を添加すると不安定にあることを示した。この不安定性のため、3 % B S A を含有するカップリングバッファーを用いた 6 日間の応答では劇的な減少が起こった。c - F n の % 置換は、いかなるバッファーの組み合わせを用いても有意ではなかったもので、最適なバッファーの組み合わせを、最大の応答性と安定性に基づいて選択した。以下、最適な応答性と安定性を生みだすために決定したバッファーの組成について詳述する：

30

カップリングバッファー = 2 5 m M P B S p H 6 + 0 . 1 % P r i o n e x + 0 . 0 2 % T w e e n 2 0

結合体バッファー = P B S p H 6 + 0 . 1 % P r i o n e x

【 0 0 6 6 】

アッセイにおける細胞フィブロネクチン (c F n) 抗原の置換を最適化する試みでは、様々な pH バッファー、タンパク質、洗浄剤、還元剤および他の添加剤についての検査を含む試料の前処理試験をいくつか実施した。

40

【 0 0 6 7 】

i) 試料バッファー添加剤についての実験

既知の濃度の細胞フィブロネクチン (c F n) 試料を様々なバッファー添加剤で処理し、c F n を含有しないブランクバッファーにより生じた応答と比較するアッセイで検査した。添加剤の 2 × ストック溶液を、P B S p H 6 バッファーで調製した。検査の直前に、試料 (ブランクまたは c F n) を適切な 2 × ストックバッファーで 1 : 2 に希釈した。表 5 は、バッファー添加物および生じた応答を詳述するものである。

【 0 0 6 8 】

50

S D S 試料の前処理

この試験は、試料の前処理としてS D S（ドデシル硫酸ナトリウム）を使用する効果を詳述するものである。S D Sは、c F n結合の機会を増やすようにタンパク質の構造を変化させる能力があるため選択した。S D S 2×ストックバッファーを、P B S p H 6、0.1% P r i o n e x、0.02% T w e e n - 2 0 バッファーで調製した。検査の直前に、試料を各S D S バッファーで1：2に希釈した。表6は、初期のS D S 力価スクリーニングのデータを示す。表7は、狭いS D S 力価でのスクリーニングのデータを示す。

【0069】

試料の前処理として使用したS D Sは、前処理をしない試料と比較して、c F nの置換が良くなったように思われる。応答対置換比を比較すると、0.05%のS D S（S D S 0.1%ストック）が、試料の前処理として使用するのに最適な濃度であるように思われる。

10

【0070】

p H バッファー

アッセイおよび試料（対照）バッファーのp Hを比較するため、2つの試験を詳述する。1つの試験では、P M P カップリング、結合体、および試料バッファーで使用したp H 6および8のバッファーを比較した（表8）。もう1つの試験では、S D Sを添加したp H 4、5、および6の試料バッファーを比較した（表9）。

【0071】

結果データに基づくと、このアッセイは、p Hおよび/またはバッファーに依存するようである。T B S p H 8を使用すると非常に低いアッセイ応答が生じたが、一方、p H 6以下で検査したバッファーだと許容されるアッセイ応答が生じた。表9のデータは、バッファーp Hを下げるとアッセイ応答が増加したことを示す。置換比は、アッセイおよび対照（試料）バッファーとしてリン酸p H 6を用いると最適である。

20

【0072】

A L P 標識および非標識のP 4 F 6 抗体の比較

アッセイ応答を最適化し、結合体の不安定性による影響を低減するために、ヤギ抗マウスI g G（F a b ' 特異的）（G A M）A L Pを検出酵素として用いて、A L P 標識P 4 F 6 抗体（結合体）を非標識P 4 F 6 抗体と比較した。A L Pが結合したP 4 F 6 抗体の安定性は決定されなかったが、日々変動することは観察された。表10は、この比較による詳細なデータを示す。

30

【0073】

ヤギ抗マウスA L Pを検出酵素として用いる非標識P 4 F 6 抗体の使用により、アッセイ応答が大幅に改善し置換比がわずかに改善した。G A M A L P 検出酵素とP 4 F 6 非標識抗体を用いてさらに試験を実施した（結果は記載せず）。

【0074】

モノクローナル抗細胞フィブロネクチンクローンF N - 3 E 2

細胞フィブロネクチンに対するモノクローナル抗体を、S i g m a から購入し、アッセイで検査し、現在の抗c F nクローンP 4 F 6 抗体と比較した。両方の抗体は、ヤギ抗マウスI g G（F a b '）A L Pを用いて検出した。アッセイ応答およびc F nの置換を比較した。表11は、この試験の結果を詳述するものである。

40

【0075】

購入したモノクローナル抗c F n抗体の使用により、許容可能なアッセイ応答が生じたが、c F nの置換は全く見られなかった。従って、現在のP 4 F 6 抗体に比べ、明らかな改善は見られない。

【0076】

アッセイインキュベーション試験

アッセイ応答及びc F nの置換を最適化するために、様々なアッセイインキュベーション時間を検査した。F A S T P A C K（登録商標）アッセイシステムは、2種類のインキュベーションを含む；1つ目は、試料/抗体インキュベーションであり、2つ目は、試料

50

／抗体およびビオチンにカップリングさせたストレプトアビジンPMP免疫複合体の混合中に起こるインキュベーションである。表12は、検査したインキュベーションの組み合わせについてのアッセイ応答および置換比を示す。

【0077】

1.5分の試料／抗体のインキュベーションと、5回の混合（約4分）によるPMP／抗体複合体のインキュベーションの採用により、最適な応答および置換が生じているようだ。

【0078】

最適化アッセイ

以下は、最適化されたcFn競合様式のFASTPACK（登録商標）アッセイの概要である：

- ・抗体溶液（100μL / pack）：P4F6抗cFnモノクローナル抗体（0.5μg / mL）およびヤギ抗マウスIgG（Fab' 特異的）ALP（1：2000希釈）を含む、0.1% prionexおよび0.02% Tween 20を含有するPBS pH 6

- ・常磁性粒子（150μL / pack）：0.1% prionexおよび0.02% Tween 20を有するPBS pH 6中に、cFnビオチン（2μg / mL）をカップリングさせた0.5mg / mLのSpeed beadストレプトアビジンPMP（Seradyn）

- ・基質（140μL / pack）：Immuglow Plus

- ・洗浄液（2.1mL / pack）：洗浄剤入りのトリスバッファ

【0079】

合計時間が約7分のアッセイプロトコルを用いた。このプロトコルは、抗体溶液を用いて試料（100μL、SDSを含むバッファ中で前処理済み）を1.5分インキュベーションした後に、ストレプトアビジンPMPにカップリングしたcFnビオチンに免疫複合体を混合する（5回混合／約4分）ことから構成される。最後の工程には、3回の洗浄および基質の読み取りが含まれる。試料の前処理は、検査の直前に行う。試料およびブランクをSDS 0.1% バッファ中で1：2に希釈したらずくにパックに装填する。

【0080】

c - Fnの力価を、上記で詳述したアッセイ条件を用いて二重に検査した。平均、標準偏差、% CV、および置換比を計算した。表13は、この試験の結果を詳述するものである。視覚的な表現については、図9を参照のこと。この図より、c - Fnの迅速な検査が、このアッセイ様式で実現できることがわかる。

【0081】

4. 結論

Prediction BiosciencesからQualigenに供給された材料ならびに購入された試薬を用いたところ、競合アッセイ様式でのcFnの免疫アッセイは、FASTPACK（登録商標）システム上で最適化され、その合計インキュベーション時間は約7分であった。

【0082】

EDA - Fcペプチドでもアッセイで許容可能な応答が生じたが、「試料」中のcFnの標識cFn分子全体を置換させる能力は標識EDA - Fcペプチドを置換させる能力より高かったので、天然cFn分子全体を最終アッセイ構成用を選択した。

【0083】

cFn置換を起こすために、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を用いる試料の前処理工程を採用すべきである。競合アッセイ様式では、アッセイ応答は、「試料」におけるc - Fnの量に逆相関する。c - Fnを含まない「試料」と比較して、c - Fnの「試料」で生じた応答の低下が、「置換」によるものであると考えられる。

【0084】

実施例II

10

20

30

40

50

本実施例において、我々は、液体媒体中を自由に流動する常磁性ビーズを用いて c - F n の迅速な検査のためのサンドイッチアッセイを実施した。実施した実験は、ビオチン - モノクローナル抗体、酵素アルカリホスファターゼにカップリングしたポリクローナル抗体の調製、アッセイの最適化、およびマスター検量線の作成である。また、アッセイの性能特性を、直線性、感度および不正確性について評価した。P 4 F 6 抗体が、E L I S A システムにおいて最良であることが証明されているが、これは、全ての迅速な流体免疫測定システムについて当てはまるわけではないので、3 c - F n モノクローナル抗体についても検査した。ヒト包皮線維芽細胞由来のフィブロネクチンを、S i g m a A l d r i c h P / N F 2 5 1 8 L / N 0 3 1 M 4 0 6 5 V から購入した。

【0085】

抗 c F n モノクローナル抗体を、P E G 4 - ビオチンを用いてビオチン化し（ビオチン：抗体比は 5：1）、S M C C および S P D P ヘテロ二官能性試薬を利用した酵素 - 抗体結合についての Q u a l i g e n の内部プロトコルに従い、抗 c F n ウサギ抗体を酵素アルカリホスファターゼに結合させた（R I g G - A L P）。

【0086】

フィラー I I I に充填した試薬パックは、以下の構成成分を含む：

- ・抗体溶液（100 μ L / p a c k）：I g G - ビオチン（2.5 μ g / m L）および R I g G - A L P（1.5 μ g / m L）を含む、安定剤および 0.05% T w e e n 20 入りの P B S を含有する Q u a l i g e n 抗体溶液
- ・常磁性粒子（150 μ L / p a c k）：3% B S A および 0.02% T w e e n 20 入りのトリスバッファー中に、0.5 m g / m L の S p e e d ビーズ P M P（S e r a d y n e）
- ・基質（140 μ L / p a c k）：I m m u g l o w P l u s
- ・洗浄液（2.1 m L / p a c k）：洗浄剤入りトリスバッファー

【0087】

合計時間が約 11 分のアッセイプロトコルを、F A S T P A C K（登録商標）システムにおける c F n の評価に用いた。このプロトコルは、抗体溶液を用いて試料（25 μ L）を 5 分インキュベーションした後に、免疫複合体を P M P - ストレプトアビジンと混合し（5 回混合 / 合計時間 ~ 約 2 分）、そして 3 回洗浄することから構成される。最後に、基質を反応物に添加し、1 分間読み取りを行う。表 2 の概略プロトコルを参照のこと。

【0088】

標準液：標準液は、c F n 抗原を B S A ベースのマトリックス（Q u a l i g e n 多検体安定化溶液）で希釈することにより調製した。標準液は、次の濃度で調製した：0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 6.0, 7.5 および 10 μ g / m L。標準液は、使用するまで約 - 20 で保存した。

【0089】

対照：3つのレベルの c F n 対照を、Q u a l i g e n 多検体安定化溶液で調製し、不正確性の試験に使用した。

【0090】

直線性試料は、脱脂ヒト血清（G o l d e n w e s t カタログ番号 420 - 1 L L N 08E1206）を c F n でスパイクさせ、その後スパイクしていない血清で希釈することにより調製した。

【0091】

感度：0.0、0.25、0.5、および 1.0 μ g / m L の c F n 濃度を調製した。3 台の F A S T P A C K（登録商標）アナライザを用いて各レベルにつき 20 回繰り返して検査を行い、合計 60 回測定した。

【0092】

P r e d i c a t i o n B i o S c i e n c e s から入手した全ての抗体をビオチン化および酵素結合した。スクリーニング実験により、全てのモノクローナル抗体がウサギ抗体と対になったことが示された。どのペアも、評価に用いるのに十分なシグナルを出さ

10

20

30

40

50

なかったので、この実行可能性試験は R I g G - A L P に結合したモノクローナル P 4 F 6 ピオチンの使用に基づく。

【 0 0 9 3 】

合計時間が約 1 1 分のアッセイを本試験で用いた。最初のインキュベーション工程は、抗体 (m I g G - ピオチンおよび R I g G - A L P) を試料と混合することから構成される。図 1 0 a) は、抗体を用いた試料のインキュベーションが 5 分で十分であることを示す。

【 0 0 9 4 】

検量線は、6 台の異なる F A S T P A C K (登録商標) アナライザで、各 c F n 標準液を 5 回繰り返して検査することにより作成した。標準レベル当たり合計 3 0 回反復することになる。次に、5 μ g / m L の濃度の標準レベルを用いて R L U 値を正規化し、トリム平均をそれぞれの標準レベルについて算出した。図 1 0 b) は、6 台のアナライザでの正規化 R L U を用いて作成した典型的な検量線を示す。この図より、c - F n の迅速な検査は、このアッセイ様式で実現されることがわかる。

【 0 0 9 5 】

我々は、合計約 1 1 分のインキュベーション時間で F A S T P A C K (登録商標) システムを用いた c - F n の化学発光免疫アッセイが実行可能であることを実証した。検査したアッセイのダイナミックレンジは 0 . 3 1 μ g / m L の検出限界で、0 . 0 ~ 1 0 . 0 μ g / m L であった。

【 0 0 9 6 】

複数台の F A S T P A C K (登録商標) アナライザを用い、我々が調製した対照を分析することによってアッセイの不正確性について検査した。アナライザ 1 台当たりおよび全体の合計としての不正確性は、それぞれ、約 4 . 7 % および約 1 4 . 9 % であった。アッセイの直線性は、患者血清試料を高標準物質でスパイクし、これを希釈することによって検査した。

【 0 0 9 7 】

当業者にとって、数多くの変更が可能であることが理解されるだろう。したがって、上記の説明および添付の図面は、本発明の例示に過ぎず非限定的なものとして解釈されるべきである。さらに、本発明の原理、ならびに本発明が関与する技術分野で公知または慣行の範囲内の本開示から逸脱しない原理に従い、本明細書で既に記載しそして添付の特許請求の範囲において記載される本質的な特徴が当てはまるような本発明のいかなる変形、使用、または用途も、一般に包含する意図であることが理解されるだろう。

【 0 0 9 8 】

本発明から導かれる結論の概要

本発明は、血液中の二量体糖タンパク質細胞フィブロネクチンについて 1 5 分未満の迅速な検査を可能にする。本発明の一態様では、細胞フィブロネクチンの E D A 領域と結合する抗体が提供され、当該抗体は、細胞フィブロネクチンの E D A 領域に対する親和性は高いが、血漿フィブロネクチンに対する親和性は少なくとも 2 桁少ない。本発明は、さらに、細胞性フィブロネクチンの E D A 領域に対して生じる抗体を含む診断アッセイおよびキットを包含する。

【 0 0 9 9 】

本実施形態の別の態様では、c - F n に対する抗体を、常磁性ビーズとともに競合アッセイ様式で使用するにより、血液試料中の c - F n の定量的測定を可能にする。

【 0 1 0 0 】

本態様の好ましい実施形態は、Q u a l i g e n , I n c の F A S T P A C K (登録商標) I P システムを用いた競合アッセイ様式である。

【 0 1 0 1 】

本実施形態の別の態様では、c - F n に対する抗体を、常磁性ビーズとともにサンドイッチアッセイ様式で使用するにより、血液試料中の c - F n の定量的測定を可能にする。

10

20

30

40

50

【0102】

本態様の好ましい実施形態は、Qualigen, IncのFASTPACK（登録商標）IPシステムを用いたサンドイッチアッセイ様式である。

【0103】

本発明の特別の実施形態では、迅速なアッセイにより、特定の患者のポイントオブケアにおける出血の予測が可能になる。

【0104】

本実施形態の好ましい態様では、迅速なアッセイにより、ヒト被験者における内部神経系または心血管系の出血、あるいはヒト被験者に治療薬を投与した後に起こる神経系または心血管系の出血の可能性の予測が可能になる。

10

【0105】

本実施形態の別の好ましい態様では、迅速なアッセイにより、ヒト被験者に血栓溶解治療薬を投与した後に起こる大出血の予測が可能になる。

【0106】

本実施形態の別の好ましい態様では、迅速なアッセイにより、ヒト被験者に抗凝固治療薬を投与した後に起こる大出血の予測が可能になる。

【0107】

本実施形態の別の好ましい態様では、迅速なアッセイにより、ヒト被験者に第Xa因子阻害剤を投与した後に起こる大出血の予測が可能になる。

【0108】

20

本実施形態の更に別の好ましい態様では、迅速なアッセイにより、ヒト被験者にアルツハイマー病またはパーキンソン病に対する治療薬を投与した後に起こる大出血の予測が可能になる。

【0109】

本実施形態の更に別の好ましい態様では、迅速なアッセイにより、外科的処置を施す前に大出血の予測が可能になる。

【0110】

5. 本発明の要約

本発明は、ヒト細胞フィブロネクチンを検出するための迅速なアッセイに関し、生体液中の細胞フィブロネクチンを検出および測定するために従来から開発されてきたELISAベースのアッセイでは実用的な臨床診断で使用するのに時間がかかりすぎていたという背景がある。このアッセイは、迅速な時間規模で、出血事象の予想を可能にする。また、高い親和性を有するヒトモノクローナル抗体、特に細胞フィブロネクチン（c-Fn）の同位体決定基に対する抗体、ならびにこれらの抗体の均等物および誘導体についても記載する。これらの抗体は、血漿フィブロネクチンに対する親和性よりも少なくとも100倍を超える親和性を持ってこれらの標的にそれぞれ結合し、そして様々な検出様式において30分未満で、いくつかの検出様式では15分未満で、c-Fnを検出するアッセイの作成を可能にする。これらの抗体は、診断、特に、出血事象の予測、疾患の予防および治療に有用である。

30

【0111】

40

同時に、開示された迅速なアッセイおよび使用方法は、オペレータによる使用の簡便性、細胞フィブロネクチンについてその場での迅速な決定、ならびにオペレータおよび患者の両者の汚染リスクを最小限にする使い捨て方法を含め、従来技術よりも実質的な利益を享受する。開示された発明は、事故現場、緊急治療室、手術、介護施設、集中治療室、および非医療環境での使用を含め、ポイントオブケア臨床診断分野に適応可能である。

【0112】

本発明により、実施が簡単で、20分未満しかかからず、そして卓上機器によって実行できる、ヒト体液試料の細胞フィブロネクチンについて定量的で正確な測定が初めて可能になった。これにより、大出血が分子レベルで初めて予測可能となるので、時間が極めて重要となることが多い治療薬の投与または外科的手順における出血を予測するためのポイ

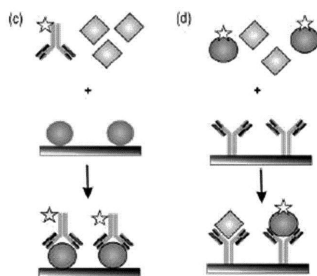
50

ントオブケアの検査が可能になるだろう。これにより、医師は、ヒト患者の心血管系および神経血管系に影響を与えかねない治療や処置について「実施する」または「実施しない」決定を、致命的な出血の副作用が起こるかもしれないという不確実性に直面することなく、行うことができるだろう。

【図 1】

FIGURE 1

作用の様式



【図 2】

FIGURE 2
材料

a)

項目
ウサギ抗フィブネクチンポリクローナル抗体
モノクローナル抗 cFn 抗体クローン#
PIH11
P3A3
P4F6
抗原およびペプチド
EDA-Fc 抗原 04397
ペプチド 1 (BSA 結合)
ペプチド 2 (BSA 結合)

b)

項目	販売者	部分番号	ロット番号
ヒト包皮線維芽細胞由来のフィブネクチン (cFn)	Sigma	F2518	031M4065V
ヤギ抗マウス IgG (Fab') アルカリホスファターゼ	Sigma	A1293	129K4857
モノクローナル抗細胞フィブネクチンクローン FN-3E2 腹水	Sigma	F6140	050M4857

【図 3】

FIGURE 3
表 1-2

表 1

	ビオチン	結合体
P4F6 モノクローナル	X	X
PIH1 モノクローナル	X	X
P3A3 モノクローナル	X	X
cFn 抗原	X	X
EDA-Fc ペプチド	X	X
親和性ペプチド	X	X
ペプチド 1	X	X
ペプチド 2	X	X

表 2

基本的な FastPack (登録商標) アッセイプロトコル

工程	作業	時間
1	バーコード、アッセイパラメーターの読み取り	～15 秒
2	試料と抗体溶液との混合	～15 秒
3	試料と ALP 結合体との第 1 インキュベーション	0～10 分
4	PMP-ストレプトアビジン/ビオチン溶液と免疫複合体との混合 (第 2 インキュベーション)	5 回の混合 (約 4 分)
6	3 回の洗浄	～2.5 分
7	基質の混合および読み取り	1 分

【図 4】

FIGURE 4
表 3-4

表 3

ビオチン	ALP 結合体
P4F6 抗体	cFn 抗原
EDA-Fc ペプチド	P4F6 抗体
EDA-Fc ペプチド	PIH11 抗体
EDA-Fc ペプチド	P3A3 抗体
EDA-Fc ペプチド	ポリクローナル抗体
cFn 抗原	P4F6 抗体
cFn 抗原	PIH11 抗体
cFn 抗原	P3A3 抗体
cFn 抗原	ポリクローナル抗体
親和性プライマーペプチド	P4F6 抗体
ペプチド-1	P4F6 抗体
ペプチド-2	P4F6 抗体
P4F6 抗体	親和性プライマーペプチド
P4F6 抗体	ペプチド-1
P4F6 抗体	ペプチド-2

表 4

検査日		11/22/2011		11/28/2011		11/28/2011	
カプ リング バッ ファー	結合体バッ ファー	バック プランク RLU	cFn 10 µg/mL RLU	置換比	バック プランク RLU	cFn 10 µg/mL RLU	置換比
#1	#2	2,709,110	NA	NA	2,149,254	2,040,838	0.95
#2	#1	2,678,965	2,814,624	1.05	1,700,108	1,444,736	0.85
#2	#2	2,737,347	2,509,928	0.92	1,847,872	1,951,390	1.06
#3	#2	3,171,049	2,991,014	0.94	3,034,036	2,433,708	0.80
#4	#2	1,393,777	1,316,448	0.95	60,451	80,420	1.33
#5	#2	1,383,064	452,256	0.33	50,406	118,219	2.35
#6	#2	986,880	1,032,652	1.05	28,993	58,134	2.01

置換比= (RLU cFn / RLU プランク)

【図 5】

FIGURE 5
表 5-6

表 5

3M 原液	2% Triton x-100	0.2% Tween-20	2.0% Thesit	0.5% デオキシコ ール酸ナト リウム	0.5% Pluronic F68
165	169	167	238	241	171
EDA-Fc ビオチン µg/mL	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
P4F6-ALP 結合体 µg/mL	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
対照プランク: PBS pH 6					
対照: Fn Std: 10 µg/mL	843,846	743,796	2,013,286	714,953	113,217
対照: Fn Std: 10 µg/mL	686,696	1,576,172	1,839,558	1,286,201	119,260
置換比	1.07	2.12	0.91	1.80	1.05
置換比= (RLU cFn / RLU プランク)					

表 6

機器番号	169	165	165	165	169
試料の前処理用バッ ファー (1:2 希釈での最終濃度)	SIS	SIS	SIS	SIS	SIS
ビオチン	1.00%	0.25%	0.25%	0.125%	0.06%
P4F6 抗体			EDA-Fc 0.5 µg/mL		
GAM-ALP			0.5 µg/mL		
対照: プランク	0	0	1:2000	0	0
対照: cFn	6,438	18,897	1,160,326	5,455,750	20 µg/mL
対照: cFn	NA	NA	20 µg/mL	3,399,121	0.62
対照: cFn	NA	NA	870,425	0.74	0.62
置換比	NA	NA	NA	0.74	0.62
置換比= (RLU cFn / RLU プランク)					

【図 6】

FIGURE 6
表 7

表 7

機器番号	241	169	169	241	241
試料の前処理用バッ ファー (1:2 希釈での最 終濃度)	SIS 0.025%	SIS 0.05%	SIS 0.075%	SIS 0.05%	PBS/Prionex/Twee n
ビオチン				cFn	cFn
抗体				2.5 µg/mL	2.5 µg/mL
GAM-ALP				P4F6 0.5 µg/mL	P4F6 0.5 µg/mL
対照: プランク	0 µg/mL	0 µg/mL	0 µg/mL	1:2000	1:2000
対照: cFn	7,878,846	4,258,833	3,752,155	2,486,121	4,421,299
対照: cFn	5 µg/mL	5 µg/mL	5 µg/mL	5 µg/mL	5 µg/mL
対照: cFn	7,005,897	3,258,161	3,031,580	1,364,091	4,546,232
置換比	0.89	0.77	0.81	0.55	1.03
置換比= (RLU cFn / RLU プランク)					

【図 7】

FIGURE 7
表 8-10

表 8

機器番号	169	241
試料バッファ/PPMP カ ップリングおよび結合 体バッファ	PBS pH 6 0.1%Prionex 0.02% Tween-20	TBS pH 8 0.1%Prionex 0.02% Tween-20
ビオチン	P4F6 0.5 µg/mL	
ALP 結合体	cFn 0.5 µg/mL	
対照: ブランク	0 µg/mL	0 µg/mL
RLU/秒	3,976,033	46,713

表 9

対照バッファ/アッセ イバッファ	Aces 0.05% SDS pH 4.1	MES 0.05% SDS 5	リン酸 0.05% SDS 6
ビオチン	cFn ビオチン(1:20 比) 2ug/mL		
抗体	P4F6 Ab 0.5 ug/mL		
GAM-ALP	1:2000		
対照: ブランク µg/mL	0	0	0
RLU/秒	8,178,520	7,423,745	6,045,548
対照: cFn µg/mL	5	5	5
RLU/秒	7,201,006	6,983,814	3,181,260
置換比	0.88	0.94	0.53

置換比= (RLU cFn / RLU ブランク)

注: 全バッファに 0.1% Prionex および 0.02% Tween-20 が含まれる

表 10

機器番号	169	238
ビオチン	EDA-Fc 0.5 µg/mL	EDA-Fc 0.4 µg/mL
抗体	P4F6 0.5 µg/mL	
GAM-ALP	1:2000	
結合体		P4F6 ALP 1 µg/mL
基質	Sub +	Sub +
対照バッファ	SDS 0.05%	SDS 0.05%
対照: ブランク	0 µg/mL	0 µg/mL
RLU/秒	4,258,833	906,870
対照: cFn	5 µg/mL	5 µg/mL
RLU/秒	3,258,161	791,852
置換比	0.77	0.87

置換比= (RLU cFn / RLU ブランク)

【図 8】

FIGURE 8
表 11-13

表 11

機器番号	241	169	238
対照バッファ/アッセ イバッファ	PBS/Prionex/ Tween 20	SDS 0.05% PBS/Prionex/ Tween 20	PBS/Prionex/ Tween 20
ビオチン	cFn 1 ug/mL	cFn 1 ug/mL	EDA-Fc 0.5 ug/mL
抗体	モノクローナル 抗-cFn (Sigma) 1:200	モノクローナル 抗-cFn (Sigma) 1:200	モノクローナル 抗-cFn (Sigma) 1:200
GAM-ALP	1:2000	1:2000	1:2000
対照: ブランク	0 µg/mL	0 µg/mL	0 µg/mL
RLU/秒	2,448,308	974,937	2,484,219
対照: cFn	5 µg/mL	5 µg/mL	5 µg/mL
RLU/秒	4,914,673	936,724	4,906,670
置換比	2.01	0.96	1.98

置換比= (RLU cFn / RLU ブランク)

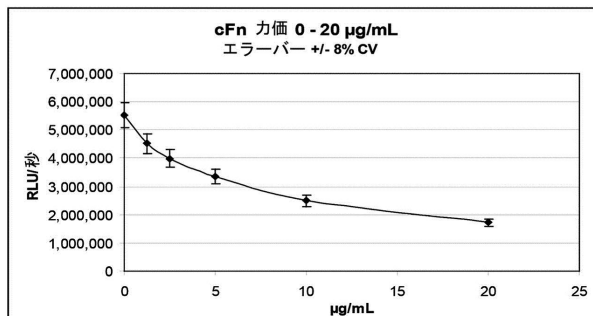
表 12

アッセイ番号	34	37	36	33
インキュベーション 1 (分)	0	1.5	5	10
インキュベーション 2 (混合、1 回の混合当たり約 45 秒)	5	5	5	5
対照バッファ/アッセイバッファ	SDS 0.05% PBS			
ビオチン	cFn ビオチン 1 ug/mL			
抗体	P4F6 Ab 0.5 ug/mL			
GAM-ALP	1:2000			
基質	Beckman 基質			
対照: ブランク µg/mL RLU/秒	7,796,446	5,832,924	4,555,595	3,841,740
対照: cFn 10 µg/mL (pre-diluted conc.) RLU/秒	6,339,841	3,533,998	3,324,262	2,587,280
置換比	0.61	0.73	0.81	0.67

表 13

対照バッファ/ア ッセイバッファ	SDS 0.05% PBS/Prionex/Tween					
ビオチン	cFn ビオチン 2 µg/mL					
抗体	P4F6 Ab 0.5 µg/mL					
GAM-ALP	1:2000					
対照 cFn µg/mL (前希釈濃度)	0.0	1.25	2.5	5.0	10.0	20.0
Rep 1 RLU/秒	5,504,062	4,676,835	4,364,908	3,287,700	2,340,680	1,715,809
Rep 2 RLU/秒	5,548,808	4,360,817	3,622,696	3,422,800	2,642,894	NA
平均	5,526,435	4,518,826	3,993,802	3,355,250	2,491,787	1,715,809
標準偏差	31640	223458	524823	95530	213698	NA
% CV	0.6	4.9	13.1	2.8	8.6	NA
置換比	NA	0.82	0.72	0.61	0.45	0.31

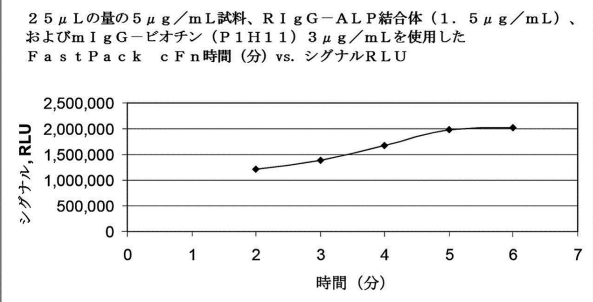
【図 9】

FIGURE 9
置換曲線

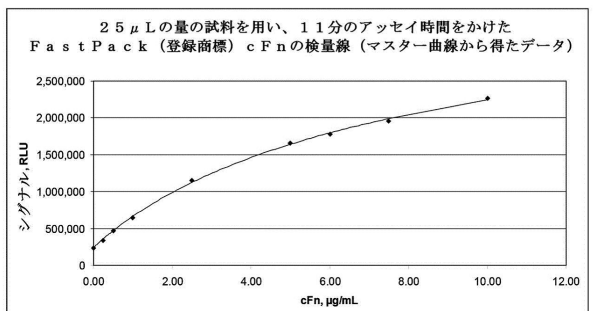
【図 10】

FIGURE 10

a) c-Fn のシグナル vs. インキュベーション時間



b) 検量線



【配列表】

0006329127000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74)代理人 100196977

弁理士 上原 路子

(72)発明者 コーネリアス ダイアモンド

アメリカ合衆国, カリフォルニア 92024, ルーカディア, ハイゲイア アベニュー 1377

審査官 草川 貴史

(56)参考文献 米国特許出願公開第2005/0130230(US, A1)

米国特許第04980279(US, A)

国際公開第2011/156639(WO, A1)

特開平02-115767(JP, A)

国際公開第2009/058168(WO, A1)

欧州特許出願公開第00359274(EP, A1)

M Pfeifer et.al. , Cerebral Hemorrhage After Passive Anti-A β Immunotherapy, Science
, 2002年, Vol.298 , Page.1379

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

C07K 7/08

C07K 14/47

C07K 16/18

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

专利名称(译)	细胞纤连蛋白的快速检测		
公开(公告)号	JP6329127B2	公开(公告)日	2018-05-23
申请号	JP2015505033	申请日	2013-04-11
[标]申请(专利权)人(译)	预测比奥青色扫描路径兴业ACCION扫描新Purifie		
申请(专利权)人(译)	预测Bioshiansu兴业路ACCION扫描新Purifie		
当前申请(专利权)人(译)	预测Bioshiansu兴业路ACCION扫描新Purifie		
[标]发明人	コーネリアスダイヤモンド		
发明人	コーネリアス ダイヤモンド		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 C07K7/08 C07K14/47		
CPC分类号	C07K16/18 G01N33/6887 G01N2333/78 C07K7/08 C07K14/001 G01N33/68 G01N2800/22 G01N2800/50		
FI分类号	G01N33/53.V C07K16/18.ZNA C07K7/08 C07K14/47		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 中岛胜		
优先权	13/506357 2012-04-13 US		
其他公开文献	JP2015514986A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于检测人细胞纤连蛋白 (c-Fn) 的快速测定法，其中先前开发了基于ELISA的测定法用于检测和测量生物流体中的细胞纤连蛋白，但是这些方法对于实际临床来说太耗时诊断使用。本发明的分析能够在快速时间尺度上预测出血事件。还描述了高亲和力的人单克隆抗体，特别是针对细胞纤连蛋白 (c-Fn) 的同位素决定簇的那些，以及这些抗体的直接等价物和衍生物。这些抗体以比它们对血浆纤连蛋白的亲合力高至少100倍的亲合力结合到它们各自的靶标，并且使得能够在不到30分钟内以各种检测形式以及在一些检测形式中检测c-Fn的检测被创建少于15分钟。这些抗体可用于诊断，特别是预测出血事件，预防和治疗疾病。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特 許 公 報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6329127号 (P6329127)
(45) 発行日 平成30年5月23日 (2018. 5. 23)	(24) 登録日 平成30年4月27日 (2018. 4. 27)	
(51) Int. Cl. G 0 1 N 33/53 (2006.01) C 0 7 K 16/18 (2006.01) C 0 7 K 7/08 (2006.01) C 0 7 K 14/47 (2006.01)	F I G O 1 N 33/53 C O 7 K 16/18 C O 7 K 7/08 C O 7 K 14/47	V Z N A
請求項の数 13 (全 23 頁)		
(21) 出願番号 特願2015-505033 (P2015-505033) (86) (22) 出願日 平成25年4月11日 (2013. 4. 11) (65) 公表番号 特表2015-514986 (P2015-514986A) (43) 公表日 平成27年5月21日 (2015. 5. 21) (86) 国際出願番号 PCT/182013/001164 (87) 国際公開番号 W02013/153457 (87) 国際公開日 平成25年10月17日 (2013. 10. 17) 審査請求日 平成28年2月10日 (2016. 2. 10) (31) 優先権主張番号 13/506, 357 (32) 優先日 平成24年4月13日 (2012. 4. 13) (33) 優先権主張国 米国 (US)	(73) 特許権者 514258823 ブレディクション ビオシアンズ ソシエ テ パ アクシオンス シンプリフィエ フランス国、エフー６９００８ リヨン、 アプニュ ロックフェラー ６０ (74) 代理人 100099759 弁理士 青木 篤 (74) 代理人 100077517 弁理士 石田 敬 (74) 代理人 100087871 弁理士 福本 慎 (74) 代理人 100087413 弁理士 古賀 晋次 (74) 代理人 100117019 弁理士 渡辺 陽一	最終頁に続く
(54) 【発明の名称】 細胞フィブロネクチンについての迅速な検査		