

(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2017-504038

(P2017-504038A)

(43) 公表日 平成29年2月2日(2017.2.2)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/92 (2006.01)	GO 1 N 33/92 Z	2 G O 4 5
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 P	4 C O 8 4
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 W	4 C O 8 6
GO 1 N 27/447 (2006.01)	GO 1 N 27/447 3 2 5 A	4 C 2 0 6
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	GO 1 N 27/447 3 2 5 C	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-560641 (P2016-560641)
 (86) (22) 出願日 平成26年12月18日 (2014.12.18)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年8月12日 (2016.8.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/071272
 (87) 国際公開番号 W02015/095592
 (87) 国際公開日 平成27年6月25日 (2015.6.25)
 (31) 優先権主張番号 61/917, 823
 (32) 優先日 平成25年12月18日 (2013.12.18)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/005, 658
 (32) 優先日 平成26年5月30日 (2014.5.30)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/042, 613
 (32) 優先日 平成26年8月27日 (2014.8.27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 516181206
 トゥルー ヘルス ダイアグノスティクス
 , エルエルシー
 アメリカ合衆国 テキサス州 75033
 フリスコ スイート211 リサーチ
 ロード 6170
 (74) 代理人 100097456
 弁理士 石川 徹
 (72) 発明者 フィリップ グアダグノ
 アメリカ合衆国 バージニア州 2311
 6 メカニクスビル チャンパーレイン
 ロード 11045

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ゾーンゲル免疫固定電気泳動を使用した Lp (a) 亜型サイズ識別

(57) 【要約】

一態様では、試験試料中の個々の Lp (a) 亜型の組成を決定するための方法が提供される。本方法は、対象から取得された Lp (a) 亜型を含む試験試料を提供することと、試験試料中の Lp (a) 亜型を電気泳動ゲルに沿って分離することと、個々の Lp (a) 亜型の泳動速度を電気泳動ゲルに沿って測定することと、その測定に基づいて、個々の Lp (a) 亜型の泳動速度を基準値と比較することと、その比較に基づいて、個々の Lp (a) 亜型のモル質量を決定することを含む。心臓血管の健康を予測するための方法も提供される。

【選択図】 図 1 A

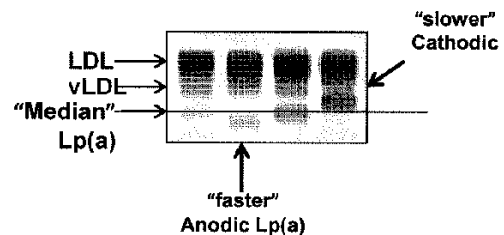


FIG. 1A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試験試料中の個々の L p (a) 亜型の組成を決定するための方法であって、

(a) 対象から取得された L p (a) 亜型を含む試験試料を提供することと、

(b) 前記試験試料中の前記 L p (a) 亜型を電気泳動ゲルに沿って分離することと、

(c) 前記電気泳動ゲルに沿った前記個々の L p (a) 亜型の泳動速度を測定することと、

(d) 前記測定に基づいて、前記個々の L p (a) 亜型の前記泳動速度を基準値と比較することと、

(e) 前記比較に基づいて、前記個々の L p (a) 亜型のモル質量を決定することと、
を含む、前記方法。

10

【請求項 2】

(f) 前記決定に基づいて、異なるモル質量の少なくとも 2 つの L p (a) 亜型を特徴付けることと、

(g) 前記特徴付けに基づいて、前記特徴付けられた L p (a) 亜型の L p (a) 亜型サイズ分布を決定することと、をさらに含む、請求項 1 に記載の前記方法。

【請求項 3】

前記対象は、既存の治療計画を有し、前記方法は、前記決定されたサイズ分布に基づいて、前記治療計画を修正するステップをさらに含む、請求項 2 に記載の前記方法。

【請求項 4】

20

(f) 前記個々の L p (a) 亜型の粒子数を測定することと、

(g) 前記個々の L p (a) 亜型の前記決定されたモル質量及び粒子数に基づいて、前記試験試料中の前記 L p (a) 亜型の前記サイズ分布を決定することと、

(h) 前記 L p (a) 亜型の前記決定されたサイズ分布に基づいて、前記対象の心臓血管リスク値を決定することと、をさらに含む、請求項 1 に記載の前記方法。

【請求項 5】

(h) は、対象を低度、中度、または高度心臓血管リスク分類のうちの 1 つに割り当てることを含む、請求項 4 に記載の前記方法。

【請求項 6】

前記個々の L p (a) 亜型のアポ (a) タンパク質のモル質量は、600 k D 超である、請求項 1 に記載の前記方法。

30

【請求項 7】

前記個々の L p (a) 亜型のアポ (a) タンパク質の前記モル質量は、700 k D 超である、請求項 1 に記載の前記方法。

【請求項 8】

前記個々の L p (a) 亜型のアポ (a) タンパク質の前記モル質量は、600 ~ 700 k D である、請求項 1 に記載の前記方法。

【請求項 9】

前記個々の L p (a) 亜型のアポ (a) タンパク質の前記モル質量は、600 k D 未満である、請求項 1 に記載の前記方法。

40

【請求項 10】

前記分離することは、前記試験試料中の前記 L p (a) 亜型を前記電気泳動ゲルの第 1 のレーンに沿って分離することを含み、前記比較することは、前記個々の L p (a) 亜型の前記泳動速度を、前記電気泳動ゲルの第 2 のレーンに沿って分離された対照 L p (a) 亜型試料の前記基準値と比較することを含む、請求項 1 に記載の前記方法。

【請求項 11】

前記決定することは、前記個々の L p (a) 亜型を低度、中度、または高度モル質量分類に割り当てることを含む、請求項 1 に記載の前記方法。

【請求項 12】

約 600 k D 未満のモル質量を有する個々の L p (a) 亜型は、前記低度モル質量分類

50

に割り当てられ、約600kD～700kDのモル質量を有する個々のLp(a)亜型は、前記中度モル質量分類に割り当てられ、約700kD超のモル質量を有する個々のLp(a)亜型は、高度モル質量分類に割り当てられる、請求項11に記載の前記方法。

【請求項13】

前記分離された個々のLp(a)亜型は、前記検出の前に前記ゲル内に固定される、請求項1に記載の前記方法。

【請求項14】

前記測定することは、

前記電気泳動ゲルを、前記個々のLp(a)亜型を染めるタンパク質染料と接触させることと、

前記染められたLp(a)亜型を検出することと、を含む、請求項1に記載の前記方法。

10

【請求項15】

前記タンパク質染料は、アシッドバイオレットである、請求項14に記載の前記方法。

【請求項16】

前記方法は、蛍光の使用を含まない、請求項1に記載の前記方法。

【請求項17】

前記試験試料の前記個々のLp(a)亜型は各々、検出可能なシグナルを生成するか、またはその生成を引き起こすことができるシグナル生成分子に結合される、請求項1に記載の前記方法。

20

【請求項18】

前記方法は、

前記シグナル生成分子に結合された前記試験試料の前記分離された個々のLp(a)亜型を、前記シグナル生成分子と相互作用することができる試薬と接触させることをさらに含み、前記シグナル生成分子は、前記試薬との接触時に前記検出可能なシグナルを生成し、前記方法は、前記検出可能なシグナルを検出することをさらに含む、請求項17に記載の前記方法。

【請求項19】

前記試験試料の前記個々のLp(a)亜型は、互いに区別可能なシグナル生成分子に結合される、請求項17に記載の前記方法。

30

【請求項20】

前記検出可能なシグナルは、放射分析、比色分析、光分析、または蛍光分析手段によって検出可能である、請求項17に記載の前記方法。

【請求項21】

(i)前記心臓血管リスク値決定の結果に基づいて、療法計画を選択することをさらに含む、請求項4に記載の前記方法。

【請求項22】

前記選択された療法計画は、薬物及び/またはサプリメントを投与することを含む、請求項21に記載の前記方法。

【請求項23】

前記選択された療法計画は、ナイアシン、抗炎症剤、抗血栓剤、抗血小板剤、線維素溶解剤、脂質低下剤、直接トロンピン阻害薬、糖タンパク質IIb/IIIa受容体阻害薬、細胞接着分子に結合し、かかる分子に結合する白血球の能力を阻害する薬剤、カルシウムチャネル遮断薬、 α -アドレナリン受容体遮断薬、アンジオテンシン系阻害薬、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される薬物を投与することを含む、請求項21に記載の前記方法。

40

【請求項24】

前記選択された療法計画は、ナイアシン、フェノフィブラート、エストロゲン、及びラロキシフェンからなる群から選択される薬物を投与することを含む、請求項21に記載の前記方法。

50

【請求項 25】

前記選択された療法計画は、ナイアシン、エゼチマイブ、スタチン、またはそれらの組み合わせを投与することを含む、請求項 21 に記載の前記方法。

【請求項 26】

前記選択された療法計画は、前記心臓血管のリスク値決定の結果に基づいて、生活スタイルの選択の実施または維持に関して助言を与えることを含む、請求項 21 に記載の前記方法。

【請求項 27】

前記生活スタイルの選択は、食事の変化、運動の変化、喫煙の低減もしくは中止、またはそれらの組み合わせを含む、請求項 26 に記載の前記方法。

10

【請求項 28】

前記電気泳動ゲルは、ゾーン電気泳動ゲルである、請求項 1 に記載の前記方法。

【請求項 29】

心臓血管の健康を予測するための方法であって、
患者から Lp (a) 亜型を含む試料を取得することと、
前記試験試料中の前記 Lp (a) 亜型を電気泳動ゲルに沿って分離することと、
前記試料中の個々の Lp (a) 亜型の粒子数を測定することと、
前記測定された前記 Lp (a) 亜型の粒子数に基づいて、前記対象の心臓血管のリスク値を決定することと、を含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

本出願は、その各々が参照によりその全体が本明細書に援用される、2013年12月18日に出願された米国仮特許出願第61/917,823号、及び2014年5月30日に出願された米国仮特許出願第62/005,658号、及び2014年8月27日に出願された米国仮特許出願第62/042,613号の優先権の利益を主張する。

【0002】

ゲル電気泳動を使用した Lp (a) 亜型サイズの識別に関する方法が本明細書に開示される。

【背景技術】

30

【0003】

電気泳動は、荷電種をサイズ、電荷、及び他の物理的特性に基づいて分離するために使用される技術である。電気泳動では、荷電種は、電界の影響下で伝導性電気泳動媒体を通じて泳動し、それはゲルであってもよい（但し必然ではない）。電気泳動媒体の両端部に配置された活性化された電極は、泳動のための駆動力を提供する。それらの電荷及び質量を含む分子の特性は、電界が電気泳動媒体を通じてそれらをいかに迅速に泳動させるかを決定する。

【0004】

アミノ酸、ペプチド、タンパク質、ヌクレオチド、及び核酸などの多くの重要な生物学的分子は、イオン化基を有する。これらのイオン化基により、任意の所与の pH において、多くの重要な生物学的分子が帯電した種として溶液中に存在する。帯電した種は、医師及び科学者が電気泳動を使用して核酸及びタンパク質を分離することを可能にする。

40

【0005】

電気泳動を使用した生物学的ないしは別の分子の分離は、電荷及び質量を含む種々の力に依存する。タンパク質または DNA などの生物学的試料が緩衝液と混合され、電気泳動媒体に適用されると、これら 2 つの力は一緒に作用する。電界を通じた分子の泳動の速さは、界の強度、分子の電荷、サイズ、及び形状、ならびに分子がそれを通じて移動している緩衝剤のイオン強度及び温度に依存するため、電気泳動を使用した分離が可能である。電気泳動中、適用された電界は、分子電荷に基づいて電気泳動媒体の孔を通じて分子を移動させる。一方の電極の電位は、分子と反発し、それに対して他方の電極の電位は、同時

50

に分子を引き付ける。電気泳動媒体の摩擦力もまた、サイズによる分子の分離に役立つ。典型的には、適用された電界が除去された後、分子は染色され得る。染色後、分離された巨大分子は、電気泳動媒体の一方の端部から他方の端部へと広がる一連のバンドに見ることが出来る。これらのバンドが十分に明確である場合、これらのゾーン内の分子は、巨大分子を固定し、電気泳動媒体を洗浄して、固定されていない構成成分及び残りの緩衝液を除去することによって、別々に実験及び研究することができる。

【0006】

体液（例えば、血清または血漿）中のリポタンパク質粒子の分離は、種々のリポタンパク質粒子のレベルに関する情報を提供する。種々の疾患状態が、アポリポタンパク質及び/またはリポタンパク質粒子のレベルに結びついており、心臓血管疾患、アルツハイマー病、脂質異常症、無リポタンパク血症、甲状腺機能低下症、肝疾患、糖尿病、及び腎障害が挙げられるが、これらに限定されない。リポタンパク質粒子に関連する種々の疾患の発症の個体のリスクの正確な予測因子は、研究、診断、及び治療の目的のために必要とされる。

10

【0007】

個々のリポタンパク質の種類、生理的性質及びヒトの健康に対する効果の理解の進歩により、リポタンパク質粒子及び亜型の集団の理解は必須となり、その各々は特定の代謝プロセスの結果であり、また特定の代謝プロセスに参与する。かかるプロセスは、具体的な患者の健康にとって良くも悪くもあり得、薬理的療法、生活スタイルの変化、食事の変化、または他の医学的介入を含む治療的努力に影響を与える。

20

【0008】

アポ(a)は、Lp(a)粒子を部分的に含む、1つのかかるタンパク質である。種々のリポタンパク質粒子、特にLp(a)（例えば、Marcovina et al., "Effect on the Number of Apolipoprotein (a) Kringle 4 Domains on Immunochemical Measurements of Lipoprotein (a)", Clin. Chem. 41(2):246-255 (1995)、Marcovina et al., "Identification of 34 Apolipoprotein (a) Subforms: Differential Expression of Apolipoprotein (a) Alleles Between American Blacks and Whites", Biochem Biophys Res Commun 191:1192-6 (1993)、Lackner et al., "Molecular Basis of Apolipoprotein (a) Subform Size Heterogeneity as Revealed by Pulsed-Field Gel Electrophoresis", J Clin Invest 87:2153-61 (1991)、Kraft et al., "Apolipoprotein (a) Kringle IV Repeat Number Predicts Risk for Coronary Heart Disease", Arterioscler Thromb Vase Biol. 16(6):713-9 (1996)を参照、それらの全てはその全体が参照により本明細書に援用される)の粒子数の定量化は近年改善されているが、Lp(a)亜型の効率的及び費用効率の良い識別を可能にするためにさらなる改善が必要である。

30

40

【0009】

本発明は、当該技術分野におけるこれら及び他の欠陥の克服に関する。

【発明の概要】

【0010】

本明細書に例証される態様によると、試験試料中の個々のLp(a)亜型の組成を決定するための方法が提供される。本方法は、(a)対象から取得されたLp(a)亜型を含む試験試料を提供することと、(b)試験試料中のLp(a)亜型を電気泳動ゲルに沿って分離することと、(c)個々のLp(a)亜型の泳動速度を電気泳動ゲルに沿って測定

50

することと、(d)その測定に基づいて、個々のLp(a)垂型の泳動速度を基準値と比較することと、(e)その比較に基づいて、個々のLp(a)垂型のモル質量を決定することを含む。

【0011】

本明細書に例証される態様によると、心臓血管の健康を予測するための方法が提供される。本方法は、患者から試料を取得することと、試料中のLp(a)垂型のサイズ分布を測定することと、Lp(a)垂型サイズ及び/または分布に基づいて、心臓血管疾患の患者のリスクを特徴付けることを含む。

【0012】

本明細書に例証される態様によると、心臓血管の健康を予測するための方法が提供される。本方法は、患者からLp(a)垂型を含む試料を取得することと、試験試料中のLp(a)垂型を電気泳動ゲルに沿って分離することと、試料中の個々のLp(a)垂型の粒子数を測定することと、測定されたLp(a)垂型の粒子数に基づいて、対象の心臓血管のリスク値を決定することを含む。

10

【0013】

上記の通り、種々のリポタンパク質粒子、特にLp(a)の粒子数の定量化は近年改善されているが、さらなる改善が必要である。本明細書に説明される方法は、種々のリポタンパク質粒子の粒子数を分離及び定量化し得るリポタンパク質免疫固定電気泳動(「リボ-IFE」)の方法及び機器を著しく改善する。この技術は、患者の組織内のリポタンパク質集団に関する情報を保存しないリポタンパク質または分離されたタンパク質の混合物よりもむしろ、特定のリポ粒子の効率的で費用効率の良い測定のための方法を提供する。

20

【0014】

例えば、以下の実施例に記載される通り、Lp(a)-P泳動速度がアポ(a)分子量に比例する、Lp(a)-粒子(「Lp(a)-P」)を単離し得る非変性ゾーンゲルを用いた協奏的なリポタンパク質免疫固定電気泳動プロトコルが実施された。これらの研究以前には、完全なリポタンパク質としてアポリポタンパク質と脂質粒子との組み合わせに関する情報を保存する非変性様式でアポ(a)垂型の分子量を特徴付けるための方法は存在しなかった。かかる不具合は、非効率的な複数の分析ステップの必要または患者のリポタンパク質プロフィールの不十分な特徴付けをもたらす。本明細書に例証される一実施形態では、Lp(a)粒子数とアポ(a)垂型サイズとの両方を提供するための集団スクリーニングに好適である単純で迅速な単一のゾーンゲルIFE方法が説明される。本明細書に説明される方法は、試料を分析するための短い時間(およそ90分)という利点を有するのみでなく、費用効率も良い。かかる方法は、既存の技術における著しい改善である。

30

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1A-1B】本明細書に説明される通り、リボ-IFEプロトコルの結果を介した可変的なLp(a)-P泳動の速さを示す。図1Aは、Lp(a)泳動の差を評定するための基本的なゲル例を提供する。図1Aは、LDL、VLDL、中央Lp(a)、より低速の陰極Lp(a)、及びより高速の陽極Lp(a)に対応するゲル例上の電気泳動バンドリングを標識する。図1Bでは、本出願におけるプロトコルに従って泳動された5つの試料の結果が示される。試料は全て、LDL及びVLDLを含有し、また陰性対照以外はLp(a)粒子をさらに含む。基準(既知の)Lp(a)含量は、600~650kDのアポ(a)部分を含む。レーン2内の「陽極」試料は、650kD超のアポ(a)部分を有するLp(a)を含有し、レーン3内の「中」試料は、基準と同一の質量、600~650kDのアポ(a)部分を含有し、「陰極」試料は、約600kD未満のアポ(a)部分を含有する。図1A及び1Bは、Lp(a)垂型の差別的検出及び定量化の原理を例証する。

40

【0016】

【図2】本明細書に説明されるリボ-IFEプロトコルを介して分離された、ゾーンゲル上の差別的Lp(a)-P泳動バイアスを有する試料の例を示す。図2では、一連の試料

50

が、リポ - I F Eシステム上で並行してゲル上で泳動されている。ゲルの陰極及び陽極端部がラベル付けされ、実線はアポ (a) 質量が約 6 0 0 ~ 6 5 0 k D である分離後の L p (a) 粒子の位置を表し、これは大きな (陽極) 粒子を小さな (陰極) 粒子と区別する。4 つの試料が強調されている (試料番号 1 0、7 3、2 4、及び 4 4)。これらの試料は、より小さな垂型 (試料 1 0 及び 7 3、点線で囲まれ、基材の陰極端部に向かって位置付けられる) 及びより大きな垂型 (試料 2 4 及び 4 4、実線で囲まれ、基材の陽極端部に向かって位置付けられる) の泳動の速さによる、明確な L p (a) 垂型サイズの差を示す。「 D B L 」は、レーン内の 2 つのアポ (a) イソ型の存在を示す。

【 0 0 1 7 】

【 図 3 】 図 2 に示されるゾーンゲル (リポ - I F E プロトコル、差し込み図) をウエスタンブロットにおける同一の試料と比較する。図 3 では、試料 2 4、7 3、4 4、及び 1 0 が、L p (a) 粒子からのアポ (a) の除去後にウエスタンブロット分析においてさらに分析される。ウエスタンブロット分析は、Novex WesternBreeze 発色性ウエスタンブロット免疫検出キット (Invitrogen Life Technologies) を使用して、アポリポタンパク質 (a) イソ型分析 (A A I S O) を用いる標準的なプロトコルを使用して実施された。複数の基準標準は、可変的なレーンを点在させる。試料 2 4 は、陽極 (またはより大きな) L p (a) 粒子であり、ウエスタンブロットにおいて約 7 0 0 k D 及び 7 0 0 k D 超に現れるより大きな分離されたアポ (a) を示す。試料 7 3 は、陰極性 (またはゾーンゲル中のより小さな粒子) であり、ウエスタンブロットにおいて約 6 0 0 k D のより小さなアポ (a) 部分に対応する。試料 4 4 及び 1 0 は、ウエスタンブロット上の約 7 0 0 k D におけるより大きなアポ (a) バンドを同様に有する陽極 L p (a)、及び 4 5 0 k D 未満におけるより小さなアポ (a) バンドを有する陰極 L p (a) によるパターンを反復する。「 D B L 」は、レーン内の 2 つのアポ (a) イソ型の存在を示す。

【 0 0 1 8 】

【 図 4 A - 4 B 】 ハイスループット泳動での L p (a) - P 泳動分別のさらなる例を示す (実施例 1、及びその全体が参照により本明細書に援用される Guadagno et al., " Validation of a Lipoprotein (a) Particle Concentration Assay by Quantitative Lipoprotein Immunofixation Electrophoresis, " Clin Chim Acta 439: 219 - 224 (2014) を参照)。ハイスループットは、自動器具上での試料の多様性の並行分析に關与し、この場合はリポ - I F E (Helena Laboratories) である。この実験では、2 つのマウス変異体を含む 1 3 1 個の試料が試験された。試料は、それらの電気泳動の泳動速度 (泳動速度とアポ (a) サイズとの関係性を確認するため) 及び質量指標に対する L p (a) - P に基づいて選択された。図 4 A 及び 4 B では、並行して泳動されたゾーンゲルは、ハイスループット実験において患者試料間での変動を示す。約 6 5 0 k D 超の陽極粒子及び約 6 0 0 k D 未満の陰極粒子が識別される。陽極試料は、試料番号 1 1 4 7、1 2 0 0、0 4 8 1、1 6 2 1、2 4 2 0、2 4 9 5、及び 2 6 1 8 を含む。陰極試料は、試料番号 1 1 0 1 及び 2 6 1 1 を含む。

【 0 0 1 9 】

【 図 5 】 ゾーンゲル上の一連の試料中のアポ (a) 含量及びアポ B 含量の比較を示す。図 5 では、5 個の試料が抗アポ B 血清及び抗アポ A 血清によってプローブされ、二重バンディング、それらの L p (a) 粒子上に 2 つのサイズのアポ (a) 部分を有するいくつかの対象の生成物を示した。L p (a) 二重バンディングは、試料 1、3、4、及び 5 において見られ、これらの試料は、生理食塩水レーン内の非特異的なタンパク質残基を伴わないアポ B プローブ応答とアポ (a) プローブ応答との両方を含有する。二重バンディングは、人工的ではなく、本方法の感受性及び分解力を確認する。L p (a) 二重バンディングは、等しいか、主に陰極性であるか、または差別的な分解を伴う陽極性であり得る。試料 2 は、単一の L p (a) を有するが、アポ B 応答及びアポ (a) 応答の両方を含有し、L

10

20

30

40

50

DLに対して陰極性であり、生理食塩水レーン内に非特異的なタンパク質残基を伴わない。二重バンドの頻度は、 $< 1\%$ である。生理食塩水プローブが、人工的バンドの存在を確立するために使用される。

【0020】

【図6A - 6R】ウエスタンブロットによって測定された、増加するMWのアポ(a)に関連付けられるLp(a) - Pゾーン泳動速度(図2、4A、及び4Bからの差し込み図)を比較するデータを提示する。図6A ~ 6Rでは、Lp(a)ゾーン泳動バイアスを有する100個を超える試料が、上記に説明される通りウエスタンブロット分析によるアポ(a)イソ型サイズ分析と比較された。図3に示されるものと同じの設定及び分析を反映する19個の実験の結果が提示される。結果は、同一の粒子から分離されたアポ(a)部分のより集中的な分析による、Lp(a) - P垂型サイズを分析するための新規のゾーンゲル方法の一貫した一致を示す。「DBL」は、レーン内の2つのアポ(a)イソ型の存在を示す。

10

【0021】

【図7】Lp(a)、LDL、及びVLDL粒子に結合した標識された抗アポB抗体のための蛍光画像化を示す。画像は、3Bロット/TBS画像(湿潤)である(その全体が本明細書に援用される、Guadagno et al., "Validation of a Lipoprotein(a) Particle Concentration Assay by Quantitative Lipoprotein Immunofixation Electrophoresis," Clin Chim Acta 439: 219 - 224 (2014)にも説明される)。概して、電気泳動の後、ゲルブロックは除去され、剛性の抗血清プレートがゲル状に定置される。抗体は、標準的な生理食塩水で1:4に希釈され、プレートを通じてゲル上に2分間投与された。過剰な抗体は、ブロット及びプレスすることによって除去された。残留マトリックス抗体は、トリス-緩衝生理食塩水槽内で1分間ゲルを再水和することによって除去された。これらのステップは、3回実施された。ゲルは続いて、56°Cで8分間乾燥され、次にアシッドバイオレットで染色され、スキャンされた。上行は、それぞれの列において、5:1(A1)、7.5:1(A2)、及び10:1(A3)のAlexa Fluor(登録商標)蛍光染料:ポリクローナル抗体の希釈レベルにおける試料3022を示す。同一の実験が、試料3052に関して下行に示される。希釈比間において、光学的特性の観察可能な差はない。

20

30

【0022】

【図8A - 8E】単一試料中のLDL - PからのLp(a) - Pの差異化に関する、アシッドバイオレット染色検出法(A/V)及びアポB*蛍光タグ付き抗体標識法(抗アポB抗体が、Alexa Fluor(登録商標)488または同様のものなどのフルオレセイン誘導体で標識され、リポタンパク質で培養された後、洗浄及び分析される)の初期の比較の結果を示す。図8Aは、アシッドバイオレット染色によって標識された二重泳動を含むそれぞれの列における、試料番号3022及び3052の天然ゾーンゲル分離を示す。合計4個の試料が泳動され、LDLは強いバンドとして、またLp(a)がその下の弱いバンドとして明らかである。図8Bは、同一の試料の蛍光による光学画像化を示し、3022は上行に、3052は下行にある。列は、前述の試薬A1、A2、及びA3中の異なる蛍光染料:抗アポB比に対応する。図8Cは、各試料の光学密度読み取りの数値結果を提示し、%Lpaは、総検出試料のLp(a)(リポタンパク質a)のパーセントを意味し、%LDLは、総検出試料のLDL(低密度リポタンパク質)のパーセントを意味する。図8Dは、プロフィール内の試料3022のアシッドバイオレット染色の光学密度読み取りであり、図8Eは、プロフィール内の試料3022の蛍光共役体の光学密度読み取りである(A/Vプロフィールの逆方向)。

40

【0023】

【図9A - 9E】単一試料中のLDL及びVLDLからのLp(a) - Pの差異化に関する、アシッドバイオレット染色検出法(A/V)及びアポB*蛍光タグ付き抗体標識法の

50

初期の比較の結果を示す。図9 Aは、アシッドバイオレット染色によって標識された二重泳動を含むそれぞれの列における、試料3034及び3051の天然ゾーゲル分離を示す。合計4個の試料が泳動され、LDLは強いバンドとして、またLp(a)がその下の弱いバンドとして明らかである。図9 Bは、同一の試料の蛍光による光学画像化を示し、3034は上行に、3051は下行にある。列は、前述の試薬A1、A2、及びA3中の異なる蛍光染料：抗アポB比に対応する。図9 Cは、各試料の光学密度読み取りの数値結果を提示し、%Lpaは、総検出試料のLp(a)（リポタンパク質a）のパーセントを意味し、%LDLは、総検出試料のLDL（低密度リポタンパク質）のパーセントを意味する。さらなる詳細な分析は、Lp(a)/LDLレベルを下回るLp(a)、VLDL、及びLDLのレベルを示す。図9 Dは、プロフィール内の試料3051のアシッドバイオレット染色の光学密度読み取りであり、図9 Eは、プロフィール内の試料3051の蛍光共役体の光学密度読み取りである（A/Vプロフィールの逆方向）。

10

【0024】

【図10 A - 10 E】単一試料中のLDL及びVLDLからのLp(a) - Pの差異化に関する、アシッドバイオレット染色検出法（A/V）及びアポB*蛍光タグ付き抗体標識法による、陽極（大きい）Lp(a)垂型及び陰極（小さい）Lp(a)垂型の差異化を比較する試料の結果を示す。図10 Aは、アシッドバイオレット染色によって標識された試料0816の天然ゾーゲル分離を左列に示す。左側では、抗アポB抗体が標識のために使用され、これはLp(a)、LDL、及びVLDLの全てに見出される。右側では、抗アポ(a)抗体が使用され、これはLp(a)粒子のみを標識する。図10 Bは、標識された同一の試料の蛍光による光学画像化を示す。列は、前述の試薬A1、A2、及びA3中の異なる蛍光染料：抗アポB比に対応する。図10 Cは、各試料の光学密度読み取りの数値結果を提示し、%Lpaは、総検出試料のLp(a)（リポタンパク質a）のパーセントを意味し、%LDLは、総検出試料のLDL（低密度リポタンパク質）のパーセントを意味する。さらなる詳細な分析は、Lp(a)/LDLレベルを下回るLp(a)、VLDL、及びLDLのレベルを示す。図10 Dは、プロフィール内の試料0816のアシッドバイオレット染色の光学密度読み取りであり、図10 Eは、プロフィール内の試料0816の蛍光共役体の光学密度読み取りである（A/Vプロフィールの逆方向）。

20

【0025】

【図11 A - 11 E】単一試料中のLDL及びVLDLからのLp(a) - Pの差異化に関する、アシッドバイオレット染色検出法（A/V）及びアポB*蛍光タグ付き標識法による、陽極（大きい）Lp(a)垂型及び陰極（小さい）Lp(a)垂型の差異化を比較する試料の結果を示す。図11 Aは、アシッドバイオレット染色によって標識された試料2377の天然ゾーゲル分離を左列に示す。左側では、抗アポB抗体が標識のために使用され、これはLp(a)、LDL、及びVLDLの全てに見出される。右側では、抗アポ(a)抗体が使用され、これはLp(a)粒子のみを標識する。図11 Bは、標識された同一の試料の蛍光による光学画像化を示す。列は、前述の試薬A1、A2、及びA3中の異なる蛍光染料：抗アポB比に対応する。図11 Cは、各試料の光学密度読み取りの数値結果を提示し、%Lpaは、総検出試料のLp(a)（リポタンパク質a）のパーセントを意味し、%LDLは、総検出試料のLDL（低密度リポタンパク質）のパーセントを意味する。さらなる詳細な分析は、Lp(a)/LDLレベルを下回るLp(a)、VLDL、及びLDLのレベルを示す。図11 Dは、プロフィール内の試料2377のアシッドバイオレット染色の光学密度読み取りであり、図11 Eは、プロフィール内の試料2377の蛍光共役体の光学密度読み取りである（A/Vプロフィールの逆順）。

30

40

【0026】

【図12 A - 12 E】単一試料中のLDL及びVLDLからのLp(a) - Pの差異化に関する、アシッドバイオレット染色検出法（AV）及びアポB*蛍光タグ付き抗体標識法による、陽極（大きい）Lp(a)垂型及び陰極（小さい）Lp(a)垂型の差異化を比較する試料の結果を示す。図12 Aは、アシッドバイオレット染色によって標識された試料3389の天然ゾーゲル分離を左列に示す。左側では、抗アポB抗体が標識のために

50

使用され、これはLp(a)、LDL、及びVLDLの全てに見出される。右側では、抗アポ(a)抗体が使用され、これはLp(a)粒子のみを標識する。図12Bは、標識された同一の試料の蛍光による光学画像化を示す。列は、前述の試薬A1、A2、及びA3中の異なる蛍光染料：抗アポB比に対応する。図12Cは、各試料の光学密度読み取りの数値結果を提示し、%Lpaは、総検出試料のLp(a)（リポタンパク質a）のパーセントを意味し、%LDLは、総検出試料のLDL（低密度リポタンパク質）のパーセントを意味する。さらなる詳細な分析は、Lp(a)/LDLレベルを下回るLp(a)、VLDL、及びLDLのレベルを示す。図12Dは、プロフィール内の試料3309のアシッドバイオレット染色の光学密度読み取りであり、図12Eは、プロフィール内の試料3389の蛍光共役体の光学密度読み取りである（A/Vプロフィールの逆順）。

10

【0027】

【図13A - 13C】二重含有試料0816、3389、及び2377を隣接するゲル上で互いに比較する、図10～12の要約を示す。図13Aは、各試料に関するアシッドバイオレット染色剤で標識されたゾーゲルを示し、第1の列に標識されたアポBが、また第2の列に標識されたアポ(a)がある。図13Bは、試料がはっきりと標識された、各試料に関する蛍光検出を示す。図13Cは、各試料及びその陽極（大きい）Lp(a)亜型及び陰極（小さい）Lp(a)亜型の相対的割合を、試料のLDL及びVLDL部分と共に要約する表を提示する。本方法は、亜型の種類及び/またはリポタンパク質の種類もしくはレベルとは独立して、各リポタンパク質の種類のレベルの算出比において良好な一致を示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0028】

本明細書に例証される態様によると、試験試料中の個々のLp(a)亜型の組成を決定するための方法が提供される。本方法は、(a)対象から取得されたLp(a)亜型を含む試験試料を提供することと、(b)試験試料中のLp(a)亜型を電気泳動ゲルに沿って分離することと、(c)個々のLp(a)亜型の泳動速度を電気泳動ゲルに沿って測定することと、(d)その測定に基づいて、個々のLp(a)亜型の泳動速度を基準値と比較することと、(e)その比較に基づいて、個々のLp(a)亜型のモル質量を決定することを含む。

【0029】

上記の通り、アポ(a)は、Lp(a)粒子を部分的に含む1つのかかるタンパク質である。アポ(a)は、クリングル反復を有すると説明される領域であるタンパク質中のアミノ酸の特定の配列の反復により、ある範囲のサイズを有し得る。Lackner et al., "Molecular Basis of Apolipoprotein (a) Subform Size Heterogeneity as Revealed by Pulsed-Field Gel Electrophoresis," J Clin Invest 87:2153-61 (1991)、Lackner et al., "Molecular Definition of The Extreme Size Polymorphism in Apolipoprotein (a)," Hum Mol Genet 2:933-940 (1993)を参照されたく、その各々はその全体が参照により本明細書に援用される。アポ(a)中のクリングル反復の数は、10～50超の反復の範囲であり得る。同文献参照。クリングル反復による種々のサイズのアポ(a)は、アポ(a)亜型またはイソ型と呼ばれる。Lp(a)は、心臓血管疾患のリスク因子であることが知られており、クリングル反復の数の増加は、全てではないがほとんどの場合、Lp(a)濃度と逆の相関がある。それに対応して、血液中のLp(a)粒子のサイズは、心臓血管の健康に関して著しい重要性を有し得る。Rifai et al., "Apolipoprotein (a) Size and Lipoprotein (a) Concentration and Future Risk of Angina Pectoris with Evidence of Severe Coronary Atherosclerosis in Men: The Phy

30

40

50

sicians' Health Study, "Clinical Chem. 58(8):1364-1371(2004)、Erqou et al., "Apolipoprotein(a) Isoforms and the Risk of Vascular Disease," J. Am. Coll. Cardiology 55(19):2160-7(2010)、及びlipidcenter.com/pdf/Entire_Lpa_Complexities(2010)にて入手可能なThomas Dayspring "Lipoprotein(a)"を参照されたく、その各々はその全体が参照により本明細書に援用される。したがって、本明細書に説明される態様にしたがって心臓血管のリスクを決定することは、対象を低度、中程度、または高度心臓血管のリスク分類のうちの一つに割り当ててることを含み得る。リスクを決定するための生化学的マーカーのカットオフ値に関する十分に確立された助言が存在する(Rifai et al., "Apolipoprotein(a) Size and Lipoprotein(a) Concentration and Future Risk of Angina Pectoris with Evidence of Severe Coronary Atherosclerosis in Men: The Physicians' Health Study," Clin. Chem. 58(8):1364-1371(2004)、Erqou et al., "Apolipoprotein(a) Isoforms and the Risk of Vascular Disease," J. Am. Coll. Cardiology 55(19):2160-7(2010)、ならびにlipidcenter.com/pdf/Entire_Lpa_Complexities(2010)にて入手可能なThomas Dayspring "Lipoprotein(a)"、BRAUNWALD'S HEART DISEASE: A TEXTBOOK OF CARDIOVASCULAR MEDICINE 9th ed. (Bonow et al. eds. 2011)、"Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III)," JAMA 285:2486-2497(2001)、"Adult Treatment Panel III (ATP III) of the National Cholesterol Education Program. Implications of Recent Clinical Trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines," Circulation 110(2):227-39(2004)、ならびに米国国立医学図書館及び国立衛生研究所のサービスである、nlm.nih.gov/medlineplusにて入手可能なMedlinePlusを参照されたく、その各々はその全体が参照により本明細書に援用される)。

【0030】

例えば、Lp(a)粒子数のみに基づくリスク評価は、大きいまたは小さいイソ型の優勢によって修正され得る。この方法では、イソ型サイズは、複数の追加的なマーカー間の重み付け係数として使用され得る。別法として、イソ型サイズは、追加的なマーカーとは独立して評定され得る。一実施形態では、圧倒的に小さいイソ型(例えば、約640kD未満)は、高度リスク分類に割り当てることができ、圧倒的に大きいイソ型(例えば、約640kD超)は、低度リスク分類に割り当てられ得る。小さいものと大きいものとの間の差異化のイソ型のカットオフは、600kD~700kDの範囲で変動し得る。小さいイソ型サイズと大きいイソ型サイズとの間の差は、例えば、約600kD、605kD、610kD、615kD、620kD、625kD、630kD、635kD、640kD、645kD、650kD、655kD、660kD、665kD、670kD、675k

10

20

30

40

50

D、680 kD、685 kD、690 kD、695 kD、または700 kDにおいて特徴付けられ得る。一実施形態では、高度、中程度、及び低度リスク粒子サイズは、それぞれ、約600 kD未満、約600～640 kD、及び約640 kD超の分類に分けられ得る。一実施形態では、高度、中程度、及び低度リスク粒子サイズは、それぞれ、約600 kD未満、約600～700 kD、及び約700 kD超の分類に分けられ得る。患者のリスクはまた、彼らが2つの大きなアポ(a)のイソ型バージョンを有する場合は低度リスク、彼らが1つの大きいイソ型と1つの小さいイソ型とを有する場合は中程度リスク、彼らが2つの小さいイソ型を有する場合は高度リスクに特徴付けられ得る。別法として、患者は、その試料中に存在するイソ型の平均重量を取り、その平均を、三分位数に分割した集団値の中のその場所によって低度、中程度、または高度リスクとして分類することによって、低度、中程度、または高度リスクとして特徴付けられ得る。階層化のための別の方法は、クリングルIV反復を概算し、アポ(a)上のクリングルIV反復の数の三分位数に従ってリスクを階層化することを含み得る。例えば、高度リスク分類は19個未満のクリングル反復を有するアポ(a)を含み、中程度リスクは19～29個のクリングル反復を有し、低度リスクは30個超のクリングル反復を有し得る。重要なことに、リスク分類は必ずしも対称でなくてもよい。多くの場合、上位四分位数のみが高度リスクと見なされ、これは19個より少ないクリングル反復を含み、中程度及び低度リスク分類は残りの集団分布の中で分割される。分類は、結果を研究内の患者間のアポ(a)サイズと比較する長期的研究によって決定され得る。

10

20

30

40

50

【0031】

アポリポタンパク質a(「アポ(a)」)は、高度に遺伝性であり、染色体6q26～27上に位置するアポ(a)遺伝子[LPA]によって主に制御される。アポ(a)は、相互優勢的に示され、したがって2つの異なるイソ型に関する遺伝子を有する患者に対して存在し、かつ検出可能であるべきである。AAISOシステム及び本明細書に提示される方法におけるダブレットは、泳動速度の正確な制御を通じてその感受性及び分解力を確認する。本方法は、患者間のアポ(a)の多様性の妥当性をさらに検証するような集団研究を可能にする。さらに、著しく異なるアポ(a)サイズのダブレットは、相違する表現型を顧みずに平均Lp(a)質量のみを提供する従来のLp(a)質量アッセイによって「誤って決定される」。種々のアポ(a)イソ型を有するLp(a)-Pに関連付けられる心臓血管の健康リスクを考慮すると、本明細書に説明される方法は、個々の各亜型の個々のモルの貢献(molar contribution)を区別及び定量化し得るため、臨床研究、臨床リスク評価、及びCVD診断のためのより正確な方法を提供する。

【0032】

本明細書において、一態様では、無傷/天然(即ち、非変性)Lp(a)-粒子におけるアポの分子量(「MW」)を決定する方法が説明される。本明細書で使用されるとき、分子量という用語は、モル質量を指し得る。無傷または天然Lp(a)-粒子としては、ドデシル硫酸ナトリウム(「SDS」)による処理、脱脂、無傷粒子からのアポリポタンパク質の還元または除去などの変性処理を受けていないものが挙げられる。大きい及び小さいLp(a)に関連付けられるアテローム生成的な差を考慮すれば、(プロット対ゾーン提示に関して)、亜型サイズによって緩和されるLp(a)粒子数に対するCVDリスクに関するアルゴリズムが確立され得る。

【0033】

ゲル電気泳動は、分子をそれらのサイズ及び電荷に基づいて分離するために使用される技術であり、以下の等式に従う： $V = EZ / F$ 、式中、 V = 泳動の速さ(速度)であり、 E は、電界の強度であり、 Z は、分子上の電荷であり、 F は、分子の摩擦力である。ゾーンゲル電気泳動では、電界が適用されると、溶液中の陽イオン(正荷電)はゲル電気泳動の陰極(負荷電)に向かって泳動し、一方、陰イオン(負荷電)はゲル電気泳動の陽極(正荷電)に向かって泳動する。泳動速度は、タンパク質の電荷とその質量との間の比に比例する。単位質量当たりの電荷が高くなればなるほど、泳動はより速くなる。変性ゲル(ゾーンゲルと区別される)中では、タンパク質は、SDSなどの洗剤の添加によって変性

されて、それらを分子量に従って独占的に分離することに留意されたい (Shapiro et al., "Molecular Weight Estimation of Polypeptide Chains by Electrophoresis in SDS-Polyacrylamide Gels," Biochem. Biophys. Res. Commun. 28: 815 - 820 (1967)、その全体は参照により本明細書に援用される)。SDSは、タンパク質が強い還元剤に曝露されて、ジスルフィド結合をスルフヒドリルに還元すると、ポリペプチドを荷電した変性状態に維持する弱い還元剤であるアポ(a)はジスルフィド結合によってアポBに付着されているため、かかる還元は、アポ(a)をLp(a)粒子から効果的に放出する。SDSは、分子に、サイズに直接関係したゲルを通じた泳動を可能にする正味負電荷を付与する。それに加えて、変性は、二次、三次、及び四次構造を妨害し、したがって泳動速度は、生体分子構造ではなくサイズに比例する。ゾーンゲルは、タンパク質の構造を変化させないであろう非変性条件下で泳動され、分離は、主に分子上の負電荷(pH約9のゲルによって引き起こされる)に比例し、二次的にのみサイズ(電気浸透によって増大された緩衝ゲルマトリックス内部の粒子のハイドロ耐性に起因する)による。ゾーンゲルは、例えば、その全体が参照により本明細書に援用される Jeppsson et al., "Agarose Gel Electrophoresis," Clin. Chem. 25/4: 629 - 638 (1979)に説明される。

10

20

30

40

50

【0034】

基本的に、脂質粒子上のアポリポタンパク質が大きくなればなるほど、負電荷(Z)の合計は大きくなるであろう。粒子上の摩擦力(F)は、脂質粒子のサイズに対して大きいゲル孔マトリックスのため最小であり、流体力学耐性を従属させるように低減される。したがって、 $V \sim EZ$ 及び定電圧において、Vは、Zに比例する。Lp(a)垂型の分離のために、Lp(a)-Pは、単一のアポB(MW約540kD)及び単一のアポ(a)を有する脂質粒子である。しかしながら、アポ(a)の垂型は、300kD~900kDで変動し得る。Lp(a)-P上の総電荷は、アポBとアポ(a)の特定の多形のイソ型との両方からの電荷の和である。アポBは一定のMWを有するため、Lp(a)-Pの電荷の変動は、アポ(a)サイズの関数であろう。泳動速度(VはZに比例する)は、アポ(a)垂型からの差別的な電荷の関数であり、それはアポ(a)サイズ(即ち、アポ(a)MW)に直接比例する。

【0035】

本明細書で使用されるとき、用語「リポタンパク質粒子」、「脂質タンパク質粒子」、「脂質粒子」などは、タンパク質と脂質との両方を含有する粒子を指す。リポタンパク質粒子の例は、下記により詳細に説明される。

【0036】

本明細書で使用されるとき、用語「リポタンパク質粒子数」は、体液中に存在するリポタンパク質粒子のモル濃度(nmol/L)を指す。粒子数は、モル濃度としてnmol/Lで測定され得る。

【0037】

本明細書で使用されるとき、用語「アポリポタンパク質」は、脂質と組み合わせさせてリポタンパク質粒子を形成するタンパク質を指す。アポリポタンパク質の種類は、下記により詳細に説明される。アポリポタンパク質の固有の性質は、リポタンパク質粒子数の概算を提供する、リポタンパク質粒子に対するそれらの化学量論的關係性であり、これは下記により詳細に説明される。

【0038】

本発明による好適な生物学的試料または生体試料としては、ヒト生体マトリックス、尿、脳脊髄液、全血、血漿、血清、及びヒトリポタンパク質画分が挙げられる。例えば、試料は、新鮮な血液または保管された血液もしくは血液画分であってもよい。試料は、本発明のアッセイのために明確に取得された血液試料であってもよく、または本発明による方法に従う使用のために副標本を取ることができる、別の目的のために取得された血液試料

であってもよい。例えば、生物学的試料は、全血であってもよい。全血は、標準的な臨床手順を使用して対象から取得されてもよい。生物学的試料はまた、血漿であってもよい。血漿は、抗凝固処理血液の遠心分離によって全血試料から取得されてもよい。生物学的試料はまた、血清であってもよい。試料は、必要に応じて適切な緩衝液中の希釈によって事前処理されるか、所望により濃縮されるか、または超遠心分離、高速液体クロマトグラフィー（FPLC）による画分、もしくは沈殿を含むがこれらに限定されない任意の数の方法によって画分されてもよい。例えば、リン酸塩、トリスなどの多様な緩衝剤のうちの1つを生理的～アルカリ性pHで用いる多数の標準的な水性緩衝液のいずれかが、使用され得る。

【0039】

本明細書に説明される方法は、任意の好適なゲル電気泳動システム及び/または方法と共に使用され得る。物理的構造及び方法の説明において、実施例及び対応する図は、使用されるゲルの実施形態及び本明細書に説明される方法の結果を示す。好適なゲル電気泳動システム及び方法としては、例えば、国際公開第2013/181267号及び米国特許出願公開第2012/0052594号に説明されるものなどが挙げられ、その各々はその全体が参照により本明細書に援用される。本明細書に説明される方法に従って使用され得るLp(a)-Pの検出のための装置としては、その全体が参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第2012/0052594号のものが挙げられる。免疫固定法、例えば、その全体が参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第2012/0052594号に説明されるものなどにおいては、生物学的試料（例えば、血清）が基材に適用され、構成成分が電気泳動される。血液の特定の構成成分を標的とする抗血清含有標識抗体（例えば、抗アポB抗体）が基材に適用される。抗体は、それらの抗原標的に結合し、標的は、標識を検出するいくつかの手段を通じて識別され得る。

【0040】

下記により詳細に説明される通り、本明細書に説明される方法はまた、ゲルをタンパク質染料（例えば、アシッドバイオレットなど）と接触させることによって検出される非標識抗体を用い得る。したがって、本明細書に説明される方法は、電気泳動ゲルを個々のLp(a)粒子上のアポBを染めるタンパク質染料と接触させ、続いて、染められたLp(a)垂型を検出することを含み得る。染料の結合は、アポBに対する抗アポBに結合した染料に関連付けられる。これは、一次シグナルを表す。アポ(a)に結合した染料は、PAb-アポB-A/Vによって生成されるシグナルに対して、二次シグナルノイズである。タンパク質染料は、アシッドバイオレットであり得る。非限定的な実施例では、タンパク質染料はまた、Coomassie染料、その誘導体もしくは改良版、例えば、Bio-Safe（登録商標）（Bio-Rad, Hercules, Calif.）もしくはSimply Blue（登録商標）（Invitrogen, Carlsbad, Calif.）もしくはImperialタンパク質染色剤（Thermo Fisher Scientific, Rockford, 111.）、銀系染色剤、亜鉛系染色剤、蛍光染料であってもよく、あるいは官能基に特異的な染色剤、例えば、糖タンパク質染色剤、リンタンパク質染色剤、Hisタグ染色剤、または任意の他の種類の染色剤もしくは染色剤の組み合わせがあってもよい。かかる方法は、例えば、参照により本明細書に援用されるH. J. CONN'S BIOLOGICAL STAINS (R. D. Lillie ed., Williams & Wilkins 1977) またはThermo Scientificによる商業文献（例えば、Pierce Protein Biology Products）に説明される通り、当業者に周知である。本明細書に説明される方法の1つの顕著な利点は、Lp(a)-pを検出するために一般的に使用されるアッセイ技術に関わる蛍光の使用を伴わずに実施され得るということである。かかる技術は、高価な試薬を必要とするだけでなく、時間がかかり、多くは完了するまでに多くの日数を必要とする。したがって、本明細書に説明される方法は、試料を分析するための短い時間（およそ90分）という利点を有するのみでなく、費用効率も良い。したがって、本明細書に説明される特定の方法では、本方法は、Lp(a)-pの検出のための蛍光の使用を含

10

20

30

40

50

まない。

【0041】

上記の通り、本明細書に説明される方法は、分離された個々のLp(a)垂型を、検出の前にゲル内に固定することを含み得る。分離された個々のLp(a)垂型の固定は、周知の通り、ゲルを好適な抗体（または抗血清含有抗体）と接触させることによって実施され得る。抗体は、抗アポB抗体であり得る。かかる固定の後、ゲルのタンパク質染色剤（本明細書に説明される通り、アシッドバイオレットなど）との接触、及び密度測定器を使用した染色されたLp(a)-P垂型の検出が続き得る。

【0042】

ゲル電気泳動は、1次元または2次元であり得る。等電点電気泳動もまた、実施され得る。本発明に伴う使用に好適な電気泳動ゲル基材は、当業者に既知である。例えば、好適なゲル基材としては、限定されるものではないが、アガロースまたはポリアクリルアミドまたはこの2つの配合物が挙げられる。上述の通り、SDS-PAGE（ポリアクリルアミド）ゲルは、SDSがタンパク質を負電荷で覆うため、タンパク質をそれらのサイズに基づいて分離する。アガロースゲル上でのタンパク質の分離は、電荷による。したがって、同じく上記に述べられる通り、本明細書に説明される実施形態は、ゾーンゲル電気泳動を使用し得る。非変性タンパク質が電荷によって分離されるゾーンゲル電気泳動は、単純な高分解プロトコルの利益を提供する。

10

【0043】

様々なサイズの電気泳動ゲルは、種々の数のレーン及び行（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10など）を含有し得る。単一の個体または対象に由来する生物学的試料が、複数の構成成分を識別するためにプローブされてもよく、及び/または複数の個体に由来する血清が試験されてもよい。異なるサイズのゲル上で電気泳動を実行するためのプロトコルは、そのサイズのゲル上での分離を最適化するために修正がなされ得ることを除いて、同様であろう。

20

【0044】

本明細書に説明される態様による方法はまた、個々のLp(a)垂型のモル質量の決定に基づいて、異なるモル質量の少なくとも2つのLp(a)垂型を特徴付けることも含み得る。かかる特徴付けは、特定の範囲（例えば、約600kD未満、約600kD~700kD、または約700kD超）内であるモル質量を有する個々のLp(a)垂型のレベルまたは濃度を決定することを含み得る。試料中の特定のLp(a)垂型の濃度またはレベルの決定は、電気泳動ゲルに沿って分離されるLp(a)垂型の密度測定的特徴付けを含み得る。例えば、検出されたタンパク質の濃度を検出および決定するための密度測定の使用は、下記により詳細に説明される。本方法は、異なるモル質量の少なくとも2つのLp(a)垂型の特徴付けに基づいて、特徴付けられたLp(a)垂型のLp(a)垂型サイズ分布を決定することをさらに含み得る。

30

【0045】

本明細書に説明される態様による方法はまた、試料中に存在するLp(a)、個々のLp(a)垂型、またはその両方の総粒子数を測定することも含み得る。

【0046】

背景として、電気泳動は、相対的な濃度を測定し、即ち、エレクトロフェログラムを生成するために、パーセンテージ画分が、シグナルに翻訳されている検出されたバンドからの曲線下の領域として算出される。具体的には、電気泳動の後、ゲルは、タンパク質染料（例えば、アシッドバイオレット）で染色され、密度測定器の光学システムを通過させて、分離されたバンドの視覚的な図またはグラフである電気泳動図を作成し得る。密度測定器は、染色されたゲルなどの固体試料を通じて伝達される光を測定する特別な分光光度計である。吸光度は、密度測定を用いて測定され得、蛍光は、Bio Rad Chemidoc（登録商標）計器によって提供されるものなどの光子計数画像化プロトコルを用いて特定され得る。光学密度測定を使用して、密度測定器は、染色の検出されたバンドをピークとして表す。これらのピークは、グラフまたは電気泳動図を構成し、記録計チャートま

40

50

たはコンピュータディスプレイ上に印刷される。積分器またはマイクロプロセッサは、各ピーク下の領域を評定し、その各々を総試料のパーセントとして報告する。例えば、電気泳動が血清タンパク質の分離に使用されている場合、各バンドの濃度は、このパーセント及び総タンパク質濃度に由来する。

【0047】

Lp(a) 亜型はアポBとの既知の化学量論的關係性（即ち、1：1化学量論のアポB：Lp(a) - P）を有するため、個々のLp(a) 亜型の粒子数はまた、電気泳動ゲルに沿って分離される特定の亜型のアポB濃度を測定することによっても決定され得る。粒子数は、試料中の総脂質粒子または脂質粒子濃度の種類を特徴付ける分離分析との比較によって定量化され得る。かかる分離分析は、超遠心分離（UC）、NMR、または試料中の粒子の濃度または総粒子数を特徴付け得る任意の他の分析方法であってもよい。しかしながら、UC及びNMRのいずれも、Lp(a) - Pを直接的または間接的に概算することはできない。どちらも、LDL - PとLp(a) - Pの総和を概算することしかできない。UC、NMR、及び電気泳動の間で相関が示されている。それらの比較は、Lp(a) - Pを伴う及び伴わない試料を使用し、電気泳動からのLp(a) - P及びLDL - Pの両方が含まれる場合に、方法間の許容される相関を示すのみである。リポ - IFE及び脂質粒子の定量化に使用される試料は、同一試料の異なるアリコートであってもよい。密度測定器ソフトウェアもまた、標本総アポBが（画分%）×（総アポB）として入力されるときに、各バンドの相対パーセント及びmg/dLを電気泳動ゲルに沿って自動的に算出し、印刷し得る。粒子数は、好ましい実験室情報システムにおいて（mg/dL）/ 0.054 = PNとして算出される。変換因子（mg/dL）/ 0.054は、以下から算出される：

【数1】

$$\left[\text{アポB (mg/dL)} \times (10 \text{ dL/L}) \times (106 \text{ nmol/mmol}) \right] / \left[\text{アポBの分子質量 (540,000 mg/mmol)} \right]$$

結果は、粒子数として報告される（PN = nmol/L）。

【0048】

試験試料中のLp(a) 亜型を電気泳動ゲルに沿って分離することは、試験試料中のLp(a) 亜型を電気泳動ゲルの第1のレーンに沿って分離することを含み得る。個々のLp(a) 亜型の泳動速度を基準値と比較することは、個々のLp(a) 亜型の泳動速度を、電気泳動ゲルの第2のレーンに沿って分離された対照試料と比較することを含み得る。

【0049】

電気泳動を実行することは、その全体が参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第2012/0052594号に説明される通り、体液中に存在するLp(a) 亜型のレベル及び/または分子質量を評価するための方法の一部として、電気泳動ゲルの受容ウェル中に試料を堆積させるステップを実施することを含み得る。代表的な方法は、体液試料中に存在するリポタンパク質粒子を、ゲル電気泳動基材上でのゲル電気泳動によって分離することと、基材を抗体に曝露して、リポタンパク質粒子のリポタンパク質粒子または構成成分に関連付けられる免疫学的に活性な薬剤を検出することと、タンパク質または脂質の存在の検出のために基材を試薬に曝露することと、Lp(a) 亜型のレベル及び/または分子質量を決定することを含む。

【0050】

本明細書に説明される方法はまた、（その全体が参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第2013/0319864号に説明される通り）現場検量と共に実施されてもよく、また試験試料の体積を検量試料の体積または量と組み合わせ、最終体積を形成することを含んでもよく、この場合、検量試料の体積または量は、既知の濃度の検量用試料（calibrator）を含み、最終体積は、既知の試験試料対検量試料比を含む。別法として、既知の濃度の検量用試料を提供し、かつ体積の変化を提供しないように、

10

20

30

40

50

既知の質量の乾燥検量用試料が試験試料中に混合されてもよい。本方法はまた、充填画分を受容ウェル、電気泳動ゲル中に堆積させることであって、この場合、充填画分が最終体積の画分である、堆積させることと、試験試料及び検量用試料の構成成分が共通の分離レーンに沿って互いに分離されるように、充填画分を電気泳動ゲルの共通の分離レーンに沿って分離することとも含む。本方法はまた、検量用試料と試験試料の分離された構成成分とを共通の分離レーン内で検出することと、その検出に基づいて、検量用試料と試験試料の分離された構成成分とのレベルを測定し、それによって電気泳動を現場検量と共に実施することとも含む。

【0051】

したがって、本明細書に説明される基準値は、電気泳動ゲルに沿って分離される対照Lp(a)亜型であり得る。基準値はまた、比較のために使用される所定の値であり得る。

10

【0052】

本方法は、Lp(a)粒子を、例えば、700kD超、600kD未満、及び600~700kDの分子量のアポ(a)タンパク質と区別し得る。一実施形態では、個々のLp(a)亜型のアポ(a)タンパク質のモル質量は、600kD超である。一実施形態では、個々のLp(a)亜型のアポ(a)タンパク質のモル質量は、700kD超であるように決定される。一実施形態では、個々のLp(a)亜型のアポ(a)タンパク質のモル質量は、600~700kDである。一実施形態では、個々のLp(a)亜型のアポ(a)タンパク質のモル質量は、600kD未満である。

【0053】

20

本明細書に例証される態様に従って個々のLp(a)亜型のモル質量を決定することは、個々のLp(a)亜型を低度、中度、または高度モル質量分類のうちの1つに割り当てることを含み得る。例えば、約600kD未満のモル質量を有する個々のLp(a)亜型は、低度モル質量分類に割り当てられてもよく、約600kD~700kDのモル質量を有する個々のLp(a)亜型は、中度モル質量分類に割り当てられてもよく、約700kD超のモル質量を有する個々のLp(a)亜型は、高度モル質量分類に割り当てられてもよい。

【0054】

本明細書に例証される態様によると、試験試料の個々のLp(a)亜型は各々、検出可能なシグナルを生成するか、またはその生成を引き起こすことができるシグナル生成分子に結合され得る。したがって、一実施形態では、本方法はまた、シグナル生成分子に結合された試験試料の分離された個々のLp(a)亜型を、シグナル生成分子と相互作用することができる試薬と接触させることを含み、シグナル生成分子は、試薬との接触時に検出可能なシグナルを生成し、該方法は、検出可能なシグナルを検出することをさらに含む。

30

【0055】

一実施形態では、試験試料の個々のLp(a)亜型は、互いに区別可能なシグナル生成分子に結合される。

【0056】

互いに区別可能なシグナル生成分子に関する好適なシステム及び方法としては、その全体が参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第2014/0243431号に説明される通り、電気泳動マトリックス内での脂質粒子の現場検出における使用のためのものが挙げられる。

40

【0057】

かかるシステムは、生物学的試料及び少なくとも2つのリポタンパク質結合複合体を受容するためのゲル基材を含む。各複合体は、リポタンパク質粒子またはその部分に結合する抗体を含み、該抗体は、検出可能なシグナルを生成するか、またはその生成を引き起こすことができるシグナル生成分子に結合される。少なくとも2つのリポタンパク質結合複合体の各検出可能なシグナルは、他方の検出可能なシグナルと区別可能である。システムはまた、検出可能なシグナルを検出するための機器も含み、検出することは、生物学的試料中の特定のアポリポタンパク質及び/またはリポタンパク質粒子のレベルを示す。

50

【0058】

本明細書で使用されるとき、用語「抗体」は、天然の源または組み換えの源に由来する無傷免疫グロブリン、及び無傷免疫グロブリンの免疫反応性部分（即ち、抗原結合部分）を含むように意味される。本発明の抗体は、多様な形態で存在してもよく、例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、細胞内抗体、抗体断片（例えば、Fv、Fab、及びF(ab)2）、ならびに一本鎖抗体（scFv）、キメラ抗体、及びヒト化抗体が挙げられる（Ed Harlow and David Lane, USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)、Houston et al., "Protein Engineering of Antibody Binding Sites: Recovery of Specific Activity in an Anti-Digoxin Single-Chain Fv Analogue Produced in Escherichia coli," Proc Natl Acad Sci USA 85: 5879-5883 (1988)、Bird et al., "Single-Chain Antigen-Binding Proteins," Science 242: 423-426 (1988)、これらはその全体が参照により本明細書に援用される）。

10

【0059】

モノクローナル抗体生成のための方法は、当該技術分野において周知の技術を使用して実施され得る（MONOCLONAL ANTIBODIES - PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATIONS (Mary A. Ritter and Heather M. Ladyman eds., 1995)、その全体は参照により本明細書に援用される）。ポリクローナル抗体を作成するための手順も、周知である（Ed Harlow and David Lane, USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988)、その全体は参照により本明細書に援用される）。

20

【0060】

例えば、ポリクローナル抗体は、ウサギなどの好適な動物宿主に関心のリポタンパク質及びアジュバントを注射することによって生成され得る。およそ0.02ミリリットルが注射され、ピーク抗体力価が達成されるまで21日毎に再注射が発生し得る。抗体力価は、例えば、耳の血液によって試験され得る。アポB-100または他のアポリポタンパク質に対する抗体は、この様式で生成され得る。別法として、アポB-100または他のアポリポタンパク質に対する抗体は、商業的に購入されてもよい。

30

【0061】

抗体は、例えば、アポ(a)上の異なるクリングル、特に、アポ(a)上の反復クリングルIV及び任意の他のクリングルなどの、同一のタンパク質の異なる部分を区別するのに十分な高レベルの特異性を伴って発生され得る。Lp(a)亜型はクリングル反復の数によって区別されるため、クリングル含量を特徴付けることは、Lp(a)サイズの非常に詳細な識別を促進し得る。かかる抗体は、例えば、異なる色の蛍光プローブ（上記に説明される通り）などで標識され、アポリポタンパク質の種類は、極めて詳細に区別され得る。下記に説明される通り、詳細な測定の絶対レベル及び比は、報告され、リスク因子に変換され得る。例えば、小さいLp(a)対大きいLp(a)の比が、高度、中度、及び低度リスク範囲の特定のカットオフと共に報告され得る。

40

【0062】

全抗体に加えて、本発明は、かかる抗体の結合部分を包含する。かかる結合部分としては、一価Fab断片、Fv断片（例えば、一本鎖抗体、scFv）、単一可変VH及びVL領域、ならびに二価F(ab')2断片、Bis-scFv、二重特異性抗体、三重特異性抗体、小型抗体などが挙げられる。これらの抗体断片は、例えば、その全体が参照により本明細書に援用されるJames Goding, MONOCLONAL ANTI

50

BODIES : PRINCIPLES AND PRACTICE 98 - 118 (Academic Press , 1983) 及び Ed Harlow and David Lane , ANTIBODIES : A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Laboratory , 1988) に説明されるタンパク質分解性断片化手順、または当該技術分野において既知である他の方法などの従来の手順によって作成され得る。

【 0063 】

検出可能なシグナルを生成するか、またはその生成を引き起こすことができる好適なシグナル生成分子は、当業者に既知であろう。検出可能なシグナルとしては、放射分析、比色分析、蛍光分析、サイズ分離、もしくは沈殿手段、または当該技術分野において既知である他の手段による検出及び/または測定に好適な任意のシグナルが挙げられる。

10

【 0064 】

検出可能なシグナルを生成するか、またはその生成を引き起こすことができるシグナル生成分子の例としては、種々の酵素、補欠分子族、蛍光材料、発光材料、生物発光材料、放射性材料、陽電子放出金属、及び非放射性的常磁性体金属イオンが挙げられる。シグナル生成分子は、当該技術分野において既知である技術を使用して、抗体に直接的に、または中間物（例えば、当該技術分野において既知であるリンカー）を通じて間接的にかのいずれかで連結または共役され得る。例えば、本発明による診断法としての使用のために抗体に共役され得る金属イオンに関しては、米国特許第 4,741,900 号を参照されたい。さらなる例としては、限定されるものではないが、種々の酵素が挙げられる。酵素の例としては、限定されるものではないが、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、もしくはアセチルコリンエステラーゼ、補欠分子族複合体、例えば、限定されるものではないが、ストレプトアビジン/ビオチン及びアビジン/ビオチンなどが挙げられる。蛍光材料の例としては、限定されるものではないが、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシル、またはフィコエリトリンが挙げられる。発光材料の例としては、限定されるものではないが、ルミノールが挙げられる。生物発光材料の例としては、限定されるものではないが、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びエクオリンが挙げられる。放射性材料の例としては、限定されるものではないが、ビスマス (213 Bi)、炭素 (14 C)、クロム (51 Cr)、(153 Gd、159 Gd) 5 ガリウム (68 Ga、67 Ga)、ゲルマニウム (68 Ge)、ホルミウム (166 Ho)、インジウム (115 In、113 In、112 In、111 In)、ヨウ素 (131 I、125 I、123 I、121 I)、ランタン (140 La)、ルテチウム (177 Lu)、マンガン (54 Mn)、モリブデン (99 Mo)、パラジウム (103 Pd)、亜リン酸 (32 P)、プラセオジウム (142 Pr)、プロメチウム (149 Pm)、レニウム (186 Re、188 Re)、ロジウム (105 Rh)、ルテニウム ruthenium (97 Ru)、サマリウム (153 Sm)、スカンジウム (47 Sc)、セレン (75 Se)、ストロンチウム (85 Sr)、硫黄 (35 S)、テクネチウム (99 Tc)、タリウム (201 Tl)、スズ (113 Sn、117 Sn)、トリチウム (3 H)、キセノン (133 Xe)、イッテルビウム (169 Yb、175 Yb)、イットリウム (90 Y)、亜鉛 (65 Zn) が挙げられる。さらなる例としては、種々の陽電子放出トモグラフィーを使用した陽電子放出金属、及び非放射性的常磁性体金属イオンが挙げられる。

20

30

40

【 0065 】

本発明による抗体 - シグナル生成分子複合体の検出はまた、シグナル生成分子と相互作用することができる試薬の添加によっても達成することができ、シグナル生成分子は、試薬との接触時に検出可能なシグナルを生成する。例えば、ルシフェラーゼが適切なルシフェリン基材に作用すると、光が放出される。

【 0066 】

例えば、酵素（例えば、ルシフェラーゼ）、蛍光色素分子、または発色団などの検出可

50

能なシグナルまた部分に連結される二次抗体も、使用され得る。

【0067】

上記の通り、少なくとも2つのリポタンパク質結合複合体の各検出可能なシグナルは、他方の検出可能なシグナルと区別可能であり得る。これは、少なくとも2つのリポタンパク質結合複合体をカクテル化することを可能にし、複合体の各々は、異なるLp(a)亜型またはその部分を検出し、各複合体はまた、異なる検出可能なシグナルを生成するか、または生成することができる。例えば、第1のリポタンパク質結合複合体は、試料中の全Lp(a)構成成分に関してアポ(a)上のクリングルIV反復に結合する、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)-標識抗体を含み得る。第2の非クリングルIV結合複合体は、アポ(a)の第2の部分に結合するローダミン-標識抗体を含み得る。第1及び第2の複合体は、混合されるか、または一緒にカクテル化され得る。これは、単一の電気泳動場所内での複数の抗原のプロープを可能にする。アポ(a)のクリングルIV反復からの強度の非クリングルIV構成成分に対する比は、既知のクリングルIV/非クリングルIV標準と比較されるときに、Lp(a)亜型サイズのより正確な測定を促進するであろう。

10

【0068】

例えば、シグナル生成分子としては、蛍光タグが挙げられ得る。蛍光タグ付け及び分子中の天然の蛍光の検出は、当該技術分野において周知である分析的化学及び生物学の方法である。蛍光を検出するために使用される計器は、以下の構成要素を含み得る。電球またはレーザーなどの広範な光学バンド幅を有する光源が、刺激光源として使用される。光学フィルタは、所望の刺激波長の光を選択し、それを試料上に発するのために使用される。光学フィルタは、本質的に任意の波長において利用可能であり、典型的には、所望の伝達波長の何分の1かの波長における薄フィルムの層の堆積によって構築される。光学フィルタから出る光は次に、試料に適用されて、蛍光分子を刺激する。

20

【0069】

分子は次に、その特徴的な蛍光波長の光を放出する。この光は、好適なレンズによって収集され、次に特徴的な波長に集中した第2の光学フィルタを通過させた後、光電子増倍管、光伝導性セル、または半導体光学検出器などの検出機器へともたらされる。したがって、所望の特徴的な波長の光のみが検出されて、蛍光分子の存在を決定する。したがって、少なくとも2つのリポタンパク質結合複合体は、異なる区別可能な蛍光波長の光を放出する蛍光分子を含み得る。

30

【0070】

蛍光タグは、それらが光学的に別個であるように、単一の領域内で多重化され得る。例えば、5個の異なる蛍光タグ、赤、緑、青、黄、及びオレンジが、同一の限定された領域に適用され、光学検出ソフトウェアによって独立して検出及び区別されてもよい。例えば、Life Technologies Alexa Fluor製品ラインは、少なくとも19個の別個の染料を含み、それは、別個の抗体をタグ付けして、個々の抗原を標識及び識別するために組み合わせられ得る。例えば、本明細書に説明される実施例に示される通り、Alexa 647、Alexa 546、及びAlexa 488は、別個の抗体をタグ付けして、個々の抗原(例えば、アポB、アポC-III、及びアポE)を標識及び識別するために組み合わせられ得る。方法を最適化し、標識間のクロストークを回避するために、Alexa 430などの追加の蛍光色素分子が含まれてもよい。光学システムは、蛍光シグナルを定量化し、シグナル値を自動的に正規化して、相対的密度または粒子数を発生させ得る。例えば、各染料の吸光/放出係数または量子力学的関連性を正規化することによって、濃度または粒子数の相対値が決定され得る。

40

【0071】

本システム及び方法はまた、検出可能なシグナルを検出するための機器または機器の使用を含んでもよく、検出することは、生物学的試料中の特定のLp(a)粒子のレベルを示す。機器はまた、シグナル生成分子の検出に基づいて、特定のLp(a)粒子のレベルを定量化し得る。

50

【0072】

電気泳動ゲル中の検出された粒子またはその部分の存在は次に、検出可能なシグナルまたは部分の測定によって定量化され得る。粒子数は次に、既知の化学量論的關係性に従って算出され得る。粒子数は、試料中の総脂質粒子または脂質粒子濃度の種類を特徴付ける分離分析との比較によって定量化され得る。かかる分離分析は、超遠心分離、NMR、または試料中の粒子の濃度または総粒子数を特徴付け得る任意の他の分析であってもよい。脂質粒子の電気泳動及び脂質粒子の定量化に使用される該試料は、同一試料の異なるアリコートであってもよい。

【0073】

かかる現場検出に好適な方法としては、生物学的試料中に存在する特定のLp(a)亜型粒子のレベルを評価する方法が挙げられる。この方法は、Lp(a)亜型粒子を含有する生物学的試料を提供するステップと、少なくとも2つのリポタンパク質結合複合体を提供するステップとを含む。各複合体は、Lp(a)亜型粒子またはその部分に結合する抗体を含み、該抗体は、検出可能なシグナルを生成するか、またはその生成を引き起こすことができるシグナル生成分子に結合される。少なくとも2つのリポタンパク質結合複合体の各検出可能なシグナルは、他方の検出可能なシグナルと区別可能である。この方法はまた、生物学的試料を、リポタンパク質-抗体-シグナル生成分子複合体を形成するために好適な条件下で抗体と接触させることと、生物学的試料を電気泳動ゲル上に堆積させ、ゲル電気泳動を実施することによって、生物学的試料中に存在するリポタンパク質粒子を分離することとも含む。この方法は、電気泳動ゲル上でリポタンパク質-抗体-シグナル生成分子複合体のシグナル生成分子によって生成された検出可能なシグナルを検出することと、その検出に基づいて、生物学的試料中に存在する特定のLp(a)亜型粒子のレベルを決定することとをさらに含む。

10

20

【0074】

現場検出のためのさらなる方法としては、対象が心臓血管疾患の増加したリスクを有するかどうかを決定する方法が挙げられる。この方法は、生物学的試料中に存在する特定のLp(a)亜型粒子のレベルを評価することを含む。評価することは、Lp(a)亜型粒子を含有する生物学的試料を提供するステップと、少なくとも2つのリポタンパク質結合複合体を提供するステップとを含む。各複合体は、Lp(a)亜型またはその部分に結合する抗体を含み、該抗体は、検出可能なシグナルを生成するか、またはその生成を引き起こすことができる。シグナル生成分子に結合される少なくとも2つのリポタンパク質結合複合体の各検出可能なシグナルは、他方の検出可能なシグナルと区別可能である。評価するステップはまた、生物学的試料を電気泳動ゲル上に体積させ、ゲル電気泳動を実施することによって、生物学的試料中に存在する脂質タンパク質粒子を分離することと、生物学的試料を、リポタンパク質-抗体-シグナル生成分子複合体を形成するのに好適な条件下で少なくとも2つのリポタンパク質結合複合体と接触させることと、電気泳動ゲル上でリポタンパク質-抗体-シグナル生成分子複合体のシグナル生成分子によって生成された検出可能なシグナルを検出することと、その検出に基づいて、生物学的試料中に存在するLp(a)亜型粒子のレベルを決定することとを含む。本方法はまた、決定されたLp(a)亜型粒子のレベルを対照または基準値と相関させて、対象が増加した心臓血管疾患のリスクを有するかどうかを決定するステップも含む。

30

40

【0075】

本明細書に説明される態様による方法はまた、個々のLp(a)亜型の粒子数を測定することと、決定された個々のLp(a)亜型のモル質量及び粒子数に基づいて、試料中のLp(a)亜型のサイズ分布を決定することと、Lp(a)亜型の決定されたサイズ分布に基づいて、対象の心臓血管のリスク値を決定することとも含み得る。本明細書に説明される態様による方法はまた、試料中に存在するLp(a)の粒子数を測定することと、測定された具体的な数に基づいて、対象の心臓血管のリスク値を決定することとも含み得る。

【0076】

50

本明細書に例証される態様によると、心臓血管の健康を予測するための方法が提供される。本方法は、患者からLp(a)亜型を含む試料を取得することと、試験試料中のLp(a)亜型を電気泳動ゲルに沿って分離することと、試料中の個々のLp(a)亜型の粒子数を測定することと、測定されたLp(a)亜型の粒子数に基づいて、対象の心臓血管のリスク値を決定することを含む。

【0077】

心臓血管のリスクは、上記に説明される通り、例えば、低度(または最善)、中程度、または高度として決定され得る。

【0078】

本明細書に説明される方法はまた、対象が既存の治療計画を有するか、またはそれを受けている場合にも実施され得る。かかる方法は、決定されたLp(a)亜型のサイズ分布、Lp(a)の粒子数、またはその両方に基づいて、治療計画を修正することを含み得る。療法計画はまた、上記に説明される通り、決定された心臓血管のリスク値に基づいて修正され得る。例えば、スタチン(または、本明細書に説明される通り、他の薬物)の用量は、心臓血管のリスク値が中間または高度である場合に増加され得る。

10

【0079】

本発明はまた、決定された心臓血管疾患のリスクに基づいて、療法計画を選択することを含む。例えば、個体は、本方法に従って上昇したリスクを有すると決定されてもよく、次に治療計画は、その上昇したリスクに基づいて選択されてもよい。

【0080】

選択される療法計画としては、薬物またはサプリメントを投与することを含み得る。好適な薬物またはサプリメントとしては、当該技術分野において既知である通り、血清コレステロールの低下、LDL、IDL、及びVLDL、Lp(a)の低下、ならびに/またはHDLの上昇の目的のために投与されるものが挙げられる。

20

【0081】

好適な薬物の例としては、ナイアシン、抗炎症剤、抗血栓剤、抗血小板剤、線維素溶解剤、脂質低下剤、直接トロンピン阻害薬、糖タンパク質IIb/IIa受容体阻害薬、細胞接着分子に結合し、かかる分子に結合する白血球の能力を阻害する薬剤、カルシウムチャンネル遮断薬、 α -アドレナリン受容体遮断薬、アンジオテンシン系阻害薬、ならびにそれらの組み合わせが挙げられる。

30

【0082】

一実施形態では、選択される療法計画は、ナイアシン、フェノフィブラート、エストロゲン、及びラロキシフェンからなる群から差選択される薬物を投与することを含む。一実施形態では、選択される療法計画は、ナイアシンを含む。一実施形態では、選択される療法計画は、スタチンを含む。一実施形態では、選択される療法計画は、ナイアシン及びスタチンを投与することを含む。一実施形態では、選択される療法計画は、スタチン及びエゼチマイブを投与することを含む。一実施形態では、選択される療法計画は、ナイアシン、エゼチマイブ、スタチン、またはそれらの組み合わせを投与することを含む。

【0083】

選択される療法計画はまた、決定された心臓血管疾患のリスクに基づいて、生活スタイルの選択の実施または維持に関して助言を与えることを含み得る。生活スタイルの選択は、食事の変化、運動の変化、喫煙の低減または中止、またはそれらの組み合わせを含み得る。

40

【0084】

とりわけ、選択される治療計画の説明を含む報告も発生され得る。いくつかの実施形態では、リポタンパク質分析の結果が、かかる報告において報告される。リポタンパク質及び他の脂質分析の文脈においては、報告は、例えば、患者、臨床医、他の医療従事者、疫学者などに対して提供される報告を指し、それは、個体からの生物学的標本、例えば、血漿標本などの分析の結果を含む。報告は、印刷されたもしくは電子的な形式で、または当該技術分野において既知である通り、その中のデータの分析、再調査、及び/もしくは保

50

管に好都合な任意の形式で提示され得る。報告は、報告の個々の対象に関する情報を識別することを含んでもよく、限定されるものではないが、氏名、住所、性別、識別情報（例えば、社会保障番号、保険番号）などが挙げられる。報告は、Lp(a)に加えて、例えば、限定されるものではないが、トリグリセリド、総コレステロール、LDLコレステロール、及び/またはHDLコレステロールなどの試料中の脂質、の生化学的特徴付けを含み得る。報告は、本明細書に提供される方法によって調製される試料に対して実行されるリポタンパク質の、またしたがって基準範囲の特徴付けをさらに含み得る。用語「基準範囲」及び同様の用語は、個体の集団内で観察される典型的な標準的な範囲を反映するような、当該技術分野において既知である生物学的試料の構成成分の濃度を指す。分析報告におけるリポタンパク質の代表的な特徴付けは、VLDL、IDL、Lp(a)、LDL、及びHDL、ならびにそれらのサブクラスの濃度及び基準範囲を含み得る。報告は、リポタンパク質サイズ分布傾向をさらに含み得る。

10

【0085】

本発明はまた、選択される治療計画を対象に投与することをさらに含み得る。したがって、本発明のさらなる態様は、本明細書に説明される方法に従って決定された、上昇した心臓血管疾患のリスクを有する対象を治療する方法に関する。

【0086】

本発明はまた、心臓血管疾患を発症するリスクを監視する方法にも関する。この方法は、第1の時点で対象が増加した心臓血管疾患のリスクを有するかどうかを決定することと、1つ以上のさらに後の時点で（例えば、治療的介入の前後で、または治療的介入のコース中の進行中の時点で）その決定を反復することを含む。各進行中の時点で決定されるリスクは、対象の心臓血管疾患を発症するリスクが増加または減少しているかどうかを評定し、それによって心臓血管疾患を発症するリスクを監視するために、1つ以上のより早い時点から決定されるリスクと比較される。この方法は、決定された心臓血管疾患を発症するリスクに基づいてリスク分類を割り当てることと、進行中の時点で割り当てられたリスク分類を比較して（第1の時点で決定された第1のリスク分類を、第2の時点で取得された第2のリスク分類と比較する）、それによって心臓血管疾患を発症するリスクを監視することを含む。

20

【0087】

本明細書に例証される態様によると、心臓血管の健康を予測するための方法が提供される。本方法は、患者から試料を取得することと、試料中のLp(a)亜型のサイズ分布を測定することと、Lp(a)亜型サイズ及び/または分布に基づいて、心臓血管疾患の患者のリスクを特徴付けることを含む。一実施形態では、治療計画は、心臓血管疾患のリスクを低減するために患者に処方される。

30

【実施例】**【0088】**

以下の実施例は、本明細書において請求される主題の実施形態を例証するために提供されるが、その範囲を限定することを意図するものではない。

【0089】

実施例1 - Lp(a)亜型分析：材料及び方法

40

本明細書に説明される実験の実施において、以下のプロトコルが用いられた。血液試料は、好ましくは空腹時の患者から採取された。当該技術分野における周知の方法を使用して、少なくとも125µLの血清が血液試料の各々から調製された。各試料は、2~8で維持され、収集の4日以内に試験された。

【0090】

SPIFE 3000ゲル電気泳動及び処理計器（Helena Laboratories）が、操作者用マニュアルに提供される教示に従って、乾燥、プロット、及び再水和プロトコルの追加を伴ってコレステロール電気泳動プログラム及びIFE染色器を修正することによって調製された。操作前に、以下の溶液が調製され、計器に充填された：アシッドバイオレット染色剤（Helena 551758）

50

原料：本染色剤は、アシッドバイオレット染色剤からなる。

使用のための調製：乾燥した染色剤を1リットルの10%酢酸(900mLの脱イオン水中の100mLの酢酸)中に溶解させ、完全に混合する。SPIFE染色剤バットを充填する。

クエン酸脱染剤(Helena 551959)

原料：溶解後、脱染剤は、0.3%(重量/体積)のクエン酸を含有する。

使用のための調製：11Lの脱イオン水を脱染剤バットに注ぐ。1包装分の脱線剤を添加する。完全に溶解するまで十分に混合する。

トリス-緩衝生理食塩水

粉末は、トリス-HCl及び塩化ナトリウムと共にトリスベースを含有する。粉末を8Lの脱イオン水中に溶解させ、溶解するまで混合する。

ウシ血清由来のアルブミン(Sigma-Aldrich A7030)

原料：BSAコーン画分V、凍結乾燥粉末

使用のための調製：そのまま希釈溶液の調製において使用する。

希釈溶液；生理食塩水-NaCl 0.9%重量/体積溶液中の10%BSA。

原料：生理食塩水-塩化ナトリウム 0.9%重量/体積溶液中の10%BSA。

使用のための調製：5gのBSAを50mLの生理食塩水-0.9%重量/体積溶液に移し、溶解させる。完全に溶解するまで、およそ15分間磁気攪拌棒上で混合する。

【0091】

アルブミン希釈溶液を使用して、リポ-IFEアッセイのアポB直線性を超えて試料を希釈した。この溶液を用いた希釈は、適切な試料堆積に必要な表面張力の関係性を維持する。

【0092】

品質対照試料は、1.5mLの脱イオン水中で凍結乾燥血清を再構築し、優しく回転させ、ロッカー内で15分間培養することによって調製された。200µLのアリコートチューブに分割した。異常及び正常対照が、各ゲル上でQC溶液と共泳動された。試料調製のために、アリコートチューブ内で初めの2つの位置が保管された。試料トレイは、自動プレートキャリア(Hamilton)に充填された。試料は、SPIFE 3000試料トレイに充填された。

【0093】

ゲル調製：必要数のアプリケータブレード(Helena)が、保護ガードを取り外すことによって調製され、計器上に位置付けられた。アプリケータブレードは計器上に充填され、試薬バイアルは定位置に定位置された。0.5~1mLのREP Prep(Helena)が電気泳動チャンパフロア上に分注され、その後SPIFE Visコレステロールゲルをチャンパフロア上に配置した。ゲルが整列ピン上に位置付けられ、ゲルとDC電源との間の回路を完成させるように電極がそのピン上に位置付けられた。初期プロッター(Helena)を使用して、プロッターの縁部がマイラーバックキングの縁部と整列され、プロッターがゲルブロック間に整列された。プロッターが、ゲルのプロッターと最初に接触する側から除去された。

【0094】

操作：コレステロール操作が計器上で開始され、試料の充填が正しく進行していることが確認された。電気泳動手順は、自動的に継続した。電気泳動が完了する前に、1部の抗アポB血清を4部の標準的生理食塩水と混合することによって作業用pAbが調製された。完了後、電極プロッター及びブレードは直ちに除去された。

【0095】

「ゲルブロック除去剤」を使用して、ゲルの陰極及び陽極端部においてゲルブロックが削り取られた。剛性抗血清テンプレート(Helena)がゲル上に定置され、チャンパフロアピンをテンプレート内の穴と整列させた。250個の作業用アポB抗血清が、剛性テンプレート上の各試料レーン内に分注された。「コムプロッター」を、剛性抗血清テンプレートの陽極ポート上に定置し、過剰な抗血清除去が観察され、定位置に少なくとも

10

20

30

40

50

30秒間留まることが可能である。コームプロッターを取り外し、剛性抗血清テンプレートをゲルから慎重に取り外す。

【0096】

気泡の捕捉を最小にしながら、プロッターがゲル上に回転しながら位置付けられ、2つ以上のプロッターが上部に位置付けられる。剛性抗血清テンプレートがチャンバフロア整列ピン上に定置され、錘を剛性テンプレート上で60秒間中心に位置付けることによって、ゲルがプレスプロットされた。

【0097】

プロッター、錘、及び剛性テンプレートが取り除かれ、ゲルが、アガロース側が面していることを確認しながら、トリス-緩衝生理食塩水(TBS)溶液(およそ50mL)の浅い容器槽内に定置された。洗浄トレイを優しくかき混ぜるか、または振盪器上に1分間定置した。

10

【0098】

プロット法が反復され、ゲルが、アガロース側が上を向いていることを確認しながら、TBS溶液(およそ50mL)の浅い容器槽内に定置された。洗浄トレイを手動でかき混ぜるか、または振盪器上に1分間定置した。ゲルが槽から除去され、過剰TBSが、優しく振盪することによってゲルから除去される。第2のプロット法が再び反復され、およそ0.5~1mLのREP Prepを電気泳動チャンバの左側に分注した後、最後にもう1回反復された。

【0099】

電極がゲル上に戻され、SPIFE 3000乾燥周期が開始された。自動乾燥手順に続いて、SPIFE 3000上で自動洗浄、染色、及び脱染手順が行われた。

20

【0100】

Quick Scan 2000の操作者用マニュアルに記される通りに中性密度密度測定器スキャンを実施して、ゲルレーン中に存在する画分がQuick Scan 2000を用いて評定された。各スキャンは、3つの画分、Lp(a)-P、vLDL-P、及びLDL-Pで構成された。

Helena密度測定器ソフトウェアは、標本総Apo-Bが(画分の%)×(総Apo-B)として入力されるときに、各バンドの相対パーセント及びmg/dLを自動的に算出し、印刷する粒子数は、好ましい実験室情報システムにおいて(mg/dL)/0.054=PNとして算出される。結果は、粒子数として報告される(PN=nmol/L)。

30

【0101】

実施例2 - ゾーンゲル免疫固定電気泳動を使用したLp(a)亜型サイズ識別

以下の実験及びその説明は、泳動速度とLp(a)亜型サイズとの間の関係性を実証する。より速いLp(a)粒子は、より大きなアポ(a)アポリポタンパク質部分に対応し、より遅い粒子は、より小さなアポ(a)を示す。さらなる差異化は、既知のLp(a)サイズ標準から導かれる。

アポ(a)MWは、泳動バイアス及びダブレットを用いて130個の試料上で測定されている。全ての結果は、ゾーンゲル上でのMWと泳動速度との間の比例を確認する。同様に、亜型の種類は、泳動速度または亜型サイズのいずれかを犠牲にすることなく配合され得る。これは、亜型基準対照の調製を可能にし、それは「ゲル上」Lp(a)亜型MWマーカーを確立するであろう。かかる基準は、Lp(a)粒子を大、中、小MWに分類するための粒子数及び泳動速度基準に関する定量的品質対照を提供するであろう。全ての個体は、2つの亜型の種類を示す。ダブレットは、Lp(a)粒子のアポ(a)間に、システムの分解能力に適合するのに十分なクリングル/MW差が存在する場合に、ゲル上に見られる。このシステムは、Lp(a)亜型の臨床的意義をプローブ及び実証するために適している。ゲルは、必要に応じて、当該技術分野において既知である方法によって分解を増加させるように修正され得る。システムは、粒子数及びサイズに関して両バンドを識別する。

40

50

【 0 1 0 2 】

図 1 A 及び 1 B は、本明細書に説明される通り、リポ - I F E プロトコルの結果を介した可変的な L p (a) - P 泳動の速さを示す。図 1 A は、L p (a) 泳動の差を評定するための基本的なゲル例を提供する。図 1 A は、L D L、V L D L、中央 L p (a)、より低速の陰極 L p (a)、及びより高速の陽極 L p (a) に対応するゲル例上の電気泳動バンドリングを標識する。図 1 B では、本出願におけるプロトコルに従って泳動された 5 つの試料の結果が示される。試料は全て、L D L 及び V L D L を含有し、また陰性対照以外は L p (a) 粒子をさらに含む。基準 (既知の) L p (a) 含量は、6 0 0 ~ 6 5 0 k D のアポ (a) 部分を含む。レーン 2 内の「陽極」試料は、6 5 0 k D 超のアポ (a) 部分を有する L p (a) を含有し、レーン 3 内の「中」試料は、基準と同一の質量、6 0 0 ~ 6 5 0 k D のアポ (a) 部分を含むし、「陰極」試料は、約 6 0 0 k D 未満のアポ (a) 部分を含有する。図 1 A 及び 1 B は、L p (a) 亜型の差別的検出及び定量化の原理を例証する。

10

【 0 1 0 3 】

図 2 は、本明細書に説明されるリポ - I F E プロトコルを介して分離された、ゾーンゲル上の差別的 L p (a) - P 泳動バイアスを有する試料の例を示す。図 2 では、一連の試料は、リポ - I F E システム上で並行してゲル上で泳動されている。ゲルの陰極及び陽極端部がラベル付けされ、実線は、分離後の L p (a) 粒子の予想位置を表す。4 つの試料が強調されている (試料番号 1 0、7 3、2 4、及び 4 4)。これらの試料は、より小さな亜型 (試料 1 0 及び 7 3、点線で囲まれ、基材の陰極端部に向かって位置付けられる) 及びより大きな亜型 (試料 2 4 及び 4 4、実線で囲まれ、基材の陽極端部に向かって位置付けられる) の泳動の速さによる、明確な L p (a) 亜型サイズの差を示す。

20

【 0 1 0 4 】

図 3 は、図 2 に示されるゾーンゲル (リポ - I F E プロトコル、差し込み図) をウエスタンブロットにおける同一の試料と比較する。図 3 では、試料 2 4、7 3、4 4、及び 1 0 が、L p (a) 粒子からのアポ (a) の除去後にウエスタンブロット分析においてさらに分析される。ウエスタンブロット分析は、Novex (登録商標) Western Blotting (商標) 発色性ウエスタンブロット免疫検出キット (Invitrogen Life Technologies) を使用して、アポリポタンパク質 (a) イソ型分析 (A A I S O) を用いる標準的なプロトコルを使用して実施された。A A I S O は、電気泳動及びウエスタンブロットを使用して、血清または E D T A 血漿中のアポ (a) イソ型を測定する。血清 (または血漿) は、まずジチオエリトール及び 6 - アミノカプロン酸中で還元され、次にメルカプトエタノール中で変性される。変性された試料は次に、4 % トリスグリシゲル上に充填され、電気泳動される。電気泳動後、タンパク質は、ゲルからポリフッ化ビニリデン移送膜へと移される。次に、ウエスタン検出が P V D F 膜上で実行される。全ての非占領結合部位は、ハマーシュタインカゼイン溶液で遮断される。膜は次に、ヤギ抗 L p (a) 一次抗体中で培養され、続いてアルカリホスファターゼ共役抗 I g O 二次抗体中で培養される。発色性基材が発色のために添加され、膜が分析される。複数の基準標準は、種々のレーンを点在させる。試料 2 4 は、陽極 (またはより大きな) L p (a) 粒子であり、ウエスタンブロットにおけるより大きな分離されたアポ (a) を示し、約 7 0 0 k D 及び 7 0 0 k D 超で現れる。試料 7 3 は、陰極性 (ゾーンゲル中のより小さな粒子) であり、ウエスタンブロットにおいて約 6 0 0 k D のより小さなアポ (a) 部分に対応する。試料 4 4 及び 1 0 は、ウエスタンブロット上の約 7 0 0 k D におけるより大きなアポ (a) バンドを同様に有する陽極 L p (a)、及び 4 5 0 k D 未満におけるより小さなアポ (a) バンドを有する陰極 L p (a) によるパターンを反復する。

30

40

【 0 1 0 5 】

図 4 A 及び 4 B は、ハイスループット泳動における L p (a) - P 泳動分別のより多くの例を示す。図 4 A 及び 4 B では、並行して泳動されたゾーンゲルは、ハイスループット実験において患者試料間での変動を示す。約 6 5 0 k D 超の陽極粒子及び約 6 0 0 k D 未満の陰極粒子が識別される。陽極試料は、試料番号 1 1 4 7、1 2 0 0、0 4 8 1、1 6

50

21、2420、2495、及び2618を含む。陰極試料は、試料番号1101及び2611を含む。

【0106】

図5は、ゾーゲル上の一連の試料中のアポ(a)含量及びアポB含量の比較を示す。図5では、5個の試料が抗アポB血清及び抗アポA血清によってプローブされ、二重バンディング、それらのLp(a)粒子上に2つのサイズのアポ(a)部分を有するいくつかの対象の生成物を示した。Lp(a)二重バンディングは、試料1、3、4、及び5において見られ、これらの試料は、生理食塩水レーン内の非特異的なタンパク質残基を伴わないアポBプローブ応答とアポ(a)プローブ応答との両方を含有する。二重バンディングは、人工的ではない。Lp(a)二重バンディングは、等しいか、主に陰極性であるか、または差別的な分解を伴う陽極性であり得る。試料2は、単一のLp(a)を有するが、アポB応答及びアポ(a)応答の両方を含有し、LDLに対して陰極性であり、生理食塩水レーン内に非特異的なタンパク質残基を伴わない。二重バンディングの頻度は、 $< 1\%$ である。生理食塩水プローブが、人工的バンディングの存在を確立するために使用される。

10

【0107】

図6A~6Rは、ウエスタンブロットによって測定された、増加するMWのアポ(a)に関連付けられるLp(a)-Pゾーン泳動速度(図2、4A、及び4Bからの差し込み図)を比較するデータを提示する。図6A~6Rでは、Lp(a)ゾーン泳動バイアスを有する100個を超える試料が、上記に説明される通りウエスタンブロット分析によるアポ(a)イソ型サイズ分析と比較された。図3に示されるものと同一の設定及び分析を反映する19個の実験の結果が提示される。結果は、同一の粒子から分離されたアポ(a)部分のより集中的な分析による、Lp(a)-P亜型サイズを分析するための新規のゾーゲル方法の一貫した一致を示す。

20

【0108】

実施例3 - ゾーゲル免疫固定電気泳動を使用したLp(a)亜型サイズ識別の実証

ゾーゲル免疫固定電気泳動を使用したLp(a)亜型サイズ識別が、Meridian Custom共役抗アポB100* - Alexa488抗体を用いたアッセイによって実証された。

【0109】

Custom共役抗体が調製され、アポB含有粒子間の差異化を示すために実験された。HDL生成Calbiochem抗アポBが精製され、Alexa488蛍光色素分子と共役された。3個の500uLのパイロットロットが、シグナル：ノイズ比を研究するために調製された。ロットが調製され、ロットA1が5：1の染料対ポリクローナル抗体比を有し、ロットA2が7.5：1の比を有し、ロットA3が10：1の比を有した。全ての濃度は、既存の作業用Calbiochem抗血清に関して抗体力価に対して正規化された。血清は、可変的なLp(a)、VLDL、及びLDL濃度を有して選択された。アッセイの亜型依存性を洞察するために、確認された大きい及び小さいLp(a)-Pを有する二重試料が、非特異的タンパク質アシッドバイオレット及びアポB特異性抗体を用いてアッセイされた。Lp(a)、LDL、またはVLDL上の抗体に対応する各蛍光標識の光学密度が、密度測定器において測定された。リポタンパク質レベルの全ての結果は、相対パーセンテージで報告される。

30

40

【0110】

図7は、Lp(a)、LDL、及びVLDL粒子に結合した標識された抗アポB抗体のための蛍光画像化を示す。画像は、3Bロット/TBS画像(湿潤)である(乾燥したゲルは不透明であり、画像化には適さない)。上行は、それぞれの列において、5：1(A1)、7.5：1(A2)、及び10：1(A3)のAlexa Fluor(登録商標)蛍光染料：ポリクローナル抗体の希釈レベルにおける試料3022を示す。同一の実験が、試料3052に関して下行に示される。希釈比間において、光学的特性の観察可能な差はない。

50

【 0 1 1 1 】

図 8 A ~ 8 E は、単一試料中の L D L - P からの L p (a) - P の差異化に関する、アシッドバイオレット染色検出法 (A / V) 及びアポ B * 蛍光タグ付き抗体標識法の初期の比較の結果を示す。図 8 A は、アシッドバイオレット染色によって標識された二重泳動を含むそれぞれの列における、試料番号 3 0 2 2 及び 3 0 5 2 の天然ゾーンゲル分離を示す。合計 4 個の試料が泳動され、L D L は強いバンドとして、また L p (a) がその下の弱いバンドとして明らかである。図 8 B は、同一の試料の蛍光による光学画像化を示し、3 0 2 2 は上行に、3 0 5 2 は下行にある。列は、前述の試薬 A 1、A 2、及び A 3 中の異なる蛍光染料：抗アポ B 比に対応する。図 8 C は、各試料の光学密度読み取りの数値結果を提示し、% L p a は、総検出試料の L p (a) (リポタンパク質 a) のパーセントを意味し、% L D L は、総検出試料の L D L (低密度リポタンパク質) のパーセントを意味する。図 8 D は、プロフィール内の試料 3 0 2 2 のアシッドバイオレット染色の光学密度読み取りであり、図 8 E は、プロフィール内の試料 3 0 2 2 の蛍光共役体の光学密度読み取りである (A / V プロフィールの逆方向)。

10

【 0 1 1 2 】

図 9 A ~ 9 E は、単一試料中の L D L 及び V L D L からの L p (a) - P の差異化に関する、アシッドバイオレット染色検出法 (A / V) 及びアポ B * 蛍光タグ付き抗体標識法の初期の比較の結果を示す。図 9 A は、アシッドバイオレット染色によって標識された二重泳動を含むそれぞれの列における、試料 3 0 3 4 及び 3 0 5 1 の天然ゾーンゲル分離を示す。合計 4 個の試料が泳動され、L D L は強いバンドとして、また L p (a) がその下の弱いバンドとして明らかである。図 9 B は、同一の試料の蛍光による光学画像化を示し、3 0 3 4 は上行に、3 0 5 1 は下行にある。列は、前述の試薬 A 1、A 2、及び A 3 中の異なる蛍光染料：抗アポ B 比に対応する。図 9 C は、各試料の光学密度読み取りの数値結果を提示し、% L p a は、総検出試料の L p (a) (リポタンパク質 a) のパーセントを意味し、% L D L は、総検出試料の L D L (低密度リポタンパク質) のパーセントを意味する。さらなる詳細な分析は、L p (a) / L D L レベルを下回る L p (a)、V L D L、及び L D L のレベルを示す。図 9 D は、プロフィール内の試料 3 0 5 1 のアシッドバイオレット染色の光学密度読み取りであり、図 9 E は、プロフィール内の試料 3 0 5 1 の蛍光共役体の光学密度読み取りである (A / V プロフィールの逆方向)。

20

【 0 1 1 3 】

図 1 0 A ~ 1 0 E は、単一試料中の L D L 及び V L D L からの L p (a) - P の差異化に関する、アシッドバイオレット染色検出法 (A / V) 及びアポ B * 蛍光タグ付き抗体標識法による、陽極 (大きい) L p (a) 亜型及び陰極 (小さい) L p (a) 亜型の差異化を比較する試料の結果を示す。L D L、V L D L、及び L p (a) のいずれも、抗アポ B - 4 8 8 * を用いてプローブされた。「A」図の右側のプローブは、A / V 染色を用いた抗アポ (a) であり、このプローブは、L p (a) - P としてのバンドの同一性を確認する。データは、特定の A ぽ B * を非特異的な A / V と比較し、両染色方法の同等性を実証し、A / V の非特異的なタンパク質染色に関する問題に対処する。両技術とも同一の抗体を使用し、報告するもののみが異なり、アポ B - A / V 対アポ B - 4 8 8 * であった。図 1 0 A は、アシッドバイオレット染色によって標識された試料 0 8 1 6 の天然ゾーンゲル分離を左列に示す。左側では、抗アポ B 抗体が標識のために使用され、これは L p (a)、L D L、及び V L D L の全てに見出される。右側では、抗アポ (a) 抗体が使用され、これは L p (a) 粒子のみを標識する。図 1 0 B は、標識された同一の試料の蛍光による光学画像化を示す。列は、前述の試薬 A 1、A 2、及び A 3 中の異なる蛍光染料：抗アポ B 比に対応する。図 1 0 C は、各試料の光学密度読み取りの数値結果を提示し、% L p a は、総検出試料の L p (a) (リポタンパク質 a) のパーセントを意味し、% L D L は、総検出試料の L D L (低密度リポタンパク質) のパーセントを意味する。さらなる詳細な分析は、L p (a) / L D L レベルを下回る L p (a)、V L D L、及び L D L のレベルを示す。図 1 0 D は、プロフィール内の試料 0 8 1 6 のアシッドバイオレット染色の光学密度読み取りであり、図 1 0 E は、プロフィール内の試料 0 8 1 6 の蛍光共役体の光学密

30

40

50

度読み取りである（A/Vプロフィールの逆方向）。

【0114】

図11A~11Eは、単一試料中のLDL及びVLDLからのLp(a)-Pの差異化に関する、アシッドバイオレット染色検出法（A/V）及びアポB*蛍光タグ付き抗体標識法による、陽極（大きい）Lp(a)垂型及び陰極（小さい）Lp(a)垂型の差異化を比較する試料の結果を示す。データの差異化は、図10に関するものと同じである。図11Aは、アシッドバイオレット染色によって標識された試料2377の天然ゾーンゲル分離を左列に示す。左側では、抗アポB抗体が標識のために使用され、これはLp(a)、LDL、及びVLDLの全てに見出される。右側では、抗アポ(a)抗体が使用され、これはLp(a)粒子のみを標識する。図11Bは、標識された同一の試料の蛍光による光学画像化を示す。列は、前述の試薬A1、A2、及びA3中の異なる蛍光染料：抗アポB比に対応する。図11Cは、各試料の光学密度読み取りの数値結果を提示し、%Lpaは、総検出試料のLp(a)（リポタンパク質a）のパーセントを意味し、%LDLは、総検出試料のLDL（低密度リポタンパク質）のパーセントを意味する。さらなる詳細な分析は、Lp(a)/LDLレベルを下回るLp(a)、VLDL、及びLDLのレベルを示す。図11Dは、プロフィール内の試料2377のアシッドバイオレット染色の光学密度読み取りであり、図11Eは、プロフィール内の試料2377の蛍光共役体の光学密度読み取りである（A/Vプロフィールの逆順）。

10

【0115】

図12A~12Eは、単一試料中のLDL及びVLDLからのLp(a)-Pの差異化に関する、アシッドバイオレット染色検出法（A/V）及びアポB*蛍光タグ付き抗体標識法による、陽極（大きい）Lp(a)垂型及び陰極（小さい）Lp(a)垂型の差異化を比較する試料の結果を示す。データの差異化は、図10に関するものと同じである。図12Aは、アシッドバイオレット染色によって標識された試料3389の天然ゾーンゲル分離を左列に示す。左側では、抗アポB抗体が標識のために使用され、これはLp(a)、LDL、及びVLDLの全てに見出される。右側では、抗アポ(a)抗体が使用され、これはLp(a)粒子のみを標識する。図12Bは、標識された同一の試料の蛍光による光学画像化を示す。列は、前述の試薬A1、A2、及びA3中の異なる蛍光染料：抗アポB比に対応する。図12Cは、各試料の光学密度読み取りの数値結果を提示し、%Lpaは、総検出試料のLp(a)（リポタンパク質a）のパーセントを意味し、%LDLは、総検出試料のLDL（低密度リポタンパク質）のパーセントを意味する。さらなる詳細な分析は、Lp(a)/LDLレベルを下回るLp(a)、VLDL、及びLDLのレベルを示す。図12Dは、プロフィール内の試料3309のアシッドバイオレット染色の光学密度読み取りであり、図12Eは、プロフィール内の試料3389の蛍光共役体の光学密度読み取りである（A/Vプロフィールの逆順）。

20

30

【0116】

図13A~13Cは、二重含有試料0816、3389、及び2377を隣接するゲル上で互いに比較する、図10~12の要約を示す。図13Aは、各試料に関するアシッドバイオレット染色剤で標識されたゾーンゲルを示し、第1の列に標識されたアポBが、また第2の列に標識されたアポ(a)がある。図13Bは、試料がはっきりと標識された、各試料に関する蛍光検出を示す。図13Cは、各試料及びその陽極（大きい）Lp(a)垂型及び陰極（小さい）Lp(a)垂型の相対的割合を、試料のLDL及びVLDL部分と共に要約する表を提示する。本方法は、各リポタンパク質の種類レベルの算出された比において、良好な一致を示す。

40

【0117】

これらの研究は、本明細書に説明される通り、リポ-IFEアッセイによって達成される結果を実証する。

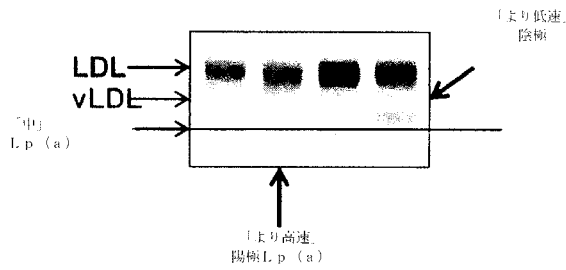
【0118】

本明細書に例証される態様の変形、ならびに他の特徴及び機能、またはその代替物は、多数の他の異なるシステムまたは用途と組み合わせられ得ることが理解されるであろう。種

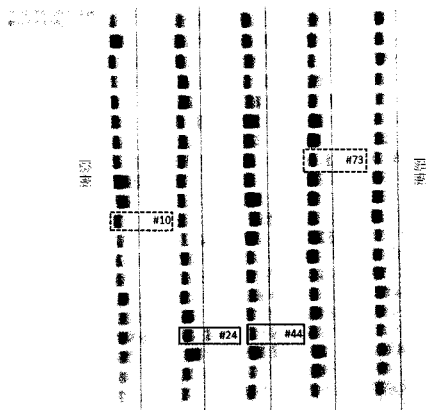
50

々の現在予期または予想されない、それらにおける代替物、修正、変形、または改善は、今後当業者によって行われてもよく、それらもまた、下記の特許請求の範囲によって包含されることを意図される。

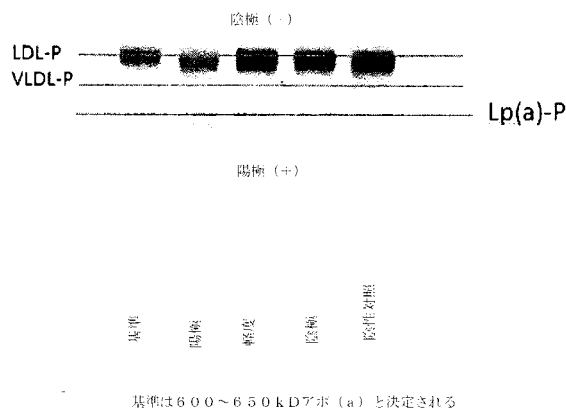
【図 1 A】



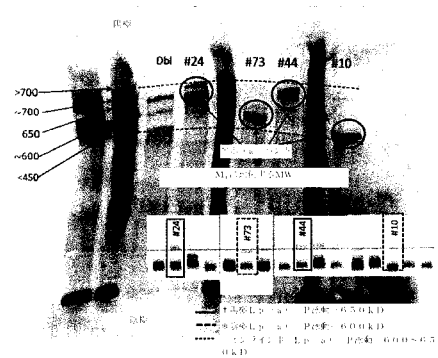
【図 2】



【図 1 B】



【図 3】



【図 4 A - 4 B】

図 4 A

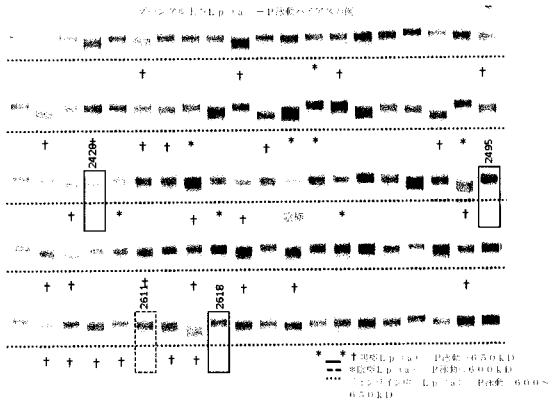
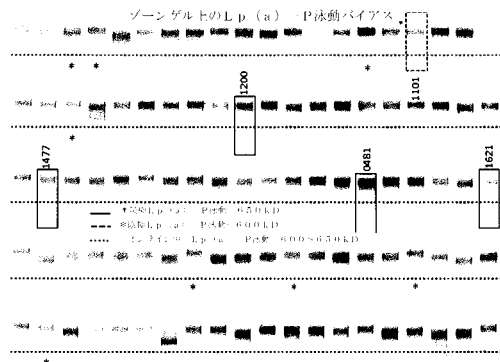
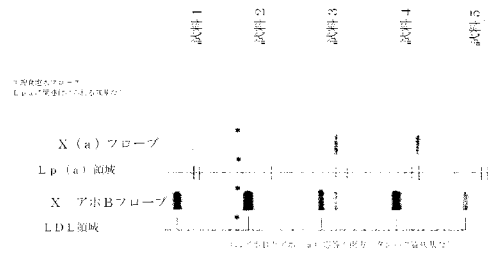


図 4 B



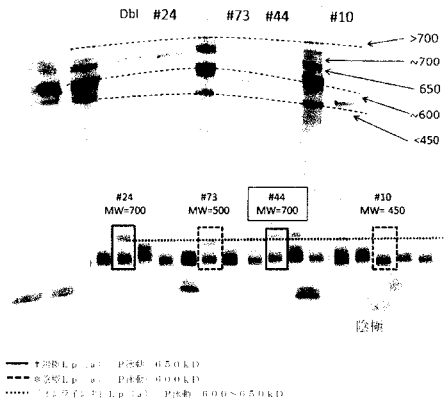
【図 5】

図 5 Lp(a) P値 < 0.001 急性冠症の Lp(a) 測定



【図 6 A】

MW α M_r



【図 6 B - 6 C】

図 6 B

MW α M_r

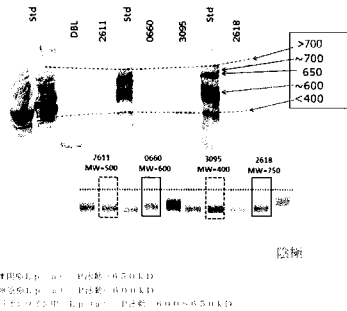
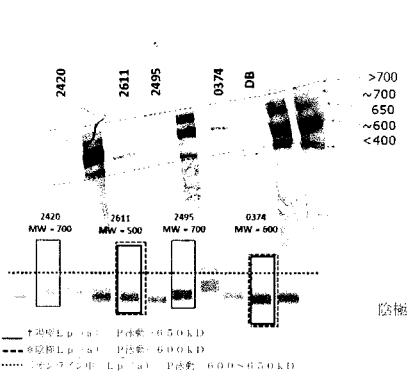


図 6 C

MW α M_r



【図 6 D - 6 E】

図 6 D

MW α M_r

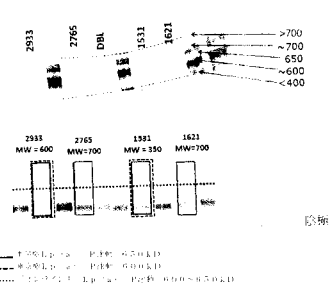
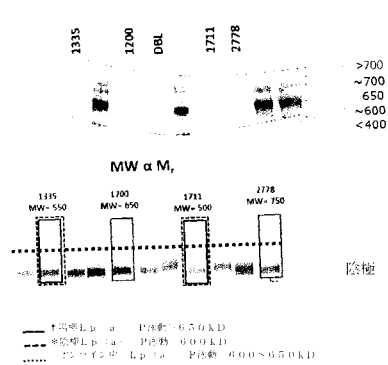


図 6 E

MW α M_r



【 図 6 F - 6 G 】

図 6 F

MW α M_r

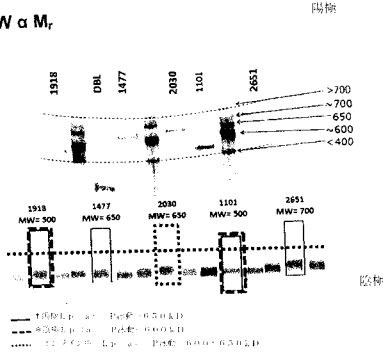
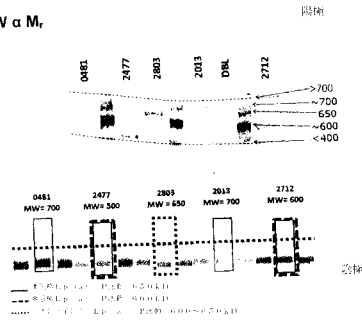


図 6 G

MW α M_r



【 図 6 H - 6 I 】

図 6 H

MW α M_r

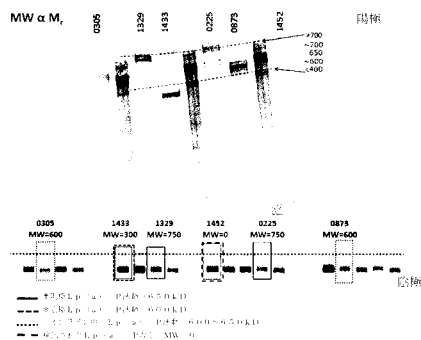
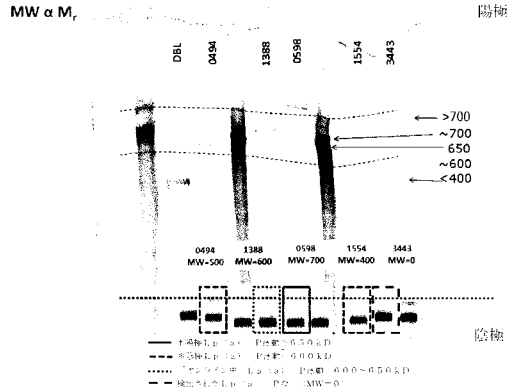


図 6 I

MW α M_r



【 図 6 J - 6 K 】

図 6 J

MW α M_r

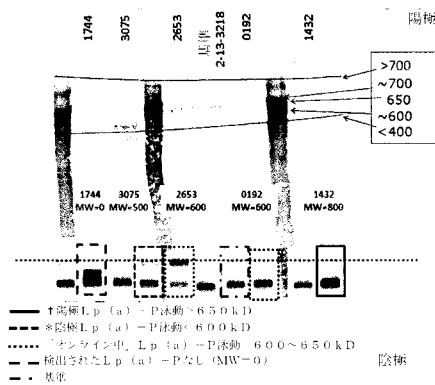
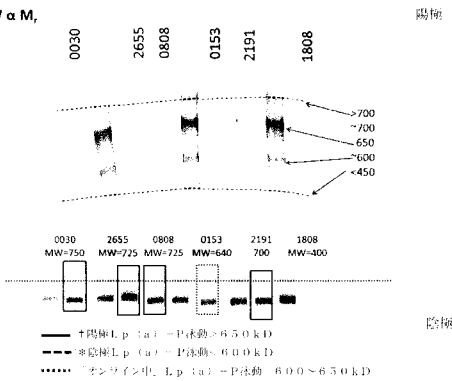


図 6 K

MW α M_r



【 図 6 L - 6 M 】

図 6 L

MW α M_r

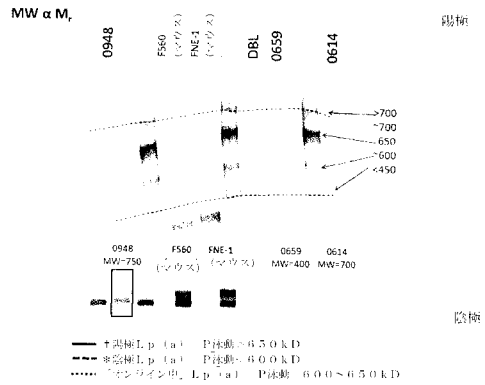
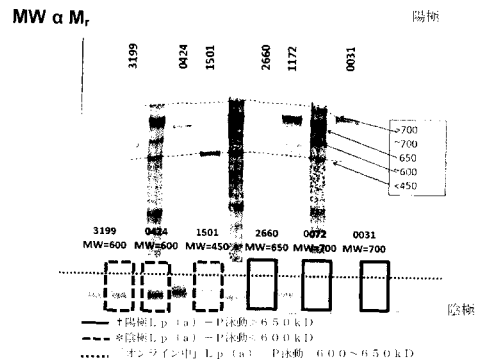
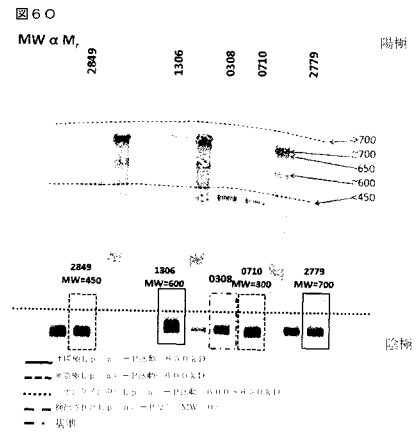
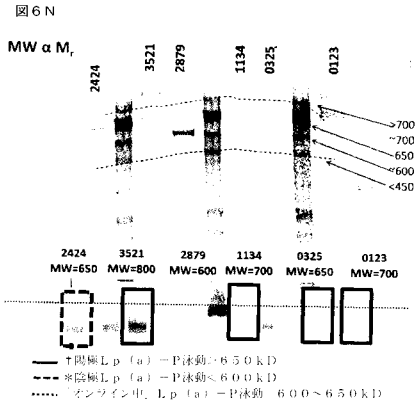


図 6 M

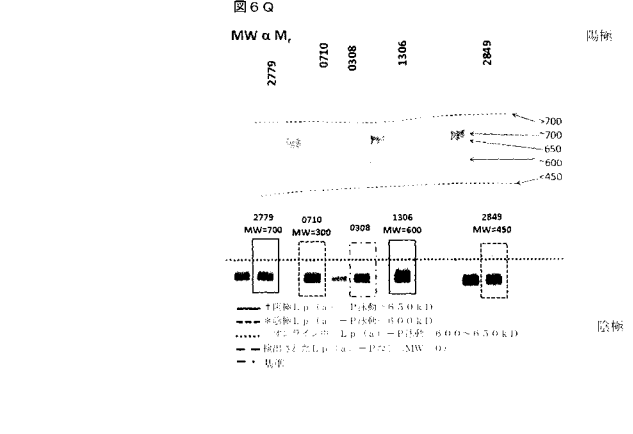
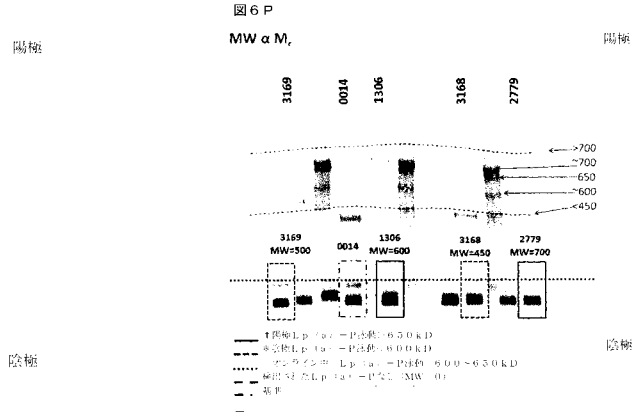
MW α M_r



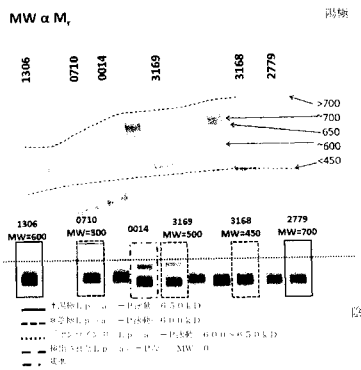
【図 6 N - 6 O】



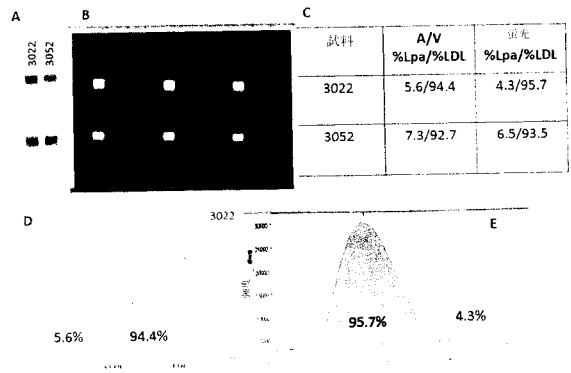
【図 6 P - 6 Q】



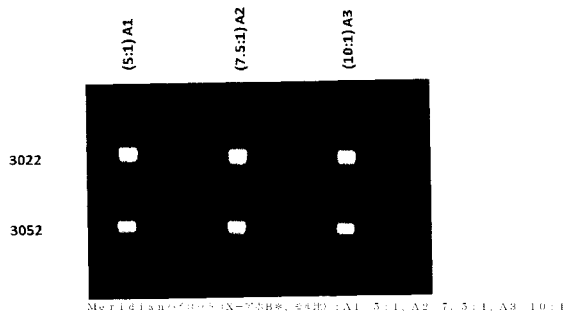
【図 6 R】



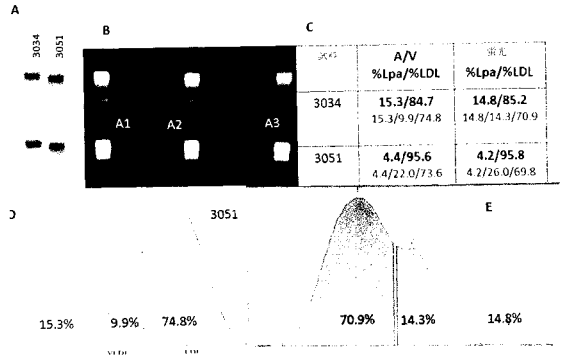
【図 8 A - 8 E】



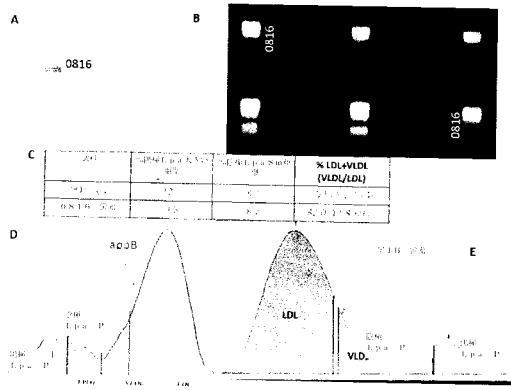
【図 7】



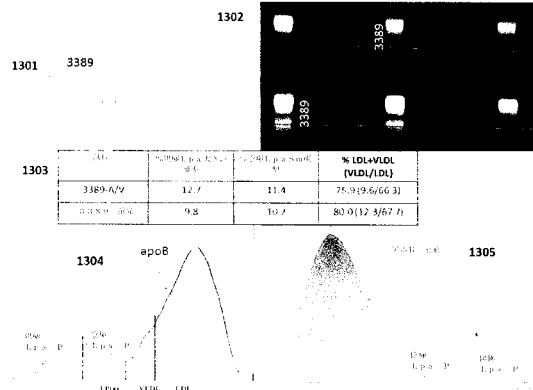
【図 9 A - 9 E】



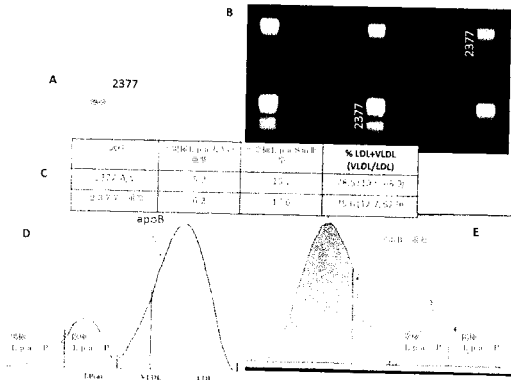
【図10A - 10E】



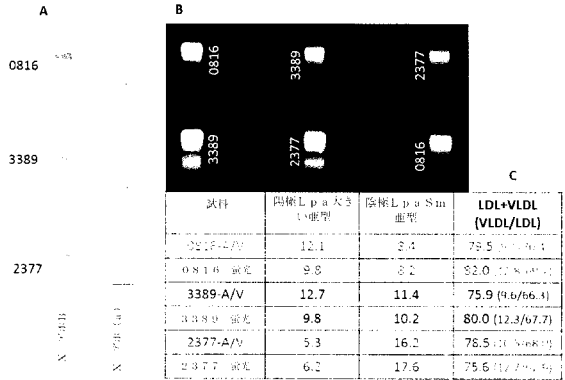
【図12A - 12E】



【図11A - 11E】



【図13A - 13C】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2014/071272

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/92 G01N33/68 ADD.		
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) 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 practicable, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ERQOU ET AL.: "Apolipoprotein(a) Isoforms and the Risk of Vascular Disease", J AM. COLL. CARDIOLOGY, vol. 55, no. 19, 2010, pages 2160-7, XP002737170, cited in the application page 2161, left-hand column, paragraph 1 - paragraph 2; table 1 page 2164, left-hand column, paragraph 2; figures 2-3 ----- -/--	1,2, 6-10, 12-27
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family 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 application or patent 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 March 2015		Date of mailing of the international search report 30/03/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Fleitmann, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2014/071272

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>GUADAGNO ET AL.: "Validation of a Lipoprotein(a) Particle Concentration Assay by Quantitative Lipoprotein Immunofixation Electrophoresis", CLIN CHIM ACTA, vol. 439, 2014, pages 219-224, XP002737171, cited in the application page 219, right-hand column, paragraph 1 - page 220, right-hand column, paragraph 2; figures 6,2</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	29
X	<p>Marian C Cheung ET AL: "Characterization of high density lipoprotein subspecies: structural studies by single vertical spin ultracentrifugation and immunoaffinity chromatography",</p> <p>1 January 1987 (1987-01-01), XP055176017, Retrieved from the Internet: URL:http://www.jlr.org/content/28/8/913.full.pdf [retrieved on 2015-03-12] figure 6; table 2</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-28
X	<p>F. PAULTRE ET AL: "High Levels of Lp(a) With a Small Apo(a) Isoform Are Associated With Coronary Artery Disease in African American and White Men", ARTERIOSCLEROSIS, THROMBOSIS, AND VASCULAR BIOLOGY, vol. 20, no. 12, 1 December 2000 (2000-12-01), pages 2619-2624, XP55176114, ISSN: 1079-5642, DOI: 10.1161/01.ATV.20.12.2619 abstract; figure 1; table 3</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-29

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/455 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/455	
A 6 1 K 31/216 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 K 38/22 (2006.01)	A 6 1 K 31/216	
A 6 1 K 31/435 (2006.01)	A 6 1 K 37/24	
A 6 1 K 31/337 (2006.01)	A 6 1 K 31/435	
	A 6 1 K 31/337	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72) 発明者 エリン グレイス サマーズ

アメリカ合衆国 バージニア州 2 3 1 5 0 サンドストーン フロブ ロード 4 9 6 6

F ターム(参考) 2G045 AA25 CA25 CA26 CB03 DA62 FB03 FB05
 4C084 AA02 AA17 BA44 DB01 NA05 ZA361 ZA362
 4C086 AA01 AA02 BC03 BC19 BC21 GA04 GA07 GA12 MA01 MA04
 NA05 ZA36
 4C206 AA01 AA02 DB25 DB43 MA01 MA04 NA05 ZA36

专利名称(译)	Lp (a) 亚型大小鉴别使用区域凝胶免疫固定电泳		
公开(公告)号	JP2017504038A	公开(公告)日	2017-02-02
申请号	JP2016560641	申请日	2014-12-18
[标]申请(专利权)人(译)	ツールヘルスダイアグノスティクスエルエルシー		
申请(专利权)人(译)	true健康凹模阿格诺, エルエル海洋统计学		
[标]发明人	フィリップグアダグノ エリングレイスサマーズ		
发明人	フィリップ グアダグノ エリン グレイス サマーズ		
IPC分类号	G01N33/92 G01N33/48 G01N33/53 G01N27/447 A61K45/00 A61K31/455 A61P9/00 A61K31/216 A61K38/22 A61K31/435 A61K31/337		
CPC分类号	G01N33/92 G01N33/6893 G01N2333/775 G01N2800/32 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/92.Z G01N33/48.P G01N33/53.W G01N27/447.325.A G01N27/447.325.C A61K45/00 A61K31/455 A61P9/00 A61K31/216 A61K37/24 A61K31/435 A61K31/337		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/DA62 2G045/FB03 2G045/FB05 4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/BA44 4C084/DB01 4C084/NA05 4C084/ZA361 4C084/ZA362 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BC03 4C086/BC19 4C086/BC21 4C086/GA04 4C086/GA07 4C086/GA12 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA05 4C086/ZA36 4C206/AA01 4C206/AA02 4C206/DB25 4C206/DB43 4C206/MA01 4C206/MA04 4C206/NA05 4C206/ZA36		
代理人(译)	石川彻		
优先权	61/917823 2013-12-18 US 62/005658 2014-05-30 US 62/042613 2014-08-27 US		
其他公开文献	JP2017504038A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一方面, 提供了用于确定测试样品中各个Lp (a) 亚型的组成的方法。该方法提供了包含从受试者获得的Lp (a) 亚型的测试样品, 沿着电泳凝胶分离测试样品中的Lp (a) 亚型, 并且 (a) 通过测量亚型沿着电泳凝胶的迁移率, 并基于该测量结果, 将每个Lp (a) 亚型的迁移率与参考值进行比较, 并基于比较 并确定各个Lp (a) 亚型的摩尔质量。还提供了预测心血管健康的方法。[选型图]图1A

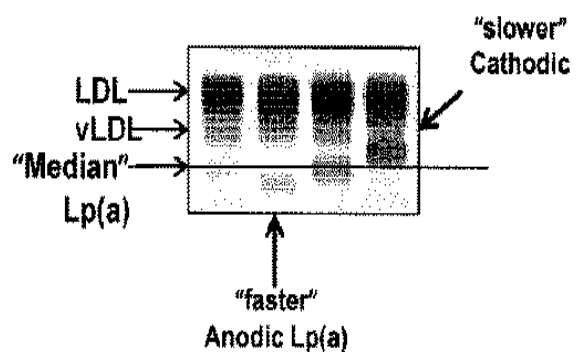


FIG. 1A