

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-329214

(P2004-329214A)

(43) 公開日 平成16年11月25日(2004.11.25)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/37	C 1 2 Q 1/37	2 G 0 4 5
GO 1 N 33/48	GO 1 N 33/48	2 G 0 5 2
// GO 1 N 1/28	GO 1 N 1/28	4 B 0 6 3
	GO 1 N 1/28	
		A
		J
		K

審査請求 有 請求項の数 6 O L (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2004-153125 (P2004-153125)	(71) 出願人	300058891
(22) 出願日	平成16年5月24日 (2004. 5. 24)		バイエル コーポレーション
(62) 分割の表示	特願平7-523343の分割		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
原出願日	平成7年3月9日 (1995. 3. 9)		2 0 3 2 イースト ウォルポール コウ
(31) 優先権主張番号	08/212, 442		ニー ストリート 3 3 3
(32) 優先日	平成6年3月10日 (1994. 3. 10)	(74) 代理人	100073184
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 柳田 征史
		(74) 代理人	100090468
			弁理士 佐久間 剛
		(72) 発明者	セーキュン オウ
			アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
			2 1 4 6 ブルックリン ユニット 1
			バブコック ストリート 1 7 7

最終頁に続く

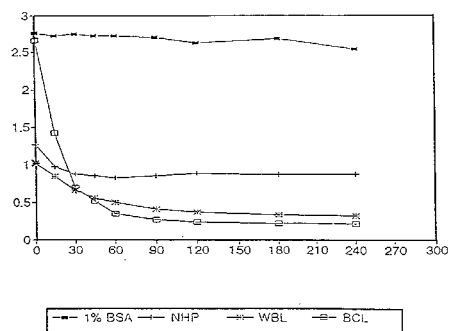
(54) 【発明の名称】 ヒト全血細胞溶解産物のプロテアーゼ活性の阻害

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】ヒト全血細胞溶解産物内のMxタンパク質のタンパク質を阻害する方法に関し、さらに詳しくはインターフェロン療法の効力を示す方法としてMxタンパク質アッセイを提供する。

【解決手段】熱安定性細胞内タンパク質のタンパク質分解を阻害する方法が記載されている。この方法は、プロテアーゼおよび関心のあるタンパク質を含有する試料に1種類以上の変性剤を加え、プロテアーゼを変性するのに十分な温度で十分な期間に亘り得られた溶液を加熱する各工程からなる。さらに、細胞内タンパク質を分解するプロテアーゼを含まない溶液も開示されており、そのような溶液は少なくとも3週間に亘り4 で安定のままである。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料内に含まれるプロテアーゼを阻害する方法であって、

該試料に 1 種類以上の変性剤を加え、

前記プロテアーゼを変性するのに十分な温度で十分な期間に亘り加熱する、各工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項 2】

前記試料が、前記プロテアーゼが不活化された後にタンパク質が加えられる合成マトリックスを含むことを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記加熱工程が、前記試料を 50 から 100 までの温度で 1 分から 1 時間以上の期間に亘り加熱することを特徴とする、請求項 3 記載の方法。

【請求項 4】

前記加熱が、56 で約 1 時間に亘り行なわれることを特徴とする、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

関心タンパク質が加えられるプロテアーゼを含まないマトリックスを含む溶液であって、該マトリックスが少なくとも 3 週間に亘り 4 でプロテアーゼ活性がないままであることを特徴とする溶液。

【請求項 6】

前記マトリックスが、臨床分析が行なわれる細胞を擬態していることを特徴とする請求項 5 記載の溶液。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、概して生物体液内のプロテアーゼ活性の阻害に関し、より詳しくは、ヒト全血細胞溶解産物内の Mx タンパク質のタンパク質分解を阻害する方法に関し、さらにインターフェロン療法の効力を示す方法として Mx タンパク質アッセイを用いることに関するものである。

【背景技術】

【0002】

タンパク質分解は全ての生物界で自然に起こる工程である。また、タンパク質の非分解レベルを検査しようとする場合に、タンパク質分解により科学的研究が複雑になっている。細胞内タンパク質または膜タンパク質の測定は、細胞溶解工程でもまたプロテアーゼが放出されるので、タンパク質分解により特に複雑になる。タンパク質分解を阻害する様々なプロテアーゼ阻害剤が存在し、そのような従来阻害剤が当業者に知られている。しかしながら、既知のプロテアーゼ阻害剤の効能が関心のあるタンパク質のタンパク質分解を停止させるのに十分ではない場合、または、これらの阻害剤を添加してもタンパク質分解を加速させただけの場合、この問題を阻止する別の方法を見付ける必要がある。

【0003】

タンパク質分解により複雑となる種類の研究の例としては、生物体液内のタンパク質の精密な測定が挙げられる。このようなタンパク質の測定はまた、関心のある種が特に誘発するタンパク質の測定により治療の臨床関連性を評価するのに有用であるかもしれない。

【0004】

例えば、インターフェロン療法の臨床効能を評価することが重要である。この療法は、子供の血管腫、遺伝素因の多発性硬化症、自己免疫疾患、ある種類の癌、およびエイズのような条件の療法において、高価であるが、ますます普及している。インターフェロンの循環レベルを検定することは技術的に困難である。しかしながら、特にインターフェロンにより誘発される Mx タンパク質と呼ばれる細胞内タンパク質を検定することにより、インターフェロン療法の効能が評価されるかもしれない。トウピン等による非特許文献 1 の「A whole Blood Immunoassay for the Interferon-Inducible Human Mx Protein」と題

10

20

30

40

50

する書物において、著者は、酵素イムノアッセイを用いた全血細胞溶解産物内のM×タンパク質の検定方法を記載している。

【0005】

一般的なインターフェロンの研究および特にM×タンパク質の調査において進歩が遂げられてきたが、インターフェロン療法の新しい用途を評価する際のM×タンパク質のタンパク質分解を最小にすることによりM×タンパク質のレベルを妥協せずに測定することが依然として目的となっている。

【非特許文献1】Journal of Interferon Research, 12, 67(1992)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0006】

したがって、本発明の目的は、細胞内タンパク質、すなわち、細胞溶解産物内のM×タンパク質のタンパク質分解を阻害する方法を提供することにある。本発明の別の目的は、それによって、少なくとも3週間に亘り4以下の温度で、細胞内タンパク質をタンパク質分解に対して安定に保持できる人工マトリックス溶液を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明の前述した目的および他の目的並びに利点は、細胞溶解産物内に熱安定な細胞内タンパク質のタンパク質分解を阻害する方法を提供することにより達成される。この方法は、1種類以上の変性剤および細胞内タンパク質を分解する未知のプロテアーゼを含有する溶液を調製し、プロテアーゼを変性するのに十分な温度で十分な期間に亘りこの溶液を加熱する各工程からなる。

20

【0008】

この溶液を洗浄剤溶解全血細胞として定義してもよい。この溶液をひとつには、血液細胞溶解産物を擬態した合成マトリックスにより同様に定義してもよい。この溶液が全血溶解産物におけるような細胞内タンパク質を含有する場合、加熱工程は、細胞内タンパク質を破壊しない条件で行なう。細胞溶解産物を擬態した合成マトリックスにおけるように、細胞内タンパク質をこの溶液が含まない場合、全てのプロテアーゼ活性が破壊されるまでより過酷な条件を適用してもよい。

【0009】

30

本発明はまた、患者の血液内のインターフェロンを測定する間接的方法も提供する。この方法は、関心のある細胞内タンパク質、例えば、M×タンパク質を分解する、細胞溶解産物からの1種類以上の未知のプロテアーゼを変性するために、変性剤の存在下で試料を加熱する工程からなる。熱は、プロテアーゼを変性するが、細胞内タンパク質は変性しない、十分なレベルと十分な期間に亘り加える。次いで、細胞内タンパク質を測定する。

【0010】

測定は、インターフェロンにより誘発されたタンパク質の存在を検出するアッセイにより行ない、インターフェロン療法の生物学的効能を間接的に測定してもよい。このようなアッセイは、固相捕捉抗体に対する細胞内タンパク質の結合パートナーを用意し、固相を溶液に接触させることにより結合パートナーに細胞内タンパク質を捕捉させ、細胞内タンパク質の第2の結合パートナーを細胞内タンパク質に結合させる各工程からなるものであってもよい。この第2の結合パートナーは化学発光標識を担持しており、この標識はルミノメータにより検出される。この結合工程は、どのような順番で組み合わせてもよい。

40

【0011】

本発明はまた、プロテアーゼを含まないように調製された人工マトリックスを提供する。細胞内M×タンパク質は、少なくとも3週間に亘り4の温度でこの人工タンパク質溶液内で安定したままである。本発明のある実施の形態によると、この溶液は全血細胞溶解産物を含んでいる。本発明の別の実施の形態によると、この溶液は全血細胞溶解産物を擬態した合成マトリックスを含んでいる。

【0012】

50

本発明の他の利点、新たな性質および目的は、図面とともに、本発明の詳細な記載から明らかとなる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

本発明は、プロテアーゼを変性するのに十分な温度で十分な期間に亘り細胞溶解産物を熱および1種類以上の変性剤で処理することにより、熱安定性細胞内タンパク質のタンパク質分解を阻害する方法を提供する。プロテアーゼ活性が本発明の方法により阻害されるので、細胞内タンパク質の存在および/または濃度を測定するアッセイが確実に行なわれる。タンパク質分解に対して安定なアッセイ用試料を提供することは、アッセイを行なう前に試料を任意の期間に亘り貯蔵しなければならない場合に有利である。さらに、関心のあるタンパク質のタンパク質分解に対して安定なタンパク質溶液の人工混合物を用意し、抗原基準、対照、較正物質等の希釈液として用いてもよい。

10

【0014】

本発明により、任意の様々な熱安定性タンパク質のタンパク質分解を阻害する。ここに用いているように、「熱安定性」という用語は、タンパク質分解の原因であるプロテアーゼを変性するのに必要な温度で必要な時間に亘る関心のあるタンパク質の安定性を定義することを意味するものである。熱安定性タンパク質の例としては、以下に限定されるものではないが、いくつかの膜タンパク質（例えば、癌胎児性抗原）および細胞内タンパク質が挙げられる。そのようなタンパク質の例としては、核タンパク質（例えば、マウスMxタンパク質）および細胞質タンパク質（例えば、ヒトMxタンパク質、熱ショックタンパク質および細胞骨格タンパク質）が挙げられる。

20

【0015】

本発明のある実施の形態により、インターフェロンにより誘発される細胞内タンパク質（例えば、Mxタンパク質）のタンパク質分解を阻害する方法を提供する。このような方法により、Mxタンパク質の确实で再現性のある測定が実施でき、したがって、インターフェロン療法の臨床効能を測定できる。約30の異なるタンパク質がインターフェロンにより誘発されることが知られている。しかしながら、2, 5-オリゴ-(A) シンセターゼ、p68キナーゼ、およびMxタンパク質のみが、インターフェロンの抗ウイルス作用を媒介することが知られており、したがって、本発明によるこれらタンパク質の1種類以上の測定がインターフェロン療法の評価に大いに関連している。

30

【0016】

Mxタンパク質の測定は以下の理由により特に好ましい。Mxはインターフェロンの処理後に即座（2時間）に誘発され、比較的短い期間（約36時間）で最大レベルに到達する。Mxタンパク質の細胞誘発は、高用量のインターフェロン療法でさえもフィードバック阻害にさらされない。さらに、Mxタンパク質の生物学的半減期は比較的長い（T_{1/2}は3.5-5日）。したがって、最初のMxタンパク質レベルの20-30%が、インターフェロン療法を中止してから2週間後でさえも残っている。このように、その長い半減期のために、Mxタンパク質はインターフェロンの効能の良好な指標である。さらに、Mxタンパク質は、容易に検出できるために、広範囲のインターフェロン用量において、インターフェロン作用の、即座に誘発でき、感度がよい确实な指標となる。

40

【0017】

本発明の方法によると、変性塩、洗浄剤、および細胞内タンパク質を分解するプロテアーゼを含有する溶液を、プロテアーゼを変性するのに十分な温度で十分な期間に亘り加熱する。この溶液は、溶解細胞、例えば、ヒト全血細胞または培養細胞により調製してもよい。

【0018】

この溶液はまた、血液を擬態した人工マトリックスを作成することにより調製してもよい。全血を擬態した多くの人工マトリックスが本発明により使用するのに適している。好ましくは、本発明により配合し、プロテアーゼを含まないウシ血清アルブミンおよび結晶性ウシヘモグロビンからなる人工マトリックスを用いる。

50

【0019】

様々な変性剤が、当業者に知られており、本発明の方法により用いられる。そのような例としては、以下に限定されるものではないが、尿素および塩酸グアニジンが挙げられる。これらが好ましい変性剤である。本発明により阻害されるプロテアーゼには、白血球内に存在することが知られている実質的にすべてのプロテアーゼがあり、カテプシンG、エラスターゼ、メタロプロテアーゼ等が挙げられる。

【0020】

本発明の方法を行なう場合、すなわち、細胞内タンパク質を分解するプロテアーゼを変性するように溶液を処理する場合、タンパク質分解の危険を冒すことなく、細胞内タンパク質をこの溶液に加えてもよい。このような溶液は、アッセイにおいて抗原基準の希釈液の役割を果たし、全血細胞溶解産物、または全血細胞溶解産物を擬態する合成マトリックスを含有する。本発明の好ましい実施の形態によると、そのような溶液は、少なくとも3週間に亘り40の温度で安定のままである。

10

【0021】

別の実施の形態によると、この溶液は、アッセイの基準の役割を果たすか、または、アッセイにおける試料、例えば、ヒト全血試料を含む。この溶液が全血細胞または培養細胞を含有する場合、変性剤の存在下で溶液を加熱する前に、溶解剤をこの溶液に含めることが都合よい。したがって、1つの工程で細胞を溶解し、プロテアーゼを変性する。

【0022】

様々な溶解剤が本発明に使用するのに適している。そのような例としては、以下に限定されるものではないが、単分散および多分散のポリオキシエチレン、同質および異質のポリオキシエチレンのような非イオン系洗浄剤が挙げられる。好ましい溶解剤の例としては、Tergitol NP-40 (ユニオンカーバイド社から得られる) またはトリトン X-100 (ロームアンドハース社から得られる) が挙げられ、試料が他の変性剤 (尿素および塩酸グアニジンのような) の存在下で加熱される場合、その濃度がプロテアーゼを変性するのに十分であるような量で加えなければならない。

20

【0023】

タンパク質が可溶化される前または同時に細胞が溶解されるか否かは重要ではないが、非イオン系洗浄剤は変性工程を補助するので、細胞を溶解するのに用いる非イオン系洗浄剤を変性溶媒に含めることは重要である。溶解が必要とされない場合 (例えば、合成マトリックスを用いる場合)、1種類以上の他の変性剤 (例えば、尿素または塩酸グアニジン) および陰イオン系洗浄剤 (例えば、SDS) とともに非イオン系洗浄剤を加えて、確実に変性を生じさせなければならない。含まれる細胞に応じて、他の溶解剤が適する場合もある。例えば、赤血球の場合には、細胞を溶解させるのに水で十分である。しかしながら、非イオン系洗浄剤とは別の作用物質を用いて細胞を溶解する場合、プロテアーゼを変性するためには依然として、非イオン系洗浄剤を用いなければならない。

30

【0024】

過去において熱と組み合わせたSDSを用いて天然形状のタンパク質の電荷を隠蔽し、このようにしばしば変性を行ってきたが (Laemmli, Nature 227:680(1970)参照)、本発明においてコントロールされた形式でSDS、変性剤 (例えば、尿素) および熱を用いると、関心のあるタンパク質が変性されずに、プロテアーゼが破壊されるのみである。この溶液を、プロテアーゼを変性するのに十分な温度で十分な期間に亘り変性剤の存在下で加熱する。加熱する温度および時間は、プロテアーゼを十分に変性するように選択すべきであり、溶液が細胞内タンパク質を含有する場合には、その温度と時間は、細胞内タンパク質を変性しないように選択しなければならない。50以上の温度を選択し、少なくとも60秒間に亘り溶液を加熱すべきである。細胞内タンパク質が溶液中に含まれる場合には、この溶液は、15-30分の期間に亘り、約50から約60までの温度で加熱すべきである。溶液が人工マトリックスのみを含む (すなわち、プロテアーゼの不純物を含有するが、関心のあるタンパク質はまだ含んでいない) 場合、関心のあるタンパク質をこのマトリックスに加える前に、より過酷な条件を用いもよい。例えば、そのような溶液を、約1分から1

40

50

時間以上の期間に亘り、約50 から約100 までの温度で、好ましくは、約1時間に亘り約56 の温度で加熱してもよい (Manwaring, W.H. (1906) the destruction of complement by heat, TR. Chicago Path Soc. 6:425 参照のこと)。

【0025】

溶液が細胞内タンパク質を含有する場合、この溶液の条件は、そのようなタンパク質が生存するような範囲内に維持しなければならない。特に、溶液のpHは7.0-8.0の範囲内に維持すべきであり、この溶液のイオン強度は約4M以下のレベルに維持すべきである。

【0026】

上述したように、熱安定性細胞内タンパク質(例えば、M×タンパク質)を含有し、M×タンパク質を分解するプロテアーゼを含まない本発明による溶液は、確実に再現性のあるアッセイにより細胞内M×タンパク質を測定するのに役立つ。ここに用いているように、「測定」という用語は、アッセイの限界での細胞内タンパク質の検出、または細胞内タンパク質の溶液の濃度の測定を定義することを意味するものである。本発明による測定に用いられるように変更してもよい多くの種類のアッセイがこの業界で知られている。一般的なアッセイの種類例としては、1993年10月12日にターチャ等に発行された米国特許第5,252,459号に記載されているもののような、直接、間接、競合およびサイドイッチ型の同質または異質アッセイが挙げられる。この特許をここに引用する。

10

【0027】

本発明の特に好ましい実施の形態によりM×タンパク質についてヒトの血液を検定する場合には、以下のように検定方法を行なってもよい。上述したように、溶解剤、1種類以上の変性剤(好ましくは尿素)およびドデシル硫酸ナトリウム(sodium dodecyl sulfate: SDS)を組み合わせることにより全血細胞由来のタンパク質を含有する溶液を調製する。洗浄剤はプロテアーゼを変性しM×タンパク質を可溶化するように選択する。さらに、変性が効果的となるようにプロテアーゼを十分に希釈することが重要である。次いで、この溶液を約15-30分間の期間に亘り約50 から約60 までの温度で加熱し、M×タンパク質を測定する。

20

【0028】

プロテアーゼが破壊される温度を測定し、分析物が変性される温度より低いことが分かる限り、様々なタンパク質に関して、本発明を変更することができる。さらに、適切な溶解剤、一般的には非イオン系洗浄剤、および適切な可溶化剤/変性剤、一般的には、陰イオン界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウムのようなイオン系界面活性剤、並びに変性剤の塩(例えば、尿素またはグアニジン)を用いなければならない。得られた試料がすでに溶解している場合には、この系に非イオン系(溶解)作用物質を含ませる必要がない。

30

【0029】

本発明をさらに変更することもできる。例えば、インターフェロンを含有する疑いのある試料が、全血試料、濃縮血液細胞、組織培養細胞、溶解全血細胞を含有する溶液、M×タンパク質を加えて全血溶解産物を擬態する合成マトリックス等であってもよい。他の変更例も当業者には明らかである。

【0030】

以下の実施例は本発明の利点を説明することを意図したものであり、本発明の全範囲を例示するものではない。例えば、特定の変性剤、可溶化洗浄剤および溶解剤を例示するが、様々なそのような作用物質を用いてもよい。M×タンパク質およびM×タンパク質を含有する標準および対照溶液の対応する試料の測定を例示するが、以下に限定されるものではないが、インターフェロンにより誘発されたタンパク質または他のシトキン(cytokines)もしくは他の生物応答変更因子を含む様々な熱安定性タンパク質が本発明の範囲内にあることが分かる。これらおよび他の変更例並びにそれらの同等のものが本発明の範囲内にあることが分かる。

40

【実施例】

【0031】

物質および方法

50

プロテアーゼ阻害剤である、フェニルメチルスルホニルフッ化物 (P M S F)、アプロトニン (a p r o t o n i n)、アンチパイン (a n t i p a i n)、キモスタチン (c h y m o s t a t i n)、ロイペプチン (l e u p e p t i n)、ペプスタチン A、トシル - リシンクロロメチルケトン (T L C K)、トシル - フェニルアラニクロロメチルケトン (T P C K)、イブシロン - アミノノ - カブロン酸 (E A C A)、エラスチナル (e l a s t i n a l)、および E - 64 を、シグマケミカル社 (ミズーリ州、セントルイス) から購入した。非イオン系洗浄剤である、N P - 40 (白血球を可溶化するのに用いた)、2 - メルカプトエタノール (2 - M E)、プロテアーゼを含まないウシ血清アルブミン (B S A - P F)、ラジオイムノアッセイ (R I A) 級 B S A (B S A - R I A) および結晶性ウシヘモグロビン (b H B) もまたシグマケミカル社から購入した。ドデシル硫酸ナトリウム (S D S) をバイオラドラボラトリーズ (カリフォルニア州、ハーキュレス) から購入した。いく種類かのプロテアーゼ、すなわち、エラスターゼ (ブタ膵臓およびヒト白血球)、カテプシン G (ヒト白血球) もまたシグマケミカル社から購入した。結晶性トリプシンをワーシントンバイオケミカルズ社 (ニュージャージー州、フリーホールド) から得て、フェニルスルホニルフッ化物の類似物である P E F A b l o c (商標) をペンタファーム A G (スイス国、バスル) から得た。他の全ての化学品はマリンクロット (ケンタッキー州、パリ) からの試薬級の化学品であった。D E A E セファデックス A 25 および 12.5% のファストゲルをファーマシアバイオテック社 (ニュージャージー州、ピスカタウェイ) から得た。ペントレックスラボラトリ (メイン州、ポートランド) からのヤギ血清を使用前に熱不活化し、0.2 μ m のミリポアフィルタを通して濾過した。固定化タンパク質 - A 親和性 P a k (商標) をピアースケミカルズ社 (イリノイ州、ロックフォード) から購入し、製造社の記載にしたがって用いた。

【 0 0 3 2 】

実施例 1

M x タンパク質のタンパク質分解の研究

正常なヒト血漿 (N H P)、全血溶解産物 (W B L)、濃縮血液細胞溶解産物 (血漿がない状態 ; B C L)、全血溶解産物を擬態した合成マトリックス、およびプロテアーゼを含まない対照における N x タンパク質の分解についての研究を行なった。

【 0 0 3 3 】

培養細胞系統 (すなわち、W I S H、C H O、3 T 3) 内の M x タンパク質をインターフェロン (B / D) (スイス国、バスレ、チバガイギー社) により誘発し、細胞を溶解させて、使用するまで - 80 で凍結貯蔵した。E L I S A アッセイにより、凍結細胞溶解産物内に存在する内因性 M x タンパク質が凍結融解後に元の新鮮な試料よりもずっと少量の免疫反応性 M x タンパク質を示したことが分かった。これとは対照的に、E . C o l i 内で産生され、同様に精製し、使用するまで - 80 で貯蔵した組換え M x タンパク質は、凍結および融解を繰り返した際にも最初の免疫反応性を 100 % 維持した。

【 0 0 3 4 】

既知の量の精製 r M x タンパク質を、2 種類の異なる B S A 試料、すなわち、B S A - P F (プロテアーゼを含まない) および B S A - R I A、並びに正常で健康なボランティアから新鮮な状態で採取した溶解全血に加えた。全血溶解産物および 2 種類の異なる B S A 試料の両者は、溶解剤、特に、前に参照したトーピン等により記載された 2 % (v / v) M P - 40 洗浄剤を含んでいた。これらの試料をさらに、変性剤、特に 2 M の尿素、および可溶化洗浄剤、特に 0.1 % の S D S、並びに緩衝塩、すなわち、50 m M のトリス H C l (p H 8.0) を含有する媒体で希釈した。最終的なタンパク質の濃度を 1 % に調節した。M x タンパク質を、B S A - P F および結晶性 b H B を含む合成マトリックス中に添加した。

【 0 0 3 5 】

これらの試料を 120 分間までの期間に亘り 37 で保温した。試料のアリコットを周期的に採取して、溶液中に残った M x タンパク質の量を、化学発光イムノアッセイにおいて測定したように、ある時間に亘って信号 (R U L の) の低下との相関関係により算定した。

【 0 0 3 6 】

B S A - P F 中に加えた M x タンパク質には、この保温期間中に最小限の分解が行なわれた。これとは対照的に、B S A - R I A は最初の30分以内で M x タンパク質を急速に分解し、全血溶解産物内の M x タンパク質は2時間の保温期間に亘り連続的に分解された。B S A - P F および結晶性 b H B を含む合成マトリックスに添加した M x タンパク質もまた分解された。

【0037】

B S A - P F 内では M x タンパク質は最小限に分解されたので、結晶性 b H B がこのプロテアーゼ活性の供給源であったに違いないと思われる。実際、ヘモグロビンの濃度を増加させた合成マトリックスでは、より大きい程度の M x のタンパク質分解を示した。M x タンパク質は、全血溶解産物内においてよりも、濃縮血液細胞溶解産物（血漿を含まない）内においてのほうがより速く分解された。

10

【0038】

第1図は、対照（1%の B S A）と比較した、正常なヒト血漿（N H P）、全血溶解産物（W B L）および濃縮血液細胞溶解産物内の M x タンパク質の著しい減少を示す、このアッセイの結果を示すグラフである。この調査から、M x タンパク質は、様々な生物体液、とりわけ血液細胞溶解産物においてタンパク質分解にさらされることが明確となった。これらの結果は、臨床試料内の M x タンパク質の量を確実に再現可能に測定する前に、合成マトリックス並びに全血溶解産物内においてプロテアーゼ活性を除去する必要があることが明らかとなった。

20

【0039】

実施例 2

全血溶解産物の調製

新鮮な状態で採取した血液に2%（v/v、最終濃度）の N P - 40 洗浄剤を加えることにより、正常で健康なボランティアからの全血溶解産物を調製し、E D T A またはヘパリンを含有する管内に採集し、非処理対照として使用した。インターフェロン（B/D）の臨床試験からの臨床試料もまた、正常な対照血液溶解産物と同様な方法で調製し、使用するまで - 80 で凍結保持した。

【0040】

実施例 3

M x タンパク質用の合成マトリックスの配合

様々なヘマトクリットを有する個々の全血溶解産物を擬態する一連の合成マトリックスを形成した。これらの合成マトリックスは以下のように P B S 内の b H B および B S A - P F からなるものであった：

30

【表 1】

	ヘマトクリット			
	15%	30.0%	45.0%	70.0%
b H B	5g%	10.0g%	15.0g%	23.9g%
B S A	7g%	5.5g%	4.5g%	2.5g%

40

【0041】

これらの合成マトリックスの目的は、M x アッセイの信号読出し値について様々なヘモグロビン含有量の潜在的な影響を調査し、最も適したヘモグロビン含有量を定義して合成マトリックスを配合することであった。

【0042】

実施例 4

M x タンパク質測定のアッセイの開発

1. M x タンパク質に対するモノクローナル抗体

50

2種類の異なるモノクローナル抗体、一方はM×タンパク質のC末端(クローン1302.5.32)に向けられ、他方はN末端(クローン1302.34.16.2.44)に向けられた抗体をサンドイッチ型イムノアッセイにおいて捕捉および検出抗体として用いた。これらのモノクローナル抗体を産生した細胞系統を、ハイブリドーマM×1302.5.32およびハイブリドーマM×1302.34.16.2.44として同定した。これらの細胞系統を、アメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC)特許寄託機関(米国、20852メアリーランド州、ロックビル、パークロンドライブ12301)に寄託し、ATCC番号として、ATCC HB-11836(ハイブリドーマM×1302.5.32)およびATCC HB-11837(ハイブリドーマM×1302.34.16.2.44)を得た。この寄託はブダペスト条約の下で行なった。タンパク質Aセファロース媒体を用いてこれらの抗体をマウス腹水から精製し、クーマシーブルー染色SDS-PAGEゲル(20)のデンストメトリー走査により>95%の純度であることが証明された。米国特許第4,554,088号に開示されたようなホワイトヘッド等のグルタルアルデヒド活性化方法を用いて、M×タンパク質のC末端に向けられたクローン1302.5.32モノクローナル抗体を常磁性粒子(PMP)に接合した。PMP接合抗体をPMP洗浄緩衝液中で10mg/mlで懸濁させ、固相捕捉抗体として用いた。この緩衝液は、食塩加リン酸緩衝液(PBS)中に、0.25%のBSA(プロテアーゼを含まない)、0.7%のウシガンマグロブリン(BGG、ペンテックス、マイルスサイエンティフィック、ナバービル、イリノイ州)、および0.1%の窒化ナトリウムを含有するものであった。室温で30分間に亘り、DMAE:抗体=20:1のモル比で、一定に攪拌しながら、N-ヒドロキシスクシンイミド-活性化ジメチルアクリジニウムエステル(DMAE-NHS、チバコーニングダイアグノスティクス社、ワルポール、マサチューセッツ州)を用いて、M×タンパク質のN末端に向けられたクローン1302.34.16.2.44モノクローナル抗体をアクリジニウムエステルで標識付けした。PBS中のDEAE-セファデックスA25カラムのクロマトグラフィーによりDMAEを含まない抗体およびDMAE標識付け抗体を分離した。1mlの分画を採集し、標識付け抗体分画をMLA-IまたはIIルミノメータ(オハイオ州、オバーリン、チバコーニングダイアグノスティクス社)を用いてモニタした。DMAE標識付け抗体を含有する分画をプールし、1%のBSA-PF、2%のNP-40および0.1%の窒化ナトリウムを含有するPBS中で1012相対発光単位(RLU)/mlの最終濃度まで希釈した。両方の抗体試料を使用するまで4で貯蔵した。

10

20

30

40

50

【0043】

2. 化学発光アッセイの開発

E. Coliの封入体由来の精製組換えM×タンパク質(rMx)(ホリスバーガー等の「cDNA Cloning and Assignment to Chromosome 21 of IFI-78-k Gene, The Human Equivalent of Murine Mx Gene」、Somatic Cell & Molecular Genetics,14,123,(1988))を抗体標準として用いた。BSA標準を用いたバイオラドタンパク質アッセイ、および前述したトウピン等により記載された2-Dゲルの定量ウエスタンブロッティングの両方により、タンパク質の含有量を測定した。M×タンパク質の量を、全血溶解産物に関してもととトウピン等により公表されたELISAアッセイを変更したアッセイにおいて確認した。変更したアッセイでは、より多い試料容量(50ul対20ul)およびより多い第1の抗体の量(50ul対40ul)と第2の抗体の量(100ul対50ul)を用いた。精製したrM×タンパク質を変更ELISAアッセイにおける抗原標準として用いた。M×タンパク質の化学発光イムノアッセイに関して、全ての試料または既知の量のM×タンパク質を含有する合成マトリックスを、DMAE標識付け検出抗体およびPMP接合捕捉抗体とともに、同時に12×75mmのプラスチック管内で保温した。保温期間は、水浴中37で、30分から120分までの間で変更した。各々の保温期間の終りに、室温で3分間に亘り、磁化分離ラックであるマジックラック(商標)(マサチューセッツ州、E.ワルポール、チバコーニングダイアグノスティクス社)により固相結合免疫複合体を分離した。非結合抗原または抗体をデカンテーションにより捨てた。次いで、分離した沈殿を、マルチチューブボルテクサー(ニューヨーク州、コーニング、モデル4010)を用いて、1mlの脱イオン水中に再懸濁させ、PMP沈殿を分離し、非結合物質を上述のように除去した。これら

の沈殿を 1 m l の脱イオン水でもう 1 度洗浄し、M L A - I または I I ルミノメータにおいて計測する前に最終的に 0.1 m l の脱イオン水中に再懸濁させた。自動アッセイに関して、A C S : 180 (商標) (オハイオ州、オバーリン、チバコーニングダイアグノスティクス社) を用いて、統計プログラムにより作成した数学アルゴリズムを用いて、データを分析した。

【 0 0 4 4 】

3 . D M A E 標識を有する検出抗体の調製

物質および方法の章に記載した D M A E 標識付け方法を用いて、ルミノメータにより測定した発光およびバイオラドタンパク質アッセイにより測定したタンパク質濃度に関して、検出抗体 (クローン 1302.34.16.2.44) 1 m g 当たり 7×10^1 1 相対発光単位 (R L U) の比活性を有する D M A E 標識付け抗体を得た。製造者が提案したタンパク質 A セファロースにより検出抗体を精製した。D M A E 標識付け抗体は、E L I S A に用いたビオチニル化抗体と同様に、用量依存様式で固相結合 M x タンパク質と反応した。この結果は、D M A E 標識付けが M x 抗原に対する検出抗体の免疫反応性を破壊しなかったことを示している。

10

【 0 0 4 5 】

4 . P M P 結合抗体の調製

捕捉抗体 (クローン 1302.5.32) を 74% の結合効率で P M P に接合し、P M P 1 g 当たり 150 m g の抗体が結合した。この P M P 接合抗体は用量依存様式で r M x の別のエピトープと反応した。このエピトープは D M A E 標識付け抗体により使用されない。

20

【 0 0 4 6 】

5 . M x タンパク質の化学発光アッセイの開発

A . 化学発光信号出力への生化学特性およびマトリックスの総タンパク質濃度の影響

全血溶解産物は主にヘモグロビンおよび血清アルブミンからなるので、これらの 2 種類のタンパク質の化学発光信号出力への影響を調査した。合成マトリックスの総タンパク質濃度の化学発光信号への影響を調査した。同じ 1 g % (w / v) 濃度でのヘモグロビンは 1 % の B S A のものと比較した化学発光信号出力のたった 1 / 10 を示した。一方、2 g % の総タンパク質 (ヤギ血清 + 15 g % ヒトヘモグロビンの 1 : 10 の希釈) は、1 % の総タンパク質により生じた信号出力のたった 1 / 2 を生じた。したがって、タンパク質 (すなわち、ヘモグロビン対 B S A) の生化学特性並びに総タンパク質の濃度の両方が化学発光アッセイの信号出力に影響を与える。

30

【 0 0 4 7 】

第 2 図は、2 M の尿素 + 0.1 % の S D S を含有する緩衝液 (例えば、50 m M のトリス H C l (p H 8.0)) により 20 倍までマトリックスを希釈した際に、15% と 70% の間でヘマトクリットを示す 4 種類のマトリックス全てが同様な信号出力を生じた。プロテアーゼ不活化工程は、同様にこの希釈において最良に機能する。したがって、この希釈方法を標準試料調製の一部に含める。

【 0 0 4 8 】

B . 非特異的結合および信号出力のレベルへの洗浄剤濃度の影響

全血溶解産物または合成マトリックス内に存在する 2 % (v / v) N P - 40 洗浄剤にかかわらず、2 M の尿素 (変性剤) および 0.1 % の S D S (可溶化洗浄剤) を含有する媒体により溶液を 20 倍に希釈したので、アッセイ混合物中の洗浄剤の最終濃度は低かった。したがって、検出抗体を含有する媒体中で N P - 40 のいくつかの濃度 (すなわち、0.5、1 および 2 %) を検査して、洗浄剤の濃度 (0.2 %) が固相 (P M P) に対する D M A E 標識付け抗体の非特異的結合を阻害するのに十分であるか否かを決定した。アクリジニウムエステル標識付け抗体を含有する媒体中の 2 % (v / v) での N P - 40 濃度により最良の信号 / ノイズ比が得られたことが分かった。洗浄剤がこのレベルより低い場合 (アッセイ混合物中 0.525 % の N P - 40) 、特に M x タンパク質濃度のより低い範囲で (約 4 n g / m l より少ない) 、非特異的結合のレベルが高く、一方、この範囲よりも洗浄剤濃度が大きい場合には、信号出力が低かった。アッセイ混合物中に 50 m M の 2 - M E を含めること

40

50

により、M×タンパク質の溶解度を高めることなく、非特異的結合のレベルを上昇させたことも分かった。したがって、M×タンパク質の溶解度を高めるために元の緩衝カクテル中に含まれた2-MEが、本発明の変性媒体、すなわち、アッセイ混合物中において削除された。

【0049】

C. アッセイ感度レベルへの保温時間の影響

正常で健康なボランティアにおけるM×タンパク質のレベルが本発明のアッセイの検出限界であったので、アッセイの感度限界をより長い保温期間により延長できるか否かを調査した。保温期間を30分から2時間に増加させたときに、絶対信号出力がより大きくなった。しかしながら、このことによって、感度限界を延長したり、M×抗原濃度のより小さいほうでアッセイの精度を改良したりしなかった。したがって、30分の保温期間を選択した。

10

【0050】

6. M×タンパク質の希釈および回収

M×タンパク質アッセイが広範囲のM×タンパク質濃度で線形の用量応答曲線を形成することを確認するために、M×タンパク質を、同一のアッセイ媒体中で連続して希釈し、7種類の異なるM×濃度で検定した。3種類の別々のACS:180装置で検査したM×タンパク質の平均的な回収率は95.9%の平均回収率を示し、1ng/mlが感度限界であり、このアッセイの性能が濃度に依存しないことを示している。

20

【0051】

実施例5

熱安定性タンパク質のタンパク質分解の阻害

既知の量の組換えM×タンパク質を全血溶解産物または合成マトリックス中に添加し、37で保温した。試料のアリコットを周期的に採取し、残留M×タンパク質について検定するまで氷上に保持した。

【0052】

変性剤および可溶化剤を含有する様々な容積比の溶液、特に50mMのトリスHCl緩衝溶液(pH8.0)中2Mの尿素+0.1(w/v)%SDSにより細胞溶解産物または合成マトリックスを最初に希釈した後、全血溶解産物または合成マトリックス中のプロテアーゼ活性の除去について調査した。次いで、希釈した混合物に、水浴中において、30分間に亘る56での熱処理、または60秒間に亘る90での熱処理を施した。既知の量のM×タンパク質を熱処理した媒体中に添加し、120分までに亘り37でさらに保温した際のM×タンパク質レベルの変化を観察した後、合成マトリックスまたは全血溶解産物のプロテアーゼ活性を破壊する熱処理の効能を調査した。

30

【0053】

2Mの尿素+0.1%のSDS+50mMのトリスHCl(pH8.0)を含有する緩衝液を調製し、その後、熱処理を行なって、プロテアーゼ活性への影響を調査した。合成マトリックスまたは全血溶解産物を上記溶液で20倍(v/v)まで希釈し、60秒間に亘る90での熱処理、または30分間に亘る56での熱処理を施した。熱処理に続いて、溶液をさらに60分間に亘り37で保温し、この保温期間中に採取した試料のアリコットにより、残留プロテアーゼ活性を評価した。

40

【0054】

第3図に示したように、本発明により熱不活化された4種類の異なる合成マトリックス中に添加されたM×タンパク質は、少なくとも1時間に亘り37で安定のままであり、細胞溶解産物のプロテアーゼ活性が実質的になくなったことを示している。60秒間に亘り90で加熱することによっても、実質的に同様な結果が得られた。

【0055】

第4図に示したように、6種類の異なる個体の全血溶解産物中に添加したM×タンパク質もまた、本発明による熱不活化工程後に少なくとも1時間に亘り37で安定のままであった。

50

【0056】

本発明の阻害方法もまた、いくつかの市販のプロテアーゼ、すなわち、ヒト白血球からのカテプシンGおよびエラスターゼ、並びにブタ膵臓からのトリプシンおよびIV型エラスターゼにより検査した。本発明の方法はまた、基体(S)に対する酵素(E)の等モル比まで精製プロテアーゼの酵素活性を除去するのに効果的であることが確認された。

【0057】

凍結全血溶解産物中に含まれるM×タンパク質の安定性を評価するために、正常で健康なボランティア由来の4種類の異なる全血溶解産物中に既知の量の精製rM×タンパク質を添加し、4℃、-20℃および-80℃で貯蔵した。これらの全血溶解産物中のM×タンパク質の内因性レベルは事前に測定し、無視してよい程度であることが分かっている。貯蔵した試料のアリコットを毎週採取し、50mMのトリスHCl緩衝液(pH8.0)中に2Mの尿素+0.1%のSDSを含む溶液で20倍の容積に直ちに希釈し、検定工程中のM×タンパク質の分解をさらに最小にするために、30分間に亘り56℃で加熱した。全血溶解産物中に保持したM×タンパク質は、-80℃でさえもかなりの程度の自己分解を行ない、4℃ではより著しく破壊された(1週間で25%の破壊)。これとは対照的に、本発明による熱処理溶解産物中に保持されたM×タンパク質は、少なくとも3週間に亘り-80℃および4℃の両方で安定のままであり、細胞溶解産物中のM×タンパク質のタンパク質分解を停止させることにおけるこの単純な工程の効能を示した。

【0058】

新鮮な状態で採集した正常で健康なボランティアからの血液について全血溶解産物を調製し、非処理正常対照として用いた。インターフェロン(B/D)の臨床検査由来の凍結全血溶解産物の98の試料を、手動アッセイを用いてM×タンパク質について検査した。様々な悪性度を有する合計で26人の患者を1日目、2日目、3日目および7日目、または8日目もしくは9日目に、 2×10^6 から 64×10^6 ユニット/日までのインターフェロン(B/D)用量で処理した。3つの患者の群を1日当たり2, 4, 8, 16, 32, 64および25百万ユニットの各々の用量のインターフェロンで処理した。

【0059】

第5図は、 8×10^6 ユニット/日のIFN(B/D)で処理した3人の患者の典型的な用量依存性M×誘発応答を示している。これらのデータは本発明の方法により収集した。

【0060】

実施例6

手動アッセイと自動アッセイの比較

ACS:180での自動アッセイにおける最大保温時間はたった7.5分であり、一方、手動アッセイにおける保温時間の長さは調整可能である。手動アッセイの性能と自動アッセイの性能を比較するために、手動アッセイにおいて、30分間に亘り37℃で検定混合物を保温することを選択した。その結果により、手動アッセイの保温時間がより長いことを考慮すると、手動アッセイ値は自動アッセイ値よりもほとんど大きくないことが示された。2種類のアッセイは優れた線形相関性($R = 0.987$)を示した。

【0061】

実施例7

比較例：従来プロテアーゼ阻害剤

エラスターゼ阻害剤であるエラスチナル、およびシステイン-プロテアーゼ阻害剤であるE-64を含む、物質および方法の章に列記した少なくとも14の異なるプロテアーゼ阻害剤では、全血溶解産物または合成マトリックスのいずれにおけるプロテアーゼ活性も阻害できなかった。実際、全血溶解産物中にこれらのプロテアーゼ阻害剤を含めることにより、M×タンパク質のタンパク質分解を悪化させた。高濃度のカオトロピック塩(すなわち、3Mのチオシアン酸ナトリウム、または塩化カリウム)、8Mの尿素または6Mのグアニジン-HClのような変性塩を使用すること、もしくは極端なpH(pH2または11)への露出のいずれによっても、M×タンパク質のタンパク質分解を阻止することはできな

10

20

30

40

50

かった。

【0062】

当業者には、ここに列記した全てのパラメータは例示を意味するものであり、実際のパラメータは、密封および基礎配置が用いられる特定の用途に依存することが容易に理解される。したがって、前述した実施の形態は実施例により示したものであり、請求の範囲およびその同等物の範囲内において、本発明は具体的に記載したものと異なる方法で実施してもよいことが理解されよう。

【0063】

以下に、他の参考例を記載する。

【0064】

1. 細胞内に含まれる熱安定性細胞内タンパク質の試料のタンパク質分解を阻害する方法であって、

前記細胞内タンパク質およびプロテアーゼが前記細胞内に含まれる場合には、該細胞を溶解して、該プロテアーゼおよび該細胞内タンパク質を放出し、

a. 放出された細胞内タンパク質およびプロテアーゼを含有する前記試料に1種類以上の変性剤を加えて溶液を調製し、

b. 前記プロテアーゼを変性するが、前記細胞内タンパク質を変性しない、十分な温度で十分な期間に亘り前記溶液を加熱することにより、

該プロテアーゼを変性する、

各工程を含むことを特徴とする方法。

【0065】

2. 前記細胞が非イオン系洗浄剤を使用することにより溶解されることを特徴とする参考例1記載の方法。

【0066】

3. 前記非イオン系洗浄剤がオクチルフェノキシポリエトキシエタノールであることを特徴とする参考例2記載の方法。

【0067】

4. 前記変性剤がドデシル硫酸ナトリウムおよび尿素とグアニジン塩酸塩とからなる群より選択される一方または両方であることを特徴とする参考例1記載の方法。

【0068】

5. 前記加熱工程が、約50 から約60 までの温度で、約60秒から約30分までの期間に亘り前記溶液を加熱する工程を含むことを特徴とする参考例1記載の方法。

【0069】

6. 前記プロテアーゼおよび細胞内タンパク質の供給源が、全血、溶解した全血細胞、濃縮細胞、培養細胞、および全血を擬態する合成マトリックスからなる群より選択されることを特徴とする参考例1記載の方法。

【0070】

7. 前記細胞内タンパク質がMxタンパク質であることを特徴とする参考例1記載の方法。

【0071】

8. 前記溶液中で前記細胞内タンパク質を測定する工程を含むことを特徴とする参考例1記載の方法。

【0072】

9. 前記測定工程が、

前記溶液に不溶性である固相に結合した前記細胞内タンパク質の第1の抗体を提供し、

前記固相を前記溶液に接触させることにより、前記抗体に前記細胞内タンパク質を捕捉させ、

該細胞内タンパク質に対する、標識を担持する該細胞内タンパク質の第2の抗体を反応させ、

10

20

30

40

50

該標識を測定する、
各工程を含み、

前記捕捉工程および反応工程をいずれの順番で行なってもよいことを特徴とする参考例 8 記載の方法。

【0073】

10. 前記第 1 および第 2 の結合パートナーが、ATCC 受入番号 HB-11836 を有するモノクローナル抗体クローンおよび ATCC 受入番号 HB-11837 を有するモノクローナル抗体クローンからなる群より独立して選択されることを特徴とする参考例 9 記載の方法。

【0074】

11. 前記標識がアクリジニウムエステルを含むことを特徴とする参考例 9 記載の方法。 10

【0075】

12. 前記標識が N - ヒドロキシスクシンイミド活性化ジメチルアクリジニウムエステルを含むことを特徴とする参考例 11 記載の方法。

【0076】

13. 試料中のインターフェロンを測定する方法であって、
インターフェロンにより誘発される熱安定性細胞内 M x タンパク質、該細胞内 M x タンパク質を分解する未知のプロテアーゼ、変性剤、および該細胞内 M x タンパク質を可溶化するように選択された洗浄剤を含有する試料を調製し、

該プロテアーゼを変性するが、前記細胞内タンパク質を変性しない、十分な温度で十分な時間に亘り該試料を加熱し、 20

該溶液内の前記細胞内タンパク質を測定する、
各工程を含むことを特徴とする方法。

【0077】

14. 前記加熱工程が、前記試料を約 50 から約 60 までの温度で約 15 分から約 30 分までの期間に亘り加熱する工程を含むことを特徴とする参考例 13 記載の方法。

【0078】

15. 細胞内に含まれる M x タンパク質のタンパク質分解を阻害する方法であって、
前記細胞内タンパク質およびプロテアーゼが細胞内に含まれる場合には、該細胞を溶解して該細胞内タンパク質およびプロテアーゼを放出し、

a. 放出された細胞内タンパク質およびプロテアーゼを含有する前記試料に 1 種類以上の変性剤を添加し、 30

b. 前記プロテアーゼを変性するが、前記細胞内タンパク質を変性しない、十分な温度で十分な時間に亘り前記溶液を加熱することにより、

該プロテアーゼを変性する、
各工程を含むことを特徴とする方法。

【0079】

16. a. 前記細胞が非イオン系洗浄剤を使用することにより溶解され、
b. 前記変性剤が、ドデシル硫酸ナトリウム、尿素、および塩酸グアニジンからなる群より選択され、

c. 前記加熱工程が、前記溶液を約 50 から約 60 までの温度で約 60 秒から約 30 分までの期間に亘り加熱する工程を含むことを特徴とする参考例 15 記載の方法。 40

【0080】

17. 前記非イオン系洗浄剤が Tergitol NP - 40 であり、前記変性剤が尿素およびドデシル硫酸ナトリウムであることを特徴とする参考例 16 記載の方法。

【0081】

18. 細胞内に含まれる M x タンパク質の量を測定する方法であって、

a.

1. 前記細胞内タンパク質およびプロテアーゼが細胞内に含まれる場合には、該細胞を溶解して該細胞内タンパク質およびプロテアーゼを放出し、

2. イ. 放出された細胞内タンパク質およびプロテアーゼを含有する前記試料に 1 種類 50

以上の変性剤を加え、

ロ．該プロテアーゼを変性するが、前記細胞内タンパク質を変性しない、十分な温度で十分な期間に亘り前記溶液を加熱することにより、

該プロテアーゼを変性する、

各工程により、前記細胞内に含まれるM×タンパク質のタンパク質分解を阻害する工程を含むことを特徴とする方法。

【0082】

19． a．前記細胞が非イオン系洗浄剤を用いることにより溶解され、

b．前記変性剤が、ドデシル硫酸ナトリウム、尿素、および塩酸グアニジンからなる群より選択され、

c．前記加熱工程が、前記溶液を約50 から約60 までの温度で約60秒から約30分までの期間に亘り加熱する工程を含むことを特徴とする参考例18記載の方法。

【0083】

20．前記M×タンパク質の量を測定する方法が、ATCC受入番号HB-11836およびHB-11837を有するモノクローナル抗体クローンを使用することを特徴とする参考例18記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0084】

【図1】第1図は、正常なヒト血漿、全血溶解産物、濃縮血液細胞溶解産物、およびプロテアーゼを含まないウシ血清アルブミン内のM×タンパク質の比較分解を、37 で培養した分で示した時間に対する405 nmでの光学的濃度(O.D.)の単位で示したグラフである。

【図2】第2図は、ng/mlの単位のM×濃度に対する相対光単位(RLU)の千倍の単位における、M×のタンパク質分解が本発明の方法により阻害され、ヘマトクリットが15、30、45および70%である溶液から由来した、本発明による化学発光イムノアッセイにおけるM×抗原の標準曲線を示すグラフである。

【図3】第3図は、37 での時間(分)に対する相対光単位(RLU)の千倍の単位における、15、30、45および70%のヘマトクリットを有する合成マトリックス内の、2Mの尿素および0.1%のSDS内の加熱後の熱不活化により、本発明による合成マトリックス内のM×タンパク質のタンパク質分解がなくなったことを示すグラフである。

【図4】第4図は、37 での時間(分)に対する相対光単位(RLU)の千倍の単位における、56 で30分間に亘り尿素中での加熱により、本発明による全血溶解産物内のM×タンパク質のタンパク質分解がなくなったことを示すグラフである。

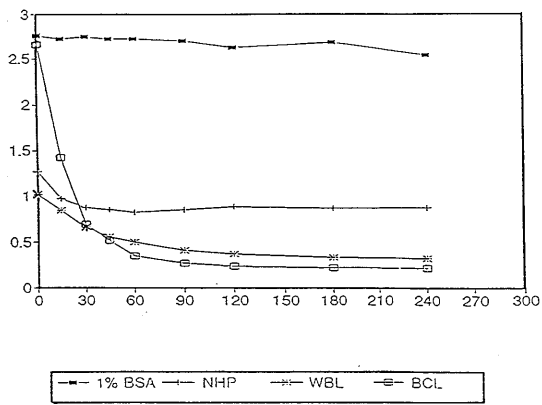
【図5】第5図は、全血内のM×濃度(ng/ml)の単位の様々な日の応答を示す、IFN(B/D)の 8×10^6 単位/日を用いた、本発明のアッセイにより測定した、3人の患者にインターフェロンを投与した後のM×タンパク質の典型的な用量応答誘発を説明するグラフである。

10

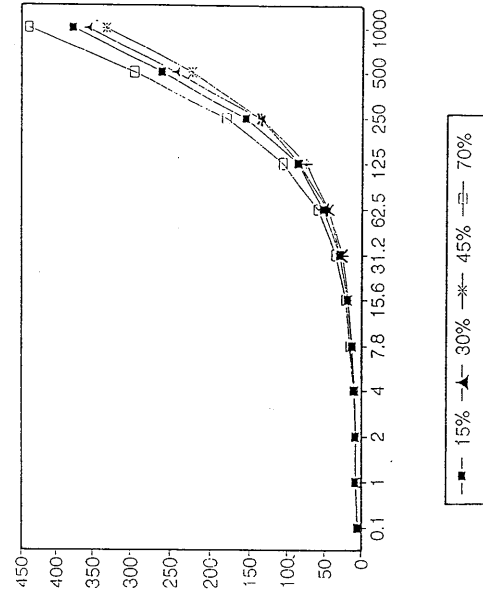
20

30

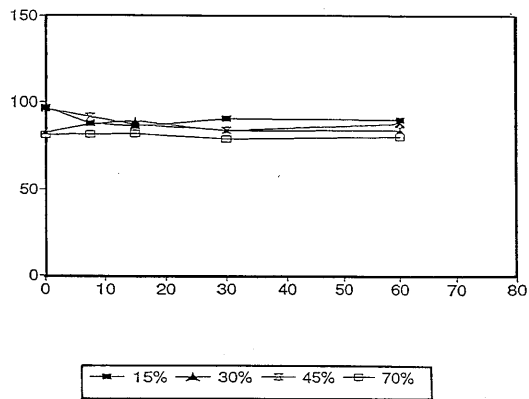
【 図 1 】



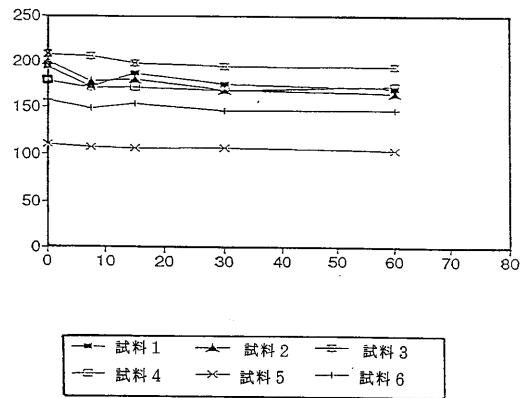
【 図 2 】



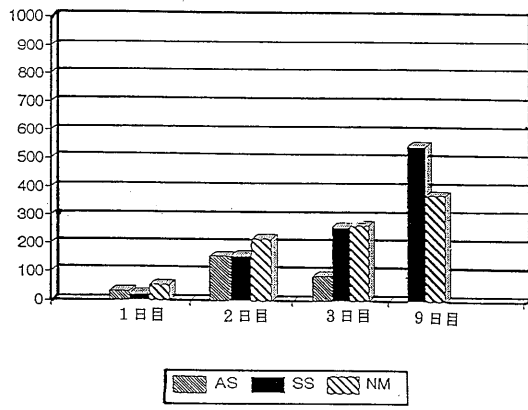
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



フロントページの続き

(72)発明者 ハリー トウビン

スイス国 チューハー - 4 1 2 3 アルシュヴィル フェルドストラーセ 3 1

Fターム(参考) 2G045 BA01 BB01 BB29 BB51 CA25 CA26 CB01 DA20 DA36 FB01
FB03 FB07 FB13 FB15 GC10
2G052 AA30 AA33 AB18 AD29 AD46 CA03 EB11 EB12 FD02 FD09
GA12 GA30 JA06 JA11
4B063 QA20 QQ03 QQ95 QR67 QS33

专利名称(译)	抑制人全血细胞裂解物的蛋白酶活性		
公开(公告)号	JP2004329214A	公开(公告)日	2004-11-25
申请号	JP2004153125	申请日	2004-05-24
[标]申请(专利权)人(译)	拜尔公司		
申请(专利权)人(译)	拜耳公司		
[标]发明人	セキユンオウ ハリートウビン		
发明人	セ-キユン オウ ハリ- トウビン		
IPC分类号	G01N33/48 C12N9/99 C12Q1/37 G01N1/28 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/68		
CPC分类号	C12Q1/37 G01N33/6866 Y10S435/962 Y10S435/967		
FI分类号	C12Q1/37 G01N33/48.A G01N1/28.J G01N1/28.K G01N1/44		
F-TERM分类号	2G045/BA01 2G045/BB01 2G045/BB29 2G045/BB51 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB13 2G045/FB15 2G045/GC10 2G052/AA30 2G052/AA33 2G052/AB18 2G052/AD29 2G052/AD46 2G052/CA03 2G052/EB11 2G052/EB12 2G052/FD02 2G052/FD09 2G052/GA12 2G052/GA30 2G052/JA06 2G052/JA11 4B063/QA20 4B063/QQ03 4B063/QQ95 4B063/QR67 4B063/QS33		
代理人(译)	佐久间刚		
优先权	08/212442 1994-03-10 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种抑制人全血细胞裂解物中的Mx蛋白蛋白质的方法，更具体地说，是提供一种Mx蛋白测定法作为显示干扰素治疗功效的方法。描述了抑制热稳定细胞内蛋白的蛋白水解降解的方法。该方法包括向含有目的蛋白酶和目的蛋白质的样品中加入一种或多种变性剂，并在足以使蛋白酶变性足够长的时间的温度下加热所得溶液。。进一步公开了降解细胞内蛋白的无蛋白酶溶液，这种溶液在4°C下保持稳定至少3周。 [选型图]图1

