

(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2014-533835

(P2014-533835A)

(43) 公表日 平成26年12月15日(2014.12.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 L	
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 4 5 S	
<b>GO 1 N 33/577 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 4 1 A	
	GO 1 N 33/543 5 4 1 B	
	GO 1 N 33/577 B	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁)

(21) 出願番号 特願2014-542542 (P2014-542542)  
 (86) (22) 出願日 平成24年11月19日 (2012.11.19)  
 (85) 翻訳文提出日 平成26年7月7日 (2014.7.7)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/065770  
 (87) 国際公開番号 WO2013/078107  
 (87) 国際公開日 平成25年5月30日 (2013.5.30)  
 (31) 優先権主張番号 13/300,795  
 (32) 優先日 平成23年11月21日 (2011.11.21)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 591286579  
 エシコン・インコーポレイテッド  
 ETHICON, INCORPORATED  
 アメリカ合衆国、ニュージャージー州、サマービル、ユー・エス・ルート 22  
 (74) 代理人 100088605  
 弁理士 加藤 公延  
 (74) 代理人 100130384  
 弁理士 大島 孝文  
 (72) 発明者 ディーン・グリス・アシュリー  
 アメリカ合衆国、08558 ニュージャージー州、スキルマン、フェアビュー・ロード 55

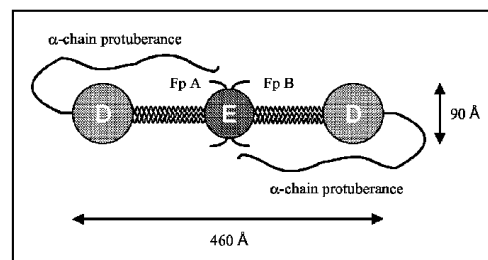
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 フィブリノゲンアッセイ

(57) 【要約】

本発明は、無傷フィブリノゲンを検出する方法に関し、a) 任意に少なくとも部分的にフィブリンに変換された少なくとも一部のフィブリノゲンを含有し、かつ任意にトロンピンを含有する、試料を提供する工程と、b) トロンピン活性を阻害する可溶性溶液中で試料を可溶化する工程と、c) 任意の SDS - PAGE 後、前述の試料の一部分をタンパク質結合膜に移動/つける工程と、d) フィブリノゲンを、フィブリノペプチド A 部分に結合することが可能な一次モノクローナル抗体と反応させる工程と、e) 結合した一次モノクローナル抗体の量を定量化することによって、試料中の無傷フィブリノゲンの量を検出する工程と、を含む。

FIGURE 1.



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

無傷フィブリノゲンを検出するための方法であって、

- a) 任意に少なくとも部分的にフィブリンに変換された少なくとも一部のフィブリノゲンを含有し、かつ任意にトロンピンを含有する、試料を提供する工程と、
- b) トロンピン活性を阻害する可溶化溶液中で前記試料を可溶化する工程と、
- c) 前記試料の一部をゲルに移し、前記一部分を電気泳動に供する工程と、
- d) 前記ゲルから前記試料の前記一部分の画分をタンパク質結合膜に移し、前記膜上で前記フィブリノゲンを固定化する工程と、
- e) 前記膜を少なくとも1つの遮断工程に供する工程と、
- f) 前記膜上で固定化された前記フィブリノゲンを、フィブリノペプチド A 部分に結合することが可能な一次モノクローナル抗体と反応させ、フィブリノゲン抗体複合体を形成する工程と、
- g) 前記膜を少なくとも1つの洗浄工程に供し、任意の非結合一次モノクローナル抗体を除去する工程と、
- h) 前記フィブリノゲン抗体複合体を形成した前記モノクローナル抗体を、マーカを有する二次抗体と反応させる工程と、
- i) 前記膜を少なくとも1つの洗浄工程に供し、マーカを有する任意の非結合二次抗体を除去する工程と、
- j) 前記マーカの量を定量化することによって、前記試料中の無傷フィブリノゲンの量を検出する工程と、を含む、方法。

10

20

## 【請求項 2】

前記試料が、未知量の無傷フィブリノゲンを含有する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記試料が、固体、液体、又は半液体である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記試料が、凍結乾燥されたフィブリノゲン及びトロンピンを含有する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記方法が、SDS-PAGE 及びウエスタンブロットを利用する、請求項 1 に記載の方法。

30

## 【請求項 6】

フィブリノペプチド A 部分に結合することが可能な前記一次モノクローナル抗体が、クローン 1 F 7 である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記一次モノクローナル抗体が、前記フィブリノゲン上でフィブリノペプチド B 部分に結合することが可能である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 8】

マーカを有する前記二次抗体が、アルカリホスファターゼに共役した、ヤギ抗マウス IgG である、請求項 1 に記載の方法。

40

## 【請求項 9】

前記マーカの量を定量化することによって、前記試料中の無傷フィブリノゲンの量を検出する前記工程が、前記タンパク質結合膜をアルカリホスファターゼの基質でインキュベートすることによって実施される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記マーカが、電気化学的に検出可能なマーカ、比色分析で検出可能なマーカ、X線で検出可能なマーカ、磁氣的に検出可能なマーカ、又は蛍光マーカである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 11】

フィブリノゲンである少なくとも1つの生物学的成分を含有する止血デバイスの性能又

50

は安定性を評価するための方法であって、無傷フィブリノゲンの閾値レベルに対して、請求項 1 に記載の方法に従って得られる試料中の無傷フィブリノゲンの量を比較する工程を含む、方法。

【請求項 1 2】

無傷フィブリノゲンを検出するための方法であって、

a) 任意に少なくとも部分的にフィブリンに変換された少なくとも一部のフィブリノゲンを含有し、かつ任意にトロンピンを含有する、試料を提供する工程と、

b) トロンピン活性を阻害する可溶化溶液中で前記試料を可溶化する工程と、

c) 前記試料の一部をタンパク質結合膜につけて、前記膜上で前記フィブリノゲンを固定化する工程と、

d) 前記膜を少なくとも 1 つの遮断工程に供し、前記膜から、フィブリノゲンから開裂したフィブリノペプチド A を除去する工程と、

e) 前記膜上で固定化された前記フィブリノゲンを、フィブリノペプチド A 部分に結合することが可能な一次モノクローナル抗体と反応させ、フィブリノゲン抗体複合体を形成する工程と、

f) 前記膜を少なくとも 1 つの洗浄工程に供し、任意の非結合一次モノクローナル抗体を除去する工程と、

g) 前記フィブリノゲン抗体複合体を形成した前記モノクローナル抗体を、マーカーを有する二次抗体と反応させる工程と、

h) 前記膜を少なくとも 1 つの洗浄工程に供し、マーカーを有する任意の非結合二次抗体を除去する工程と、

i) 前記マーカーの量を定量化することによって、前記試料中の無傷フィブリノゲンの量を検出する工程と、を含む、方法。

【請求項 1 3】

前記試料が、未知量の無傷フィブリノゲンを含有する、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記試料が、固体、液体、又は半液体である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記試料が、凍結乾燥されたフィブリノゲン及びトロンピンを含有する、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 6】

フィブリノペプチド A 部分に結合することが可能な前記一次モノクローナル抗体が、クローン 1 F 7 である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記一次モノクローナル抗体が、前記フィブリノゲン上でフィブリノペプチド B 部分に結合することが可能である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 8】

マーカーを有する前記二次抗体が、アルカリホスファターゼに共役した、ヤギ抗マウス Ig G である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記試料中の無傷フィブリノゲンの量を検出する前記工程が、前記タンパク質結合膜をアルカリホスファターゼの基質でインキュベートすることによって決定される、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記マーカーが、電気化学的に検出可能なマーカー、比色分析で検出可能なマーカー、X 線で検出可能なマーカー、磁氣的に検出可能なマーカー、又は蛍光マーカーである、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 2 1】

フィブリノゲンである少なくとも 1 つの生物学的成分を含有する止血デバイスの性能又は安定性を評価するための方法であって、無傷フィブリノゲンの閾値レベルに対して、請

10

20

30

40

50

求項 1 2 に記載の方法に従って得られる試料中の無傷フィブリノゲンの量を比較する工程を含む、方法。

【請求項 2 2】

無傷フィブリノゲンを検出するための方法であって、

a) 任意に少なくとも部分的にフィブリンに変換された少なくとも一部のフィブリノゲンを含有し、かつ任意にトロンピンを含有する、試料を提供する工程と、

b) トロンピン活性を阻害する可溶化溶液中で前記試料を可溶化する工程と、

c) 前記試料の一部をタンパク質結合膜に移し、前記膜上で前記フィブリノゲンを固定化する工程と、

d) 前記膜を少なくとも 1 つの洗浄及び 1 つの遮断工程に供し、前記膜から、フィブリノゲンから開裂したフィブリノペプチド A を除去する工程と、

e) 前記膜上で固定化された前記フィブリノゲンを、フィブリノペプチド A 部分に結合することが可能な一次モノクローナル抗体と反応させ、フィブリノゲン抗体複合体を形成する工程と、

f) 結合した前記フィブリノゲン抗体複合体を形成する前記一次モノクローナル抗体の量を定量化することによって、前記試料中の無傷フィブリノゲンの量を検出する工程と、を含む、方法。

【請求項 2 3】

前記試料中の無傷フィブリノゲンの量を検出する前記工程 ( f ) が、

a) 前記膜を少なくとも 1 つの洗浄工程に供し、任意の非結合一次モノクローナル抗体を除去する工程と、

b) 前記フィブリノゲン抗体複合体を形成した前記モノクローナル抗体を、マーカを有する二次抗体と反応させる工程と、

c) 前記膜を少なくとも 1 つの洗浄工程に供し、マーカを有する任意の非結合二次抗体を除去する工程と、

d) 前記マーカの量を定量化することによって、前記試料中の無傷フィブリノゲンの量を検出する工程と、によって実施される、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記一次モノクローナル抗体が、マーカに共役しており、前記マーカが、電気化学的に検出可能なマーカ、比色分析で検出可能なマーカ、X 線で検出可能なマーカ、磁気的に検出可能なマーカ、又は蛍光マーカであり、前記試料中の無傷フィブリノゲンの量を検出する前記工程 ( f ) が、前記マーカの量を定量化することによって実施される、請求項 2 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は概して、トロンピンの存在下でフィブリノゲンを検出するための免疫測定法に関する。

【背景技術】

【0002】

血液とは、液相中に分散した赤血球、白血球、小体、及び血小板を含む、液体の組織である。この液相は血漿であり、血漿は、酸性物質、脂質、溶解した電解質、及びタンパク質を含んでいる。この液相中に存在するある特定のタンパク質がフィブリノゲンである。出血が生じるとき、不溶性フィブリン凝塊を形成するために、フィブリノゲンはトロンピン (酵素) と反応する。

【0003】

多種多様な状況において、ヒトを含む動物は、創傷が原因であるいは外科的処置の間に出血に見舞われ得る。いくつかの状況においては、出血は比較的軽いものであり、通常の血液凝固が、簡単な応急処置の実施に加われば、それだけで十分である。他の状況においては、相当な出血が発生し得る。これらの局面では通常、専門的な設備及び物資、並びに

10

20

30

40

50

適切な救助を施すように訓練された人員が必要となる。

【0004】

上述の問題に対処する取り組みにおいて、過剰な出血を抑制するための物質が開発されてきた。局所吸収性止血剤（T A H）は、外科的用途で広く使用されている。T A Hは、ポリグラクチン910、酸化セルロース、酸化再生セルロース（O R C）、ゼラチン、コラーゲン、キチン、キトサン等のラクチド-グリコリドベースのコポリマーを含む、天然から合成ポリマーに及ぶ、少なくとも部分的に再吸収可能な材料及びこれらの組み合わせから典型的に作られる、様々な織布又は不織布又はスポンジに基づく、生成物を包含する。止血性能を改善するために、上記の材料に基づくスカフォールドが、トロンピン及び/又はフィブリノゲン等、生物学的に誘導された凝固因子と組み合わせられ得る。

10

【0005】

現在市場で入手可能な、又は開発中の多くの止血剤は、しばしば凍結乾燥されたトロンピンと組み合わせて、凍結乾燥されたフィブリノゲンを利用し、止血剤は、乾燥粉末、半液体ペースト、液体剤の形態で塗布されるか、又は任意に吸収性布地スカフォールド等の支持スカフォールド上に配設される。

【0006】

多くの先行技術の参考文献が、フィブリン又はフィブリノゲンに対する血漿分析及び関連アッセイ、モノクローナル抗体（m A B）の開発、並びにフィブリノゲン分解産物に対するm A Bに関する。これらの先行技術の参考文献は、トロンピンが試料中に存在せず（又は不活性前駆物質プロトロンピンのみ）、所望の凍結乾燥したタンパク質に適用できず、可溶化工程及び/又はトロンピン不活性化工程を有さない、アッセイを教示する。

20

【0007】

「Useful laboratory tests for studying thrombogenesis in acute cardiac syndromes」(Fareedら、Clinical Chemistry . 44 ( 8 Pt 2 ) : 1845 ~ 53 , 1998)と題する記事は、臨床的用途のためにE L I S A及びラジオイムノアッセイ法においてフィブリノペプチドA ( F p A ) に対する抗体を利用することを開示し、それは、血栓症(血管内の血液凝固)に対するマーカーとしてのF p A に対する抗体の一般的な使用である。

【0008】

「Fibrin detected in plasma of patients with disseminated intravascular coagulation by fibrin-specific antibodies consists primarily of high molecular weight factor XII Ia-crosslinked and plasmin-modified complexes partially containing fibrinopeptide A」(Pfitznerら、Thrombosis & Haemostasis . 78 ( 3 ) : 1069 ~ 78 , 1997)と題する記事は、凝固複合体中のフィブリノゲン/フィブリンを特性化するために、活性凝固を有する患者からの血漿試料を、様々な抗体(フィブリノペプチドAに対する抗体を含む)を用いて評価したことを開示する。出発試料物質は、血漿であった。

30

40

【0009】

「The conversion of fibrinogen to fibrin : recombinant fibrinogen typifies plasma fibrinogen」(Gorkunら、Blood . 89 ( 12 ) : 4407 ~ 14 , 1997)と題する記事は、2つの形態のフィブリノゲンから放出されたF p A の量を定量化するために、H P L Cを使用したことを開示する。出発試料物質は、液体(血漿)であった。

【0010】

「Isolation and characterization of the

50

fibrin intermediate arising from cleavage of one fibrinopeptide A from fibrinogen」(Shainoffら、Journal of Biological Chemistry . 271 (39) : 24129 ~ 37 , 1996)と題する記事は、「 $\alpha$ -プロフィブリン」(放出された通常の2つのFpAペプチドよりも、放出された単一のフィブリノペプチドAを有するフィブリンモノマー)及びその重合する能力の研究を開示する。FpAが開裂したかを決定するために、FpAに対するモノクローナル抗体を使用した。出発物質は、フィブリノゲン、フィブリン、又は中間体を含有する溶液であった。

## 【0011】

「A monoclonal antibody, specific for human fibrinogen, fibrinopeptide A-containing fragments and not reacting with free fibrinopeptide」(Koppertら、Blood . 66 (3) : 503 ~ 7 , 1985)と題する記事は、FpAに対するモノクローナル抗体の生成を記載する。

10

## 【0012】

「Monoclonal antibodies to different neo-epitopes on fibrinogen and fibrin degradation products」(Amiralら、Blood Coagul Fibrinolysis . 1990 Oct ; 1 (4 ~ 5) : 447 ~ 52)と題する記事は、3つの反応性クラス：D及びD二量体、D二量体及び初期フィブリノゲン、並びにフィブリン分解産物に分類されるフィブリン又はフィブリノゲンの分解中に非マスク化されたネオエピトープに特異的な、様々なモノクローナル抗体を開発する試みを開示する。ラテックススライドアッセイ及びELISA技術を開発するために、これらのモノクローナル抗体を使用した。フィブリン関連生成物に特異的なもの、及びフィブリン又はフィブリノゲン分解産物の一体性を評価するものの2つの種類のクエン酸血漿アッセイを得た。

20

## 【0013】

「A monoclonal antibody-based quantitative enzyme immunoassay for the determination of plasma fibrinogen concentrations」(Hoegge-de Nobelら、Thromb Haemost . 1988 Dec 22 ; 60 (3) : 415 ~ 8)と題する記事は、血漿フィブリノゲン濃度の決定のためのモノクローナル抗体による定量的酵素免疫アッセイを開示し、フィブリノゲン、フィブリノペプチドAに対する免疫アッセイを教示し、それは、フィブリノゲンの分解産物を検出しない。

30

## 【0014】

「Comparison of several mouse and rat monoclonal antibodies against human fibrinogen」(Marecekら、Hybridoma . 1996 Dec ; 15 (6) : 423 ~ 7)と題する記事は、ヒトフィブリノゲンに対して増加した6つのモノクローナル抗体が特性化されたことを開示する。マウスモノクローナル抗体をフィブリノゲンの免疫優勢Dドメイン上の連続エピトープに対して標的化し、それらは、Dドメインを含有する全ての分子と交差反応した[フィブリン、フィブリノゲン-分解産物]。

40

## 【0015】

米国特許第7,790,410 B2号は、血液適合性に関して候補材料をスクリーニングする方法を開示し、(1)候補材料をフィブリノゲンと接触させる工程と、(2)工程(1)からの候補材料をトロンピンと接触させる工程と、工程(2)からのフィブリノゲン開裂生成物の存在又はレベルを決定する工程と、候補材料がフィブリノゲン開裂生成物の存在又はレベルに基づき、血液適合性であるかを決定する工程とを含む。

## 【0016】

米国特許第6,074,837号は、試料中のフィブリン及びフィブリン分解産物を決

50

定するための競合免疫測定法を開示し、前述の免疫測定法は、前述の試料、並びに既知のフィブリン及びフィブリン分解産物濃度の陽性対照を、前述のフィブリン及びフィブリン分解産物に特異的に結合する標識抗体と個々に接触させる工程と、好適なインキュベーション時間の後に、非結合標識抗体から、結合した標識抗体を分離する工程と、結合標識を測定する工程と、接触した試料中の測定された結合標識を、接触した陽性対照中の測定された結合標識と比較し、前述の試料中の前述のフィブリン及びフィブリン分解産物の存在又は量を決定する工程とを含み、改善は、前述の陽性対照中の前述のフィブリン及びフィブリン分解産物として、変性フィブリノゲンを使用することを含む。本参考文献は更に、試料中のフィブリン及びフィブリン分解産物を決定するためのサンドイッチ免疫測定法を開示し、前述の免疫測定法は、マイクロタイタープレートのウェルを、前述のフィブリン、前述のフィブリン分解産物、及びフィブリンモノマーに特異的に結合する第1の抗体でコーティングする工程と、前述のマイクロタイタープレートのウェルを分離するために、前述の試料、及び既知のフィブリン又はフィブリンモノマー濃度の陽性対照を接触させる工程と、その個々のウェルから任意の非結合試料又は陽性対照を除去する工程と、各ウェルを、標識化された抗第1の抗体 (antibody antibody) と接触させる工程と、各ウェル中の任意の結合標識を測定する工程と、試料ウェル中の測定された結合標識を、陽性対照ウェル中の測定された結合標識と比較し、試料中の前述のフィブリン及びフィブリン分解産物の存在又は量を決定する工程とを含み、改善は、前述の陽性対照中の前述のフィブリン又はフィブリンモノマーとして、変性フィブリノゲンを使用することを含む、変性フィブリノゲンは、以下の工程を含むプロセスによって得られる：(1) 0.5 ~ 1.5 時間にわたって、二価陽イオンの非存在下での非変性条件下で、30 ~ 40 で、還元剤を用いて、1 ナノモルの前述のフィブリノゲン当たり 0.25 ミリモルで、3 ~ 25 マイクロモルのフィブリノゲンを部分的に還元する工程、次いで、(2) 工程(1)の生成物を、工程(2)の生成物の沈殿を引き起こさない遮断薬と反応させることによって、工程(1)中に形成される任意の遊離システインのチオール基を遮断する工程、次いで、(3) 工程(2)の生成物を、二価陽イオンの非存在下で、生理緩衝液中の凝固酵素と反応させ、フィブリノペプチドA及びBを放出する工程、並びに(4) 前述の凝固酵素の活性を終了させる工程。

10

20

30

40

50

#### 【0017】

米国特許第5,876,947号は、特異的なアミノ酸配列によって定義されるエピトープと特異的に結合するモノクローナル抗体を生成する、P10と同定され、ATCC寄託番号HB-12398として寄託される、連続細胞株を開示し、更に、フィブリノゲン、フィブリノペプチドB、又はdes-ArgフィブリノペプチドB中に存在するようなエピトープに特異的に結合する、単一特異性抗体又はそのフラグメントを開示する。

#### 【0018】

米国特許第4,438,209号は、血漿中のフィブリノペプチドAの濃度を決定するための競合ラジオイムノアッセイ法を開示し、第1に、血液試料が採取され、前述の試料中のトロンピンが阻害量のトロンピン阻害剤によって阻害され、血漿が前述の試料から分離され、第2に、前述の血漿の試料がフィブリノペプチドA及び放射活性物質で標識したフィブリノペプチドAに対する十分な量の抗体と、ラジオイムノアッセイ競合的結合条件下で接触させられ、その後、抗体結合フィブリノペプチドAが非結合フィブリノペプチドAから分離され、放射活性が測定され、改善は、トロンピンに対する阻害剤として、D-フェニルアラニル-L-プロピル-L-N-[2(1-クロロ-7-グアニドヘプタン(guanidoheptane)-2-オン)]、その塩酸付加塩；そのフッ化水素酸付加塩；その酢酸付加塩、及びそのクエン酸付加塩からなる群から選択される阻害剤を使用することを含む。

#### 【0019】

欧州特許公開第EP 345,811 A2号は、ヒトフィブリノペプチドAに特異的なモノクローナル抗体を分泌するが、無傷フィブリノゲンかあるいはヒトフィブリノペプチドA含有フィブリノゲンフラグメントのいずれかと反応しない、ハイブリドーマを開示

する。本参考文献は更に、遊離 F p A を決定するための方法を開示し、( a )モノクローナル抗体を固定化する工程であって、前述のモノクローナル抗体が請求項 1 に従っている、工程と、( b ) ( a ) からの固定化モノクローナル抗体を、標識 h F P A ペプチド又はその標識フラグメント又はその T y r 誘導體、及び血漿試料と接触させる工程と、( c ) 標識を分析する工程とを含む。

**【 0 0 2 0 】**

米国特許第 5 , 8 1 7 , 7 6 8 号は、フィブリノゲンの E サブユニットのエピトープと結合する単一特異性抗体を開示し、前述の単一特異性抗体は、# 3 - 1 0 と同定されるハイブリドーマ細胞株、# 2 9 - 1 と同定されるハイブリドーマ細胞株、及び# 1 4 8 - B と同定されるハイブリドーマ細胞株からなる群から選択されるハイブリドーマ細胞株によって生成される。

10

**【 0 0 2 1 】**

P C T 特許公開第 2 0 0 7 / 0 3 0 5 7 1 A 2 号は、疾患標的分子の同定、並びにそれらの分子に特異的なイメージング試薬及び診断アッセイの開発を開示する。そこには、疾病又は病状に特異的な分子標的の同定のための方法及び試薬、使用され得るイメージング技術の方法、特異的分子イメージング試薬の開発、イメージング試薬の臨床評価、並びに分子イメージングに対する臨床的適応が記載されている。本参考文献は、イメージング剤に結合するアフィニティー剤を含む、標的的特異的イメージング試薬を請求し、前述のアフィニティー剤は、生体分子に特異的に結合し、前述の生体分子の発現は、疾病又は病状を予測する。

20

**【 0 0 2 2 】**

P C T 特許公開第 2 0 0 7 / 0 3 0 5 3 1 号は、疾患標的分子の同定と、それらの分子に特異的なイメージング試薬及び診断アッセイの開発の両方を開示する。そこには、疾病又は病状に特異的な分子標的の同定のための方法及び試薬、使用され得るイメージング技術の方法、特異的分子イメージング試薬の開発、イメージング試薬の臨床評価、並びに分子イメージングに対する臨床的適応が記載されている。本参考文献は、磁気共鳴によって検出可能なイメージング剤に結合する抗体を含む、標的的特異的イメージング試薬を請求し、前述の抗体は、G l y p i c a n - 3 に特異的に結合し、G l y p i c a n - 3 の発現は、肝癌を予測する。

30

**【 0 0 2 3 】**

米国特許出願公開第 2 0 1 1 0 0 5 3 1 9 3 号は、第 1 の反応成分及び第 2 の反応成分の未反応混和物中の第 1 の反応成分又は第 2 の反応成分のいずれかの、活性又は機能性を決定するための方法を開示し、( a ) 第 1 の反応成分を可逆的に抑制し、不活性な第 1 の反応成分及び第 2 の反応成分を有する混合物を得る工程と、( b ) 第 1 の反応成分の活性を評価するときに、既知量の第 2 の反応成分を、又は第 2 の反応成分の活性を評価するときに、既知量の第 1 の反応成分を、その混合物に添加する工程と、( c ) 第 1 の反応成分を可逆的に活性化する工程と、( d ) 第 1 の反応成分を、混和物中にもともと存在する第 2 の反応成分及び既知量の第 2 の反応成分と反応させる工程、又は第 1 の反応成分を、混和物中にもともと存在する第 2 の反応成分及び既知量の第 1 の反応成分と反応させる工程と、( e ) 混和物中にもともと存在する第 1 又は第 2 の反応成分の活性又は官能性を決定する工程とを含む。

40

**【 0 0 2 4 】**

任意に吸収性スカフォールド上に、凍結乾燥されたトロンピン及びフィブリノゲンを含む、止血パッチ又はパッドは、生物学的成分の活性化状態を定量化するためのアッセイがない(つまり、フィブリノゲンがフィブリンに変換されたかどうか)。フィブリノゲン及びトロンピンは水和により自然に反応するため、水分への止血パッドの曝露は、生物学的成分の早期の活性化(出血部位への塗布前)を引き起こし得、パッドの全体的な安定性及び性能に影響を及ぼす可能性があり得る。現在、フィブリン封止剤送達デバイスは、止血又は組織密閉用途のために、創傷上にフィブリノゲン及びトロンピン溶液の混合物を配置するが、フィブリノゲンからフィブリンへの変換を直接評価することが可能な試験が

50

ない。本出願者の研究の一目的は、フィブリノゲンからフィブリンへの変換反応の速度及び程度の両方を測定する強固なアッセイを開発すること、並びにトロンビンの存在下で無傷フィブリノゲンの量を測定することであった。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0025】

簡潔に言うと、本発明は、無傷フィブリノゲンを検出する方法に関し、任意に少なくとも部分的にフィブリンに変換された少なくとも一部のフィブリノゲンを含有し、かつ任意にトロンピンを含有する、試料を提供する工程と、可溶化溶液中で試料を可溶化し、トロンピン活性を阻害する工程と、任意の SDS - PAGE 後、前述の試料の一部分をタンパク質結合膜上に移す工程と、フィブリノゲンを、フィブリノペプチド A 部分に結合することが可能な一次モノクローナル抗体と反応させる工程と、結合した一次モノクローナル抗体の量を定量化することによって、試料中の無傷フィブリノゲンの量を検出する工程と、を含む。

10

【0026】

一実施形態では、本発明は、無傷フィブリノゲンを検出する方法に関し、任意に少なくとも部分的にフィブリンに変換された少なくとも一部のフィブリノゲンを含有し、かつ任意にトロンピンを含有する、試料を提供する工程と、トロンピン活性を阻害する可溶化溶液中で試料を可溶化する工程と、前述の試料の一部分をゲルに移し、前述の一部分を電気泳動に供する工程と、前述のゲルから試料の前述の一部分の画分をタンパク質結合膜に移し、前述の膜上でフィブリノゲンを固定化する工程と、前述の膜を少なくとも1つの遮断工程に供する工程と、前述の膜上で固定化されたフィブリノゲンを、フィブリノペプチド A 部分に結合することが可能な一次モノクローナル抗体と反応させ、フィブリノゲン抗体複合体を形成する工程と、前述の膜を少なくとも1つの洗浄工程に供し、任意の非結合一次モノクローナル抗体を除去する工程と、フィブリノゲン抗体複合体を形成した前述のモノクローナル抗体を、マーカーを有する二次抗体と反応させる工程と、前述の膜を少なくとも1つの洗浄工程に供し、マーカーを有する任意の非結合二次抗体を除去する工程と、マーカーの量を定量化することによって、試料中の無傷フィブリノゲンの量を検出する工程と、を含む。

20

【0027】

代替の実施形態では、前述の膜上で固定化されたフィブリノゲンを、フィブリノペプチド B 部分に結合することが可能な一次モノクローナル抗体と反応させ、フィブリノゲン抗体複合体を形成する。

30

【0028】

試料は、未知量の無傷フィブリノゲンを含有することができる。試料は、固体、液体、又は半液体であってもよい。試料は、凍結乾燥されたフィブリノゲン及びトロンピンを含有することができる。

【0029】

方法は、SDS - PAGE 及び/又はウエスタンブロット若しくはドットブロットを利用することができる。フィブリノペプチド A 部分に結合することが可能な一次モノクローナル抗体は、クローン 1F7 であってもよい。代替の実施形態では、一次モノクローナル抗体は、フィブリノペプチド B 部分に結合することが可能である。フィブリノペプチド A 及び B はそれぞれ、フィブリノゲンの A 及び B 鎖のアミノ末端からのトロンビンの酵素作用によって開裂する。これらのペプチドは、16 及び 14 のアミノ酸からなり、それらはそれぞれ、1536.6 Da 及び 1570.6 Da の分子量を有する。マーカーを有する二次抗体は、アルカリホスファターゼに共役した、ヤギ抗マウス IgG である。

40

【0030】

マーカーの量を定量化することによって、試料中の無傷フィブリノゲンの量を検出する工程は、タンパク質結合膜をアルカリホスファターゼの基質でインキュベートすることによって実施され得る。

50

【0031】

マーカーは、電気化学的に検出可能なマーカー、比色分析で検出可能なマーカー、X線  
で検出可能なマーカー、磁氣的に検出可能なマーカー、又は蛍光マーカーであり得る。

【0032】

別の実施形態では、本発明は、フィブリノゲンである少なくとも1つの生物学的成分を  
含有する止血デバイスの性能又は安定性を評価するための方法に関し、無傷フィブリノゲ  
ンの閾値レベルに対して、上記の方法に従って得られる試料中の無傷フィブリノゲンの量  
を比較する工程を含む。

【0033】

別の実施形態では、本発明は、無傷フィブリノゲンを検出する方法に関し、任意に少な  
くとも部分的にフィブリンに変換された少なくとも一部のフィブリノゲンを含有し、かつ  
任意にトロンピンを含有する、試料を提供する工程と、トロンピン活性を阻害する可溶化  
溶液中で試料を可溶化する工程と、前述の試料の一部をタンパク質結合膜につけて、前  
述の膜上でフィブリノゲンを固定化する工程と、前述の膜を少なくとも1つの遮断工程に  
供し、ドットプロットアッセイ膜から、フィブリノゲンから開裂したフィブリノペプチド  
Aを除去する工程と、前述の膜上で固定化されたフィブリノゲンを、フィブリノペプチド  
A部分に結合することが可能な一次モノクローナル抗体と反応させ、フィブリノゲン抗体  
複合体を形成する工程と、前述の膜を少なくとも1つの洗浄工程に供し、任意の非結合一  
次モノクローナル抗体を除去する工程と、フィブリノゲン抗体複合体を形成した前述のモ  
ノクローナル抗体を、マーカーを有する二次抗体と反応させる工程と、前述の膜を少な  
くとも1つの洗浄工程に供し、マーカーを有する任意の非結合二次抗体を除去する工程と、  
マーカーの量を定量化することによって、試料中の無傷フィブリノゲンの量を検出する工  
程と、を含む。

10

20

【0034】

別の実施形態では、本発明は、無傷フィブリノゲンを検出する方法に関し、任意に少な  
くとも部分的にフィブリンに変換された少なくとも一部のフィブリノゲンを含有し、かつ  
任意にトロンピンを含有する、試料を提供する工程と、トロンピン活性を阻害する可溶化  
溶液中で試料を可溶化する工程と、前述の試料の一部をタンパク質結合膜に移し、前述  
の膜上でフィブリノゲンを固定化する工程と、前述の膜を少なくとも1つの洗浄及び1つ  
の遮断工程に供し、ドットプロットアッセイ膜から、フィブリノゲンから開裂したフィブ  
リノペプチドAを除去する工程と、前述の膜上で固定化されたフィブリノゲンを、フィブ  
リノペプチドA部分に結合することが可能な一次モノクローナル抗体と反応させ、フィブ  
リノゲン抗体複合体を形成する工程と、結合したフィブリノゲン抗体複合体を形成する一  
次モノクローナル抗体の量を定量化することによって、試料中の無傷フィブリノゲンの量  
を検出する工程と、を含む。

30

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】フィブリノゲンの構造を概略的に示す。

【図2】フィブリンへのフィブリノゲン変換を概略的に示す。

【図3】ウエスタンプロットアッセイを実施した後のニトロセルロース膜の画像を示す。

40

【図4】ゲルからニトロセルロース膜へのタンパク質移動の直後、クマシーブルーで染色  
されたゲルの画像を示す。

【図5】ドットプロットアッセイを実施した後のニトロセルロース膜の画像を示す。

【図6】フィブリノゲンの濃度と染色強度との間の直線関係を示すグラフを示す。

【図7】ウエスタンプロットアッセイのための本発明の方法のブロック図を示す。

【図8】ドットプロットアッセイのための本発明の方法のブロック図を示す。

【発明を実施するための形態】

【0036】

フィブリノゲンは、血液凝固基質の前駆体タンパク質である。それは、340,000  
Daの分子量を有し、ジスルフィド結合によって一緒に結合される、3つの対の異なるポ

50

リペプチド鎖 A、B、及び からなる。フィブリノゲンは、三節構造：2つの同一の D 末端球状ドメイン及び1つの中央 E 球状ドメインを有する。これらのドメインの全ては、図 1 に概略的に示されるように、スーパーコイル状ヘリックスによって接続され、ここで、記号 F p A 及び F p B はそれぞれ、フィブリノペプチド A 及び B に対応する。

【0037】

通常の下で、血液は、内皮細胞によって覆われている連続した導管網内に含有される。内皮細胞の管腔表面は、血液の自然凝固及び血小板接着を阻害する、「血液適合性」バリアを形成する。しかしながら、内皮性内膜が破壊されたとき、一連の生化学反応が失血を止めるために開始される。血管損傷の直後、血液が損傷部位から流されるように、損傷した血管は収縮する。凝固プロセスは、特異的な血漿タンパク質及び血小板の、内皮性内膜の破壊に起因する新しく曝露された内皮性内膜への結合によって開始される。損傷した内皮細胞はまた、組織因子、タンパク質及びリン脂質の複合体を放出することによって、凝固プロセスを開始する。いったん凝固が開始されると、酵素活性化の「カスケード」が生じ、損傷部位における多血小板血栓又は止血「血栓」の形成をもたらす。

10

【0038】

以下の出版物が参照され、それは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる：A P De Anglis and G S Retzinger, 「Fibrin (ogen) and Inflammation: Current Understanding and New Perspectives」、Clinical Immunology Newsletter (1999) 18, 111~118。

20

【0039】

血栓の形成の重要な工程は、フィブリノゲンからフィブリンへのトロンビン触媒変換である。この変換が生じるために、トロンビン自体が、凝固プロセス中に生成された酵素複合体によって、その不活性前駆体、プロトロンビンから変換されなければならない。トロンビン、セリンプロテアーゼは、フィブリノゲンの A 及び B ポリペプチド鎖のアミノ末端に位置する特異的なアルギニン-グリシン結合を加水分解し、タンパク質からフィブリノペプチド A 及び B と呼ばれる2つの対の負に帯電したタンパク質フラグメントを放出する。これらのペプチドは、フィブリノゲンの全体の質量の2%しか構成しない。フィブリノペプチドの放出は、Eドメイン内の電荷を負から正に帯電し、そのドメインの、他のフィブリン分子の負に帯電したDドメインとの相互作用を促進する。フィブリンモノマーの互いの相互作用は、図2に概略的に示されるように、半分ずれた配列のフィブリンモノマーの自発的集合体をもたらす。フィブリン重合中に生じるフィブリンモノマーの特異的会合は、フィブリンモノマーの E 及び D ドメイン中のノブ (knobs) 及びホール (holes) と呼ばれる、相補的重合部位間の非共有相互作用の結果である。最初に、フィブリンポリマー集合体は、2つの分子の厚さを有する長いフィブリンオリゴマー、プロトフィブリルを生成する。やがて、プロトフィブリルは横方向に会合して、プロトフィブリルの群を形成し、それらは続いて、集合してより大きいフィブリン線維を形成する。プロトフィブリル集合プロセスは、特有の半分ずれた配列におけるフィブリン線維の相互接続網の形成をもたらす。

30

【0040】

フィブリノゲンのフィブリンへの変換は、フィブリノゲンからのフィブリノペプチド A 及び B のトロンビン触媒開裂を伴う止血プロセスにおいて、重要な工程であり、フィブリンモノマーの形成をもたらす、それは続いて、集合してフィブリンポリマーを形成する。トロンビンの存在下でのフィブリノゲンのフィブリンへの変換の程度の測定は、酵素が、典型的な条件下でフィブリノゲンをフィブリンに自発的に加水分解するため、困難である。フィブリノゲンの量は、タンパク質が可溶化される場合のみ、測定され得る。タンパク質が十分に可溶化される場合、トロンビンは、フィブリノゲンをフィブリンに自発的に変換し、元のフィブリノゲンの測定を防ぐ。

40

【0041】

目的

50

本発明の目的は、以下、フィブリノゲン/フィブリンと称される乾燥フィブリノゲン及び/又はフィブリン、並びにトロンビン粉末からなる出発物質中の、フィブリノゲンのフィブリンへの変換の量を測定することができる方法を提供することである。

【0042】

本発明の更なる目的は、乾燥フィブリノゲン/フィブリン及びトロンビン粉末からなる出発物質の、フィブリノゲンのフィブリンへの潜在的な早期変換の測定を可能にする方法を提供することである。自発的フィブリン形成は、可溶化中にトロンビンを阻害することによって阻止される。

【0043】

本発明の更なる目的は、2つのタンパク質を含有する液体製剤中のフィブリノゲンとトロンビンとの間の反応の速度及び程度を評価するために使用され得る方法を提供することである。

【0044】

本発明のなお更なる目的は、液体製剤又は混合効率を最適化するために、フィブリノゲンとトロンビンとの間の生化学反応を評価するために使用され得る方法を提供することである（液体フィブリン封止剤製剤及び特殊なミキシングチップに適用できる）。

【0045】

本発明のなお更なる目的は、フィブリノゲン及びフィブリンの量を測定するためにタンパク質の可溶化を利用する方法を提供することである。試料調製中の自発的フィブリン形成を阻止するために、水和によってすぐにトロンビンを不活性化し最適化された条件が、タンパク質を可溶化するために使用される。試料調製手順は、元の試料中のフィブリノゲンの量が決定され得るように、任意のフィブリン生成を阻止/最小限化しなければならない。

【0046】

本発明の更なる目的は、2つのタンパク質が一緒に存在するとき、フィブリノゲンの存在を同定し、フィブリノゲンとフィブリンとの間を区別するために、診断及び臨床に応用することができる方法を提供することである。フィブリノゲン及びフィブリンの堆積は、多くの病状、例えば、炎症、アテローム性動脈硬化症、腫瘍、血栓塞栓症等に対する重要なマーカーである。フィブリノゲン及びフィブリンの存在及び/又は相対量は、診断又は予後指標として使用され得る。

【0047】

方法の概要

本発明の一実施形態によると、凍結乾燥されたフィブリノゲン及びトロンビンは、本発明の無傷フィブリノゲンアッセイの前に、又はその一部として可溶化される。可溶化中にフィブリノゲンのフィブリンへの変換を阻止するために、トロンビンは、水和によってすぐに不活性化されなければならない。フィブリノゲンの量を測定するために、タンパク質の混合物は、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）によって分離され、タンパク質結合膜（例えば、ニトロセルロース、ポリビニリデンフルオリド）上にプロットされ得る。あるいは、タンパク質の混合物は、膜上に直接適用され得る。FpA又はFpBに対する抗体を使用して、無傷フィブリノゲンは、膜上で検出され得るが、しかしながら、元の無傷フィブリノゲンがフィブリンに変換された場合（フィブリノゲンからのフィブリノペプチド開裂によって）、タンパク質は膜上で検出されない。本発明の方法は、フィブリノゲンのフィブリンへの変換を評価することが可能であり、かつフィブリノゲン/フィブリン及びトロンビンの任意の混合物に適用できる。

【0048】

加えて、フィブリノゲンの測定に必要とされるタンパク質可溶化工程は、フィブリノゲンとトロンビンとの間の自発的反応をもたらし得、したがって試料可溶化前の任意の反応の正確な測定を阻止し得る。本発明者らは、特定の可溶化条件が、トロンビン活性を阻害し、それでもなおタンパク質を可溶化することを発見した。本発明の可溶化試薬/条件は、高温と組み合わせて、トロンビン阻害剤、高濃度の洗剤、及び還元剤を含む。

10

20

30

40

50

## 【0049】

本発明に記載されるフィブリノゲンのフィブリンへの変換を測定するための分析方法は、酵素トロンビンによって加水分解及び開裂されるフィブリノゲン分子の一部分に特異的な抗体を利用する、免疫プロット技術である。この抗体を使用して、フィブリノゲンを含有する試料が検出される一方で、フィブリンのみを含有する完全に反応した試料は、この抗体によって検出されない。部分的に反応した試料は、免疫プロット技術を使用して定量化され得る中間反応をもたらす。

## 【0050】

本発明の一実施形態によると、(無傷)フィブリノゲンを検出する方法は、可溶化工程及び免疫プロット工程を含む。

10

## 【0051】

可溶化工程は、試料を可溶化しながら、トロンビン活性を阻害することを伴う。

## 【0052】

免疫プロット工程は、膜上への試料の移動又は適用；任意のSDS-PAGE；遮断工程；膜上で固定化されたフィブリノゲンをモノクローナル一次抗体と反応させる工程；未反応一次抗体を除去するための洗浄工程；モノクローナル抗体をマーカを有する二次抗体と反応させる工程；未反応二次抗体を除去するための洗浄工程；及びマーカの量を定量化することによって、無傷フィブリノゲンの量を検出する工程を伴う。

## 【0053】

凍結乾燥されたフィブリノゲン及びトロンビンを含有する止血パッド

20

本発明の実験的試験で利用した、吸収性スカフォールド上に凍結乾燥されたトロンビン及びフィブリノゲンを含有する止血パッドは、本明細書でフィブリノゲン含有パッドと称される。フィブリノゲン含有パッドは、Vicryl(登録商標)(ポリグリラクチン910)及びORC(酸化再生セルローズ)の層を含む、複合材料構造体からなる。Vicryl(登録商標)層は、乾燥した未反応状態でのヒトフィブリノゲン及びトロンビン粉末でコーティングされる。製品が出血部位上に塗布されるとき、タンパク質は水和され、それは、フィブリノゲンのフィブリンへの変換及びフィブリン凝塊の形成をもたらす。組織表面上のフィブリン形成は、止血及び組織への接着を促進する。組織への塗布前に、タンパク質が未反応状態のままであることが重要である。製造又は保管中の水への曝露によるフィブリノゲンのフィブリンへの早期変換(製品の使用前の活性化)は、性能及び安定性に悪影響を及ぼす可能性がある。

30

## 【0054】

「Reinforced absorbable multilayered fabric for use in medical devices」と題するShettyらの米国特許第7,666,803号は、あらゆる目的のために参照によってその全体が本明細書に組み込まれ、酸化ポリサッカライドを含む、第1の吸収性不織布及び第2の吸収性織布又は編布を含む、多層布地を教示する。

## 【0055】

「Method for making an absorbable hemostat」と題するGormanらの公開された米国特許出願第2006/0088589 A1号は、あらゆる目的のために参照によってその全体が本明細書に組み込まれ、創傷包帯を作製する方法を開示し、前述の方法が、それらが可溶性ではない全フッ素置換炭化水素キャリア流体中でトロンビン及び/又はフィブリノゲン粉末を懸濁する工程と、得られた懸濁液を第1の吸収性不織布に適用する工程とを含むことを特徴とする。

40

## 【0056】

「REINFORCED ABSORBABLE MULTILAYERED HEMOSTATIC WOUND DRESSING」と題するGormanらによる公開された米国特許出願第2009/0246238 A1号は、あらゆる目的のために参照によってその全体が本明細書に組み込まれ、第1の吸収性不織布、1つ以上の第2の吸収性織布又は編布、トロンビン及び/又はフィブリノゲンを有する多層創傷包帯を作製するため

50

の方法を教示し、(a) 1センチメートルあたり約3.9~11.8クリンプ(1インチあたり約10~30クリンプ)の範囲内で、吸収性ポリマー繊維又は糸を縮れさせる工程と、(b)縮れた繊維又は糸を約0.25~6.4cm(約0.1~2.5インチ)の繊維の長さに切断する工程と、(c)約15~24の室温で、湿度を約20~60%に制御しながら、繊維をけば立てて第1の吸収性不織布を形成する工程と、(d)第1の吸収性不織布を第2の吸収性織布又は編布に取り付ける工程と、(e)トロンピン及び/又はフィブリノゲンを第1の吸収性不織布に適用する工程とを含む。

【0057】

上記の参考文献に記載される通りに作製されるフィブリノゲン含有パッドを、本発明の実施において実行される実験で利用した。フィブリノゲン含有パッドの多層マトリックス成分は、ポリグラクチン910(PG910)不織繊維の層に取り付けられる、編まれたORC支持層からなる。製造プロセス中、PG910繊維は、パッドにけば立てられ、ORC支持層にニードルパンチされ、多層マトリックスを生成する。

10

【0058】

フィブリノゲン含有パッドの生物学的成分は、好ましくは、ヒトフィブリノゲン及びヒトトロンピンの凍結乾燥された形態である。それらは、生物活性成分、フィブリノゲン及びトロンピン、並びに他の賦形剤をそれぞれ含有する。フィブリノゲン含有パッドに適用されるヒトフィブリノゲン及びヒトトロンピンの組成物は、2~20mg/cm<sup>2</sup>のフィブリノゲン及び1~150IU/cm<sup>2</sup>のトロンピンである。

【0059】

乾燥フィブリノゲン及びトロンピンの混合物中のフィブリノゲンのフィブリンへの変換の程度を測定することに加えて、本方法は、フィブリノゲン及びトロンピンを含有する液体製剤中のフィブリノゲンのフィブリンへの変換の程度を測定するために使用され得る。かかる製剤の例としては、出血を制御するために、出血部位に同時に、しかし別々に塗布されるフィブリノゲン及びトロンピンの濃縮溶液からなる、市販のフィブリン封止剤がある。2つのタンパク質溶液が十分に混合されているとき、フィブリノゲンはフィブリンに急速に変換される。フィブリン形成の速度及び程度の測定は、フィブリン形成の速さ及び得られるフィブリン凝塊の不溶性により困難である。液体の混合の程度を評価するために様々なアプローチが使用され得るが、これらのアプローチは、フィブリノゲンのフィブリンへの変換を生化学的に評価しない。本明細書に記載される免疫ブロット技術を使用して、フィブリン封止剤混合物中に存在するフィブリノゲン及びフィブリンの相対量が決定され得る。

20

30

【0060】

EVICE L(登録商標)フィブリン封止剤(Human)(Johnson & Johnson Wound Management, Somerville, NJから入手可能)は、BAC2(55~85mg/mLのフィブリノゲン)及びトロンピン(800~1200IU/mLのヒトトロンピン)を含有するキットとして供給される。BAC2は、主としてヒトフィブリノゲンの濃縮物からなるpH 6.7~7.2の滅菌溶液である。BAC2溶液の組成は、以下の通りである:ヒトフィブリノゲンの濃縮物(55~85mg/mL)、塩酸アルギニン、グリシン、塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム、塩化カルシウム、及び注射用蒸留水。トロンピンは、精製ヒトトロンピンを含有する滅菌溶液(pH 6.8~7.2)である。トロンピン溶液の組成は、以下の通りである:ヒトトロンピン(800~1200IU/mL);塩化カルシウム、ヒトアルブミン、マンニトール、酢酸ナトリウム、及び注射用蒸留水。

40

【0061】

本発明の方法は、2つのタンパク質が合わさったときにフィブリノゲンとフィブリンとを区別するために、又は混合物中のフィブリノゲン及びフィブリンの相対量を測定するために、他の診断及び臨床に応用され得る。要約すれば、本方法は、フィブリノゲンのフィブリンへの変換を評価することが可能であり、かつフィブリノゲン/フィブリン及びトロンピンの任意の混合物に適用できる。

50

## 【0062】

## 可溶化工程

本発明の一実施形態では、乾燥及び/又は液体製剤中にトロンビン及びフィブリノゲン/フィブリンを含有する試料が、可溶化される。

## 【0063】

本発明の可溶化試薬は、高温(95 )と組み合わせて、高濃度の洗剤及び還元剤(4%のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)及び500mMのジチオスレイトール(DTT))、直接トロンビン阻害剤(例えば、200mg/mLのPefabloc(登録商標)SC)を含む。結果として、トロンビンは不活性化され、フィブリン生成を触媒することができない。したがって、トロンビン及びフィブリノゲンは、任意の相互作用なしで、同一溶液中に可溶化形態で存在することができる。

10

## 【0064】

いったん可溶化されると、タンパク質は、電気泳動及び免疫ブロット技術によって評価される。

## 【0065】

## 免疫ブロット工程

フィブリノゲンのフィブリンへの変換の程度を評価するために、様々な試料をSDS-PAGE、続いて、ウエスタンブロット分析又はドットブロット分析に任意に供した。フィブリノゲンのフィブリノペプチドAに特異的なモノクローナル抗体[クローン1F7]を検出のために使用した。

20

## 【0066】

## フィブリノペプチドAに対するモノクローナル抗体[クローン1F7]

本発明の一実施形態によると、本発明のアッセイは、無傷(未反応)フィブリノゲン分子上に存在するフィブリノペプチドA(FpA)に対するモノクローナル抗体[クローン1F7]を利用する。

## 【0067】

Abcam Inc. (Cambridge, MA)からモノクローナル抗体を得て、電気泳動及びELISAによって特性化した。

## 【0068】

本発明の一実施形態によると、FpAの存在は、無傷フィブリノゲンを検出するための指標として使用される。完全にフィブリンに変換されたフィブリノゲンは、FpAが存在しないため、この抗体によって検出されない。

30

## 【0069】

固定化されたフィブリノゲン及びフィブリンの混合物を含有する試料中で、抗体は、固定化された無傷フィブリノゲンのみに結合する。

## 【0070】

## 本発明のアッセイに使用される被験物質

以下の説明は、本発明のアッセイの動作を説明する実験例で利用した、被験物質又は試料の組成及び調製を詳述する。具体的な被験物質又は試料が、以下の表1及び2に列挙される。

40

## 【0071】

フィブリノゲンのフィブリンへの変換の程度を評価するために、ウエスタンブロット及び直接ドットブロット検出技術によって、無傷フィブリノゲンからフィブリンに及ぶタンパク質を含有する様々な試料(反応生成物)、並びに対照試料を試験した。フィブリノゲンのフィブリノペプチドAに特異的なモノクローナル抗体[クローン1F7]を検出のために使用した。

## 【0072】

被験物質を調製するために使用された出発物質は、市販の精製フィブリノゲン、市販のフィブリン封止剤からの高濃度トロンビン及びフィブリノゲン成分を含み、また上記のように、Ethicon, Inc.によって製造されるフィブリノゲン含有パッドも含ま

50

。

## 【0073】

未反応試料は、精製フィブリノゲン、フィブリン封止剤のフィブリノゲン成分、及び乾燥フィブリノゲン含有パッドから抽出した生物学的粉末を含んだ。完全に反応した試料は、凝固した液体フィブリン封止剤、及び凝塊形成のために完全に水和したフィブリノゲン含有パッドから抽出された粉末を含んだ。部分的に反応した試料は、限られた体積の水性培地に曝露されたフィブリノゲン含有パッドから抽出された粉末を含んだ。

## 【0074】

トロンピンを含有しない全ての試料を、95 で、還元剤として0.1MのTris-HCl、20mg/mLのSDS緩衝液、及び7.7mg/mLのDTTの最終濃度を含有する水溶液（可溶化緩衝液）中に溶解し、約10mg/mLのフィブリノゲン濃度を得た。

10

## 【0075】

トロンピンを含有する全ての試料を、Fluka, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から市販されている、ここでトロンピン阻害剤として使用される、2mg/mLの最終濃度のPefabloc（登録商標）SC（4-（2-アミノエチル）ベンゼンスルホニルフルオリド塩酸塩）も含有した、上記の可溶化緩衝液中に溶解し、試料調製中の任意のトロンピン活性を最小限に抑えた。

## 【0076】

試料を以下の通り調製した：各試料に対して、可溶化緩衝液を調製し、95 に加熱した。次いで、可溶化緩衝液を、乾燥タンパク質又はタンパク質溶液を含有するバイアルに添加し、約10mg/mLのフィブリノゲン/フィブリン濃度を得た。得られた混合物を手動で攪拌し、タンパク質の完全な還元及び可溶化が得られるまで95 で保持した（最大で3時間）。

20

## 【0077】

Enzyme Research Laboratories (South Bend, IN) から精製フィブリノゲン試料（95%の凝固可能フィブリノゲン）を得て、可溶化緩衝液（上記のような）中に溶解し、約10mg/mLのフィブリノゲン濃度を得た。

。

## 【0078】

EVICE L（登録商標）（BAC2）フィブリン封止剤のフィブリノゲン成分をいくつかの試験に利用した。フィブリノゲンの濃度は、55~85mg/mLであり、他のタンパク質及び賦形剤もまた形成物中に含まれ、フィブロネクチン、アルブミン、塩酸アルギニン、グリシン、塩化ナトリウム、及びクエン酸ナトリウムを含む。

30

## 【0079】

加えて、EVICE L（登録商標）フィブリン封止剤のトロンピン成分をいくつかの試験に利用した。トロンピンの活性は、800~1200IU/mLであり、製剤はまた、塩化カルシウム、ヒトアルブミン、マンニトール、及び酢酸ナトリウムを含有した。

## 【0080】

試料調製のために、フィブリン封止剤のフィブリノゲン成分を、95 で、0.1MのTris-HCl、20mg/mLのSDS緩衝液、及び7.7mg/mLのDTTの最終濃度の可溶化緩衝液中に溶解し、約10mg/mLのフィブリノゲン濃度を得た。

40

## 【0081】

等体積のEVICE L（登録商標）フィブリノゲン及びトロンピン成分を試験管で同時に混合し、最大で2時間、試料を生理学的に最適な温度（例えば、37）でインキュベートすることによって、フィブリン封止剤凝塊試料を調製し、完全なフィブリン凝塊形成を確実にした。次いで、上記のように、完全に凝固した混合物を可溶化緩衝液中に溶解し、約10mg/mLのフィブリノゲン/フィブリン濃度を得た。

## 【0082】

溶媒（メチルペルフルオロプロピルエーテル）中で、フィブリノゲン及びトロンピンで

50

コーティングされた布地を攪拌することによって、続いて、溶媒の蒸発によって、凍結乾燥されたタンパク質粉末を乾燥フィブリノゲン含有パッド試料から抽出した。この粉末の一部を水性培地（200 mMのtris-HCl、150 mMのNaCl、pH 7.4）中で水和し、最大で2時間、生理学的に最適な温度（例えば、37）でインキュベートし、完全なフィブリン凝塊形成を確実にした。次いで、上記のように、得られた凝塊を可溶化緩衝液中に溶解し、約10 mg/mLのフィブリノゲン/フィブリン濃度を得た。

**【0083】**

25 / 60 % RHの指定温度及び湿度条件に曝露されたフィブリノゲン含有パッド試料を以下の通り調製した：フィブリノゲン含有パッド試料を、1時間又は24時間、25 / 60 % RHの条件に設定された環境試験室に配置した。次いで、上記のように、フィブリノゲン含有パッド試料を任意に真空乾燥させ、それらの粉末を抽出した。次いで、上記のように、粉末抽出物を可溶化緩衝液中に溶解し、約10 mg/mLのフィブリノゲンの濃度を得た。

10

**【0084】**

また、限られた体積の水性培地（200 mMのtris-HCl、150 mMのNaCl、pH 7.4）中の水和によって、フィブリノゲン含有パッド試料を部分的に凝固し、フィブリン凝塊形成を可能にし、次いで、任意に真空乾燥させた。次いで、粉末を抽出し、次いで、上記のように、可溶化緩衝液中に溶解し、約10 mg/mLのフィブリノゲン/フィブリン濃度を得た。

20

**【0085】**

被験物質「試料処理緩衝液」は、上記のように、可溶化緩衝液のみを含有した。

**【実施例】****【0086】****実施例1．ウエスタンブロット免疫測定法**

試験した試料が、表1に列挙される。約10 mg/mLのフィブリノゲン/フィブリン濃度への可溶化後、試料を更に可溶化緩衝液中で希釈し、SDS-PAGEのために試料タンパク質濃度を最適化した。次いで、表1に示される最終フィブリノゲン/フィブリン量で、試料を4～12%のSDS-ポリアクリルアミドゲル上に載置した。次いで、標準的な実験技術を使用して、タンパク質をゲル電気泳動に供した。ダイフロンがゲルの底部に到達するまで、125ボルトでSDS-PAGEを実行した。電気泳動後、標準的な実験技術を使用して、タンパク質をタンパク質結合膜（例えば、ニトロセルロース）上に移した。

30

**【0087】**

移動後、非特異的結合を阻止するために、膜をブロッキング溶液（例えば、当該技術分野において既知のような、溶液を含有するカゼイン及び/又は洗剤）中でインキュベートした。次いで、ニトロセルロース膜をすすぎ、周囲温度で、ヒトフィブリノゲンのフィブリノペプチドA部分に特異親和性を有するモノクローナル抗体（一次抗体、[クローン1F7]）溶液中でインキュベートした。

**【0088】**

膜を、抗体洗浄緩衝液（例えば、当該技術分野において既知のような、洗剤を含有する食塩水溶液）で洗浄し、任意の非結合抗体を除去し、次いで、二次抗体溶液（アルカリホスファターゼに共役した、市販のヤギ抗マウスIgG）中でインキュベートし、抗体洗浄緩衝液で再度洗浄し、任意の非結合抗体を除去した。

40

**【0089】**

アルカリホスファターゼに対する市販の基質中でのニトロセルロース膜のインキュベーションにより、縞模様が視覚化された。

**【0090】**

ここで図3を参照すると、ウエスタンブロット手順を実施した後のニトロセルロース膜の画像が示される。表1は、試験した試料に対するウエスタンブロットの列割り当て、及

50

び縞模様の解釈を伴う試験結果を示す。

【 0 0 9 1 】

【 表 1 】

表 1. ウエスタンブロット試験試料の載置情報及び結果

列	試料説明	載置された フィブリノゲン/ フィブリンの量 (μg)	結果の解釈
1	分子量マーカー	該当なし	該当なし
2	精製フィブリノゲン	1. 25	フィブリノゲンは、精製フィブリノゲン試料中で検出された
3	フィブリン封止剤の フィブリノゲン含有成分	1. 25	フィブリノゲンは、フィブリン封止剤試料の フィブリノゲン含有成分中で検出された
4	フィブリン封止剤の フィブリノゲン含有成分	0. 63	フィブリノゲンは、フィブリン封止剤試料の フィブリノゲン含有成分中で検出された
5	凝固したフィブリン封止剤	0. 50	フィブリノゲンは、凝固したフィブリン封止剤 試料中で検出されなかった
6	乾燥フィブリノゲン含有 パッドから抽出された粉末	2. 13	フィブリノゲンは、乾燥フィブリノゲン 含有パッド試料から抽出された粉末中で 検出された
7	フィブリノゲン含有 パッドから抽出された 水和粉末	2. 13	フィブリノゲンは、フィブリノゲン含有パッド 試料から抽出された水和粉末中で 検出されなかった
8	1時間の加湿後の フィブリノゲン含有パッドから 抽出された粉末	2. 13	フィブリノゲンは、1時間の加湿後の フィブリノゲン含有パッド試料から抽出された 粉末中で検出された。
9	24時間の加湿後の フィブリノゲン含有パッドから 抽出された粉末	2. 13	フィブリノゲンは、24時間の加湿後の フィブリノゲン含有パッド試料から抽出された 粉末中で検出された。
10	部分的に凝固した フィブリノゲン含有パッドから 抽出された粉末	2. 13	中程度のフィブリノゲン(比較的淡い縞模様) が、限られた体積の水性培地に曝露された フィブリノゲン含有パッド試料から抽出された 粉末中で検出された。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 2 】

図 3 及び表 1 は、フィブリノゲンが、非凝固フィブリノゲン試料を含有する試料中でうまく検出されたこと、つまり、フィブリノゲンが、精製フィブリノゲン(列 2)、市販のフィブリン封止剤のフィブリノゲン含有成分(列 3、4)、並びに乾燥及び加湿フィブリノゲン含有パッド粉末抽出物(列 6、8、9)中で検出されたことを示す。フィブリノゲンは、完全に凝固した試料、つまり、凝固したフィブリン封止剤試料(列 5)、及びフィブリノゲン含有パッドから抽出された水和粉末(列 7)中で検出されなかった。中程度のフィブリノゲン(比較的淡い縞模様によって反映される)が、限られた体積の水性培地に曝露されたフィブリノゲン含有パッド試料から抽出された粉末(列 10)中で検出された。乾燥及び加湿(25 / 60% RH、最大で 24 時間)フィブリノゲン含有パッド粉末抽出物の間で、縞模様の認識可能な差が認められず、フィブリノゲン含有パッドが、これらの条件下での任意の相当なフィブリノゲンのフィブリンへの変換を受けなかったことを示す。

【 0 0 9 3 】

タンパク質の、ゲルからニトロセルロース膜への移動後、標準的な実験技術を使用して、ゲルをクマシーブルーで染色し、タンパク質が列の全てにおいて存在したことを確認した。ゲルの画像が図4に示され、タンパク質が全ての列において検出されたことを示す。フィブリノゲンが、ウエスタンブロット上で検出されなかった列において、つまり、凝固したフィブリン封止剤(列5)、及び完全に水和したフィブリノゲン含有パッドから抽出された粉末(列7)において、フィブリノゲンの鎖及び鎖が存在した。フィブリノゲンが、ウエスタンブロット上で検出された列において、つまり、精製フィブリノゲン(列2)、フィブリン封止剤のフィブリノゲン含有成分(列3、4)、及びフィブリノゲン含有パッドから抽出された粉末(列6、8、9)において、フィブリノゲンのA鎖及びB鎖が存在した。

10

**【0094】****実施例2. ドットブロット免疫測定法**

ドットブロット免疫測定手順を利用して、迅速フィブリノゲンアッセイを開発した。上記のウエスタンブロット手順のゲル電気泳動工程は省略され、アプローチは、試料中の多くのタンパク質が膜上に吸着され、一方で、FpA等の小分子が、抗FpA抗体での処理前に洗い流されることに基づく。次いで、同様の免疫ブロット手順を以下に記載される通りに踏んだ。

**【0095】**

試験した試料が、表2に列挙される。1.5cm×1.5cmの正方形の配列をニトロセルロースタンパク質結合膜上に描いた。可溶化後、好適な体積(例えば、2μL)の試料又は対照材料を各正方形の中心に適用した。試料又は対照を膜上で完全に乾燥させた。次いで、ニトロセルロース膜をブロッキング溶液中でインキュベートし、非特定の結合を阻止した。

20

**【0096】**

膜をすすぎ、次いで、周囲温度でヒトフィブリノゲンのフィブリノペプチドA部分に特異親和性を有するモノクローナル抗体(一次抗体、[クローン1F7])溶液中でインキュベートし(上記のウエスタンブロット手順と同じ)、次いで、緩衝液で洗浄し、任意の非結合抗体を除去した。膜を1時間、二次抗体溶液中でインキュベートし(ウエスタンブロット手順と同じ)、次いで、緩衝液で洗浄し、任意の非結合抗体を除去した。視覚化のためにドット強度が好適に増加されるまで(例えば、5~30分)、膜をアルカリホスファターゼに対する市販の基質でインキュベートし(ウエスタンブロット手順と同じ)、次いで、膜をすすぎ、反応を停止した。

30

**【0097】**

次いで、光学濃度測定法によって染色領域のサイズ及び強度を定量化し、フィブリノゲン濃度との関係性を評価した。

**【0098】**

ここで図5を参照すると、ドットブロット手順を実施した後のニトロセルロース膜の画像が示され、番号は、表2に列挙された試料番号に対応する。表2は、試料の説明、載置されたフィブリノゲン/フィブリンタンパク質の量、濃度測定法によって測定された膜上の染色領域の光学密度、及び観察されたパターンを解釈する試験結果を示す。光学密度は、完全な黒色に対応する0(高いフィブリノゲン含量)から白色(フィブリノゲンの非存在)に対応する255に及び、グレースケール上の数によって表現される。

40

**【0099】**

【表 2】

表 2. ドットプロット試験試料の載置情報及び結果

試料/対照	載置された フィブリノゲン/ フィブリンの量(μg)	光学密度	検出結果
1. 試料処理緩衝液	0	223	染色は、試料緩衝液で認められなかった
2. ブランク	該当なし	232	染色は、ブランクで認められなかった
3. フィブリノゲン含有 パッドから抽出された 水和粉末	0.850	238	フィブリノゲンは、完全に湿潤及び 凝固したフィブリノゲン含有パッド粉末 抽出物中で検出されなかった
4. フィブリノゲン含有 パッドから抽出された 水和粉末	0.425	236	フィブリノゲンは、完全に湿潤及び 凝固したフィブリノゲン含有パッドからの 抽出物中で検出されなかった
5. フィブリノゲン含有 パッドから抽出された 水和粉末	0.213	230	フィブリノゲンは、完全に湿潤及び 凝固したフィブリノゲン含有パッドからの 抽出物中で検出されなかった
6. 乾燥フィブリノゲン 含有パッド粉末抽出物	0.850	178	フィブリノゲンは検出された
7. 乾燥フィブリノゲン 含有パッド粉末抽出物	0.425	193	フィブリノゲンは検出された
8. 乾燥フィブリノゲン 含有パッド粉末抽出物	0.213	222	フィブリノゲンは検出された
9. 乾燥フィブリノゲン 含有パッド粉末抽出物	0.106	231	フィブリノゲンは検出された
10. 乾燥フィブリノゲン 含有パッド粉末抽出物	0.053	224	フィブリノゲンは検出された
11. 1時間の加湿後の フィブリノゲン含有パッドから 抽出された粉末	0.425	185	フィブリノゲンは検出された
12. 24時間の加湿後の フィブリノゲン含有パッドから 抽出された粉末	0.425	192	フィブリノゲンは検出された
13. 部分的に凝固した フィブリノゲン含有パッド 試料から抽出された粉末	0.425	217	フィブリノゲンは検出された
14. 完全に凝固した フィブリノゲン含有パッド 試料から抽出された粉末	0.425	233	フィブリノゲン含有パッドが完全に 凝固したとき、フィブリノゲンは 検出されなかった
15. ブランク(空)	該当なし	226	染色は、ブランクで認められなかった

10

20

30

40

## 【0100】

ここで図6を参照すると、フィブリノゲン濃度と染色強度との間の関係を示すグラフが示される。ドットプロット膜上のグレースケール光学密度値を、試料中のタンパク質(フィブリノゲン)の濃度の対数の関数としてプロットした。フィブリノゲン/フィブリン載置が、0.850~0.106 μgに及ぶ、表2に列挙される試料6~9を用いて、分析

50

を実施した。フィブリノゲン染色強度は、試料中に存在するフィブリノゲンの量に比例した ( $r^2 = 0.96$ )。

【0101】

図5～6及び表2に示されるデータの分析は、フィブリノゲン染色強度が、試料中に存在する無傷フィブリノゲンの量に比例したことを示す。認識可能な染色は、試料緩衝液又はブランク(空)(試料1、2、及び15)で認められず、フィブリノゲンは、生物学的粉末を完全に水和することによって調製した、フィブリノゲン含有パッドから抽出された水和粉末中で(試料3～5)、又はフィブリノゲン含有パッド全体が完全に凝固したとき(試料14)、検出されなかった。フィブリノゲンは、乾燥フィブリノゲン含有パッド粉末抽出物中(試料6～10)、及び1時間(試料11)又は24時間(試料12)湿気に曝露されたフィブリノゲン含有パッド試料中、及び部分的に凝固したフィブリノゲン含有パッド試料から抽出された粉末中(試料13)で検出された。

10

【0102】

プロセスのブロック図

ここで図7及び8を参照すると、本発明の方法のブロック図がウエスタンブロット及びドットブロットのそれぞれに対して示される。

【0103】

本発明の一実施形態によると、ウエスタンブロットを使用して無傷フィブリノゲンを検出する方法は、a)試料を可溶化し、トロンピンを阻害する工程と、b)SDS-PAGEを実施する工程と、c)試料をタンパク質結合膜上に移す工程と、d)遮断工程と、e)膜上で固定化されたフィブリノゲンを、モノクローナル一次抗体と反応させる工程と、f)非結合一次抗体を除去するための洗浄工程と、g)モノクローナル抗体を、マーカーを有する二次抗体と反応させる工程と、h)未反応非結合二次抗体を除去するための洗浄工程と、i)マーカーの量を定量化することによって、無傷フィブリノゲンの量を検出する工程とを含む。

20

【0104】

本発明の別の実施形態によると、ドットブロットを使用して無傷フィブリノゲンを検出する方法は、a)試料を可溶化し、トロンピンを阻害する工程と、b)試料をタンパク質結合膜上に付ける工程と、c)遮断工程と、d)膜上で固定化されたフィブリノゲンを、モノクローナル一次抗体と反応させる工程と、e)非結合一次抗体を除去するための洗浄工程と、f)モノクローナル抗体を、マーカーを有する二次抗体と反応させる工程と、g)非結合二次抗体を除去するための洗浄工程と、h)マーカーの量を定量化することによって、無傷フィブリノゲンの量を検出する工程とを含む。

30

【0105】

上記の実施例は本発明の特定の実施形態を示すが、それらは本発明の範囲を限定するものとしてではなく、本発明の十分な説明に寄与するものとして解釈されるものとする。

【0106】

〔実施の態様〕

(1) 無傷フィブリノゲン(intact fibrinogen)を検出するための方法であって、

a)任意に少なくとも部分的にフィブリンに変換された少なくとも一部のフィブリノゲンを含有し、かつ任意にトロンピンを含有する、試料を提供する工程と、

40

b)トロンピン活性を阻害する可溶化溶液中で前記試料を可溶化する工程と、

c)前記試料の一部をゲルに移し、前記一部分を電気泳動に供する工程と、

d)前記ゲルから前記試料の前記一部分の画分をタンパク質結合膜に移し、前記膜上で前記フィブリノゲンを固定化する工程と、

e)前記膜を少なくとも1つの遮断工程に供する工程と、

f)前記膜上で固定化された前記フィブリノゲンを、フィブリノペプチドA部分に結合することが可能な一次モノクローナル抗体と反応させ、フィブリノゲン抗体複合体を形成する工程と、

g)前記膜を少なくとも1つの洗浄工程に供し、任意の非結合一次モノクローナル抗体

50

を除去する工程と、

h) 前記フィブリノゲン抗体複合体を形成した前記モノクローナル抗体を、マーカーを有する二次抗体と反応させる工程と、

i) 前記膜を少なくとも1つの洗浄工程に供し、マーカーを有する任意の非結合二次抗体を除去する工程と、

j) 前記マーカーの量を定量化することによって、前記試料中の無傷フィブリノゲンの量を検出する工程と、を含む、方法。

(2) 前記試料が、未知量の無傷フィブリノゲンを含有する、実施態様1に記載の方法。

(3) 前記試料が、固体、液体、又は半液体である、実施態様1に記載の方法。

(4) 前記試料が、凍結乾燥されたフィブリノゲン及びトロンピンを含有する、実施態様1に記載の方法。

(5) 前記方法が、SDS-PAGE及びウエスタンブロットを利用する、実施態様1に記載の方法。

【0107】

(6) フィブリノペプチドA部分に結合することが可能な前記一次モノクローナル抗体が、クローン1F7である、実施態様1に記載の方法。

(7) 前記一次モノクローナル抗体が、前記フィブリノゲン上でフィブリノペプチドB部分に結合することが可能である、実施態様1に記載の方法。

(8) マーカーを有する前記二次抗体が、アルカリホスファターゼに共役した、ヤギ抗マウスIgGである、実施態様1に記載の方法。

(9) 前記マーカーの量を定量化することによって、前記試料中の無傷フィブリノゲンの量を検出する前記工程が、前記タンパク質結合膜をアルカリホスファターゼの基質でインキュベートすることによって実施される、実施態様1に記載の方法。

(10) 前記マーカーが、電気化学的に検出可能なマーカー、比色分析で検出可能なマーカー、X線で検出可能なマーカー、磁氣的に検出可能なマーカー、又は蛍光マーカーである、実施態様1に記載の方法。

【0108】

(11) フィブリノゲンである少なくとも1つの生物学的成分を含有する止血デバイスの性能又は安定性を評価するための方法であって、無傷フィブリノゲンの閾値レベルに対して、実施態様1に記載の方法に従って得られる試料中の無傷フィブリノゲンの量を比較する工程を含む、方法。

(12) 無傷フィブリノゲンを検出するための方法であって、

a) 任意に少なくとも部分的にフィブリンに変換された少なくとも一部のフィブリノゲンを含有し、かつ任意にトロンピンを含有する、試料を提供する工程と、

b) トロンピン活性を阻害する可溶化溶液中で前記試料を可溶化する工程と、

c) 前記試料の一部をタンパク質結合膜につけて、前記膜上で前記フィブリノゲンを固定化する工程と、

d) 前記膜を少なくとも1つの遮断工程に供し、前記膜から、フィブリノゲンから開裂したフィブリノペプチドAを除去する工程と、

e) 前記膜上で固定化された前記フィブリノゲンを、フィブリノペプチドA部分に結合することが可能な一次モノクローナル抗体と反応させ、フィブリノゲン抗体複合体を形成する工程と、

f) 前記膜を少なくとも1つの洗浄工程に供し、任意の非結合一次モノクローナル抗体を除去する工程と、

g) 前記フィブリノゲン抗体複合体を形成した前記モノクローナル抗体を、マーカーを有する二次抗体と反応させる工程と、

h) 前記膜を少なくとも1つの洗浄工程に供し、マーカーを有する任意の非結合二次抗体を除去する工程と、

i) 前記マーカーの量を定量化することによって、前記試料中の無傷フィブリノゲンの

10

20

30

40

50

量を検出する工程と、を含む、方法。

(13) 前記試料が、未知量の無傷フィブリノゲンを含有する、実施態様12に記載の方法。

(14) 前記試料が、固体、液体、又は半液体である、実施態様12に記載の方法。

(15) 前記試料が、凍結乾燥されたフィブリノゲン及びトロンピンを含有する、実施態様12に記載の方法。

【0109】

(16) フィブリノペプチドA部分に結合することが可能な前記一次モノクローナル抗体が、クローン1F7である、実施態様12に記載の方法。

(17) 前記一次モノクローナル抗体が、前記フィブリノゲン上でフィブリノペプチドB部分に結合することが可能である、実施態様12に記載の方法。

(18) マーカーを有する前記二次抗体が、アルカリホスファターゼに共役した、ヤギ抗マウスIgGである、実施態様12に記載の方法。

(19) 前記試料中の無傷フィブリノゲンの量を検出する前記工程が、前記タンパク質結合膜をアルカリホスファターゼの基質でインキュベートすることによって決定される、実施態様12に記載の方法。

(20) 前記マーカーが、電気化学的に検出可能なマーカー、比色分析で検出可能なマーカー、X線で検出可能なマーカー、磁氣的に検出可能なマーカー、又は蛍光マーカーである、実施態様12に記載の方法。

【0110】

(21) フィブリノゲンである少なくとも1つの生物学的成分を含有する止血デバイスの性能又は安定性を評価するための方法であって、無傷フィブリノゲンの閾値レベルに対して、実施態様12に記載の方法に従って得られる試料中の無傷フィブリノゲンの量を比較する工程を含む、方法。

(22) 無傷フィブリノゲンを検出するための方法であって、

a) 任意に少なくとも部分的にフィブリンに変換された少なくとも一部のフィブリノゲンを含有し、かつ任意にトロンピンを含有する、試料を提供する工程と、

b) トロンピン活性を阻害する可溶化溶液中で前記試料を可溶化する工程と、

c) 前記試料の一部をタンパク質結合膜に移し、前記膜上で前記フィブリノゲンを固定化する工程と、

d) 前記膜を少なくとも1つの洗浄及び1つの遮断工程に供し、前記膜から、フィブリノゲンから開裂したフィブリノペプチドAを除去する工程と、

e) 前記膜上で固定化された前記フィブリノゲンを、フィブリノペプチドA部分に結合することが可能な一次モノクローナル抗体と反応させ、フィブリノゲン抗体複合体を形成する工程と、

f) 結合した前記フィブリノゲン抗体複合体を形成する前記一次モノクローナル抗体の量を定量化することによって、前記試料中の無傷フィブリノゲンの量を検出する工程と、を含む、方法。

(23) 前記試料中の無傷フィブリノゲンの量を検出する前記工程(f)が、

a) 前記膜を少なくとも1つの洗浄工程に供し、任意の非結合一次モノクローナル抗体を除去する工程と、

b) 前記フィブリノゲン抗体複合体を形成した前記モノクローナル抗体を、マーカーを有する二次抗体と反応させる工程と、

c) 前記膜を少なくとも1つの洗浄工程に供し、マーカーを有する任意の非結合二次抗体を除去する工程と、

d) 前記マーカーの量を定量化することによって、前記試料中の無傷フィブリノゲンの量を検出する工程と、によって実施される、実施態様22に記載の方法。

(24) 前記一次モノクローナル抗体が、マーカーに共役しており、前記マーカーが、電気化学的に検出可能なマーカー、比色分析で検出可能なマーカー、X線で検出可能なマーカー、磁氣的に検出可能なマーカー、又は蛍光マーカーであり、前記試料中の無傷フィ

10

20

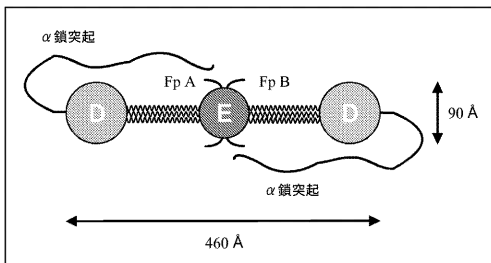
30

40

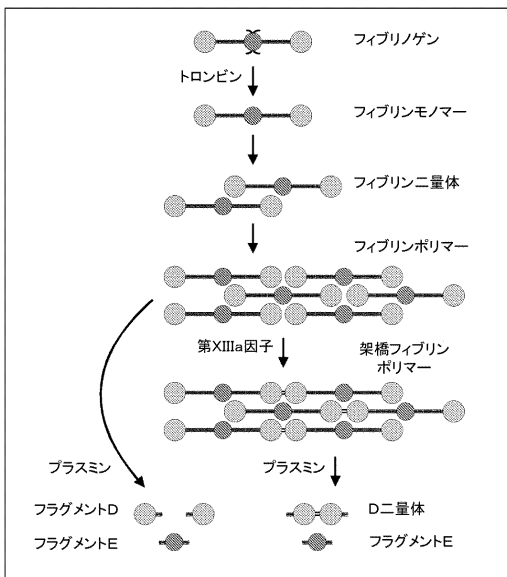
50

ブリノゲンの量を検出する前記工程 ( f ) が、前記マーカの量を定量化することによって実施される、実施態様 2 2 に記載の方法。

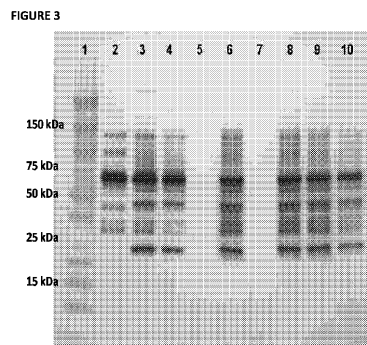
【 図 1 】



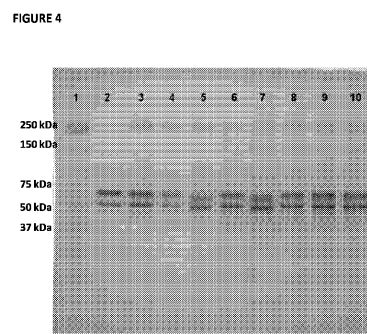
【 図 2 】



【 図 3 】

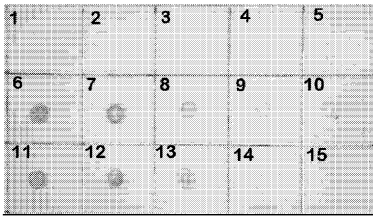


【 図 4 】

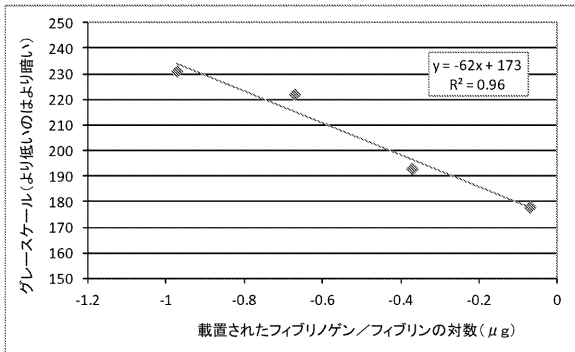


【 図 5 】

FIGURE 5



【 図 6 】



【 図 7 】

ウエスタンブロットを使用して[無傷]フィブリノゲンを検出する方法
試料を可溶化し、トロンピンを阻害する
SDS-PAGE
タンパク質結合膜に移す
遮断工程
膜上で固定化されたフィブリノゲンをモノクローナル一次抗体と反応させる
未反応一次抗体を除去するための洗浄工程
モノクローナル抗体を、マーカ-を有する二次抗体と反応させる
未反応二次抗体を除去するための洗浄工程
マーカ-の量を定量化することによって、無傷フィブリノゲンの量を検出する

【 図 8 】

ドットブロットを使用して[無傷]フィブリノゲンを検出する方法
試料を可溶化し、トロンピンを阻害する
タンパク質結合膜に移す
遮断工程
膜上で固定化されたフィブリノゲンをモノクローナル一次抗体と反応させる
未反応一次抗体を除去するための洗浄工程
モノクローナル抗体を、マーカ-を有する二次抗体と反応させる
未反応二次抗体を除去するための洗浄工程
マーカ-の量を定量化することによって、無傷フィブリノゲンの量を検出する

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 12/65770

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12Q 1/56; G01N 33/53 (2013.01) USPC - 435/13, 436/63, 436/69 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) USPC: 435/13, 436/63, 436/69		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 435/13, 4; 436/63, 69 (keyword limited; terms below)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase; Google; PubMed Search terms: fibrinogen, fibrinopeptide A, thrombin, inhibitor, assay, western, blot, monoclonal, 1F7, goat, anti-mouse, IgG, alkaline phosphatase		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2011/0053193 A1 (DEANGLIS et al.) 3 March 2011 (03.03.2011) para [0002], [0010]-[0011], [0020]-[0021], [0023], [0025]	1-24
Y	US 2002/0132370 A1 (LASSEN et al.) 19 September 2002 (19.09.2002) para [0054]-[0055], [0144], [0148]-[0149], [0159], [0225], [0298]-[0299]	1-24
Y	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY. Fibrinogen alpha Antibody (1F7): sc-51892. (2010). [Retrieved from the internet on 14 January 2012 (14.01.2012) <url: http://www.scbt.com/datasheet-51892-fibrinogen-alpha-1f7-antibody.html>]	6, 16
L	CHEN et al. Quantitative organellar proteomics analysis of rough endoplasmic reticulum from normal and acute pancreatitis rat pancreas. J. Proteome Res. 5 February 2010, Vol. 9, No. 2, pages 885-896; pg 886, para 4 (Cited to support publication date of datasheet for Santa Cruz Biotechnology and to establish availability of the antibody for commercial use.)	6, 16
Y	US 5,821,068 A (SOE et al.) 13 October 1998 (13.10.1998) col 1, ln 29-31	7, 17
Y	US 2005/0202527 A1 (LE BONNIEC et al.) 15 September 2005 (15.09.2005) para [0196]	8, 18
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X"
"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)	"Y"
"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	
Date of the actual completion of the international search 10 January 2013 (10.01.2013)		Date of mailing of the international search report <b>29 JAN 2013</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

---

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72)発明者 バーコルー・エリフ

アメリカ合衆国、08901 ニュージャージー州、ニュー・ブランズウィック、ジョージ・ストリート 1050、アパートメント 7エフ

专利名称(译)	纤维蛋白原测定		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014533835A</a>	公开(公告)日	2014-12-15
申请号	JP2014542542	申请日	2012-11-19
[标]申请(专利权)人(译)	伊西康内外科公司 ETHICON. INC		
申请(专利权)人(译)	爱惜康公司		
[标]发明人	ディーン・グリス・アシュリー バーコルー・エリフ		
发明人	ディーン・グリス・アシュリー バーコルー・エリフ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/86 G01N27/447		
FI分类号	G01N33/53.L G01N33/543.545.S G01N33/543.541.A G01N33/543.541.B G01N33/577.B		
优先权	13/300795 2011-11-21 US		
其他公开文献	JP6181062B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及检测完整纤维蛋白原的方法，其包括以下步骤：a) 提供含有至少一些纤维蛋白原的样品，所述至少一些纤维蛋白原任选地至少部分地转化成纤维蛋白，并任选含有凝血酶；b) 将样品溶解于抑制凝血酶活性的增溶溶液中；c) 在任选的SDS-PAGE转移/将一部分所述样品应用于蛋白质结合膜之后；d) 使纤维蛋白原与能够结合纤维蛋白肽A部分的第一单克隆抗体反应；和e) 通过定量结合的初级单克隆抗体的量来检测样品中完整纤维蛋白原的量。

