(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6181062号
(P6181062)

(45)発行日　平成29年8月16日(2017.8.16)　(24)登録日　平成29年7月28日(2017.7.28)

(51)Int.Cl.		F I		
G01N 33/53	***(2006.01)***	G01N	33/53	L
G01N 33/543	***(2006.01)***	G01N	33/543	５４５Ｓ
G01N 33/577	***(2006.01)***	G01N	33/543	５４１Ａ
		G01N	33/543	５４１Ｂ
		G01N	33/577	B

請求項の数 23　(全 26 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)
(65)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)
(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)
審査請求日　平成27年11月19日 (2015.11.19)
(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)

(73)特許権者　591286579
エシコン・インコーポレイテッド
ＥＴＨＩＣＯＮ，　ＩＮＣＯＲＰＯＲＡＴＥＤ
アメリカ合衆国、ニュージャージイ州、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、フェアービュー・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)【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、かつ任意にトロンビンを含有する、試料を提供する工程と、

ｂ）トロンビ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）前記試料の一部分をゲルに移し、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部分またはフィブリノペプチドＢ部分またはフィブリノペプチドＡ部分とフィブリノペプチドＢ部分の両方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。

【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ビンを含有する、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。

【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１Ｆ７である、請求項１に記載の方法。

【請求項７】

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、請求項１に記載の方法。

【請求項８】

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、請求項１に記載の方法。

【請求項９】

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、磁気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に記載の方法。

【請求項１０】

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１１】

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、かつ任意にトロンビンを含有する、試料を提供する工程と、

ｂ）トロンビ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）前記試料の一部分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、前記膜上で固定化された前記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１２】
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１１に記載の方法。
【請求項１３】
前記試料が、固体、液体、又は半液体である、請求項１１に記載の方法。
【請求項１４】
前記試料が、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、請求項１１に記載の方法。
【請求項１５】
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、請求項１１に記載の方法。
【請求項１６】
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１１に記載の方法。
【請求項１７】
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、請求項１１に記載の方法。
【請求項１８】
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１１に記載の方法。
【請求項１９】
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、磁気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１１に記載の方法。
【請求項２０】
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、請求項１１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２１】
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、かつ任意にトロンビンを含有する、試料を提供する工程と、
ｂ）トロンビ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、
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、前記膜上で固定化された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２２】
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、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
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、磁気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ブリノゲンの量を検出する前記工程（ｆ）が、前記マーカーの量を定量化することによって実施される、請求項２１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、トロンビ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ビン（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（ＴＡＨ）は、外科的用途で広く使用されている。ＴＡＨ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（ＯＲＣ）、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、トロンビン及び／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され得る。
【０００５】
現在市場で入手可能な、又は開発中の多くの止血製剤は、しばしば凍結乾燥されたトロンビンと組み合わせて、凍結乾燥されたフィブリノゲンを利用し、止血製剤は、乾燥粉末、半液体ペースト、液体製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（ｍＡＢ）の開発、並びにフィブリノゲン分解産物に対するｍＡＢに関する。これらの先行技術の参考文献は、トロンビンが試料中に存在せず（又は不活性前駆物質プロトロンビンのみ）、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／又はトロンビン不活性化工程を有さない、アッセイを教示する。
【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ＥＬＩＳＡ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（ＦｐＡ）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ＦｐＡ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 ＸＩＩＩａ－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。

【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ＦｐＡの量を定量化するために、ＨＰＬＣ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 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、「α－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。

【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。

【００１３】

「Ａ ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｂａｓｅｄ ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｖｅ ｅｎｚｙｍｅ ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ ｆｏｒ ｔｈｅ ｄｅｔｅｒｍｉｎａｔｉｏｎ ｏｆ ｐｌａｓｍａ ｆｉｂｒｉｎｏｇｅｎ ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｉｏｎｓ」（Ｈｏｅｇｅｅ－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イムノアッセイを開示し、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。

【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］。

【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ビ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み、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。

【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ビンが阻害量のトロンビ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、トロンビ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ＦｐＡ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ｈＦＰＡペプチド又はその標識フラグメント又はそのＴｙｒ誘導体、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。

【００２０】

米国特許第５，８１７，７６８号は、フィブリノゲンのα_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、＃３－１０と同定されるハイブリドーマ細胞株、＃２９－１と同定されるハイブリドーマ細胞株、及び＃１４８－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。

【００２１】

ＰＣＴ特許公開第２００７／０３０５７１　Ａ２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。

【００２２】

ＰＣＴ特許公開第２００７／０３０５３１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、標的特異的イメージング試薬を請求し、前述の抗体は、Ｇｌｙｐｉｃａｎ－３に特異的に結合し、Ｇｌｙｐｉｃａｎ－３の発現は、肝癌を予測する。

【００２３】

米国特許出願公開第２０１１００５３１９３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。

【００２４】

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ビン及びフィブリノゲンを含有する、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ビ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ビ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、かつ任意にトロンビンを含有する、試料を提供する工程と、可溶化溶液中で試料を可溶化し、トロンビ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。

【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、かつ任意にトロンビンを含有する、試料を提供する工程と、トロンビ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。

【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。

【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ビ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Ａα及びＢβ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、１５３６．６Ｄａ及び１５７０．６Ｄａ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。

【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。

【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、磁気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、かつ任意にトロンビンを含有する、試料を提供する工程と、トロンビ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、ドットブ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。
【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、かつ任意にトロンビンを含有する、試料を提供する工程と、トロンビ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、ドットブ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。
【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】ウエスタンブ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】ドットブ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】ウエスタンブ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】ドットブ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、３４０，０００Ｄａ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つの対の異なるポリペプチド鎖Ａα、Ｂβ、及びγ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αヘリックスによって接続され、ここで、記号ＦｐＡ及びＦｐＢはそれぞれ、フィブリノペプチドＡ及びＢに対応する。
【００３７】
通常の条件下で、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。
【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：ＡＰ ＤｅＡｎｇｌｉｓ ａｎｄ ＧＳ Ｒｅｔｚｉｎｇｅｒ、「Ｆｉｂｒｉｎ（ｏｇｅｎ） ａｎｄ Ｉｎｆｌａｍｍａｔｉｏｎ：Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｕｎｄｅｒｓｔａｎｄｉｎｇ ａｎｄ Ｎｅｗ Ｐｅｒｓｐｅｃｔｉｖｅｓ」、Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｎｅｗｓｌｅｔｔｅｒ（１９９９）１８，１１１～１１８。
【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Ａα及びＢβ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との相互作用は、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。

【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し、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。

【００４１】

目的

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する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）上にブロットされ得る。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。

【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、免疫ブロット技術である。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、免疫ブ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ブロット工程を含む。

【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】

免疫ブロット工程は、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ー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

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）（ポリグラクチン９１０）及びＯＲＣ（酸化再生セルロース）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。

【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２００６／００８８５８９Ａ１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。

【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２００９／０２４６２３８Ａ１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）トロンビン及び／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、バットにけば立てられ、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。

【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ビ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ビン、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ビンの組成物は、２～２０ｍｇ／ｃｍ^{2}のフィブリノゲン及び１～１５０ＩＵ／ｃｍ^{2}のトロンビンである。

【００５９】

乾燥フィブリノゲン及びトロンビ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ビンを含有する液

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ビ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。

【００６０】

ＥＶＩＣＥＬ（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）及びトロンビン（８００～１２００ＩＵ／ｍＬのヒトトロンビン）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。トロンビンは、精製ヒトトロンビンを含有する滅菌溶液（ｐＨ　６．８～７．２）である。トロンビン溶液の組成は、以下の通りである：ヒトトロンビン（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。

【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ビンの任意の混合物に適用できる。

【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。

【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。

【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。

【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。

【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んだ。

【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】

トロンビ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。

【００７５】

トロンビ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、ここでトロンビ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ビ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

手動で撹拌し、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）。

【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】

ＥＶＩＣＥＬ（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。

【００７９】

加えて、ＥＶＩＣＥＬ（登録商標）フィブリン封止剤のトロンビン成分をいくつかの試験に利用した。トロンビンの活性は、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。

【００８１】

等体積のＥＶＩＣＥＬ（登録商標）フィブリノゲン及びトロンビ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ビンでコーティングされた布地を撹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。この粉末の一部分を水性培地（２００ｍＭのｔｒｉｓ－ＨＣｌ、１５０ｍＭ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１０ｍｇ／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１０ｍｇ／ｍＬのフィブリノゲンの濃度を得た。

【００８４】

また、限られた体積の水性培地（２００ｍＭのｔｒｉｓ－ＨＣｌ、１５０ｍＭ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１０ｍｇ／ｍＬのフィブリノゲン／フィブリン濃度を得た。

【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１０ｍｇ／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。ダイフロント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。
【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。
【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、及び縞模様の解釈を伴う試験結果を示す。
【００９１】

【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。

【００９２】

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。

【００９３】

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α鎖及びβ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Ａα鎖及びＢβ鎖が存在した。

【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、非特定的結合を阻止した。

【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。

【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に及ぶ、グレースケール上の数によって表現される。

【００９９】

【表２】

表２．ドットブ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

【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。ドットブ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、０．８５０～０．１０６μｇに及ぶ、表２に列挙される試料６～９を用いて、分析を実施した。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。

【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、トロンビ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。

【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、トロンビンを阻害する工程と、ｂ）試料をタンパク質結合膜上につける工程と、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。

【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、かつ任意にトロンビンを含有する、試料を提供する工程と、

ｂ）トロンビ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）前記試料の一部分をゲルに移し、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、

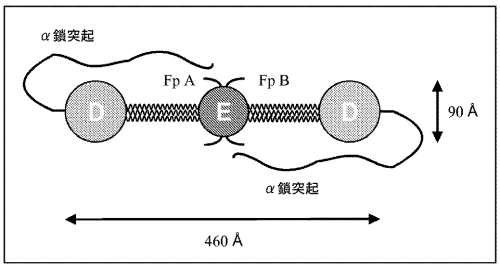
ｇ）前記膜を少なくとも１つの洗浄工程に供し、任意の非結合一次モノクローナル抗体を除去する工程と、

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、

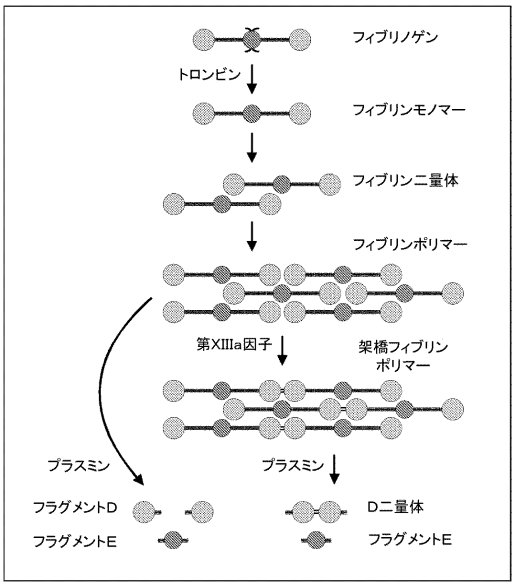
ｉ）前記膜を少なくとも１つの洗浄工程に供し、マーカーを有する任意の非結合二次抗体を除去する工程と、
ｊ）前記マーカーの量を定量化することによって、前記試料中の無傷フィブリノゲンの量を検出する工程と、を含む、方法。
（２）　前記試料が、未知量の無傷フィブリノゲンを含有する、実施態様１に記載の方法。
（３）　前記試料が、固体、液体、又は半液体である、実施態様１に記載の方法。
（４）　前記試料が、凍結乾燥されたフィブリノゲン及びトロンビンを含有する、実施態様１に記載の方法。
（５）　前記方法が、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ及びウエスタンブロットを利用する、実施態様１に記載の方法。
【０１０７】
（６）　フィブリノペプチド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、磁気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、かつ任意にトロンビンを含有する、試料を提供する工程と、
ｂ）トロンビ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）前記試料の一部分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。
（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ビンを含有する、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、磁気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、かつ任意にトロンビンを含有する、試料を提供する工程と、
ｂ）トロンビ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、
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、磁気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ブリノゲンの量を検出する前記工程（ｆ）が、前記マーカーの量を定量化することによって実施される、実施態様２２に記載の方法。

【図１】

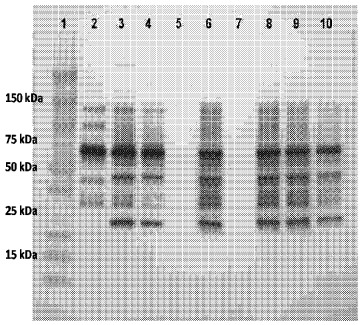


【図２】



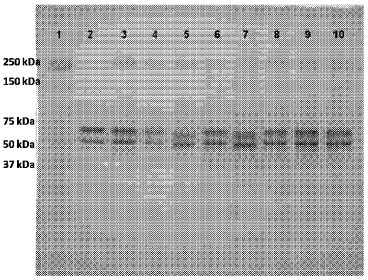
【図３】

FIGURE 3



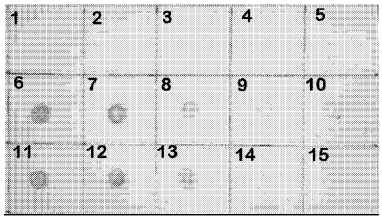
【図４】

FIGURE 4

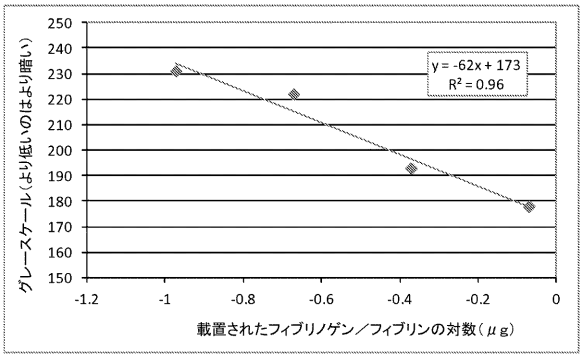


【図５】

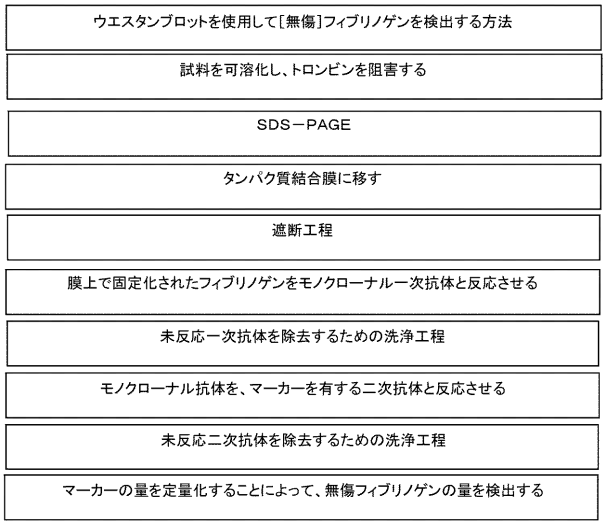
FIGURE 5



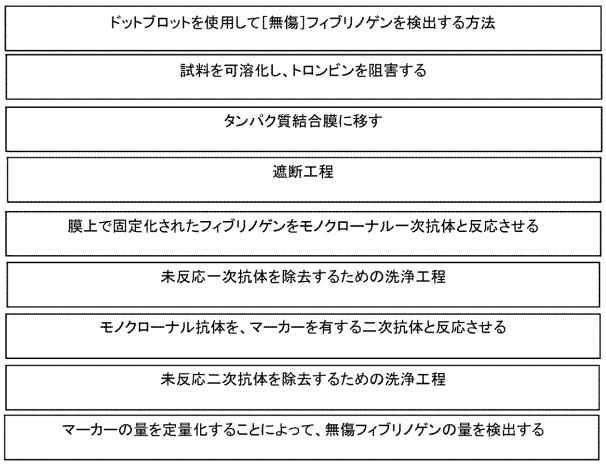
【図６】



【図７】



【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、トロンビンを阻害する
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、マーカー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

フロントページの続き

(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

審査官　海野　佳子

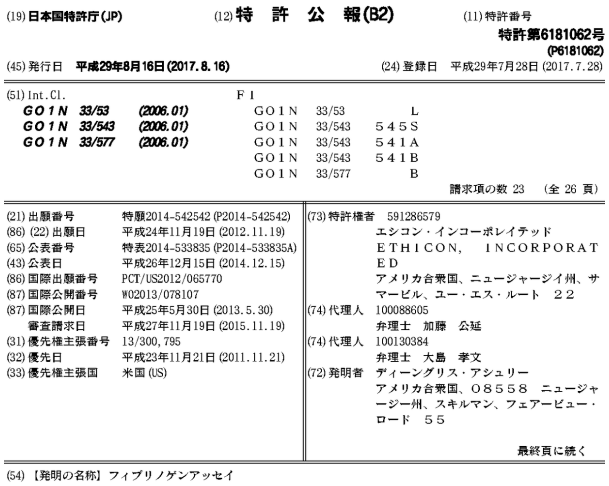
(56)参考文献　特表２００３－５２４１８７（ＪＰ，Ａ）
特表平０５－５０８４７２（ＪＰ，Ａ）
特開昭６１－１７８９２７（ＪＰ，Ａ）
特開２００４－０７５６８２（ＪＰ，Ａ）
特表２０１１－５２３４６１（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｇ０１Ｎ　３３／４８－３３／９８
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）

专利名称(译)	纤维蛋白原测定		
公开(公告)号	JP6181062B2	公开(公告)日	2017-08-16
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		
当前申请(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	JP2014533835A		
外部链接	Espacenet		

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。



(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6181062号
(P6181062)

(45)発行日　平成29年8月16日(2017.8.16)　(24)登録日　平成29年7月28日(2017.7.28)

(51)Int.Cl.　F I
G01N 33/53 (2006.01)　G01N 33/53 L
G01N 33/543 (2006.01)　G01N 33/543 545S
G01N 33/577 (2006.01)　G01N 33/543 541A
G01N 33/543 541B
G01N 33/577 B

請求項の数 23　(全 26 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)
(65)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)
(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)
審査請求日　平成27年11月19日(2015.11.19)
(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)

(73)特許権者　591286579
エシコン・インコーポレイテッド
ＥＴＨＩＣＯＮ，　ＩＮＣＯＲＰＯＲＡＴＥＤ
アメリカ合衆国、ニュージャージイ州、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、フェアービュー・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