

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5498110号
(P5498110)

(45) 発行日 平成26年5月21日(2014.5.21)

(24) 登録日 平成26年3月14日(2014.3.14)

(51) Int.Cl.		F I		
GO 1 N 33/531	(2006.01)	GO 1 N 33/531		A
GO 1 N 33/577	(2006.01)	GO 1 N 33/577		B
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53		L

請求項の数 16 外国語出願 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2009-223732 (P2009-223732)	(73) 特許権者	398032751
(22) 出願日	平成21年9月29日 (2009.9.29)		シーメンス・ヘルスケア・ダイアグノステ
(65) 公開番号	特開2010-85407 (P2010-85407A)		ィックス・プロダクツ・ゲーエムベーハー
(43) 公開日	平成22年4月15日 (2010.4.15)		ドイツ連邦共和国 マルブルク/ラーン (
審査請求日	平成24年9月10日 (2012.9.10)		番地なし)
(31) 優先権主張番号	10 2008 049 601.4	(74) 代理人	100127926
(32) 優先日	平成20年9月30日 (2008.9.30)		弁理士 結田 純次
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)	(74) 代理人	100105290
			弁理士 三輪 昭次
微生物の受託番号	DSMZ DSM ACC2911	(74) 代理人	100140132
微生物の受託番号	DSMZ DSM ACC2912		弁理士 竹林 則幸
微生物の受託番号	DSMZ DSM ACC2913	(72) 発明者	ハーラルト・アルトハオス
微生物の受託番号	DSMZ DSM ACC2914		ドイツ連邦共和国 35083ヴェター. シ
			ュールシュトラッセ20A

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 均質系免疫測定法においてプロトンピンフラグメント F2/F1+2 を測定するための抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも完全プロトンピンフラグメント F2 を含むペプチドを有する単離された免疫複合体であって、その C 末端に該プロトンピンフラグメント F2 の C 末端ネオエピトープに対して特異性を有する抗体フラグメントが結合されており、かつ、免疫刺激キャリアタンパク質に結合されている、免疫複合体。

【請求項 2】

結合された抗体フラグメントが、Fab、Fab'、F(ab')₂ または Fv フラグメントである、請求項 1 に記載の免疫複合体。

【請求項 3】

結合された抗体フラグメントが、ハイブリドーマ細胞株 DSM ACC 2911 によって形成されたモノクローナル抗体のフラグメントである、請求項 1 または 2 に記載の免疫複合体。

【請求項 4】

キーホールリンペットヘモシアニンに結合されている、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体。

【請求項 5】

アルデヒドによって架橋されている、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体。

【請求項 6】

モノクローナル抗体を作製する方法であって、

少なくとも完全プロトロンビンフラグメントF2を含むペプチドを有する単離された免疫複合体であって、そのC末端に該プロトロンビンフラグメントF2のC末端ネオエピトープに対して特異性を有する抗体フラグメントが結合されており、かつ免疫刺激キャリアタンパク質に結合されている、免疫複合体、を抗原として用いる工程、を包含する、方法。

【請求項7】

請求項1～5のいずれか1項に記載の免疫複合体に結合するモノクローナル抗体であるが、プロトロンビンフラグメントF2単独に結合するのでも、および該プロトロンビンフラグメントF2のC末端ネオエピトープに対して特異性を有する抗体フラグメント単独に結合するのでもない、モノクローナル抗体。

10

【請求項8】

ハイブリドーマ細胞株DSM ACC2912、DSM ACC2913またはDSM ACC2914のひとつによって産生される、請求項7に記載のモノクローナル抗体。

【請求項9】

シグナル生成系の構成要素に結合する、請求項7または8に記載のモノクローナル抗体。

【請求項10】

固相に結合する、請求項7～9のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体。

【請求項11】

請求項7～10のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体またはそのフラグメントを使用する工程を包含する、F2またはF1+2の定量的または定性的な検出方法。

20

【請求項12】

請求項7に記載のモノクローナル抗体を産生する、ハイブリドーマ細胞株。

【請求項13】

受託番号DSM ACC2912、DSM ACC2913またはDSM ACC2914でDSMZに寄託される、請求項12に記載のハイブリドーマ細胞株。

【請求項14】

請求項7～10のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体またはそのフラグメントを含む試薬。

30

【請求項15】

請求項14に記載の試薬を含む試験キット。

【請求項16】

サンプル中のプロトロンビンフラグメントF2またはF1+2を検出する方法であって、該サンプルを前記プロトロンビンフラグメントF2のC末端ネオエピトープに特異性を有する抗体または抗体フラグメントに接触させ、サンプル中に存在するプロトロンビンフラグメントF2またはF1+2と免疫複合体を形成し、さらに該サンプルを請求項7に記載の抗体と接触させる、検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明は、凝固分析の分野であり、F2/F1+2の複合体およびF2/F1+2特異的結合パートナーに特異的に結合する抗体ならびにそれらの作製、ならびにF2/F1+2を測定する方法におけるそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

多くの診断上適切なパラメーターが患者の凝固系の状態の臨床的判断のために利用可能である。特に、いわゆる凝固の活性化マーカーの定量的な検出は、凝固または繊維素溶解プロセスの診断を可能にする。患者のサンプル中のプロトロンビンフラグメントF2/F1+2の検出は、生体内でのトロンビン形成の増加を検出または防止することを可能にし

50

、例えば、消費性凝固障害、急性静脈血栓塞栓症もしくは動脈性血管閉塞（心筋梗塞、脳梗塞）における腸管内のトロンビン形成を明らかにするため、または抗凝固療法のモニタリングのために使用される。

【0003】

プロトロンビンは、トロンビンの前酵素であり、凝固カスケードの中心酵素である。このプロトロンビタンパク質は分子構造を有しており、N末端のF1+2部分およびC末端のトロンビン部分から構成されている。プロトロンビンはタンパク分解活性のXa因子によって切断され、各プロトロンビン分子（70kD）からトロンビン分子（30kD）が作製され、それと共にプロトロンビンフラグメントF1+2（35-37kD）が遊離する。このフラグメントF1（23kD）およびF2（14kDa）の切断は、トロンビンによるプロトロンビンの自触反応による切断を介してさらに可能である。トロンビンは血液中では遊離形態で存在しないが、その形成後、阻害因子およびフィブリンに即座に結合するので、トロンビン形成の程度は（例えば、活性化マーカーF1+2および/またはF2を測定することによって）間接的に確認されなければならない。従って、生体内のトロンビン形成の増加を検出または防止するひとつの可能性は、血漿中のF2/F1+2濃度を測定することである。

10

【0004】

F2/F1+2アッセイに伴う一般的な難点は、プロトロンビンが、F2/F1+2と比較して1000~10000倍モルも過剰にサンプル中に存在することである。プロトロンビン存在下でのF2/F1+2の免疫学的検出は、無傷の切断されていないプロトロンビンと比べると、遊離したプロトロンビンフラグメントF2/F1+2は、単一のF2/F1+2特異的抗原性エピトープのみ、特にトロンビン切断によって作製されたF2/F1+2ペプチド（ネオエピトープ）のC末端を有するという事実によって妨害される。F2/F1+2ペプチドのC末端領域に対する抗体のみが、無傷のプロトロンビンに対する特異性を同時に示すことなくプロトロンビンフラグメントF2/F1+2に特異的に結合することができる。F2/F1+2フラグメントの他の抗原決定基は全て同様に無傷のプロトロンビンに対して特異的である。

20

【0005】

プロトロンビンに結合しない特異的なF2/F1+2抗体の作製は、例えば、特許文献1、特許文献2または特許文献3に記載されている。抗F2/F1+2抗体の特異性については、それらがF2/F1+2フラグメントの少なくとも4つのC末端アミノ酸（Ile-Glu-Gly-Arg-OH）を含むエピトープに結合することが重要である。F2/F1+2の濃度を測定するためにはサンドイッチ免疫測定法が通常使用されるので、2つの抗F2/F1+2抗体が必要である。特許文献4は、F2フラグメントのN末端側半分の1つのエピトープに結合し、かつ従って無傷のプロトロンビンにも結合する抗体を記載するが、サンドイッチ免疫測定法において、F2/F1+2ネオエピトープ特異的二次抗体と組み合わせて、二次抗体として使用するのが特に適切である。

30

【0006】

公知の抗体は、不均質系免疫測定法、好ましくはサンドイッチELISA法の形態において血漿サンプル中のF2/F1+2濃度を測定するのに適切である。この目的のためにF2/F1+2ネオエピトープ特異的抗体（「一次抗体」）は固相に結合され、そのサンプルと共にインキュベートされることでF2/F1+2ペプチドが固定化された抗体に結合することが可能となる。結合されていないタンパク質、特にプロトロンビンは、抗体溶液を加えることによって第2のF2/F1+2結合抗体およびプロトロンビン結合抗体（「二次抗体」）がアプライされる前に、洗浄工程によって除去される。この二次抗体は、通常F2/F1+2濃度の定量化を可能にするシグナル生成要素と結合する。

40

【0007】

しかしながら、先行技術で公知のモノクローナル抗体で洗浄または分離する工程のない直接的な不均質系サンドイッチ免疫測定法を設計する可能性はごく限られている。なぜなら、不均質系免疫測定法の設計においては、F2/F1+2-およびプロトロンビン-結合二

50

次抗体は、サンプル中に存在するプロトロンビンに大部分が結合され、それによってシグナル生成に不可欠な分析物 F 2 / F 1 + 2 によるサンドイッチ形成がもはや可能でなくなるからである。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】欧州特許第0303983号(A2)(Pelzer等)

【特許文献2】米国特許第5,830,681号(Hursting等)

【特許文献3】米国出願第2003/0219845号(A1)(Ruiz等)

【特許文献4】欧州特許第1541676号(A1)(Teigelkamp等)

10

【特許文献5】欧州特許第0264219号(A2)

【特許文献6】欧州特許第0475784号(A1)

【特許文献7】WO 85/04422(A1)

【特許文献8】WO 87/07147

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Walz, D. A. (1977) Amino acid sequence of human prothrombin fragments 1 and 2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 74, No. 5, 1969 - 1972

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

従って、本発明は、均質系結合アッセイにおいてプロトロンビンを特に過剰に含有するサンプル中の F 2 / F 1 + 2 を検出することを可能にする手段を提供する目的を基本とした。

【0011】

この目的は、特許請求の範囲に記載される本発明の手段および方法を提供することにより達成される。

【0012】

30

この目的は、プロトロンビンフラグメント F 2 / F 1 + 2 の C 末端ネオエピトープに特異性を有する抗体または抗体フラグメントが結合する、プロトロンビンフラグメント F 2 / F 1 + 2 を含む免疫複合体に特異的に結合するモノクローナル抗体を提供することによって特に達成されるが、ここでこの抗体は、プロトロンビンフラグメント F 1 + 2 または F 2 単独、およびプロトロンビンフラグメント F 2 / F 1 + 2 の C 末端ネオエピトープに特異性を有する抗体または抗体フラグメント単独には結合しない。

【0013】

分析対象物からなる免疫複合体に特異性を有する抗体には、原則的に分析対象物特異的結合パートナー(例えば、一次抗体または一次抗体フラグメント)が結合することが知られている(例えば、特許文献5、特許文献6、特許文献7または特許文献8)。しかしながら、本発明に関しては、驚くことにプロトロンビンフラグメント F 2 / F 1 + 2 結合パートナー免疫複合体に対して特異性を有する本発明の抗体を得るために、抗原を免疫すると同様にプロトロンビンフラグメント F 2 / F 1 + 2 の C 末端ネオエピトープに特異性を有する抗体フラグメントが結合する、完全プロトロンビンフラグメント F 2 を少なくとも含むペプチドを含む免疫複合体を使用することが必要であることが明らかとなった。F 2 プロトロンビンフラグメントのフラグメントのみを含む免疫複合体を使用し、かつプロトロンビンフラグメント F 2 / F 1 + 2 の C 末端ネオエピトープに対して特異性を有する完全抗体を含む免疫複合体と共に免疫複合体に対して特異性を有する抗体を作製することは不可能であった。

40

【0014】

50

本発明は、少なくともそのC末端にプロトロンビンフラグメントF2 / F1 + 2のC末端ネオエピトープに対して特異性を有するC末端抗体フラグメントが結合する、完全プロトロンビンフラグメントF2を含むペプチドを含む単離され精製された免疫複合体に関する。

【0015】

少なくとも完全プロトロンビンフラグメントF2（すなわちヒトプロトロンビンのアミノ酸残基156 - 273（例えば、非特許文献1の図1を参照））を含むペプチドおよびプロトロンビンフラグメントF2 / F1 + 2のC末端ネオエピトープを有するペプチドは、例えばプロトロンビン含有溶液をXa因子と共にインキュベートするかまたは例えば、ヘビ毒であるラッセルクサリヘビ毒（RVV）を用いて凝固因子含有溶液中の凝固カスケードを活性化し、その後クロマトグラフィーによってF2フラグメントを精製することによって得ることができる。あるいは、このプロトロンビンフラグメントF2は、化学合成によって合成して、または原核生物もしくは真核生物の発現システム中で発現させることによって組み換え的に得ることができる。

10

【0016】

C末端ネオエピトープを含む、すなわち完全プロトロンビンフラグメントF1 + 2および種々のアミノ末端短縮型F1 + 2フラグメントも含む、完全プロトロンビンフラグメントF2を少なくとも含む全てのペプチドが適切である。

【0017】

プロトロンビンフラグメントF2 / F1 + 2のC末端ネオエピトープに対して特異性を有する適切な抗体フラグメント（例えばFab、Fab'、F(ab')₂またはFvフラグメントなど）は、例えば組み換えによるかまたは抗体（好ましくはモノクローナル抗体であり、これらの抗体はプロトロンビンフラグメントF2 / F1 + 2のC末端ネオエピトープに対して特異性を有し、かつプロトロンビンに結合しない）の酵素切断によって得ることができる。プロトロンビンに結合しないこのようなF2 / F1 + 2特異的抗体は、例えば、特許文献1、特許文献2または特許文献3に記載される。モノクローナル抗体の酵素切断は、例えばパイン、ペプシンまたはフィシンによって行われる。特に好ましい抗体フラグメントはFabフラグメントであり、これは例えばパインによる酵素切断によって得ることができる。

20

【0018】

特に好ましい抗体フラグメントは、2008年6月3日にDSMZ（Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, 38124 Brunswick, Germany）に受託番号DSM ACC 2911で寄託されたハイブリドーマ細胞株によって作製される、モノクローナルであるF2 / F1 + 2ネオエピトープ特異的抗体96 - 163 / 04（抗原を免疫するのと同様に配列Cys - Gly - Ser - Asp - Arg - Ala - Ile - Glu - Gly - Arg - OH（“PF2”）を有する合成ペプチドを使用して特許文献2（特に実施例I ~ VI）の教示に従って作製された）のフラグメント（特にFabフラグメント）である。

30

【課題を解決するための手段】

40

【0019】

本発明の免疫複合体は、適切な条件下で少なくとも完全プロトロンビンフラグメントF2を含むペプチドおよびプロトロンビンフラグメントF2 / F1 + 2のC末端ネオエピトープに特異性を有する抗体を混合しインキュベートして免疫複合体を形成することによって作製される。その後その免疫複合体は、他の反応物から好ましくはクロマトグラフィーによって分離、すなわち単離および精製される。

【0020】

本発明の免疫複合体の好ましい実施形態において、この複合体は好ましくはアルデヒド（例えばグルタルアルデヒドまたはホルムアルデヒド）によって複合体を処理することによって化学的に架橋される。

50

【0021】

本発明の免疫複合体のさらに好ましい実施形態は、キャリアタンパク質（例えば、キーホールリンペットヘモシアニンまたはオボアルブミン）に結合する複合体に関する。このようなキャリアタンパク質の免疫刺激効果およびこれらを結合するための方法は、この技術分野で公知である。

【0022】

本発明のさらなる局面は、複合体に特異的に結合するがその複合体の個々の構成成分には結合しないモノクローナル抗体を得るための方法において抗原を免疫するような本発明の免疫複合体の使用に関する。モノクローナル抗体を得る方法は、例えば、ハイブリドーマ細胞を樹立し、その後分泌された抗体を精製するとういうように十分よく知られている。

10

【0023】

本発明はさらに少なくとも完全プロトンピンフラグメントF2を含むペプチドを含む免疫複合体（これは、プロトンピンフラグメントF2/F1+2のC末端ネオエピトープに特異性を有する抗体フラグメントが結合するがプロトンピンフラグメントF2単独およびプロトンピンフラグメントF2/F1+2のC末端ネオエピトープに対する特異性を有する抗体フラグメント単独には結合しない）に結合するという点で区別されるモノクローナル抗体に関する。

【0024】

本発明の中で特に好ましい抗体は、完全F2ペプチドを含む免疫複合体に特異的に結合する抗体であり、この抗体にはハイブリドーマ細胞株DSM ACC 2911によって形成されたモノクローナル抗体のFabフラグメントが結合する。このような抗体は、例えばハイブリドーマ細胞株2006-175/024、2006-188/044または2006-188/069によって作製される。これらのハイブリドーマ細胞株は、2008年6月3日にDSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, 38124 Brunswick, Germany) に受託番号DSM ACC 2912、DSM ACC 2913およびDSM ACC 2914で寄託された。

20

【0025】

本発明は固相および/またはシグナル生成システムの構成要素と結合する本発明の抗体にも関する。

30

【0026】

用語「固相」は、本発明の目的において、多孔質および/または非多孔質の、通常は水不溶性の材料からなる部材を含み、この部材は、多種多様な形であってよく、例えば、管、チューブ、マイクロタイタープレート、ビーズ、微粒子、ロッド、試験片、ろ紙、または、クロマトグラフィーペーパーなどの形状が可能である。固相の表面は、通常、親水性でもよいし、または、親水性にしてもよい。固相は、多種多様な材料から構成されていてもよく、例えば、無機および/または有機材料、合成材料、天然に存在する材料、および/または、改変された天然に存在する材料から構成することができる。固相材料の例は、

40

【0027】

固相は、例えば、サンプル成分が固相に非特異的に結合することを減少させる、または防ぐために、あるいは、例えば、粒状の固相の懸濁安定性、貯蔵安定性、成形安定性、または、UV光、微生物もしくは損傷作用を有するその他の物質に対する耐性に関する改善を達成するために、例えばタンパク質、炭水化物、親油性物質、バイオポリマー、有機ポリマー、またはそれらの混合物の1またはそれ以上の層からなるコーティングを有しても

50

よい。

【0028】

「シグナル生成系」は、1またはそれ以上の構成要素を含んでもよく、この場合、少なくとも1つの構成要素が検出可能なラベルを含む。ラベルとは、それ自身がシグナルを生産できるあらゆる分子、または、シグナル生産を誘導できるあらゆる分子を意味し、例えば、蛍光物質、放射活性物質、酵素、または、化学発光物質である。シグナルは、例えば、酵素活性、発光、光吸収、光散乱、放出された電磁放射もしくは放射活性放射、または、化学反応に基づき、検出または測定することができる。

【0029】

ラベルは、それ自身で検出可能なシグナルを生成することができ、その場合、さらなる構成要素は必要ない。多くの有機分子は、紫外光および可視光を吸収し、光の吸収により転移したエネルギーは、これらの分子を励起エネルギー状態にし、分子は吸収したエネルギーを入射光の波長と異なる波長の光の形態で放出する。その他のラベルは、代わりに検出可能なシグナルを直接生成することができるものである（例えば、放射活性同位体または色素）。

10

【0030】

その他のラベルは、シグナルを生成するのに、代わりにさらなる構成要素を必要とし、すなわちこのような場合、シグナル生成系は、シグナル生成に必要な全ての構成要素、例えば、基質、補酵素、消光剤、促進剤、さらなる酵素、酵素産物と反応する物質、触媒、活性化剤、補因子、阻害剤、イオンなどを含む。

20

【0031】

適切なラベルは、例えば、酵素、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、グルコースオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、ウレアーゼ、および、アセチルコリンエステラーゼ；色素；蛍光物質、例えばフルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、エチジウムブロマイド、5-ジメチルアミノ-ナフタレン-1-塩化スルホニル、および、希土類の蛍光キレート；化学発光物質、例えばルミノール、イソルミノール、アクリジニウム化合物、オレフィン、エノールエーテル、エナミン、アリールビニルエーテル、ダイオキセン、アリールイミダゾール、ルシゲニン、ルシフェリン、および、エクオリン；増感剤、例えばエオシン、9,10-ジプロモアントラセン、メチレンブルー、ポルフィリン、フタロシアニン、クロロフィル、ローズベンガル；補酵素；酵素基質；放射活性同位体、例えば ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{14}C 、 ^3H 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{51}Cr 、 ^{59}Fe 、 ^{57}Co 、および、 ^{75}Se ；例えば色素、増感剤、蛍光物質、化学発光物質、同位体、もしくはその他の検出可能なラベルでそれ自身が標識可能な磁気粒子のような粒子、好ましくはラテックス粒子；ゾル粒子、例えば金または銀ゾルなどである。

30

【0032】

シグナル生成系はまた、空間的に互いに近接している場合、例えば、エネルギードナーとエネルギーレシピエントの形態で、例えば、光増感剤と化学発光物質（欧州特許第0515194号（A2））、光増感剤と蛍光団（WO95/06877）、放射活性ヨウ素-125と蛍光団（Udenfriend等（1985年）Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 8672~8676）、蛍光団と蛍光団（Mathis（1993年）Clin. Chem. 39: 1953~1959）、または、蛍光団と蛍光消光剤（米国特許第3,996,345号）のような形態で、検出可能な相互作用に参加させることができる構成要素を含んでもよい。構成要素間の相互作用としては、例えば光または電子の放出や、短時間の反応性の化学分子による構成要素間の直接的なエネルギー転送が挙げられる。またそれにより、1つの構成要素の活性が、1またはそれ以上の他の構成要素により阻害または増強される工程が含まれ、この工程としては、例えば酵素活性を阻害または増加すること、または、作用を受けた構成要素により放出された電磁放射を阻害、増加または改変すること（例えば波長シフト、極性化）が挙げられる。構成要素間

40

50

の相互作用はまた、酵素カスケードを含む。この場合、構成要素は酵素であり、そのうち少なくとも1つは他方の酵素の基質を提供し、それにより最大または最小反応速度で結合した基質の変換が起こる。

【0033】

構成要素間の効率的な相互作用は通常、それらが空間的に近接している場合に起こり、すなわち例えば距離が数 μm の範囲内、特に、距離が600nm未満、好ましくは400nm未満、さらに特に好ましくは200nm未満の範囲内で起こる。

【0034】

微粒子はしばしば、固相として、および/または、ラベルとして使用される。用語「微粒子」は、本発明の目的において、およその直径が、20nm~20 μm 、通常40nm~10 μm 、好ましくは0.1~10 μm 、特に好ましくは0.1~5 μm 、さらに特に好ましくは0.15~2 μm の粒子を意味する。微粒子の形状は、一定でもよいし、または不揃いでもよい。微粒子は、球状、回転楕円体、大きいまたは小さい空洞または孔を有する球状が可能である。微粒子は、有機材料もしくは無機材料、または、これら2種の混合物または組み合わせから構成することができる。微粒子はまた、多孔質または非多孔質材料、膨潤性または非膨潤性材料から構成されてもよい。微粒子は、どのような比重を有していてもよいが、水の比重に近い比重(例えば約0.7~約1.5g/ml)を有する粒子が好ましい。好ましい微粒子は、水性溶液に懸濁可能であり、懸濁液中で最も安定である。微粒子は、透明、半透明、または不透明であり得る。微粒子は、複数の層で構成されてもよく、例えば、コアと、1またはそれ以上の被服層とを有するいわゆるコア・シェル粒子が挙げられる。用語「微粒子」は、例えば色素結晶、金属ゾル、シリカ粒子、ガラス粒子、磁気粒子、ポリマー粒子、油滴、脂質粒子、デキストラン、および、タンパク質集合体を含む。好ましい微粒子は、水性溶液に懸濁可能であり、水不溶性ポリマー材料、特に置換ポリエチレンからなる粒子である。ラテックス粒子は極めて特に好ましく、例えば、ポリスチレン、アクリル酸ポリマー、メタクリル酸ポリマー、アクリロニトリルポリマー、アクリロニトリル-ブタジエン-スチレン、ポリ酢酸ビニル-アクリレート、ポリビニルピリジン、塩化ビニル-アクリレートで構成される。表面に、共有結合(例えば特異的な結合パートナーとラテックス粒子との共有結合)を可能にする反応性基(例えば、カルボキシル、アミノまたはアルデヒド基)を有するラテックス粒子が、特に興味深い。ラテックス粒子の製造は、例えば欧州特許第0080614号(A2)、欧州特許第0227054号(A2)、および、欧州特許第0246446号(A2)で説明されている。

【0035】

用語「結合した」は、広い意味を有し、例えば、共有結合および非共有結合、直接的および間接的な結合、表面への吸着、および、くぼみや空洞への取り込みなどを含む。共有結合の場合、抗体は、化学結合で固相またはシグナル生成系の構成要素に結合する。非共有結合の例としては、表面への吸着、空洞への取り込み、または、2つの特異的な結合パートナー結合が挙げられる。固相またはシグナル生成系の構成要素への直接的な結合のほか、抗体を、他方の特異的な結合パートナーと特異的な相互作用を介して固相またはラベルに間接的に結合させることも可能である(欧州特許第0411945号(A2)も参照)。これは、以下の例により詳細に説明される: ビオチン化抗体は、ラベル結合アビジンを介してラベルへ結合できる; または、フルオレセイン抗体結合体は、固相に結合した抗フルオレセイン抗体を介して固相に結合できる; または、抗体は、免疫グロブリンが結合したタンパク質を介して固相またはラベルに結合できる。

【0036】

本発明の抗体は、被験体からの生体サンプル中、好ましくは患者の血液または血漿サンプル中のプロトンピンフラグメントF2/F1+2の定量的または定性的な検出方法において使用するのに適切である。従って、本発明はさらにサンプル中のプロトンピンフラグメントF2/F1+2を測定する方法に関し、ここでこのサンプルは、プロトンピンフラグメントF2/F1+2のC末端ネオエピトープに対して特異性を有する抗体フラ

10

20

30

40

50

グメントと接触され、サンプル中のプロトンピンフラグメント F 2 / F 1 + 2 と免疫複合体を形成する。このサンプルはさらに免疫複合体に結合するがプロトンピンフラグメント F 2 / F 1 + 2 単独およびプロトンピンフラグメント F 2 / F 1 + 2 の C 末端ネオエピトープに対して特異性を有する抗体フラグメント単独には結合しない本発明の抗体またはそのフラグメントと接触させられ、その結合された免疫複合体の量が測定される。好ましい実施形態において、このサンプルは、寄託されたハイブリドーマ細胞株 DSM ACC 2911 によって形成される抗体の F (a b ')₂ フラグメントまたは F a b フラグメントと接触させられ、そのサンプル中に存在するプロトンピンフラグメント F 2 / F 1 + 2 と免疫複合体を形成し、この免疫複合体に対して特異性を有する抗体を用いて、好ましくは寄託されたハイブリドーマ細胞株 DSM ACC 2912、DSM ACC 2913 もしくは DSM ACC 2914 のうちのひとつから形成される抗体またはそのフラグメントを用いてその免疫複合体の量が測定される。

10

【 0 0 3 7 】

F 2 / F 1 + 2 の定量検出方法において、サンプル中における F 2 / F 1 + 2 の量または濃度が測定される。用語「定量検出」は、サンプル中の F 2 / F 1 + 2 のおよその量もしくは濃度を推測する程度、または、相対的な量もしくは濃度を示すのに役立つ程度の半定量方法も含む。定性検出は、サンプル中における F 2 / F 1 + 2 の存在、または、サンプル中における F 2 / F 1 + 2 の濃度が、特定の閾値またはいくつかの特定の閾値より低いか、または高いかを示す指標を単に検出することを意味する。

【 0 0 3 8 】

20

従って本発明はまた、サンプルおよびそのための適切な試薬中における、F 2 / F 1 + 2 の定量検出または定性検出の方法に関する。これらの方法はいわゆる不均質系結合分析または均質系結合分析であってもよく、それらの分析において結合パートナーに対する F 2 / F 1 + 2 の特異的結合を通してサンプル中の F 2 / F 1 + 2 の存在、非存在または量について結論を描き出すことができる。免疫測定法は結合分析の例である。

【 0 0 3 9 】

いわゆる「不均質系結合分析」は、1 またはそれ以上の分離工程および / または洗浄工程を特徴とする。分離は、例えば、免疫沈降、ポリエチレングリコールまたは硫酸アンモニウムのような物質を用いた沈殿、ろ過、磁気での除去、固相への付着により行うことができる。このような「固相」は、多孔質および / または非多孔質の材料（通常は水不溶性）からなる。固相は多種多様な形であってよく、例えば：管、チューブ、マイクロタイタープレート、ビーズ、微粒子、ロッド、試験片、ろ紙、または、クロマトグラフィーペーパーなどである。サンドイッチ様式の不均質系結合分析において、通常、F 2 / F 1 + 2 に特異的な結合パートナーの一方は、固相に結合し、「F 2 / F 1 + 2 - F 2 / F 1 + 2 に特異的な結合パートナー」が結合した複合体を液相から除去するのに役立つ、その一方で、もう一方の分析物に特異的な結合パートナーは、結合した複合体を検出するための検出可能なラベルを保持する（例えば酵素、蛍光ラベルまたは化学発光ラベルなど）。これら分析方法は、いわゆる 1 ステップサンドイッチ分析（2 種の特異的な結合パートナーを同時にサンプルとインキュベートする）、および、2 ステップサンドイッチ分析（最初にサンプルを固相試薬とインキュベートし、分離および洗浄工程後、固相が結合した F 2 / F 1 + 2 と F 2 / F 1 + 2 に特異的な結合パートナーとの複合体を検出試薬とインキュベートする）にさらに分類される。

30

40

【 0 0 4 0 】

「均質系結合分析」において、遊離のシグナル生成系の構成要素と、「F 2 / F 1 + 2 - F 2 / F 1 + 2 に特異的な結合パートナー」複合体に結合した構成要素との分離は行われない。分析混合物（F 2 / F 1 + 2 に特異的な結合パートナー、シングルジェネレーティングの構成要素およびサンプルを含む）は、結合反応後または結合反応中でも、さらに分離および / または洗浄工程を行うことなく測定に用いられ、対応する測定シグナルが決定される。均質な免疫測定法の例としては、様々な混濁度測定方法や比濁分析方法（この場合、検出に用いられた分析物に特異的な結合パートナーはラテックス粒子と結合する）

50

; E M I T (登録商標) アッセイ; C E D I A (登録商標) アッセイ/蛍光偏光免疫測定法; 発光酸素チャネリングイムノアッセイ (l u m i n e s c e n t o x y g e n c h a n n e l i n g i m m u n o a s s a y) (「L O C I」, 欧州特許第0515194号(A2); U l l m a n , E . F . 等 (1994年) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . , 91:5426~5430; U l l m a n , E . F . 等 (1996年) C l i n i c a l C h e m i s t r y , 42:1518~1526を参照); などが挙げられる。例えば比濁ラテックス分析のような均質系サンドイッチ免疫測定法において、抗体試薬は、サンプルと共にインキュベートされ、測定前に分離または洗浄工程を行うことなく、インキュベート中および/またはインキュベート後にシグナルが測定される。言い換えれば、遊離の分析物または分析対象物と結合していない抗体から、抗体が結合した分析対象物を分離しなくてもよい。

10

【0041】

均質および不均質系結合分析はまた、いわゆる「サンドイッチ分析」の形態で行うこともできる。この場合、分析対象物は、例えば、不均質系結合分析において、固相に結合した分析対象物に特異的な結合パートナーにより、および、シグナル生成系の構成要素と結合した分析対象物に特異的な結合パートナーにより結合する。

【0042】

均質または不均質な「競合的な結合分析」において、サンプル分析対象物および試薬分析対象物(例えば「改変された分析対象物」、例えば、標識されたF2/F1+2もしくはタグを付されたF2/F1+2、またはF2/F1+2フラグメント)は、限定された数の分析対象物に特異的な結合パートナーに対する結合に関して競合する。原理を説明する例を以下に挙げる:(i) サンプル分析対象物は、シグナル生成系の構成要素と結合する試薬分析対象物と、固相に結合した分析対象物に特異的な結合パートナーへの結合に関して競合するか、または、(ii) サンプル分析対象物は、固相に結合した分析対象物(試薬分析対象物)と、シグナル生成系の構成要素と結合した分析物に特異的な結合パートナーへの結合に関して競合する。

20

【0043】

例えば、以下の方法によって、本発明の抗体を用いてF1+2を検出することもできる:

ウェスタンブロットティング、ドットブロットティング、免疫電気泳動法、免疫固定電気泳動、電気免疫拡散、免疫沈降、放射免疫拡散、免疫固定、イムノクロマトグラフィー、ラテックス凝集反応、混濁度測定分析または比濁分析、均質系または不均質系結合分析、1または2ステップ分析、サンドイッチ分析、間接的な分析、競合的分析、ポイント・オブ・ケア・テストなど。これらおよび他の検出方法は、例えば「Labor und Diagnose」, L. Thomas 編, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, フランクフルト, 1998年, 第60章に記載されている。

30

【0044】

用語「ポイント・オブ・ケア・テスト」または「POC試験」は、試験を実行または評価するのに別個の分析装置または測定装置を必要としない試験を含む。POC試験は、多くの場合、イムノクロマトグラフィー方法、ろ過による免疫複合体の除去、および/または免疫固定技術に基づいている。POC試験は、大規模な研究所のためというよりむしろ、特に、例えば病院のベッドまたは自宅などの場所での測定、救急医および/または一次医療医を対象にしている。POC試験はまた、特に、臨床検査分野におけるきめ細かい医療技術の訓練を受けていない人々やそのような経験がない人々によって行うことができる。用語「POC試験」はまた、本発明の目的において、医療専門外の人々により実施することができるいわゆる自宅での検査またはOTC検査を意味し、例えば自宅での使用のために市販される様々な妊娠試験がある。その他のPOC試験は、例えば、心筋梗塞のマーカ、薬物、医薬品、感染や炎症のマーカの検出に関する。多くのPOC試験において、特異的な結合パートナーは、試験の実行中に、フィルターまたはクロマトグラフィー試験片もしくはディスク上に存在するか、または、それらに結合する。ポジティブまたは

40

50

ネガティブな検出反応は、例えば特定の試験フィールドにおける着色されたバンドの出現または非出現、および/または、特定の記号（例えば「+」や「-」）の出現または非出現、および/または、特定の測定されたシグナルの強度と関連付けることができる。

【0045】

F2/F1+2のためのPOC試験は、例えば以下のように設計することができる：サンプルおよび、プロトロンピンフラグメントF2/F1+2のC末端ネオエピトープに特異性を有する標識された抗体を試験片に適用する。適切なラベルの例としては、着色されたラテックス粒子、コロイド金、酵素などが挙げられる。F2/F1+2がサンプル中に存在する場合、F2/F1+2-抗体複合体が形成され得る。これら複合体は、例えば毛細管力によって、F2/F1+2を含む免疫複合体およびプロトロンピンフラグメントF2/F1+2のC末端ネオエピトープに特異性を有する抗体フラグメントに特異的に結合できる本発明の抗体（好ましくは一次抗体）が固定されている領域に移動してもよいし、または、試験方法の際に例えばバンド状に固定されてもよい（例えばビオチン-アビジン架橋を介して）。標識されたF2/F1+2-抗体免疫複合体はこの領域に結合し、固定された抗体とサンドイッチ複合体を形成する。この場合、ラベルのシグナルの強度は、F2/F1+2のサンプル濃度に比例する。

10

【0046】

本発明の別の局面は、プロトロンピンフラグメントF2を含む免疫複合体に結合する本発明の抗体を含む少なくともひとつの試薬を備える試験キットであり、この免疫複合体にはプロトロンピンフラグメントF2/F1+2のC末端ネオエピトープに対して特異性を有する抗体フラグメントが結合するが、プロトロンピンフラグメントF2単独およびプロトロンピンフラグメントF2/F1+2のC末端ネオエピトープに対して特異性を有する抗体フラグメント単独には結合しない。好ましい試験キットは、寄託されたハイブリドーマ細胞株DSM ACC 2912、DSM ACC 2913またはDSM ACC 2914のうちのひとつによって形成される抗体を含む。このような試験キットは、通常パッケージ化された形状で試験の全てまたはいくつかの構成要素のみを含んでいる。本発明の抗体は、例えば、1種類以上の固相および/またはシグナル生成系の1つ以上の構成要素と結合し得る。この試験キットは、例えば、標準物質、コントロール、ならびに例えば、緩衝液、洗浄溶液、測定されたシグナル誘導溶液および/もしくは酵素基質のような他の試薬；キュベット；ピペットおよび/または試験の説明書を備えていてもよい。

20

30

【0047】

本発明の試験キットは、好ましくはプロトロンピンフラグメントF2/F1+2のC末端ネオエピトープに対して特異性を有する抗体または抗体フラグメント、好ましくは寄託されたハイブリドーマ細胞株DSM ACC 2911によって形成されるモノクローナル抗体96-163/04のF(ab')₂フラグメントまたはFabフラグメントをさらに含む。

【図面の簡単な説明】**【0048】**

【図1】均質系LOCI（登録商標）分析（実施例3を参照）におけるF2/F1+2を数量化するための校正プロット。これらの測定されたシグナルは、ビオチン化された免疫複合体特異性抗体（BA）をケミビーズ（化学発光粒子）に結合したF2/F1+2ネオエピトープ特異性抗体（CB）と組み合わせて使用した最初の分析計画（実線）、およびビオチン化されたF2/F1+2ネオエピトープ特異的抗体（BA）をケミビーズに結合した免疫複合体特異的抗体（CB）と組み合わせて使用した第2の分析計画（破線）の両方のF1+2の濃度に対して比例関係を示している。

40

【実施例】**【0049】**

以下の実施例は、本発明を説明する役目を果たしており、限定的なものとして解釈されるべきではない。

【0050】

50

(実施例1：免疫抗原としての使用するための種々の免疫複合体の作製)
以下の免疫複合体を、免疫抗原として使用した。

【表1】

表1

	免疫複合体			
	プロトロンビン フラグメント	F2/F1+2 抗体 96-163/04	架橋	キャリア タンパク質
a)	F2/F1+2 ペプチド 15mer	完全	—	—
b)	F2/F1+2 ペプチド 15mer	完全	グルタルアルデヒド	—
c)	完全F2フラグメント	完全	—	—
d)	完全F2フラグメント	完全	グルタルアルデヒド	—
e)	完全F2フラグメント	Fabフラグメント	グルタルアルデヒド	KLH
f)	完全F2フラグメント	Fabフラグメント	—	オボアルブミン

10

20

【0051】

(出発物質)

(使用したプロトロンビンフラグメント)

(F2/F1+2ペプチド15mer)

ヒトプロトロンビンフラグメントF2/F1+2の14C末端アミノ酸残基およびさらなるアミノ末端システイン残基からなる合成ペプチド(配列：H-Cys-Leu-Asp-Glu-Asp-Ser-Asp-Glu-Glu-Arg-Ala-Ile-Glu-Gly-Arg-OH)。

【0052】

(完全F2フラグメント)

完全F2フラグメント(14kDa)を得るために、市販の凝固因子濃縮物(ヒトプロトロンビン複合体)を、プロトロンビン(Beriplex P/N 500, CSL Behring GmbH, Marburg, Germany)の供与源として使用した。F2作製物の作製を、以下の方法で行った：

1. 活性緩衝液(10mmol Tris、10mmol CaCl₂、pH7.5)中へのBeriplexの溶解

2. FX特異的RVVセファロース(キャリア物質に結合したヘビ毒)を使用した凝固活性化、および37にて攪拌しながらのインキュベーション

3. 吸引漏斗または遠心分離によるキャリア物質の除去、引き続いてPMSF(フッ化フェニルメチルスルホニル)を使用しての凝固活性の停止およびクエン酸ナトリウムの添加

4. 塩化バリウムを使用してのGladメインを有する切断生成物の二倍吸収/沈殿、および遠心分離による除去

5. 上清の安定化、濾過および濃縮

6. SuperdexTM75ゲル物質(GE Healthcare Europe GmbH, Germany)、走行緩衝液(running buffer)(50mmol NaHPO₄、pH8.5)を使用しての上清のゲル濾過、さらなる精製のためのF2含有画分の使用

7. Mono Qキャリア物質(GE Healthcare Europe GmbH

30

40

50

H, Germany) を使用した陰イオン交換クロマトグラフィー :

緩衝液 A : 50 mmol NaHPO₄, pH 8.5

緩衝液 B : 50 mmol NaHPO₄ + 1 mol NaCl, pH 8.5

緩衝液 A 中への F2 含有画分の添加、直線的な塩勾配 (0 ~ 40 % 緩衝液 B、20 カラム容量) での溶離、F2 含有画分の収集および貯留

8. SDS-PAGE およびウエスタンブロットによる作製物の純度のチェック。

【0053】

(使用した抗体および抗体フラグメント)

プロトンピンフラグメント F2 / F1 + 2 の C 末端ネオエピトープに対して特異性を有するモノクローナル抗体 F1 + 2 96 - 163 / 04 を、米国特許第 5,830,681 号 (Hursting 等) の教示に従って作製した。抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を、受託番号 DSM ACC 2911 で寄託した。Fab フラグメントを作製するために、抗体 F1 + 2 96 - 163 / 04 を、既知の方法によってパピンをを用いて切断し、Fab フラグメントを濃縮した。

10

【0054】

(免疫複合体の作製)

合成 F2 / F1 + 2 ペプチド (15 mer)、またはモノクローナル抗体 F1 + 2 96 - 163 / 04 もしくはその Fab フラグメントに対して過剰な、精製された完全 F2 フラグメント (10 ~ 30 モル) を添加し、室温にて 3 ~ 3.5 時間 PBS 緩衝液 (pH 7.2) 中でインキュベートし、その後 SephacrylTM S-100 (GE Healthcare Europe GmbH, Germany) でのクロマトグラフィーによって免疫複合体を精製することによって、免疫複合体を作製した。

20

【0055】

(免疫複合体の架橋)

0.2 % の濃度で、グルタルアルデヒドを混合物に添加し、その混合物を 2 ~ 8 にて 2 時間インキュベートした。NaBH₄ を添加することによってその反応を停止し、架橋した免疫複合体を HiPrepTM 脱塩用カラム (GE Healthcare Europe GmbH, Germany) によって精製した (走行緩衝液 : PBS (pH 7.2))。

30

【0056】

(キャリアタンパク質への結合)

免疫複合体または架橋した免疫複合体を、既知の慣例的な方法によってキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) またはオボアルブミンに結合させた。

【0057】

(実施例 2 : 本発明の抗体の作製およびスクリーニング)

先行技術に従って、免疫抗原 20 μg の各場合において BALB / c マウスを腹腔内で免疫化した (実施例 1 の免疫複合体を参照のこと)。この免疫化した動物の脾臓細胞をミエローマ細胞 (Sp2 / 0) に融合させ、ハイブリドーマ細胞株を樹立した。

【0058】

適した抗体を、以下のように同定した :

40

ELISA No. 1 : F2 フラグメントおよびモノクローナル抗体 F1 + 2 96 - 163 / 04 の F(ab')₂ フラグメントからなる免疫複合体との反応性

モノクローナル抗体 F1 + 2 96 - 163 / 04 の F(ab')₂ フラグメントでコーティングしたマイクロタイタープレートを、F2 フラグメント (実施例 1 を参照のこと) を含有する溶液中でインキュベートし、F2 / F1 + 2 - 特異的抗体の F(ab')₂ フラグメントと F2 フラグメントの免疫複合体を形成した。

【0059】

ELISA No. 2 : F2 フラグメント単独との反応性

マイクロタイタープレートを、精製した F2 フラグメント (実施例 1 を参照のこと) でコーティングした。

50

【0060】

ELISA No. 3:モノクローナル抗体F1+2 96-163/04のF(ab')₂フラグメント単独との反応性

マイクロタイタープレートを、F2/F1+2-特異的抗体96-163/04のF(ab')₂フラグメントでコーティングした。

【0061】

100 μ lの細胞培養上清(1:2希釈)を、コーティングしたマイクロタイタープレートの各ウェル中にピペットで入れ、+15~+25にて1時間インキュベートした。そのプレートを洗浄液POD(OSEW; Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany)で2回洗浄した後、100 μ lの抗マウスIgG/Fc-POD接合体(ペルオキシダーゼ接合体、Sigma-Aldrich GmbH, Germany, Prod. No. A0168)をピペットで各ウェルに入れ、+15~+25にて1時間インキュベートした。そのプレートを2回以上洗浄した後、100 μ lの色原体TMB溶液(テトラメチルベンジジン溶液、Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany)をピペットで各ウェルに入れ、+15~+25にてさらに30分インキュベートした。インキュベート後、100 μ lの停止溶液POD(Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany)をピペットで各ウェルに入れ、そのマイクロタイタープレートを、Tecan SunriseTM吸光度読取装置(Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Germany)において450nmにて評価した。

10

20

【0062】

細胞培養上清が免疫複合体と良好な反応性を示し(ELISA No. 1)、個々の成分と最小限の反応性しか示さないか全く反応性を示さない(ELISA No. 2およびNo. 3)細胞株をクローン化し、大量の抗体をこれらのクローンから精製した。この精製した抗体の濃度を1または0.1 μ g/mlに調整し、ELISA No. 1~3においてアッセイした。

【0063】

これらの結果を表2(抗体濃度1 μ g/ml)および表3(抗体濃度0.1 μ g/ml)に示す。450nmでの吸光値を、測定データとして示す。

30

【表 2】

表 2

MAb	グループ No.	ELISA No. 1	ELISA No. 2	ELISA No. 3
2006-140/0651	1	3.961	0.038	0.511
2006-175/024	1	2.761	0.028	0.108
2006-188/044	1	3.906	0.027	0.186
2006-188/069	1	3.848	0.029	0.233
2006-188/086	1	3.918	0.036	0.174
2006-188/0143	1	3.970	0.031	0.387
2006-209/09	1	3.819	0.030	0.166
2006-216/04	1	1.940	0.024	0.230
Prothr. 195/097	2	4.103	3.570	0.135
96-163/04	3	0.923	1.921	0.112
95-332/03	3	0.290	3.552	0.097
CRP 268/094	4	0.062	0.027	0.099
バックグラウンド	-	0.082	0.034	0.097

10

20

【 0 0 6 4 】

【表 3】

表 3

MAb	グループ No.	ELISA No. 1	ELISA No. 2	ELISA No. 3
2006-140/0651	1	3.645	0.025	0.135
2006-175/024	1	1.490	0.034	0.107
2006-188/044	1	3.808	0.034	0.099
2006-188/069	1	3.779	0.031	0.121
2006-188/086	1	3.835	0.024	0.107
2006-188/0143	1	3.795	0.025	0.132
2006-209/09	1	3.171	0.027	0.110
2006-216/04	1	1.548	0.020	0.102
Prothr. 195/097	2	3.534	1.850	0.102
96-163/04	3	0.174	0.615	0.096
95-332/03	3	0.096	1.203	0.096
CRP 268/094	4	0.081	0.025	0.101
バックグラウンド	-	0.082	0.034	0.097

30

40

【 0 0 6 5 】

試験したモノクローナル抗体をより明確にするためにグループに分けた：

グループ 1：F 2 フラグメントおよび F 2 / F 1 + 2 ネオエピトープ特異的抗体 F 1 + 2 9 6 - 1 6 3 / 0 4 の F (a b ')₂ フラグメントから構成される免疫複合体に対して特異性を有する本発明の抗体；

グループ 2：コントロールとして含まれる F 2 フラグメントの N 末端半分上のエピトープに結合するプロトロンイン特異的抗体（欧州特許第 1 5 4 1 6 7 6 (A 1)、実施例 2

50

d) および e) を参照、受託番号 D S M A C C 2 6 0 7 で寄託されたハイブリドーマ細胞株) ;

グループ 3 : コントロールとして含まれる、米国特許 5 , 8 3 0 , 6 8 1 号 (H u r s t i n g 等) の教示に従って作製されたプロトロンピンフラグメント F 2 / F 1 + 2 の C 末端ネオエピトープに対して特異性を有するモノクローナル抗体 ;

グループ 4 : ネガティブコントロールとして含まれる F 2 / F 1 + 2 系とは性質を異にするモノクローナル抗体。

【 0 0 6 6 】

グループ 1 の本発明の抗体は、免疫複合体に対してモノクローナル抗体の所望される特異性を示している。すなわち E L I S A N o . 1 においては複合体と非常に良好な反応性を示しているが、E L I S A N o . 2 および 3 においてはごく小さい反応のみまたは反応を示していない。

10

【 0 0 6 7 】

(実施例 3 : F 2 / F 1 + 2 を数量化するための均質系 L O C I (登録商標) アッセイ)

本明細書中で使用される L O C I (登録商標) 技術は、光増感剤によって生成する一重項酸素が、化学発光化合物を励起することのできるように、分析対象物への結合を介して空間的近接に導かれているラテックス粒子 (C h e m i b e a d s 、 C B) 上に結合された化学発光化合物およびラテックス粒子 (S e n s i b e a d s 、 S B) 上に結合された光増感剤をベースとしている。生成した化学発光の量は、分析物の量と相関関係にある。

20

F 1 + 2 濃度におけるシグナルの依存度は、均質系免疫測定法計画において L O C I (登録商標) 技術を使用して示された。

【 0 0 6 8 】

第 1 の分析計画について、この免疫複合体特異的抗体 2 0 0 6 - 1 7 5 / 0 2 4 (D S M A C C 2 9 1 2 より) 、 2 0 0 6 - 1 8 8 / 0 4 4 (D S M A C C 2 9 1 3 より) または 2 0 0 6 - 1 8 8 / 0 6 9 (D S M A C C 2 9 1 4 より) をケミビーズ (C h e m i b e a d s) に結合した。ストレプトアビジンコーティングした S e n s i b e a d s を第 2 成分として使用した。ビオチン化 F 2 / F 1 + 2 ネオエピトープ特異的抗体 9 6 - 1 6 3 / 0 4 (D S M A C C 2 9 1 1 より) を第 3 の成分として使用した。

【 0 0 6 9 】

30

第 2 の分析計画について、F 2 / F 1 + 2 ネオエピトープ特異的抗体 9 6 - 1 6 3 / 0 4 (D S M A C C 2 9 1 1 より) をケミビーズに結合した。ストレプトアビジンコーティングした S e n s i b e a d s を第 2 成分として使用した。ビオチン化免疫複合体特異的抗体 2 0 0 6 - 1 7 5 / 0 2 4 (D S M A C C 2 9 1 2 より) 、 2 0 0 6 - 1 8 8 / 0 4 4 (D S M A C C 2 9 1 3 より) または 2 0 0 6 - 1 8 8 / 0 6 9 (D S M A C C 2 9 1 4 より) を第 3 の成分として使用した。

【 0 0 7 0 】

F 1 + 2 濃度を数量化するために血漿サンプルを 2 つの試薬 (ケミビーズおよびビオチン化抗体) と混合し、37 で 2 2 0 分間インキュベートした。次いで S e n s i b e a d s をさらなるシグナル要素として加え、混合した。その後 37 で 3 6 0 分間さらにインキュベートした。次いでこの化学発光を L O C I リーダーにて測定した。

40

【 0 0 7 1 】

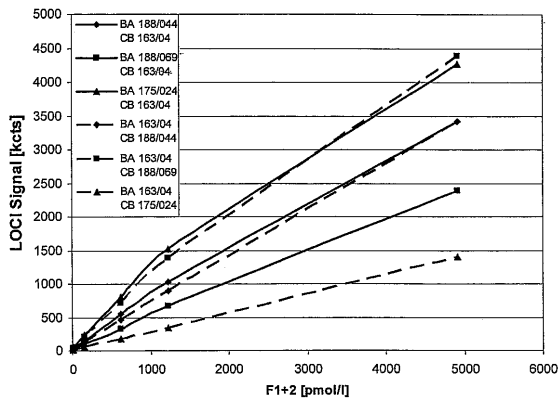
ヒト血漿サンプル中の F 2 / F 1 + 2 濃度を数量化するための標準プロットを構築した。この目的は、F 1 + 2 を適切な緩衝液中で規定濃度の 5 0 0 0 p m o l / l に合わせることであった。このストック溶液の段階希釈を作成し、上記に記載するとおりに分析した。測定されたシグナル高度に対する F 1 + 2 濃度 (X 軸) のプロットは、校正プロットを提供する。図 1 から明らかなように、2 つの異なる分析計画において生成したシグナルは、サンプル中の F 1 + 2 濃度に比例し、そのことで F 1 + 2 濃度を数量化することが可能となる。

【 0 0 7 2 】

50

本明細書中で選択された分析計画を用いて、1600000 pmol/l F1+2の濃度まで高容量フック効果 (high-dose hook effect) が見出されなかったことを、さらなる研究が示している。従って、分析物の不正確で低い測定が実質的に防止される。

【 図 1 】



【配列表】

0005498110000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 ローラント・バルテン
ドイツ連邦共和国35039マルブルク・ヘールガーセ1
- (72)発明者 マーティアス・エーム
ドイツ連邦共和国35094ラーントル・ビルケンヴェク9
- (72)発明者 ボードー・フィッシャー
ドイツ連邦共和国35039マルブルク・ヴァイントラウトシュトラッセ37
- (72)発明者 シュテファン・タイゲルカンブ
ドイツ連邦共和国35096ニーデルヴァルゲルン・ミュラッカーシュトラッセ17

審査官 海野 佳子

- (56)参考文献 特開昭63-112599(JP,A)
特開昭64-070498(JP,A)
特表平05-504473(JP,A)
特表平05-504841(JP,A)
米国特許出願公開第2003/0219845(US,A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48 - 33/98

专利名称(译)	用于在均相免疫测定中测量凝血酶原片段F2 / F1 + 2的抗体		
公开(公告)号	JP5498110B2	公开(公告)日	2014-05-21
申请号	JP2009223732	申请日	2009-09-29
[标]申请(专利权)人(译)	西门子医疗诊断PRODS		
申请(专利权)人(译)	西门子医疗诊断产品有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	西门子医疗诊断产品有限公司		
[标]发明人	ハーラルトアルトハオス ローラントバルテン マーティアスエーム ポードーフィッシャー シュテファンタイゲルカンフ		
发明人	ハーラルト・アルトハオス ローラント・バルテン マーティアス・エーム ポードー・フィッシャー シュテファン・タイゲルカンフ		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/577 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/36 C07K16/42 C07K2317/32 C07K2319/00 C12N9/6429 C12Y304/21005 G01N33/86 G01N2333/96463 G01N33/563 G01N33/573		
FI分类号	G01N33/531.A G01N33/577.B G01N33/53.L G01N33/543.501.D		
优先权	102008049601 2008-09-30 DE		
其他公开文献	JP2010085407A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供在均相结合试验中检测含有过量凝血酶原的样品中 F 2 / F 1 + 2 的方法。单克隆抗体特异性结合免疫缀合物，其中结合了对凝血酶原片段 F2 / F1 + 2 具有特异性的抗体或抗体片段。【选择图】无

	免疫複合体			
	プロトロンビン フラグメント	F2/F1+2 抗体 96-163/04	架橋	キャリア タンパク質
a)	F2/F1+2 ペプチド 15mer	完全	—	—
b)	F2/F1+2 ペプチド 15mer	完全	グルタルアルデヒド	—
c)	完全 F2 フラグメント	完全	—	—
d)	完全 F2 フラグメント	完全	グルタルアルデヒド	—
e)	完全 F2 フラグメント	Fab フラグメント	グルタルアルデヒド	KLH
f)	完全 F2 フラグメント	Fab フラグメント	—	オボアルブミン