

(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2014-500500  
(P2014-500500A)

(43) 公表日 平成26年1月9日(2014.1.9)

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)  
**GO 1 N 33/53 (2006.01)** GO 1 N 33/53 D  
**GO 1 N 33/543 (2006.01)** GO 1 N 33/543 5 O 1 A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁)

(21) 出願番号 特願2013-542664 (P2013-542664)  
 (86) (22) 出願日 平成23年11月30日 (2011.11.30)  
 (85) 翻訳文提出日 平成25年8月5日 (2013.8.5)  
 (86) 国際出願番号 PCT/IL2011/000911  
 (87) 国際公開番号 W02012/077097  
 (87) 国際公開日 平成24年6月14日 (2012.6.14)  
 (31) 優先権主張番号 209921  
 (32) 優先日 平成22年12月9日 (2010.12.9)  
 (33) 優先権主張国 イスラエル (IL)  
 (31) 優先権主張番号 61/421, 339  
 (32) 優先日 平成22年12月9日 (2010.12.9)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

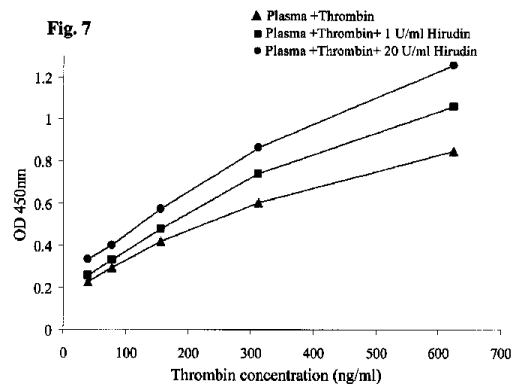
(71) 出願人 511203455  
 オムリックス・バイオフィーマシューティ  
 カルズ・リミテッド  
 Omrix Biopharmaceut  
 icals Ltd.  
 イスラエル国、76106 レホボット、  
 ピーオー・ボックス 619、ワイツマン  
 ・サイエンス・パーク、ビルディング 1  
 4  
 Bldg. 14, Weizmann  
 Science Park, P. O.  
 Box 619, Rehovot 76  
 106 Israel  
 (74) 代理人 100088605  
 弁理士 加藤 公延

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トロンピンを検出するためのイムノアッセイ

(57) 【要約】

本発明は、アンチトロンピンIII (AT-III) 及びトロンピンを含む試料中のトロンピンを定量化するためのインビトロイムノアッセイに関する。方法は、試料をトロンピンの基質結合部位を認識する小分子と接触させる工程と、トロンピンを活性部位がブロックされたトロンピンに対して産生されるトロンピンに特異的な抗体と接触させる工程と、結合した抗体のレベルを測定する工程とを含む。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

アンチトロンビン I I I ( A T - I I I ) の存在下で試料中のトロンピンを定量化するためのインビトロイムノアッセイであって、前記試料をトロンピンの基質結合部位を認識する小分子と接触させる工程と、前記試料にトロンピンに特異的な抗体を加える工程であって、前記トロンピンに特異的な抗体は、ブロックされた活性部位を有するトロンピンに対して産生される、工程と、前記抗体の前記トロンピンとの結合を測定する工程と、存在するトロンピンの量を測定する工程と、を含む、イムノアッセイ。

## 【請求項 2】

前記試料は、血液又は血液成分からなる群から選択される生物学的検体である、請求項 1 に記載のイムノアッセイ。 10

## 【請求項 3】

前記小分子は、天然起源のヒルジン、合成ヒルジン変異体、ヒルジン誘導体、組換えヒルジン変異体、模倣物、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 1 又は 2 に記載のイムノアッセイ。

## 【請求項 4】

前記トロンピンに特異的な抗体は、ポリクローナル抗体又はその断片である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のイムノアッセイ。

## 【請求項 5】

前記抗体は、P h e - P r o - A r g - クロロメチルケトン ( P P A C K )、4 - アミノフェニルピルビン酸 ( A P P A )、4 - ( 2 - アミノエチル ) ベンゼンスルホニルフルオリド ( A E B S F )、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるペプチドで、ブロックされた活性部位を有するトロンピンに対して産生される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のイムノアッセイ。 20

## 【請求項 6】

前記イムノアッセイは、固相免疫測定法である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のイムノアッセイ。

## 【請求項 7】

前記固相免疫測定法は、サンドイッチイムノアッセイである、請求項 6 に記載のイムノアッセイ。 30

## 【請求項 8】

前記トロンピンの量の測定は、トロンピンの標準曲線で行われる、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のイムノアッセイ。

## 【請求項 9】

アンチトロンビン I I I ( A T - I I I ) を含む試料中のトロンピンを定量化するキットであって、トロンピンに特異的なポリクローナル抗体又はその断片と、トロンピンの基質結合部位を認識する小分子とを含み、前記トロンピンに特異的な抗体は、ブロックされた活性部位を有するトロンピンに対して産生される、キット。

## 【請求項 10】

前記小分子は、天然起源のヒルジン、合成ヒルジン変異体、ヒルジン誘導体、組換えヒルジン変異体、模倣物、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 9 に記載のキット。 40

## 【請求項 11】

前記抗体は、P h e - P r o - A r g - クロロメチルケトン ( P P A C K )、4 - アミノフェニルピルビン酸 ( A P P A )、4 - ( 2 - アミノエチル ) ベンゼンスルホニルフルオリド ( A E B S F )、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるペプチドで、ブロックされた活性部位を有するトロンピンに対して産生される、請求項 9 又は 10 に記載のキット。

## 【請求項 12】

前記キットは、イムノアッセイキットである、請求項 9 ~ 11 のいずれか一項に記載の 50

キット。

【請求項 13】

精製トロンピンを更に含む、請求項 9 ~ 12 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 14】

アンチトロンピン I I I ( A T - I I I ) とトロンピンとを含む試料中のトロンピンを定量化するためのインビトロイムノアッセイであって、前記試料をトロンピンの基質結合部位を認識する小分子と接触させる工程と、前記トロンピンを活性部位がブロックされたトロンピンに対して産生されるトロンピンに特異的な抗体と接触させる工程と、結合した抗体のレベルを測定する工程と、を含む、イムノアッセイ。

【請求項 15】

前記試料は、血液又は血液成分からなる群から選択される生物学的検体である、請求項 14 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 16】

前記小分子は、天然起源のヒルジン、合成ヒルジン変異体、ヒルジン誘導體、組換えヒルジン変異体、模倣物、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 14 又は 15 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 17】

前記トロンピンに特異的な抗体は、ポリクローナル抗体又はその断片である、請求項 14 ~ 16 のいずれか一項に記載のイムノアッセイ。

【請求項 18】

前記抗体は、P h e - P r o - A r g - クロロメチルケトン ( P P A C K )、4 - アミノフェニルピルビン酸 ( A P P A )、4 - ( 2 - アミノエチル ) ベンゼンスルホニルフルオリド ( A E B S F )、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるペプチドで、ブロックされた活性部位を有するトロンピンに対して産生される、請求項 14 ~ 17 のいずれか一項に記載のイムノアッセイ。

【請求項 19】

前記イムノアッセイは、固相免疫測定法である、請求項 14 ~ 18 のいずれか一項に記載のイムノアッセイ。

【請求項 20】

前記固相免疫測定法は、サンドイッチイムノアッセイである、請求項 19 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 21】

前記トロンピンの量の測定は、トロンピンの標準曲線で行われる、請求項 14 ~ 20 のいずれか一項に記載のイムノアッセイ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アンチトロンピン I I I ( A T - I I I ) を含む試料中のトロンピンを定量化するためのイムノアッセイに関する。

【背景技術】

【0002】

トロンピン ( - トロンピン ) は、凝固カスケード又は血栓形成において重要な役割を果たす内因性溶解の ( endolytic ) セリンプロテアーゼである。トロンピンは、チモーゲンのプロトロンピンの酵素の切断によって生成される。切断は活性化第 X 因子 ( 因子 X a ) によって行われる。ヒトトロンピンは、軽鎖 ( ~ 6 k D a の分子量を有する ) 及び重鎖 ( ~ 31 k D a の分子量を有する ) からなる。トロンピンは、重鎖内にある活性部位を含む。トロンピンは、アルギニン結合を有するタンパク質の基質に対して高い特異性を有し、その主な基質はフィブリノーゲンである。トロンピンは、フィブリノーゲンを結合してフィブリンに変える。トロンピンはまた、プロテイン C、血小板、第 X I I I 因子、及び血漿プロカルボキシペプチダーゼ B ( T A F I ) を活性化する。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 3 】

通常、トロンビンの活性化は血漿中で阻害される。血漿中に存在するトロンビンの主なインヒビターは、アンチトロンビン I I I ( A T - I I I )、及びより少ない程度でヘパリン補助因子 I I である。これら両方のインヒビターによる阻害の割合は、ヘパリンの最適濃度の存在下で大きく増加する。トロンビンの他の生理的インヒビターは、2 - マクログロブリン及び 1 - アンチトリプシン 1 - 4 である。

## 【 0 0 0 4 】

A T - I I I は、トロンビンと因子 X a とを結合することによって凝固カスケードを阻害する。A T - I I I の阻害活性は、ヘパリンの存在下で著しく増加する。ヒト血漿中のアンチトロンビン I I I の正常濃度は高く、およそ 0 . 1 2 m g / m L である。トロンビンの不活性化は、トロンビンが A T - I I I と等モルの複合体でトラップした結果として生じる。複合体の形成は、トロンビンの活性部位が基質にアクセスすることを防ぐ。アンチトロンビン I I I - トロンビンの複合体の形成には、トロンビンと A T - I I I 内の特異的反応性のペプチド結合との間の相互作用が関与する。ヒト A T - I I I では、この結合はアルギニン ( a r g ) 3 9 3 とセリン ( s e r ) 3 9 4 との間である。

10

## 【 0 0 0 5 】

循環中の異常に高いレベルのトロンピンは凝固カスケードを引き起こす可能性があり、その結果、全身性血液凝固障害が生じる。被検生体試料、例えば、血液試料中のトロンピンのレベルを迅速に定量測定できる方法は、考慮すべき生物医学的関心事である。ヒト及び動物モデルの血漿中のトロンピンの迅速な定量分析は更に、トロンピンを含む止血剤の実験的使用及び日常的使用の安全評価のために非常に重要であり得る。

20

## 【 0 0 0 6 】

比較的大量の酵素前駆体のプロトロンピンが存在する基礎環境、例えば、血漿試料中で、トロンピンに特異的な抗体を用いるイムノアッセイによるトロンピンの検出は、難しい可能性がある。

## 【 0 0 0 7 】

米国特許第 4 7 5 3 8 7 5 号はトロンピンをアッセイするための方法を開示し、その方法では、タグ付き過剰量のトロンピンインヒビター（例えば、タグ付きヒルジン又はタグ付き A T - I I I ）をトロンピンを含む被検試料と一緒に溶液に混合し、タグ付きインヒビター - トロンピンの複合体と、タグ付き遊離インヒビターとの混合物を形成する。次に、アンチトロンピン抗体を加え、タグ付きインヒビター - トロンピンとトロンピンに特異的な抗体との複合体を形成する。次に、複合体をタグ付き遊離インヒビターから分離し、タグを測定する。3 H - ヒルジンを加え、セルロースと結合したトロンピンに特異的な抗体でトロンピン - ヒルジン複合体を分離することによって、血漿の試料中のトロンピンを検査するためのアッセイを例示する。すなわち、この検査は、例えば、アフィニティークロマトグラフィーのカラム分離の追加の工程を用いる、複雑な分離の工程を必要とする。

30

## 【 0 0 0 8 】

米国特許第 5 2 9 6 3 5 2 号は、トロンピン / ヒルジン - 複合体及びその誘導体に対する、またそれらを認識するモノクローナル抗体を開示する。米国特許第 5 2 9 6 3 5 2 号は、トロンピン / ヒルジン複合体を検出するためのモノクローナル抗体の使用を開示する。同特許は更に、モノクローナル抗体は、被験者の少量の自然発生トロンピンを検出するのに使用できることを開示する。方法は、被験者にヒルジンをトレーサーとして注入し、続いて、形成された複合体トロンピン / ヒルジンをその複合体を認識するモノクローナル抗体を用いて測定することを含む。血漿中に存在するトロンピン - ヒルジン複合体を測定するために E L I S A アッセイを例示する。この検査は、トロンピンを検査するために被験者にヒルジンを注入する必要がある。

40

## 【 発明の概要 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

## 【 0 0 0 9 】

血液試料中のトロンピンのレベルを測定するためのインビトロで、簡単、迅速、かつ有

50

効な検査の必要性がある。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、アンチトロンビンIII (AT-III) の存在下で試料中のトロンピンを定量化するためのインビトロイムノアッセイに関する。

【0011】

一態様では、イムノアッセイは、試料をトロンピンの基質結合部位を認識する小分子と接触させる工程と、トロンピンを活性部位がブロックされたトロンピンに対して産生されるトロンピンに特異的な抗体と接触させる工程と、結合した抗体のレベルを測定する工程とを含む。

【0012】

別の態様では、イムノアッセイは、試料をトロンピンの基質結合部位を認識する小分子と接触させる工程と、試料にトロンピンに特異的な抗体を加える工程であって、トロンピンに特異的な抗体は、ブロックされた活性部位を有するトロンピンに対して産生される、工程と、抗体とトロンピンとの結合を測定する工程と、存在するトロンピンの量を測定する工程とを含む。

【0013】

本発明の一実施形態では、試料は、血液又は血液成分からなる群から選択される生物学的検体である。

【0014】

本発明の別の実施形態では、小分子は、天然起源のヒルジン、合成ヒルジン変異体、ヒルジン誘導体、組換えヒルジン変異体、模倣物、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。

【0015】

更なる実施形態では、トロンピンに特異的な抗体は、ポリクローナル抗体又はその断片である。

【0016】

本発明の更に別の実施形態では、抗体は、Phe-Pro-Arg-クロロメチルケトン (PPACK)、4-アミノフェニルピルビン酸 (APPA)、4-(2-アミノエチル)ベンゼンスルホニルフルオリド (AEBSF)、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるペプチドで、ブロックされた活性部位を有するトロンピンに対して産生される。

【0017】

本発明の更に別の実施形態では、イムノアッセイは、サンドイッチイムノアッセイ等の固相免疫測定法である。

【0018】

本発明の更に別の実施形態では、トロンピンの量の測定はトロンピンの標準曲線で行われる。

【0019】

本発明は、アンチトロンビンIII (AT-III) を含む試料中のトロンピンを定量化するキットも提供し、キットは、トロンピンに特異的なポリクローナル抗体又はその断片と、トロンピンの基質結合部位を認識する小分子とを含み、トロンピンに特異的な抗体は、ブロックした活性部位を有するトロンピンに対して産生される。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】緩衝液の試料中のトロンピンのレベルを測定するために開発したイムノアッセイの性能 (OD値) を示す。

【図2】次第に増加する濃度のトロンピンを添加した血漿試料中で得たOD値 ( ) と比較した、次第に増加する濃度のトロンピンを含む緩衝液の試料中の、トロンピンに特異的なイムノアッセイによって得られたOD値 ( ) を示す。

10

20

30

40

50

【図3】次第に増加する濃度のトロンピンを含む緩衝液の試料及びAT - IIIを含む試料( )、並びに、AT - IIIの非存在下で次第に増加する濃度のトロンピンを含む緩衝液の試料( )における、トロンピンに特異的なイムノアッセイによって得られたOD値を示す。

【図4】イムノアッセイによってトロンピンを検出することに関して、トロンピン試料にヒルジン及び血漿の混合物を加えることの効果を示す。

【図5】イムノアッセイによってトロンピンを検出することに関して、ヒルジン及びAT - IIIの混合物を加えることの効果を示す。

【図6】イムノアッセイによってトロンピンを検出することに関して、ヒルジン、AT - III及びヘパリンの混合物を加えることの効果を示す。

【図7】試料にヒルジンを加えることによって、トロンピンに特異的なイムノアッセイを用いて血漿試料中のトロンピンを検出するレベルの増加を示す。

【発明を実施するための形態】

【0021】

トロンピンに特異的なイムノアッセイによるトロンピンの検出は、血漿中に存在する物質の干渉によって損なわれることが本発明によって判明した。血漿中に検出した干渉は、少なくとも一部分は、AT - IIIが存在するためであり得ることも判明した。

【0022】

更に、本発明により、驚くべきことに、ヒルジンを含む試料にAT - IIIと共にトロンピンを加えることは、ヒルジンを欠く対照試料と比較して、試料中のトロンピンを検出するトロンピンに特異的なイムノアッセイの能力を増加させる結果となったことが判明した。これらの結果は、ヒルジンがアンチトロンピンIIIの存在下でトロンピンの検出を高めることを示している。

【0023】

トロンピン分子中のヒルジン及びAT - IIIの結合部位は異なること、及びAT - IIIとは対照的にヒルジンは小分子であることを考えると、これらの発見は驚くべきことである。トロンピン中のヒルジン結合部位は、トロンピンのフィブリノーゲン結合部位と重複する(Chang JY. The hirudin-binding site of human alpha-thrombin. Identification of lysyl residues which participate in the combining site of hirudin-thrombin complex. J Biol Chem. 1989 May 5; 264(13): 7141~6; Huntington JA. Molecular recognition mechanisms of thrombin. J Thromb Haemost. 2005 Aug; 3(8): 1861~72)のに対して、AT - III結合部位は、トロンピンの触媒部位と重複する(Griffith MJ. Kinetics of the heparin-enhanced antithrombin III/thrombin reaction. Evidence for a template model for the mechanism of action of heparin. J Biol Chem. 1982 Jul 10; 257(13): 7360~5; and Markwardtら、The influence of synthetic thrombin inhibitors on the thrombin-antithrombin reaction. Thrombosis research h. 1973 Vol. 2, 343~348)。

【0024】

トロンピンをAT - IIIと混合した後にヒルジンを加えることは、ヒルジンの不在下の対照と比較して、トロンピンの検出に増加をもたらすことも判明した。AT - IIIを含む血漿試料又は他の試料を検査するとき、ヒルジンはトロンピンに特異的なイムノアッセイで遭遇する干渉を減少させる。

【0025】

10

20

30

40

50

メカニズムに拘束されないで、トロンビン中の抗原群は、トロンビンのA T - I I Iとの結合によって隠される及び/又は変更されるように見え、またヒルジンを加えることは、A T - I I Iがイムノアッセイに及ぼす干渉を減少させ、その結果イムノアッセイによるトロンビンの検出を増加させるように見える。

【0026】

これらの発見は、A T - I I Iのレベルが高い条件下で、すなわち、血漿試料に見られる一般的な条件下で、トロンビンのレベルの測定を可能にするイムノアッセイ方法の開発への道を開く。

【0027】

本発明は、A T - I I Iの存在下で試料中のトロンビンを定量化するためのインビトロイムノアッセイを提供し、その方法は、試料をフィブリノーゲン結合部位等のトロンビン基質結合部位を認識する小分子と接触させる工程と、試料にトロンビンに特異的な抗体を加える工程と、抗体とトロンビンとの結合を測定する工程と、存在するトロンビンの量を測定する工程とを含む。

10

【0028】

用語「接触」は、小分子を試料と接触させる結合作用を指し、より具体的には、試料中に存在する小分子とトロンビンとの間で結合相互作用が発生するような方法で小分子をトロンビンと接触させる結合作用を指す。

【0029】

用語「小分子」は、例えば、400～50,000ダルトン、又は400～40,000ダルトン、又は400～8,000ダルトン、又は400～1000ダルトン、又は5,000～40,000ダルトン、又は1,000～8,000ダルトンの範囲等の400～100,000ダルトンの範囲の分子量を有する分子を指す。小分子は、類似の三次元構造を有するが非重複性配列を示すヒルジンの合成模倣物であり得る。ヒルジンの模倣物は、例えば、ランダムペプチドのファージディスプレイライブラリなどのスクリーニングによって識別することができる。スクリーニングは、トロンビン中の基質結合部位へのヒルジンの結合に対するペプチドの競合に依存することができる。本発明の一実施形態では、E L I S A サンドイッチアッセイが使用される。トロンビンの触媒部位に特異的なモノクローナル抗体を、E L I S A マイクロタイタープレートにコーティングするのに使用することができる。プレートにブロッキング溶液中のトロンビンを充填し、過剰なトロンビンを数回洗浄して除去する。次に、ブロッキング溶液中のヒルジンを充填し、過剰なヒルジンを洗い流す。次に、プレートに結合したヒルジン(100%結合のヒルジン)を、標識抗ヒルジンポリクローナル抗体を用いて検出する。ヒルジンのバウンディングは、標識ヒルジン、例えば、3H-ヒルジンを使用することで検出することができる。試験ウェル中に個々のペプチドがE L I S A に含まれ、特定のペプチドの存在によってプレートに結合するヒルジンの減少は、ペプチドが模倣ペプチドの可能性を示す。

20

30

【0030】

一実施形態では、トロンビン基質結合部位を認識する小分子は、トロンビンのフィブリノーゲンへの結合の少なくとも50%を阻害する。本発明の方法で使用する小分子は、ペプチド、合成化合物、天然起源のヒルジン、合成ヒルジン変異体、トロンビン基質結合部位への結合能力を保持するヒルジン誘導体及び/又は組換えヒルジン変異体であり得る。

40

【0031】

変異体は、天然起源のヒルジンに比べて、アミノ酸の置換、欠失、及び/又は付加を含むヒルジンポリペプチドを含む。典型的には、アミノ酸の置換、欠失、及び/又は付加は、トロンビン基質結合部位に結合するための変異体の能力を変えない。変異体は、非天然起源のアミノ酸残基も含み得る。

【0032】

誘導体は、グリコシル化変化、アシル化変化及び/又は他の化学変化を含み、例えば、ポリペプチドのアミノ酸配列に共有結合的に又は非共有結合的に結合するレポーター分子及び/又は他のリガンド等の非アミノ酸の置換基を含む。

50

## 【0033】

模倣物は、必ずしもヒルジンの構造を複製することなく、その三次元の立体構造を再現する能力を有する小分子を非常に多く含む。この模倣物がトロンピンを結合できるように、模倣物は、ヒルジンの完全な複製である必要はなく、またヒルジンの構造に十分に似ている近似であってもよい。

## 【0034】

本発明の一実施形態では、小分子は、試料中に存在するトロンピンを中和する量で被検試料に加える。本発明の別の実施形態では、試料中のヒルジンとトロンピンとの間のモル比は、0.64以上、例えば、0.67、1.27、2.55、5.10、10.20、12.76、20.41、25.52、40.82、51.05、81.63、102.56、205.13、410.26、816.36、及び1632.65、又はそれ以上のモル比である。

10

## 【0035】

一実施形態では、トロンピンは試料中に約1単位で存在すると思われ、ヒルジンは、約0.64アンチトロンピン単位又はそれ以上加える。

## 【0036】

しばしば、用語「中和する」と「阻害する」とは交換可能である。

## 【0037】

用語「トロンピン基質結合部位を認識する分子」は、トロンピン基質結合部位に対してアフィニティーを有する分子を指す。本発明の一実施形態では、トロンピン基質結合部位はエキソサイトIにある。本発明の別の実施形態では、結合の1つの重要な要素は、フィブリノーゲンの場合と同じくトロンピンの活性部位から離れた20の周りに位置するTyr76である(Thierry Rose and Enrico Di Cera, Three-dimensional Modeling of Thrombin-Fibrinogen Interaction, JBC 2001 Vol 277 N21, 18875~18880)。

20

## 【0038】

本発明のイムノアッセイは、任意の試料、例えば、血液等の生物学的検体、血漿等の血液成分及び他の血液由来の部分、トロンピン及びアンチトロンピンIIIを含む他の体液等で行うことができる。

30

## 【0039】

本発明によって使用されるトロンピンに特異的な抗体は、活性部位がブロックされたトロンピンに対して産生される。用語「ブロックされた活性部位を有するトロンピン」は、活性部位に結合したペプチドを有するトロンピンを指す。本発明の一実施形態では、トロンピンの活性部位は、P4~P2'のクレフトに存在する(Huntington J A. Molecular recognition mechanisms of thrombin. J Thromb Haemost. 2005 Aug; 3(8): 1861~72の図2に示される)。ペプチド(本明細書で「ブロックングペプチド」と呼ばれる)は、例えば、約400~1000ダルトンの範囲で三アミノ酸ペプチド誘導体、Phe-Pro-Arg-クロロメチルケトン(PPACK)、4-アミノフェニルビルビン酸(APPA)又は4-(2-アミノエチル)ベンゼンスルホニルフルオライド(AESF)であり得る。用語「活性部位」は、用語「触媒部位」と交換可能である。

40

## 【0040】

トロンピンに特異的な抗体は、トロンピンに結合特異性を示す及び/又はトロンピン結合が可能であるのであれば、モノクローナル抗体、単鎖、Fab免疫グロブリン発現ライブラリの生成物を含むFab断片、ポリクローナル抗体又はその断片であり得る。

## 【0041】

用語「ポリクローナル抗体」は、異種性抗体の集団を指す。これは、トロンピン内で異なるエピトープに特異的な抗原結合機能を有する抗体を含んでもよい。ポリクローナル抗体は、例えば、ウサギ、ヤギ、ロバ、及びヒツジ等の哺乳類種の動物をヒトトロンピンで

50

免疫することにより生成されてもよい。免疫に使用されるトロンピンは、精製ヒトプロトロンピンから調製することができる。免疫の経路は、皮内、腹腔内、皮下、筋肉内、頭蓋内、及び/又は静脈内が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0042】

用語「モノクローナル抗体」は、抗体産生細胞の単クローン、例えば、ハイブリドーマ細胞の単クローンから作製される抗体医薬を指す。典型的には、モノクローナル抗体はハイブリドーマ技術によって作製される。用語「ハイブリドーマ」は、所望する抗体を大量に作製する、例えば、モノクローナル抗体を作製するために操作された細胞を指す。モノクローナル抗体を作製するには、トロンピンで免疫した動物（例えば、任意の哺乳類種）の脾臓からB細胞を除去することができる。免疫に使用されるトロンピンは、精製ヒトプロトロンピンから調製することができる。免疫の経路は、皮内、腹腔内、皮下、筋肉内、頭蓋内、及び/又は静脈内が挙げられるが、これらに限定されない。次に、B細胞は、培養中に不確定に増殖することができる骨髓腫瘍細胞と融合されることができる。この融合は、細胞膜をより透過性により行なうことができる。融合細胞は癌細胞であるので、急速かつ不確定に増殖させることができ、所望する抗体を大量に作製することができる。作製された抗体は、トロンピンに対する特異性及びアフィニティーを検査することができる。モノクローナル抗体を調製する方法、及び特異性を判定する方法は、当技術分野では公知である（例えば、Shivanand Pandey, 「HYBRIDOMA TECHNOLOGY FOR PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES」 International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 2010; Volume 1, Issue 2: 88~94を参照されたい）。

10

20

#### 【0043】

ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体の作製及び精製は、当技術分野では周知である（Immunoassay, Eds. Eleftherios P Diamandis and Theodore K. Christopoulos, Academic Press 1996, Chapter 5）。トロンピンに特異的な抗体は組換え可能である（Immunoassay, Eds. Eleftherios P Diamandis and Theodore K. Christopoulos, Academic Press 1996, Chapter 6）。

30

#### 【0044】

検出するために抗体を標識することは、当技術分野では周知である（Immunoassay, Eds. Eleftherios P Diamandis and Theodore K. Christopoulos, Academic Press 1996, Chapter 8）。

#### 【0045】

「抗体を検出する」及び「標識抗体/抗体を標識する」は、発見されることが可能な抗体を指す。抗体を検出することは、検出可能なシグナルに又はシグナルを発生する部分に、直接的に、又は間接的に（例えば、別の抗体を通して）結合させてもよい。シグナルは、放射性（例えば、放射性ヨード、トリチウム、炭素、硫黄等）で比色定量することによる蛍光シグナル等であり得る。シグナルを発生する基質に作用するシグナルを発生する部分としては、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）[好適な基質としては、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン（TMB）；OPD；2, 2'-アジノビス（3-エチルベンゾチアゾリン）-6-スルホン酸ニアンモニウム塩が挙げられる]；アルカリホスファターゼ[好適な基質としては、リン酸p-ニトロフェニルニナトリウム塩が挙げられる]；及び -ガラクトシダーゼ[好適な基質としては、O-ニトロフェニル-D-ガラクトピラノシドが挙げられる]が挙げられるが、これらに限定されない。シグナルは、アビジン-ビオチン結合システムを利用して増幅されてもよい。

40

#### 【0046】

抗原の抗原決定基と特異的抗体の抗原結合部分との間の結合相互作用に依存する異なる

50

タイプのイムノアッセイは、当該技術分野において周知であり (Immunoassay, Eds. Eleftherios P Diamandis and Theodore K. Christopoulos, Academic Press 1996, Chapter 8~19)、例えば、固相免疫測定法、例えば、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA)、例えば、二部位 (抗原を固定化抗体と標識抗体との間にサンドイッチする、サンドイッチタイプ) イムノアッセイ、アビジン - ビオチンイムノアッセイシステム、ウエスタンブロット、免疫沈殿、ラジオイムノアッセイ (RIA)、酵素イムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ (蛍光 (fluorescent) マーカーが抗体と抱合する、例えば、フルオレスセイン、ローダミン等)、免疫沈殿、化学発光イムノアッセイ (化学構造修飾上の光を取り除く有機分子が使用される、例えば、イソルミノール、ピロガロール、ルシフェリン、ルミノール等)、生物発光イムノアッセイ、免疫プロッティング技術等がある。「抗原決定基」は、抗体によって認識される抗原中の領域を指す。

10

**【0047】**

抗体をポリスチレン製マイクロタイターウェルに結合させる (コーティングさせる) ために、以下の実施例に明記するように、抗原に特異的な抗体を pH 9~9.6 の炭酸緩衝液で希釈することができる。共有結合が報告されている (Immunoassay, Eds. Eleftherios P Diamandis and Theodore K. Christopoulos, Academic Press 1996, Chapter 24)。コーティング工程は、ブロッキング溶液、例えば、BSA の存在下で、抗原に特異的な抗体をウェル中でインキュベートすることによって通常行なわれる。第2の抗体は、コーティングする抗体に結合する抗原を検出するために使用することができる。第2の抗体を標識することができる。次に、充当した抗原 (例えば、トロンビン) の標準物質は、検量線用に作成することができる (Immunoassay, Eds. Eleftherios P Diamandis and Theodore K. Christopoulos, Academic Press 1996, Chapter 24)。用語「コーティング抗体」、「捕獲抗体」、及び「固定化抗体」は、固形支持体の表面に存在する抗体を通常指す。コーティング抗体は、抗原を結合する部分が試料に存在する抗原と接触可能であるように方向付けることができる。検出が間接的である場合 (例えば、第2の抗体を通して行われる)、第2の検出抗体は、捕獲抗体を生成するために使用される種とは異なる種で生成することができる。

20

30

**【0048】**

用語「トロンビン量の測定」は、定性測定又は定量測定を指す。

**【0049】**

ELISA は、定性的又は定量的であり得る。定性的結果は、被検試料内のトロンビンの存在に対して、単純な陽性又は陰性の結果を提供する。2~3回の標準偏差 (検査に固有の誤差) は、陽性の試料を陰性の試料と区別するために典型的には使用される。定量的 ELISA では、試料の光学濃度 (OD) を、典型的には既知量の精製トロンビンの段階希釈である標準曲線と比較する。本発明の一実施形態では、トロンビンの異なる既知濃度を以下のように調製する。43.9 µg/mL の濃度のトロンビン標準溶液を、ブロッキング緩衝液 (1% I-Block を含有する 0.05% Tween-20 を含む PBS) で 6.27 µg/mL (6270 ng/mL) の濃度に希釈する。次に、前回希釈した溶液から 100 µL をブロッキング緩衝液 100 µL が入ったチューブに移すことで、希釈したトロンビン標準溶液を段階的に2倍希釈 (7回) する。6270 ng/mL から 49 ng/mL まで希釈した8種類の希釈液を調製する。次に、上述のトロンビン希釈液をそれぞれ、ブロッキング緩衝液で更に希釈し (1:10)、トロンビンの最終濃度 4.9 ng/mL、9.8 ng/mL、19.5 ng/mL、39.78 ng/mL、156.7 ng/mL、313.5 ng/mL、及び 627 ng/mL を得た。次の工程で、最終のトロンビン溶液をそれぞれ 100 µL、あらかじめコーティングしたマイクロELISA プレートに移し、小分子を加えることなく以下に詳細説明するように免疫測定を行なう。免疫測定は自動化することができる (Immunoassay, Eds. Elef

40

50

herios P Diamandis and Theodore K. Christopoulos, Academic Press 1996, Chapter 21)。

【0050】

本発明の一実施形態では、固相免疫測定法が行われる。チューブ、ビーズ、磁性微粒子材料、プラスチックビーズ、プラスチック支持体、カラム、小シート、及びアッセイプレート、例えば、マイクロタイターウェル等の様々な固相を使用することができる。

【0051】

本発明の一実施形態では、下記の開発した二部位（サンドイッチタイプ）のイムノアッセイを使用して、被検試料中のトロニンを検出する。第1の工程で、トロニン基質結合部位を認識する小分子を被検試料に加える。小分子は、少なくとも1NIH単位のトロニンを中和する最終濃度、例えば、20NIH単位のトロニンを中和する量で加えるヒルジンであり得る。トロニンを含む試料を、約15分間小分子と一緒にインキュベートすることができる。次に、小分子を含む試料をピペットでとり、過剰量のトロニンに特異的なポリクローナル抗体（「捕獲抗体」）であらかじめコーティングした固相にインキュベートする。このインキュベート中に、試料中のトロニンが捕獲抗体と結合し（binds to）、次に他の試料成分すべてを洗い流す。次に、過剰量のトロニンに特異的な標識ポリクローナル抗体を加える。インキュベーション後に、過剰量の標識抗体を洗い流し、結合した標識抗体のシグナルを測定する（例えば、光学濃度[OD]を測定することによる）。上述の既知量の精製トロニンを用いて作成したトロニン標準曲線と比較及び外挿することで、トロニンのレベルの定量化/測定を行うことができる。このイムノアッセイの実施形態では、トロニンに特異的な同じポリクローナル抗体が、捕獲抗体及び標識抗体として役立つ。

【0052】

別の実施形態では、モノクローナル抗体が、捕獲抗体として、及び標識抗体として使用される。そのような実施形態では、捕獲抗体及び標識抗体は異なり、互いの結合を妨害しないように、トロニン上の個別のエピトープを認識しなければならない。一実施形態では、トロニンに特異的なモノクローナル抗体は、基質結合部位に向けられない。

【0053】

例示的なELISAでは、トロニンに特異的な捕獲抗体、例えば、ポリクローナル抗体は、マイクロタイターウェルに過剰にあらかじめコーティングされる。より具体的には、抗体溶液（例えば、2mg/mLの濃度のタンパク質）をコーティング緩衝液（50mM炭酸緩衝液；pH=9.6）で1:200~1:100の範囲、例えば、1:500に希釈し、希釈した抗体100μLを各ウェルに加える。マイクロタイタープレートを2~8で一晩インキュベートする。次に、コーティング溶液を捨て、マイクロタイタープレートを洗浄緩衝液（0.05% Tween-20を含むPBS）200μL/ウェルで3回洗浄する。続いて、200μLのブロッキング緩衝液（1% I-Blockを含む洗浄緩衝液）を各ウェルに加え、マイクロタイタープレートを37で1時間インキュベートする。インキュベート終了時に、ブロッキング緩衝液を取り除く。被検試料、例えば、生体液等をそれぞれ、トロニンの基質結合部位を認識する小分子と接触させる。試料は、小分子と一緒に約15分間インキュベートすることができる。被検試料は、ブロッキング緩衝液で1:5に希釈することができ、次に、希釈した各試料100μLをあらかじめコーティングしたウェルに加える。次に、プレートを37で1時間インキュベートする。インキュベート期間後に試料溶液を捨て、ウェルを洗浄緩衝液で洗浄する。次に、ブロッキング緩衝液で1:200~1:100の範囲、例えば、1:500に希釈した、トロニンを検出するHRP抱合ポリクローナル抗体を含む100μLの溶液（例えば、2mg/mLの濃度のタンパク質を有するストック溶液から）を、各ウェルに加える。プレートを37で1時間インキュベートし、上述のように洗浄緩衝液で洗浄し、ELISA（HRP基質）用の3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン（TMB）液体基質システム100μLを各ウェルに加える。プレートを室温で約60分間（強い青色が高濃度のトロニンを含むウェルで観察されるまで）インキュベートする。100μLの停止液

10

20

30

40

50

(1 Mの塩酸)を各ウェルに加えて反応を止める。プレートにOD<sub>450nm</sub>で読み取り、試料中のトロンビンの正確な濃度を、上述したようにトロンビンの既知濃度から作成したトロンビン標準曲線と比較することによって、外挿することができる。典型的には、トロンビンの標準曲線の線形範囲を使用して、被検試料中のトロンビンの正確な濃度を計算する。

#### 【0054】

本発明の一実施形態では、捕獲抗体は、抗ヒトトロンビンヒツジポリクローナル抗体(例えば、Affinity Biologicals製の抗体;カタログ番号SAHT-AP)である。本発明の別の実施形態では、ポリクローナル抗体を産生させるために使用する免疫原は、活性部位がPPACKでブロックされた精製ヒトプロトロンビンから調製したトロンビンである。本発明の別の更なる実施形態では、検出する抗体は、HRP抱合ヒツジ抗ヒトトロンビン抗体(例えば、Affinity Biologicals製の抗体;カタログ番号SAHT-HRP)である。

10

#### 【0055】

本発明の別の実施形態では、間接ELISAアッセイを使用する。例示的な間接ELISAでは、被検試料を、トロンビンの基質結合部位、例えば、フィブリノーゲン結合部位を認識する小分子と接触させ、次に、固相、例えば、マイクロタイタープレートのウェルに加え、そこでプラスチックに、例えば、電荷相互作用を通して、付着する時間を与える。次に、非反応タンパク質の溶液、例えば、ウシ血清アルブミン又はカゼインを加え、被検試料内に存在する抗原によってコーティングされない状態を保持するウェル中の任意のプラスチック表面をブロックする。次の工程で、トロンビンの特異的に結合する一次抗体を各ウェルに加える。その後、一次抗体を結合する二次抗体を各ウェルに加える。二次抗体は付着した酵素を有し、それは抗体の結合特性に無視できる効果を有する。次に、この酵素用の基質を加える。この基質は、酵素と反応すると色が変わる。色の変化は、二次抗体が一次抗体と結合したことを示す。典型的には、非結合の抗体が取り除かれるように、一次抗体及び二次抗体を加えた後プレートを洗浄する。別の実施形態では、酵素に連結した1つの抗体が、試料内のトロンビンの有無を検出するために使用される。分光計を使用して、色の強度に対して定量値を与える。検出可能なシグナルは、放射性(例えば、放射性ヨード、トリチウム、炭素、硫黄等)で比色定量することによる蛍光シグナル等であり得る。

20

30

#### 【0056】

本発明は、アンチトロンビンIII(AT-III)を含む試料中のトロンビンを定量化するキットを提供する。キットは、トロンビンに特異的なポリクローナル抗体と、トロンビンの基質結合部位を認識する小分子の構成要素と、を含み、トロンビンに特異的な抗体は、ブロックされた活性部位を有するトロンビンに対して産生される。キットは、取扱説明書、及び/又は標準曲線作成用の精製トロンビンを含み得る。キットの構成要素は、粉末、溶液及び/又はそれらの組み合わせとして提供され得る。溶液は冷凍形態で提供され得る。以上又は以下に引用する出願、特許、及び刊行物の開示は、参考として本明細書に組み込まれる。

#### 【0057】

以下の実施例は例示であり、限定するものではない。

40

#### 【実施例】

#### 【0058】

材料及び方法

イムノアッセイ手順:

1. マイクロELISAプレートを捕獲抗体でコーティングする。

マイクロELISAプレート(96ウェル; Costar; カタログ番号9018)を抗ヒトトロンビンヒツジポリクローナル抗体(Affinity Biologicals; カタログ番号SAHT-AP; ポリクローナル抗体産生に使用した免疫原は活性部位がPPACKでブロックされた精製ヒトプロトロンビンから調製したトロンビンであった

50

)でコーティングした。以下の手順でコーティングを行った。抗体をコーティング緩衝液(50 mM炭酸緩衝液; pH = 9.6; Sigma; カタログ番号C-3041)で1:500に希釈し、希釈した抗体100 µLを各ウェルに加えた。次に、マイクロELISAプレートを2~8で一晚(約16時間)インキュベートした。次に、コーティング溶液を捨て、ウェルを洗浄緩衝液[0.05% Tween-20 (Sigma; カタログ番号P-1379)を含むPBS (Biological Industries; カタログ番号02-023-SA)]200 µL/ウェルで3回洗浄した。続いて、ブロッキング緩衝液[1% I-Block (Tropix; カタログ番号AI300)を含む洗浄緩衝液]200 µLを各ウェルに加え、ELISAプレートを37で1時間インキュベートした。被検試料を加える前にブロッキング緩衝液を取り除いた。

10

#### 【0059】

2. 被検試料及び標識結合抗体をあらかじめコーティングしたウェルに加え、標識結合抗体のシグナルを測定する。

被検試料をブロッキング緩衝液で1:5に希釈し、希釈した各試料100 µLをあらかじめコーティングしたマイクロELISAプレートに加えた。次に、プレートを37で1時間インキュベートした。インキュベーション期間後に試料溶液を捨て、ウェルを上述の洗浄緩衝液200 µL/ウェルで3回洗浄し、HRP抱合アンチトロニン抗体(Affinity Biologicals; カタログ番号SAHT-HRP; ブロッキング緩衝液で1:500に希釈; 「標識抗体」)100 µLを各ウェルに加えた。未処置のブタ血漿を陰性対照として用いた。ブロッキング緩衝液中の既知濃度のトロニン(4.9~627 ng/mL)を陽性対照として用いた。陰性対照群及び陽性対照群のOD結果は下記の結果に示されない。プレートを37で1時間インキュベートし、上述の洗浄緩衝液200 µL/ウェルで3回洗浄し、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン(TMB-HRP基質; Sigma, カタログ番号T-0440)100 µLを各ウェルに加えた。プレートを室温(約22±3)で約60分間(強い青色が最高濃度のトロニンを含むウェルで観察されるまで)インキュベートした。100 µLの停止液(1Mの塩酸; Riedel de Haen; カタログ番号30721)を各ウェルに加えて反応を止めた。プレートをOD<sub>450nm</sub>で読み取った。得られたOD値の上昇は、試料中のトロニンのより高い濃度を示す。試料中のトロニンの正確な濃度を、既知量の精製トロニンを用いて作成したトロニンの標準曲線と比較することによって外挿する。トロニンの標準曲線の線形範囲を使用して、試料中の正確なトロニンの濃度を計算する。

20

30

#### 【0060】

以下の実施例で使用する異なる濃度のトロニンの調製

異なる濃度のトロニンを調製するために、Omrix社内標準(43.9 µg/mL)を使用した。異なる濃度を得るために、そのトロニン標準をブロッキング緩衝液(上記の成分を参照のこと)で6.27 µg/mL(6270 ng/mL)の濃度に希釈した。次に、前回希釈した溶液から100 µLをブロッキング緩衝液100 µLが入ったチューブに移すことで、希釈したトロニン標準溶液を段階的に2倍希釈(7回)した。6270 ng/mLから49 ng/mLまで希釈した8種類の希釈液を調製した。次に、上述のトロニン希釈液をそれぞれ、更に希釈し(1:10)、被検試料にした。

40

#### 【0061】

実施例1 - 試料中のトロニンを検出するサンドイッチELISA

被検試料中のトロニンを検出するために、二部位(サンドイッチタイプ)のイムノアッセイを開発した。手短に、トロニンを含む試料を、過剰量のアンチトロニンポリクローナル抗体(「捕獲抗体」)であらかじめコーティングした固相にピペットで移し、「材料及び方法」の項で説明したようにインキュベートした。このインキュベーション中に、試料中のトロニンは捕獲抗体と結合し(bounds to)、次に他の試料成分すべてを洗い流した。次に、過剰量の標識アンチトロニン抗体を加えた。インキュベーション後に、過剰量の標識抗体を洗い流した。このイムノアッセイでは、同じポリクローナル抗体を捕獲抗体及び検出/標識抗体として用いた。ポリクローナル抗体は、アフィニティー精製したIg

50

Gヒッジ抗ヒトトロンビンであった。抗体は、活性部位/触媒部位がPPACKでブロックされた精製ヒトトロンビン(精製したプロトロンビンから調製)を免疫原として用いて産生した。PPACKは、トロンビンの触媒部位に結合するペプチドである。

【0062】

この実験では、上記の開発したイムノアッセイが試料中のトロンビンのレベルを検出する能力を調べた。このために、次第に増加する濃度のトロンビンを含むブロッキング緩衝液の試料を調製し(上述したように、試料中のトロンビンの最終濃度は、約4.9 ng/mL、約9.8 ng/mL、約19.5 ng/mL、約39 ng/mL、約78 ng/mL、約156.7 ng/mL、約313.5 ng/mL、及び約627 ng/mLに調製した)、上項の「材料及び方法」の項で詳細に説明したようにイムノアッセイを行った。標識結合抗体のシグナルが各試料で検出され、結果を図1に示す。

10

【0063】

結合抗体のシグナルは、正確な濃度のトロンビンを含む緩衝液の試料中のトロンビンの濃度に直接関係することが判明した。最も低い5種類の希釈液は線形範囲内であった。

【0064】

したがって、このイムノアッセイは、(既知量の精製トロンビンを用いて作成したトロンビンの標準曲線と比較することで)トロンビンを含む緩衝液の被検試料中のトロンビンのレベルを測定するために使用することができるツールであると結論付けられた。

【0065】

実施例2- トロンビンに特異的なイムノアッセイによるトロンビンの検出への血漿中に存在する物質の干渉

20

先の実験は、前述のイムノアッセイがトロンビンを含む緩衝液の試料中のトロンビンを検出する能力を示している。この実験では、上記の開発したイムノアッセイが、次第に増加する濃度のトロンビン(実施例1と同じ)を添加したブタ血漿試料(Institute of animal research (Kibutz Lahav Israel)から入手)中のトロンビンを検出する能力を調べた。同等の濃度のトロンビンを含むブロッキング緩衝液を、基準として用いた。上記のようにイムノアッセイを行い、両群[すなわち、群1- トロンビンを添加した血漿試料( )、及び群2- トロンビンを含む緩衝液の試料( )]のOD値を図2に示す。

【0066】

30

血漿中のトロンビンに対して得られたOD結果は、同じ濃度のトロンビンでブロッキング緩衝液中のトロンビンに対して得られたOD結果よりはるかに低いことが分かる。したがって、イムノアッセイは、血漿中に存在する物質の干渉によって損なわれることが判明した。

【0067】

実施例3- トロンビンに特異的なイムノアッセイによるトロンビンの検出へのAT-IIIの干渉

実施例2は、トロンビンに特異的なイムノアッセイに干渉する物質が血漿中にあることを示している。ヒト血漿中のAT-IIIの正常濃度は高く、およそ0.12 mg/mLである。血漿中に存在するAT-IIIがイムノアッセイに干渉する因子であるかどうかを調べるために、次の実験を行った。

40

【0068】

このために、AT-IIIを含む試料(American diagnostica; カタログ番号433; ブロッキング緩衝液で最終濃度1 IU/mLに希釈)、又はAT-IIIを含まない試料(上述のブロッキング緩衝液溶液)を調製した。次に、異なる濃度のトロンビンをこれらの試料に加えた(上述したように、最終濃度4.9、9.8、及び19.5 ng/mLに調製した)。試料中のトロンビンを検出するために、上述したようにイムノアッセイを行った。

【0069】

AT-IIIの存在下で得られたOD結果は、AT-IIIの非存在下で得られたOD

50

結果よりはるかに低いことが分かる（図3）。

【0070】

AT - IIIは、トロンビン免疫アッセイに干渉を引き起こすことが判明した。したがって血漿中に検出される干渉（実施例2）は、少なくとも一部は、AT - IIIの存在のためであり得ることを示している。

【0071】

実施例4 - 血漿中のトロンビンを検出するための免疫アッセイにおいてヒルジンを加えることの有益な効果

ヒルジンはヒル類に自然に生じる65アミノ酸の小さなペプチドであり、抗凝血性の特性を有する。ヒルジンはトロンビン中のフィブリノーゲン結合部位（基質結合部位）に結合し、一方でAT - IIIはトロンビン中の触媒部位 / 活性部位に結合する。次の実験の組で、トロンビンに特異的な免疫アッセイにおいてAT - III干渉にヒルジンを加えることの効果を調べた。

【0072】

このために、AT - IIIを含む異なる溶液 [ 以下の溶液1、4、及び7を参照 ] を調製し、異なる濃度のヒルジンを、異なる溶液に混合した（以下の群2、3、5、6、8及び9を参照）。次に、異なる濃度のトロンビンを混合液に加え、免疫アッセイを行った。

【0073】

溶液1~9の調製：

1. AT - III ( American Diagnostica ; カタログ番号433 ) をブロッキング緩衝液で希釈する、最終濃度1 IU / mL。
2. 溶液1 + ヒルジン ( Sigma ; カタログ番号94581 )、最終濃度1 U / mL ( 1 U のヒルジンは1 ATU ( アンチトロンビン単位 [ ATU ] ; 1 ATU は1 NIH単位のトロンビンを中和するインヒビターの量として定義する ) に相当 ) 。
3. 溶液1 + ヒルジンのみ加える、最終濃度5 U / mL。
4. 溶液1 + ヘパリン ( Pharmacia )、最終濃度10 IU / mL。ヘパリンは、AT - IIIによってトロンビンの不活性化を増加させる。
5. 溶液4 + ヒルジン、最終濃度1 U / mL。
6. 溶液4 + ヒルジン、最終濃度5 U / mL。
7. ブタ血漿。
8. 7 + ヒルジン、最終濃度1 U / mL。
9. 7 + ヒルジン、最終濃度5 U / mL。

【0074】

次に、上述した（「材料及び方法」の項を参照）方法で、最終濃度4.9 ng / mL、9.8 ng / mL、19.5 ng / mL、39 ng / mL、78 ng / mL、156.7 ng / mL、313.5 ng / mL、及び627 ng / mLでトロンビンを各溶液（1~9）に加えた。この実験では、トロンビンを、AT - IIIと共にヒルジンを含む溶液2、3、5、6、8及び9に加えた。

【0075】

調製した試料（異なる濃度のトロンビンで混合した溶液1~9）を希釈し、あらかじめコーティングしたELISAプレートにピペットで移し、「材料及び方法」の項に明記したようにODレベルを測定した。

【0076】

トロンビンを含む異なる試料のOD値を図4、5及び6に示す。図4では、試料はブタ血漿である（試料は溶液7~9で調製した）。図5では、試料はAT - IIIを含む溶液である（試料は溶液1~3で調製した）。図6では、試料はAT - III及びヘパリンを含む溶液である（試料は溶液4~6で調製した）。

【0077】

ヒルジンを加えることは、用量依存的様式で、トロンビンに特異的な免疫アッセイに

10

20

30

40

50

おけるAT - IIIの干渉を減少させることが観察された。

【0078】

これらの結果は、AT - IIIを含む試料において、トロンビンに特異的なイムノアッセイによるトロンビンの検出を向上させるためには、トロンビンの基質結合部位に結合可能な小分子のヒルジンを被検試料に加えることが有益であることを示している。

【0079】

実施例5 - 血漿中のトロンビンを検出するためのトロンビンに特異的なイムノアッセイにおいてヒルジンを加えることの有益な効果

上記の実験の結果は、AT - IIIを含む試料にヒルジンを加えることは、特異的なイムノアッセイにおいてトロンビンの検出を向上させることを示している。上記の実験では、AT - IIIと共にヒルジンを含む試料にトロンビンを加えた。しかしながら、被検血漿試料は既にトロンビンを含み、ほとんどのトロンビンはアンチトロンビンIIIに付着している。そのような場合、ヒルジンはトロンビン - AT - IIIの複合体に作用する必要がある。次の実験は、既にトロンビン及びAT - IIIを含む血漿試料中のトロンビンを検出するためのイムノアッセイにおいて、ヒルジンの有益な効果を検討する。

【0080】

次の実験の組では、様々な濃度のトロンビンをブタ血漿の試料に添加した（最終濃度4.9 ng/mL ~ 627 ng/mL；「材料及び方法」の項の試料の調製を参照）。3つの群の試料を調製した。次の工程で、ヒルジンを群のうち2つに、最終濃度1 U/mL（ ）又は20 U/mL（ ）で加えた。第3の群にはヒルジンを加えず、この群を対照（ ）として用いた。トロンビンが上述のELISAアッセイによって異なる群で検出された。この実験では、5 U/mLのヒルジンを補充した非添加のブタ血漿を陰性対照として用いた（陰性対照の結果は示さず）。結果を図7に示す。

【0081】

試料に加えたヒルジンと試料中に存在するトロンビンとの間のモル比を下表1に示す。

【表1】

表1：被検試料中のヒルジンとトロンビンとの間のモル比

| 試料中のトロンビンの濃度 (ng/mL) | 試料中のトロンビンの単位* (U/mL) | ヒルジン:トロンビンモル比<br>1ATU/mLのヒルジンを加えたとき | ヒルジン:トロンビンモル比<br>20ATU/mLのヒルジンを加えたとき |
|----------------------|----------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 4.9                  | 0.01225              | 81.63                               | 1632.65                              |
| 9.8                  | 0.0245               | 40.82                               | 816.33                               |
| 19.6                 | 0.049                | 20.41                               | 410.26                               |
| 39.2                 | 0.098                | 10.20                               | 205.13                               |
| 78.4                 | 0.196                | 5.10                                | 102.56                               |
| 156.8                | 0.392                | 2.55                                | 51.05                                |
| 313.6                | 0.784                | 1.27                                | 25.52                                |
| 627.2                | 1.568                | 0.64                                | 12.76                                |

\* 1トロンビンUは約400 ng/mLトロンビンに相当する。

【0082】

トロンビンを添加した血漿の試料にヒルジンを加えることは、イムノアッセイでトロンビンを検出する能力にヒルジンの濃度に依存した増加が生じることが判明した。結果は更に、ヒルジンとトロンビンとの間のモル比が0.637755以上のとき、イムノアッセイの、トロンビンを検出する能力の増加が観察されたことを示している。

【0083】

〔実施の態様〕

(1) アンチトロンビンIII(AT-III)の存在下で試料中のトロンピンを定量化するためのインビトロイムノアッセイであって、前記試料をトロンピンの基質結合部位を認識する小分子と接触させる工程と、前記試料にトロンピンに特異的な抗体を加える工程であって、前記トロンピンに特異的な抗体は、ブロックされた活性部位を有するトロンピンに対して産生される、工程と、前記抗体の前記トロンピンとの結合を測定する工程と、存在するトロンピンの量を測定する工程と、を含む、イムノアッセイ。

(2) 前記試料は、血液又は血液成分からなる群から選択される生物学的検体である、実施態様1に記載のイムノアッセイ。

(3) 前記小分子は、天然起源のヒルジン、合成ヒルジン変異体、ヒルジン誘導体、組換えヒルジン変異体、模倣物、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、実施態様1又は2に記載のイムノアッセイ。

(4) 前記トロンピンに特異的な抗体は、ポリクローナル抗体又はその断片である、実施態様1～3のいずれかに記載のイムノアッセイ。

(5) 前記抗体は、Phe-Pro-Arg-クロロメチルケトン(PPACK)、4-アミノフェニルピルビン酸(APPA)、4-(2-アミノエチル)ベンゼンスルホニルフルオリド(AESF)、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるペプチドで、ブロックされた活性部位を有するトロンピンに対して産生される、実施態様1～4のいずれかに記載のイムノアッセイ。

#### 【0084】

(6) 前記イムノアッセイは、固相免疫測定法である、実施態様1～5のいずれかに記載のイムノアッセイ。

(7) 前記固相免疫測定法は、サンドイッチイムノアッセイである、実施態様6に記載のイムノアッセイ。

(8) 前記トロンピンの量の測定は、トロンピンの標準曲線で行われる、実施態様1～7のいずれかに記載のイムノアッセイ。

(9) アンチトロンビンIII(AT-III)を含む試料中のトロンピンを定量化するキットであって、トロンピンに特異的なポリクローナル抗体又はその断片と、トロンピンの基質結合部位を認識する小分子とを含み、前記トロンピンに特異的な抗体は、ブロックされた活性部位を有するトロンピンに対して産生される、キット。

(10) 前記小分子は、天然起源のヒルジン、合成ヒルジン変異体、ヒルジン誘導体、組換えヒルジン変異体、模倣物、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、実施態様9に記載のキット。

#### 【0085】

(11) 前記抗体は、Phe-Pro-Arg-クロロメチルケトン(PPACK)、4-アミノフェニルピルビン酸(APPA)、4-(2-アミノエチル)ベンゼンスルホニルフルオリド(AESF)、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるペプチドで、ブロックされた活性部位を有するトロンピンに対して産生される、実施態様9又は10に記載のキット。

(12) 前記キットは、イムノアッセイキットである、実施態様9～11のいずれかに記載のキット。

(13) 精製トロンピンを更に含む、実施態様9～12のいずれかに記載のキット。

(14) アンチトロンビンIII(AT-III)とトロンピンとを含む試料中のトロンピンを定量化するためのインビトロイムノアッセイであって、前記試料をトロンピンの基質結合部位を認識する小分子と接触させる工程と、前記トロンピンを活性部位がブロックされたトロンピンに対して産生されるトロンピンに特異的な抗体と接触させる工程と、結合した抗体のレベルを測定する工程と、を含む、イムノアッセイ。

(15) 前記試料は、血液又は血液成分からなる群から選択される生物学的検体である、実施態様14に記載のイムノアッセイ。

#### 【0086】

(16) 前記小分子は、天然起源のヒルジン、合成ヒルジン変異体、ヒルジン誘導体、

10

20

30

40

50

組換えヒルジン変異体、模倣物、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、実施態様 14 又は 15 に記載のイムノアッセイ。

(17) 前記トロンビンに特異的な抗体は、ポリクローナル抗体又はその断片である、実施態様 14 ~ 16 のいずれかに記載のイムノアッセイ。

(18) 前記抗体は、Phe-Pro-Arg-クロロメチルケトン (PPACK)、4-アミノフェニルピルビン酸 (APPA)、4-(2-アミノエチル)ベンゼンスルホンフルオライド (AEBSF)、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるペプチドで、ブロックされた活性部位を有するトロンビンに対して産生される、実施態様 14 ~ 17 のいずれかに記載のイムノアッセイ。

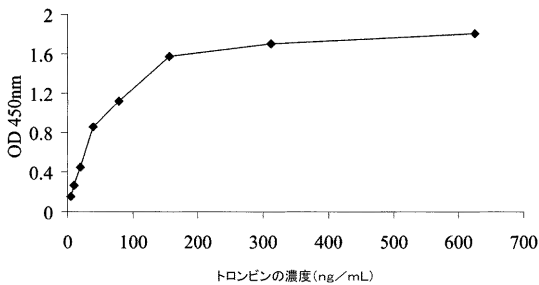
(19) 前記イムノアッセイは、固相免疫測定法である、実施態様 14 ~ 18 のいずれかに記載のイムノアッセイ。

(20) 前記固相免疫測定法は、サンドイッチイムノアッセイである、実施態様 19 に記載のイムノアッセイ。

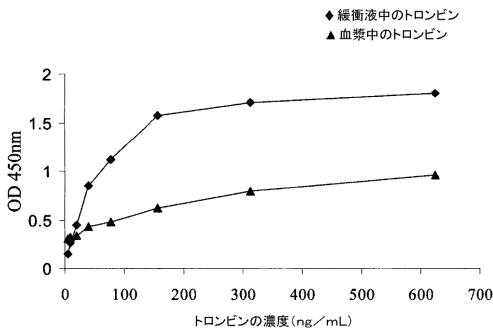
【0087】

(21) 前記トロンビンの量の測定は、トロンビンの標準曲線で行われる、実施態様 14 ~ 20 のいずれかに記載のイムノアッセイ。

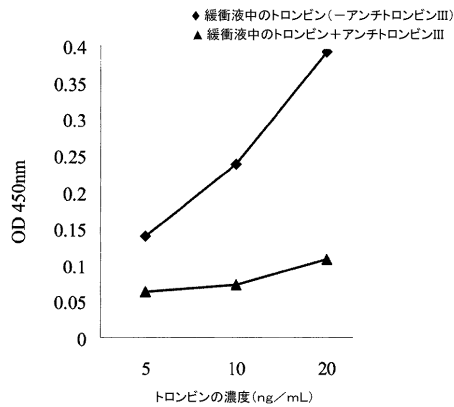
【図 1】



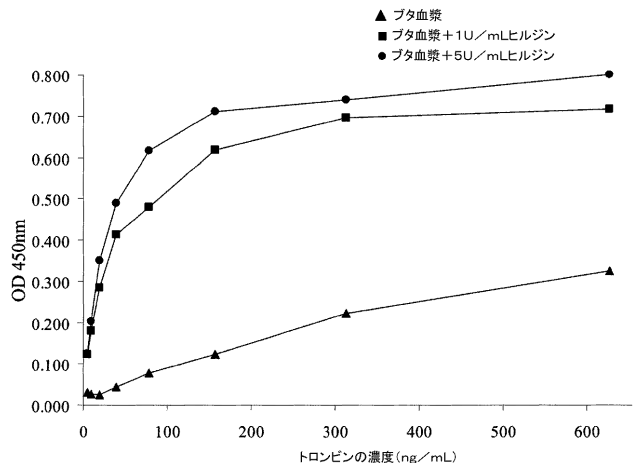
【図 2】



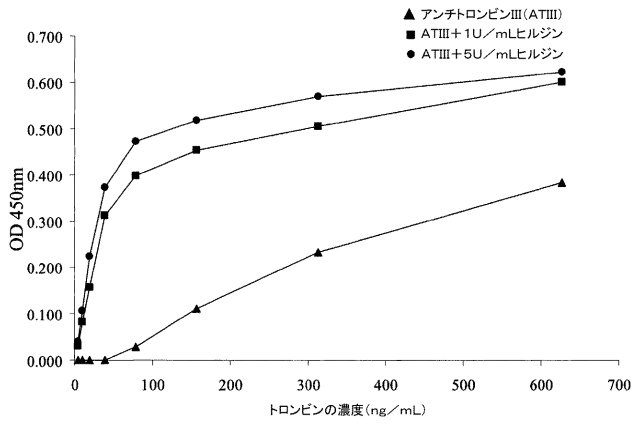
【図 3】



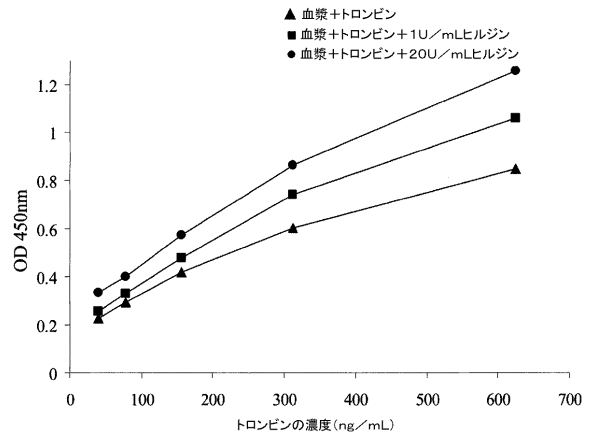
【図 4】



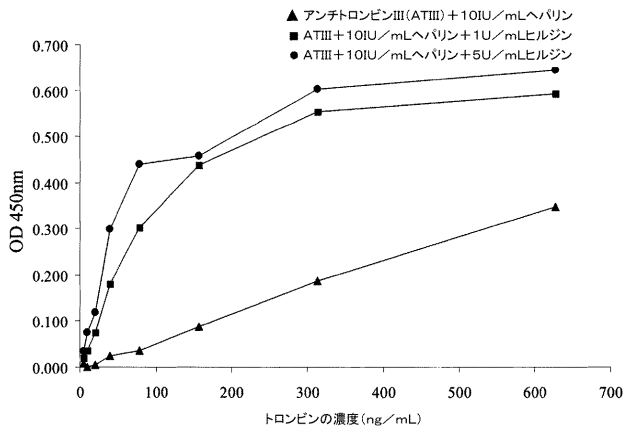
【 図 5 】



【 図 7 】



【 図 6 】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|   |
|---|
| International application No<br>PCT/IL2011/000911 |
|---|

| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>INV. G01N33/86<br>ADD.  |  |  |
|---|--|--|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC   |  |  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>G01N  |  |  |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched   |  |  |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)<br>EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE  |  |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>   |  |  |
| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.                              |
| X   | EP 0 479 721 A2 (CIBA GEIGY AG [CH]<br>NOVARTIS AG [CH]; NOVARTIS ERFIND VERWALT<br>GMBH [AT]) 8 April 1992 (1992-04-08)   | 1-4,<br>6-10,<br>12-17,<br>19-21                   |
| Y   | page 9, line 56 - page 10, line 14; claim<br>24  | 5,11,18  |
| Y   | -----<br>TORSTEN STEINMETZER ET AL: "Rationales<br>Design von Thrombinhemmstoffen: Von<br>Fibrinogen und Hirudin zu synthetischen<br>Antikoagulanzen",<br>PHARMAZIE IN UNSERER ZEIT,<br>vol. 33, no. 3, 1 May 2004 (2004-05-01),<br>pages 196-205, XP55020376,<br>ISSN: 0048-3664, DOI:<br>10.1002/pauz.200400068<br>the whole document<br>----- | 5,11,18  |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.  |  |  |
| * Special categories of cited documents :<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier document but published on or after the international filing date<br>"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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.<br>"&" document member of the same patent family |  |  |
| Date of the actual completion of the international search   |  | Date of mailing of the international search report |
| 28 February 2012  |  | 06/03/2012   |
| Name and mailing address of the ISA/<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016  |  | Authorized officer<br><br>Rosin, Oliver            |

1

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/IL2011/000911

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date         |
|--|------------------|-------------------------|--------------------------|
| EP 0479721                             | A2               | 08-04-1992              | AU 653549 B2 06-10-1994  |
|  |                  |                         | AU 8471391 A 20-05-1993  |
|  |                  |                         | CA 2052501 A1 03-04-1992 |
|  |                  |                         | EP 0479721 A2 08-04-1992 |
|  |                  |                         | JP 3226942 B2 12-11-2001 |
|  |                  |                         | JP 5252984 A 05-10-1993  |
|  |                  |                         | US 5296352 A 22-03-1994  |
| -----                                  |                  |                         |                          |

## 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, MD, 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, 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, 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, VN

(74) 代理人 100130384

弁理士 大島 孝文

(72) 発明者 ミンツ・ロニ

イスラエル国、7 9 5 1 5 モシャブ・シャフィル 2 2 2

(72) 発明者 オール・ナダブ

イスラエル国、7 6 8 0 4 マズケレト・パティア、パルマツハ・ストリート 2 1

(72) 発明者 ヌル・イスラエル

イスラエル国、7 9 8 6 0 モシャブ・ティモリム、ハウス・ナンバー 2 7 7

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 用于检测凝血酶的免疫测定法  |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2014500500A</a>  | 公开(公告)日 | 2014-01-09 |
| 申请号            | JP2013542664   | 申请日     | 2011-11-30 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 奥姆里克斯生物药品有限公司  |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 男士螺旋生物制药有限公司   |         |            |
| [标]发明人         | ミンツロニ<br>オールナダブ<br>ヌルイスラエル   |         |            |
| 发明人            | ミンツ・ロニ<br>オール・ナダブ<br>ヌル・イスラエル  |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/53 G01N33/543   |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/86 G01N2333/8128 G01N2333/815 G01N2333/974 C07K16/36 G01N33/573 |         |            |
| FI分类号          | G01N33/53.D G01N33/543.501.A   |         |            |
| 优先权            | 209921 2010-12-09 IL<br>61/421339 2010-12-09 US                        |         |            |
| 其他公开文献         | JP5955854B2  |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>  |         |            |

摘要(译)

本发明涉及用于定量样品中凝血酶的体外免疫测定，其包含抗凝血酶III (AT-III) 和凝血酶。该方法包括以下步骤：使样品与识别凝血酶底物结合位点的小分子接触；使凝血酶与凝血酶特异性抗体接触，所述抗体针对活性位点中阻断的凝血酶产生；并测量结合抗体的水平。

