

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-230114

(P2012-230114A)

(43) 公開日 平成24年11月22日(2012.11.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/573 (2006.01)	GO 1 N 33/573 Z N A A	2 G O 4 5
CO 7 K 16/40 (2006.01)	CO 7 K 16/40	4 B O 5 O
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 D	4 B O 6 4
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y	4 H O 4 5
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 P	
審査請求 有 請求項の数 11 O L (全 21 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2012-148096 (P2012-148096)	(71) 出願人	597070264
(22) 出願日	平成24年7月2日 (2012.7.2)		ツェー・エス・エル・ペーリング・ゲー・
(62) 分割の表示	特願2001-224423 (P2001-224423)		エム・ペー・ハー
原出願日	平成13年7月25日 (2001.7.25)		ドイツ連邦共和国D-35041 マルブ
(31) 優先権主張番号	10036641:4		ルク・エミル フォン ペーリング シュ
(32) 優先日	平成12年7月26日 (2000.7.26)	(74) 代理人	トラーセ 76
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		100127926
(31) 優先権主張番号	10050040:4		弁理士 結田 純次
(32) 優先日	平成12年10月10日 (2000.10.10)	(74) 代理人	100140132
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		弁理士 竹林 則幸
(31) 優先権主張番号	10052319:6	(72) 発明者	ユアゲン・レーミシュ
(32) 優先日	平成12年10月21日 (2000.10.21)		ドイツ連邦共和国デー-35041 マルブ
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		ルク・ツム・アイゼンベルク8
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 第V I I 因子活性化プロテアーゼの変異体および特異抗体を用いる検出方法

(57) 【要約】

【課題】 血液凝固第VII因子および単鎖プラスミノゲン活性化因子を活性化するプロテアーゼ (F S A P) をコードするD N A 配列の変異体、体液または組織細胞でF S A Pを検出し、遺伝的にヘテロ接合性またはホモ接合性であるF S A P発現を示す患者を特定するために用いる診断方法、F S A Pおよびその変異体に対する抗体、およびF S A Pおよびその変異体に対する抗体を検出するために用いることができる診断方法の提供。

【解決手段】 本変異体は、ヌクレオチド1177位にG / C塩基交換および / またはヌクレオチド1601位にG / A塩基交換を含む。その対応するプロテアーゼはアミノ酸393位にG l u / G l n交換および / またはアミノ酸534位にG l y / G l u交換をもつ。このF S A Pを検出することによる診断方法とF S A Pおよびその変異体に対する抗体の開示もなされている。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

血液凝固第Ⅶ因子および単鎖プラスミノゲン活性化因子を活性化するプロテアーゼ（F S A P）をコードするDNA配列の変異体であって、ヌクレオチド1177位にG / C塩基交換および / またはヌクレオチド1601位にG / A塩基交換を含む前記DNA配列変異体。

【請求項 2】

配列表の配列番号1のヌクレオチド配列を有する請求項1に記載の変異体。

【請求項 3】

アミノ酸393位にG l u / G l n交換および / またはアミノ酸534位にG l y / G l u交換を含むF S A P変異体。

10

【請求項 4】

配列表の配列番号3のアミノ酸配列を有する請求項3に記載の変異体。

【請求項 5】

請求項3または4に記載のF S A P変異体のヘテロ接合体またはホモ接合体遺伝子発現を示す個体を特定する診断方法であって、前記個体に由来するゲノムDNAまたはmRNAの変異体を検出する前記診断方法。

【請求項 6】

変異体が蛋白質レベルで検出される請求項5に記載の診断方法。

【請求項 7】

血液凝固第Ⅶ因子活性化プロテアーゼ、そのプロ酵素、そのフラグメント、または請求項3もしくは4に記載の変異体に対して特異的に誘導されたモノクローナルまたはポリクローナル抗体。

20

【請求項 8】

請求項7に記載の抗体を用いて血液凝固第Ⅶ因子活性化プロテアーゼ、そのプロ酵素、そのフラグメントまたは前記変異体を検出することを含む診断方法。

【請求項 9】

以下の工程：

a) 請求項3または4に記載の変異体を含む可能性があるサンプルを固形支持体に固定した請求項7に記載の第一の抗体とインキュベートし、続いて洗浄し、請求項7に記載の標識した第二の抗体、または野生型に対する標識抗体を添加し、再び洗浄した後、前記第二の抗体によって産生されたシグナルを測定するか、または

30

b) 請求項3または4に記載の変異体を含む可能性があるサンプルを固形支持体に固定した野生型に対して誘導した第一の抗体とインキュベートし、続いて洗浄し、請求項7に記載の標識した第二の抗体を添加し、再び洗浄した後、前記第二の抗体によって産生されるシグナルを測定するか、または

c) 請求項3または4に記載の変異体の存在を検査しようとするサンプルを支持体に固定し、さらに請求項7に記載の標識抗体を単独で用いて前記サンプルの検出を実施するか、または非標識抗体の混合物として用い続いて標識抗体で検出することにより前記サンプルの検出を実施するか、または

40

d) 請求項3または4に記載の変異体の存在を検査しようとするサンプルを、支持体に固定した請求項7に記載の抗体に標識変異体の存在下で添加し、前記標識によって生じるシグナルを測定する、

ことを含む請求項8に記載の診断方法。

【請求項 10】

F S A P活性が以下の工程：

- 請求項7に記載の抗プロテアーゼ抗体を予め結合させた固形支持体と前記プロテアーゼ含有サンプルをインキュベートし、さらに

- 未反応支持体を洗い流し、支持体に固定されたプロテアーゼをその活性の測定を可能にする試薬とインキュベートする

50

ことによって測定される請求項 8 に記載の診断方法

【請求項 1 1】

請求項 7 に記載の抗体が、ウェスタンブロット、免疫組織学的方法、蛍光支援細胞分類 (FACS) または類似方法により変異体を検出するために用いられる請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 2】

請求項 5 ~ 1 1 のいずれかに記載の診断方法を実施するためのアッセイシステム。

【請求項 1 3】

請求項 7 に記載の 1 つまたは 2 つ以上の抗体を支持体に固定し、免疫吸着物質をサンプルとインキュベートし、洗浄した後、溶出によって請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の変異体を得ることを含むプロテアーゼ変異体の製造方法。

10

【請求項 1 4】

リコンビナントおよび / または遺伝子導入発現によって請求項 1 3 に記載の変異体を製造する方法。

【請求項 1 5】

体液、細胞培養上清および遺伝子導入動物由来の液体から請求項 1 3 または 1 4 に記載の変異体を製造する方法。

【請求項 1 6】

第VIII因子フォン・ビルブランド因子、第V因子、第IX因子、第X因子、第XI因子、第XII因子における先天性もしくは後天性欠損症例で出血の予防および / または治療のため、および / または前記蛋白質に対する抗体のために変異体を用いることを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の前記変異体の使用。

20

【請求項 1 7】

ハイブリドーマ細胞株 D S M A C C 2 4 5 3 またはハイブリドーマ細胞株 D S M A C C 2 4 5 4 によって産生される血液凝固第VII因子活性化プロテアーゼに対するモノクローナル抗体。

【請求項 1 8】

請求項 1 7 に記載のモノクローナル抗体、その F a b またはその F (a b ')₂ フラグメントが用いられる、血液凝固第VII因子活性化プロテアーゼまたはそのプロ酵素の精製、検出および / または活性測定のための方法。

30

【請求項 1 9】

血液凝固第VII因子活性化プロテアーゼ (= F S A P) に対する抗体および / または 1 つまたは 2 つ以上のアミノ酸の交換によって形成された F S A P 変異体に対する抗体を検出する診断方法であって、前記抗体を含む可能性があるサンプルを固形支持体に固定した F S A P および / または F S A P 変異体と反応させ、洗浄した後、前記プロテアーゼと結合した抗体を検出することを含む前記診断方法。

【請求項 2 0】

結合ヒト抗体を標識した抗ヒト免疫グロブリンもしくはそのフラグメント、または標識した蛋白 A もしくは蛋白 G とインキュベートし、さらに前記結合標識物質によって放射されるシグナルを測定する請求項 1 9 に記載の診断方法。

40

【請求項 2 1】

抗体が、酵素を結合させた抗ヒト抗体もしくはそのフラグメントまたは蛋白 A もしくは蛋白 G によって適当な発色団または蛍光発生基質の切断により惹起される吸光を分光計で測定することによって検出される請求項 1 9 に記載の診断方法。

【請求項 2 2】

抗体が、蛍光基で標識された結合物質によって惹起された蛍光を測定することにより検出される請求項 1 9 に記載の診断方法。

【請求項 2 3】

抗体が、放射能基で標識された結合物質の放射能活性を測定することによって検出される請求項 1 9 に記載の診断方法。

50

【請求項 2 4】

標識した抗プロテアーゼモノクローナルもしくはポリクローナル抗体またはそのフラグメントの 1 つを組織サンプルと反応させ、未結合の抗体またはそのフラグメントを洗い流し、結合した抗体またはそのフラグメントの 1 つから放射されるシグナルを測定することを含む、血液凝固第Ⅶ因子活性化プロテアーゼ、そのプロ酵素、そのフラグメントまたはその変異体を免疫組織学的に検出する請求項 8 に記載の診断方法。

【請求項 2 5】

前記プロテアーゼまたはその変異体の 1 つに対して誘導した非標識モノクローナルもしくはポリクローナル抗体またはそのフラグメントの 1 つと組織サンプルとを反応させ、未結合の抗体またはそのフラグメントを洗い流し、続いて標識抗抗体を前記組織と反応させ、未結合の標識抗抗体を洗い流し、結合した抗抗体またはそのフラグメントから放射されるシグナルを測定することを含む請求項 2 4 に記載の診断方法。

10

【請求項 2 6】

被検組織サンプルが内分泌器官から採取される請求項 2 4 または 2 5 に記載の診断方法。

【請求項 2 7】

ハイブリドーマ細胞株 D S M A C C 2 4 5 3 または D S M A C C 2 4 5 4 の標識モノクローナル抗体が F S A P を検出するために用いられる請求項 2 4 または 2 5 に記載の診断方法。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、血液凝固第Ⅶ因子活性化プロテアーゼ (F S A P) の変異体、F S A P およびその変異体を蛋白質レベルおよび R N A / D N A レベルでまたは組織サンプルで検出する方法、並びに前記検出方法のための特異抗体に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

ドイツ特許出願 199 03 693.4 は、血漿から分離され、血液凝固第Ⅶ因子を活性化できるプロテアーゼを既に開示している。この最初の発見により、前記プロテアーゼは第Ⅶ因子活性化プロテアーゼ (F S A P) と称された。詳細な実験によって、F S A P はまた、単鎖プラスミノゲン活性化因子、例えばプロウロキナーゼまたは単鎖組織プラスミノゲン活性化因子 (s c t - P A) の強力な活性化物質であることが示された。これらの特性によって、F S A P の可能な利用、例えば第Ⅶ因子活性化により推進される血液凝固促進を主体とする血液凝固促進物質としての利用が提唱された。F S A P はまた、単独で用いるかまたはプラスミノゲン活性化因子と併用して、例えば血栓を形成する合併症の場合にフィブリン溶解のために用いることができる。

30

【0 0 0 3】

ドイツ特許出願 199 03 693.4 および 199 26 531.3 で開示されたようにこのプロテアーゼの検出アッセイが開発されたが、これは、例えば血漿中の F S A P 抗原含有量およびその活性の両者を定量することを可能にする。この場合、抗原決定は好ましくは E L I S A アッセイによって実施される。ドイツ特許出願 19926531.3 で開示されたように、F S A P 活性は、プロウロキナーゼのウロキナーゼへの活性化を定量し、さらに後者と色素形成物質との反応を吸光の相違としてその後すぐに測定することによって決定できる。驚いたことには、前記の活性化のアッセイ中に、例えば血漿から単離した F S A P プロ酵素は選択したインキュベーション条件下で活性化され、したがってプロウロキナーゼの活性化を可能にすることが見出された。より最近の研究によって、F S A P は、自己活性化によってその活性形に変換され、したがって例えばプロウロキナーゼまたは第Ⅶ因子を活性化できることが示された。このことは、さらに上記のインキュベーション条件 (すなわち中性からアルカリ p H、カルシウムイオンおよびヘパリン) によって支持された。さらにまた、最近得られたほとんどの結果は、プロウロキナーゼ / ウロキナーゼ (または単鎖およ

40

50

び二重鎖 t P A) はそれ自体、単鎖 F S A P の活性化を引き起こすかまたは促進することができることを示している。

【 0 0 0 4 】

上記の 2 つのアッセイ系 (すなわち E L I S A およびプロウロキナーゼ活性化アッセイ) を用いて、 1 8 0 以上の健常な血液ドナーの血漿が調べられた。 (1 0 0 人以上健常ドナーの) 血漿プールと比較するか、または全検査群の平均と比較してすべてのサンプルの 5 から 1 0 % で F S A P によるプロウロキナーゼ活性化能力が顕著に低下していることが見出された。

【 0 0 0 5 】

対照的に、F S A P 抗原の平均値が前記のドナーの大半で測定された。したがって、調べられた血液サンプルでは、活性の低下または消失をもたらす 1 つまたは 2 つ以上の F S A P の変化が存在するのであろうと推測される。これに対する説明は集団内の多形性、すなわち F S A P の構造における 1 つまたは 2 つ以上の変異で、ドイツ特許出願 19926531.3 で既に考えられたように、それら多形性は F S A P アミノ酸配列の変化で示唆された。調べた全ドナーの平均値より通常 5 0 から 7 0 % 低い活性はヘテロ接合変異を示唆している。出現する表現型は、両方の F S A P (すなわち野生型 F S A P および変異体) が血中に等しく存在するものであろう。変異体はプロウロキナーゼを活性化する特性を (ほとんど) 完全に失っていると仮定すれば、平均して約半分の活性が測定されるであろう。しかしながら、また他の蛋白質のヘテロ接合変異で仮性ホモ接合体が出現することが報告されたが、この場合、適切に検出される生物学的特性が部分的に失われた変異蛋白質が検出できただけであった。

【 0 0 0 6 】

未知の潜在的な補助因子の欠損または減少が F S A P 活性低下が検出された原因であるという可能性を排除するために、3 人のドナーの F S A P サンプル (彼らの提供サンプルは繰り返し顕著な活性低下を示した) を精製した。この高度に精製した蛋白質は、血漿プールから精製した F S A P と比較して同様に顕著に低い活性を示した。これにより補助因子の影響の可能性は減少し、上記で述べたような蛋白質改変の可能性が高まった。驚くべき結果は、第 VII 因子を活性化させる能力は見かけ上低下しないことであった。このために、この種の変異体は、そのフィブリン溶解能が外観上限定されているので、ドイツ特許出願 19903693.4 に記載されたように血液凝固促進剤として上記で述べた利用に特に適している。前記変異体は、下記で述べるヌクレオチド改変に関する発見を基にして遺伝子組換えまたは遺伝子導入により製造することができる。しかしながら、それらはまた、対応する F S A P 蛋白質 (単鎖または二重鎖 F S A P と同様に天然の供給源 (例えば血液サンプル) から直接単離することがもできる。

【 0 0 0 7 】

ドイツ特許出願 199 03 693.4、199 37 219.5 および 199 37 218.7 では既に、F S A P の製造 (好ましくは、ドイツ特許出願 100 36 641.4 に詳細に開示されているような免疫吸着による) を含む方法が記載されている。しかしながら、知る限りではこれまで用いられてきたモノクローナル抗体は、野生型 F S A P と変異体 F S A P を識別することができない。したがって、特異的に前記変異体と反応するモノクローナル抗体のみを前記変異体の製造に用いることができる。前記変異体で免疫することによって抗体を得ることが可能である。さらにまた、既知の方法による免疫および対応する抗体の生成のために、配列表の配列番号 3 のアミノ酸 3 8 9 から 3 9 7 (... S F R V Q K I F K ...) および / または 5 3 4 から 5 3 9 (... E K R P G V ...) に対応する蛋白質領域をもつペプチドを用いることが可能である。さらに、例えば E L I S A ウェスタンブロットのような検出方法、免疫組織学または蛍光補助細胞分類 (= F A C S) で試薬として前記抗体を用い特異的に前記変異体を検出できる。

【 0 0 0 8 】

他方、F S A P 野生型に特異的な抗体または野生型に対応するアミノ酸配列、例えばアミノ酸配列 3 8 9 から 3 9 7 (... S F R V E K I F K ...) および / またはアミノ酸配列

534 から 539 (...GKRPGV...) に対して作製した抗体は、例えば出血を引き起こすフィブリン溶解亢進を防ぐために F S A P 活性を予防的または治療的に抑制する医薬として特にヒト化形で用いることができる。さらに野生型 F S A P を精製、検出および識別するために、前記のような態様で前記抗体を用いることもまた可能である。

【0009】

既知の c D N A 配列 (Choi-Miura, 登録番号 S83182) と比較することによって、ゲノム F S A P 配列を遺伝子バンクで登録番号 AC006097 として特定した。イントロンおよびエクソンは比較の過程で誘導された。個々の P C R 反応でそれぞれの隣接イントロン配列の小部分と一緒にコード配列を増幅するために、合計 12 プライマー対をデザインした。

【0010】

先ず最初に、活性の低下した 2 人の対象者の血液および正常なウロキナーゼ活性をもつ 4 人の対象者の血液から、すべてのプライマー対を用いてゲノム D N A を単離して増幅し、続いて P C R プライマーを用いて D N A 配列を決定した。結果は表 1 に示した。コード領域で合計 4 つのヌクレオチド位が多形性であった。すなわち、これらの位置では 2 つの塩基が同時に検出された。したがって、これらの事例はヘテロ接合体 (野生型の 1 つの対立遺伝子座および 1 つの変異型対立遺伝子座をもつ) であると思われる。これらのうちの 2 つ (183 位および 957 位) は第三の塩基の交換 (これはアミノ酸の交換をもたらさない) である。他の 2 つ (プロウロキナーゼ活性が低下している対象者の D N A でのみ見出される) は、表 1 に示すようにアミノ酸の交換をもたらす。

【0011】

10

20

【表 1】

表 1

表示ヌクレオチド位置のDNA配列*

対象者番号	プロウロキナーゼ活性	183	957	1177	1601
S 8 3 1 8 2		T	G	G	G
9 6 8 9	正常	T/C	G	G	G
9 6 9 0	正常	T/C	G	G	G
9 7 0 4	正常	T	G/A	G	G
9 7 0 6	正常	T	G/A	G	G
9 7 1 4	低下	T	G	G/C	G/A
9 7 1 5	低下	T	G	G/C	G/A

* この場合 1 位は開始コドンの A である。

表示位置のアミノ酸*

対象者番号	プロウロキナーゼ活性	NT*183 AA*61	NT:957 AA:319	NT:1177 AA:393	NT:1601 AA:534
S 8 3 1 8 2		His	Lys	Glu	Gly
9 6 8 9	正常	His	Lys	Glu	Gly
9 6 9 0	正常	His	Lys	Glu	Gly
9 7 0 4	正常	His	Lys	Glu	Gly
9 7 0 6	正常	His	Lys	Glu	Gly
9 7 1 4	低下	His	Lys	Glu/Gln	Gly/Glu
9 7 1 5	低下	His	Lys	Glu/Gln	Gly/Glu

* NT：ヌクレオチドの位置、AA：アミノ酸の位置

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

2つの変異のプロウロキナーゼ活性低下との相関性を調べるために、個々のDNAの配列をさらにこれらの位置で決定した。結果は表2に要約した。プロウロキナーゼ活性が低下した対象者の6人すべてがヌクレオチド1601位でヘテロ接合体（Gly - Glu変更）で、4人はさらに1177位でヘテロ接合体（Glu - Gln変更）であった。正常なプロウロキナーゼ活性を有するか、低い正常範囲のウロキナーゼ活性を有する合計11人の対象者のいずれも上記のヘテロ接合体ではなかった。この結果は、少なくともアミノ酸534位の変更はプロウロキナーゼの活性低下と因果関係を有することを示唆している。393位のみのアミノ酸変更がプロウロキナーゼ活性低下をもたらすか否かはこの時点ではまだ明らかではない。

【 0 0 1 3 】

【 表 2 】

表 2

表示ヌクレオチド位置のDNA配列

対象者番号	プロウロキナーゼ活性	1 1 7 7	1 6 0 1	
9 7 1 4	低い	C / G	A / G	
9 7 1 5	低い	C / G	A / G	10
9 8 0 2	低い	C / G	A / G	
1 0 0 3 2	低い	G	A / G	
1 0 0 3 9	低い	C / G	A / G	
1 0 0 4 7	低い	G	A / G	
9 6 9 8	低い正常範囲	G	G	
9 7 0 2	低い正常範囲	G	G	
9 7 1 1	低い正常範囲	G	G	20
9 7 1 2	低い正常範囲	G	G	
1 0 0 3 8	低い正常範囲	G	G	
9 6 8 9	正常	G	G	
9 6 9 0	正常	G	G	
9 7 0 4	正常	G	G	
9 7 0 6	正常	G	G	30
9 8 0 3	正常	G	G	
1 0 0 4 3	正常	G	G	

【 0 0 1 4 】

本発明はしたがって、血液凝固第VII因子および単鎖プラスミノーゲン活性化因子を活性化するプロテアーゼ (F S A P) をコードするDNA配列の変異体に関する。本変異体は、ヌクレオチド1177位にG / C塩基交換および / またはヌクレオチド1601位にG / A塩基交換を含む。

【 0 0 1 5 】

添付の配列表の配列番号1のヌクレオチド配列は野生型配列を表している。ヌクレオチド1177位および1601位で2つの変更を含む変異体のDNA配列は配列表の配列番号2に示されている。対応する野生型アミノ酸配列は配列表の配列番号3に示されている。配列番号4は2つのアミノ酸交換を含む変異体のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 1 6 】

配列表に示した前記のDNAおよびアミノ酸配列の検出によって、遺伝的にヘテロ接合体またはホモ接合体のF S A P発現を示す患者を特定する診断方法を開発するための条件が得られた。前記患者のゲノムDNAまたはmRNAのいずれかで変異を検出することが可能である。しかしながら、それら変異はまた、改変アミノ酸配列を有する変異体または野生型に対して作製したモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を用いて蛋白質レ

10

20

30

40

50

ベルで検出することも可能である。

このためにはこの目的に適した抗体を製造し、従って信頼できる診断方法およびアッセイシステムを開発する必要がある。

【課題を解決するための手段】

【0017】

本発明はしたがってまた血液凝固第VII因子活性化プロテアーゼおよびその変異体に対するモノクローナル抗体に関し、さらにまたF S A Pおよびその変異体の検出並びに活性測定のためのそれらの使用に関する。

F S A P 抗原含有量の定量およびF S A P 活性の測定の両方が可能なアッセイシステム、例えばウェスタンブロットまたはエンザイムイムノアッセイ (E L I S A) はそれ自体はドイツ特許出願199 03 693.4 および 199 26 531.3 で既に開示されている。

【0018】

前記アッセイシステムは特異的モノクローナル抗体によるF S A P の結合および/または検出を基にしている。しかしながら、例えばマウスの免疫はしばしば個々のモノクローナル抗体の発現について多くの陽性クローンを生じるが、それらクローンのほんのわずかなだけが上記の作業に適している。したがって、本発明の目的は、血液凝固第VII因子活性化プロテアーゼの精製、その定性的および定量的検出およびその活性の測定のすべてに効果的に用いることができる前記プロテアーゼに対する特異的モノクローナル抗体を検出することである。

【0019】

我々は、これらの要請は、ハイブリドーマ細胞株D S M A C C 2 4 5 3およびハイブリドーマ細胞株D S M A C C 2 4 5 4によって産生される、血液凝固第VII因子活性化プロテアーゼに対するモノクローナル抗体によって十分に満たされることを見出した。

【0020】

最近まで、F S A P は主にその活性化形で精製されていた。通常の調製方法 (例えばカラムクロマトグラフィー技術) は、前記プロテアーゼの急速な活性化およびその後の不活化を促進する。本発明にしたがえば、血液凝固第VII因子活性化プロテアーゼおよび特にそのプロ酵素を高収量で精製することが可能である。本方法では、上記の抗体の一つを支持体に結合させ、前記抗体を前記プロテアーゼまたはそのプロ酵素を含む液体で平衡化させ、続いて洗浄した後で溶出によって前記プロテアーゼまたはそのプロ酵素を得る。

【0021】

さらにまた、上記の抗体は以下のような免疫アッセイを用いて血液凝固第VII因子活性化プロテアーゼまたはそのプロ酵素を検出するのにも適している：

a) プロテアーゼまたはそのプロ酵素を含むと思われるサンプルを、固形支持体に固定した本発明の第一の抗体とインキュベートし、続いて洗浄した後、本発明の第二の標識抗体を添加し、さらに再度洗浄した後、第二の抗体または他のモノクローナルもしくはポリクローナル抗体によって生じたシグナルを測定するか、または

b) 被検サンプル中に含まれるプロテアーゼまたはそのプロ酵素を、例えば前記プロテアーゼまたはそのプロ酵素に対するポリクローナル抗体によって支持体に固定し、本発明の標識抗体のみを用いて検出するか、または本発明の非標識抗体と混合し続いてモノクローナル抗体で検出するか、または、

c) 標識プロテアーゼまたはそのプロ酵素の存在下で、プロテアーゼまたはそのプロ酵素について検査しようとするサンプルを支持体に固定した本発明の抗体に添加し、さらに前記標識によって生じたシグナルを測定する。

【0022】

血液凝固第VII因子活性化プロテアーゼまたはそのプロ酵素を検出するまた別の可能な手段は、本発明の標識抗体単独または本発明の非標識抗体との混合物との免疫反応によるウェスタンブロット法を用い、続いて本発明のモノクローナル抗体を、例えば標識蛋白AもしくはG、または前記モノクローナル抗体に対して作製した標識モノクローナルもしくはポリクローナル抗体によって検出を実施するものである。

【 0 0 2 3 】

最後に、蛋白質溶液中の血液凝固第VII因子活性化プロテアーゼまたはそのプロ酵素の活性の測定もまた、プロテアーゼおよび/またはそのプロ酵素を含む蛋白質溶液を、本発明の抗プロテアーゼモノクローナル抗体を予め結合させた固形支持体とインキュベートし、前記固形支持体を洗浄した後、前記固形支持体に固定されたプロテアーゼおよびそのプロ酵素をそれらの活性の測定を可能にする試薬とインキュベートすることによって実施できる。続いてプロテアーゼまたはそのプロ酵素の活性は、発色基質に対する作用により出現する吸光を光度定量することにより測定することができる。

【 0 0 2 4 】

他の実施可能なプロテアーゼまたはそのプロ酵素活性測定手段では以下を測定する：

- 血液凝固第VII因子 / V I I I a 因子またはV / V a 因子を不活化する作用、または
- 完全凝固アッセイにおける凝固時間を短縮する作用、または
- プラスミノゲン活性化因子を活性化する作用、または
- 血液凝固第VII因子を活性化する作用。

【 0 0 2 5 】

完全なモノクローナル抗体およびそのフラグメント（例えばF（a b '）₂またはF a b）もともに上記の方法での使用に適している。放射性物質または蛍光物質または酵素的に活性な物質で標識した後で、抗体またはそのフラグメントを免疫アッセイまたはウェスタンブロット検出法での検出補助物質として用いることができる。非標識モノクローナル抗体またはフラグメントも同様に用いることができるが、続いて、例えば標識抗体（マウス抗体に対して作製）またはその標識フラグメントによって検出または固定を実施する（サンドイッチ法）。本発明のモノクローナル抗体またはそのフラグメントは単独でも混合しても用いることができる。これはウェスタンブロットでは特に推奨される。なぜならば、SDSゲル電気泳動はしばしばサンプルの還元条件下で実施されるからである。2つのF S A Pポリペプチド鎖は、単にジスルフィド架橋を介して互いに連結されているので、この分子は還元時には2つの鎖、すなわち重鎖および軽鎖に解離する。前者はD S M A C C 2 4 5 4のモノクローナル抗体によって認識され、後者はD S M A C C 2 4 5 3のモノクローナル抗体によって認識される。したがって、両方の鎖を検出するためには、本発明の2つのモノクローナル抗体またはそのフラグメントが必要である。

【 0 0 2 6 】

本発明のモノクローナル抗体は以下のように製造され、その特性が定められたた：

免疫：

3匹の雌のb a l b / cマウス（約6週齢）を第VII因子活性化因子で免疫した。最初の注射はフロイントの完全アジュバント0.2 mlと混合した0.2 mlの抗原（10 μg）から成る。その後続く3回の追加免疫注射（それぞれの間隔は2週間）では、抗原（0.2 ml中に20 μg）をアジュバント無しで投与した（いずれも腹腔内注射）。免疫原はP B Sで希釈した。最後の注射の後で、第VII因子活性化因子でマイクロタイタープレート被覆することにより間接E L I S Aで血清力価を測定した。もっとも高い血清力価をもつマウスを融合に選んだ。

【 0 0 2 7 】

融合：

最後の接種から3週間後に3日間連続して抗原を投与した（0.1 ml中に10 μgの静注）次の日（4日目）に、血液採取後にマウスを殺処分し、脾臓を摘出して脾細胞を単離した。続いてこの脾細胞をマウスのミエローマ細胞株S P 2 / 0 - A g 1 4と融合させた。融合試薬はポリエチレングリコール4000（Merck）であった。融合は、最初のKoehler / Milstein法の変法を用いて実施した。細胞は24ウェルの培養プレートに分散させた。使用した培養液は、10%ウシ胎児血清を含むダルベッコー改変イーグル培地および選別用H A Tであった。約2週間後に、増殖した細胞クローンを48ウェルプレートのウェルに移し番号を付けた。

【 0 0 2 8 】

ハイブリドーマスクリーニング：

培養上清を 1728 個の増殖クローンから採取し、マウス IgG の有無について ELISA によってアッセイした。固定第 VII 因子活性化因子を用いてマウス IgG 陽性上清を特異性について検査した (ELISA)。アッセイした細胞株のうち、108 個の細胞株が第 VII 因子活性化因子に対して特異的であると特定され、これらを凍結状態で保存した。

DSMACC2453 および DSMACC2454 と称する 2 つのハイブリドーマ細胞株を更なる実験のために選んだ。前記細胞株によって産生された抗体の特異性は B I A C O R E で確認し、結合動態を測定した。2 つのモノクローナル抗体は IgG 1 型である。
【0029】

F S A P 野生型およびその変異体に対する上述の抗体を用いて、変異体を検出する診断法を以下のようにして実施することができる：

a) 変異体を含む可能性があるサンプルを固形支持体に固定した請求項 7 に記載の第一の抗体とインキュベートし、続いて洗浄した後で、請求項 7 に記載の第二の標識抗体を添加するか、または野生型に対して誘導した第二の標識抗体を添加し、再び洗浄した後で、前記第二の抗体によって生じたシグナルを測定するか、または

b) 変異体を含む可能性があるサンプルを、野生型に対して誘導し固形支持体に固定した第一の抗体とインキュベートし、洗浄した後で、請求項 7 に記載の第二の標識抗体を添加し、再度洗浄した後で、第二の抗体によって生じたシグナルを測定するか、または

c) 変異体の有無について検査しようとするサンプルを支持体に固定し、請求項 7 に記載の標識抗体を単独で用いて検出するか、または非標識抗体と混合して続いて標識抗体を検出するか、または

d) 変異体の有無について検査しようとするサンプルを、支持体に固定した請求項 7 に記載の抗体に標識変異体の存在下で添加し、前記標識によって生じたシグナルを測定する。

【0030】

好ましい診断方法では F S A P 活性は以下のように測定される：請求項 7 に記載の抗プロテアーゼ抗体を予め結合させた固形支持体とプロテアーゼ含有サンプルとをインキュベートし、前記固形支持体を洗浄した後、前記支持体に固定されたプロテアーゼをその活性の測定を可能にする試薬とインキュベートする。

この場合には、プロテアーゼ活性は、発色基質に対する作用に続いて出現する吸光を光度定量することによって測定できる。

【0031】

さらにまたプロテアーゼ活性は以下を測定することによって測定できる。

- 血液凝固第 VIII / VIIIa 因子または V / V a 因子を不活化する作用、または
- 完全凝固アッセイで血液凝固時間を短縮させる作用、または
- プラスミノゲン活性化因子を活性化する作用、または
- 血液凝固第 VII 因子を活性化する作用。

【0032】

最後に、以下のものを活性化することによってプラスミノゲン活性化因子の作用を測定する方法もまた利用できる：

- 単鎖ウロキナーゼ (s c u P A、単鎖ウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子)、または
- 単鎖 t P A (s c t P A、単鎖組織プラスミノゲン活性化因子)。

【0033】

プロウロキナーゼ活性低下の原因となる変異は、単一ヌクレオチドの多形性を検出するためにも利用される方法を用いて DNA および RNA レベルで検出できる。例えば、

- RNA の c D N A 増幅またはゲノム DNA の増幅およびそれに続くそれらの配列決定；
- c D N A レベルまたはゲノム DNA レベルでの変異の検出、または以下によるそれら

10

20

30

40

50

の増幅；

- 配列特異的プローブによるハイブリダイゼーション（これらプローブは、例えば以下のような検出用標識を有する：酵素、アルカリ性ホスファターゼ、H R Pおよびそれらの基質、蛍光染料（さらにまたレポーター-クエンチャー対、例えばスコルピオン、分子信号、TaqManプローブ）、放射性同位元素、発色団、化学発光標識および電気化学的発光標識）；または

- 例えば、選択的な2'-アミンのアシル化、“副溝結合物質”オリゴヌクレオチド共役物による核酸の電気化学的酸化のような方法またはH P L Cによる検出。

【0034】

上記の抗原アッセイおよび活性のアッセイによって得られた検査結果を基にして、3群の健常なドナーをゲノムレベルでの潜在的な変異に関して調べることができる。この目的のために、血液をドナーから採取し、遠心によって血液細胞を血漿から分離した。続いて血漿を用いてF S A P抗原および活性レベルを定量し、後者にしたがって3つの群に分割した（すなわち、“高い/平均”、“平均/低い”および“顕著に低い”）。続いて得られた血液細胞を用いてD N A / R N Aを抽出し、それらから9ページおよび表1に示した結果が得られた。

【0035】

今やこの結果を基にして、前記の変異の一方または両方を、それらの遺伝子型がヘテロ接合体であろうとホモ接合体であろうと、対応するF S A Pヌクレオチド配列レベルで迅速に検出することが可能である。前述の抗原および活性のアッセイは健常なドナーの遺伝子型を極めて正確に反映するが、F S A Pの血漿レベルが影響を受けるときはこれは困難または不可能である。したがって、例えばホルモンの変動、ライフスタイルなどのパラメーター、特に病的状態は、多かれ少なかれ抗原および/または活性レベルに強い影響を与える。ドイツ特許出願19926531.3で開示されたように、心臓発作時の測定可能なF S A Pの活性は正常値と比較して顕著に増加し、抗原含有量はほとんど増加しない。結果として、健康時にF S A Pの活性が低いドナーはしたがって明らかに“平均水準”である。

【0036】

例えば、F S A Pの変異をもつ患者は、血栓性合併症（例えば心臓発作）を発症する危険が増加するか否かに関する研究は、上記の制限のために可能ではあるが困難を伴う。他方、例えば肝不全は血漿レベルの低下をもたらす可能性があり、これは同様に、“真の”遺伝的素因の解釈を誤らせるかもしれない。反対に、D N A / R N AレベルのF S A P変異アッセイは一時的な事象に左右されない。上述のアッセイのすべてを組み合わせることによって、ドナー/患者の完全な臨床像、すなわち潜在的な変異の評価および抗原-活性比に対する影響に対する急性症状の評価が得られる。これは予防的および治療的手段を提供するかもしれない。

【0037】

上記で述べたように、その血漿が約50%の正常なF S A Pおよび約50%のF S A P変異体を含む完全なヘテロ接合性血液のドナーがこれまで発見されてきた。これは血漿活性レベルの約50%の低下をもたらし、その血漿には両タイプのF S A P分子が存在する。100人以上のドナーの血液から得られた血漿プールは、したがって集団によって5から10%のF S A P変異体を含む。このことの結果は、上記に一致する確率で輸血においてF S A P変異体を含むドナーの血漿を受け取るということである。この変異体を産生することができないレシピエントに前記変異体を含む血液を投与した場合、前記変異体は異質なものと認識され適当な抗体が産生される。それより後にF S A P変異体をさらに投与することにより、レシピエントに免疫学的反応が引き起こされる可能性があり、その副作用は当業者には周知である。

【0038】

反対に、ホモ接合性血液のレシピエントで正常なF S A PではなくF S A P変異体のみを産生している者では、正常なF S A Pは“異質”と認識され、それに対する適当な抗体が産生される。

【0039】

F S A Pは止血およびそれに関わる細胞性反応に影響を与える。血液凝固および/またはフィブリン溶解に関与することにより、F S A Pはまた創傷治癒反応に影響を与える。さらにまた、F S A Pは、グリコサミノグリカンに対して高い親和性を示すその特性のために細胞および他のマトリックスと結合し、したがっておそらく生理学的および病理生理学的に細胞遊走および細胞性-蛋白分解性反応に関与する。

【0040】

したがって抗F S A P抗体はすべてのF S A P仲介活性に影響を及ぼす。F S A Pの外観に対する自己抗体の事例では、その生理学的機能の障害に加えて、免疫複合体(F S A P + 抗体)が既知の自己免疫疾患という副作用をもたらす可能性がある。これは、例えば内皮に局所的に脈管炎を生じるかもしれない。プロフィブリン溶解剤としてのF S A P活性の中和作用はまた血栓症促進状態を惹起するかもしれない。

したがって上記の抗体を検出する診断方法が必要である。

【0041】

したがって、本発明はまた、血液凝固第VII因子活性化プロテアーゼ(= F S A P)に対する抗体、および/または1つまたは2つ以上のアミノ酸の交換によって生じるF S A P変異体に対する抗体を検出する方法に関する。本方法は、抗体を含む可能性があるサンプルを、固形支持体に固定したF S A Pおよび/またはF S A P変異体と反応させ、洗浄後に、前記プロテアーゼと結合した抗体を標識した抗ヒト免疫グロブリンまたは標識した蛋白Aとともにインキュベートし、前記結合標識物質によって放射されるシグナルを測定

10

20

【0042】

本発明の診断方法の実施にはE L I S Aの技術を用いるのが都合がよい。その技術では、F S A Pおよび/またはF S A P変異体はマトリックス、例えばマイクロタイタープレートに結合される。F S A Pおよび/またはF S A P変異体の最適な提示のために、モノクローナルもしくはポリクローナル抗体またはそのF (a b ')₂もしくはF a bフラグメントでプレートを予め被覆し、続いてこのプレートにF S A Pおよび/またはF S A P変異体を適用する。F S A Pおよびその変異体はデキストランスルフェート、ヘパリンおよび類似の物質に非常に良好に結合するので、F S A P結合のために前記の薬剤で予め被覆することも可能である。洗浄した後で、支持体またはマイクロタイタープレートに、適切な場合にはさらにまたこの目的に適した薬剤(例えば洗剤またはアルブミン)を用いて封鎖処理および洗浄を施し、続いてアッセイするべき溶液とともにインキュベートする。F S A P抗体含有溶液は血清、血漿および他の体液(例えば滑液、C S F、唾液、涙液、精漿)または他の細胞溶解物であろう。

30

【0043】

支持体をインキュベートおよび洗浄した後で、続いて適当な検出薬剤を用いる。種々のクラスの抗体(例えばI g G、I g M、I g A、I g Eおよびそれらに属するサブクラス)の検出に必要なアッセイ物質は標識試薬として市販されている。抗体力価は、抗ヒト抗体と結合させた酵素によって発色基質を切断することによって惹起される吸光を分光計で測定して検出および定量できる。しかしながら、検出に用いられる抗体に結合した蛍光基によって放射される蛍光を測定することも可能である。最後のものとして、検出に用いる物質が放射性の基で標識される場合は放射能測定を用いて検出を実施してもよい。

40

【0044】

F S A Pおよび/または特にF S A P変異体に対する抗体を測定することによって、輸血で生じるリスクを輸血実施前に特定し、さらに適当な測定を実施することによって危険な合併症を回避することが可能である。

【0045】

本発明はさらに、血液凝固第VII因子活性化プロテアーゼ、そのプロ酵素またはその変異体もしくはフラグメントを免疫組織化学的に検出する診断方法に関する。本方法は、標識した抗プロテアーゼモノクローナルもしくはポリクローナル抗体またはそのフラグメン

50

トの1つを組織サンプルと反応させ、未結合抗体またはそのフラグメントを洗い流し、結合した抗体またはそのフラグメントの1つから放射されるシグナルを測定することを含む。

【0046】

本方法はまた、前記プロテアーゼ、そのプロ酵素もしくは変異体またはそのフラグメントもしくはそのフラグメントの1つに対して誘導した非標識モノクローナルまたはポリクローナル抗体を組織サンプルと反応させ、未結合の抗体またはそのフラグメントを洗い流し、続いて標識した抗体を前記組織と反応させ、未結合の標識抗体を洗い流し、結合した抗体またはそのフラグメントから放射されるシグナルを測定することによって実施できる。

10

【0047】

さらにまた、F S A Pに対して誘導したモノクローナルまたはポリクローナル抗体は、発色団または化学発光団で標識したとき、ヒト由来の組織切片でF S A Pを検出するために非常に適していることが判明した。ウサギ、ヒツジ、ヤギまたは他の哺乳類を免疫して得られた抗F S A Pポリクローナル抗体は、モノクローナル抗体と同様に前記の検出に適している。活性型およびプロ酵素型の両方またはそのフラグメントとして存在するF S A Pの組織学的に特異的な検出に特に適しているものは、ハイブリドーマ細胞株D S M A C C 2 4 5 3およびD S M A C C 2 4 5 4のモノクローナル抗体である。活性化F S A Pとインヒビター（例えば抗プラスミン）との複合体もまたこのようにして検出できる。この目的に適切なものは、すべての一般的な組織学的検出方法、例えば光学顕微鏡法、蛍光顕微鏡法および電子顕微鏡法である。

20

【0048】

上記の方法でF S A Pを検出するために適しているものは、検出可能な基で標識されている限り、完全なポリクローナルおよびモノクローナル抗体並びにそのフラグメント（例えばF (a b ')₂またはF a b)である。上記の抗体またはそのフラグメントは単独でもまたは混合物としても使用できる。これは、認識されるエピトープの1つが不明瞭な場合に特に推奨される。例えば、蛋白質ドメインは細胞との結合のために抗体がアクセスできないかもしれないが、異なるF S A P領域に対して特異性を有する別の抗体が結合できる。ヒトのF S A P、野生型、および/またはその変異体に対して誘導され、ドイツ特許出願10052319.6でさらに詳細に開示されている抗体もまた、ヒト由来の組織切片でF S A Pの検出に用いることができる。

30

【0049】

F S A Pの免疫組織化学的検出に関してこれまでに得られた所見は以下のように要約することができる：

- F S A Pはこれまでに調べられたヒトの組織のほとんどすべてで検出されている；
- 内分泌学的に活性な細胞、例えばライディヒ細胞または膵臓のランゲルハンス島の内分泌学的に活性な細胞は、発色団をもつ抗体を用いてその細胞質内が極めて強く染色される；
- 上皮および内皮は、それらの位置に応じて多かれ少なかれF S A Pに対する抗体と強力な細胞質内免疫反応を示す；
- 皮質の神経節細胞および樹状突起は高濃度のF S A Pを示し、これは発色団をもつ抗体との強力な免疫組織学的発色反応によって検出される；
- プラズマ細胞は発色団をもつ抗体により強い細胞質内着色を示す；
- 複雑な組織内の間葉の支質細胞はF S A Pに対して極めて微弱な発色反応を示すか、または全く反応を示さない。

40

【0050】

したがってF S A Pは正常な細胞構成成分とみなされる蛋白質である。これまでのところ、F S A Pは細胞内および細胞外の両方に分布し、細胞内の方がはるかに強く染まることが判明していた。上記の抗体またはそのフラグメントによる本発明のF S A Pの検出は、以下の病理進行過程を特定することを可能にする：

50

- 内分泌的に活性な腫瘍および神経内分泌腫瘍；
- 血管形成性内皮および毛細血管内皮；および、
- 血管形成活性を有する腫瘍（例えば神経膠腫および神経膠芽腫）、さらに例えば血管腫瘍（例えば血管内皮腫または血管周囲細胞腫）および血管肉腫；
- 創傷治癒反応、顆粒形成組織および膠原病；
- 動脈硬化を示し、（微細）な血栓が形成され、さらに壊死を示す領域；
- 神経退行性疾患（例えばアルツハイマー病、パーキンソン病）、または例えばプリオン蛋白質によって惹起されるスポンジ状脳炎；
- 高ガンマグロブリン血症およびミエローマ。

【0051】

10

PSAPは、好ましくはハイブリドーマ細胞株DSMACC2453またはDSMACC2454のモノクローナル抗体を用いて検出される。

本発明の診断方法は以下の実施例によってより詳細に説明される。

【0052】

ハイブリドーマ細胞株DSMACC2453およびDSMACC2454のFSAP特異的モノクローナル抗体の免疫組織化学的反応性は、成人の組織および悪性泌尿器系腫瘍から以下のようにパラフィン切片を調製して調べた；10μmの厚さのパラフィン切片を作製し、続いて、クエン酸緩衝液中でマイクロ波で5分間3回処理した切片を脱パラフィン処理した。最初に、上記のハイブリドーマ細胞株由来の非標識抗体を前記切片と30分反応させた。組織切片を洗浄した後、標識した抗マウス検出抗体を前記組織と同じように30分反応させ、続いてAPAAP複合体（アルカリホスファターゼ/抗アルカリホスファターゼ複合体）を形成させ、さらに発色源で染色しヘマラムで対比染色することにより結合FSAP抗体を可視化した。

20

【0053】

陰性コントロールとして、FSAP抗体との前インキュベーションを行わずに各組織を別々に検出抗体とインキュベートし、潜在的な非特異的検出反応を可視化させた。さらに、α-ケラチンに対する抗体を陽性コントロールとして加えた。

正常なヒト組織の免疫組織化学実験の結果は表1に要約した。

【0054】

FSAPに対する抗体，クローンDSMZACC2454およびDSMZACC2453

30

	ヒトの正常組織	
	DSMZACC2454	DSMZACC2453
食道		
扁平上皮	2 +	2 +
分泌ユニット	0	0
腺房管	2 +	2 +
筋系	1 +	1 +
支質	1 +	1 + から 2 +
血管内皮	2 +	2 +
噴門（胃）		
小窩上皮	0	0
噴門腺	1 +	2 +
粘液分泌ユニット	0	0
酸分泌腺	3 +	3 +
筋系	1 +	1 +
血管内皮	1 +	1 +
胃本体		
小窩上皮	0	0 から 1 +
胃本体の腺小体	2 +	2 +
筋系	0	1 +

40

50

血管内皮	1 +	1 +	
十二指腸			
上皮	0 から 1 +	1 +	
ブルンナー腺	0	0	
筋系	0	0 から 1 +	
リンパ小節	1 +	2 +	
神経節細胞	2 +	3 +	
血管内皮	1 +	1 +	
小腸			
上皮	2 +	3 +	10
筋系	1 +	1 +	
支質	1 +	2 +	
神経節細胞	3 +	3 +	
血管内皮	1 +	1 +	
結腸 / 直腸			
上皮	1 +	1 +	
リンパ小節	1 +	1 +	
プラズマ細胞	1 +	1 +	
血管内皮	1 +	0	
【 0 0 5 5 】			20
	<u>D S M Z A C C 2 4 5 4</u>	<u>D S M Z A C C 2 4 5 3</u>	
虫垂			
上皮	1 +	3 +	
筋系	1 +	1 +	
リンパ小節	1 +	2 +	
プラズマ細胞	2 +	3 +	
血管内皮	1 +	1 +	
膵臓			
上皮	1 +	2 +	
ランゲルハンス島	3 +	1 +	30
管上皮	2 +	2 +	
血管内皮	1 +	1 +	
唾液腺			
粘液末端ユニット	0	0	
漿液末端ユニット	1 +	1 + から 2 +	
腺房管	1 +	1 +	
唾液腺管	1 +	1 +	
血管内皮	0 から 1 +	0 から 1 +	
肝臓			
肝細胞	2 +	2 +	40
胆管	0	0	
血管内皮	1 +	(1 +)	
胆嚢			
上皮	1 +	1 +	
筋系	2 +	1 +	
血管内皮	2 +	1 +	
胆嚢管			
上皮	3 +	3 +	
筋系	2 +	1 +	
神経節細胞	3 +	3 +	50

血管内皮	2 +	2 +
精巢		
ライディヒ細胞	3 +	1 +
セルトーリ細胞	1 + から 2 +	1 +
生殖細胞	1 + から 2 +	1 +
血管内皮	1 +	1 +
精巣網		
上皮	2 +	2 +
【 0 0 5 6 】		

	<u>D S M Z A C C 2 4 5 4</u>	<u>D S M Z A C C 2 4 5 3</u>	
精巣上体			10
精巣上体管	2 +	2 +	
輸出管	2 +	2 +	
支質	1 +	1 +	
血管内皮	1 +	1 +	
精液腺			
上皮	2 +	3 +	
筋系	1 +	1 +	
血管内皮	2 +	2 +	
排泄管			20
上皮	2 +	3 +	
縦筋層	0	+ / -	
輪状筋層	2 +	3 +	
血管内皮	2 +	3 +	
前立腺			
腺上皮	2 +	2 +	
筋系	1 +	1 +	
血管内皮	1 + から 2 +	1 + から 2 +	
腎臓			
細管	2 +	1 +	30
糸球体	0	0	
髄質上皮	1 +	1 +	
血管内皮	0 から 1 +	0 から 1 +	
膀胱			
尿皮	2 +	1 + から 2 +	
筋系	2 +	1 +	
プラズマ細胞	2 +	2 +	
線維芽細胞	1 + から 2 +	1 + から 2 +	
抹消神経		0	
副腎			40
糸球体ゾーン	2 +	1 +	
線維束ゾーン	1 + から 2 +	(1 +)	
網様ゾーン	3 +	(1 +)	
髄質	0	0	
血管内皮	1 +	(1 +)	
子宮内膜			
腺上皮	3 +	2 +	
支質細胞	0	1 +	
子宮筋層	1 +	1 +	
血管内皮	1 +	2 +	50

【 0 0 5 7 】

	<u>D S M Z A C C 2 4 5 4</u>	<u>D S M Z A C C 2 4 5 3</u>	
胎 盤			
絨毛膜上皮	3 +	2 +	
羊膜上皮	2 +	2 +	
脱落膜細胞	2 + から 3 +	2 +	
支質細胞	0	+ / -	
血管内皮	1 +	1 +	
胎児膜			
羊膜上皮	3 +	2 +	10
脱落膜細胞	3 +	1 +	
線維芽細胞	3 +	1 + から 2 +	
子宮頸部			
腺上皮	0	0	
血管内皮	1 +	0 から 1	
支質	1 +	0 から 1	
卵管			
上皮	2 +	3 +	
筋系	0	1 +	
血管内皮	1 +	2 +	20
乳房			
乳腺小葉上皮	2 +	2 +	
分泌管上皮	2 +	2 +	
線維芽細胞	0	1 +	
プラズマ細胞	2 +	2 +	
血管内皮	1 +	0	
甲状腺			
小胞上皮	2 +	1 + から 2 +	
支質	1 +	1 +	
血管内皮	1 +	0	30
胸腺			
ハッサル小体	2 + から 3 +	2 +	
小胞	1 +	2 +	
外皮ゾーン	(1 +)	(1 +)	
スターリースカイ			
マクロファージ	1 +	1 +	
脾臓	+	+	
扁桃	+ / -	+ / -	
リンパ節	+ / -	+ / -	
上顎洞			40
呼吸上皮	2 +	2 +	
プラズマ細胞	3 +	3 +	
血管内皮	1 +	1 +	

【 0 0 5 8 】

	<u>D S M Z A C C 2 4 5 4</u>	<u>D S M Z A C C 2 4 5 3</u>	
肺臓			
気管支上皮	2 +	1 +	
肺胞上皮	1 + から 2 +	1 +	
気管支腺	1 +	1 +	
軟骨	3 +	1 +	50

筋系	1 +	1 +
肺胞マクロファージ	2 +	2 +
弾性線維	2 + から 3 +	2 + から 3 +
血管内皮	1 +	1 +
骨格筋	2 +	1 +
脂肪組織	2 +	2 +
血管内皮	2 +	2 +
皮膚		
表皮	2 +	1 + から 2 +
真皮	(1 +)	0
皮下組織	(1 +)	0
汗腺	1 +	0
血管内皮	1 +	0
心内膜	0	0
線維芽細胞	2 + から 3 +	2 + から 3 +

0 = 陰性 ; 1 + = 弱陽性 ; 2 + = 中等度の陽性 ; 3 + = 強陽性

10

20

30

【 0 0 5 9 】

内分泌腺細胞、例えば膵臓のランゲルハンス島、精巣間隙のライディヒ細胞、胎盤の脱落膜細胞および胃噴門の酸分泌腺小体、並びに胆嚢管の高度に円筒状の上皮は、部分的に微細な顆粒が認められる強い反応を示す。強陽性反応が、組織構造に分布するプラズマ細胞並びに皮質の神経節細胞および神経細胞で観察された。脱落膜細胞、羊膜上皮および胎児膜の線維芽細胞は、精液腺の基底上皮および小腸の腸細胞のように非常に強い免疫組織学的染色性を示した。

【 0 0 6 0 】

泌尿器系腫瘍のホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍材料を用いた実験では、前立腺の種々の分化腺癌は弱い反応から中等度の細胞質内反応を示した。精上皮腫系精巣腫瘍の腫瘍細胞は弱い細胞質内反応を示しただけであるが、非精上皮腫系腫瘍（胎生期癌および絨毛膜癌）では腫瘍細胞の染色性は著しく増加し、F S A P の濃度の増加を示した。

本発明の診断方法は、したがって極めて多様な器官の病理進行を免疫組織化学的に検出することを可能にする。

【 配列表 】

[2012230114000001.app](#)

【 手続補正書 】

【 提出日 】平成24年7月2日(2012.7.2)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

配列表の配列番号 3 のアミノ酸配列のアミノ酸 3 9 3 位における G l u / G l n 交換および / またはアミノ酸 5 3 4 位における G l y / G l u 交換を含む F S A P 変異体のヘテロ接合体またはホモ接合体遺伝子を検出する方法であって、個体に由来するゲノム DNA または m R N A の変異体を蛋白質レベルで検出する前記検出方法。

【 請求項 2 】

請求項 1 に記載の変異体に対する特異的モノクローナル抗体。

【 請求項 3 】

請求項 2 に記載の抗体を用いて請求項 1 に記載の変異体を検出する検出方法。

【 請求項 4 】

以下の工程：

a) 請求項 1 に記載の変異体を含む可能性があるサンプルを固形支持体に固定した請求項 2 に記載の第一の抗体とインキュベートし、続いて洗浄し、請求項 2 に記載の標識した第二の抗体、または野生型に対する標識抗体を添加し、再び洗浄した後、前記第二の抗体によって産生されたシグナルを測定するか、または

b) 請求項 1 に記載の変異体を含む可能性があるサンプルを固形支持体に固定した野生型に対して誘導した第一の抗体とインキュベートし、続いて洗浄し、請求項 2 に記載の標識した第二の抗体を添加し、再び洗浄した後、前記第二の抗体によって産生されるシグナルを測定するか、または

c) 請求項 1 に記載の変異体の存在を検査しようとするサンプルを支持体に固定し、さらに請求項 2 に記載の標識抗体を単独で用いて前記サンプルの検出を実施するか、または請求項 2 に記載の非標識抗体を用い続いて標識抗体で検出することにより前記サンプルの検出を実施するか、または

d) 請求項 1 に記載の変異体の存在を検査しようとするサンプルを、支持体に固定した請求項 2 に記載の抗体に標識変異体の存在下で添加し、前記標識によって生じるシグナルを測定する、ことを含む請求項 3 に記載の検出方法。

【請求項 5】

F S A P 活性が以下の工程：

- 請求項 2 に記載の抗プロテアーゼ抗体を予め結合させた固形支持体と前記プロテアーゼ含有サンプルをインキュベートし、さらに

- 未反応支持体を洗い流し、支持体に固定されたプロテアーゼをその活性の測定を可能にする試薬とインキュベートする

ことによって測定される請求項 3 に記載の検出方法。

【請求項 6】

請求項 2 に記載の抗体が、ウェスタンブロット、免疫組織学的方法、蛍光支援細胞分類 (FACS) または類似方法により変異体を検出するために用いられる請求項 3 に記載の検出方法。

【請求項 7】

請求項 2 に記載の 1 つまたは 2 つ以上の抗体を支持体に固定し、前記支持体をサンプルとインキュベートし、洗浄した後、溶出によって請求項 1 に記載の変異体を得ることを含む前記プロテアーゼ変異体の製造方法。

【請求項 8】

サンプルが体液、細胞培養上清および遺伝子導入動物由来の液体である請求項 7 に記載の変異体を製造する方法。

【請求項 9】

標識した請求項 2 に記載の抗体またはそのフラグメントの 1 つを組織サンプルと反応させ、未結合の抗体またはそのフラグメントを洗い流し、結合した抗体またはそのフラグメントの 1 つから放射されるシグナルを測定することを含む、請求項 1 に記載の変異体を免疫組織学的に検出する請求項 3 に記載の検出方法。

【請求項 10】

非標識の請求項 2 に記載のモノクローナル抗体またはそのフラグメントの 1 つと組織サンプルとを反応させ、未結合の抗体またはそのフラグメントを洗い流し、続いて標識抗体またはそのフラグメントを前記組織と反応させ、未結合の標識抗体またはそのフラグメントを洗い流し、結合した抗体またはそのフラグメントから放射されるシグナルを測定することを含む請求項 9 に記載の検出方法。

【請求項 11】

被検組織サンプルは内分泌器官から採取されたものである請求項 9 または 10 に記載の検出方法。

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N 9/64 (2006.01)		C 1 2 N 9/64	Z	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)		C 1 2 P 21/08		

(31)優先権主張番号 10118706:8

(32)優先日 平成13年4月12日(2001.4.12)

(33)優先権主張国 ドイツ(DE)

(72)発明者 ハンス・アルノルト・シュテアー

ドイツ連邦共和国デー - 3 5 0 8 3 ヴェター . シュールシュトラッセ 6 6

(72)発明者 アネッテ・フォイスナー

ドイツ連邦共和国デー - 3 5 0 4 3 マルブルク . ランゲヴィーゼンヴェーク 1 0

(72)発明者 ヴィーガント・ラング

ドイツ連邦共和国デー - 3 5 0 9 1 ケルベ . アカーツィエンヴェーク 2

(72)発明者 トーマス・ヴァイマー

ドイツ連邦共和国デー - 3 5 0 7 5 グラーデンバハ . リヒャルト - ヴァーグナー - シュトラッセ 8

(72)発明者 マルグレト・ベッカー

ドイツ連邦共和国デー - 3 5 0 4 3 マルブルク . イム・フェルトヒェン 1 3

(72)発明者 クラウディア・ネルリヒ

ドイツ連邦共和国デー - 3 5 0 4 1 マルブルク . ブーヘンヴェーク 3

(72)発明者 ゲードルーン・ムート・ナウマン

ドイツ連邦共和国デー - 3 5 0 8 3 ヴェター . タールブリック 2

F ターム(参考) 2G045 BB24 CB01 DA20 FA16 FB03 FB07

4B050 CC02 CC03 DD11 FF16C LL03

4B064 AG27 CA20 CC24 DA13

4H045 AA11 BA10 DA76 EA50 FA74

专利名称(译)	因子VII活化蛋白酶突变体和使用特异性抗体的检测方法		
公开(公告)号	JP2012230114A	公开(公告)日	2012-11-22
申请号	JP2012148096	申请日	2012-07-02
[标]申请(专利权)人(译)	德国杰特贝林生物制品有限公司		
申请(专利权)人(译)	基于谢-ES埃尔门贝林她EM		
[标]发明人	ユアゲンレーミシュ ハンスアルノルトシュテーア アネッテフォイスナー ヴィーガントラング トーマスヴァイマー マルグレットベッカー クラウディアネルリヒ グードルーンムートナウマン		
发明人	ユアゲン・レーミシュ ハンス・アルノルト・シュテーア アネッテ・フォイスナー ヴィーガント・ラング トーマス・ヴァイマー マルグレット・ベッカー クラウディア・ネルリヒ グードルーン・ムート・ナウマン		
IPC分类号	G01N33/573 C07K16/40 G01N33/543 G01N33/53 G01N33/48 C12N9/64 C12P21/08		
FI分类号	G01N33/573.ZNA.A C07K16/40 G01N33/543.501.D G01N33/53.Y G01N33/48.P C12N9/64.Z C12P21/08 G01N33/573.AZN.A		
F-TERM分类号	2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/DA20 2G045/FA16 2G045/FB03 2G045/FB07 4B050/CC02 4B050/CC03 4B050/DD11 4B050/FF16C 4B050/LL03 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	10036641:4 2000-07-26 DE 10050040:4 2000-10-10 DE 10052319:6 2000-10-21 DE 10118706:8 2001-04-12 DE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：检测编码蛋白酶（FSAP）的DNA序列的突变体，体液或组织细胞中的FSAP，其激活凝血因子VII和单链纤溶酶原激活物，并且遗传杂合提供了用于鉴定表现出FSAP表达的性或纯合的患者的诊断方法，FSAP的抗体及其变体，以及可用于检测FSAP抗体及其变体的诊断方法。突变体包含核苷酸位置1177处的G / C碱基交换和/或核苷酸位置1601处的G / A碱基交换。其相应的蛋白酶在氨基酸位置393处具有Glu / Gln交换和/或在氨基酸位置534处具有Gly / Glu交换。还公开了通过检测该FSAP和针对FSAP及其突变体的抗体的诊断方法。【选择图】无

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/573 (2006.01)	GO 1 N 33/573 Z N A A	2 G O 4 5
CO 7 K 16/40 (2006.01)	CO 7 K 16/40	4 B O 5 O
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 D	4 B O 6 4
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y	4 H O 4 5
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 P	

審査請求 有 請求項の数 11 O L (全 21 頁) 最終頁に

(21) 出願番号	特願2012-148096 (P2012-148096)	(71) 出願人	597070264
(22) 出願日	平成24年7月2日 (2012. 7. 2)		ツュー・エス・エル・バーリング・ゲー
(62) 分割の表示	特願2001-224423 (P2001-224423)		エム・ペー・ハー
	の分割		ドイツ連邦共和国 D-3 5 0 4 1 マ
原出願日	平成13年7月25日 (2001. 7. 25)		ルク・エミル フォン バーリング シ
(31) 優先権主張番号	10036641:4		トラーセ 7 6
(32) 優先日	平成12年7月26日 (2000. 7. 26)	(74) 代理人	100127926
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		弁理士 結田 純次
(31) 優先権主張番号	10050040:4	(74) 代理人	100140132
(32) 優先日	平成12年10月10日 (2000. 10. 10)		弁理士 竹林 剛幸
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)	(72) 発明者	ユアゲン・レーミシュ
(31) 優先権主張番号	10052319:6		ドイツ連邦共和国ゲー-3 5 0 4 1 マ
(32) 優先日	平成12年10月21日 (2000. 10. 21)		ルク・ツム・アイゼンベルク 8
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		