

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

インタクト C 3 のレベルを対象由来の試料において検出する工程であって、該検出は、該インタクト C 3 と、それに対する非交差反応性抗体との特異的相互作用を伴う、工程；

検出されたレベルを基準レベルと比較する工程であって、該基準レベルは約 350 ug / mL ~ 約 1,700 ug / mL の範囲内にあり、該検出されたレベルが該基準レベル未満であることが決定されることは、該対象が、望ましくないかつ/または病理学的な補体活性化を受けているか、あるいは受けやすいことを示す、工程；および

該検出されたレベルが該基準レベル未満であるならば、望ましくない補体活性化を処置するための処置を施す工程

を含む方法。

10

【請求項 2】

前記非交差反応性抗体は、i C 3 b の 1 ug / u L の溶液により、約 1 ng / mL 未満の C 3 に相当するシグナルがもたらされることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記非交差反応性抗体は H M 2 0 7 5 であるか、または、H M 2 0 7 5 を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記検出する工程および比較する工程は約 30 分間以下で実施され得る、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記望ましくないかつ/または病理学的な補体活性化は、全身性エリテマトーデス、外傷、炎症性ストレス、自己免疫障害、頭蓋内出血、感染、移植拒絶反応、眼疾患、心疾患、虚血/再灌流障害、加齢性黄斑変性、発作性夜間ヘモグロビン尿症、遺伝性血管浮腫、腎疾患、妊娠関連障害および神経障害からなる群から選択される障害によって引き起こされる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記試料は、全血、血清、血漿、尿、涙液、唾液、創傷滲出液、気管支肺胞洗浄液および脳脊髄液からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記検出する工程は、該工程の実施により、前記試料内の補体を実質的に活性化されないような制御された条件のもとで行われる、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記検出する工程および比較する工程は、E L I S A アッセイを使用して実施されない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記検出する工程および比較する工程は、側方流動アッセイを使用して実施される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

i C 3 b のレベルを対象由来の試料において検出する工程であって、該検出は、該 i C 3 b と、それに対する非交差反応性抗体との特異的相互作用を伴う、工程；

検出されたレベルを基準レベルと比較する工程であって、該基準レベルは約 10 ng / mL ~ 約 5,000 ng / mL の範囲内にあり、該検出されたレベルが該基準レベルを超えることが決定されることは、該対象が、望ましくないかつ/または病理学的な補体活性化を受けているか、あるいは受けやすいことを示す、工程；および

該検出されたレベルが該基準レベルを超えるならば、望まれない補体活性化を処置するための処置を施す工程

を含む方法。

40

【請求項 11】

前記非交差反応性抗体は、C 3 の 1 ug / u L の溶液により、約 1 ng / mL 未満の i C

50

3 b に相当するシグナルがもたらされることを特徴とする、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記非交差反応性抗体は、A209、MCA2607 および HM2199 からなる群から選択される抗体であるか、または、該抗体を含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

前記検出する工程および比較する工程は約 30 分以下で実施され得る、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 14】

前記望ましくないかつ/または病理学的な補体活性化は、全身性エリテマトーデス、外傷、炎症性ストレス、自己免疫障害、頭蓋内出血、感染、移植拒絶反応、眼疾患、心疾患、虚血/再灌流障害、加齢性黄斑変性、発作性夜間ヘモグロビン尿症、遺伝性血管浮腫、腎疾患、妊娠関連障害および神経障害からなる群から選択される障害によって引き起こされる、請求項 10 に記載の方法。

10

【請求項 15】

前記試料は、全血、血清、血漿、尿、涙液、唾液、創傷滲出液、気管支肺胞洗浄液および脳脊髄液からなる群から選択される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 16】

前記検出する工程は、該工程の実施により、前記試料内の補体を実質的に活性化されないような制御された条件のもとで行われる、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 17】

前記検出する工程および比較する工程は、ELISA アッセイを使用して実施されない、請求項 10 に記載の方法。

20

【請求項 18】

前記検出する工程および比較する工程は、側方流動アッセイを使用して実施される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 19】

インタクト C3 レベル対 iC3b レベルの比率を試料において検出する工程であって、該検出は、該インタクト C3、該 iC3b または両者と、それに対する非交差反応性抗体との特異的相互作用を伴う、工程；

検出されたレベルを約 0.001 の基準比率と比較する工程であって、該検出されたレベルが該基準レベル未満であることが決定されることは、該対象が、望ましくないかつ/または病理学的な補体活性化を受けているか、あるいは受けやすいことを示す、工程；および

30

該検出されたレベルが該基準レベル未満であるならば、望ましくない補体活性化を処置するための処置を施す工程

を含む方法。

【請求項 20】

前記検出する工程および比較する工程は約 30 分間以下で実施され得る、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

インタクト C3 を検出するための前記非交差反応性抗体は HM2075 であるか、または、HM2075 を含む、請求項 19 に記載の方法。

40

【請求項 22】

iC3b を検出するための前記非交差反応性抗体は、A209、MCA2607 および HM2199 からなる群から選択される抗体であるか、または、該抗体を含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 23】

前記望ましくないかつ/または病理学的な補体活性化は、全身性エリテマトーデス、外傷、炎症性ストレス、自己免疫障害、頭蓋内出血、感染、移植拒絶反応、眼疾患、心疾患、虚血/再灌流障害、加齢性黄斑変性、発作性夜間ヘモグロビン尿症、遺伝性血管浮腫、腎

50

疾患、妊娠関連障害および神経障害からなる群から選択される障害によって引き起こされる、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 24】

前記試料は、全血、血清、血漿、尿、涙液、唾液、創傷滲出液、気管支肺胞洗浄液および脳脊髄液からなる群から選択される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 25】

前記検出する工程は、該工程の実施により、前記試料内の補体を実質的に活性化されないような制御された条件のもとで行われる、請求項 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

前記検出する工程および比較する工程は、E L I S A アッセイを使用して実施されない、請求項 19 に記載の方法。

10

【請求項 27】

前記検出する工程および比較する工程は、側方流動アッセイを使用して実施される、請求項 19 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

背景

炎症は、損傷、感染症および一定の疾患に対する血管新生組織の生理反応である。炎症プロセスは、外傷性損傷後の創傷治癒のために、および感染を取り除くために生物学的に必要なものである。しかし、炎症は、自己組織を傷つけることもある。このため、炎症は、諸刃の剣と見なされることが多い。

20

【0002】

補体は、免疫系の最古来の武器であり、炎症プロセスに深く関わっている。補体タンパク質カスケードは、侵入微生物に対する防御の第一線であり、創傷治癒プロセスに極めて重要な役割を果たすものである。この補体カスケードは、30 を超える血清および細胞タンパク質を伴い、先天免疫および適応免疫に重要な役割を果たす。補体活性化は、古典的経路、副経路およびレクチン経路という3つの主要経路によって起こり得る。補体活性化の3つの主要経路すべてが、中心的タンパク質補体成分3 (C3) に収束する。C3 は、炎症の中心的媒介因子であり、炎症を引き起こす大多数の要因によって活性化される。図 1 および 2 は、C3 およびその活性化産物の概略概観図である。

30

【0003】

補体、および特にC3は、急性および慢性両方の幾つかの疾患適応症に関連している。例としては、外傷、呼吸困難、敗血症、他の形態の感染症、感染性疾患（例えば、出血熱）、多臓器不全、加齢性黄斑変性、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、糸球体腎炎、虚血/再灌流障害、炎症性腸疾患、頭蓋内出血、心筋梗塞および心停止が挙げられるが、これらに限定されない。

【0004】

幾つかの報告により、補体活性化は損傷直後に起こり、損傷の重症度と相関することが示されている。ある研究において、外傷患者の補体タンパク質の循環レベルは患者転帰と相関することが判明した。Heckeら、Circulating complement proteins in multiple trauma patients - correlation with injury severity, development of sepsis, and outcome, Crit. Care Med. (1997) 25 (12) : 2015 - 24 を参照。この研究において、著者らは、損傷直後およびICUにおいて損傷後数日間、C3aと全C3の両方の血漿濃度を測定した。彼らは、損傷後最も早い時点で補体C3活性化の証拠を検出した。しかし、最初の八時間は、生存者より非生存者のほうが補体活性化が顕著であった。最も早い時点でのC3活性化度は、患者転帰と相関した。Heckeらは、全補体に対する比として考えたときの、C3分割産物であるC3aの比のほうが、C3a単独より良好な転帰予測因子であるこ

40

50

とも見出した。

【0005】

Zilowらによる類似の研究 (Zilowら、Complement activation and the prognostic value of C3a in patients at risk of adult respiratory distress syndrome、Clin. Exp. Immunol. (1990) 79:151-57) により、頻繁な(6時間)間隔でのC3aおよび全C3のモニタリングは、呼吸困難のリスクの高い患者または呼吸困難の早期にある患者の同定に有用であり得ることが遡及的に判明した。これらの研究者は、損傷2時間以内に第一の血漿試料を採り、最初の48時間は6時間試料採取を繰り返し、その後は一日間隔で行った。Zilowらは、6および12時間の時点でのC3aレベルとC3a:全C3比との間に有意な相関関係を見出し、5日目からは外れることも見出した。

10

【0006】

外傷ケアの分野では、損傷後最初の1時間は、時として、「ゴールデン・アワー」と呼ばれる。理論により拘束されることを望まないが、外傷性損傷後の最初の1時間以内の介入は、患者の転帰を大きく向上させると一般に考えられる。より早くもたらされるより良い診断情報は、処置を決定する際の救命救急診療専門家の洞察力の向上に役立つだろう。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Heckeら、Circulating complement proteins in multiple trauma patients - correlation with injury severity, development of sepsis, and outcome、Crit. Care Med. (1997) 25(12):2015-24

20

【非特許文献2】Zilowら、Complement activation and the prognostic value of C3a in patients at risk of adult respiratory distress syndrome、Clin. Exp. Immunol. (1990) 79:151-57

【発明の概要】

30

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、ネイティブまたはインタクトなC3および/またはiC3bの定性的測定および定量的測定のための新しい方法およびアッセイを開発した。本発明者らはさらに、そのような方法およびアッセイのポイント・オブ・ケア実行を提供する。

【0009】

提供される方法およびアッセイは、例えば、診断学および治療学における使用を含めて医療における使用のために好適であり、特に、臨床の場における使用のために好適である。とりわけ、提供される方法およびアッセイは、外傷性損傷または他の生理的クリーゼの直後における最も早期の時点での患者ケアを導く際の使用のために好適である。代替において、または加えて、提供される方法およびアッセイは、例えば、補体活性化の存在またはレベルによって影響される1つ以上の疾患状態に苦しむか、または罹りやすい患者のための処置を選択するための、モニターするための、および/または調節するための使用のために好適である。そのような疾患状態には、例えば、自己免疫疾患(例えば、全身性エリテマトーデスなど)が挙げられる。

40

【0010】

干渉するクロストークを回避する捕捉抗体および検出抗体のペアを注意深く選択することによって、本発明者らは驚くべきことに、ネイティブまたはインタクトなC3および/またはiC3bを含む補体活性化のバイオマーカーを、これらの分析物のためのより多くの従来の検査方法を悩ましている偽陽性結果を避けながら検出し、定量することが可能で

50

あることを見出した。本発明は様々な方式で適用され得る；本発明者らはさらに、側方流動アッセイ方式により、特に側方流動イムノアッセイ方式により、格別な利点および驚くべき特徴が提供されることを見出した。

【0011】

補体応答は、疾患に対する重要な防御システムであるが、いくつかの特徴が、臨床的に関連する期間においては特に、補体活性化の正確な測定を困難にしている。公知の技術では、補体のレベルを決定するために1時間を必要とし、しばしば2時間以上を必要とする。この期間中に、著しい、または、不可逆的でさえある、損傷が生じてしまうまでは視覚的に現れない患者状態の著しい悪化が生じつつある場合がある。加えて、補体タンパク質が、取り扱い条件および他の実験条件によって容易に活性化されることが公知である。本出願人らはとりわけ、補体を活性化するには以前には認識されていなかったレベルまたはタイプの取り扱いが実際には、アッセイ結果に著しい影響を与え得ることを発見した。恐らく最も驚くべきことに、本出願人らは、時間の経過が、取り扱いがない場合でさえ、自発的な補体活性化における重大な要因であることを本明細書中において明らかにする。

10

【0012】

本発明は、様々な問題のこれらのこれまで特定されていなかった根源に対処する技術を提供する。例えば、一部の実施形態において、本発明は、関連の工程がすべて、限られた期間の範囲内で行われる方法を提供する。本発明によれば、そのような方法は、自発的な補体活性化を最小限に抑えること、および、あるいはまたは加えて、臨床的に関連があるデータを、標準的な方法論と比較して実質的に削減された期間（これは対象からの試料採取の開始から測定される）のうちに提供することを含めて様々な利点を提供する。一部の実施形態において、提供されるアッセイは、約60分未満、約50分以下、約40分以下、約30分以下、約20分以下、約10分以下または約5分以下である期間（これは対象からの試料採取の開始から測定される）のうちに完了する。対照的に、多くの先行技術アッセイでは、データが何時間もの間にわたって提供されない。そのような時間の差は、患者にとっては生死に関わる差になり得る。

20

【0013】

本発明はさらに、全補体タンパク質レベルにおける変化（例えば、低下）を検出する先行技術アッセイに関するある問題のこれまで認識されていなかった根源を特定する。そのような先行技術アッセイの背後にある理論的根拠が、傷害または疾患が甚だしい補体活性化の引き金となり得、この結果、全補体タンパク質レベルにおける低下を生じさせ得るということである。しかしながら、本発明は、これまでに認識されていたよりも高いレベルの補体活性化が、非病源的な事象（例えば、運動など）によって個体体内において、そしてまた、取り扱いによってまたは時間の経過によってさえも試料内において誘発され得るという知見を包含する。したがって、本発明は、先行技術アッセイでは、補体タンパク質が減少する理由、または、関連性がある補体タンパク質の運命を区別することができないという点で特異性がないことを明らかにする。対照的に、本発明の様々な実施形態では、望ましくないかつ/または病理学的な補体活性化と、望ましくはなくはないかつ/または病理学的な補体活性化との区別を可能にするアッセイが提供される。例えば、いくつかのそのような提供されるアッセイにより、インタクトC3のレベルおよび/または1つ以上の活性化産物（例えば、iC3bなど）のレベルが測定される。全補体タンパク質ではなく、むしろ、補体タンパク質レベルを本発明に従って評価することにより、例えば、ライフスタイルの変化などに応じて生じることがあるような、循環している補体タンパク質における全体的低下から生じる望ましくないかつ/または病理学的な補体活性化が区別される。

30

40

【0014】

一つの態様において、本発明は、インタクトC3のレベルを対象由来の試料において検出する工程であって、該検出は、該インタクトC3と、それに対する非交差反応性抗体との特異的相互作用を伴う、工程、検出されたレベルを基準レベルと比較する工程であって、該基準レベルは約350ug/mL~約1,700ug/mLの範囲内にあり、該検出

50

されたレベルが該基準レベル未満であることが決定されることは、該対象が、望ましくな
いかつ/または病理学的な補体活性化を受けているか、あるいは受けやすいことを示す、
工程、および、必要な場合には、前記検出されたレベルが前記基準レベル未満であるなら
ば、処置を施す工程を含む方法を提供する。

【0015】

一つの態様において、本発明は、iC3bのレベルを対象由来の試料において検出する
工程であって、該検出は、該iC3bと、それに対する非交差反応性抗体との特異的相互
作用を伴う、工程、検出されたレベルを基準レベルと比較する工程であって、該基準レ
ベルは約10ng/mL~約5,000ng/mLの範囲内にあり、該検出されたレベルが
該基準レベルを超えることが決定されることは、該対象が、望ましくな
いかつ/または病理学的な補体活性化を受けているか、あるいは受けやすいことを示す、工程、および、必
要な場合には、前記検出されたレベルが前記基準レベルを超えるならば、処置を施す工程
を含む方法を提供する。

10

【0016】

一つの態様において、本発明は、インタクトC3レベル対iC3bレベルの比率を試料
において検出する工程であって、該検出は、該インタクトC3、該iC3bまたは両者と
、それに対する非交差反応性抗体との特異的相互作用を伴う、工程、検出されたレベルを
約0.001の基準比率と比較する工程であって、該検出されたレベルが該基準レベル未
満であることが決定されることは、該対象が、望ましくな
いかつ/または病理学的な補体
活性化を受けているか、あるいは受けやすいことを示す、工程、および、必要な場合には
、前記検出されたレベルが前記基準レベル未満であるならば、処置を施す工程を含む方法
を提供する。

20

【0017】

これらおよび他の目的、特徴、実施形態および利点は、後に続く詳細な説明および添付
の特許請求の範囲を読むことで当業者には明らかになるだろう。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】図1は、補体系の概略概観図を提供する。補体は、3つの主要経路によって活性
化され、これらの経路のすべてがインタクトC3の活性化に収束する。C3のタンパク質
分解的活性化は、C3分割産物C3aおよびC3bを生じさせる。C3bは、さらにタン
パク質分解的に修飾されて、C3活性化についてのバイオマーカーであるiC3bを形成
する。インタクトC3およびiC3bは、概略図において丸で囲まれている。

30

【0019】

【図2】図2は、C3活性化および非活性化の略図を提供する。インタクトC3は、C3
aおよびC3bへとタンパク質分解的に活性化される。表面に共有結合で付いているC3
b分子もあり；水と反応し、循環内に留まるものもある。C3bは、プロテアーゼ第1因
子(Factor 1)によって非活性化される。その第一の非活性化産物がiC3bで
あり、これは、短鎖ペプチドであるC3fを除去する第1因子の活性化によって形成され
る。iC3bは、C3cおよびC3dgへとさらに分解され、そのC3dgが最終的にC
3dへと分解される。

40

【0020】

【図3】図3は、抗体ペアによるインタクトC3およびiC3bの特異的認識の略図であ
る。(A)インタクトC3は、二つの抗体によって認識される：第一抗体は、インタクト
C3分子中にしか存在しないC3aを認識する；第二抗体は、インタクトC3とiC3b
の両方に存在するC3d中の領域を認識する。第二抗体は、C3およびその誘導体の他の
タンパク質分子からの識別に参与するが、iC3bとインタクトC3の識別には参与しな
い。インタクトC3に対する抗体の代替ペアとしては、C3aおよびC3fを認識する抗
体が挙げられる。(B)iC3bタンパク質は、別の抗体ペアによって認識される。第一
抗体は、前記タンパク質と、そのC3g領域付近に位置すると考えられるネオエピトープ
で接触する。このエピトープは、第1因子がC3f断片を除去すると現れる。第1因子が

50

i C 3 b を C 3 c および C 3 d g へと分解すると、そのネオエピトープは妨げられる。第二抗体は、C 3 d エピトープを認識する。i C 3 b に対する代替ペアとしては、上述の i C 3 b 抗体と、活性化された C 3 d を認識する第二のもの (Q u i d e l (登録商標) A 2 5 0) が挙げられる。

【 0 0 2 1 】

【 図 4 】 図 4 は、本発明の側方流動イムノアッセイの一つの実施形態の概略図である。

【 0 0 2 2 】

【 図 5 】 図 5 は、本発明による側方流動イムノアッセイの二つの実施形態の略図である。(A) は、単一分析物の検出のための側方流動イムノアッセイを示す。(B) は、並列メンブレンストリップで二つの別個の分析物 (インタクト C 3 および i C 3 b) を検出するための側方流動イムノアッセイを示す。

10

【 0 0 2 3 】

【 図 6 】 図 6 は、単一分析物用側方流動イムノアッセイの三つの実施形態の描画である。(A) は、全 C 3 側方流動イムノアッセイのための検査カセットを示す。(B) は、インタクト C 3 側方流動イムノアッセイのための検査カセットを示す。(C) は、i C 3 b 側方流動イムノアッセイのための検査カセットを示す。

【 0 0 2 4 】

【 図 7 】 図 7 は、インタクト C 3 および i C 3 b の評価のための、二分析物用側方流動イムノアッセイ検査カセットの二つの実施形態の描画である。(A) は、試料ローディング用の二つの独立したポートと並の二つのメンブレンストリップ (各分析物につき一つ) とを含む検査カセットを示す。(B) は、試料ローディング用の単一のポートと並列の二つのメンブレンストリップ (各分析物につき一つ) とを備えている検査カセットを示す。

20

【 0 0 2 5 】

【 図 8 】 図 8 は、全 C 3 、インタクト C 3 および i C 3 b の評価のための、三分析物用側方流動イムノアッセイ検査カセットの二つの実施形態の描画である。(A) は、試料ローディング用の三つの独立したポートと並列の三つのメンブレンストリップ (各分析物につき一つ) とを含む検査カセットを示す。(B) は、試料ローディング用の単一のポートと並列の三つのメンブレンストリップ (各分析物につき一つ) とを備えている検査カセットを示す。

【 0 0 2 6 】

【 図 9 】 図 9 は、側方流動イムノアッセイの二つの実施形態の略図である。(A) は、単一分析物の検出のための側方流動イムノアッセイを示す。(B) は、同じメンブレンストリップ上で直列に二つの別個の分析物 (インタクト C 3 および i C 3 b) を検出するための側方流動イムノアッセイを示す。

30

【 0 0 2 7 】

【 図 1 0 】 図 1 0 は、直列での複数の分析物のための側方流動イムノアッセイの二つの実施形態の描画である。(A) は、同じメンブレンストリップ上で直列に二つの分析物および一つの対照を検出するための側方流動イムノアッセイを示す。(B) は、同じメンブレンストリップ上で直列に三つの分析物および一つの対照を検出するための側方流動イムノアッセイを示す。

40

【 0 0 2 8 】

【 図 1 1 】 図 1 1 は、本側方流動イムノアッセイの三つの実施形態についての感度、ダイナミックレンジ、検査間のばらつき、およびアッセイ時間の比較を示す。(A) は、カセットケースなしで i C 3 b を検出する検査ストリップについての標準曲線グラフを示す。(B) は、検査試料容積のより制御された管理を可能にするカセットに検査ストリップを入れている、側方流動イムノアッセイの一つの実施形態の標準曲線グラフを示す。金コンジュゲーションに使用する抗体溶液の濃度は 0 . 5 m g / m L であり、B S A を反応混合物に含める。(C) は、金コンジュゲーションに使用される抗体溶液の濃度が 1 m g / m L であり、B S A を反応混合物から除去している、カセットに組み込まれた検査ストリップのもう一つの実施形態の標準曲線グラフを示す。このアッセイの感度は 1 0 n g / m L

50

に達し、ダイナミックレンジは 10 u g / m L に及ぶ。

【0029】

【図12】図12は、本明細書に記載する i C 3 b 用の側方流動イムノアッセイの1実施形態の感度を示す。感度は、 10 n g / m L から 10 u g / m L の範囲である。標準誤差は、20分の時点で3%未満である。R二乗 = 0.9892。

【0030】

【図13】図13は、本明細書に記載するインタクトC3についての側方流動イムノアッセイの1実施形態の感度を示す。感度は、 20 n g / m L から 10 u g / m L の範囲である。標準誤差は、20分の時点で3%未満である。R二乗 = 0.9964。エラーバーを示すが、プロットした点よりそれらのほうが小さい。

10

【0031】

【図14】図14は、例示的な側方流動イムノアッセイにおけるインタクトC3と i C 3 b 抗体間のクロストークを示す。

【0032】

【図15】図15は、本明細書に記載する例示的な側方流動イムノアッセイによってアッセイしたときの、一人の個体からの基礎涙液中のインタクトC3および i C 3 b レベルを12時間間隔で示す。

【0033】

【図16】図16は、正常健常個体からの全血中のインタクトC3および i C 3 b レベルを示す。結果は、健常ドナーからの全血中の i C 3 b より、およそ2500倍多いインタクトC3を示す。

20

【0034】

【図17】図17は、健常個体からの全血中のインタクトC3および i C 3 b レベルを示す。結果は、健常ドナーからの全血中の i C 3 b より、およそ333倍多いインタクトC3を示す。

【0035】

【図18】図18は、重い運動(100マイル自転車走行)の2時間後の正常個体のインタクトC3および i C 3 b レベルを示す。結果は、運動後の健常個体からの全血中の i C 3 b より、1000倍多いインタクトC3を示す。

【0036】

【図19】図19は、本明細書に開示するアッセイおよび方法での使用に好適な例示的体液の表である。

30

【0037】

【図20】図20は、ただ一つの分析物を試料から測定するために使用され得る本発明の側方流動実施形態の二つの略図を示す。(A)は本発明の例示的実施形態の概略図を示す。(B)は、本発明の様々な態様に従う例示的プロセスの概略図を示す。

【0038】

【図21】図21は、本発明の1つ以上の態様を実施する例示的方法を示す。本方法が実施されるとき、本方法がどのように見え得るかの例示的な図示、ならびに、本発明の様々な態様に従うアッセイ検査ストリップおよび検査ストリップリーダーの写真もまた示される。

40

【0039】

【図22】図22は、図23における標準曲線を作製するために、実施例に記載するような本発明のある特定の実施形態に従って使用されたアッセイ検査ストリップの写真を示す。図23における各データ点をこの図22に示される三連の測定から得た。

【0040】

【図23】図23は、試料調製後10分、20分および30分のネイティブC3タンパク質のレベルを示す、本発明の方法に従って作製されたいくつかの標準曲線を示す。

【0041】

【図24】図24は、図22に示される試料についてネイティブC3についての測定値お

50

よび図23に示されるデータにおける分散を示す。

【0042】

【図25】図25は、図26における標準曲線を作製するために使用されたアッセイ検査ストリップの写真を示す。図26における各データ点をこの図に示される三連の測定値から得た。

【0043】

【図26】図26は、試料調製後10分、20分および30分のiC3bタンパク質のレベルを示す、本発明の方法に従って作製されたいくつかの標準曲線を示す。

【0044】

【図27】図27は、本発明の方法に従ってアッセイされる場合のただ一つの血液試料からの(A)ネイティブC3および(B)iC3bの三連測定を示す。

10

【0045】

【図28】図28は、本発明の方法に従って全血、血清および血漿において測定される場合の3名のドナーからのネイティブC3レベルの測定値を示す。

【0046】

【図29】図29は、本発明の方法に従って測定され、公知のELISA法と比較される場合の血漿または血清におけるiC3bレベルの測定値を示す。パネル(A)、パネル(B)およびパネル(C)はドナー毎のデータを棒グラフ形式で示し、一方、パネル(D)は3名すべてのドナーからのデータを表形式で示す。

【0047】

20

【図30】図30は、本発明の方法に従って測定され、公知のELISA法と比較される場合の精製iC3bタンパク質の試料からのiC3bレベルを示し、かつ、本発明のアッセイまたは従来のELISAのどちらかを使用して血漿の試料から得られるデータに対する比較を示す。

【0048】

【図31】図31は、2名のドナーから得られる全血、血漿または血清の試料から測定される場合のiC3bタンパク質のレベルを示す。これらのアッセイを、試料が新鮮であるとき、または、試料が室温に4時間さらされたときに行った。

【0049】

【図32】図32は、iC3b標準曲線(「iC3b」と表示される)に対して比較される場合の、全血の試料での測定されたiC3bレベル(「血液」と表示される)に対する時間の影響を示す。試料を、(A)5分間、(B)10分間、(C)15分間または(D)20分間、室温にさらした。

30

【0050】

【図33】図33は、3名のドナーからの血漿または血清の試料における測定されたiC3bレベルを示す。各ドナーからの試料を、二つの条件のうちの一つ、すなわち、室温への五(5)分間の暴露または室温への六十(60)分間の暴露のどちらかにさらした。iC3bのレベルを暴露時間の期間中に6回の間隔で測定し、レベルを直接的な比較のためにiC3b標準曲線に対して正規化した。

【0051】

40

【図34】図34は、ヒト血漿試料におけるiC3bの生成に対する時間の影響を示す。(A)は、本発明の様々な態様に従う側方流動検査ストリップの写真を示す。(B)は、(A)に示されるストリップから読み取られる場合の経時的なiC3b生成のグラフを示す。

【0052】

【図35】図35は、ELISA方式のアッセイを使用して、(A)2分間のインキュベーションの後および(B)5分間のインキュベーションの後でのヒトの血漿試料および血清試料におけるiC3b活性化を示す。

【0053】

【図36】図36は、ELISA方式のアッセイにおいて、2分間、5分間、15分間ま

50

たは60分間のインキュベーションの後でのヒト血清の試料におけるiC3b活性化の棒グラフを示す。

【0054】

【図37】図37は、抗原：抗体複合体の非存在下における経時的なヒト血清由来C3の沈着および活性化を示す。

【0055】

【図38】図38は、抗体被覆ウェルの非存在下における経時的なヒト血清由来C3の沈着および活性化を示す。

【発明を実施するための形態】

【0056】

発明の特定の実施形態の詳細な説明

これまでは、補体活性化を処置の実施可能な期間のうちに測定するためのポイント・オブ・ケアアッセイがこの技術分野において公知でなかった。補体と疾患または外傷との様々な関連が長い間認識されていたにもかかわらず、C3がほんの少数の疾患または状態においてモニターされるだけである。そのような場合においてでさえ、現在のアッセイ法は様々な制限がある。第一に、ほとんどの場合において、従来の補体アッセイは、(例えば、濁度アッセイおよびELISAを介して)標的分析物として全C3に向けられている。全C3は、インタクト(またはネイティブ)C3ならびにC3の活性化産物および非活性化産物の組合せである。これらの検査では一般に、循環している全C3レベルにおける低下が検出される。したがって、全C3の低下したレベルは、甚だしい活性化に起因するC3枯渇化を測定するだけである。しかしながら、他の要因(例えば、食事または運動など)により、C3のより低い定常状態レベルが引き起こされ得る。全C3アッセイはターンオーバーを測定しないので、活性化の原因を区別することができない。そのうえ、全C3を測定する検査では、患者ケアを導くことにおいて有用であると思われるC3活性化シグネチャーにおけるリアルタイム変化をモニターすることができない。例えば、(低下したC3レベルを特徴とする)外傷または全身性狼瘡に罹患する患者が、改善されたC3活性化モニタリングから利益を受けるとと思われる。現在、全身性狼瘡についての処置有効性が、低下したC3レベルが正常なレベルに戻ることによって測定される。しかしながら、医師は、根底にある疾患プロセスが停止させられているか、または、恒常性機構がC3を生理学的正常なレベルに戻すように十分に阻止されているだけであるかを見分けることが困難である。

【0057】

現在のC3検査における第二の制限が、ほとんどのアッセイを行うために要求される時間である。補体活性化を検出するための典型的なELISAアッセイでは、行うために数時間が要求され、また、実験室および熟練技術者が利用できる準備ができていないことが要求される。したがって、このアッセイプラットフォームは、炎症性機能不全を示すには有用でない。これは、この場合、バイオマーカーが分単位で変化し、かつ、臨床的介入が、同様の時間スケールで要求されるからである。

【0058】

現在のC3検査における第三の制限がタンパク質カスケード自体の性質にある。補体は、悪名が高いほど細心の注意を必要とし、また、標準的な分析手順(取り扱い、貯蔵、および、分析中にC3と接触する異物への暴露)により活性化される可能性がある。補体は、侵入微生物を溶解すること、および、傷害部位における創傷治癒応答を開始させることにおいて非常に効果的である。この有効性は部分的には、C3が異物(例えば、細菌の細胞壁成分など)によって活性化される能力に起因する。この特性は、免疫応答を新しい外来病原体に向かわせることにおいて有用であるが、この同じ特性は、厄介な課題を実験研究および診断研究にもたらしている。試料取り扱いにおいて使用されるプラスチックなどの材料、試料そのものの操作、および、不適切な貯蔵条件もまた、補体活性化の引き金となり得る。所与のアッセイを行うために要求される処理工程および取り扱い工程が多くなるほど、アッセイ自体による補体の活性化に起因して、より多くの偽陽性が予想され得る

10

20

30

40

50

。そのような偽陽性は従来の検査を複雑にし、そして、現在の検査法を、患者ケアをほぼリアルタイムで導く際における使用のためには不適切にする。

【0059】

補体活性化を検査する際のさらなる検討事項が、炎症応答におけるリアルタイム変化を検出するための最も良いバイオマーカーの選択である。C3は、炎症におけるバイオマーカーとして幾つかの魅力的な品質を有する。第一に、補体系の中心的タンパク質として、C3が、補体活性化を引き起こすほとんどの刺激によって活性化される。第二に、C3が、傷害または感染の程度に比例して活性化する。第三に、C3が、生理学的傷害に対してほぼリアルタイムで応答する。補体活性化は、応答に数時間または数日を要する他の急性期炎症マーカーとは対照的に、クリーゼを引き起こす作用因子に対して直接応答して生じる。この迅速な応答特性が、臨床において頻繁に使用される他のバイオマーカーには存在しない。

10

【0060】

具体的には、インタクト（またはネイティブ）C3が炎症状態の有益なマーカーである。インタクトC3は、活性化のために利用可能であるC3の量を表す。全C3は、インタクトC3、同様にまた、すべてのC3活性化産物を表す。現在、標準的な補体アッセイでは一般に、全C3が濁度アッセイまたはELISAにより測定される。技術的には行うことがより容易であるにもかかわらず、全C3アッセイは、インタクトC3アッセイと同じくらい正確にC3枯渇化を検出することができない。インタクトC3をとりわけ経時的にモニターすることが、甚だしい補体活性化事象（例えば、外傷および他の全身的な補体活性化指標において生じる補体活性化事象など）を追跡するために有用である。インタクトC3を経時的にモニターすることにより、臨床医は、C3の枯渇化によって引き起こされる免疫抑制状態の開始を検出することが可能になる。さらに、インタクトC3は、補体活性化指数を計算するときには全C3よりも有用であり得る。インタクトC3アッセイは、部分的にはインタクトC3が非常に不安定であり、かつ、適切な取り扱いがなされないならば、変性または自己活性化し得るので、施行することまたは頼ることが困難であることが歴史的に判明している。

20

【0061】

C3分割産物、すなわち、iC3bもまた、炎症応答の有益なマーカーである。iC3bは半減期が30分～90分であり、このため、（C3aと比較して）揮発性が低く、しかし、依然として迅速に応答し得るバイオマーカーとして役立つ。しかしながら、iC3bは、患者試料においてインタクトC3よりもはるかに低いレベルで存在する。インタクトC3タンパク質とiC3b特異的アッセイとの間における小さい程度のクロストーク（例えば、1%）でさえ、偽陽性のiC3bシグナルが、正常な循環しているiC3bのレベルの2倍のレベルでもたらされる。それ故、炎症の望ましいマーカーではあるが、これまで、iC3bは、著しい課題を診断検査において引き起こしている。

30

【0062】

国際公開2010/135717（Zhangら、2010年11月25日公開）は、バイオマーカーであるインタクトC3、iC3bおよび全C3により補体活性化を評価するための方法に関する。しかしながら、Zhangらは、実験室処理および熟練技術者の専門知識を必要とする従来のサンドイッチ型イムノアッセイ（例えば、ELISAなど）に限定される。さらに、Zhangらのアッセイおよび方法は、不安定なインタクトC3を活性化させ、偽陽性の検査結果をもたらし、これにより、インタクトC3を正確に測定する能力を妨げることが知られている試料調製工程、貯蔵工程および取り扱い工程を必要とする。そのうえ、Zhangらのアッセイおよび方法は、処理するために何時間も必要であり、したがって、生理学的クリーゼ後の最も早期時点において患者ケアに影響を及ぼし得るほぼリアルタイムのデータを提供することができない。

40

【0063】

ここに開示する主題の一つ以上の実施形態の詳細を本明細書に示す。本明細書に提供する情報の研究後、本明細書に記載する実施形態に対する変形および他の実施形態が、当業

50

者には明白となるだろう。

【0064】

以下の用語は当業者によく理解されていると考えられるが、ここに開示する主題の説明を助長するために定義を示す。

【0065】

別の定義がない限り、本明細書において用いるすべての専門および科学用語は、ここに開示する主題が属する技術分野の通常の技術者が一般に理解しているのと同じ意味を有する。

【0066】

別の指摘がない限り、本明細書および特許請求の範囲で用いる成分の量および特性、例えば反応条件、などを表現するすべての数は、すべての場合、用語「約」によって修飾されていると解すべきである。したがって、相反する指摘がない限り、本明細書および特許請求の範囲に示す数値パラメータは、ここに開示する主題によって得ようと努める所望の特性に依存して変動し得る近似値である。

10

【0067】

本明細書において用いる場合、用語「約」は、質量、重量、時間、容積、濃度または百分率の値または量を指すとき、明記されている量から、一部の実施形態では±20%、一部の実施形態では±10%、一部の実施形態では±5%、一部の実施形態では±1%、一部の実施形態では±0.5%、および一部の実施形態では±0.1%の変動を包含することを意図したものである。かかる変動は、開示する方法の実施に適切であるからである。

20

【0068】

「分析物」は、評価されることとなる、例えばその量（例えば、濃度もしくは質量）、活性、組成または他の特性（単数もしくは複数）が検出、測定、定量、評価、分析などされることとなる、任意の実体、特に、化学的、生化学的または生物学的実体を意味する。「分析物」は、単一分子種である場合もあり、または多数の異なる分子種からなる場合もある。

【0069】

「抗体」は、タイプIgA、IgG（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）、IgE、IgD、IgM、IgYのインタクトおよび/または完全長免疫グロブリン、完全免疫グロブリンの抗原結合断片または一本鎖（例えば、一本鎖抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、Fd断片、scFv（一本鎖可変）およびdAb断片）、ならびに少なくとも一つの抗原結合免疫グロブリン可変領域を含む他のタンパク質、例えば、免疫グロブリン可変領域、例えば重（H）鎖可変領域（VH）および軽（L）鎖可変領域（VL）を含むタンパク質を包含する。抗体の軽鎖は、カッパタイプのものであることもあり、またはラムダタイプのものであることもある。抗体は、ポリクローナル抗体であることもあり、またはモノクローナル抗体であることもある。ポリクローナル抗体は、免疫グロブリン分子（複数）を含有し、該免疫グロブリン分子は、それらの相補性決定領域（CDR）の配列が異なり、したがって典型的には抗原の異なるエピトープを認識する。多くの場合、ポリクローナル抗体は、異なる特異性を有する抗体をそれぞれが生産する多数の異なるB細胞系統に由来する。ポリクローナル抗体は、それぞれが個々のB細胞系統に由来する幾つかの抗体垂集団で主として構成されることもある。モノクローナル抗体は、個々の免疫グロブリン分子で構成され、該個々の免疫グロブリン分子は、同じ配列のCDRを含み、したがって同じエピトープを認識する（すなわち、この抗体は、単一特異性である）。多くの場合、モノクローナル抗体は、単一B細胞系統またはハイブリドーマに由来する。抗体は、例えば、齧歯動物起源の可変ドメインがヒト起源の定常領域に融合されている「ヒト化」抗体、または相補性決定領域アミノ酸の一部もしくはすべてが、多くの場合一つ以上のフレームワークアミノ酸と一緒に、齧歯動物（例えばマウス）抗体からヒト抗体に「移植され」、それ故、齧歯動物抗体の特異性を保持する「ヒト化」抗体であることがある。

30

40

【0070】

50

もう一つの実施形態において、捕捉剤および/または検出剤は、他のリガンド、例えば、活性化C3の天然受容体（例えば、補体受容体1、2および3）、アプタマー、ペプチド、他の小分子リガンドならびにこれらに類するものを含む。

【0071】

本発明の一定の実施形態の態様は、捕捉剤および検出剤として使用するための抗体の選択である。本発明者らは、多くの発表され、市販されている抗体が、インタクトC3と様々なC3切断産物との間の、または異なるC3切断産物間のクロストークを示すことを発見した。例えば、ヒトC3aに対する一定のモノクローナル抗体は、C3bおよびiC3bとの有意な予想外の交差反応性を示す。一定の状況では交差反応性が不正確さの大きな原因となり得ることが分かった。検査したiC3b抗体の多くで観察されたインタクトC3とiC3bとの間のクロストークは、iC3b用のアッセイを開発する上で特に重要な事柄であった。さらなる検査により、これらの抗体の少なくとも一部に関してC3bとiC3bとの間のクロストークがよりいっそう重要であることが明らかになった。これはiC3bレベルが、患者試料においてインタクトC3よりはるかに低いレベルで存在すると予想されるため、重要であった。本発明の一定の実施形態の一つの態様は、かかるクロストークを最小限にするために、インタクトC3またはiC3bに対して特異性を有する抗体を選択することである。一定の実施形態では、インタクトC3またはiC3bに対して特異性を有する抗体は、実質的に交差反応性でない。この文脈で、「実質的に交差反応性でない」は、約0.1%未満の交差反応性を意味し、これは、1ug/mLのC3溶液が約1ng/mL未満のiC3bとして示されなければならないことを意味する。約0.1%閾値は、正常個体におけるインタクトC3およびiC3bの生理的レベルに基づく。正常iC3bレベルは、循環内の全C3のレベルのおおよそ0.5%である。補体活性アッセイにおいてC3クロストークがiC3bシグナルに約25%より大きく寄与すると、そのアッセイは、そのアッセイの有用性を無効にする偽陽性結果を生じさせることがある。

【0072】

「体液」は、補体活性化についてアッセイすることができる体内の任意の流体を意味する。体液としては、全血、血清、血漿、尿、涙液、唾液、創傷滲出液、気管支肺胞洗浄液および脳脊髄液が挙げられるが、これらに限定されない。好適な体液の非限定的リストについての図19を参照のこと。

【0073】

「補体活性化レベル」は、所与の時点で活性化されている補体（一般にC3）の量を意味する。インタクトC3、iC3bおよび/または全C3の量（すなわちレベル）を典型的には濃度によって表現するが、質量または重量によって表現することもある。濃度は、様々な様式で、例えば、モル濃度、重量モル濃度、モル分率、質量分率（全混合物の質量の分率としての混合物中の物質の質量）、単位容積あたりの質量などによって、表現することができる。本明細書での説明のために、濃度（例えば、単位容積あたりの質量）を一般に用いることとする。補体活性化レベルをiC3bのインタクトまたは全C3に対する比として、またはC3aの全C3に対する比として記載することもある。

【0074】

「補体関連障害」は、本明細書において用いる場合、補体活性化の修飾を特徴とする障害または状態を指す。補体関連障害の例としては、外傷、例えば、外傷性脳損傷、脊髄損傷、外科手術、および頭蓋内圧；炎症性苦痛、例えば、重症アレルギー、全身性炎症反応症候群（SIRS）；多臓器不全（MOF）、急性または成人呼吸窮迫症候群（ARDS）、敗血症ショック、およびショック；発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）；遺伝性血管浮腫（hereditary angioedema）；腎疾患、例えば、糸球体腎炎、感染症、ループス腎炎、および臓器移植を必要とする腎疾患；自己免疫疾患、例えば、I型糖尿病、炎症性腸疾患、クローン病、多発性硬化症、重症筋無力症、関節リウマチおよび全身性エリテマトーデス；虚血/再灌流障害；心疾患、例えば、心筋梗塞および心停止；妊娠（子癇前症および胎児低酸素症候群を含む）；眼疾患、例えば、加齢性黄斑変性、ドライアイ症候群、および眼感染症；臓器移植（移植拒絶反応、切迫拒絶反応（imm

inent rejection)の検出、感染症の検出、および免疫抑制薬レジメンの調整のモニタリングを含む)；感染症(敗血症、肺炎、膀胱感染症、尿路感染症、および腎感染症を含む)；ならびに神経障害(多発性硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、統合失調症、および外傷後ストレス障害を含む)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0075】

「対照」は、公知の基準補体活性化レベルを有する試料を指す。一部の実施形態において、対照は、補体関連障害を経験していない個体のもに匹敵する補体活性化レベルを有するので、対照と比較して偏差を有する補体活性化レベルを有する検査試料は補体関連障害を示す。一定の実施形態において、補体関連障害は、検査試料補体活性化レベルが対照と比較して統計学的に有意に偏差を有するときに示される。

10

【0076】

「C3活性化シグネチャー」は、本明細書において用いる場合、C3活性化レベルの経時的变化を意味する。

【0077】

「偏差を有する」および「偏差」は、本明細書において用いる場合、対照の基準レベルと比較して統計学的に有意な偏差を指す。アッセイされる分析物に依存して、偏差を有する検査試料レベルは、対照レベルを基準にして上昇することもあり、または減少することもある。

20

【0078】

対照の基準レベルと比較して「減少する」は、統計学的に有意に減少することを意味する。急性炎症反応の場合、インタクトC3レベルは、C3がその活性化産物へと分解されるにつれて枯渇する。一定の実施形態において、インタクトC3レベルは、対照の基準レベルと比較して約10%減少すると考えられる。

【0079】

対照の基準レベルと比較して「上昇する」は、統計学的に有意に上昇することを意味する。急性炎症反応の場合、iC3bレベルは、C3がその活性化産物へと分解されるにつれて増加する。一定の実施形態において、0.005の標準比と比較して上昇している、iC3bのインタクトC3に対する比は、C3活性化を示す。

30

【0080】

「エピトープ」は、かかるエピトープに結合する抗体によって認識され、したがって、かかるエピトープに結合する抗体の免疫特異性を決める、分子の最小部分を指す。非抗体特異的結合剤によって認識される分子の最小部分を指すためにもこの用語を本明細書では用いる。別の指摘がない限り、補体タンパク質に結合する特異的結合剤は、天然タンパク質中に存在して結合に利用できるエピトープ(すなわち、該エピトープはネオエピトープではない)に結合することが本明細書において推測される。

【0081】

「炎症性苦痛」または「炎症性機能不全」は、炎症反応がその炎症反応を誘導する刺激を解消または除去できないときに起こる。かかる急性症例では、そのプロセスに対する恒常性制御が減退するまで炎症反応は増加する。1つの実施形態において、本明細書に開示するアッセイおよび方法によって決定される補体活性化レベルは、個体が経験している炎症性苦痛の重症度と直接相関する。例えば、iC3b濃度がインタクトC3の約12.5%であるとき、その患者の炎症性苦痛を少し重症であると言うことができる。iC3b濃度がインタクトC3の約2.5~5%であるとき、その患者の炎症性苦痛を中等度に重症であると言うことができる。iC3b濃度がインタクトC3の5%より上であるとき、その患者の炎症性苦痛を高度に重症であると言う。患者の炎症性苦痛の重症度の理解は、その個体に対する医師の処置法についての情報を与えることができる。例えば、個体が、本明細書に開示するアッセイおよび方法によって示されるような、高度に重症の炎症性苦痛レベルを呈する場合、医師は、炎症性苦痛の最も早い時点の中で救急医療処置を施して、炎症反応からの障害を最小限にすることができる。

40

50

【0082】

「標識」は、それが付いている分子の直接的もしくは間接的検出および/または定量的もしくは相対的測定を助長する部分を指す。検出可能標識は、例えば、蛍光、化学発光、放射能、色、磁場、磁気共鳴などを検出する計器の使用により、または場合によっては目視検査により、検出可能となるシグナル、例えば蛍光、化学発光、放射能、色、磁性または常磁性性質などを、多くの場合、生じさせる。標識は、例えば、蛍光物質；色素；化学発光もしくは発光物質；着色物質；磁性体；または非磁性金属粒子、例えば金コロイドであり得る。具体的な実施形態では、本方法およびアッセイでの使用に好適な検出抗体を、色シグナルを生じさせるコロイド金標識にコンジュゲートさせる。

【0083】

「ネオエピトープ」は、補体成分または切断産物のタンパク質分解性切断の結果として生成されるかまたは検出可能になるエピトープを指す。

【0084】

本明細書に開示するアッセイおよび方法の一定の実施形態において、検査する体液試料中に存在する補体は、そのアッセイまたは方法自体によって実質的に活性化されない。この文脈で用いる場合の「実質的に活性化されない」は、本発明の方法およびアッセイに、検査方法および/または材料に起因する *in vitro* 活性化が実質的に含まれないことを意味する。このように、側方流動イムノアッセイは、迅速であり、試料操作が少なくすみ、それ故、*in vitro* 補体活性化の一因となる刺激の多くを避けられるので、補体活性化についての偽陽性検査結果を避けられる。

【0085】

「ポイント・オブ・ケア」は、本明細書において用いる場合、ベッドサイドでまたは患者の損傷現場で使用または行うことができるデバイスまたは方法を指す。ポイント・オブ・ケア検査は、一般に、処理のために検査室に試料を輸送する必要がなく、また熟練した検査技師の専門技術を必要としない。本明細書に記載するポイント・オブ・ケア方法および検査は、臨床医が患者のベッドサイドで、または外傷損傷現場またはトリアージ現場で臨床情報を受け取れることを可能にし、それにより、補体活性化を誘発する生理的クリーゼ後の極めて重要な最初の短時間のうちに患者ケアを指示することができる。

【0086】

「リーダー」は、標識によって生成されたシグナルの検出に好適な計器を指す。診断検査での標識シグナル検出用の様々な計器が当該技術分野において公知である。本発明の具体的な実施形態では、標識はコロイド金であり、リーダーは、標識によって生成される色シグナルの定性的および/または定量的検出に好適な計器である。好適なリーダーは、BioAssay Works (メリーランド州イジャムスヴィル)、Qiagen (ドイツ国ヒルデン) からの ESE-Quant、Easterline LRE (ドイツ国ネルトリンゲン) および Detekt Biomedical (テキサス州オースティン) をはじめとする様々な供給業者から市販されている。いくつかの具体的な実施形態では、リーダーは、インタクト C3、iC3b または全 C3 の量または濃度を定量する手持ち式リーダーである。

【0087】

「処置」は、本明細書において用いる場合、個体に施される任意の診断的、治療的、予防的または矯正処置を包含する。一部の実施形態において、処置は、個体に対する追加の診断検査の実施を包含する。他の実施形態において、処置は、治療的処置、例えば、個体への治療薬の投与を包含する。一定の実施形態において、前記治療薬は、抗生物質、抗炎症薬および補体インヒビターからなる群より選択される。他の実施形態において、処置は、個体が既に受けたかまたは現在受けている処置の変更を包含する。例えば、一つの実施形態において、人工呼吸器を用いる個体の処置は、その人工呼吸器の最適化を包含する。

【0088】

補体系の概観

補体系は、30 より多くの血清および細胞タンパク質を含み、先天免疫および適応免疫

10

20

30

40

50

に重要な役割を果たす。三つの主要補体活性化経路がある。古典的経路は、主として、免疫複合体、特に、抗原に結合した I g G / I g M 抗体によって活性化される。他の活性化因子としては、リポ多糖類、ミエリン、ポリアニオン性化合物、C 反応性タンパク質 (C R P) ならびに微生物 D N A および R N A が挙げられる。レクチン経路は、遊離マンノース基を有する多糖類、ならびに真菌および細菌に共通である他の糖によって活性化される。副経路は、微生物細胞壁成分を多くの場合含む「外来」物質による直接 C 3 活性化によって媒介される。補体活性化の三つの主要経路すべてが、中心的タンパク質補体成分 3 (C 3) に収束する。C 3 は、中心的な炎症媒介因子であり、炎症を引き起こす大多数の要因によって活性化される。補体系の概略外観図について図 1 および 2 を参照のこと。

【 0 0 8 9 】

古典的経路は、I g M または I g G アイソタイプに一般に属する抗体と結合している抗原の複合体である免疫複合体によって概して誘発される。次に、免疫複合体は補体成分 C 1 に結合し、該 C 1 は、C 1 q、C 1 r および C 1 s から構成される。C 1 q の抗体 - 抗原複合体への結合は、C 1 r および C 1 s の活性化を誘発する。活性化された C 1 s が次に成分 C 4 を切断して、C 4 a および C 4 b を生じさせる。C 4 b は、細胞表面に共有結合で付くことができるが、そうできるのは約 5 パーセントに過ぎない。残りの 9 5 % は、水と反応して可溶性の活性化 C 4 b を形成する。すると成分 2 は、C 4 b と結合することができ、その後、C 1 s によって C 2 a および C 2 b へと活性化される。C 4 b および C 2 a は組み合わせられて、古典的経路 (C P) C 3 コンバーターゼである C 4 b C 2 a を形成する。

【 0 0 9 0 】

この C P コンバーターゼは、C 3 を切断して C 3 a および C 3 b を形成する。活性化 C 4 b と同様に、C 3 b は、細胞表面に共有結合することができるか、または H₂O と反応し、溶液中にとどまることができる。活性化 C 3 b は、多数の役割を有する。単独で、C 3 b は、オプソニンとしての役割を果たして、より容易に食細胞に修飾細胞 (d e c o r a t e d c e l l) または粒子を取り込ませることができる。加えて、C 3 b は、C 4 b C 2 a (C P C 3 コンバーターゼ) と結合して C 5 コンバーターゼを形成することができる。C 4 b C 2 a C 3 b と称するこの複合体を C P C 5 コンバーターゼと言う。あるいは、C 3 b は、副経路 (A P) C 3 コンバーターゼと呼ばれる別の C 3 コンバーターゼのコアを形成することができる。

【 0 0 9 1 】

副経路 (A P) は、C 3 が活性化され得るもう一つのメカニズムである。典型的に、C 3 は、標的、例えば微生物表面ならびに様々な複雑な多糖類および他の材料によって活性化される。この副経路は、C 3 (H₂O) を形成する水分子による C 3 中のチオエステル結合の切断により、自発的に開始されることもある。C 3 (H₂O) は B 因子に結合し、それにより D 因子は B 因子を切断して B a および B b にすることができる。B b は、C 3 (H₂O) と結合したまま C 3 (H₂O) B b 複合体を形成し、この複合体が C 3 コンバーターゼとして作用し、C 3 を切断し、結果として C 3 a および C 3 b が得られる。

【 0 0 9 2 】

このプロセスによって、または古典的もしくはレクチン経路によって形成された C 3 b は、標的に (例えば細胞表面に) 結合し、B 因子と複合体を形成し、その後、この B 因子が D 因子によって切断され、B b になり、結果として C 3 b B b が得られ、この C 3 b B b を副経路 (A P) C 3 コンバーターゼと言う。C 3 b の別の分子の A P C 3 コンバーターゼへの結合は C 3 b B b C 3 b を生成し、この C 3 b B b C 3 b が A P C 5 コンバーターゼである。

【 0 0 9 3 】

レクチン補体経路は、マンノース結合レクチン (M B L) および M B L 結合セリンプロテアーゼ (M A S P) の炭水化物への結合によって開始される。M B 1 1 遺伝子 (ヒトでは L M A N 1 として公知) は、小胞体とゴルジ体との間の中間領域に局在する 1 型内在性膜タンパク質をコードする。M B L 2 遺伝子は、血清中で見られる可溶性マンノース結合

10

20

30

40

50

タンパク質をコードする。ヒトレクチン経路では、MASp1およびMASP2が、C3コンバーゼをもたらすC4およびC2のタンパク質分解に関与し、それが、CPについて上で説明したように、C5コンバーゼの生産につながる。

【0094】

上記三経路のいずれかによって生成されたC5コンバーゼは、C5を切断してC5aおよびC5bを生じさせる。その後、C5bは、C6、C7およびC8に結合し、これが、C9の重合を触媒し、C5b-9膜侵襲複合体(MAC)を形成する。アッセンブルしているMACは自身を標的細胞膜内に挿入し、その結果、C9分子の環によって輪郭が示される孔が形成される。MAC形成は、侵入微生物の細胞溶解を引き起こし、宿主細胞上でのMAC形成も溶解を引き起こすことがあるが、必ずしも溶解を引き起こすとは限らない。細胞膜上の溶解量以下(sublytic amount)のMACは、様々な形で細胞機能に影響を及ぼし得る。小さな切断産物C3a、C4aおよびC5aは、アナフィラトキシンであり、急性炎症反応の多数の反応を媒介する。C3aおよびC5aは、好中球およびマクロファージなどの免疫系細胞をクリーゼ領域に誘引する強力な走化性因子でもある。

10

【0095】

生理的クリーゼについてのバイオマーカーとしての補体

補体成分C3は、何らかの形態の生理的クリーゼ、例えば損傷、感染症または他の疾患プロセスに身体が反応していることの一一般警告バイオマーカーとして有用である。補体は、狼瘡、関節炎、頭蓋内出血、糖尿病、多発性硬化症、心疾患および加齢性黄斑変性をはじめとする多種多様な疾患と関連づけられている。多くの場合、疾患の重症度は、補体活性化レベルと相関する。場合によっては、補体は、疾患病態に一定の役割を果たすことがある。これらの場合、身体は、炎症の原因を首尾よく制御することができず、炎症が局所性から全身性へと進む。補体活性化は、組織を直接傷つけることもあり、または細胞を過活性化し(over-activating)、免疫細胞をリクルートし、その結果として組織破壊を生じさせることにより、間接的に組織を傷つけることもある。過活性化の例としては、アナフィラキシーショック、多臓器不全(MOF)、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)および全身性炎症反応症候群(SIRS)が挙げられる。

20

【0096】

外傷直後の期間および外傷後早期の補体活性化は十分に立証されており、幾つかの異なるメカニズムによって起こり、これらのメカニズムは三つの主要経路すべてを含む可能性が高い。タンパク質分解酵素の放出および活性化は、補体成分を直接活性化し得る。組織損傷および内皮内層の破壊は、宿主組織を通常保護する内因性補体阻害分子を欠く表面を露出させる。これらの表面は、C3bの沈着および副経路活性化を受けやすい。補体活性化は、外傷後虚血の後の組織の再灌流によっても誘発される。

30

【0097】

補体活性化は、I/R損傷、ARDS、MODS、二次的CNS損傷および敗血症に有意に寄与する重症外傷の合併症の多くにおける重要な要因であることを、多数の系統の証拠が示唆している。第一に、補体活性化がヒト外傷被害者の外傷直後の期間によくあることであることは明白であり、また幾つかの研究により、補体活性化の程度と転帰不良とに正の相関関係があることを示唆する証拠が提供されている。第二に、補体活性化はヒト外傷被害者ばかりでなく外傷の動物モデルにおいてもI/R損傷の主因であるという証拠が、かなりの数ある。第三に、補体欠損または補体インヒビターの投与は、組織損傷を低減させ、出血、I/R損傷およびCNS損傷をはじめとする様々な実験モデルにおいて転帰を向上させることが、非常に多数の研究により証明されている。

40

【0098】

幾つかの研究により、重症外傷後の逐次的な時点で外傷患者の補体活性化が測定され、補体活性化と損傷重症度との相関関係の存在が調査された。有害事象、例えばARDS、多臓器不全、敗血症および死亡も、補体活性化に関してモニタリングされた。一つの研究では、ARDSのリスクがある外傷患者において14日にわたって補体パラメータが決定

50

された。すべての患者が最初の24時間の間にC3、C4、C5のならびにインヒビターC1-INH、補体因子H(CFH)および補体因子I(CFI)の血清レベルの減少を見せ、これは、高レベルの補体活性化による消費を示していた。Cataniaら、*Immunological consequences of trauma and shock*, *Ann. Acad. Med. Singapore* 28:120-32(1999); Heckerら、*Circulating complement proteins in multiple trauma patients - correlation with injury severity, development of sepsis, and outcome*, *Crit. Care Med.* 25(12): 201524(1997); Huber-Langら、*Complement-induced impairment of innate immunity during sepsis*, *J. Immunol.* 169:3223-31(2002); Kangら、*Change of complement system predicts the outcome of patients with severe thermal injury*, *J. Burn Care Rehabil.* 24:148-53(2003); および Youngerら、*Detrimental effects of complement activation in hemorrhagic shock*, *J. Appl. Physiol.* 90:441-46(2001) 参照。

10

20

30

40

50

【0099】

補体活性化の検出および定量のためのアッセイならびにそれらの使用方法

ここに開示するアッセイおよび方法は、当該技術分野において公知の以前の補体アッセイおよび方法に勝る幾つかの利点を提供する：例えば、本アッセイおよび方法は、ポイント・オブ・ケア使用に好適であり、数時間ではなく数分で結果を生じさせる。結果の迅速な返答により、臨床医は、準リアルタイムにおけるC3活性化の変化に基づいて行動して、外傷性損傷後の極めて重要な最初の短時間のうちに、または生理的クリーゼの開始に際して患者ケアを指示することができる。提供されるアッセイおよび方法は、使用が比較的簡単であり、外部検査室または熟練した検査技師を確保できることを求めない。あるいは、または加えて、提供されるアッセイおよび方法は、取り扱い工程が少なくすみ、それ故、偽陽性検査結果をもたらす取り扱いおよび処理に起因するインタクトC3活性化を最小限にする。あるいは、または加えて、本明細書に記載する提供されるアッセイおよび方法は、補体タンパク質インタクトC3および/またはiC3b(C3の主要な活性化バイオマーカー)の測定を可能にするように注意深く選択された抗体ペアを用いる。旧来の全C3アッセイと比較して、このより正確な補体活性化測定は、C3のターンオーバー、および残存し活性化に利用できるC3の正確な量の分析を可能にする。

【0100】

本発明の一つの態様が、インタクトC3のレベルを対象由来の試料において検出する工程であって、該検出は、該インタクトC3と、それに対する非交差反応性抗体との特異的相互作用を伴う、工程、検出されたレベルを基準レベルと比較する工程であって、該基準レベルは約350ug/mL~約1,700ug/mLの範囲内にあり、該検出されたレベルが該基準レベル未満であることが決定されることは、該対象が、望ましくないかつ/または病理学的な補体活性化を受けているか、あるいは受けやすいことを示す、工程、および、前記検出されたレベルが前記基準レベル未満であるならば、望まれない補体活性化を処置するための処置を施す工程を含む方法を包含する。

【0101】

本発明の方法において用いられる試料は、本発明の特定の適用に従って変化し得る。代表的には、サンプルは、補体関連障害に罹患した個体から採取される。例示的な補体関連障害としては、外傷、炎症性苦痛、自己免疫障害、頭蓋内出血、感染症(例えば、菌血症)、移植拒絶反応、眼疾患、心疾患、虚血/再灌流障害、加齢性黄斑変性、発作性夜間ヘモグロビン尿症(paroxysmal nocturnal hemoglobinuria)(PNH)、遺伝性血管浮腫(hereditary angioedema)、腎

疾患、妊娠関連障害および神経障害が挙げられる。一部の実施形態では、前記補体関連障害は自己免疫障害である。自己免疫障害としては、体内において通常見出される組織および物質に対する不適切な免疫応答に関連した様々な疾患および状態が挙げられる。自己免疫疾患の例としては、とりわけ、全身性エリテマトーデス、筋萎縮性側索硬化症、セリアック病、クローン病、グレーブス病および関節リウマチが挙げられるが、これらに限定されない。他の実施形態では、前記補体関連障害は炎症性苦痛である。炎症性苦痛は、炎症性機能不全としても公知であり、過度の炎症に関連した様々な疾患および状態を含む。炎症性苦痛に関連した疾患および状態の例としては、臓器不全、全身性炎症反応症候群（SIRS）、成人呼吸窮迫症候群（ARDS）、敗血症、人工呼吸器関連肺炎（VAP）、呼吸窮迫および肺炎が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0102】

本発明のいくつかの態様において、前記試料は、体液またはそこから得られる試料であり得る。試料を構成し得るかまたは試料を生成するように処理され得る例示的な体液としては、全血、血清、血漿、尿、涙液、唾液、創傷滲出液、気管支肺胞（bronchoalveolar）洗浄液および脳脊髄液からなる群より選択される。好適な体液の非限定的リストについての図19を参照のこと。いくつかの実施形態では、前記体液は、補体活性化を誘発する生理的イベントの一時間以内に個体から採取され得る。他の実施形態では、前記体液は全血であり得る。

【0103】

対照の基準値（すなわち、「正常」レベル）からの偏差（個体の補体が活性化されていることを示す）に関して、補体活性化レベルを評価し得る。一例として、一定の実施形態において、検査試料中のiC3bのレベルまたは濃度は対照と比較して上昇していてもよく、このことは、C3が活性化され、その活性化産物iC3bへとさらに分割されたことを示す。さらなる例として、他の実施形態において、インタクトC3のレベルまたは濃度は対照と比較して減少しており、これは、インタクトC3がその分解または活性化産物に転換されたこと、それ故、その個体において枯渇していることを示す。

20

【0104】

一部の実施形態において、患者試料（例えば、身体体液）における「正常な」インタクトC3レベルが、下方限界と、該下方限界よりも大きい上方限界とを有する範囲内に含まれる。一部の実施形態では、前記下方限界が、30 ug/mL、35 ug/mL、40 ug/mL、45 ug/mL、50 ug/mL、55 ug/mL、60 ug/mL、65 ug/mL、70 ug/mL、75 ug/mL、80 ug/mL、85 ug/mL、90 ug/mL、95 ug/mL、100 ug/mL、110 ug/mL、120 ug/mL、130 ug/mL、140 ug/mL、150 ug/mL、160 ug/mL、170 ug/mL、180 ug/mL、190 ug/mL、200 ug/mL、210 ug/mL、220 ug/mL、230 ug/mL、240 ug/mL、250 ug/mL、260 ug/mL、270 ug/mL、280 ug/mL、290 ug/mL、300 ug/mL、350 ug/mL、400 ug/mL、450 ug/mL、500 ug/mL、550 ug/mL、600 ug/mL、650 ug/mL、700 ug/mLまたはそれより上からなる群から選択される。一部の実施形態では、前記上方限界が、2,000 ug/mL、1,900 ug/mL、1,800 ug/mL、1,700 ug/mL、1,600 ug/mL、1,500 ug/mL、1,400 ug/mL、1,300 ug/mL、1,200 ug/mL、1,100 ug/mL、1,000 ug/mL、900 ug/mL、800 ug/mL、700 ug/mL、600 ug/mL、500 ug/mL、400 ug/mL、300 ug/mLまたはそれ未満からなる群から選択される。一部の実施形態では、インタクトC3の「正常な」レベルが30 ug/mL ~ 2,000 ug/mLの範囲内に含まれる；他の実施形態では、インタクトC3の「正常な」レベルが100 ug/mL ~ 1,500 ug/mLの範囲内に含まれる；他の実施形態では、インタクトC3の「正常な」レベルが200 ug/mL ~ 1,200 ug/mLの範囲内に含まれる；他の実施形態では、インタクトC3の「正常な」レベルが200 ug/mL ~ 1,000

30

40

50

ug/mLの範囲に含まれる；他の実施形態では、インタクトC3の「正常な」レベルが200ug/mL～800ug/mLの範囲に含まれる；他の実施形態では、インタクトC3の「正常な」レベルが200ug/mL～500ug/mLの範囲に含まれる；他の実施形態では、インタクトC3の「正常な」レベルが600ug/mL～1,800ug/mLの範囲に含まれる；他の実施形態では、インタクトC3の「正常な」レベルが700ug/mL～1,700ug/mLの範囲に含まれる。

【0105】

一部の実施形態において、試料が、血液、血漿または血清である場合、インタクトC3の「正常な」レベルが300ug/mL～1,700ug/mLの範囲に含まれ得る；他の実施形態では、インタクトC3の「正常な」レベルが400ug/mL～1,400ug/mLの範囲に含まれ得る；さらに他の実施形態では、インタクトC3の「正常な」レベルが500ug/mL～1,300ug/mLの範囲に含まれ得る；さらに他の実施形態では、インタクトC3の「正常な」レベルが500ug/mL～1,200ug/mLの範囲に含まれ得る；さらに他の実施形態では、インタクトC3の「正常な」レベルが500ug/mL～1,100ug/mLの範囲に含まれ得る；さらに他の実施形態では、インタクトC3の「正常な」レベルが500ug/mL～1,000ug/mLの範囲に含まれ得る；さらに他の実施形態では、インタクトC3の「正常な」レベルが500ug/mL～900ug/mLの範囲に含まれ得る；なおさらに他の実施形態では、インタクトC3の「正常な」レベルが500ug/mL～800ug/mLの範囲に含まれ得る；なおさらに他の実施形態では、インタクトC3の「正常な」レベルが500ug/mL～700ug/mLの範囲に含まれ得る；なおさらに他の実施形態では、インタクトC3の「正常な」レベルが500ug/mL～600ug/mLの範囲に含まれ得る。

10

20

【0106】

より具体的な一例として、試料が全血である一部の実施形態では、インタクトC3の「正常な」レベルが500ug/mL～1,000ug/mLの範囲に含まれ得る。

【0107】

より具体的な一例として、試料が血漿である一部の実施形態では、インタクトC3の「正常な」レベルが700ug/mL～1,700ug/mLの範囲に含まれ得る。

【0108】

より具体的な一例として、試料が血清である一部の実施形態では、インタクトC3の「正常な」レベルが700ug/mL～1,700ug/mLの範囲に含まれ得る。

30

【0109】

他の実施形態において、試料が涙液である場合、インタクトC3の「正常な」レベルが30ug/mL～100ug/mLの範囲に含まれ得る；他の実施形態では、インタクトC3の「正常な」レベルが40ug/mL～90ug/mLの範囲に含まれ得る；さらに他の実施形態では、インタクトC3の「正常な」レベルが50ug/mL～80ug/mLの範囲に含まれ得る；さらに他の実施形態では、インタクトC3の「正常な」レベルが50ug/mL～70ug/mLの範囲に含まれ得る；さらに他の実施形態では、インタクトC3の「正常な」レベルが50ug/mL～60ug/mLの範囲に含まれ得る。

40

【0110】

一部の実施形態において、インタクトC3が、iC3bの1ug/uLの溶液により、約1ng/mL未満のC3に相当するシグナルがもたらされることを特徴とする非交差反応性抗体を使用して検出される。他の実施形態において、前記非交差反応性抗体はHM2075である。

【0111】

補体活性化レベルは、炎症性苦痛の重症度と相関し得る：補体活性化レベルが高いほど、炎症性苦痛発症のリスクが高く、および/または個体が経験する炎症性苦痛の重症度が高い。したがって、本発明のいくつかの実施形態によれば、補体関連障害は炎症性苦痛で

50

あり、インタクトC3およびiC3bのうちの一つ以上の濃度が炎症性苦痛の重症度と関連する。

【0112】

本方法によって決定される補体活性化レベルは、患者ケアを指示することができるポイント・オブ・ケア診断情報を提供し得る。補体関連障害のリスクまたは疾患もしくは障害の重症度に基づき、臨床医は、個体のための適切な処置を選択することができる。いくつかの実施形態において、前記処置は、炎症性苦痛の原因を決定するための追加の検査を個体に対して行うことを含む。例えば、呼吸のために人工呼吸器補助を必要とする重症外傷患者は、人工呼吸器関連肺炎（VAP）または非感染性炎症性機能不全のいずれかに起因する急性呼吸困難のリスクがある。補体活性化のレベルは、呼吸クリーゼの臨床的徴候が呈示される前に活動性または切迫性炎症性機能不全を指摘することができる。本アッセイおよび方法は、個体がVAPを経験しているのか、または非感染性呼吸苦痛を経験しているのかを指摘することができる。あるいは、本アッセイおよび方法は、現在の標準的実施より早い時点で追加の検査（例えば、気管支肺胞（bronchoalveolar）洗浄（BAL））を指摘することができる。個体がVAPに罹患している場合、その処置は、治療薬、例えば抗生物質または抗生物質のセットの投与を含み得る。炎症性機能不全が、非感染性手段に起因する場合、人工呼吸器調整、抗炎症薬および補体インヒビターからなる群より治療法を選択することができる。

10

【0113】

個体が全身性エリテマトーデスに罹患している場合、前記追加の検査は、遺伝的検査であり得る。個体が外傷性脳損傷または頭蓋内出血に罹患している場合、前記追加の検査は、追加の分析のための脳脊髄液試料の採取を含み得る。個体が、非治癒性創傷を含めて、創傷に罹患している場合、前記さらなる検査は、追加の分析のための創傷滲出液の試料の採取を含み得る。

20

【0114】

多くの補体インヒビターが当該技術分野において公知であり、本発明の方法での使用に好適である。いくつかの実施形態において、補体インヒビターは、天然補体インヒビターおよびその誘導体、コンプスタチンおよびその類似体、抗膜侵襲複合体（MAC）抗体、抗C3抗体、抗C5抗体、C3a受容体アンタゴニストおよびC5a受容体アンタゴニストからなる群より選択される。追加の補体インヒビターの例は、例えば、Emlenら、Therapeutic complement inhibition: new developments, Semin. Thromb. Hemost. 36(6): 660-68(2101); Wagnerら、Therapeutic potential of complement modulation, Nat. Rev. Drug Discov. 9(1): 43-56(21010); およびRicklinら、Complement-targeted therapeutics, Nat. Biotechnol. 25(11): 1265-75(2007)において見つけることができ、前記参考文献の内容はそれら全体が参照により本明細書に援用されている。

30

【0115】

本発明の方法の恩恵の一つは結果の迅速な返答であり、それにより、臨床医は準リアルタイムで補体活性化の変化に応じて患者ケアを指示することができる。当該技術分野において公知の以前の補体活性化アッセイは、十分な検査室、熟練した技師、そして完了に何時間も必要とするが、本方法およびアッセイは、それよりはるかに短い時間枠内で結果を提供する。いくつかの実施形態において、本方法は、前記試料中の補体活性化レベルの測定値を約30分以下で提供し得る。より他の実施形態では、前記方法は、試料中の補体活性化レベルを約30、約25、約20、約15、約10、約5または約3分以下で提供し得る。本方法の迅速性により、臨床医は、臨床的に重要な時間中に、補体活性化レベルを決定し、それに応じて適切な治療法を選択することができる。実際に、本方法は、ベッドサイドで、または外傷損傷現場においてさえ - 例えば、救急車内または戦場での患者トリアージの際に - 行うことができ、本アッセイおよび方法によって決定される補体活性化レ

40

50

ベルは、外傷後の極めて重要な最初の1時間のうちに患者ケアを方向づけることができる。

【0116】

本発明のもう一つの態様が、iC3bのレベルを対象由来の試料において検出する工程であって、該検出は、該iC3bと、それに対する非交差反応性抗体との特異的相互作用を伴う、工程、検出されたレベルを基準レベルと比較する工程であって、該基準レベルは約10ng/mL~約5,000ng/mLの範囲内にあり、該検出されたレベルが該基準レベルを超えることが決定されることは、該対象が、望ましくないかつ/または病理学的な補体活性化を受けているか、あるいは受けやすいことを示す、工程、および、前記検出されたレベルが前記基準レベルを超えるならば、望まれない補体活性化を処置するための処置を施す工程を含む方法を包含する。

10

【0117】

本発明の方法において用いられる試料は、種々の供給源のうちの任意のもの由来であり得る。代表的には、試料は、補体関連障害に罹患した個体から採取される。例示的な補体関連障害としては、外傷、全身性エリテマトーデス、炎症性苦痛、自己免疫障害、頭蓋内出血、感染(例えば、菌血症)、移植拒絶反応、眼疾患、心疾患、虚血/再灌流障害、加齢性黄斑変性、発作性夜間ヘモグロビン尿症(paroxysmal nocturnal hemoglobinuria)(PNH)、遺伝性血管浮腫(hereditary angioedema)、腎疾患、妊娠関連障害および神経障害が挙げられる。一部の実施形態では、前記補体関連障害は自己免疫障害である。自己免疫障害としては、体内において通常見出される組織および物質に対する不適切な免疫応答に関連した様々な疾患および状態が挙げられる。自己免疫疾患の例としては、とりわけ、全身性エリテマトーデス、筋萎縮性側索硬化症、セリアック病、クローン病、グレーブス病および関節リウマチが挙げられるが、これらに限定されない。他の実施形態では、前記補体関連障害は炎症性苦痛である。炎症性苦痛は、炎症性機能不全としても公知であり、過度の炎症に関連した様々な疾患および状態を含む。炎症性苦痛に関連した疾患および状態の例としては、臓器不全、全身性炎症反応症候群(SIRS)、成人呼吸窮迫症候群(ARDS)、敗血症、人工呼吸器関連肺炎(VAP)、呼吸窮迫および肺炎が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0118】

本発明のいくつかの態様によれば、前記試料は、体液またはそこから得られる試料であり得る。試料を構成し得るかまたは試料を生成するように処理され得る例示的な体液としては、全血、血清、血漿、尿、涙液、唾液、創傷滲出液、気管支肺胞(bronchoalveolar)洗浄液および脳脊髄液が挙げられる。好適な体液の非限定的リストについては図19を参照のこと。一部の実施形態では、前記体液は、補体活性化を誘発する生理的イベントの1時間以内に個体から採取され得る。他の実施形態では、前記体液は全血であり得る。

30

【0119】

一部の実施形態において、患者試料(例えば、身体体液)における「正常な」iC3bレベルが、下方限界と、該下方限界よりも大きい上方限界とを有する範囲内に含まれる。一部の実施形態では、前記下方限界が、75ng/mL、80ng/mL、85ng/mL、90ng/mL、95ng/mL、100ng/mL、110ng/mL、120ng/mL、130ng/mL、140ng/mL、150ng/mL、160ng/mL、170ng/mL、180ng/mL、190ng/mL、200ng/mL、210ng/mL、220ng/mL、230ng/mL、240ng/mL、250ng/mL、260ng/mL、270ng/mL、280ng/mL、290ng/mL、300ng/mLまたはそれより上からなる群から選択される。一部の実施形態では、前記上方限界が、5ug/mL、4.5ug/mL、4ug/mL、3.5ug/mL、3ug/mL、2.5ug/mL、2ug/mL、1.9ug/mL、1.8ug/mL、1.7ug/mL、1.6ug/mL、1.5ug/mL、1.4ug/mL、1.3ug/

40

50

mL、1.2 ug/mL、1.1 ug/mL、1.0 ug/mL、0.9 ug/mL、0.8 ug/mL、0.7 ug/mL、0.6 ug/mL、0.5 ug/mL、0.4 ug/mL、0.3 ug/mLまたはそれ未満からなる群から選択される。一部の実施形態では、iC3bの「正常な」レベルが100 ng/mL ~ 5 ug/mLの範囲に含まれる；他の実施形態では、iC3bの「正常な」レベルが100 ng/mL ~ 4 ug/mLの範囲に含まれる；他の実施形態では、iC3bの「正常な」レベルが100 ng/mL ~ 3 ug/mLの範囲に含まれる；他の実施形態では、iC3bの「正常な」レベルが100 ng/mL ~ 2 ug/mLの範囲に含まれる；他の実施形態では、iC3bの「正常な」レベルが100 ng/mL ~ 1.5 ug/mLの範囲に含まれる；他の実施形態では、iC3bの「正常な」レベルが200 ng/mL ~ 1 ug/mLの範囲に含まれる；他の実施形態では、iC3bの「正常な」レベルが200 ng/mL ~ 0.7 ug/mLの範囲に含まれる；他の実施形態では、iC3bの「正常な」レベルが200 ng/mL ~ 0.5 ug/mLの範囲に含まれる；他の実施形態では、iC3bの「正常な」レベルが200 ng/mL ~ 0.3 ug/mLの範囲に含まれる。

10

【0120】

一部の実施形態において、試料が、血液、血漿または血清である場合、iC3bの「正常な」レベルが150 ng/mL ~ 5,000 ng/mLの範囲に含まれ得る；他の実施形態では、iC3bの「正常な」レベルが150 ng/mL ~ 4,000 ng/mLの範囲に含まれ得る；他の実施形態では、iC3bの「正常な」レベルが150 ng/mL ~ 3,000 ng/mLの範囲に含まれ得る；他の実施形態では、iC3bの「正常な」レベルが150 ng/mL ~ 2,000 ng/mLの範囲に含まれ得る；他の実施形態では、iC3bの「正常な」レベルが150 ng/mL ~ 1,000 ng/mLの範囲に含まれ得る；他の実施形態では、iC3bの「正常な」レベルが175 ng/mL ~ 900 ng/mLの範囲に含まれ得る；さらに他の実施形態では、iC3bの「正常な」レベルが200 ng/mL ~ 800 ng/mLの範囲に含まれ得る；さらに他の実施形態では、iC3bの「正常な」レベルが200 ng/mL ~ 700 ng/mLの範囲に含まれ得る；さらに他の実施形態では、iC3bの「正常な」レベルが200 ng/mL ~ 600 ng/mLの範囲に含まれ得る；さらに他の実施形態では、iC3bの「正常な」レベルが200 ng/mL ~ 500 ng/mLの範囲に含まれ得る；さらに他の実施形態では、iC3bの「正常な」レベルが200 ng/mL ~ 400 ng/mLの範囲に含まれ得る；さらに他の実施形態では、iC3bの「正常な」レベルが200 ng/mL ~ 300 ng/mLの範囲に含まれ得る。

20

30

【0121】

より具体的な一例として、試料が全血である一部の実施形態では、iC3bの「正常な」レベルが10 ng/mL ~ 1,500 ng/mLの範囲に含まれ得る。

【0122】

より具体的な一例として、試料が血漿である一部の実施形態では、iC3bの「正常な」レベルが10 ng/mL ~ 3,000 ng/mLの範囲に含まれ得る。

【0123】

より具体的な一例として、試料が血清である一部の実施形態では、iC3bの「正常な」レベルが10 ng/mL ~ 5,000 ng/mLの範囲に含まれ得る。

40

【0124】

一部の実施形態において、試料が涙液である場合、iC3bの「正常な」レベルが1 ng/mL ~ 50 ng/mLの範囲に含まれ得る；他の実施形態では、iC3bの「正常な」レベルが1 ng/mL ~ 40 ng/mLの範囲に含まれ得る；さらに他の実施形態では、iC3bの「正常な」レベルが1 ng/mL ~ 30 ng/mLの範囲に含まれ得る；なおさらに他の実施形態では、iC3bの「正常な」レベルが1 ng/mL ~ 20 ng/mLの範囲に含まれ得る；さらに他の実施形態では、iC3bの「正常な」レベルが2 ng/mL ~ 10 ng/mLの範囲に含まれ得る；なおさらに他の実施形態では、iC3bの「正常な」レベルが4 ng/mL ~ 10 ng/mLの範囲に含まれ得る。

50

【0125】

一部の実施形態において、iC3bが、インタクトC3の1ug/mLの溶液により、約1ng/mL未満のiC3bに相当するシグナルがもたらされることを特徴とする非交差反応性抗体を使用して検出される。他の実施形態において、前記非交差反応性抗体が、A209、MCA2607およびHM2199からなる群から選択される。

【0126】

さらにもう一つの態様において、本発明は、インタクトC3レベル対iC3bレベルの比率を試料において検出する工程であって、該検出は、該インタクトC3、該iC3bまたは両者と、それに対する非交差反応性抗体との特異的相互作用を伴う、工程、検出されたレベルを約0.001の基準比率と比較する工程であって、該検出されたレベルが該基準レベル未満であることが決定されることは、該対象が、望ましくないかつ/または病理学的な補体活性化を受けているか、あるいは受けやすいことを示す、工程、および、前記検出されたレベルが前記基準レベル未満であるならば、望ましくない補体活性化を処置するための処置を施す工程を含む方法を包含する。

10

【0127】

本発明のいくつかの実施形態は、0.001~0.005の範囲における基準比率を含む。ある特定の実施形態では、前記基準比率が、0.001、0.002および0.005からなる群から選択される。

【0128】

本発明の一部の実施形態の方法において、アッセイの形式が、試料におけるインタクトC3およびiC3bのうちの1つ以上の存在または非存在を検出する側方流動イムノアッセイであり得る。前記方法の他の実施形態では、前記側方流動アッセイは全C3の存在を検出する。さらに他の実施形態では、前記側方流動イムノアッセイがリーダーによって読み取られる。より具体的な実施形態において、前記リーダーは、試料におけるインタクトC3およびiC3bの1つ以上の濃度を定量する。もう一つの具体的な実施形態において、前記リーダーは、試料における全C3の濃度を定量する。

20

【0129】

本発明の側方流動アッセイの実施形態において、米国特許第7,910,381号(Fordら)は、本発明に従って有用であるとして意図されるいくつかのそのようなアッセイを記載しており、この特許の開示は本明細書によりその全体が援用されている。開示された側方流動アッセイの様々な実施形態が現在、CFLAT(登録商標)の名称で販売されている。図20は、米国特許第7,910,381号の教示に従う側方流動アッセイキットの一つの実施形態を示す。

30

【0130】

一定の実施形態において、臨床医は、患者が受ける処置に応じた補体活性化の減少を検出し得る。それに応じて、臨床医は、投与する薬物、例えば抗炎症薬もしくは補体インヒビターの投薬を調整することにより、または補体レベルが正常(すなわち、補体関連障害を経験していない個体におけるレベル)に戻ったら処置を中止することにより、個体の処置を変更し得る。他の実施形態では、臨床医は、患者が受けている処置に応じた補体活性化レベルの上昇を検出し得る。それに応じて臨床医は、補体活性化レベルの所望の安定化または減少が達成されるまで薬物、例えば抗炎症薬または補体インヒビターの投薬量を増加させることにより、個体の処置を変更し得る。補体活性化レベルの変化が検出されない場合、臨床医は、個体の処置を変更することも、補体活性化レベルの変化が観察されるまで個体の処置レジメンを維持することに決めることもできる。

40

【0131】

図4を参照して、本発明の側方流動イムノアッセイの実施形態を本明細書に記載し、そしてこれは、セルロースメンブレンストリップ3によって構成され、該ストリップ上には、試料流体を吸収し、試料-および-粒子-コンジュゲート免疫複合体のゆるやかな移動を可能にする試料パッド1と、該ストリップの遠位端にあり、その液体試料およびコンジュゲート材料を吸収して、該セルロースメンブレンストリップ3を通り抜ける毛管移動を

50

助長するウィック6と、標識に結合した検出抗体または検出コンジュゲートを含む粒子コンジュゲートパッド2が置かれている。前記セルロースメンブレンストリップ3は検査ゾーン領域であり、該ストリップ上には、検出コンジュゲートを捕捉するための縞状のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を含む検査ライン4と、対照分析物、例えばIgGに結合し、検査が首尾よく実行されたことを使用者に知らせる抗体を含む対照ライン5とが置かれている。前記側方流動イムノアッセイは、前記セルロースメンブレンストリップ3に接着したポリエステルフィルムバックリング7と、感圧性ラミネートフィルムバックリング8とをさらに含む。各側方流動イムノアッセイを、例えば、MYLAR（登録商標）zero-vapor barrier pouchの中にパッケージングし得る。

【0132】

検査試料を試料パッド1に適用すると、試料は試料パッド1から粒子コンジュゲートパッド2まで移動し、そこで、存在する任意の標的分析物が検出抗体コンジュゲートに結合する。その後、試料は、検査ライン4に到達するまでメンブレン3を横断して移動し続け、該検査ライン4で、標的/コンジュゲート複合体は、固定されている抗体に結合して、該メンブレン上に可視ラインを生じさせる。その後、試料は、対照ライン5に到達するまでメンブレンストリップ3に沿ってさらに移動し、該対照ライン5で、前記検査ラインに結合しなかった過剰な抗体コンジュゲートが該対照ラインに結合し、該メンブレン上に第二の可視ラインを生じさせることとなる。対照ラインリガンドは、多くの場合、コンジュゲート抗体のF_e領域に対する抗体である。この対照ラインは、試料が意図したとおりにメンブレンを横断して移動したことを示す。

【0133】

一定の実施形態において、本発明による側方流動イムノアッセイは、単一の分析物の検出のための単一のメンブレンストリップを含む。他の実施形態において、前記側方流動イムノアッセイは、二つ以上の分析物を検出する。前記側方流動イムノアッセイが二つ以上の分析物を検出するとき、並列に配置された多数のメンブレンストリップで検査を構成することも（例えば、図5（B）の略図参照）、単一のメンブレンストリップ上に直列に配列された多数の検査ラインで検査を構成することもできる（例えば、図9（B）の略図参照）。

【0134】

図6を参照して、一部の実施形態では、前記側方流動イムノアッセイのメンブレンストリップは、検査試料を滴下するためのポート10と検査結果を見るためのウインドウ11とを有する検査カセット9に入れられている。図6の側方流動イムノアッセイは、単一分析物についてアッセイするように構成され、それぞれが一本の検査ライン4および一本の対照ライン5を含む。

【0135】

図7を参照して、一部の実施形態では、前記側方流動イムノアッセイは、単一の検査カセットで並行して二つの分析物について検査するように構成される。一部の実施形態において、前記側方流動イムノアッセイは、検査試料を滴下するための二つのポート10と各分析物用の独立したメンブレンストリップ3とを含む（図7（A）参照）。他の実施形態において、前記側方流動イムノアッセイは、試料を滴下するための一つのポート10と各分析物用の独立したメンブレンストリップ3とを含む（図7（B）参照）。

【0136】

図8を参照して、一部の実施形態では、前記側方流動イムノアッセイは、単一の検査カセットで並行して三つの分析物について検査するように構成され得る。一部の実施形態では、前記側方流動イムノアッセイは、検査試料を滴下するための三つのポート10と各分析物用の独立したメンブレンストリップ3とを含み得る（図8（A）参照）。他の実施形態では、前記側方流動イムノアッセイは、検査試料を滴下するための一つのポート10と各分析物用の独立したメンブレンストリップ3とを含み得る（図8（B）参照）。

【0137】

図10を参照して、一定の実施形態では、前記側方流動イムノアッセイは、単一の検査

10

20

30

40

50

カセットで直列に多数の分析物について検査するように構成され得る。図10(A)は、直列に配置された二本の検査ライン4と一本の対照ライン5とを備えているメンブレンストリップ3を含む検査カセットを示す図である。図10(B)は、直列に配置された三本の検査ライン4と一本の対照ライン5とを備えているメンブレンストリップ3を含む検査カセットを示す図である。

【0138】

ここに開示する側方流動イムノアッセイは、標的マーカーの定性的および/または定量的検出をもたらし得る。定性的には、前記メンブレン上の二本の明瞭なラインは陽性結果を提示し得、これに対して対照ゾーンの単一ラインは陰性結果を提示し得る。

【0139】

本発明のいくつかの実施形態では、補体タンパク質を含む体液試料中の補体活性化のマーカーについてのポイント・オブ・ケア検出のための例示的な側方流動イムノアッセイであって、メンブレンストリップと、前記マーカーの第一エピトープを結合する検出抗体と、前記マーカーの第二エピトープを結合する捕捉抗体を含む検査ラインと、対照分析物を結合する抗体を含む対照ラインとを含み、前記マーカーがインタクトC3およびiC3bからなる群より選択される、側方流動イムノアッセイを提供する。

【0140】

そのようなデバイスの例示的な実施形態が図20に示されており、(A)は、メンブレンストリップがニトロセルロースメンブレンストリップであり、かつ、金標識されたコンジュゲートパッドを用いる該デバイス(これはある特定の適用において望ましい)の構造の概念的完成見取り図を示し、(B)は、試料における補体活性化レベルを評価するために(A)に示される実施形態を使用する方法を示す。

【0141】

いくつかの実施形態において、前記検出抗体は、臨床医が視覚的に読み取ることができるか、または市販用リーダーによって電子的に読み取ることができるシグナルをもたらす標識を含む。様々な標識がここに開示するアッセイでの使用に好適である。具体的な実施形態では、前記標識は図20(A)で示されるとおり、コロイド金であり得る。

【0142】

いくつかの実施形態によれば、検出抗体と捕捉抗体とのペアは、C3とiC3bとの間の干渉クロストークを避けるように注意深く選択すべきである。主な懸念は、iC3bの検出のためのアッセイにおいてシグナルを生じさせるインタクトC3である。両方の分子が同じタンパク質分子に由来するので、クロストークは問題を提起し得る。正常個体ではC3がiC3bより約200倍高いレベルで存在するので、微々たる程度のクロストークでさえ、iC3bおよびC3活性化の正確な測定に大きな影響を及ぼすことがある。これは、不適当な取扱い、不適当な保管、およびさらには試薬自体が*in vitro* C3活性化の原因になり得るという事実によってさらに複雑化される。驚くべきことに、本出願人は、旧来のELISAアッセイでの使用に好適なすべての抗体が本発明のアッセイでの使用に同等に好適というわけではないことを発見した。

【0143】

下の表1および2は、本発明のアッセイでの使用に好適な抗体ペアを同定することの難しさを示す。本発明者らは、インタクトC3イムノアッセイで19の抗体ペアを、およびiC3b側方流動イムノアッセイで18の抗体ペアを分析した。これらのペアのうち、Hycult(登録商標)HM2075とMP Biomedicals(登録商標)55237は、インタクトC3側方流動イムノアッセイにおいて、交差反応がなく、最高の結果をもたらした。MP Biomedicals(登録商標)55237またはQuidel(登録商標)A250のいずれかとQuidel(登録商標)A209は、iC3b側方流動イムノアッセイにおいて最高の結果をもたらした。興味深いことに、本発明者らは、旧来のELISAアッセイでの使用に好適な抗体ペアが本明細書に記載する側方流動イムノアッセイでの使用に必ずしも同等に好適であるとは限らないことに注目した。例えば、Hycult(登録商標)HM2198は、約1%交差活性があり、検査間のばらつ

10

20

30

40

50

きが相当あるアッセイをもたらした。この交差反応性は、偽陽性 i C 3 b シグナルを正常循環 i C 3 b のものの 2 倍のレベルで生じさせた。i C 3 b レベルの実際の実験の二倍化または三倍化は、大量補体活性化のサインとなるため、1% 交差活性を伴う側方流動イムノアッセイには臨床的有用性がない。MP Biomedicals (登録商標) (55237) は、はるかに良好に機能して、臨床的有用性と適合性のある約 0.5% 未満 (約 0.05%) の交差反応性しか生じさせなかった。しかし、両方の抗体が旧来の E L I S A アッセイにおいて同様に良好に機能したことは注目に値する。

【表 1】

表 1: インタクト C3 アッセイでの抗体スクリーニング結果

捕捉抗体			検出抗体			注記
種	抗原	供給業者	種	抗原	供給業者	
マウス	C3a	Hycult (HM2075)	ヤギ	C3	MP Biomedicals (55237)	アッセイ条件下で交差反応なし
マウス	C3a	Quidel (A203)	ヤギ	C3	MP Biomedicals (55237)	アッセイ間の変動が大きすぎる
ニワトリ	C3a	GenTex (GTX78198)	ウサギ	C3d	Abcam (ab15981)	陽性読み取り値なし (機能しない)
マウス	C3a	Quidel (A203)	ウサギ	C3d	Abcam (ab15981)	C3b/iC3bとの交差反応 + + +
ヤギ	C3a	SantaCruz (sc17237)	ウサギ	C3d	Abcam (ab15981)	AbがC3aのみと反応し、インタクトC3とは反応しない場合がある
マウス	C3a	Hycult (HM2073)	ウサギ	C3d	Abcam (ab15981)	C3b/iC3bとの交差反応 +
マウス	C3a	Hycult (HM2074)	ウサギ	C3d	Abcam (ab15981)	陽性読み取り値なし
ニワトリ	C3a	Abcam (ab48580)	ウサギ	C3d	Abcam (ab15981)	陽性読み取り値なし
マウス	C3a	Hycult (HM2073)	ニワトリ	C3a	Abcam (ab48580)	陽性読み取り値なし
マウス	C3a	Quidel (A203)	ニワトリ	C3a	Abcam (ab48580)	陽性読み取り値なし
ニワトリ	C3a	Abcam (ab48580)	ヤギ	C3	MP Biomedicals (55237)	C3b/iC3bとの交差反応 + + +
マウス	C3a	Hycult (HM2073)	ヤギ	C3	MP Biomedicals (55237)	C3b/iC3bとの交差反応 + + +
ヤギ	C3a	SantaCruz (sc17237)	ヤギ	C3	MP Biomedicals (55237)	HM2073と同様、希釈血清中でのほうが良好
ウサギ	C3d	Abcam (ab15981)	マウス	C3a	Quidel (A203)	抗C3dが捕捉Abであるとき、抗C3dはC3bおよびiC3bにも結合し、それが、混合試料を分析するときインタクトC3の効率的な結合を妨げる
ウサギ	C3d	Abcam (ab15981)	ニワトリ	C3a	GenTex (GTX78198)	
ウサギ	C3d	Abcam (ab15981)	ヤギ	C3a	SantaCruz (sc17237)	
ウサギ	C3d	Abcam (ab15981)	ニワトリ	C3a	Abcam (ab48580)	
ウサギ	C3d	Abcam (ab15981)	マウス	C3a	Hycult (HM2073)	
ウサギ	C3d	Abcam (ab15981)	マウス	C3a	Hycult (HM2074)	
ウサギ	C3d	Abcam (ab15981)	マウス	C3a	Hycult (HM2074)	

10

20

【表 2】

表 2: iC3b アッセイでの抗体スクリーニング結果

捕捉抗体			検出抗体			注記
種	抗原	供給業者	種	抗原	供給業者	
マウス	iC3b	Quidel (A209)	ヤギ	C3	MP Biomedicals (55237)	アッセイ条件下で交差反応なし、良好なシグナル
マウス	iC3b	AbD serotec (MCA2607)	ヤギ	C3	MP Biomedicals (55237)	高濃度でC3b/C3cと交差反応
マウス	iC3b	AbD serotec (MCA2607)	ウサギ	C3d	Abcam (ab15981)	抗C3を使用するより、低いシグナル強度
マウス	iC3b	Quidel (A209)	ウサギ	C3d	Abcam (ab15981)	抗C3を使用するより、低いシグナル強度
マウス	iC3b	Quidel (A209)	ラット	C3d	Hycult (HM2198)	良好なシグナル、抗C3を使用するより低い
マウス	iC3b	Quidel (A209)	ラット	C3g	Hycult (HM2199)	シグナルなし
マウス	iC3b	Quidel (A209)	マウス	ネオ C3d	Quidel (A250)	HRP-抗C3を使用するより、低いシグナル強度、抗C3dを使用するより、良好な特異性
ラット	iC3b	Hycult (HM2199)	ヤギ	C3	MP Biomedicals (55237)	良好なシグナル
ラット	iC3b	Hycult (HM2199)	マウス	活性 C3	Hycult (HM2168)	弱いシグナル
ラット	iC3b	Hycult (HM2199)	マウス	活性 C3	Hycult (HM2257)	シグナルなし
ラット	iC3b	Hycult (HM2199)	マウス	iC3b	Quidel (A209)	シグナルなし
ラット	iC3b	Hycult (HM2199)	マウス	ネオ C3d	Quidel (A250)	シグナルなし
マウス	活性 C3	Hycult (HM2168)	ヤギ	C3	MP Biomedicals (55237)	C3とのクロストーク過多
マウス	活性 C3	Hycult (HM2168)	ラット	C3g	Hycult (HM2199)	弱いシグナル
マウス	活性 C3	Hycult (HM2257)	ヤギ	C3	MP Biomedicals (55237)	シグナルなし
マウス	活性 C3	Hycult (HM2257)	ラット	C3g	Hycult (HM2199)	シグナルなし
マウス	C3α	Meridian (H54189M)	ヤギ	C3	MP Biomedicals (55237)	シグナルなし
マウス	ネオ C3d	Quidel (A250)	ラット	C3g	Hycult (HM2199)	非常に低シグナル

30

40

【 0 1 4 4 】

一つの例示的な実施形態において、前記マーカーはインタクト C 3 であってもよく、前

50

記検出抗体はインタクトC3の第一エピトープを結合し、該第一エピトープはインタクトC3上に存在するC3aドメインであり、該C3aドメインはC3の活性化により失われる。さらなる実施形態において、前記マーカーはインタクトC3であり、前記捕捉抗体はC3上の第二エピトープを結合し、該第二エピトープは、インタクトC3、C3b、iC3bおよびC3d上に存在するC3dドメイン内の領域である。図3(A)参照。

【0145】

もう一つの例示的な実施形態において、前記マーカーはiC3bであってもよく、前記検出抗体はiC3bの第一エピトープを結合し、前記第一エピトープはiC3b上のネオエピトープであり、該ネオエピトープは、C3bがiC3bへと非活性化されると現れ、iC3bがC3cおよびC3dへとさらに分解されると妨げられる。さらなる実施形態において、前記マーカーはiC3bであり、前記捕捉抗体はiC3b上の第二エピトープを結合し、該第二エピトープは、C3b、iC3bおよびC3dg上にのみ存在するネオエピトープである。図3(B)参照。

10

【0146】

具体的な例では、前記マーカーはインタクトC3であり、前記捕捉抗体はHycult(登録商標)HM2075であり、前記検出抗体はMP Biomedicals(登録商標)55237である。もう一つの非常に具体的な例では、前記マーカーはiC3bであり、前記捕捉抗体はQuidel(登録商標)A209であり、前記検出抗体はMP Biomedicals(登録商標)55237である。もう一つの具体的な例では、前記マーカーはiC3bであり、前記捕捉抗体はQuidel(登録商標)A209であり、前記検出抗体はQuidel(登録商標)A250である。

20

【0147】

様々な対照分析物が、本発明の方法において該アッセイが首尾よく完了したことを実証するために用いることに好適であることは、当業者には理解されるであろう。一つの実施形態において、前記対照分析物はIgGである。

【0148】

本発明の方法のもう一つの利点は、偽陽性結果をもたらすことがある、検査自体による試料の実質的補体活性化の回避である。C3が、試料の取り扱い、保管、および外来材料または物質との接触に起因して自己活性化し得る、細心の注意を要するタンパク質であることは周知である。それ故、C3の性質は、広範な試料取り扱いおよび多数の工程を含む補体活性化についての旧来のELISAおよび濁度アッセイにおいて偽陽性をもたらし得る。本発明の方法は、試料調製および取扱い工程の低減および/または削除によって、特に例えば側方流動イムノアッセイの状況で使用される場合に、かかる偽陽性を回避する。したがって、本発明の一つの実施形態では、体液試料中の補体は、実験的に該側方流動イムノアッセイによって実質的に活性化されない。

30

【0149】

本発明のいくつかの実施形態では、単一のアッセイで一つより多くの補体活性化マーカーを検出することができる側方流動イムノアッセイを有することが望ましい。例えば、体液の同じアリコート中のインタクトC3とiC3bの両方を定性的かつ定量的に検出することができる二重側方流動イムノアッセイは、非常に望ましい場合がある。したがって、もう一つの実施形態では、補体タンパク質を含む体液試料中の補体活性化のマーカーについてのポイント・オブ・ケア検出のための側方流動イムノアッセイであって、メンブレンストリップと、インタクトC3の第一エピトープを結合する第一検出抗体と、インタクトC3の第二エピトープを結合する第一捕捉抗体を含む第一検査ラインと、iC3bの第一エピトープを結合する第二検出抗体と、iC3bの第二エピトープを結合する第二捕捉抗体を含む第二検査ラインと、対照分析物を結合する抗体を含む少なくとも一つの対照ラインを含む側方流動イムノアッセイを提供する。

40

【0150】

いくつかの実施形態において、前記第一および第二検出抗体は、シグナルをもたらす標識を含む。様々な標識がここに開示する方法での使用に好適である。いくつかの実施形態

50

において、前記標識はコロイド金である。

【0151】

本発明のいくつかの態様によれば、前記試料中の補体は、前記側方流動イムノアッセイ自体によっては実験的に実質的に活性化されない。

【0152】

いくつかの実施形態において、前記第一検出抗体はインタクトC3の第一エピトープを結合し、該インタクトC3の第一エピトープは、インタクトC3上に存在するC3aドメインであり、該C3aドメインはC3の活性化によって失われる。

【0153】

さらに他の実施形態において、前記第一捕捉抗体はインタクトC3の第二エピトープを結合し、該第二エピトープは、インタクトC3、C3b、iC3bおよびC3d上に存在するC3dドメイン内の領域である。

10

【0154】

さらに他の実施形態において、前記第二検出抗体はiC3bの第一エピトープを結合し、該iC3bの第一エピトープはiC3b上のネオエピトープであり、該ネオエピトープは、C3bがiC3bへと非活性化されると現れ、iC3bがC3cおよびC3dへとさらに分解されると妨げられる。

【0155】

なお他の実施形態において、前記第二捕捉抗体はiC3bの第二エピトープを結合し、該iC3bの第二エピトープは、C3b、iC3bおよびC3dg上にのみ存在するネオエピトープである。

20

【0156】

さらに他の実施形態において、インタクトC3を結合する抗体と、iC3bを結合する抗体は、実質的に交差反応しない。

【0157】

いくつかの実施形態によれば、前記検出および比較の工程は、30分以下で実施され得る。

【実施例】

【0158】

以下の実施例は、例示として与えるものであり、本発明の範囲を限定するためのものでは決してない。

30

【0159】

実施例1

患者トリアージ

最初の検査試料をアッセイする前に、10ng/mL、30ng/mL、100ng/mL、300ng/mLおよび1000ng/mLのインタクトC3およびiC3b標準物質を使用して標準曲線を完成する。側方流動イムノアッセイカセットを20分後に電子リーダーで読み取る。

【0160】

この検査を用いて、損傷15、30または60分以内に損傷重症度を計測する。これは、目視検査でははっきり分からない損傷を被っているかもしれない患者に最も有用である。動脈ライン(Aライン)またはフィンガースティックのいずれかで一滴の血液を採集する。容量固定ピペットを使用して10uL試料を吸い上げる。次いで試料を990uLの試料緩衝液と混合する。血液と試料緩衝液を混合する。容量固定ピペットの球部を使用して、100uLを吸い上げ、一体型インタクトC3およびiC3b検査ストリップを含んでいる側方流動イムノアッセイカセット上にピペットで置く。あるいは、100uLを独立のインタクトC3およびiC3b側方流動アッセイカセットに適用することができる。10分後、しかし40分より前に、そのカセットを好ましくはリーダーによって電子的に読み取って結果を記録する。一回目の読み取りが、血液中50μg/mLより高いiC3bレベル(または等価のiC3b:インタクトC3比)を有する場合、補体活性化および

40

50

高度炎症の証拠が存在する。スタッフは、重症損傷を想定し、ERスタッフの注意を喚起する (a l e r t)。そうでなければ、5分後に二回目の読み取りを行う。i C 3 b レベル (または等価の i C 3 b : インタクト C 3 比) が血液中 5 0 μ g / m L より高いか、i C 3 b レベルが 2 5 % より大きく増加されていた場合、患者が重症損傷を有すると想定し、ERスタッフの注意を喚起する (a l t e r)。より少ない増加または無増加は、より重症度の低い損傷を示唆するが、決定的ではない。

【 0 1 6 1 】

実施例 2

外傷患者の軌跡モニタリング (t r a j e c t o r y m o n i t o r i n g)

シフトの開始時に、ICUスタッフは、10 ng / m L、30 ng / m L、100 ng / m L、300 ng / m L および 1000 ng / m L のインタクト C 3 および i C 3 b 標準物質を使用して標準曲線を完成する。側方流動イムノアッセイカセットを 20 分後に電子リーダーで読み取る。

10

【 0 1 6 2 】

軌跡モニタリングの目的は、重症外傷後に安定した患者の炎症および免疫状態の変化を検出することである。この実施例では、肺炎または炎症性機能不全のいずれかによって引き起こされた呼吸困難を検出することができる。予想患者プロファイルは、16 以上の損傷重症度スコア (I S S) を有し、呼吸のために人工呼吸器補助を必要とする者である。

【 0 1 6 3 】

患者は、血糖値を検査する時点と同調する頻繁な間隔で補体検査を受ける。検査間のこの間隔は、通常、約二時間である。A ラインまたはフィンガースティックいずれかによる血糖検査と同じ方法を用いて、血液を採集する。容量固定ピペットを使用して 10 u L 試料を吸い上げる。次いで試料を 990 u L の試料緩衝液と混合する。血液と試料緩衝液を混合する。容量固定ピペットの球部を使用して、100 u L を吸い上げ、一体型インタクト C 3 および i C 3 b 側方流動イムノアッセイカセットを含んでいる L F A カセット (単数) 上にピペットで置く。あるいは、100 u L を独立のインタクト C 3 および i C 3 b カセット (複数) に適用する。前記カセット (単数) またはカセット (複数) を患者のベッドサイドにあるリーダーの中に置く。20 分後に読み取りを行うようにリーダーを設定する。データを収集し、i C 3 b、インタクト C 3 および i C 3 b : (インタクト C 3) 値を各時点で記録する。

20

30

【 0 1 6 4 】

インタクト C 3 もしくは i C 3 b レベルの経時的変化、または変化率の変化は、炎症状態の変化を示し得る。インタクト C 3 の減少を随伴する i C 3 b の急上昇は、切迫した呼吸困難を示す。次の行動方針として、臨床医は、患者に対して気管支肺胞洗浄 (B A L) を行って、その患者が V A P を経験しているか否かを決定する。細菌が 1 m L 当たり 10⁴ 個以上のレベルで存在する場合、V A P を指摘し、その患者を抗生物質療法に付す。そうでなければ、非感染性炎症性機能不全を想定し、その患者を抗炎症薬および / または補体インヒビターで処置することができる。その患者は、人工呼吸器設定を調整してもらうこともできる。

【 0 1 6 5 】

実施例 3

全身性エリテマトーデス (S L E) を有する患者における疾患重症度および処置の有効性の決定

最初の検査試料をアッセイする前に、10 ng / m L、30 ng / m L、100 ng / m L、300 ng / m L および 1000 ng / m L のインタクト C 3 および i C 3 b 標準物質を使用して標準曲線を完成する。側方流動イムノアッセイカセットを 20 分後に電子リーダーで読み取る。

40

【 0 1 6 6 】

この検査を用いて、初期疾患重症度、および治療の有効性を計測する。S L E 患者に対して行う標準診断の一つは、全 C 3 レベルの測定である。S L E 患者の C 3 レベルは、通

50

常低下しており、処置が成功すると正常 ($> 1 \text{ mg/mL}$) に戻る。しかし、C3活性化が抑止されたのか、または十分遅くなり、通常の補充メカニズムが可能になり、C3レベルが正常値へ回復しただけであるのかは、一般に分からない。

【0167】

各病院訪問時に、患者の血液を全C3、インタクトC3およびiC3b検査のために採集する。併せた3検査でたった一滴しか必要としない。血液は、他の検査のために採血していない限りフィンガースティックによって採集し、他の検査のために採血している場合には、その供給源から血液を得ることとなる。容量固定ピペットを使用して10uL試料を吸い上げる。次いで試料を990uLの試料緩衝液と混合する。血液と試料緩衝液を混合する。容量固定ピペットの球部を使用して、100uLを吸い上げ、全C3、インタクトC3およびiC3bを測定する一体型側方流動カセットを含んでいるLFAカセット(単数)上にピペットで置く。あるいは、100uLを独立の各アッセイ用のカセット(複数)に適用することができる。前記カセット(単数)またはカセット(複数)を病院のリーダーの中に置く。20分後に読み取りを行うようにリーダーを設定する。

10

【0168】

各病院訪問時にデータを収集する。初回病院訪問時、iC3bおよびインタクトC3検査の追加により、専門医は、患者の状態の重症度について、現在可能であるものよりも、多くの情報が得られる。専門医が患者の状態が安定していると思なすときに新たな情報を利用できるようになる。この時点でのiC3bおよびインタクトレベルは、残りの疾患プロセスの程度を示す。特にiC3bレベルが正常値より高い(一般に、 $> 1\%$)場合、基礎疾患プロセスはまだ非常に活動性であり、専門医は、抗炎症薬用量を増加させること、または追加の薬物療法を加えることによる治療法のさらなる調整を選ぶことができる。

20

【0169】

実施例4

健常個体の基礎涙液中の基礎インタクトC3およびiC3bレベルの24時間にわたる決定

最初の検査試料をアッセイする前に、 10 ng/mL 、 30 ng/mL 、 100 ng/mL 、 300 ng/mL 、 1000 ng/mL および 3000 ng/mL のインタクトC3およびiC3b標準物質を使用して標準曲線を完成する。側方流動イムノアッセイカセットを20分後に電子リーダーで読み取る。

30

【0170】

健常個体の眼におけるインタクトC3およびiC3bレベルを決定するために、合計3回の読み取りを行った。時間 = 0時間、12時間および24時間の試料を採集し、評価した。

【0171】

涙液回収のために、下瞼を引き寄せ、眼の下部にKimwipe(登録商標)を短時間、軽くあてる(dap)。次いでKimwipe(登録商標)を素早く切断し、涙染みの周囲の二、三ミリメートルの乾いた端部を残して涙液を回収する。次いでそのKimwipe(登録商標)涙液試料を220uLのBioAssay Works Diluent Bufferに入れ、十分に10秒間ボルテックスにかける。一分間待った後、その試料を再び短時間ボルテックスにかける。次に、100uLの試料を各側方流動イムノアッセイ(インタクトC3およびiC3b)に移し、アッセイする。

40

【0172】

分析のために、各カセットをリーダーに挿入し、20分後に読み取る。

【0173】

結果は、 $50 \sim 60 \mu\text{g/mL}$ のインタクトC3および $5 \sim 8 \mu\text{g/mL}$ のiC3bの範囲であった(図15参照)。

【0174】

実施例5

一時点での二人の健常個体の基礎インタクトC3およびiC3bレベルの決定

50

最初の検査試料をアッセイする前に、10 ng/mL、30 ng/mL、100 ng/mL、300 ng/mL、1000 ng/mLおよび3000 ng/mLのインタクトC3およびiC3b標準物質を使用して標準曲線を完成する。側方流動イムノアッセイカセットを20分後に電子リーダーで読み取る。

【0175】

安静時インタクトC3およびiC3bレベルを二人の健常ドナーから収集する。側方流動イムノアッセイリーダーのスイッチを入れる。アルコールスワブを使用して指を清浄にする。指にランセットを刺し、優しく押して、MICROSAFE（登録商標）Tubeを使用して毛管作用により10 uLの血液を採集する。990 mLの試料アッセイ緩衝液を満たしたチューブに血液試料を直接排出して蓋をし、6～8回反転させることによって混合した。100 uL Exact Volume Pipetを使用して100 uLの血液試料混合物をCompActインタクトC3検査に移した。次いで新たな100 uL Exact Volume Pipetを使用して第二の100 uLの血液試料混合物をCompAct iC3b検査に移した。両方の検査について20分後に読み取るようにタイマーを設定した。

10

【0176】

第一の患者からの結果は、インタクトC3についてはおおよそ500 μg/mL、およびiC3bについては200 ng/mLであると決定された。これは、この個体に2500のインタクトC3対iC3b比が存在することを示す（図16参照）。第二の個体の結果は、インタクトC3についてはおおよそ1000 μg/mL、およびiC3bについては300 ng/mLであった（図17参照）。これらの値の両方が予想正常範囲内である。iC3b値は、正常と見なされるものより低い範囲内にあった。

20

【0177】

実施例6

激しい運動後の一時点での健常個体の基礎インタクトC3およびiC3bレベルの決定
実施例5についての上記プロトコルを用いて、健常個体の一方を激しい運動後に再び検査した（図18参照）。運動はiC3bまたはC3レベルを有意に変えなかった。

【0178】

実施例7

側方流動イムノアッセイにおけるインタクトC3抗体とiC3b抗体との間のクロストーク

30

1ミリリットル容積中、50 ng/mLのiC3bを様々な量（0 ng/mLから100, 000 ng/mLの範囲）のインタクトC3と混合した。試料を6～8回反転させることによって混合し、その後、0.1 mLをピペットでカセットに置いた。20分の時点で読み取りを行った。10 ng/mLから100, 000 ng/mLまで生成した標準曲線を使用してリーダーアウトプットをiC3b濃度に変換した。緩衝液のみを用いて実行したカセットからのバックグラウンドを差し引いた。各時点でのiC3bの見かけの濃度から実際のiC3b濃度（C3を加えていないiC3b検査からのもの）を引き、その後、実際のiC3b濃度に対して正規化することによって、寄与率を計算した。図14参照。H08K-01カセットについては、検査したC3の最高濃度で、iC3bシグナルの約半分はインタクトC3から生じ、半分は実際のiC3bから生じた。J24K03バージョンについては、インタクトC3クロストークから、実際のiC3bからより4倍多いiC3bシグナルが生じた。これらの抗体ペアは、ELISAアッセイでは十分機能するが、側方流動イムノアッセイにおいて同じ分析物のために使用すると有意なクロストークを呈示する。生理的に妥当な250:1および500:1比で、インタクトC3は、J24K-03ではiC3bシグナルアウトプットにiC3b自体より大きく寄与する。

40

【0179】

J24K-03は、金コンジュゲート上にマウス抗C3aモノクローナル、および検査ライン上にマウス抗C3dモノクローナルを備えているアッセイである。H08K-01は、金コンジュゲート上にマウス抗iC3bモノクローナル、および検査ライン上に抗C

50

3 ポリクロールを有する。

【0180】

実施例 8

側方流動イムノアッセイのための iC3b 標準曲線の生成

本発明の一つの実施形態は、カセットケースを伴わない側方流動アッセイストリップを含む。これらのストリップは、金にコンジュゲートした抗 iC3b モノクローナル抗体 (Quidel (登録商標) A209) およびストリップにコンジュゲートした抗 C3 抗体 (MP Biomedical (登録商標) 55237) を有した。標準曲線を図 11 (A) に示す。これらの標準曲線は、約 10 倍の線形範囲および約 100 ng/mL の感度を示した。本発明のもう一つの実施形態は、アッセイストリップへの試料の制御適用を可能にするカセットで使用するためのストリップを構成する。これは、アッセイへの時間依存性はまだ相当にあるが、アッセイ間の再現性を向上させた。標準曲線の結果を図 11 (B) に示す。第三の実施形態は、金コンジュゲート上に適用する抗体濃度を 0.5 mg/mL から 1 mg/mL に増加させ、吸収緩衝液から BSA を除去する。標準曲線の結果を図 11 (C) に示す。

10

【0181】

標準曲線は、下の実施例 9 において説明するように生成する。

【0182】

実施例 9

側方流動イムノアッセイのための iC3b 標準曲線の生成

2 mL 蓋付チューブを使用して、十 (10) μ L の iC3b (濃度 1 mg/mL) ストックを 990 μ L の試料希釈緩衝液で希釈して 10 μ g/mL の作業用ストックを作った。10 ~ 12 回ゆっくりと反転させることによってチューブを混合した。研究員は、別の 2 mL 蓋付チューブの中で 500 μ L の 10 μ g/mL ストックを 500 μ L BAW Buffer で希釈して 5 μ g/mL ストックを作った。10 ~ 12 回チューブをゆっくりと反転させることによって混合を行った。上で説明したような 1 : 1 希釈 (500 μ L : 500 μ L) をさらに九回繰り返して、次の作業用ストックを作った: 10 μ g/mL、5 μ g/mL、2.5 μ g/mL、1.25 μ g/mL、625 ng/mL、313 ng/mL、156 ng/mL、78 ng/mL、39 ng/mL、20 ng/mL、10 ng/mL、および 0 ng/mL (緩衝液のみ)。

20

30

【0183】

標識し、三群に割り付けることにより、側方流動イムノアッセイ (LFA) カセットを調製した。各希釈について、研究員は、100 μ L の第一の作業用ストック (インタクト C3 については 10 μ g/mL、および iC3b については 5 μ g/mL) を第 1 の LFA の試料ポートにピペットで置いた。各濃度について、研究員は 20 秒待ち、その後、100 μ L の同作業用ストックを第 2 の LFA にローディングした。BioAssay Works Reader LFDR 101 (Forsite Diagnostics) を使用し、検査ライン設定、続いて対照ライン設定を用いてカセットを 10、20 および 30 分後に読み取り、データを記録した。

【0184】

実験完了後、GraphPad Prism 5 ソフトウェアを使用してデータをプロットした。標準曲線は、3 パラメータロジスティック方程式: $Y = \text{下限値} + (\text{上限値} - \text{下限値}) / (1 + EC50 / X)$ にフィットする。図 12 参照。

40

【0185】

実施例 10

側方流動イムノアッセイのためのインタクト C3 標準曲線の生成

2 mL 蓋付チューブを使用して、十 (10) μ L のインタクト (濃度 1 mg/mL) ストックを 990 μ L の試料希釈緩衝液で希釈して 10 μ g/mL の作業用ストックを作った。10 ~ 12 回ゆっくりと反転させることによってチューブを混合した。研究員は、別の 2 mL 蓋付チューブの中で 500 μ L の 10 μ g/mL ストックを 500 μ L BAW

50

Bufferで希釈して5 ug/mLストックを作った。10~12回チューブをゆっくりと反転させることによって混合を行った。上で説明したような1:1希釈(500 uL:500 uL)をさらに九回繰り返して、次の作業用ストックを作った:

【0186】

10 ug/mL、5 ug/mL、2.5 ug/mL、1.25 ug/mL、625 ng/mL、313 ng/mL、156 ng/mL、78 ng/mL、39 ng/mL、20 ng/mL、10 ng/mL、および0 ng/mL(緩衝液のみ)。

【0187】

標識し、三群に割り付けることにより、LFAカセットを調製した。各希釈について、100 uLの第一の作業用ストック(インタクトC3については10 ug/mL、およびiC3bについては5 ug/mL)を第1のLFAの試料ポートにピペットで置いた。各濃度について、研究員は20秒待ち、その後、100 uLの同作業用ストックを第2のLFAにローディングした。BioAssay Works Reader LFDR 101(Forsite Diagnostics)を使用し、検査ライン設定、続いて対照ライン設定を用いてカセットを10、20および30分後に読み取り、データを記録した。

10

【0188】

実験完了後、GraphPad Prism 5ソフトウェアを使用してデータをプロットした。標準曲線は、3パラメータロジスティック方程式: $Y = \text{下限値} + (\text{上限値} - \text{下限値}) / (1 + EC50 / X)$ にフィットする。図13参照。

20

【0189】

実施例11

CompAct(商標)側方流動アッセイ手順の実施形態

図21は側方流動方式イムノアッセイの例示的な実施形態を示す。最初、患者の指をアルコールスワブにより清浄化し、指にランセットを刺す。その後、指を圧搾して、血液の提示を容易にし、その後、血液をMicrosafe(商標)チューブに集める。血液をMicrosafe(商標)チューブからCompAct(商標)検査カセットの試料ポートの中に直接に排出する。次に、3滴のアッセイ緩衝液を試料ポートの中に加えて、血液試料と混合し、希釈する。試料を所定の期間(例えば、15分間~20分間)静置する。所望されるならば、第二の血液試料が記載されるように採血される場合があり、その後、この試料は第二のCompAct(商標)検査カセット(「B」)に導入される場合がある。所望の期間が終了したときまたは終了する前のある時点において、それぞれの検査カセットが、対照ラインが容易に視認されること、および、試料の不鮮明化が、データの読み取りにおいて問題を引き起こす可能性がないことを確実にするために目視検査され得る。所望の期間が経過したら、各検査カセットが、例えば、図21に示されるように、各検査からのデータを捕捉するために読み取りデバイスに導入され得る。図21にはまた、清浄化手順および試料抽出手順の概念的スケッチ、ならびに、本発明の範囲内であると意図される検査カセットおよび検査リーダーの写真が示される。

30

【0190】

実施例12

ヒトC3についてのCompAct(商標)側方流動アッセイ実施形態の感度

10(10) μLの精製ヒトC3タンパク質(Complement Technology, Inc., #A113、1 mg/mL)ストックを990 uLの試料希釈緩衝液(Sample Diluent Buffer)(BioAssay Works, ISOT-003)で希釈して、2 mL蓋付チューブ中に10 ug/mLの作業用ストックを作った。10~12回ゆっくりと反転させることによって作業用ストックを混合した。研究員は、別の2 mL蓋付チューブの中で500 uLの10 ug/mLストックを500 uL BAW Bufferで希釈して5 ug/mLストックを作った。10~12回チューブをゆっくりと反転させることによって混合を行った。上で説明したような1:1希釈(500 uL:500 uL)をさらに九回繰り返して、次の作業用ストックを作った:

40

50

10 ug / mL、5 ug / mL、2.5 ug / mL、1.25 ug / mL、625 ng / mL、313 ng / mL、156 ng / mL、78 ng / mL、39 ng / mL、20 ng / mL、10 ng / mL、および0 ng / mL（緩衝液のみ）。

【0191】

側方流動アッセイ（LFA）カセットにラベルをつけ、3つからなる群で配置することによって準備した。三連検査の各セットを写真撮影し（60mmのAF Micro Nikkorレンズを取り付けたNikon D80）、画像を、Paintアプリケーションを使用して1枚の画像に組み合わせた。各レプリケートの写真を図22に見ることができる。

【0192】

各希釈物について、100 uLの第一作業用ストック（インタクトC3については10 ug / mLおよびiC3bについては5 ug / mL）を第一LFAの試料ポートにピペットで注入した。各濃度について、研究員は20秒待ち、その後、100 uLの同作業用ストックを第二LFAにローディングした。カセットを、検査ライン設定、続いて対照ライン設定を使用するBioAssay Works Reader LFDR-001（Forsite Diagnostics）を使用して10分後、20分後および30分後に読み取り、データを記録した。各時点についてのサンドイッチ値を下記のように百分率として計算した：[検査ライン] / [対照ライン] × 100%。結果を図23に示す。本実施例で使用されるアッセイの変動性の評価を計算した。この評価を図24に示す。

【0193】

実施例13

ヒトiC3bについてのCompAct（商標）側方流動アッセイ実施形態の感度
 十（10）μLの精製ヒトiC3bタンパク質のストック（Complement Technology, Inc.、#A115、濃度：1mg / mL）を990 uLの試料希釈剤緩衝液（BioAssay Works、ISOT-003）で希釈して、2mLの蓋付チューブにおいて10 ug / mLの作業用ストックを作製した。この作業用ストックを、10回～12回ゆっくり反転することによって混合した。研究員は10 ug / mLのストックの500 uLを500 uLのBAW Bufferで希釈して、5 ug / mLのストックを別の2mLの蓋付チューブにおいて作製した。混合を、チューブを10回～12回ゆっくり反転することによって行った。この1：1希釈（500 uL：500 uL）をさらに9回、上記のように繰り返して、下記の作業用ストックを作製した：10 ug / mL、5 ug / mL、2.5 ug / mL、1.25 ug / mL、625 ng / mL、313 ng / mL、156 ng / mL、78 ng / mL、39 ng / mL、20 ng / mL、10 ng / mLおよび0 ng / mL（緩衝液のみ）。

【0194】

側方流動イムノアッセイ（LFA）カセットにラベルをつけ、3つからなる群で配置することによって準備した。三連検査の各セットを写真撮影し（60mmのAF Micro Nikkorレンズを取り付けたNikon D80）、画像を、Paintアプリケーションを使用して1枚の画像に組み合わせた。各レプリケートの写真を図25に見ることができる。

【0195】

各希釈について、研究員は、100 uLの第一の作業用ストック（インタクトC3については10 ug / mL、およびiC3bについては5 ug / mL）を第1のLFAの試料ポートにピペットで置いた。各濃度について、研究員は20秒待ち、その後、100 uLの同作業用ストックを第2のLFAにローディングした。BioAssay Works Reader LFDR 001（Forsite Diagnostics）を使用し、検査ライン設定、続いて対照ライン設定を用いてカセットを10、20および30分後に読み取り、データを記録した。各時点についてのサンドイッチ値を下記のように百分率として計算した：[検査ライン] / [対照ライン] × 100%。結果を図26に示す。

【0196】

10

20

30

40

50

実施例 14

側方流動アッセイ実施形態を使用するヒトのネイティブC3およびiC3bの評価

全血を、安全ランセット (Fisher Healthcare、02-675-160) を使用してフィンガースティックにより採取し、ピペットにより2 mLのチューブに移した。次に、30 μ Lの血液を直ちに、別個の2 mLのチューブにおいて270 μ Lの Sample Diluent Buffer (BioAssay Works、ISO T-003) で希釈し、この1:10血液希釈物の100 μ LをiC3b LFAに適用した。この1:10血液希釈物を Sample Diluent Buffer でさらに希釈して1:3162の最終濃度にし、100 μ LをC3 LFAに適用した。検査ラインおよび対照ラインを、リーダー (Forsite、#LFDR-001) を使用して20分および30分で各検査について読み取り、三連の試料を各データ点のために流した。ネイティブC3およびiC3bの推定濃度を、試料についてのサンドイッチ値および特定のアッセイについての標準曲線を使用して導いた。これらのアッセイについてのデータを図27に示す。

【0197】

実施例 15

ヒトの全血、血漿および血清の試料からのヒトC3レベルの評価

本研究では、全血、血漿および血清のヒトドナー試料をネイティブC3のレベルおよびiC3bのレベルについて分析した。3名のドナーが、試料を、1週間の期間中に1日目、2日目および5日目での三つの異なる時点で採取された。試料を抽出し、それをカセットに導入するために使用される手順は実質的には、実施例11に記載される通りであった。全血試料はCompAct (商標) 側方流動アッセイ検査により抽出後直ちに検査され、一方、血漿試料および血清試料は調製され、CompAct (商標) 側方流動アッセイ検査または標準的ELISAアッセイのどちらかにより検査された。

【0198】

CompAct (商標) 側方流動アッセイを用いて検査される試料については、血漿-EDTAおよび血清を製造業者のプロトコル (Becton, Dickinson and Company) に従って新鮮な全血から調製し、小分けして-80 で冷凍した。アリコート氷上で解凍し、CompAct (商標) アッセイによりアッセイした。推定されるiC3b濃度を精製タンパク質の標準曲線から得た。

【0199】

標準的ELISAアッセイで検査される試料については、下記の手順を使用した。最初に、96ウェルプレートを、1 x PBSにおいて2 μ g/mLに希釈されたモノクローナル抗体の50 μ Lを使用して被覆した。ヒトC3のELISAアッセイのために、Immulon 4 HBXプレート (Thermo Scientific、3855) をマウス抗ヒトC3/C3aモノクローナル抗体 (Cell Sciences、HM2075) により被覆した。ヒトiC3bのELISAアッセイのために、Immulon 1 B 96ウェルプレート (Thermo Scientific、3355) をマウス抗ヒトiC3bモノクローナル抗体 (Quidel、A209) により被覆した。これらのELISAプレートを室温で1時間~2時間インキュベーションした。モノクローナル抗体を含有する液体を捨て、各ウェルを1 x PBS-Tween (0.05%) (PBS-T) により2回洗浄した。次に、ウェルを200 μ LのStarting Block緩衝液 (Thermo Scientific、37538) によりブロッキング処理し、室温で1時間インキュベーションした。その後、緩衝液を捨て、セルを1 x PBS-Tにより3回洗浄した。精製タンパク質の標準物を別個のマイクロタイタープレート (Thermo Fisher、#9205) において1 x PBSで希釈して1 μ g/mLの濃度にした。使用されるヒトC3標準物はComplement Technology, Inc.からのものであり (#A113)、使用されるヒトiC3b標準物もまたComplement Technology, Inc.からのものである (#A115)。その後、それぞれの標準物を、等体積の1 x PBSを使用して連続希釈した。

10

20

30

40

50

【0200】

それぞれの血漿試料および血清試料を上記のように全血から調製し、その後、別個のマイクロタイタープレートに1×PBSにおいて1:20に希釈し、その後、1×PBSを使用して連続希釈した。その後、50 uLの各希釈試料をELISAプレートの適切なウェルに移し、室温で1時間インキュベーションした。その後、液体を捨て、各ウェルを、1×PBS-Tを使用して6回洗浄した。五十(50) uLのヤギ抗C3-HRP(MP Biomedicals、#55237)をStarting Block緩衝液で1:2000に希釈し、ELISAプレートの各ウェルに加えた。その後、試料を室温で1時間インキュベーションした。その後、液体を捨て、各ウェルを、1×PBS-Tを使用して6回洗浄した。TMB西洋ワサビペルオキシダーゼ基質(Thermo Fisher、#1854060および#1854050)の1:1混合物の五十(50) uLを各ウェルに加えた。3分後、25 uLの1M H₂SO₄を各ウェルに加えて、反応を停止させた。その後、ELISAプレートを、BMG Labtech POLARstart Omegaプレートリーダーを450 nmにおいて使用して分析した。これらの実験の結果を図28および図29において見ることができる。

10

【0201】

図28は、本発明のCompAct(商標)側方流動アッセイ実施形態を使用して評価されるヒトC3タンパク質のレベルが一般に、ELISA法を使用して得られた文献において認められるレベルに匹敵することを示す。

20

【0202】

図29は、血漿試料および血清試料において検出されるiC3bタンパク質のレベルが、CompAct(商標)側方流動アッセイ実施形態と、既知のELISA法との間で有意に異なることを示す。(A)、(B)および(C)に示すデータは、ドナー毎による棒グラフとして示され、一方、(D)におけるデータは表において数値で示される。これは、本発明の方法およびアッセイの利点を強調する驚くべき結果であった。特定の理論にとらわれることを望まないが、出願人は、CompActアッセイを使用してアッセイされるiC3bの有意により低いレベルが、はるかにより遅くより多いELISA法と対比して、データが得られる迅速な速度に起因し得ることを提案する。反応時間を短くすることで、試料中の因子が補体タンパク質に作用して、潜在的に補体タンパク質を活性化させることがないようにすることが可能である。ELISAによって要求される操作工程および取り扱い工程の増大した数はまた、例えば、インタクトC3と活性化剤との相互作用を容易にすることにより、同様な様式でこれらの結果に寄与するものであり得る。

30

【0203】

この仮説が、iC3bの精製試料が使用されるときには、CompAct(商標)検査およびELISA検査の両方が類似したデータをもたらすことが明らかである図30に示されるように裏づけられる。しかしながら、体液由来の試料が使用されるときには、結果が有意に変化する。これらの結果の背後にあるメカニズムにかかわらず、同じ試料でのiC3bの検出レベルにおけるそのような大きい違いは、誤った臨床診断を容易に引き起こす場合があり、このことから、本発明の実施形態の利点の一つが強調され得る。

40

【0204】

実施例16

検出されたiC3bレベルに対する時間の影響

室温にさらされる試料において検出されるiC3bのレベルに対する時間の影響を、CompAct(商標)アッセイを使用して評価しようとする取り組みにおいて、実施例15で得られる全血、血漿および血清の希釈試料を室温での4時間の後で再検査した。他のアッセイ法およびアッセイ条件は、実施例15に記載されるのと同じであった。データを図31に示す。データは、iC3bのレベルにおけるおよそ100倍の増大が室温での時間経過に起因して各試料において認められることを明瞭に示す。以前には知られていないこの影響は、iC3bレベルにおける実質的な増大が室温において速やかに生じることを強く示している。このことから、本発明の実施形態の利点、および、データを得るために

50

数時間を必要とするこれまでの方法（ELISAアッセイを含む）によって生じる潜在的な誤ったデータがさらに強調される。

【0205】

様々な試料における経時的なC3活性化の増大に関してのより良好な解決策を達成しようとする取り組みにおいて、上記の実施例15で得られる全血試料、血漿試料および血清試料のアリコート、C3活性化がどのくらい速く観察され得るかを明らかにするために異なる時点で評価した。

【0206】

図32は、全血の試料において本発明のCompAct（商標）アッセイ実施形態を使用して検出されるiC3bのレベルを、精製iC3bタンパク質の標準物を含有する試料と比較して示す。試料を、5分間、10分間、15分間または20分間の室温への暴露の後で検査し、これらのアッセイを、実質的には実施例15に記載されるように行った。（A）は、iC3bにおけるいくらかの増大が、室温でのほんの5分の後で全血において検出され得ることを示す。この増大の程度は、（B）、（C）および（D）におけるデータの増大する傾きによって認められ得るように経時的に加速するようである。

10

【0207】

図33は、5分間または60分間の室温への暴露の後で本発明のCompAct（商標）アッセイ実施形態において検出されるiC3bレベルにおける違いを示す。血漿および血清の試料を実施例15について上記に記載されるように得て、調製した。図33において認められ得るように、検出されるiC3bレベルにおける増大が60分では5分よりもはるかに口バストであった。加えて、また、予想外であったが、iC3bレベルにおける増大は、経時的な傾きにおける有意な変化によって立証されるように、経時的に一樣に増大するわけではないようである。この現象は、さらなる層の複雑性を補体活性化の適正な分析に加えており、アッセイの時間および処理を最小限に抑えることの重要性をさらに強調する。本発明のいくつかの実施形態は、補体活性化の検出におけるこのようなこれまで知られていなかった問題に対処する。

20

【0208】

実施例17

ヒト血漿におけるiC3bの時間依存的生成

本実施例では、健常ドナーからのヒト血漿をSample Diluent Bufferで1:10に希釈し、iC3b LFAストリップにより直ちにアッセイした。希釈血漿を室温でインキュベーションし続け、30分間、1時間、2時間、4時間および72時間（3日間）のさらなるインキュベーション時間の後で検査した。各時点についての検査ラインおよび対照ラインを、試料をLFAに加えた30分後にリーダー（Forsite、#LFD R-001）によって読み取った。サンドイッチ値を、緩衝液単独試料から検査ラインシグナル（示されず）を差し引いた後で百分率（検査ライン/対照ライン×100%）として計算した。図34は血漿におけるiC3bの時間依存的活性化を示し、（A）はインキュベーション後の検査ストリップを示し、（B）は、Forsiteリーダーによって読み取られるときのデータを示す。（B）のグラフは、時間がX軸上に、サンドイッチ値がY軸上にプロットされる。

30

40

【0209】

実施例18

ELISAを使用するヒト血漿およびヒト血清におけるiC3bの時間依存的生成

本実施例では、図35に示すように、健常ドナーからのヒト血漿およびヒト血清をELISA Bufferで連続希釈し、抗iC3bモノクローナル抗体により被覆されるウェルとともに、（A）2分間または（B）5分間インキュベーションし、その後、インキュベーションを除去および洗浄によって停止させた。その後、すべてのウェルを検出のためのHRPコンジュゲート化抗C3ポリクローナル抗体とともにインキュベーションした。精製iC3bタンパク質もまた希釈し、血漿試料および血清試料と並行して、示される時間にわたってインキュベーションして、図35に示すような各時点についての標準曲線

50

を作製した。希釈血清における $iC3b$ の濃度を各時点についての対応する $iC3b$ 標準曲線から導いた。

【0210】

図35の(A)および(B)が示すように、ヒトの血漿および血清における $iC3b$ の活性化が、非常に素早く生じ得、それは場合によっては2分もの素早さでさえあり得る。ヒト血清における $iC3b$ の活性化が本実施例では特に強かった。この活性化から、ELISA型アッセイを使用して分析される試料に対して時間が有し得る劇的な影響が強調される。

【0211】

別の実験において、健常ドナーからのヒト血清をELISA Bufferで連続希釈し、抗 $iC3b$ モノクローナル抗体により被覆されるウェルとともに、示される時間にわたってインキュベーションし、その後、インキュベーションを除去および洗浄によって停止させた。その後、すべてのウェルを検出のためのHRPコンジュゲート化抗C3ポリクローナル抗体とインキュベーションした。精製 $iC3b$ タンパク質もまた希釈し、希釈血清と並行して、示される時間にわたってインキュベーションして、各時点についての標準曲線を作製した。希釈血清における $iC3b$ の濃度を各時点についての対応する $iC3b$ 標準曲線から導いた。図36は、これらの試料において経時的に検出される $iC3b$ の相対的レベルを示しており、 $iC3b$ レベルの倍増が、15分という短いインキュベーションによって示される。

10

【0212】

実施例19

抗原：抗体複合体の非存在におけるC3活性化

ウェルを抗オボアルブミン抗体（これはC3も $iC3b$ も認識しない）により被覆し、Starting Block Buffer (Pierce 37538)によりブロッキング処理した後、ヒト血清をこのようなウェルにおいてVeronal Buffer (Lonza、12-624E)で希釈し、10mMのEDTAの存在下/非存在で10分間または60分間インキュベーションした。洗浄後、ウェルを、Peroxide Solution (Thermo Sci.、1854060)およびPeroxidase SubstrateのTMB (Thermo Sci.、1854050)を使用する検出のためのHRPコンジュゲート化抗C3ポリクローナル抗体とともに60分間イン

20

30

【0213】

図37は、本実験における血清由来C3がOVA被覆プレートでの10分間または60分間のインキュベーションの後で有意に活性化されたことを示す。特定の理論にとらわれることを望まないが、この活性化はEDTA感受性の活性化経路を介してであると思われる。C3の沈着がオボアルブミンの非存在下において抗オボアルブミン抗体被覆ウェルの表面に生じたことは注目すべきことであり、このことは、オボアルブミン：オボアルブミン抗体複合体がC3の活性化および沈着のために要求されないことを示す。この非常に予想外の結果は、観察されたC3沈着がおそらくは、ELISAアッセイに通常的に伴う従来の捕獲現象により生じていないことを意味する。

40

【0214】

実施例20

抗体被覆ウェルの非存在下におけるC3活性化

ウェルを（抗体の非存在下で）Starting Block Bufferによりブロッキング処理し、ヒト血清をこのようなウェルにおいてVeronal Buffer (Lonza、12-624E)で希釈し、10mMのEDTAの存在下/非存在で10分間または60分間インキュベーションした。洗浄後、ウェルを、Peroxide Solution (Thermo Sci.、1854060)およびPeroxidase SubstrateのTMB (Thermo Sci.、1854050)を使用する検出のためのHRPコンジュゲート化抗C3ポリクローナル抗体とともに60分間インキ

50

ューベーションした。ウェルを450nmにおいて吸光度について読み取った。

【0215】

図38は、ヒト血清由来のC3が明らかに、EDTA感受性経路を介して活性化され、抗体の非存在下において緩衝液によりブロッキング処理されるウェルの表面に沈着することを示す。したがって、実施例19で示されるように、抗原：抗体複合体がC3の活性化および沈着のために要求されないだけでなく、抗体さえもが、この現象を観察するために要求されない。上記の実施例19の場合と同じように、この非常に予想外の結果は、観察されるC3沈着が、ELISAイムノ検出に通常的に伴う捕獲現象でないことを示している。

【0216】

本発明の特定の実施形態を例証し、説明したが、本発明の精神および範囲から逸脱することなく様々な他の変更および変形をなすことができることは当業者には明らかなことであろう。したがって、本発明の範囲内であるすべてのかかる変更および変形は、添付の特許請求の範囲に包含されると解釈される。

【図2】

C3はプロテアーゼ活性によって活性化および非活性化される

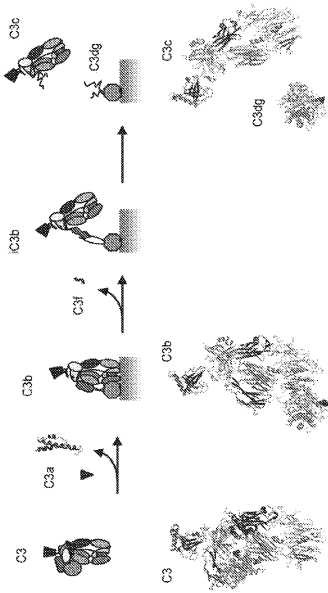


FIG. 2

【図3】

インタクトC3またはC3bのいずれかを認識する抗体ペア

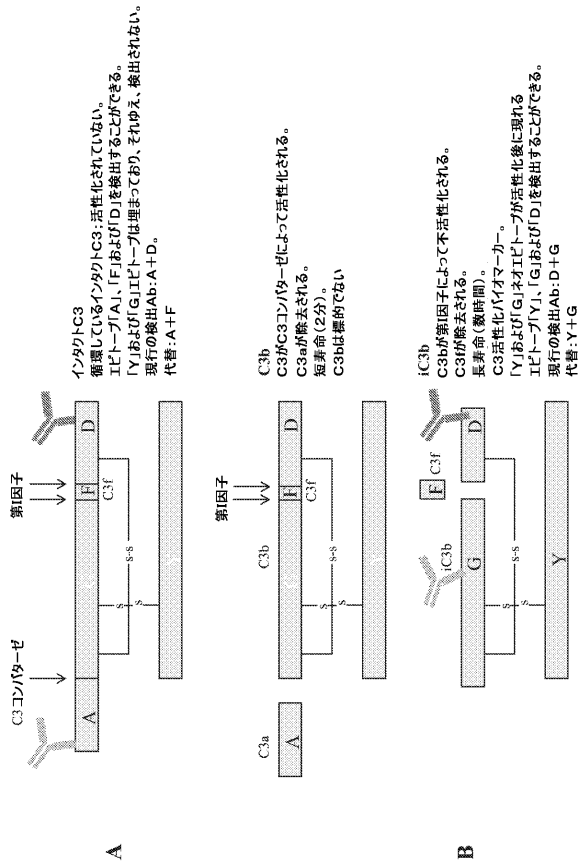


FIG. 3

【 図 4 】

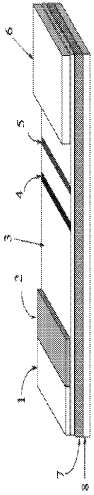


FIG. 4

【 図 5 】

並列での単一および二重側方流動イムノッセイメンプレストリップ

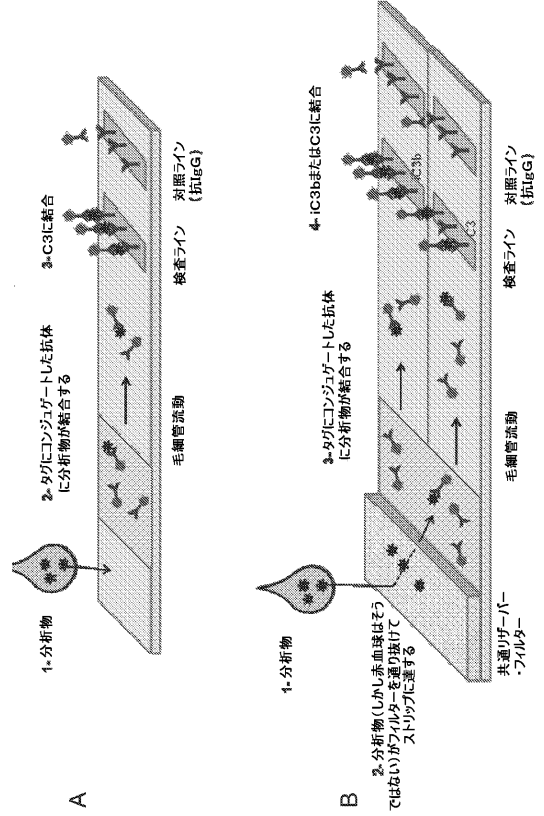


FIG. 5

【 図 6 】

単一分析物用側方流動イムノッセイ検査カセット

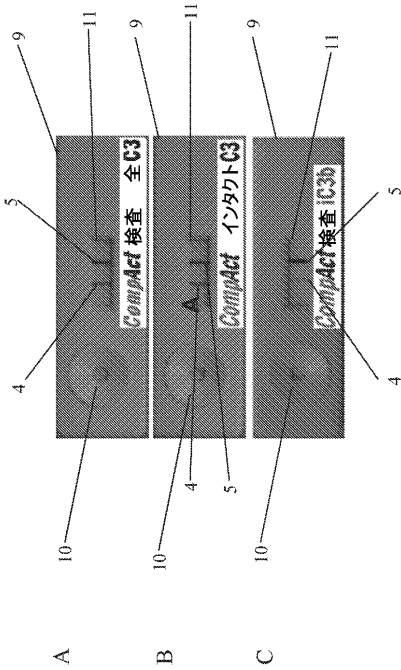


FIG. 6

【 図 7 】

並列での二分析物用側方流動イムノッセイ検査カセット

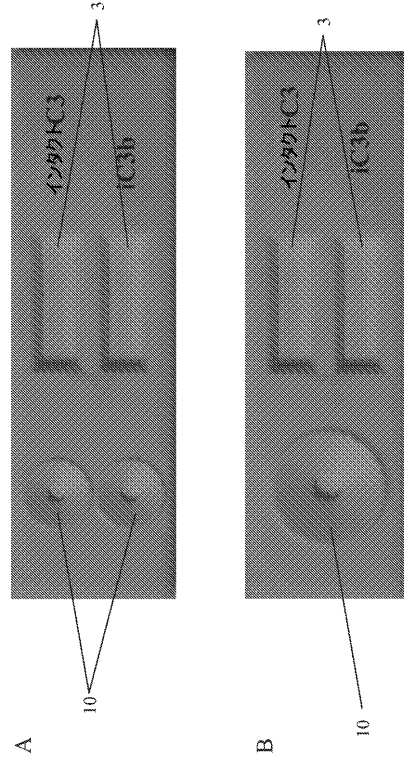
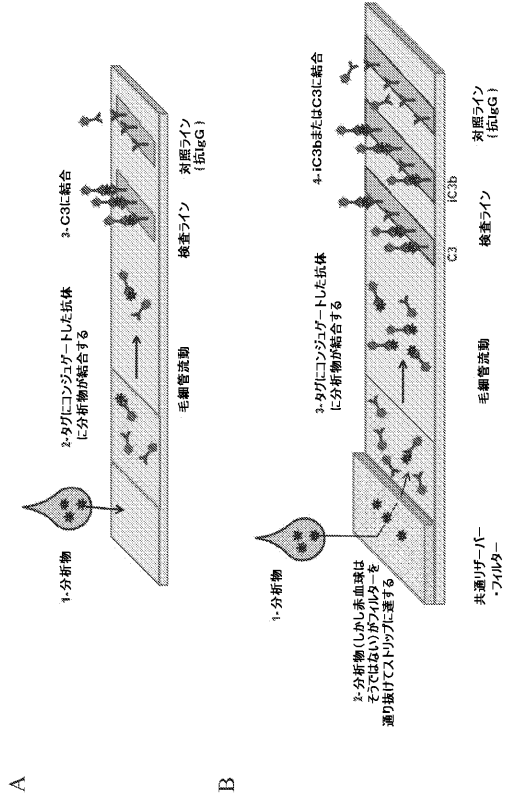


FIG. 7

【 図 9 】

直列での単一および二重側方流動イムノアッセイメンブレンストリップ



【 図 10 】

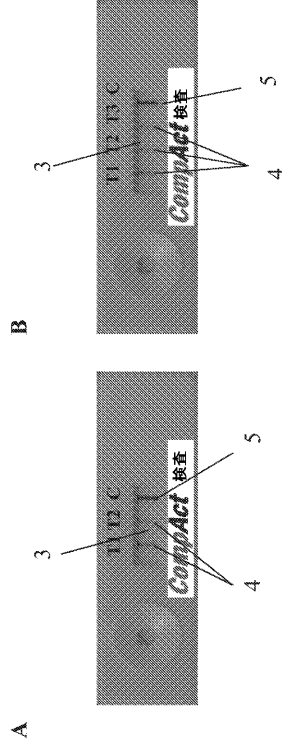


FIG. 9

直列での複数の分析物用側方流動イムノアッセイ検査カセット

FIG. 10

【 図 11 】

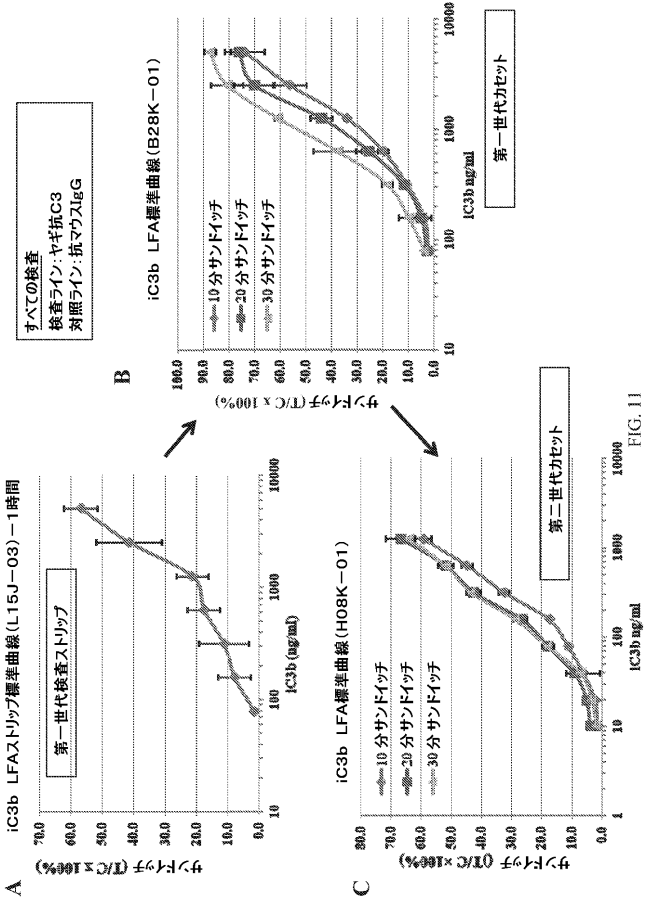


FIG. 11

【 図 12 】

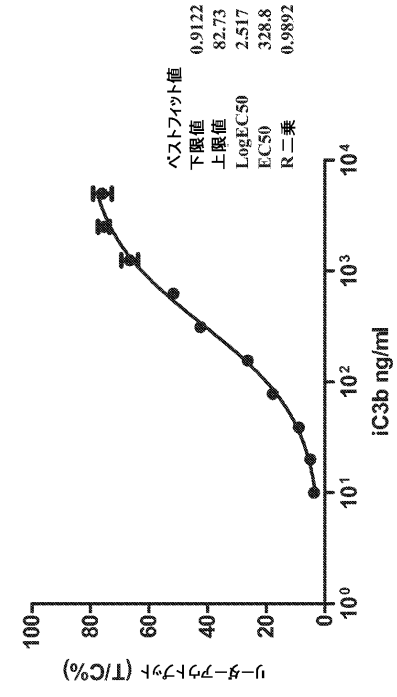
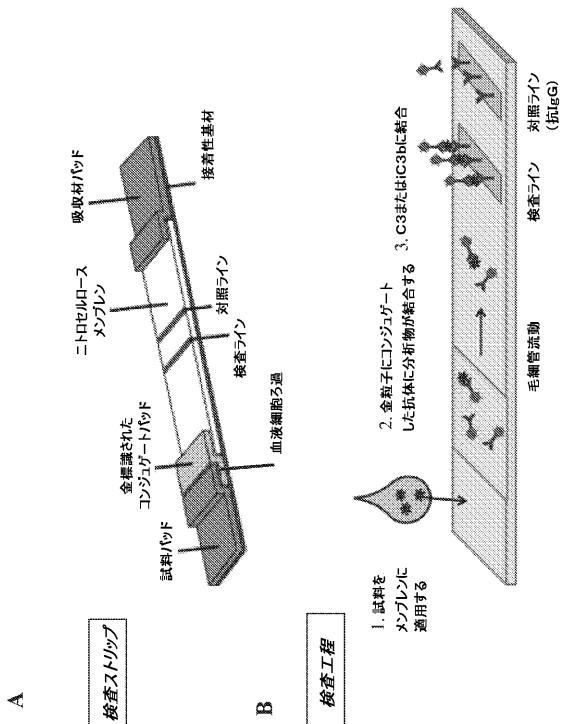


FIG. 12

【 図 2 0 】



【 図 2 2 】

試料適用後20分でのネイティブC3 LFA: 視認感度がおおよそ10~20ng/mlである

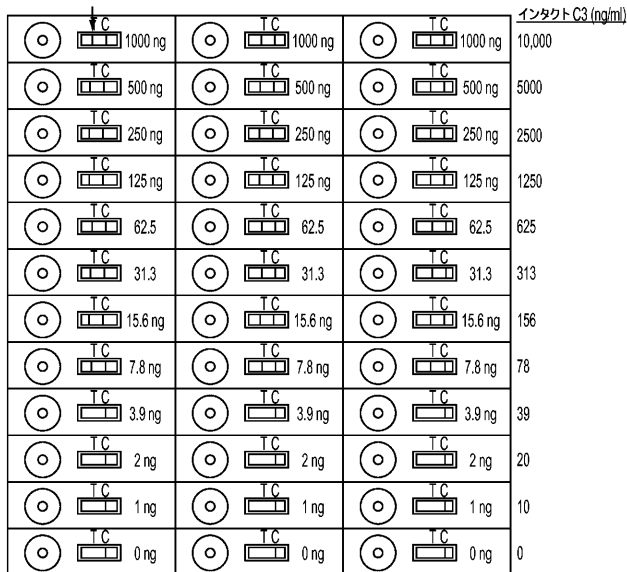
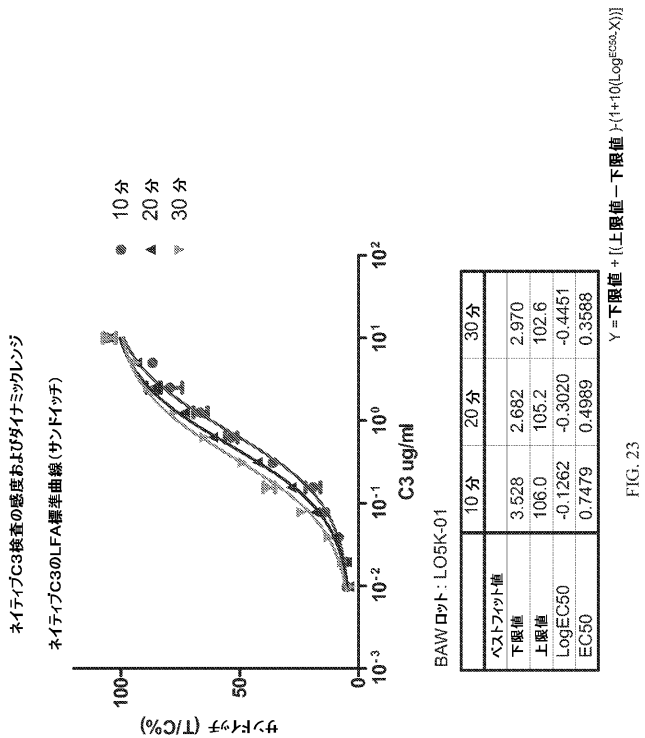


FIG. 22

【 図 2 3 】



【 図 2 4 】

10分、20分および30分におけるアッセイの分散 C.V. 値

ネイティブ C3	時間			平均分散
	10分	20分	30分	
10	11.8	21.4	20.3	17.8
5	3.1	4.2	5.8	4.4
2.5	77.2	27.0	12.8	39.0
1.25	27.1	6.2	3.2	12.2
0.63	20.0	2.6	12.8	11.8
0.31	4.0	0.1	5.3	3.1
0.16	28.7	11.2	19.5	19.8
0.08	10.5	4.7	0.5	5.2
0.04	7.9	2.1	1.2	3.7
0.02	11.4	2.0	2.6	5.3
0.01	2.9	1.9	1.6	2.2
0	5.2	0.5	0.3	2.0
平均	17.5	7.0	7.2	10.6
				7.1

CV値は一般に10%未満である

注: 使用範囲におけるすべてのCV値は5%以下でなければならぬ。一部の濃度におけるいくつかの高いCVにもかかわらず、このことは重大な問題であるとは考えられない。

FIG. 24

【 図 2 5 】

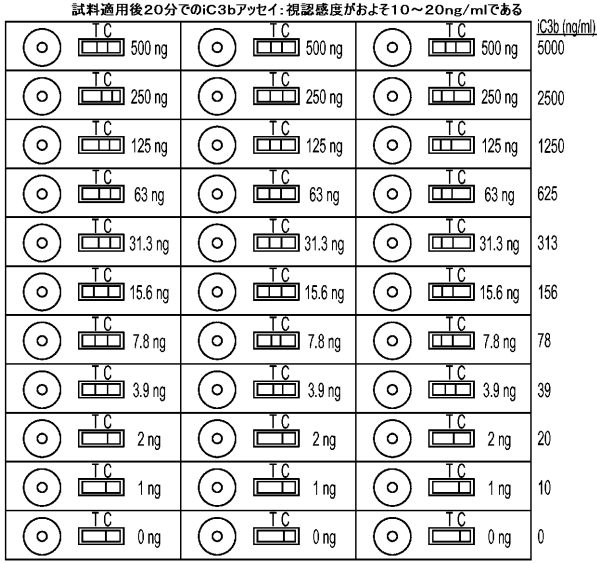


FIG. 25

【 図 2 6 】

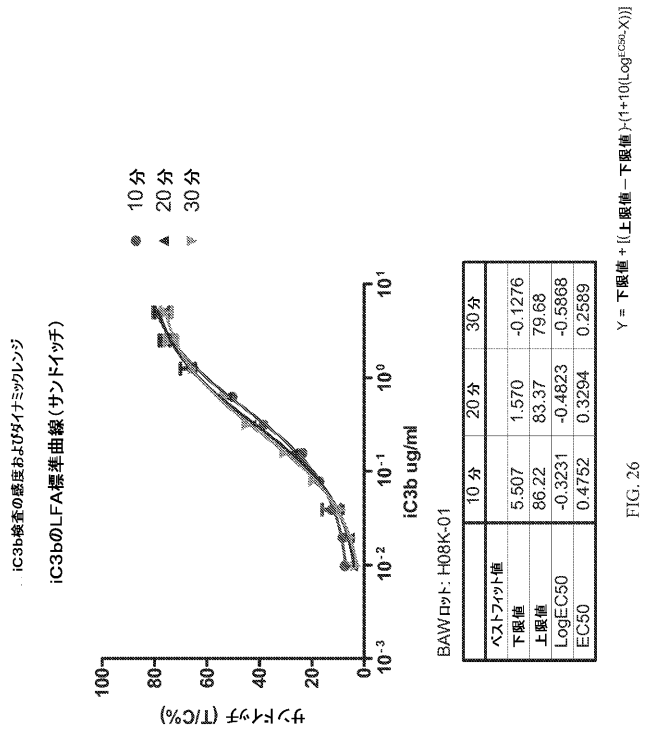


FIG. 26

【 図 2 8 】

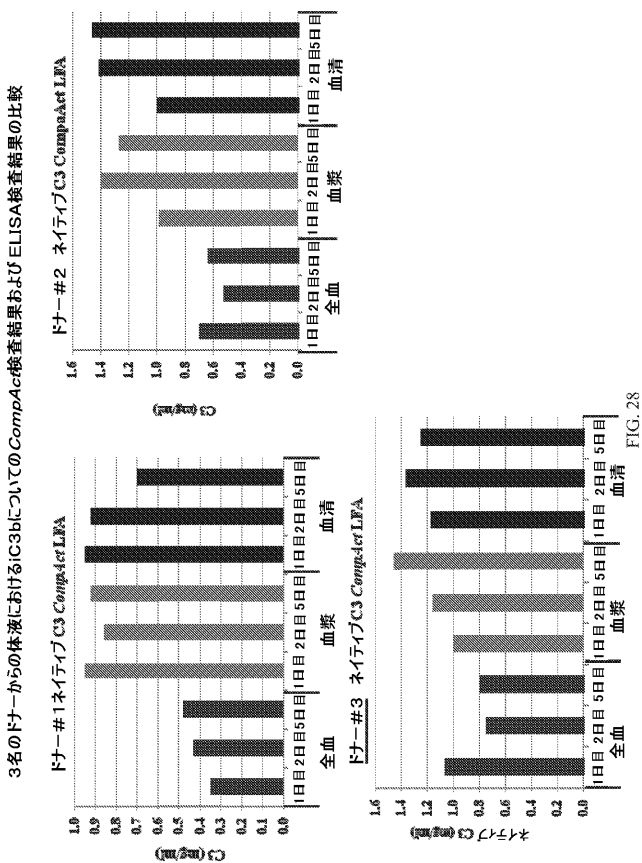


FIG. 28

【 図 3 0 】

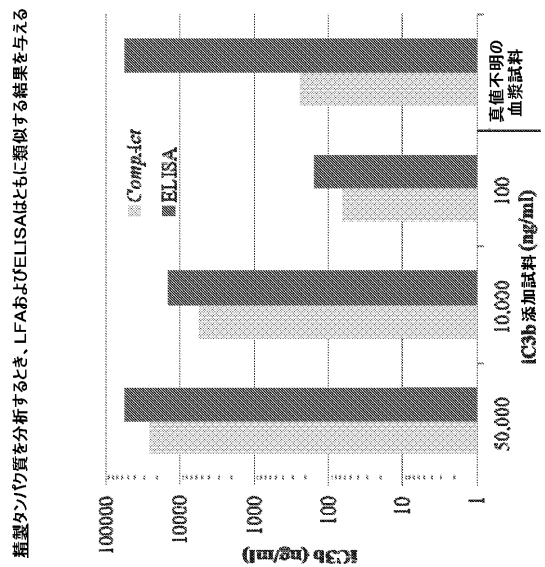


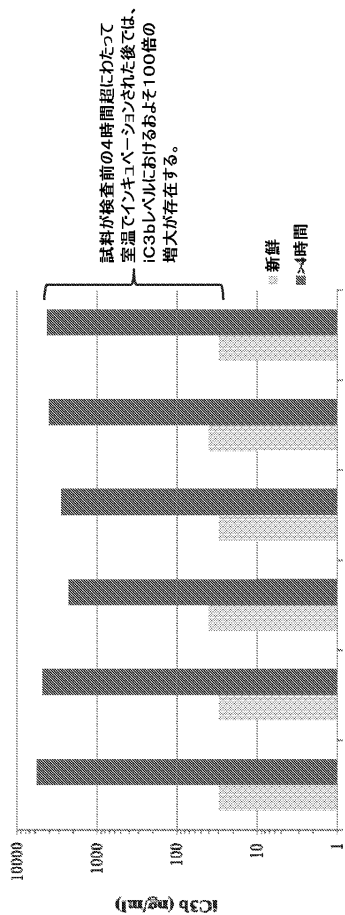
FIG. 30

真値不明の
血漿試料

【 図 3 1 】

実験的C3活性化がどのくらい重大な問題であり得るか？

4時間後より後にC3b LFAストリップにより再検査される元の希釈試料

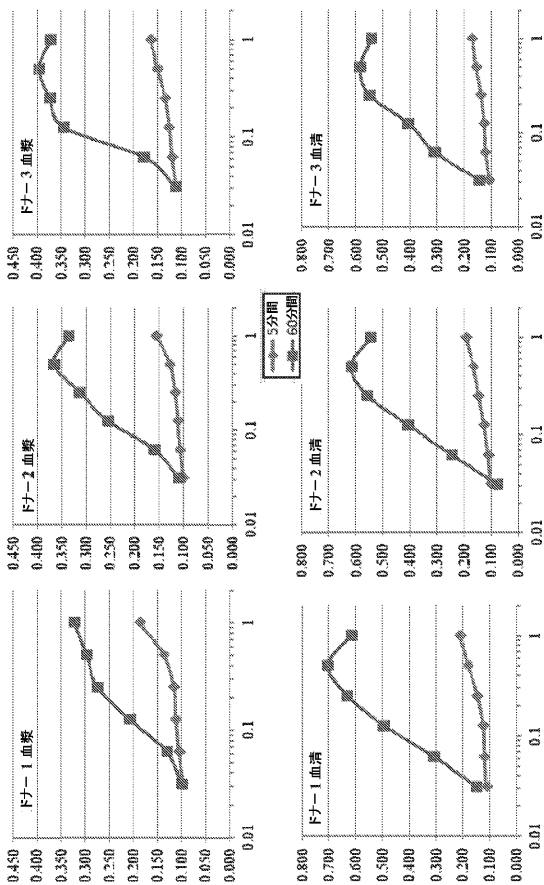


結論:iC3bレベルにおける実質的な増大がRTにおいて迅速に生じる。実質的なC3活性化が標準的iC3b ELISAアッセイではアッセイに生じ得るという可能性を高めている。-80℃で貯蔵される試料は新鮮な試料に異ならない(示されず)。

FIG.31

【 図 3 3 】

経時的な活性化が、単純かつ直線的な増大を超えて続く



データを直接的比較のためにC3b標準曲線に対して正規化した。

FIG. 33

アッセイ緩衝液で希釈される血漿におけるiC3bの時間依存生成

【 図 3 4 】

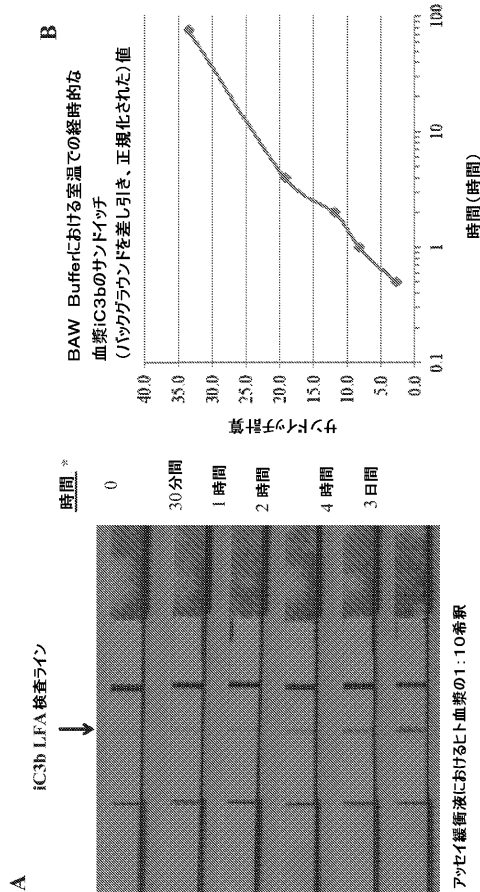


FIG.34

【 図 3 2 】

試料をヤギ抗C3-HRP検出抗体と同時にインキュベーションした

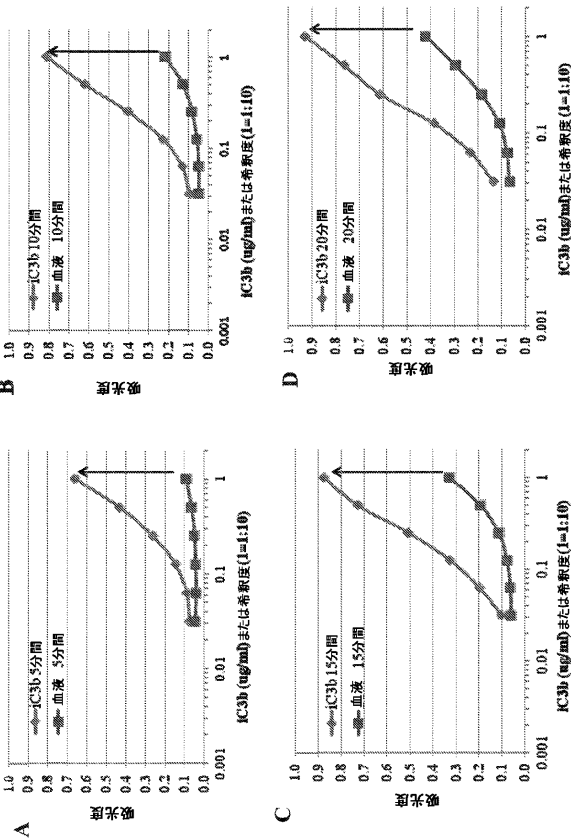


FIG.32

【 図 3 5 】

実験的C3活性化が迅速に生じる

- ヒト試料を、抗C3b mAb被覆ウエルとともに2分間だけまたは5分間だけインキュベーションする
- 抗C3 pAb検出抗体との1時間の二次インキュベーションを維持する

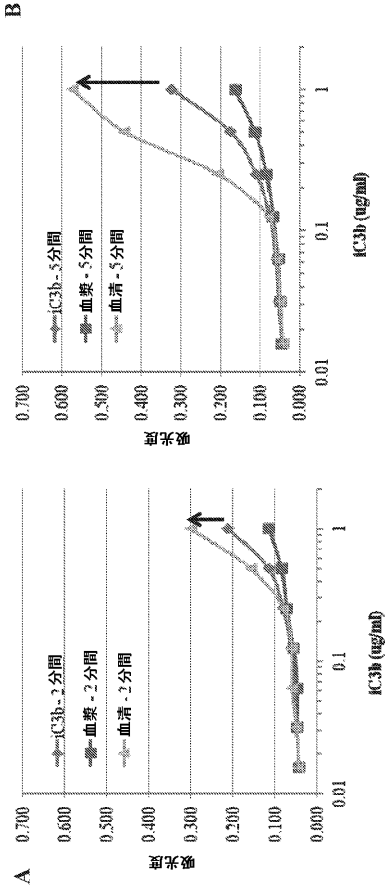


FIG. 35

【 図 3 6 】

(基準タンパク質に対して)ELISAによって推定される場合の
正常血清における推定C3bタンパク質

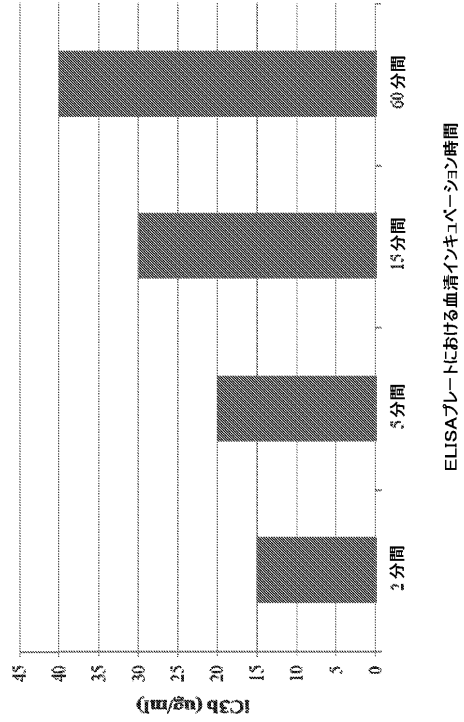


FIG. 36

【 図 3 7 】

C3沈着アッセイ: 抗原: 抗体複合体の非存在下におけるC3活性化

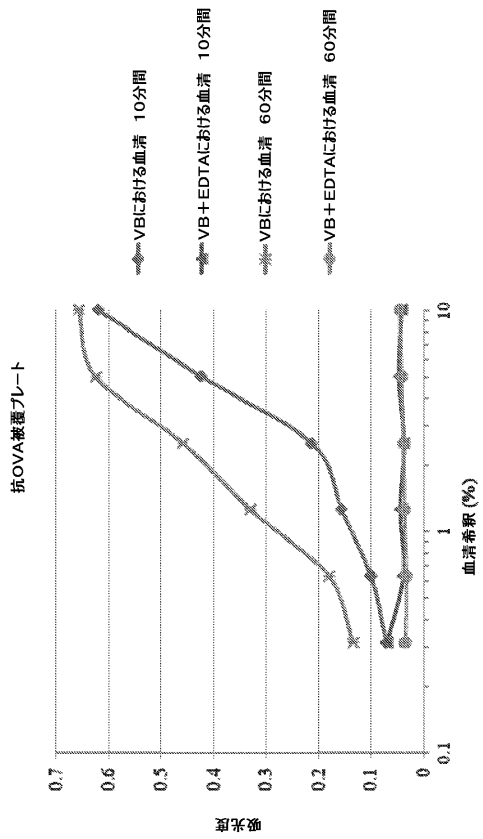


FIG.37

【 図 3 8 】

C3沈着アッセイ: 抗体被覆ウエルの非存在下におけるC3活性化

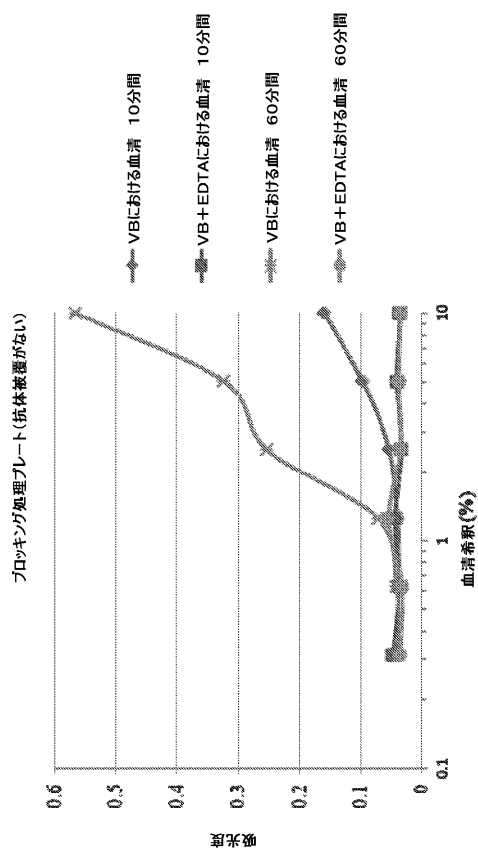


FIG.38

【 図 8 】

単一分析物用側方流動イムノアッセイ検査カセット

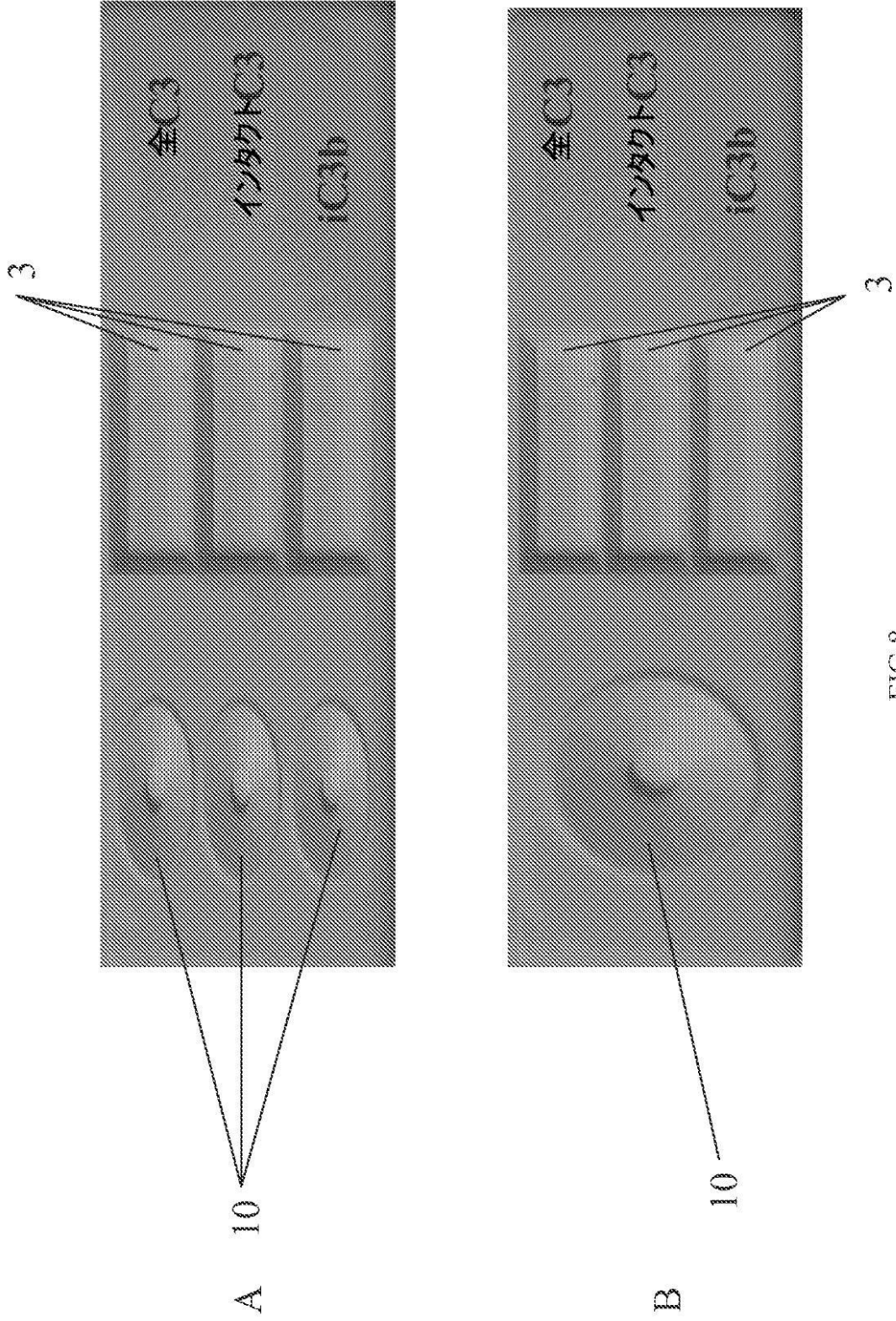
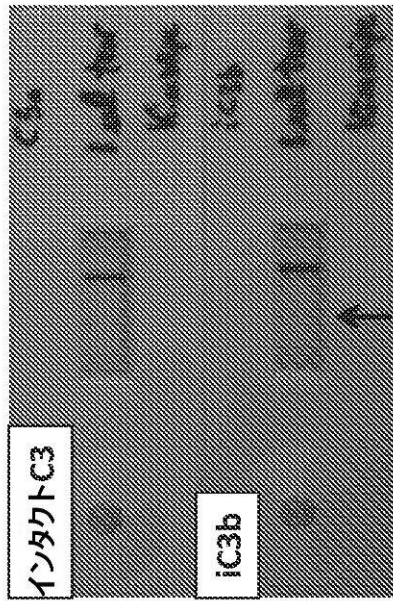


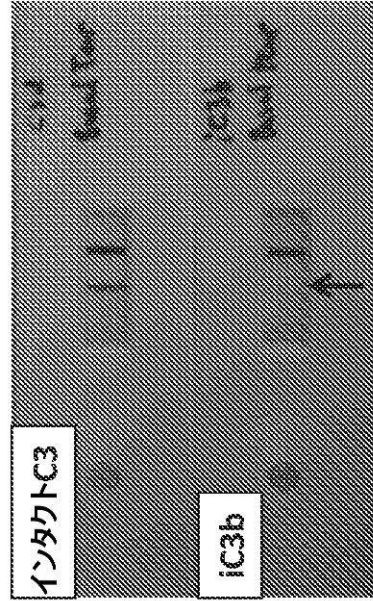
FIG.8

【 図 15 】

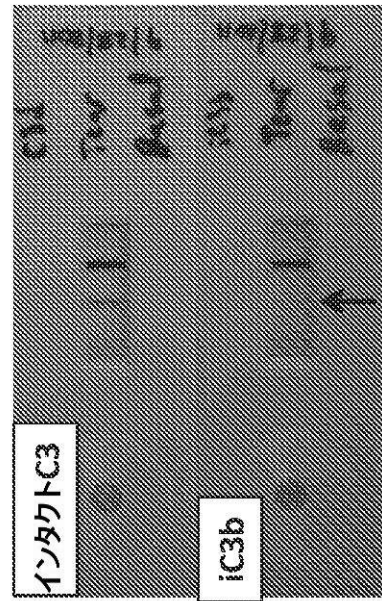
12時間間隔での一人の個体からの基礎涙液中のC3およびiC3bのレベル



T=0



T=12時間



T=24時間

時間(時)	インタクトC3 (ug/ml)	iC3b (ug/ml)
0	60	8
12	50	7.5
24	50	5

FIG.15

健康ドナーからの全血中のインタクトC3およびiC3b

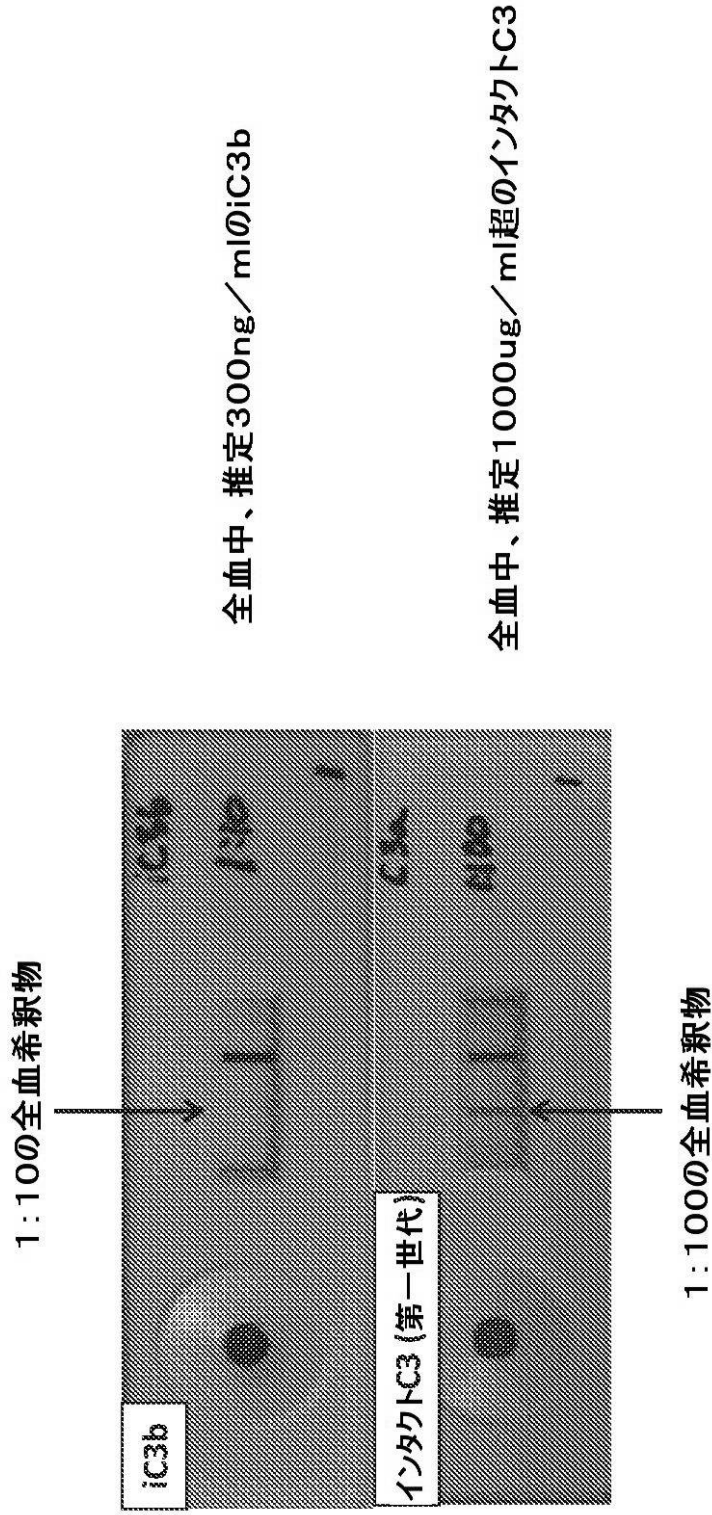


FIG.17

100マイル自転車走行の2時間後の全血検査結果

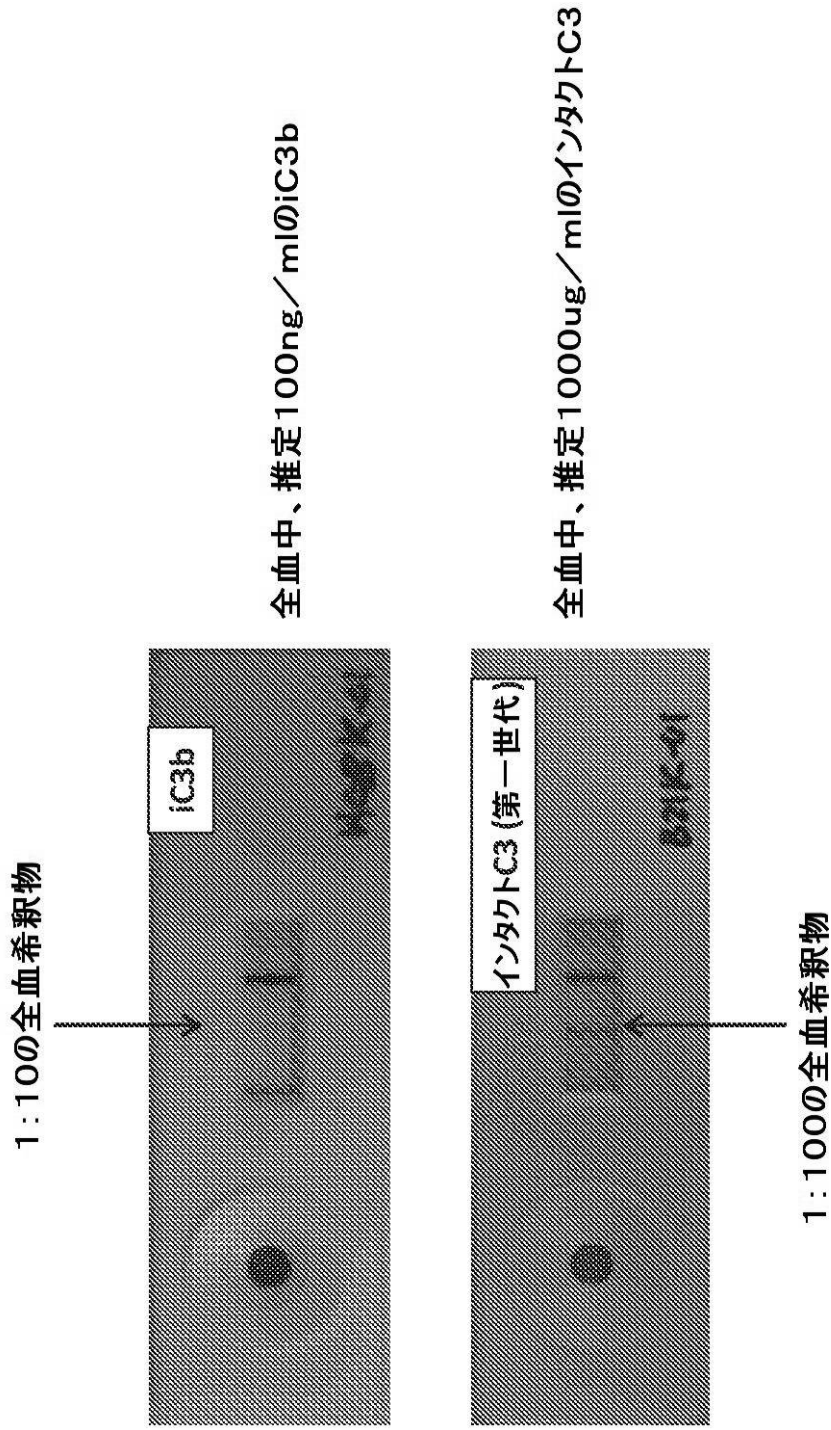


FIG.18

【 図 2 1 】

例示的プロトコル

1. アルコールスワブを使用して指を清浄にする。
2. 指をランセットで刺す。
3. 指を穏やかに圧搾し、MICROSAFE(登録商標) Tubeを使用して10ulの血液を毛細管作用によって集める。
4. 血液試料を、CompAct検査Aのカセットの試料ポートに直接排出する。
5. 直ちに3滴のアッセイ緩衝液を試料ポートに排出して、血液と混合する。
6. 時間を15分間または20分間に設定する。
7. 同じ指スティックの血液からのアッセイを、CompAct検査Bのカセットを使用して繰り返す。
8. 15分または20分が終わる前に、Kypha CompActリーダーの電源を入れる。
9. 各検査を読み取りの前に評価して、対照ラインが容易に視認されること、および、不鮮明化が問題とならないことを確認する。
10. タイマーが終了したとき、スライドのカバーを下げ、CompAct検査Aをリーダーの中に入れる。
11. スライドのカバーを戻し、開始ボタンを押す。リーダーが結果を約15秒後に表示するであろう。
12. 結果を捕捉する。リーダーは250回までの検査を保管することができる。
13. CompAct 検査Aを捨て、CompAct 検査Bと取り換える。
14. 開始ボタンを押す。
15. 結果を捕捉し、CompAct 検査Bを捨てる。

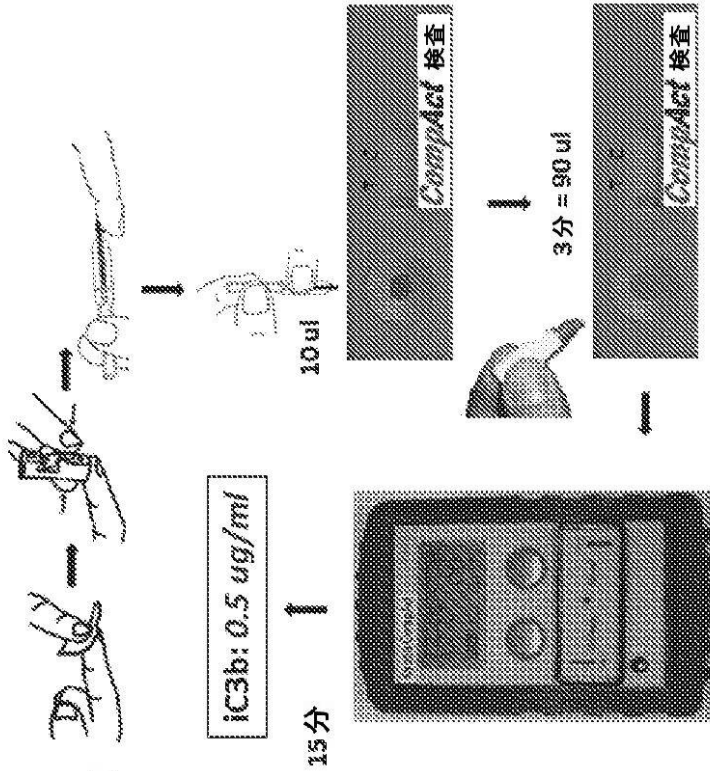


FIG. 2I

【 図 27 】

全血中のネイティブC3およびiC3bのLFA推定

A 20分 ■ および30分 ■ ■ ■ において三連でアッセイされる同じ血液試料 B

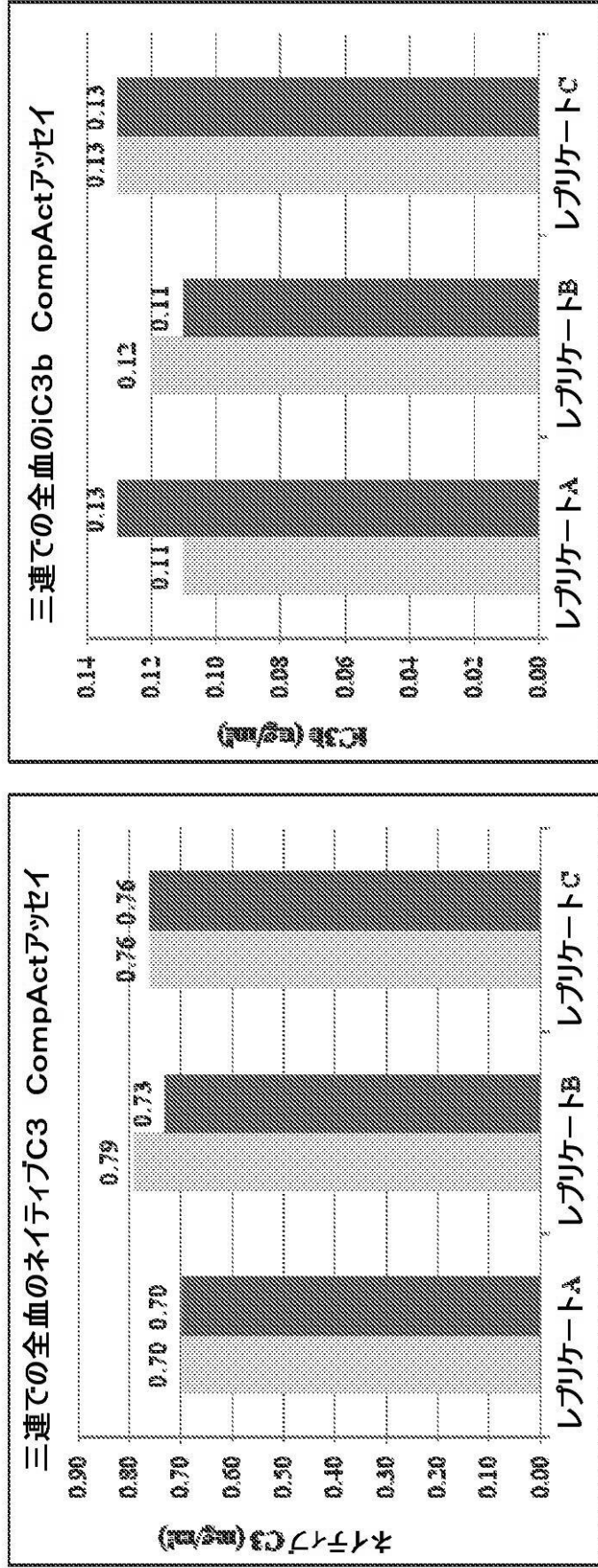
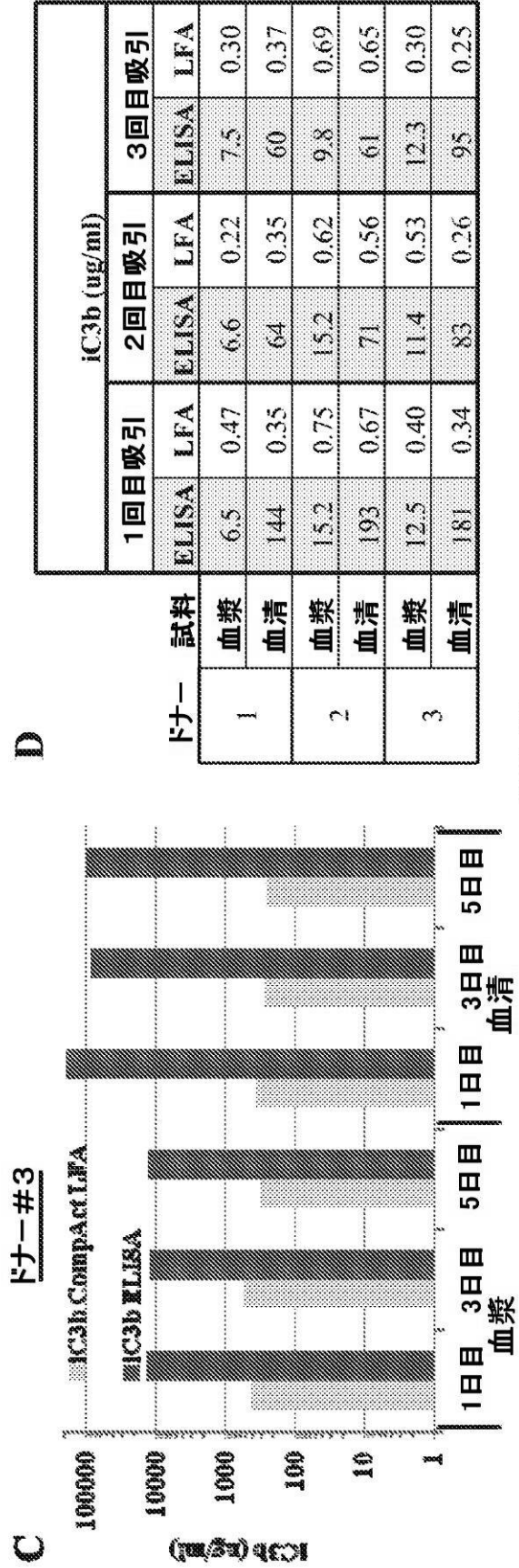
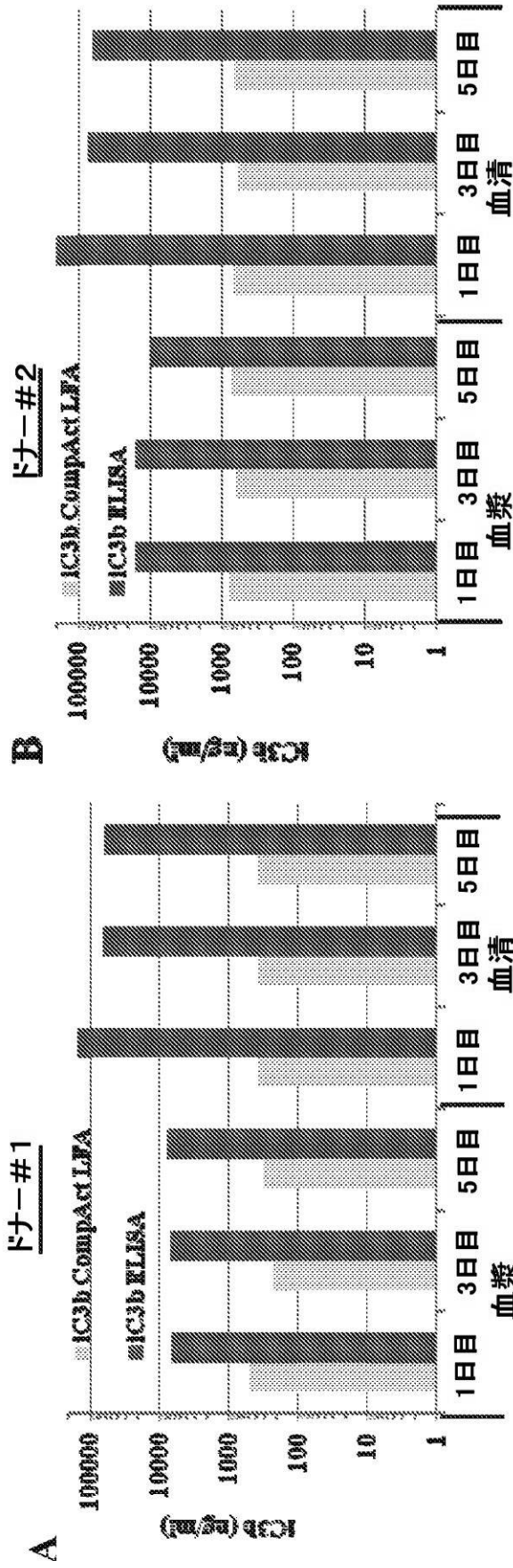


FIG. 27

【 図 2 9 】

3名のドナーからの体液におけるiC3bについてのCompAct検査結果およびELISA検査結果の比較



D

ドナー	試料	iC3b (ug/ml)					
		1回目吸引		2回目吸引		3回目吸引	
		ELISA	LFA	ELISA	LFA	ELISA	LFA
1	血漿	6.5	0.47	6.6	0.22	7.5	0.30
	血清	144	0.35	64	0.35	60	0.37
2	血漿	15.2	0.75	15.2	0.62	9.8	0.69
	血清	193	0.67	71	0.56	61	0.65
3	血漿	12.5	0.40	11.4	0.53	12.3	0.30
	血清	181	0.34	83	0.26	95	0.25

FIG. 29

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US13/38897 02.12.2013

International application No.

PCT/US13/38897

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - G01N 33/558, 33/68, 33/53 (2013.01) USPC - 435/7.1, 7.9; 424/178.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): G01N 33/00, 33/48, 33/53, 33/68, 33/558; A61K 38/17, 39/395 (2013.01) USPC: 435/7.92, 7.93, 7.94, 7.9, 7.1, 4, 7.2, 436/50, 514; 424/143.1, 178.1 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 practicable, search terms used) MicroPatent (US-G, US-A, EP-A, EP-B, WO, JP-bib, DE-C,B, DE-A, DE-T, DE-U, GB-A, FR-A); Google; Google Scholar; DialogPRO; PubMed; ScienceDirect; 'complement C3,' 'C3,' 'IC3b,' detect, assay, antibody, administer, activate, pathogenic disorder, disease, complement, measure, 'intact C3,' 'total C3'		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	WO 2010/135717 A2 (ZHANG, Z et al.) November 25, 2010; figures 10a, 10b; paragraphs [0006], [0009], [0011], [0052], [0054], [0066], [0096], [0103]; Claims 3, 7, 15, 25, 33, 91, 92	1-3, 5-7 — 4, 8, 9
Y	VLADUTIU, A et al. Complement C3 In Serum And Plasma, As Measured By Radial Immunodiffusion With Four Commercial Kits. Clin Chem. February 1976, Vol. 22 No. 2, pp 267-269.	1-9
Y	US 7371582 B2 (NAHM, KB et al.) May 13, 2008; column 2, lines 1-3; column 3, lines 11-15	4
Y	US 2006/0292700 A1 (WANG, N et al.) December 28, 2006; abstract; paragraphs [0006], [0008], [0048]; Claim 15	8, 9
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "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) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 "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 "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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 November 2013 (22.11.2013)		Date of mailing of the international search report 02 DEC 2013
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

2015/038897/02.12.2015
International application No.
PCT/US13/38897

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This international Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

---Please See Supplemental Page---

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Group I: Claims 1-9

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US13/38897 02.12.2015
International Application No.
PCT/US13/38897

***-Continuation of Box No. III - Observations where unity of invention is lacking:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-9 are directed toward a method comprising steps of detecting in a sample from a subject a level of intact C3, wherein the detecting involves specific interaction between the intact C3 and a non-cross-reactive antibody thereto; comparing the detected level with a reference level, which reference level is within a range of about 350 microg/ml to about 1,700 microg/ml; wherein determination that the detected level is below the reference level indicates that the subject is suffering from or susceptible to undesirable and/or pathologic complement activation; and administering treatment to treat undesired complement activation if the detected level is below the reference level.

Group II: Claims 10-18 are directed toward a method comprising steps of detecting in a sample from a subject a level of iC3b wherein the detecting involves specific interaction between the iC3b and a non-cross-reactive antibody thereto; comparing the detected level with a reference level, which reference level is within a range of about 10 ng/ml to about 5,000 ng/ml; wherein determination that the detected level is above the reference level indicates that the subject is suffering from or susceptible to undesirable and/or pathologic complement activation; and administering treatment to treat undesired complement activation if the detected level is above the reference level.

Group III: Claims 19-27 are directed toward a method comprising the steps of detecting in a sample a ratio of intact C3 level to iC3b level, wherein the detecting involves specific interaction between the intact C3, the iC3b, or both with a non-cross-reactive antibody thereto; comparing the detected level with a reference ratio of about 0.001 wherein determination that the detected level is below the reference level indicates that the subject is suffering from or susceptible to undesirable and/or pathologic complement activation; and administering treatment to treat undesired complement activation if the detected level is below the reference level.

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical features of Group I include a C3 reference level which is within a range of about 350 microg/ml to about 1,700 microg/ml, which is not present in Group II, the special technical features of Group II including an iC3b reference level, which is within a range of about 10 ng/ml to about 5,000 ng/ml, wherein determination that the detected level is above the reference level indicates that the subject is suffering from or susceptible to undesirable and/or pathologic complement activation, which is not present in Group III, the special technical features of Group III including a ratio of intact C3 level to iC3b level, and comparing the ratio with a reference ratio of about 0.001, which are not present in Groups I or II.

Groups I-III share the technical features including a method comprising steps of detecting in a sample from a subject a level of intact C3, wherein the detecting involves specific interaction between the intact C3 and a non-cross-reactive antibody thereto; comparing the detected level with a reference; wherein determination that the detected level is below the reference level indicates that the subject is suffering from or susceptible to undesirable and/or pathologic complement activation; and administering treatment to treat undesired complement activation if the detected level is below the reference level. Groups II and III share the technical features including detecting in a sample from a subject a level of iC3b wherein the detecting involves specific interaction between the iC3b and a non-cross-reactive antibody thereto.

However, these shared technical features are previously disclosed by WO 2010/135717 A2 to Zhang, et al. (hereinafter 'Zhang'). Zhang discloses a method comprising steps of detecting in a sample from a subject (a method comprising steps of detecting in a sample from a subject; paragraph [0006]) a level of intact C3 (level of intact C3; paragraph [0006]), wherein the detecting involves specific interaction between the intact C3 and a non-cross-reactive antibody thereto (wherein the detecting involves specific interaction between the intact C3 and an antibody specific to C3a or intact C3 (a non-cross-reactive antibody thereto); paragraph [0009]); and comparing the detected level with a reference (comparing the detected level with a reference level; paragraphs [0087], [0090]), and administering treatment to treat undesired complement activation (administering treatment to treat undesired complement activation; paragraph [0096]); detecting in a sample from a subject (detecting in a sample from a subject; paragraph [0006]) a level of iC3b (a level of iC3b; paragraph [0006]), wherein the detecting involves specific interaction between the iC3b and a non-cross-reactive antibody thereto (wherein the detecting involves specific interaction between the iC3b and an antibody specific for a neopeptide of iC3b (a non-cross-reactive antibody thereto); paragraph [0009]); wherein a level of intact C3 is similar to that of total C3 if no complement activation has occurred, but will be lower than that of the total C3 if extensive complement activation has occurred (paragraph [0052]). Zhang does not disclose wherein determination that the detected level is below the reference level indicates that the subject is suffering from or susceptible to undesirable and/or pathologic complement activation; and administering treatment to treat undesired complement activation if the detected level is below the reference level. However, it would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have implemented the determination that the detected level is below the reference level in the absence of complement activation, provided the previous disclosure by Zhang (paragraphs [0052], [0096]), as such indicates that the subject is suffering from or susceptible to undesirable and/or pathologic complement activation, and that administering treatment to treat undesired complement activation (Zhang; administering a complement inhibitor; paragraph [0096]) if the detected level is below the reference level (Zhang; paragraph [0052]), could be readily implemented, without undue experimentation or testing, to provide appropriate treatment for a subject having undesired complement activation.

Since none of the special technical features of the Groups I-III inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Zhang reference, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P	25/20 (2006.01)	A 6 1 P	25/20
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P	31/00 (2006.01)	A 6 1 P	31/00
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02
A 6 1 P	13/02 (2006.01)	A 6 1 P	13/02
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	13/12
A 6 1 P	15/00 (2006.01)	A 6 1 P	15/00
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), 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, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 オルソン, ポール

アメリカ合衆国 ミズーリ 6 3 1 0 3, セント ルイス, ワシントン アベニュー 1 2 0 9, ナンバー 3 0 2

(72)発明者 モス, ドナルド ダブリュー.

アメリカ合衆国 ケンタッキー 4 0 2 0 6, ルイビル, メルウッド アベニュー 2 4 0 0, ナンバー 1 1 0 4

(72)発明者 スターテン, ニック

アメリカ合衆国 ミズーリ 6 3 1 2 2, カークウッド, アンドリュース アベニュー 5 6 7

Fターム(参考) 4C084 AA17 NA06 ZA01 ZA05 ZA33 ZA36 ZA81 ZA89 ZB08 ZB11
ZB32

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2015518570A5	公开(公告)日	2016-06-23
申请号	JP2015510390	申请日	2013-04-30
[标]申请(专利权)人(译)	凯公司文件		
申请(专利权)人(译)	长城开发公司		
[标]发明人	オルソンポール モスドナルドダブリュー ステーテンニク		
发明人	オルソン, ポール モス, ドナルド ダブリュー. ステーテン, ニク		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 A61P37/06 A61P17/02 A61P29/00 A61P25/20 A61P9/00 A61P31/00 A61P27/02 A61P13/02 A61P13/12 A61P15/00 A61P25/00 A61K45/00		
CPC分类号	A61P13/02 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/02 A61P25/00 A61P25/20 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/00 G01N33/558 G01N33/564 G01N33/6854		
FI分类号	G01N33/53.R G01N33/543.521 A61P37/06 A61P17/02 A61P29/00 A61P25/20 A61P9/00 A61P31/00 A61P27/02 A61P13/02 A61P13/12 A61P15/00 A61P25/00 A61K45/00		
F-TERM分类号	4C084/AA17 4C084/NA06 4C084/ZA01 4C084/ZA05 4C084/ZA33 4C084/ZA36 4C084/ZA81 4C084/ZA89 4C084/ZB08 4C084/ZB11 4C084/ZB32		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	13/461709 2012-05-01 US		
其他公开文献	JP2015518570A		

摘要(译)

检测补体激活的方法包括在来自受试者的样品中检测iC3b水平的步骤，其中检测涉及iC3b与非交叉反应抗体之间的特异性相互作用，将检测的水平与参考水平进行比较，该参考水平在大约10ng / ml至大约5,000ng / ml的范围内，其中确定检测到的水平高于参考水平表明受试者患有或易患不良和/或病理性补体激活，并且给予治疗如果检测到的水平高于参考水平，则处理不需要的补体激活。还提供了在测量或不测量iC3b的情况下检测补体激活的其他方法。