

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A)

(11)特許出願公表番号

特表2003 - 509704

(P2003 - 509704A)

(43)公表日 平成15年3月11日(2003.3.11)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ド* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	N
33/543	525	33/543	525 G

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 23数)

(21)出願番号	特願2001 - 524609(P2001 - 524609)	(71)出願人	ザ リポソーム カンパニー、インコーポ レーテッド THE LIPOSOME COMPA NY , I N C . アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08 540 プリンストン プリンストン フォレ スタル センター ワンリサーチウェイ(番 地なし)
(86)(22)出願日	平成12年9月22日(2000.9.22)	(72)発明者	ジャノフ, アンドリュー・エス アメリカ合衆国ペンシルヴァニア州19067, ヤードリー, サウス・クレセント・ブルヴ アード 1807
(85)翻訳文提出日	平成14年3月22日(2002.3.22)	(74)代理人	弁理士 奥山 尚一 (外2名) 最終頁に続く
(86)国際出願番号	PCT/US00/26067		
(87)国際公開番号	W001/021183		
(87)国際公開日	平成13年3月29日(2001.3.29)		
(31)優先権主張番号	60/155,325		
(32)優先日	平成11年9月22日(1999.9.22)		
(33)優先権主張国	米国(US)		

(54)【発明の名称】 固相アッセイ

(57)【要約】

本発明は、抗リン脂質抗体を検出するための固相アッセイに関し、ここでのアッセイは、患者の血漿を、固相支持物質に固着した非二重層相のホスファチジルエタノールアミン (P E) を含むアッセイストリップに接触させるステップと、アッセイストリップを展開して、展開したアッセイストリップを抗体とリン脂質との反応について読み取りができるようにするステップとを含む。本発明はまた、抗リン脂質抗体の検出に使用できるアッセイストリップに関し、ここでのアッセイストリップは非二重層相の P E を含む。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 層感受性抗リン脂質抗体を検出するための固相アッセイであって、

a) 血漿を、固相支持物質に固着した非二重層相のホスファチジルエタノールアミンを含むアッセイストリップに接触させるステップと、

b) 該アッセイストリップを、抗体とリン脂質との反応について読み取りができるように展開するステップと

を含む固相アッセイ。

【請求項2】 前記ホスファチジルエタノールアミンが、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミンまたは卵ホスファチジルエタノールアミンからなる群から選択される請求項1に記載の固相アッセイ。

【請求項3】 前記固相支持物質がニトロセルロース紙である請求項2に記載の固相アッセイ。

【請求項4】 前記展開するステップが、イムノドットプロット法により実施される請求項3に記載の固相アッセイ。

【請求項5】 前記ホスファチジルエタノールアミンが、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミンである請求項4に記載の固相アッセイ。

【請求項6】 自己免疫疾患抗凝血性抗体を検出するための固相アッセイであって、

a) 血漿を、固相支持物質に固着した非二重層相のホスファチジルエタノールアミンを含むアッセイストリップに接触させるステップと、

b) 該アッセイストリップを抗体とリン脂質との反応について読み取りができるように展開するステップと

を含む固相アッセイ。

【請求項7】 前記ホスファチジルエタノールアミンが、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミンまたは卵ホスファチジルエタノールアミンからなる群から選択される請求項6に記載の固相アッセイ。

【請求項8】 前記固相支持物質がニトロセルロース紙である請求項7に記載の固相アッセイ。

【請求項9】 前記展開するステップが、イムノドットプロット法により実施される請求項8に記載の固相アッセイ。

【請求項10】 前記ホスファチジルエタノールアミンがジオレオイルホスファチジルエタノールアミンである請求項9に記載の固相アッセイ。

【請求項11】 抗リン脂質抗体の検出に使用可能なアッセイストリップであって、固相支持物質に固着した非二重層相のホスファチジルエタノールアミンを含むアッセイストリップ。

【請求項12】 前記ホスファチジルエタノールアミンが、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミンまたは卵ホスファチジルエタノールアミンからなる群から選択される請求項11のアッセイストリップ。

【請求項13】 前記固相支持体物質がニトロセルロース紙である請求項12のアッセイストリップ。

【請求項14】 前記ホスファチジルエタノールアミンが、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミンである請求項13のアッセイストリップ。

【請求項15】 前記抗リン脂質抗体が、自己免疫疾患抗凝血性抗体である、請求項14のアッセイストリップ。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

[発明の分野]

本発明は、抗リン脂質抗体を検出するための固相アッセイに関する。

【0002】

[発明の背景]

脂質超分子構造は、自己免疫の病因において考慮すべき重要な事項である。自己免疫疾患抗凝血性 (lupus anticoagulant) 活性は、マウスにおいて、固有のリン脂質巨大分子構築物により特異的に誘導できる。Rauchら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 4112~4114 (1990)。さらに、全身性エリテマトーデス (SLE) 患者から得られるヒトハイブリドーマおよび血漿に由来する自己免疫疾患抗凝血性抗体は、二重層相ではなく、六方晶層 (H_{II}) のホスファチジルエタノールアミン (PE) を特異的に認識する。Rauchら、J. Biol. Chem. 261: 9672~9677 (1986); Rauchら、Thromb. Haemost. 62: 892~896 (1989)。この特異性は、活性化された部分トロンボプラスチンタイム (APTT) アッセイにおいて、二重層相ではなく非二重層相のPEがこれらの抗体の自己免疫疾患抗凝血性活性を阻害しうることにより、間接的に示された。前記の層特異的なリン脂質の阻害は、自己免疫疾患抗体の臨床的検出のための間接的アッセイとして推奨され、感度が高くかつ特異的であることが判明した。Brandtら、Thromb. Haemost. 74: 1185~1190 (1995)。しかし、自己免疫疾患抗凝血性抗体および他の層感受性抗リン脂質抗体を臨床的に検出するための簡単かつ直接的な方法は今まで発見されていない。

【0003】

[発明の要約]

簡潔には、本発明は、抗リン脂質抗体を検出するための固相アッセイに関し、ここでのアッセイは、患者の血漿を、固相支持物質に固着した非二重層相のPEを含むアッセイストリップに接触させ、次いで、アッセイストリップを抗体とリン脂質との反応について読み取りができるように展開することを含む。好ましく

は、PEは、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)または卵ホスファチジルエタノールアミン(卵PE)であり、固相支持物質はニトロセルロース紙である。好ましくは、アッセイストリップはイムノドットプロット分析法により展開する。好ましくは、固相アッセイは、自己免疫疾患抗凝血性抗体の検出に使用する。

【0004】

本発明はまた、抗リン脂質抗体の検出に使用できるアッセイストリップに関し、ここでのアッセイストリップは、固相支持物質、好ましくはニトロセルロース紙に固着した非二重層相のPE、好ましくはDOPEまたは卵PEを含む。

【0005】

[発明の詳細な説明]

本発明は、層に対して感受性を有する血漿中の抗リン脂質抗体の存在を検出するための方法および装置である。本発明は、簡単であるにもかかわらず効率的で感度の高いアッセイを提供する、直接的な層感受性抗体とリン脂質との結合の発見を活用する。

【0006】

特に、本発明は、固相アッセイおよびこれに関連するアッセイストリップである。固相アッセイは、任意の動物由来の血漿を、固相支持物質に固着した非二重層相PEを含むアッセイストリップに接触させ、次いでアッセイストリップを展開して、展開したストリップを抗体とリン脂質との相互作用について読み取りができるようにすることを含む。PEは、層感受性抗リン脂質抗体が優先的に結合する、任意の六方晶層に好適なPEであってよく、好ましくはDOPEまたは卵PE、さらにより好ましくはDOPEである。

【0007】

固相支持物質のサイズ、形状、立体配置および組成は、非二重層相のPEが支持体に固着できる限り、特に限定されず、得られたアッセイストリップを血漿と接触させ、展開して、抗体とリン脂質との相互作用を示すことができる。好ましくは、固相支持物質はニトロセルロース紙である。

【0008】

層感受性抗リン脂質抗体の非二重層相PEへの結合を示す任意の展開技法を本発明に使用することができる。好ましくは、イムノドットプロット分析法を使用して、アッセイストリップを展開する。

【0009】

本発明はここで、具体的な実施例により記載する。実施例は、本発明の特定の実施形態を含み、例示のためのものである。実施例は、特許請求の範囲に定義した本発明の範囲を限定するものではない。

【0010】

[実施例に使用される物質および方法]

[リン脂質]

ウシ心臓カルジオリピン (CL)、ジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC)、DOPE、ジオレオイルホスファチジルセリン (DOPS)、卵PEおよびパルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン (POPE) は、Avanti Polar Lipids社 (アラバマ州バーミングム) から購入し、凍結乾燥して、またはクロロホルム (CHCl_3) 中に、 -70°C で保存した。これらのリン脂質はさらに精製することなく使用した。

【0011】

[ヒトヒトハイブリドーマ抗体の作製]

ヒトヒトハイブリドーマ自己免疫疾患抗凝血性抗体 (正常個体から得られた4003を除く) を、その多くが循環している自己免疫疾患抗凝血性抗体を有するSLE患者の末梢血リンパ球から、適切な個所を引用することにより本明細書の一部をなすものとするRauchら、J. Biol. Chem. 261: 9672~9677 (1986) およびMassicotteら、Hybridoma、3: 215~222 (1984) に記載のように作製した。自己免疫疾患抗凝血性活性を有さないハイブリドーマ抗体は、正常患者個体由来のリンパ球と、SLEまたは関節リウマチ患者由来のリンパ球との融合により得られた。全てのハイブリドーマ抗体はIgM免疫グロブリンであり、これは市販の試薬を使用して、固相酵素結合イムノアッセイ (ELISA法) により決定した。

【0012】

[ハイブリドーマ自己免疫疾患抗凝血性活性の検出]

ヒトハイブリドーマ上清(15%のウシ胎児血清を含むRPMIを主成分とした培養培地中)を試験し、適切な個所を引用することにより本明細書の一部をなすものとするRauchら、J. Biol. Chem. 261:9672~9677(1986)およびRauchら、Thromb. Haemost. 62:892~896(1989)に記載の希釈活性化部分トロンボプラスチンタイム(APTT)アッセイを使用して、自己免疫疾患抗凝血性活性を有するかについて明確にした。大半の自己免疫疾患抗凝血性陰性抗体は、試験した全自己抗原についてELISA法により陰性であったが、他の自己抗体活性については陽性のものもあった(例えば、B122は非常に多反応性であり、ELISA法により、変性DNA、CL、PEおよび血小板と反応した)。適切な個所を引用することにより本明細書の一部をなすものとするRiouxら、Molec. Immunol. 32:683~696(1995)参照。

【0013】

[ハイブリドーマ抗体のイムノドットプロット解析]

1 μ lの20mg/mlのリン脂質のクロロホルム溶液を、4mm \times 100mmのストリップの0.1 μ mニトロセルロース紙(SchleicherおよびSchuell社製、ニューハンプシャー州キーン)にスポットし、乾燥させて、ストリップを、0.5%のカゼインを含む0.01Mの、pH7.4のトリス緩衝食塩水(TBS)で、37 $^{\circ}$ Cにおいて1時間ブロッキングした。TBSで5回洗浄した後、ハイブリドーマの上清(0.5ml)をストリップに適用し、120分間にわたって37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。TBSで5回洗浄した後、PBS-0.5%カゼインで1/500に希釈した1.0mlのセイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP)に接合されたヤギ抗ヒト免疫グロブリン(Tago社製、カリフォルニア州バーリングゲーム)を添加し、37 $^{\circ}$ Cにおいて75分間インキュベートした。次いで、ストリップをTBSで2回洗浄し、3,3'-ジアミノベンジジンで展開し、蒸留水で2回洗浄し、直ちに解読するか(湿潤)または後に写真撮影した(乾燥)。反応は、ストリップを展開した直後に依然として湿っている間に解読した場合に最も強力で最も特異的であることが判明した。スト

リップを乾燥すると、陽性反応は僅かに減退し、陰性反応は僅かに陽性となった。

【0014】

[リン脂質構造の ^{31}P 核磁気共鳴(^{31}P NMR)解析]

^{31}P NMR解析を、20mMのHepes緩衝液(150mMのNaCl、pH7.5)中の分散液としてのリン脂質、および、ニトロセルロース紙に結合したリン脂質に実施した。 ^{31}P NMRスペクトルを、10mmの2重共鳴プローブを用いて、非回転試料上で145.8MHz(8.5テスラ)で操作するBrukerAM-360分光計で測定した。プロッホ(Bloch)崩壊は、データ測定中の90°パルスのスカラー多重パルスプロトンデカップリング、および、6秒間のパルス間隔を用いて得られた。約30,000個の中間体(transient)を、25kHzのスペクトルウィンドウおよび4Kデータ点を使用して平均化した。転換前に、100Hzの指数関数フィルターを崩壊に適用した。温度コントローラーは、エチレングリコールを用いて校正した。試料を、測定前に20分間所望の温度で平衡化した。卵レシチンの小単ラメラ小胞の共鳴を、ケミカルシフトの外部標準(0ppm)として使用した。

【0015】

リン脂質懸濁液は、Rotovapor装置(スイスのフラウイル所在のBuchi製)を使用して、減圧下で丸底ガラス管中の、クロロホルムから50mgのリン脂質を蒸発することにより調製した。乾燥させた脂質に、乾燥窒素を用いてガスを供給し、その遷移温度より高い温度で1時間水和した。ホスフェート濃度を、Bartlett法により決定した。引用することにより本明細書の一部をなすものとするBartlett, G.R., J. Biol. Chem. 234:466~468(1959)参照。。

【0016】

クロロホルム中の20mgのリン脂質を、80mm×120mmの大きさのシート(0.1μm)のニトロセルロース紙(SchleicherおよびSchuell、ニューハンプシャー州キーン)上に、反復ディスペンサー(Hamilton Co.製、ネバダ州リーノ)とHamiltonシリンジを使用してス

ポットした。各20mg/mlのリン脂質のクロロホルム溶液2 μ lの500個のスポットを使用して、各ニトロセルロース紙シートを覆った。シートを風乾し、0.5%のウシ血清アルブミン(BSA)を含む20mlのTBSと共に1時間37でインキュベートした。カゼインはリン酸化タンパク質であり、³¹P NMR実験でのブロッキングには使用できないため、BSAで置き換えた。しかし、カゼインは、ニトロセルロース紙への免疫グロブリンの非特異的結合をブロッキングする点でBSAより優れているので、イムノドットプロット実験には使用し続けた。1時間インキュベートした後、シートをTBSで洗浄し、くしゃくしゃにし、無秩序な向きのニトロセルロース紙をNMR管に挿入することによって、プローブコイル内に完全に含まれるようにし、³¹P NMR分光法により測定した。NMR管のニトロセルロース紙を1.2mlの緩衝液と水和させた。

【0017】

リン脂質が、確実に、ブロッキングおよび洗浄段階中にニトロセルロース紙から洗い流されないようにするために、クロロホルム中で、各2 μ lのリン脂質でスポットした小さいストリップのニトロセルロース紙を、ブロッキングおよび洗浄段階の前、およびその後の両方に、脂質ホスフェート含量についてアッセイした。ニトロセルロース紙のストリップを、0.4mlの過塩素酸に溶かし、これを直接Bartlett法によりホスフェート含量についてアッセイした。引用することにより本明細書の一部をなすものとするBartlett, G. R., J. Biol. Chem. 234: 466~468 (1959) 参照。

【0018】

[実施例1 リン脂質構造の³¹P NMR解析]

適用したリン脂質が、緩衝液の存在下で、ニトロセルロース紙に結合したままであることを確認するために、紙に結合したホスフェートの量を、緩衝液と共にインキュベートする前および後に定量した。ニトロセルロース紙は過塩素酸に可溶性であるので、それを溶かし、直接Bartlettアッセイでアッセイした。表1は、ブロッキング緩衝液と共に1時間インキュベートする前、インキュベート後、および緩衝液と共に5回洗浄した後に、ニトロセルロースに結合したホスフェートの μ モルを示す。スポットに使用したリン脂質のホスフェート値は、

実質的に、インキュベートおよび洗浄の前および後で同一であった。事実、大半の試料は、ブロッキング後に僅かに高い値を示したが、この値は、アッセイ手順の重複間の変動（+0.005 μ モル）より低いか、またはその変動と等しかったので、有意ではなかった。リン脂質を全く含まないニトロセルロース紙はホスフェートについて陰性であり、これにより、ホスフェート値は紙に結合したリン脂質を真に示すものであり、紙またはブロッキングタンパク質を示すものではないことが示される。

【0019】

【表1】

ニトロセルロース紙に結合したリン脂質の定量分析

リン脂質	ホスフェートの μ モル ^a	
	ブロッキング/洗浄前	ブロッキング/洗浄後
なし(CHCL ₃)	0	0
DOPE	0.023	0.026 ^b
卵PE	0.023	0.028
DOPS	0.042	0.046
CL	0.027	0.033
DOPC	0.024	0.025
POPE	0.024	0.025

^a リン脂質をスポットしたニトロセルロース紙を、ブロッキング緩衝液（0.5%BSAを含むTBS）と共に37℃において1時間インキュベートし、TBSで5回洗浄した前および後に、ホスフェート含量についてアッセイした。ブロッキングおよび洗浄段階後に紙上に残った比率（%）は、以下のように計算した。

$$\frac{\text{ホスフェートの}\mu\text{モル (ブロッキング/洗浄後)}}{\text{ホスフェートの}\mu\text{モル (ブロッキング/洗浄前)}} \times 100\%$$

^b 僅かな増加は、アッセイの重複間の変動が±0.005 μ モルであるので有意ではない

【0020】

³¹P NMRを使用して、懸濁液中またはニトロセルロース紙に結合した種々のリン脂質の構造組織を決定した。水和時に、二重層相を形成しているリン脂質により、低磁場シヨルダーを特徴とするスペクトルが得られ、高次に形成しているリン脂質からは、低磁場シヨルダーおよび高磁場ピークを特徴とするスペクトルが得られ、一方、非二重層相のH₁₁相に配置したリン脂質は、1/2の幅で、逆向き非対称なスペクトルが得られる。引用することにより本明細書の一部を

なすものとするCullisら、Biochim Biophys Acta、559:399~420(1979)参照。図1~6から、懸濁液中では、DOPEおよび卵PEは、 $H_{||}$ 層中に構成され、一方POPE、CL、DOPSおよびDOPCは、液晶性の二重層相に配置された。これらの結果は、これらのリン脂質に関する以前のNMR特徴づけと素晴らしく一致した。引用することにより本明細書の一部をなすものとするCullisら、Biochim Biophys Acta、559:399~420(1979); Cullisら、Biochim Biophys Acta、513:31~42(1978); およびDekkerら、Chem. Phys. Lipids、33:93~106(1983)参照。

【0021】

二重層相の好適なリン脂質(POPE、DOPS、CLおよびDOPC)は、ニトロセルロース紙上で水和した場合に、二重層相構造を形成した。全ての場合において、スペクトルライン幅はより狭く、高磁場ピークはダウンフィールドにシフトし、低磁場ショルダーはアップフィールドにシフトした。二重層相に配置したリン脂質のライン幅または化学シフト異方性(CSA)は、小胞サイズ(CSAは、小胞サイズの減少と共に減少する)、および、相関時間 τ_c 。(CSAは τ_c が短くなるにつれて減少する)により記述される小胞中のリン脂質の再配向率の関数である。引用することにより本明細書の一部をなすものとするBurnellら、Biochim Biophys Acta、603:63~69(1980)参照。小胞は溶液中を自由にタンブリングしていないが、脂質はニトロセルロース紙に堅く結合しているので、観察されたスペクトルの狭まりは τ_c の減少による可能性が高いようである。

【0022】

$H_{||}$ を形成するリン脂質、DOPEおよび卵PEの場合、ニトロセルロース紙との結合により、少量の $H_{||}$ スペクトル成分を含むが、大半は広い等方性シグナルを含むスペクトルが生じた。固相支持体上で、これらの脂質がタンブリングする運動により平均化される非常に短い六方晶管を形成することは可能であるが、可能性は低い。より可能性あるデータの説明は、脂質単層間にサンドイッチされ

た、広がった非二重層相の立方相または転倒した円筒が、ニトロセルロース支持体上に形成されたというものである。立方相は、多くのリン脂質について、 H_{II} 遷移への二重層相の中間体であると記載され、事実、いくつかの脂質は、二重層相から H_{II} 立方相への遷移を受ける。引用することにより本明細書の一部をなすものとするTilcockら、Biochemistry、21:4596~4601(1982)参照。立方相の脂質は、高度に湾曲した構造で配置され、 H_{II} 相を含む転倒した円筒をとり囲む高度に湾曲した単層に存在する脂質に類似している。同様に、広がった転倒した円筒を覆うリン脂質の単層も高度に湾曲し、等方性運動平均化を生じ、スペクトル幅を狭める。ニトロセルロース紙上の正確なDOPEおよび卵PEの構成は不明であるが、これらの脂質は明らかに、液晶二重層相に配置されていなかった。

【0023】

[実施例2 ハイブリドーマ抗体のイムノドットプロット解析]

表2は、33個のヒトハイブリドーマ抗体のイムノドットプロット解析の結果を示し、この中で16個が、自己免疫疾患抗凝血性活性を示し、17個は示さなかった。DOPE、卵PE、DOPS、CL、DOPCおよびPOPEを含む7個のリン脂質、およびクロロホルム($CHCl_3$)のみのパネル上での反応を、各抗体について示す。結果を表3に要約する。これは、各リン脂質と反応性である、自己免疫疾患抗凝血性陽性抗体および自己免疫疾患抗凝血性陰性抗体の数を示す。16個の自己免疫疾患抗凝血性陽性抗体の中で、12個(75%)がDOPEと反応し、10個(62%)が卵PEと反応し、7個(44%)がDOPSと反応し、10個(62%)がCLと反応し、2個(12%)がDOPCと反応し、2個(12%)がPOPEと反応した。僅か3個の自己免疫疾患抗凝血性抗体が、試験したどのリン脂質とも反応しなかった。これに対し、試験した17個の自己免疫疾患抗凝血性陰性ハイブリドーマ抗体の中で、どれも、DOPE、卵PE、DOPS、DOPC、またはDOPEと反応しなかった。1つの自己免疫疾患抗凝血性陰性抗体(ハイブリドーマ抗体122)がCLと反応した。試験したどの抗体もクロロホルムのみとは反応しなかった。

【0024】

【表2】

非二重層相および二重層相リン脂質上での、自己免疫疾患抗凝血性(LA)活性を有するヒトハイブリドーマ抗体および有さないヒトハイブリドーマ抗体のイムノドットプロット分析

抗体	CHCL ₃	DOPE	卵PE	DOPS	CL	DOPC	POPE
LA+ ^a							
1420	- ^b	+	+	-	+	-	-
9703	-	+	+	+	+	+	+
9200	-	+	-	-	+	-	-
9700	-	+	+	-	+	-	-
9705	-	-	-	-	-	-	-
1407	-	+	+	+	+	-	-
1305	-	+	+	-	+	+	-
1206-1	-	+	+	+	+	-	-
4003	-	+	+	+	-	-	+
1104	-	-	-	-	-	-	-
1401	-	-	-	+	-	-	-
1406	-	+	+	+	+	-	-
9706	-	+	+	-	+	-	-
9604	-	+	+	+	+	-	-
1410	-	+	+	-	-	-	-
9603	-	-	-	-	-	-	-
LA- ^a							
1009	-	-	-	-	-	-	-
1000	-	-	-	-	-	-	-
B122	-	-	-	-	+	-	-
B3018	-	-	-	-	-	-	-
B3109	-	-	-	-	-	-	-
B3702	-	-	-	-	-	-	-
B3123	-	-	-	-	-	-	-
B3301	-	-	-	-	-	-	-
B3700	-	-	-	-	-	-	-
B700	-	-	-	-	-	-	-
B3131	-	-	-	-	-	-	-
B3134	-	-	-	-	-	-	-
B3703	-	-	-	-	-	-	-
B3206	-	-	-	-	-	-	-
B3208	-	-	-	-	-	-	-
B3600	-	-	-	-	-	-	-
B3500	-	-	-	-	-	-	-

^a LA+およびLA-は、それぞれ自己免疫疾患抗凝血性活性を有する抗体および有さない抗体を示す。

^b 反応(陰性または陽性)は、結合したHRPに接合されたヤギ抗ヒト抗体の量を示し、これはドットプロットが依然として湿っている間に解読した。

【0025】

【表3】

イムノドットブロット解析による自己免疫疾患抗凝血活性を有するおよび有さないハイブリドーマ抗体の比較

自己免疫疾患抗凝血活性	表中に示す物質とのイムノドットブロットにおける反応性						
	CHCL ₃	DOPE	卵PE	DOPS	CL	DOPC	POPE
陽性 N=16	0(0%)	12(75%)	10(62%)	7(44%)	10(62%)	2(12%)	2(12%)
陰性 N=17	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	1(6%)	0(0%)	0(0%)

【0026】

卵PEと反応した全10個の自己免疫疾患抗凝血性抗体はまた、合成DOPEとも反応した(表2)。2つの追加の自己免疫疾患抗凝血性抗体(9200および1410)を、DOPEを用いて検出した。DOPEとの反応性を有する抗体の大半(10/12)は、POPEと反応しなかった。POPEと反応した2つの中で、1つの抗体(9703)は、非常に強くDOPCとも反応し、これは、この抗体が、DOPCおよびPOPE上の両方のエピトープ、並びに、H₁₁層DOPEおよびPE上に存在するエピトープも認識することが示唆される。他方のPOPE反応性抗体(4003)は、DOPCとは反応しなかったが、H₁₁およびラメラ形のPEの両方と強く反応した。

【0027】

興味深いことに、CLと反応した10個の自己免疫疾患抗凝血性抗体がDOPEとも反応した。同様に、DOPSと反応する7個の自己免疫疾患抗凝血性抗体のうち、1つを除いた全部がDOPE上で陽性であった。この抗体(1401)はDOPSのみと反応した。自己免疫疾患抗凝血性活性を有さない1つの抗体(3132)、および、自己免疫疾患抗凝血性活性を有する抗体(1420、9703、1407および1305)の代表的なドットブロットを図7に示す。自己免疫疾患抗凝血性陰性抗体は、いずれのリン脂質ともほとんど、または全く反応性を示さなかった。これに対し、4つ全ての自己免疫疾患抗凝血性陽性抗体が、DOPEおよび卵PEと明確な反応性を示し、大半が、他のリン脂質と目に見える反応性を示した。4つ中3つの自己免疫疾患抗凝血性抗体がPOPEと反応せ

ず、これは表2および3に示した大半の自己免疫疾患抗凝血性抗体の代表種である。一方、自己免疫疾患抗凝血性抗体9703は、POPEに対する有意な結合、および、通常、DOPE、卵PEおよびDOPCとの強い反応性を示した。各抗体は、個々の結合プロフィールを示した。これは、抗体1420および1407により特によく例示され、これは、DOPEおよび卵PEには類似の結合を示したが、DOPSおよびCLに対するその反応性は異なっていた。

【0028】

[結論]

本発明は、抗リン脂質抗体を検出するための新規な層特異的アッセイに関する。我々の発明は、ハイブリドーマ自己免疫疾患抗凝血性抗体は、直接結合固相アッセイにおいて異なる構造形のPE間を識別できるという我々の発見に基づく。本発明を使用して、リン脂質および結合抗体の両方を正確に定量でき、特異的に標識したマーカーを使用することにより、化学量論的關係を決定できる。結合した抗体は単離および解析もできるが、等しく重要なことには、抗体特異性の問題を決定的に解決できる。我々が発見した構造感受性固相アッセイは、自己免疫疾患抗凝血性抗体および他の抗リン脂質抗体により示される構造特異性を利用する。我々は、この層感受性固相アッセイは、異なる抗CL抗体のクラスを検出する手段を提供し得ると考える。

【0029】

本発明は本明細書に詳述した具体的な実施形態を参照して記載したが、これらは、本発明を説明するものであり、本発明は必ずしもこれに限定されないことが理解されるであろう。修飾および変形は、開示から明らかとなり、当分野の通常の技術的理解力を有する者により理解される本発明の精神から逸脱することなく行ない得る。従って、前記変形および修飾は、本発明および以下の特許請求の範囲内にあると考える。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、ニトロセルロース紙に結合した(上)および緩衝懸濁液中の(下)DOPEの³¹P NMRスペクトル(37℃で実施)を示す。

【図2】

図2は、ニトロセルロース紙に結合した(上)および緩衝懸濁液中の(下)卵PEの ^{31}P NMRスペクトル(37℃で実施)を示す。

【図3】

図3は、ニトロセルロース紙に結合した(上)および緩衝懸濁液中の(下)パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン(POPE)の ^{31}P NMRスペクトル(37℃で実施)を示す。

【図4】

図4は、ニトロセルロース紙に結合した(上)および緩衝懸濁液中の(下)ジオレオイルホスファチジルセリン(DOPS)の ^{31}P NMRスペクトル(37℃で実施)を示す。

【図5】

図5は、ニトロセルロース紙に結合した(上)および緩衝懸濁液中の(下)ウシ心臓カルジオリピン(CL)の ^{31}P NMRスペクトル(37℃で実施)を示す。

【図6】

図6は、ニトロセルロース紙に結合した(上)および緩衝懸濁液中の(下)ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)の ^{31}P NMRスペクトル(37℃で実施)を示す。

【図7】

図7は、代表的なヒトハイブリドーマ抗体と、非二重層相および二重層相リン脂質の反応性のイムノドットプロット解析を示す。CHCl₃中のリン脂質(DOPE、卵PE、DOPS、CL、DOPCおよびPOPE)でスポットしたニトロセルロース紙のストリップを、ヒトハイブリドーマ抗体培養上清B3123(ストリップ1)、1420(ストリップ2)、9703(ストリップ3)、1407(ストリップ4)および1305(ストリップ5)と共にインキュベートし、ここで、B3123は、自己免疫疾患抗凝血性活性について陰性であったが、他の4つの抗体は、自己免疫疾患抗凝血性活性について陽性であった。各リン脂質スポットの中心を、脂質をスポットする前に鉛筆で書いたドットにより示す

。抗体結合は、HRPに接合したヤギ抗ヒト免疫グロブリンおよび3,3'-ジアミノベンジジンを用いて検出した。プロットを表2でスコアリング(陽性または陰性)するために湿ったままで解読し、しかし写真撮影は乾燥して行なうと、弱い陽性スポットが、図7では陰性的のように見える。

【図1】

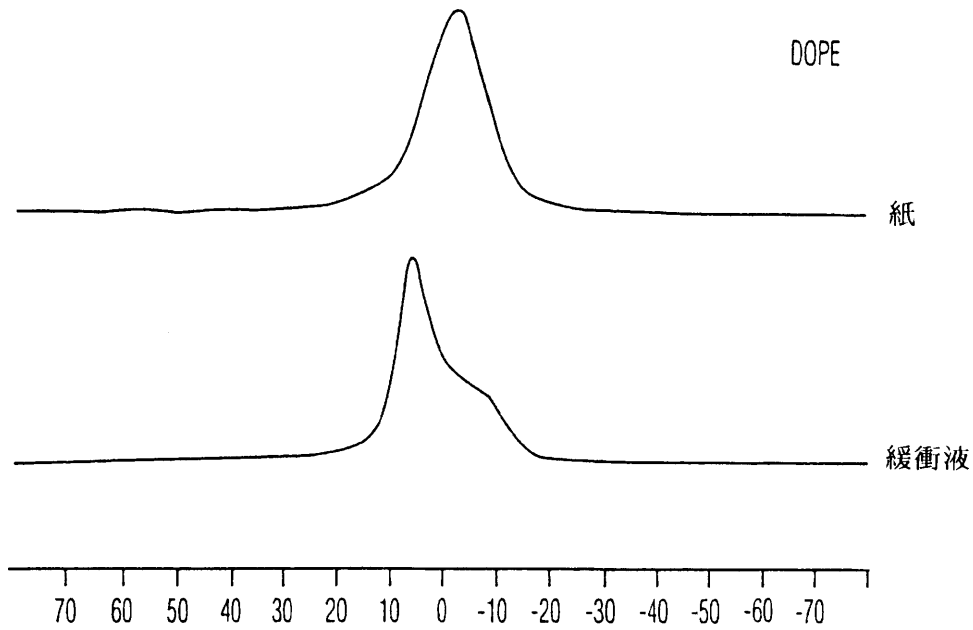


FIG. 1

【図2】

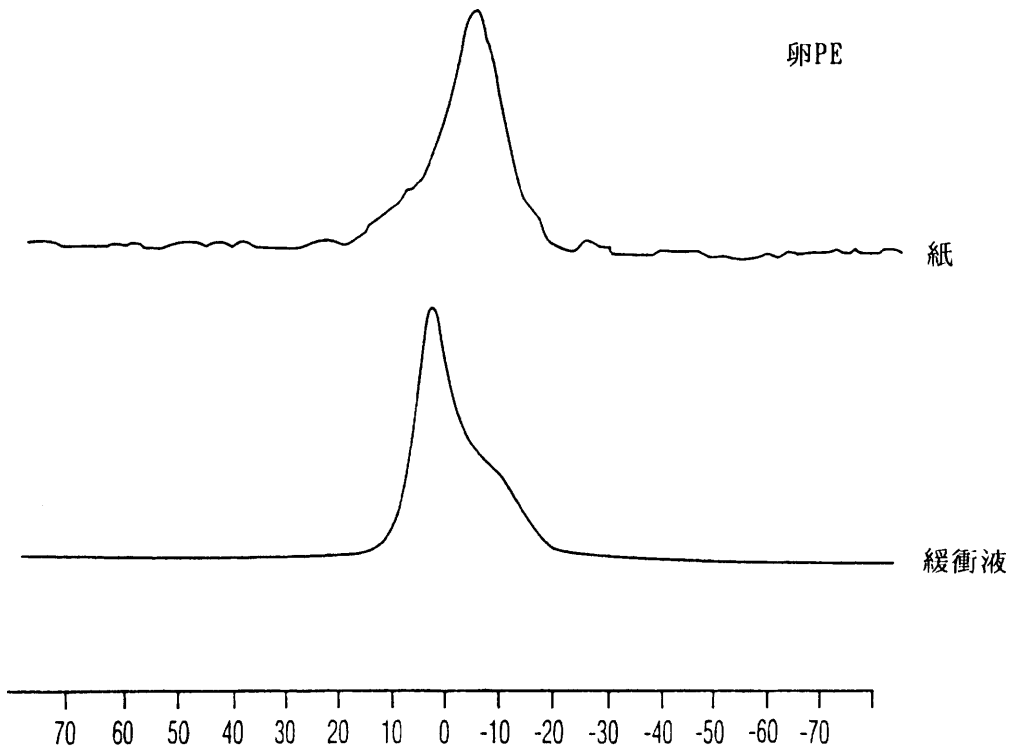


FIG. 2

【図3】

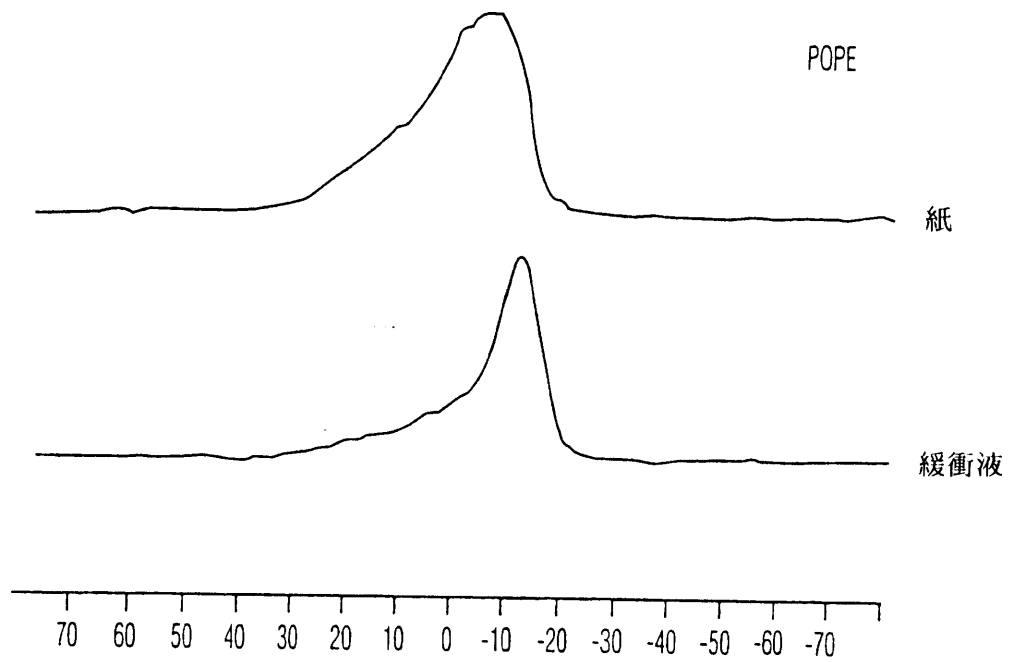


FIG. 3

【図4】

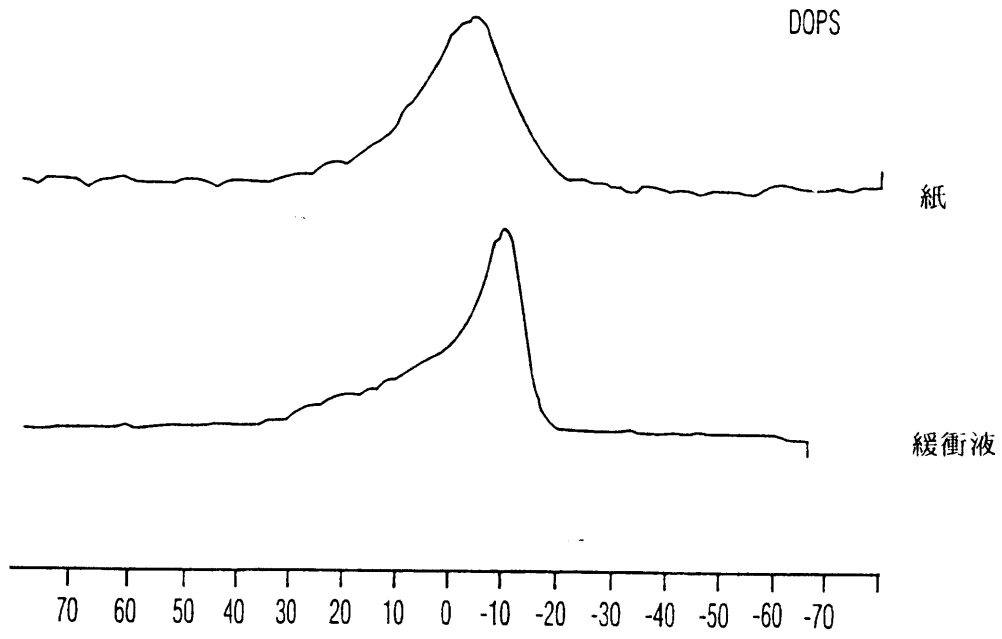


FIG. 4

【図5】

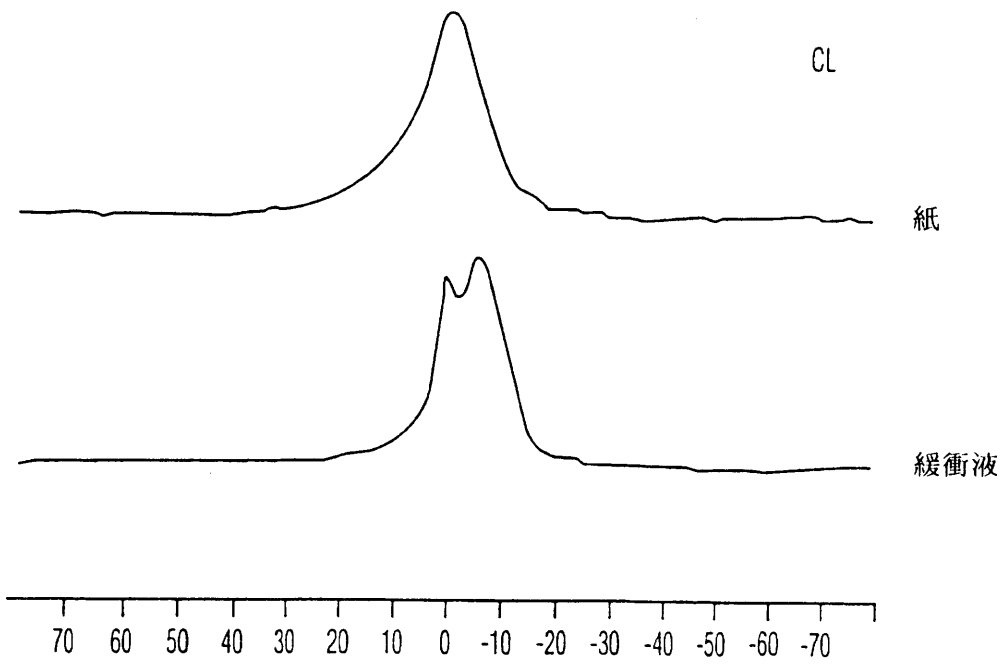


FIG. 5

【図6】

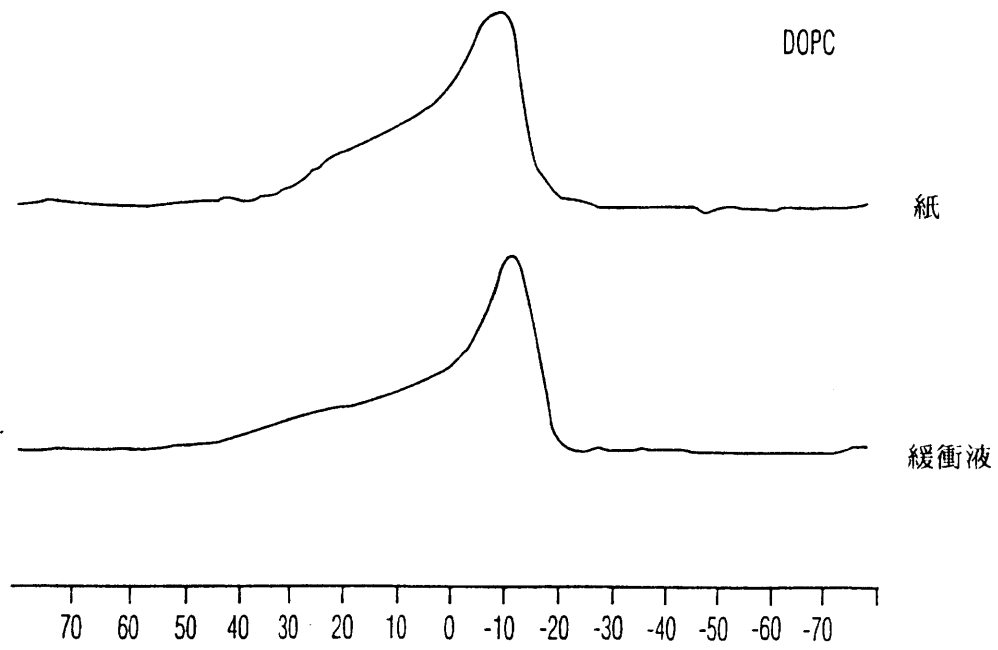


FIG. 6

【図7】

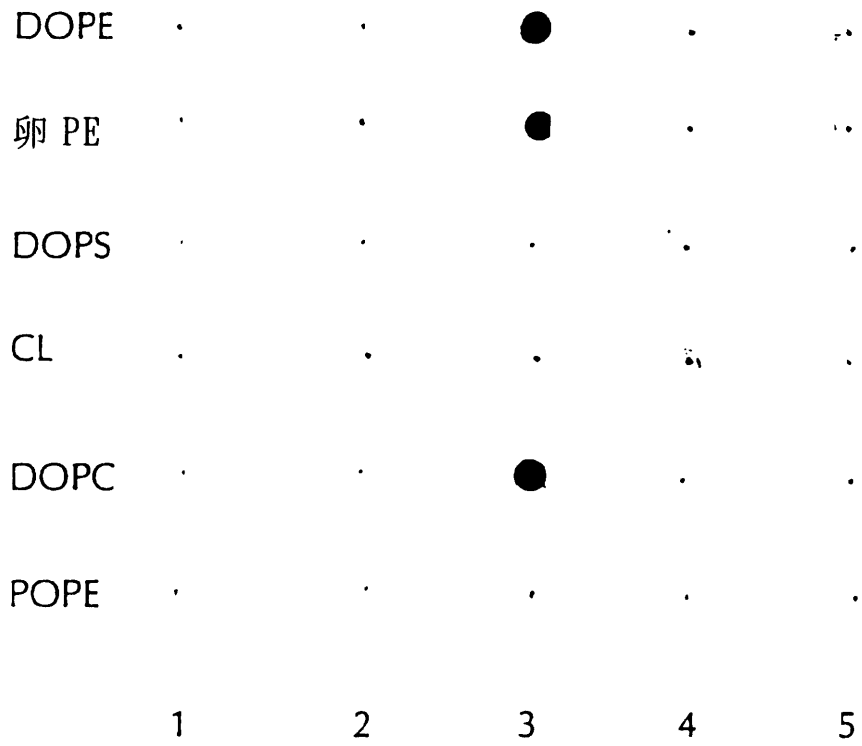


FIG. 7

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/26067										
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER												
IPC(7) : A61K 35/16; C12N 11/02; C12Q 1/00; C12M 1/34; G01N 1/18, 33/53, 33/92, 33/543, 33/549, 33/551, 33/573 US CL : 424/530; 435/4, 7.1, 7.2, 7.4, 7.8, 7.92-7.95, 174-182, 287.1, 287.2, 805; 436/71, 178, 518, 524-535, 829												
B. FIELDS SEARCHED												
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/530; 435/4, 7.1, 7.2, 7.4, 7.8, 7.92-7.95, 174-182, 287.1, 287.2, 805; 436/71, 178, 518, 524-535, 829												
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) EAST, STN												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
A,P	US 5,972,595 A (KASILA et al) 26 October 1999, whole document.	1-15										
A	US 5,776,487 A (MAXFIELD WILSON et al) 07 July 1998, whole document.	1-15										
Y	US 4,708,933 A (HUANG et al) 24 November 1987, whole document.	1-15										
Y	US 5,043,164 A (HUANG et al) 27 August 1991, whole document.	1-15										
Y	US 5,506,110 A (MATSUURA et al) 09 April 1996, whole document.	1-15										
X	US 4,564,599 A (JANOFF et al.) 14 January 1986, whole document.	1-15										
X	US 4,666,831 A (JANOFF et al) 19 May 1987, whole document.	1-15										
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"J" 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</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"J" 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	"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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	"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)	"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	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"J" 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											
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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											
"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)	"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											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search 27 October 2000 (27.10.2000)		Date of mailing of the international search report 27 DEC 2000										
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20531 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Kartic Padmanabhan Telephone No. 703-308-0196										

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 ローチ, ジョイス

カナダ国ケベック州エイチ3エックス 3
エル3, ハムステッド, ヒース・ロード
41

专利名称(译)	固相測定		
公开(公告)号	JP2003509704A	公开(公告)日	2003-03-11
申请号	JP2001524609	申请日	2000-09-22
[标]申请(专利权)人(译)	利普索姆公司		
申请(专利权)人(译)	脂质体公司, 公司		
[标]发明人	ジャンフアンドリユー・エス ローチジョイス		
发明人	ジャンフ, アンドリユー・エス ローチ, ジョイス		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/92		
CPC分类号	G01N33/92 G01N2405/04		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/543.525.G		
优先权	60/155325 1999-09-22 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于检测抗磷脂抗体的固相测定法，其中所述测定法包括患者血浆，所述患者血浆包含锚固在固体支持物上的非双层磷脂酰乙醇胺（PE）。接触该试纸条并展开该试纸条以使展开的试纸条读取抗体与磷脂的反应。本发明还涉及可用于检测抗磷脂抗体的测定条，其中所述测定条包括非双层PE。

リン脂質	ホスフェートのμモル ^a	
	ブロッキング/洗浄前	ブロッキング/洗浄後
なし(CHCl ₃)	0	0
DOPE	0.023	0.026 ^b
卵PE	0.023	0.028
DOPS	0.042	0.046
CL	0.027	0.033
DOPC	0.024	0.025
POPE	0.024	0.025