

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5859557号
(P5859557)

(45) 発行日 平成28年2月10日(2016.2.10)

(24) 登録日 平成27年12月25日(2015.12.25)

(51) Int.Cl.

F 1

G01N 33/53	(2006.01)	GO 1 N	33/53	R
G01N 33/543	(2006.01)	GO 1 N	33/543	5 1 5 A
A61K 45/00	(2006.01)	GO 1 N	33/543	5 2 1
A61P 17/02	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A61P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/02	

請求項の数 34 (全 53 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-537784 (P2013-537784)
(86) (22) 出願日	平成23年11月2日 (2011.11.2)
(65) 公表番号	特表2014-502347 (P2014-502347A)
(43) 公表日	平成26年1月30日 (2014.1.30)
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/058945
(87) 国際公開番号	W02012/071145
(87) 国際公開日	平成24年5月31日 (2012.5.31)
審査請求日	平成26年10月6日 (2014.10.6)
(31) 優先権主張番号	61/409,297
(32) 優先日	平成22年11月2日 (2010.11.2)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	513109050 カイファ、 インコーポレイテッド アメリカ合衆国 ミズーリ 63108, セント ルイス, フォレスト パーク アベニュー 4320, スイート 3 O 3
(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(74) 代理人	100181674 弁理士 飯田 貴敏
(74) 代理人	100181641 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】補体活性化についての側方流動イムノアッセイおよび補体関連障害のポイント・オブ・ケア評価のための使用法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

補体活性化レベルを、補体関連障害のリスクがある個体の指標とする方法であって、

(a) ポイント・オブ・ケア用側方流動イムノアッセイにより、該個体から得られた体液の試料の補体活性化レベルを測定する工程；

(b) 試料の該補体活性化レベルと対照の基準レベルとを比較することにより、該試料の該補体活性化レベルと補体関連障害のリスクとを相関させる工程であって、該対照の該基準レベルと比較した該試料の補体活性化レベルの偏差は、該個体に補体関連障害のリスクがあることを示す、工程；

を含み、工程(b)の相関が、該個体の処置の選択の指標である、方法。

10

【請求項 2】

前記補体関連障害が、外傷、炎症性苦痛、自己免疫障害、頭蓋内出血、感染症、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(PNH)、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より選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記炎症性苦痛が、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)、敗血症および肺炎からなる群より選択される、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

前記体液が、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

20

脳脊髄液からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記側方流動イムノアッセイが、前記試料中のインタクト C 3 および i C 3 b のうちの一つ以上の存在または不在を検出する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

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、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記リーダーが、インタクト C 3 、 i C 3 b または全 C 3 の濃度を定量する、請求項 6 に記載の方法。

10

【請求項 8】

前記 C 3 の濃度が、前記対照の前記基準レベルと比較して減少している、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記 i C 3 b の濃度が、前記対照の前記基準レベルと比較して上昇している、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

前記補体関連障害が、炎症性苦痛であり、前記インタクト C 3 、 i C 3 b または全 C 3 の濃度が、炎症性苦痛の重症度と相関する、請求項 7 に記載の方法。

20

【請求項 11】

前記処置が、前記個体に対する追加の検査を行うこと、人工呼吸器を最適化すること、または抗生物質、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治療薬を投与することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記追加の検査が、前記個体から気管支肺胞洗浄 (BAL) 試料を採取することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記補体インヒビターが、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 C 3 抗体、抗 C 5 抗体、C 3 a 受容体アンタゴニストおよび C 5 a 受容体アンタゴニストからなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 14】

前記ポイント・オブ・ケア用側方流動イムノアッセイが、約 30 分以下で前記試料中のインタクト C 3 、 i C 3 b または全 C 3 の量の測定値をもたらす、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

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；

該マーカーの第一エピトープを結合する検出抗体；

該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；および

40

対照分析物を結合する抗体を含む対照ライン

を含み、

該マーカーは、インタクト C 3 、 i C 3 b および全 C 3 からなる群より選択される、側方流動イムノアッセイ。

【請求項 16】

前記検出抗体が、シグナルをもたらす標識を含む、請求項 1 に記載の側方流動イムノアッセイ。

【請求項 17】

前記マーカーがインタクト C 3 であり、前記第一エピトープが C 3 a ドメインであり、該 C 3 a ドメインが、インタクト C 3 上に存在し、かつ C 3 の活性化に際して失われる、請

50

求項 15 に記載の側方流動イムノアッセイ。

【請求項 18】

前記第二エピトープが、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、請求項 15 に記載の側方流動イムノアッセイ。

【請求項 19】

前記マーカーが iC3b であり、前記第一エピトープが iC3b 上のネオエピトープであり、該ネオエピトープが、C3b が iC3b へと非活性化されると現れ、かつ iC3b が C3c および C3d へとさらに分解されると妨げられる、請求項 15 に記載の側方流動イムノアッセイ。

【請求項 20】

前記第二エピトープが、C3b、iC3b および C3dg 上にのみ存在するネオエピトープである、請求項 19 に記載の側方流動イムノアッセイ。

【請求項 21】

前記体液が、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より選択される、請求項 15 に記載の側方流動イムノアッセイ。

【請求項 22】

前記対照分析物が、IgG である、請求項 15 に記載の側方流動イムノアッセイ。

【請求項 23】

請求項 15 に記載の側方流動イムノアッセイであって、前記体液試料中の補体が、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、側方流動イムノアッセイ。

【請求項 24】

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；

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；

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；

iC3b の第一エピトープを結合する第二検出抗体；

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；および

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。

【請求項 25】

前記第一検出抗体および前記第二検出抗体が、それぞれ、シグナルをもたらす標識を含む、請求項 24 に記載の側方流動イムノアッセイ。

【請求項 26】

前記体液が、全血、血清、血漿、尿、涙液および脳脊髄液からなる群より選択される、請求項 24 に記載の側方流動イムノアッセイ。

【請求項 27】

前記対照分析物が、IgG である、請求項 24 に記載の側方流動イムノアッセイ。

【請求項 28】

請求項 24 に記載の側方流動イムノアッセイであって、前記体液試料中の補体が、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、側方流動イムノアッセイ。

【請求項 29】

前記インタクト C3 の第一エピトープが C3a ドメインであり、該 C3a ドメインが、インタクト C3 上に存在し、かつ C3 の活性化に際して失われる、請求項 24 に記載の側方流動イムノアッセイ。

【請求項 30】

前記インタクト C3 の第二エピトープが、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、請求項 24 に記載の側方流動イムノアッ

10

20

30

40

50

セイ。

【請求項 3 1】

前記 i C 3 b の第一エピトープが i C 3 b 上のネオエピトープであり、該ネオエピトープが、 C 3 b が i C 3 b へと非活性化されると現れ、かつ i C 3 b が C 3 c および C 3 d へとさらに分解されると妨げられる、請求項 2 4 に記載の側方流動イムノアッセイ。

【請求項 3 2】

前記 i C 3 b の第二エピトープが、 C 3 b 、 i C 3 b および C 3 d g 上のみに存在するネオエピトープである、請求項 2 4 に記載の側方流動イムノアッセイ。

【請求項 3 3】

インタクト C 3 を結合する前記抗体と i C 3 b を結合する前記抗体とが、実質的に交差反応しない、請求項 2 4 に記載の側方流動イムノアッセイ。

【請求項 3 4】

補体活性化レベルを、生理的状態について処置を受けており、補体関連障害に罹患している個体についての処置の変更の指標とする方法であって、

(a) ポイント・オブ・ケア用側方流動イムノアッセイにより、該個体からの体液の一連の試料のそれぞれの補体活性化レベルを測定する工程；

(b) 該一連の試料の該補体活性化レベルを比較して、補体活性化レベルの変化を経時的に検出する工程；

を含み、該個体の該処置が、工程 (b) の相関に基づき変更されることを特徴とする、方法。

10

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2010年11月2日に出願された米国仮出願第 61 / 409,297 号への米国特許法 119 条 (e) 項の下での優先権を主張し、上記米国仮出願の内容は、その全体が参考として本明細書に援用される。

【0002】

ここに開示する主題は、補体活性化の測定のための側方流動イムノアッセイに関する。具体的には、ここに開示する主題は、試料中のインタクト C 3 および i C 3 b の定量的測定のための側方流動イムノアッセイ、ならびに炎症性苦痛などの補体関連障害のリスクがある個体の評価および処置におけるその使用方法に関する。

30

【背景技術】

【0003】

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。

【0004】

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含み、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、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、C 3 およびその活性化産物の概略概観図である。

40

【0005】

補体、および特に C 3 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

50

、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。

【0006】

重症外傷患者は、独特な臨床的難題を呈する。損傷重症度の的確な評価は、初期介入および患者安定化、ならびに（例えば、集団災害後の）患者トリアージにとっても重要である。ICUに入れられる患者は、初期安定化後であっても、生命を危うくする二次的合併症（数ある中でも、臓器機能不全、呼吸困難および敗血症を含む）のリスクが依然として高い。これらの状態の多くは、過剰炎症（hyper-inflammatory）イベントを含み、これは、急速にエスカレートして、臨床症状が検出される前に有意な損傷を引き起こし得る。一般に、これらのイベントに先行して、炎症反応の恒常性が次第に不安定になる。損傷後最も早い時点（earliest time point）で頻繁に（例えば、1または2時間ごとに）かつ確実に炎症をモニタリングできることは、きわめて大きな臨床的価値を有し、臨床ケア患者の臨床成績を向上させるだろう。10

【0007】

幾つかの報告により、補体活性化は損傷直後に起こり、損傷の重症度と相關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關することが判明した。非特許文献1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、患者転帰と相關した。Heckel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とも見出した。20

【0008】

Zilowらによる類似の研究（非特許文献2）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。30

【0009】

外傷ケアの分野では、損傷後最初の一時間は、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一時間以内の介入は、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。

【0010】

これまで、処置の実行可能時間枠内で補体活性化を測定するためのポイント・オブ・ケア・アッセイは、当該技術分野において公知ではない。補体と疾患または外傷と間の関連性は、長きにわたり認識されているが、C3は、少数の疾患または状態でしかモニタリングされない。これらの場合でさえ、現行のアッセイ法には限界がある。先ず第一に、殆どの場合、旧来の補体アッセイは、（例えば、濁度アッセイおよびELISAによる）標的分析物としての全C3に関する。全C3は、インタクト（または天然）C3ならびにC3活性化産物および非活性化産物の組み合わせである。これらの検査は、一般に、循環C3レベルの減少を検出する。したがって、減少した全C3レベルは、大量活性化に起因するC3枯渇の尺度にしかならない。しかし、他の要因（例えば食事または運動）が、C3の定常状態レベルを低下させることもある。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。さらに、全C3を測定する検査は、患者ケアの指示に有用であろう、C3活性化シグネチャーのリアルタイム変化をモニタリングすることができない。例えば、（減少したC3レベルによって特徴づけられる）外傷または全身性エリテマトーデスに罹患している患者は、改善されたC3活性化モニタリング4050

の恩恵を受けるだろう。現在、全身性エリテマトーデスに有効な処置は、低下した C 3 レベルの正常レベルへの復帰によって測定される。しかし、医師は、基礎疾患プロセスが停止されたのか、または恒常性メカニズムに関して十分遅延されて、C 3 が生理的に正常なレベルに復帰しただけであるのかを見分けることが難しい。

【 0 0 1 1 】

現行の C 3 検査の第二の限界は、大多数のアッセイを行うために必要とされる時間である。補体活性化の検出のための典型的な E L I S A アッセイは、実施に何時間も必要であり、検査技師および熟練した技師を容易に確保できることが求められる。したがって、バイオマーカーが大体数分で変化し、同様の時間尺度で臨床的介入が求められる炎症性機能不全の指摘には、このアッセイプラットフォームは有用でない。

10

【 0 0 1 2 】

現行の C 3 検査の第三の限界は、タンパク質カスケード自体の性質に存在する。補体は、細心の注意を要することで有名であり、標準的な分析手順（取り扱い、保管、および分析中に C 3 に接触する外来材料への曝露）によって活性化されることがある。補体は、侵入微生物の溶解、および損傷部位における創傷治癒反応の開始に非常に有効である。この有効性は、一部は、細菌細胞壁成分などの外来材料によって活性化される C 3 の能力に起因する。この特性は、新たな外来病原体に対する免疫反応の指示に有用であるが、この同じ特性が、手に余る難題を実験および診断研究に提起する。試料取り扱いの際に使用されるプラスチックなどの材料、試料自体の操作、および不適切な保管条件も補体活性化を誘発することがある。所与のアッセイを行うために必要とされる処理および取り扱い工程が多いほど、そのアッセイ自体による補体の活性化に起因して偽陽性が多くなると予想できる。これらの偽陽性は、旧来の検査を複雑にし、現行検査方法を準リアルタイム（near real - time）で患者ケアの指示に用いるのに不適切なものにする。

20

【 0 0 1 3 】

補体活性化検査におけるさらなる考慮事項は、炎症反応のリアルタイム変化を検出するための最良のバイオマーカーの選択である。C 3 は、炎症に関するバイオマーカーとして幾つかの魅力的な資質を有する。第一に、補体系の中心的タンパク質としての C 3 は、補体活性化を引き起こすこととなる大多数の刺激によって活性化される。第二に、C 3 は、損傷度または感染度に比例して活性化する。第三に、C 3 は、準リアルタイムで生理的傷害に反応する。反応に数時間または数日かかる他の急性期炎症マーカーとは対照的に、作用因子によって引き起こされるクリーゼに直接反応して補体活性化が起こる。この迅速に反応する特性は、診療所でよく使用される他のバイオマーカーには存在しない。

30

【 0 0 1 4 】

具体的には、インタクト（または天然）C 3 は、炎症状態の価値あるマーカーである。インタクト C 3 は、活性化に利用できる C 3 の量を表す。全 C 3 は、インタクト C 3 、ならびにすべての C 3 活性化産物も表す。現在、標準的な補体アッセイは、一般に、濁度アッセイまたは E L I S A によって全 C 3 を測定する。技術的に実施がより簡単であるが、全 C 3 アッセイは、インタクト C 3 アッセイほど正確に C 3 枯渇を検出することができない。インタクト C 3 を特に経時的にモニタリングすることは、大量の補体活性化イベント、例えば、外傷および他の全身性補体活性化適応症の際に起こるもの追跡に有用である。インタクト C 3 を経時的にモニタリングすることにより、臨床医は C 3 の枯渇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できる。さらに、インタクト C 3 は、補体活性化指数（例えば、Z i l o w および H e c k e によって使用された C 3 a : 全 C 3 比）を計算するときに、全 C 3 より有用であり得る。インタクト C 3 アッセイは、一部には、インタクト C 3 が非常に不安定であり、正しく取り扱わないと変性または自己活性化し得るため、管理することもそれに依存することも難しいと歴史的に証明されている。

40

【 0 0 1 5 】

C 3 分割産物である i C 3 b も、炎症反応の価値あるマーカーである。i C 3 b は、30 から 90 分の半減期を有し、（例えば C 3 a と比較して）あまり不安定でないが、それ

50

でも迅速に反応するバイオマーカーとして役立つ。しかし、iC3bは、患者試料中にインタクトC3よりはるかに低レベルで存在する。インタクトC3タンパク質とiC3b特異的アッセイとの間のわずかな程度（例えば1%）のクロストークでさえ、正常な循環iC3bの二倍のレベルで偽陽性iC3bシグナルを生じさせる。それ故、望ましい炎症マーカーでありながら、これまでiC3bは診断検査に大きな難題を提示していた。

【0016】

2010年11月25日に発行されたZhangらの特許文献1は、バイオマーカーのインタクトC3、iC3bおよび全C3による補体活性化の評価方法に関する。しかし、Zhangらのものは、検査室での処理および熟練した技師の専門技術を必要とする旧来のサンドイッチタイプのイムノアッセイ、例えばELISA、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を活性化して偽陽性検査結果を生じさせ、その結果、インタクトC3を正確に測定する能力を妨げることとなることが公知である、試料調製、保管および取り扱い工程を必要とする。さらに、Zhangらのアッセイおよび方法は、処理に数時間が必要とし、したがって、生理的クリーゼ後の最も早い時点で、患者ケアに影響し得る準リアルタイムデータをもたらすことができない。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0017】

【特許文献1】国際公開第2010/135717号

20

【非特許文献】

【0018】

【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

【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

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

補体関連障害のリスクがある患者のインタクトC3およびiC3bの測定のための迅速なポイント・オブ・ケア・アッセイであって、試料の取り扱いに起因する補体活性化を最小限にし、臨床医が準リアルタイムにおいて補体活性化レベルの変化に応じて行動することを可能にする、ポイント・オブ・ケア・アッセイが、患者処置を導くために、および炎症反応をモニタリングするために必要とされ続けている。

【課題を解決するための手段】

【0020】

40

本発明者らは、ここに、外傷性損傷または他の生理的クリーゼ直後の最も早い時点での患者ケアの指示に用いるのに好適なインタクトC3およびiC3bの定性的および定量的測定のためのポイント・オブ・ケア方法およびアッセイを開発した。干渉クロストークを避けられ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、およびこの技術を側方流動イムノアッセイプラットフォームに適用することにより、バイオマーカーのインタクトC3およびiC3bを検出および定量でき、その上、これらの分析物についてのより従来的な検査方法を悩ませてきた偽陽性結果を回避できることを、本発明者らは驚くべきことに発見した。

【0021】

したがって、補体関連障害のリスクがある個体を処置するための方法であって、(a)

50

前記個体から体液の試料を採取する工程；(b) ポイント・オブ・ケア用側方流動イムノアッセイにより前記試料の補体活性化レベルを測定する工程；(c) 前記試料の補体活性化レベルと対照の基準レベルとを比較することにより前記試料の補体活性化レベルと補体関連障害のリスクとを相關させる工程（この場合、前記対照の基準レベルと比較した前記試料の補体活性化レベルの偏差は、前記個体に補体関連障害のリスクがあることを示す）；(d) 工程(c)の相關関係に基づき、前記個体の処置を選択する工程；および(e)工程(d)に従って選択した処置で前記個体を処置する工程を含む方法を提供する。

【0022】

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、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。

10

【0023】

さらにもう一つの実施形態は、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；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とを含む、側方流動イムノアッセイである。

20

【0024】

もう一つの実施形態では、生理的状態について処置を受けており、補体関連障害に罹患している個体をモニタリングするための方法であって、(a) 前記個体から体液の一連の試料を採取する工程；(b) ポイント・オブ・ケア用側方流動イムノアッセイにより前記各試料の補体活性化レベルを決定する工程；(c) 前記一連の試料の補体活性化レベルを比較して、補体活性化レベルの変化を経時的に検出する工程；および(d) 工程(c)の相關関係に基づき、前記個体の処置を変更する工程を含む方法を提供する。

30

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目1)

補体関連障害のリスクがある個体を処置するための方法であって、

- (a) 該個体から体液の試料を採取する工程；
- (b) ポイント・オブ・ケア用側方流動イムノアッセイにより該試料の補体活性化レベルを測定する工程；
- (c) 該試料の該補体活性化レベルと対照の基準レベルとを比較することにより、該試料の該補体活性化レベルと補体関連障害のリスクとを相關させる工程であって、該対照の該基準レベルと比較した該試料の補体活性化レベルの偏差は、該個体に補体関連障害のリスクがあることを示す、工程；

40

- (d) 工程(c)の相關に基づき、該個体の処置を選択する工程；および

- (e) 工程(d)に従って選択した処置で該個体を処置する工程

を含む、方法。

(項目2)

前記補体関連障害が、外傷、炎症性苦痛、自己免疫障害、頭蓋内出血、感染症、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(PNH)、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より選択される、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記炎症性苦痛が、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)、敗血症および肺炎からなる群より選択される、項目2に記載の方法。

50

(項目4)

前記体液が、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より選択される、項目1に記載の方法。

(項目5)

前記側方流動イムノアッセイが、前記試料中のインタクトC3およびiC3bのうちの一つ以上の存在または不在を検出する、項目1に記載の方法。

(項目6)

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、項目1に記載の方法。

(項目7)

前記リーダーが、インタクトC3、iC3bまたは全C3の濃度を定量する、項目6に記載の方法。

10

(項目8)

前記C3の濃度が、前記対照の前記基準レベルと比較して減少している、項目7に記載の方法。

(項目9)

前記iC3bの濃度が、前記対照の前記基準レベルと比較して上昇している、項目7に記載の方法。

(項目10)

前記補体関連障害が、炎症性苦痛であり、前記インタクトC3、iC3bまたは全C3の濃度が、炎症性苦痛の重症度と相関する、項目7に記載の方法。

20

(項目11)

前記処置が、前記個体に対する追加の検査を行うこと、人工呼吸器を最適化すること、または抗生物質、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治療薬を投与することを含む、項目1に記載の方法。

(項目12)

前記追加の検査が、前記個体から気管支肺胞洗浄(BAL)試料を採取することを含む、項目11に記載の方法。

(項目13)

前記補体インヒビターが、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、項目11に記載の方法。

30

(項目14)

前記ポイント・オブ・ケア用側方流動イムノアッセイが、約30分以下で前記試料中のインタクトC3、iC3bまたは全C3の量の測定値をもたらす、項目1に記載の方法。

(項目15)

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；

該マーカーの第一エピトープを結合する検出抗体；

40

該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；および

対照分析物を結合する抗体を含む対照ライン

を含み、

該マーカーは、インタクトC3、iC3bおよび全C3からなる群より選択される、側方流動イムノアッセイ。

(項目16)

前記検出抗体が、シグナルをもたらす標識を含む、項目15に記載の側方流動イムノアッセイ。

(項目17)

前記マーカーがインタクトC3であり、前記第一エピトープがC3aドメインであり、該

50

C 3 a ドメインが、インタクト C 3 上に存在し、かつ C 3 の活性化に際して失われる、項目 15 に記載の側方流動イムノアッセイ。

(項目 18)

前記第二エピトープが、インタクト C 3、C 3 b、i C 3 b および C 3 d 上に存在する C 3 d ドメイン内の領域である、項目 15 に記載の側方流動イムノアッセイ。

(項目 19)

前記マーカーが i C 3 b であり、前記第一エピトープが i C 3 b 上のネオエピトープであり、該ネオエピトープが、C 3 b が i C 3 b へと非活性化されると現れ、かつ i C 3 b が C 3 c および C 3 d へとさらに分解されると妨げられる、項目 15 に記載の側方流動イムノアッセイ。

10

(項目 20)

前記第二エピトープが、C 3 b、i C 3 b および C 3 d g 上にのみ存在するネオエピトープである、項目 19 に記載の側方流動イムノアッセイ。

(項目 21)

前記体液が、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より選択される、項目 15 に記載の側方流動イムノアッセイ。

(項目 22)

前記対照分析物が、IgG である、項目 15 に記載の側方流動イムノアッセイ。

(項目 23)

項目 15 に記載の側方流動イムノアッセイであって、前記体液試料中の補体が、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、側方流動イムノアッセイ。

20

(項目 24)

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；

インタクト C 3 の第一エピトープを結合する第一検出抗体；

インタクト C 3 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；

i C 3 b の第一エピトープを結合する第二検出抗体；

i C 3 b 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；および

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

30

を含む、側方流動イムノアッセイ。

(項目 25)

前記第一検出抗体および前記第二検出抗体が、それぞれ、シグナルをもたらす標識を含む、項目 24 に記載の側方流動イムノアッセイ。

(項目 26)

前記体液が、全血、血清、血漿、尿、涙液および脳脊髄液からなる群より選択される、項目 24 に記載の側方流動イムノアッセイ。

(項目 27)

前記対照分析物が、IgG である、項目 24 に記載の側方流動イムノアッセイ。

(項目 28)

項目 24 に記載の側方流動イムノアッセイであって、前記体液試料中の補体が、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、側方流動イムノアッセイ。

40

(項目 29)

前記インタクト C 3 の第一エピトープが C 3 a ドメインであり、該 C 3 a ドメインが、インタクト C 3 上に存在し、かつ C 3 の活性化に際して失われる、項目 24 に記載の側方流動イムノアッセイ。

(項目 30)

前記インタクト C 3 の第二エピトープが、インタクト C 3、C 3 b、i C 3 b および C 3 d 上に存在する C 3 d ドメイン内の領域である、項目 24 に記載の側方流動イムノアッセイ。

50

(項目31)

前記 i C 3 b の第一エピトープが i C 3 b 上のネオエピトープであり、該ネオエピトープが、C 3 b が i C 3 b へと非活性化されると現れ、かつ i C 3 b が C 3 c および C 3 d へとさらに分解されると妨げられる、項目24に記載の側方流動イムノアッセイ。

(項目32)

前記 i C 3 b の第二エピトープが、C 3 b、i C 3 b および C 3 d g 上のみに存在するネオエピトープである、項目24に記載の側方流動イムノアッセイ。

(項目33)

インタクトC 3 を結合する前記抗体と i C 3 b を結合する前記抗体とが、実質的に交差反応しない、項目24に記載の側方流動イムノアッセイ。

10

(項目34)

生理的状態について処置を受けており、補体関連障害に罹患している個体をモニタリングするための方法であって、

- (a) 該個体から体液の一連の試料を採取する工程；
- (b) ポイント・オブ・ケア用側方流動イムノアッセイにより該試料のそれぞれの補体活性化レベルを決定する工程；
- (c) 該一連の試料の該補体活性化レベルを比較して、補体活性化レベルの変化を経時的に検出する工程；および
- (d) 工程(c)の相関に基づき、該個体の処置を変更する工程

を含む、方法。

20

【0025】

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】**【0026】**

【図1】図1は、補体系の概略概観図を提供するものである。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C 3 の活性化に収束する。C 3 のタンパク質分解的活性化は、C 3 分割産物 C 3 a および C 3 b を生じさせる。C 3 b は、さらにタンパク質分解的に修飾されて、C 3 活性化についてのバイオマーカーである i C 3 b を形成する。インタクトC 3 および i C 3 b は、概略図において丸で囲まれている。

30

【図2】図2は、C 3 活性化および非活性化の略図を提供するものである。インタクトC 3 は、C 3 a および C 3 b 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C 3 分子もあり；水と反応し、循環内に留まるものもある。C 3 b は、プロテアーゼ因子1 (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 i C 3 b であり、これは、短鎖ペプチドである C 3 f を除去する因子1の活性化によって形成される。i C 3 b は、C 3 c および C 3 d g へとさらに分解され、その C 3 d g が最終的に C 3 d へと分解される。

【図3】図3は、抗体ペアによるインタクトC 3 および i C 3 b の特異的認識の略図である。(A) インタクトC 3 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C 3 分子中にしか存在しないC 3 a を認識する；第二抗体は、インタクトC 3 と i C 3 b の両方に存在するC 3 d 中の領域を認識する。第二抗体は、C 3 およびその誘導体の他のタンパク質分子からの識別に関与するが、i C 3 b とインタクトC 3 の識別には関与しない。インタクトC 3 に対する抗体の代替ペアとしては、C 3 a および C 3 f を認識する抗体が挙げられる。(B) i C 3 b 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C 3 g 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、因子1がC 3 f 断片を除去すると現れる。因子1が 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 (Quidel (登録商標) A 25 0) が挙げられる。

40

50

【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。

【図5】図5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、单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C3およびiC3b)を検出するための側方流動イムノアッセイを示す。

【図6】図6は、单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C3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C3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、iC3b側方流動イムノアッセイのための検査カセットを示す。

【図7】図7は、インタクトC3およびiC3b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。

【図8】図8は、全C3、インタクトC3およびiC3b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。

【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、单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C3およびiC3b)を検出するための側方流動イムノアッセイを示す。

【図10】図10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。前記分析物は、(A)と(B)両方について、全C3、インタクトC3およびiC3bから選択される。

【図11】図11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図である。(A)は、カセットケースなしでiC3bを検出する検査ストリップについての側方流動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0.5mg/mLであり、BSA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1mg/mLであり、BSA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10ng/mLに達し、ダイナミックレンジは10ug/mLに及ぶ。

【図12】図12は、本明細書に記載するiC3b用の側方流動イムノアッセイの感度を示す図である。感度は、10ng/mLから10ug/mL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。値をELISAによって検証した。

【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感度を示す図である。感度は、20ng/mLから10ug/mL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。値をELISAによって検証した。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。

【図14】図14は、側方流動イムノアッセイにおけるインタクトC3とiC3b抗体間のクロストークを示す図である。

10

20

30

40

50

【図15】図15は、本明細書に記載する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iC3bレベルを12時間間隔で示す図である。

【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iC3bレベルを示す図である。結果は、健常ドナーからの全血中のiC3bより、およそ2500倍多いインタクトC3を示す。

【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iC3bレベルを示す図である。結果は、健常ドナーからの全血中のiC3bより、およそ333倍多いインタクトC3を示す。

【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iC3bレベルを示す図である。結果は、運動後の健常個体からの全血中のiC3bより、1000倍多いインタクトC3を示す。
10

【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液体の表である。

【発明を実施するための形態】

【0027】

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、当業者には明白となるだろう。

【0028】

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。
20

【0029】

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。

【0030】

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るべきである。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。
30

【0031】

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。

【0032】

「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(单数もしくは複数)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、单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。
40

【0033】

「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
50

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(CD R)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、それが個々のB細胞系統に由来する幾つかの抗体亜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CD R 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。

【0034】

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。

【0035】

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よりも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。

【0036】

「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。

【0037】

「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

10

20

30

40

50

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 i C 3 b のインタクトまたは全 C 3 に対する比として、または C 3 a の全 C 3 に対する比として記載することもある。

【0038】

「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（imminent 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。

10

【0039】

「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の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。

20

【0040】

30

「C 3 活性化シグネチャー」は、本明細書において用いる場合、C 3 活性化レベルの経時的变化を意味する。

【0041】

「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。

【0042】

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 C 3 レベルは、C 3 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 C 3 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。

40

【0043】

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、i C 3 b レベルは、C 3 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、i C 3 b のインタクト C 3 に対する比は、C 3 活性化を示す。

【0044】

「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

50

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。

【0045】

「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1~2.5%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ます。

10

【0046】

「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。

20

【0047】

「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。

30

【0048】

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、側方流動イムノアッセイ結果に、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、試料操作が少なくてすみ、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。

【0049】

「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。

40

【0050】

「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

50

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、 Bio Assay 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Dektect 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。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。

【0051】

「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。10

【0052】

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IgG / IgM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(CRP)ならびに微生物DNAおよびRNA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C3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(C3)に収束する。C3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。20

【0053】

古典的経路は、IgMまたはIgG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C1に結合し、該C1は、C1q、C1rおよびC1sから構成される。C1qの抗体-抗原複合体への結合は、C1rおよびC1sの活性化を誘発する。活性化されたC1sが次に成分C4を切断して、C4aおよびC4bを生じさせる。C4b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95%は、水と反応して可溶性の活性化C4bを形成する。すると成分2は、C4bと結合することができ、その後、C1sによってC2aおよびC2bへと活性化される。C4bおよびC2bは組み合わされて、古典的経路(CP)C3コンバターゼであるC4bC2aを形成する。30

【0054】

このCPコンバターゼは、C3を切断してC3aおよびC3bを形成する。活性化C4bと同様に、C3b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C3bは、多数の役割を有する。単独で、C3b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(decorate cell)または粒子を取り込ませることができる。加えて、C3bは、C4bC2a(CP C3コンバターゼ)と結合してC5コンバターゼを形成することができる。C4bC2aC3bと称するこの複合体をCP C5コンバターゼと言う。あるいは、C3bは、副経路(AP)C3コンバターゼと呼ばれる別のC3コンバターゼのコアを形成することができる。

【0055】

副経路(AP)は、C3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、C3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4050

化される。この副経路は、C3(H₂O)を形成する水分子によるC3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。C3(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BaおよびBbにすることができる。Bbは、C3(H₂O)と結合したままC3(H₂O)Bb複合体を形成し、この複合体がC3コンバターゼとして作用し、C3を切断し、結果としてC3aおよびC3bが得られる。

【0056】

このプロセスよって、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C3b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、Bbになり、結果としてC3bBbが得られ、このC3bBbを副経路(AP)C3コンバターゼと言う。C3bの別の分子のAP C3コンバターゼへの結合はC3bBbC3bを生成し、このC3bBbC3bがAP C5コンバターゼである。

【0057】

レクチン補体経路は、マンノース結合レクチン(MBL)およびMBL結合セリンプロテアーゼ(MASP)の炭水化物への結合によって開始される。MBL-1遺伝子（ヒトではLMAN-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。MBL-2遺伝子は、血清中で見られる可溶性マンノース結合タンパク質をコードする。ヒトレクチン経路では、MASP-1およびMASP-2が、C3コンバターゼをもたらす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コンバターゼの生産につながる。

【0058】

上記三経路のいずれかによって生成されたC5コンバターゼは、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。

【0059】

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関連する。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。

【0060】

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

10

20

30

40

50

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。

【0061】

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。10

【0062】

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); Heckeら、Circulating complement proteins in multiple trauma patients - correlation with injury severity, development of sepsis, and outcome、Crit. Care Med. 25(12):2015-24(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、Detimental effects of complement activation in hemorrhagic shock、J. Appl. Physiol. 90:441-46(2001)参照。20

【0063】

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：第一に、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。前記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る。第二に、本アッセイおよび方法は、取り扱い工程が少なくてすみ、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。第三に、本明細書に記載す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。40

【0064】

一つの実施形態において、補体関連障害のリスクがある個体を処置するための方法であつて、(a)前記個体から体液の試料を採取する工程；(b)ポイント・オブ・ケア用側方流動イムノアッセイにより前記試料の補体活性化レベルを測定する工程；(c)前記試料の補体活性化レベルと対照の基準レベルとを比較することにより前記試料の補体活性化レベルと補体関連障害のリスクとを相関させる工程(この場合、前記対照の基準レベルと比較した前記試料の補体活性化レベルの偏差は、前記個体に補体関連障害のリスクがあることを示す)；(d)工程(c)の相関に基づき、前記個体の処置を選択する工程；および(e)工程(d)に従って選択した処置で前記個体を処置する工程を含む、方法を提供する。

【0065】

10

前記方法のもう一つの実施形態において、前記補体関連障害は、外傷、炎症性苦痛、自己免疫障害、頭蓋内出血、感染症、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からなる群より選択される。具体的な実施形態では、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*)、敗血症および肺炎が挙げられるが、これらに限定されない。

【0066】

20

前記方法の一つの実施形態において、前記個体から採取される体液は、全血、血清、血漿、尿、涙液、唾液、創傷滲出液、気管支肺胞(*bronchial alveolar*)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。具体的な実施形態では、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る。もう一つの具体的な実施形態では、前記体液は全血である。

【0067】

30

前記方法の一つの実施形態において、前記側方流動イムノアッセイは、前記試料中のインタクトC3および*iC3b*のうちの一つ以上の存在または不在を検出する。前記方法のもう一つの実施形態において、前記側方流動アッセイは、全C3の存在を検出する。もう一つの実施形態において、前記側方流動イムノアッセイは、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、前記試料中のインタクトC3および*iC3b*のうちの一つ以上の濃度を定量する。もう一つの具体的な実施形態では、前記リーダーは、前記試料中の全C3の濃度を定量する。

【0068】

対照の基準値からの偏差(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する。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おり、これは、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。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。

40

【0069】

個体活性化レベルは、炎症性苦痛の重症度と相関する：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、前記方法のもう一つの実施形態において、補体関連障害は炎症性苦痛であり、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相関する。

【0070】

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

50

ント・オブ・ケア診断情報を提供する。工程(c)において相関した補体関連障害のリスクに基づき、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。一つ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(bronchialveolar)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。

【0071】

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。

【0072】

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、本方法での使用に好適である。一つ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。

【0073】

本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。一つ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分以下で提供する。より具体的な実施形態では、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分以下で提供する。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。

【0074】

本発明のもう一つの態様では、生理的状態について処置を受けたかまたは受けしており、補体関連障害に罹患していることが公知の個体をモニタリングするための方法であって、(a)前記個体から体液の一連の試料を採取する工程；(b)ポイント・オブ・ケア用側

10

20

30

40

50

方流動イムノアッセイにより前記各試料の補体活性化レベルを決定する工程；(c)前記一連の試料の補体活性化レベルを比較して、補体活性化レベルの変化を経時的に検出する工程；および(d)工程(c)の相関に基づき、前記個体の処置を変更する工程を含む、方法を提供する。一連の血液試料を集め、検査して、処置に対応する補体活性化レベルをモニタリングする。

【0075】

一つの実施形態において、前記補体関連障害は、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、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*)¹⁰(PNH)、遺伝性血管浮腫(*hereditary angiodema*)、腎疾患、妊娠関連障害および神経障害、ならびに外傷(炎症性機能不全、例えば人工呼吸器関連肺炎(VAP)、呼吸困難および多臓器不全のリスクがある患者を含む)からなる群より選択される。

【0076】

本明細書に開示する他の方法のように、一定の実施形態において、前記体液は、全血、血清、血漿、尿、涙液、唾液、創傷滲出液、気管支肺胞(*broncholar*)洗浄液および脳脊髄液からなる群より選択される。一つの実施形態において、前記側方流動イムノアッセイは、前記試料中のインタクトC3およびiC3bのうちの一つ以上の存在または不在を検出する。もう一つの実施形態において、前記側方流動イムノアッセイは、インタクトC3、iC3bまたは全C3の濃度を定量することができるリーダーによって読み取られる。²⁰

【0077】

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する。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、個体の処置を変更することとなる。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する。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、個体の処置を変更する。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。³⁰

【0078】

図4を参照して、本明細書に記載する側方流動イムノアッセイは、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キング7と、感圧性ラミネートフィルムバッキング8とをさらに含む。各側方流動イムノアッセイをMylar(登録商標)zero-vapor barrier pouchの中にパッケージングする。⁴⁰

【0079】

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

10

20

30

40

50

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Fc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。

【0080】

一定の実施形態において、前記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）。

10

【0081】

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、单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。

20

【0082】

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）。

【0083】

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とを含む（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とを含む（図8（B）参照）。

30

【0084】

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。

40

【0085】

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す。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であり、これに対して対照ゾーンの单一ラインは陰性結果である。

【0086】

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、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

50

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。

【0087】

一つ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、前記標識はコロイド金である。

【0088】

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しなければならない。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。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iC3bシグナルを正常循環iC3bのものの2倍のレベルで生じさせた。iC3bレベルの実際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ELISA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。

【0089】

10

20

30

【表1】

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
ニトリ	C3a	Gentex (GTX78198)	ウサギ	C3d	Abcam (ab15981)	陽性読み取り直なし(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、インターフェクト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)	
ウサギ	C3d	Abcam (ab15981)	ニワトリ	C3a	GenTex (GTx78198)	抗C3dが捕捉Abであるとき、抗C3bはC3bおよびiC3bに
ウサギ	C3d	Abcam (ab15981)	ヤギ	C3a	SantaCruz (sc17237)	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	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)	

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

【表2】

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比交差反応
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シグナルなし
マウス	iC3b	Quidel(A209)	ラット	C3g	Hycult (HM 2199)	
マウス			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	Quidel(A209)	マウス	ネオ C3d	Quidel (A250)	
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 (HM 2199)	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 (HM 2199)	シグナルなし
マウス	C3アルファ	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 (HM 2199)	非常に低シグナル

表2:iC3bアッセイでの抗体スクリーニング結果

一つの実施形態において、前記マークターはインタクトC3であり、前記検出抗体はイン

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。

【0091】

もう一つの実施形態において、前記マーカーはiC3bであり、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

【0092】

非常に具体的な例では、前記マーカーはインタクトC3であり、前記捕捉抗体はHyct(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Quidel(登録商標)A250である。

20

【0093】

様々な体液が本発明の側方流動イムノアッセイおよび方法での使用に好適である。例えば、本明細書に記載するアッセイおよび方法での使用に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。一つの実施形態において、前記体液は、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より選択される。具体的な実施形態において、前記体液は全血である。

【0094】

様々な対照分析物が、本発明の側方流動イムノアッセイ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は好適であることは、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。

30

【0095】

本側方流動イムノアッセイ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。本側方流動イムノアッセイは、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、かかる偽陽性を回避する。したがって、本側方流動アッセイ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。

40

【0096】

代替実施形態では、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。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

50

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。

【0097】

一つ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アッセイでの使用に好適である。一つの実施形態において、前記標識はコロイド金である。

【0098】

様々な体液が本発明の側方流動イムノアッセイでの使用に好適である。例えば、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。一つの実施形態において、前記体液は、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より選択される。具体的な実施形態において、前記体液は全血である。10

【0099】

様々な対照分析物が、本発明の側方流動イムノアッセイ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。

【0100】

もう一つの実施形態において、前記体液試料中の補体は、実験的に前記側方流動イムノアッセイ自体によって実質的に活性化されない。

【0101】

一つ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。20

【0102】

もう一つ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。

【0103】

もう一つ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。30

【0104】

さらにもう一つ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。

【0105】

もう一つ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。

【0106】

以下の実施例は、例証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。

【実施例】

【0107】

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。40

【0108】

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ぬ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 10 uL 試料を吸い上げる。次いで試料を 990 uL 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 uL 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、100 uL 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 50 μg / 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（alert）。そうでなければ、5 分後に二回目の読み取りを行う。iC3b レベル（または等価の iC3b : インタクト C3 比）が血液中 50 μg / mL より高いか、iC3b レベルが 25 % 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（alter）。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。

【0109】

実施例 2

20

外傷患者の軌跡モニタリング (trajectory monitoring)

シフトの開始時に、ICU スタッフは、10 ng / mL、30 ng / mL、100 ng / mL、300 ng / mL および 1000 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。

【0110】

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 (ISS) 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。

30

【0111】

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 uL 試料を吸い上げる。次いで試料を 990 uL 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 uL を吸い上げ、一体型インタクト C3 および iC3b 側方流動イムノアッセイ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、100 uL を独立のインタクト C3 および iC3b 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、iC3b、インタクト C3 および iC3b : (インタクト C3) 値を各時点で記録する。

40

【0112】

インタクト C3 もしくは iC3b レベルの経時的变化、または変化率の变化は、炎症状態の変化を示し得る。インタクト C3 の減少を随伴する iC3b 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 (BAL) を行って、その患者が VAP を経験しているか否かを決定する。細菌が 1 mL 当たり 10⁴ 個以上のレベルで存在する場合、VAP 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

50

こともできる。

【0113】

実施例3

全身性エリテマトーデス（SLE）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/mL 、 30 ng/mL 、 100 ng/mL 、 300 ng/mL および 1000 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。

【0114】

10

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。SLE患者に対して行う標準診断の一つは、全C3レベルの測定である。SLE患者のC3レベルは、通常低下しており、処置が成功すると正常($>1\text{ mg/mL}$)に戻る。しかし、C3活性化が抑制されたのか、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、一般に分からぬ。

【0115】

20

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。3検査併せて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 10 uL 試料を吸い上げる。次いで試料を 990 uL 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 uL 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、 100 uL 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。

【0116】

30

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見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。

【0117】

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。

40

【0118】

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、合計三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。

【0119】

涙液回収のために、下瞼を引き寄せ、眼の下部にKiawi（登録商標）を短時間、軽くあてる(dap)。次いでKiawi（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Kiawi

50

p e (登録商標) 液試料を 220 uL 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、100 uL 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。

【0120】

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。結果は、50 ~ 60 μ / mL のインタクト C3 および 5 ~ 8 μ / mL の iC3b の範囲であった (図 15 参照)。

【0121】

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

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。

【0122】

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。アルコールスワップを使用して指を清潔にする。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。

【0123】

第一の患者からの結果は、インタクト C3 についてはおよそ 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。

【0124】

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。

【0125】

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

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

10

20

30

40

50

。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。J24K-03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。

【0126】

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C3ポリクローナルを有する。

【0127】

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100ng/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0.5mg/mLから1mg/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。

【0128】

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。

【0129】

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

2mL蓋付チューブを使用して、十(10)μLのiC3b(濃度1mg/mL)ストックを990uLの試料希釈緩衝液で希釈して10ug/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2mL蓋付チューブの中で500uLの10ug/mLストックを500uL BAW Bufferで希釈して5ug/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(500uL:500uL)をさらに九回繰り返して、次の作業用ストックを作った: 10ug/mL、5ug/mL、2.5ug/mL、1.25ug/mL、625ng/mL、313ng/mL、156ng/mL、78ng/mL、39ng/mL、20ng/mL、10ng/mL、および0ng/mL(緩衝液のみ)。

【0130】

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、100uLの第一の作業用ストック(インタクトC3については10ug/mL、およびiC3bについては5ug/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、100uL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 LFDRL01(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

20

30

40

50

【0131】

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。

【0132】**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 uL の試料希釀緩衝液で希釀して 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 uL の 10 ug/mL ストックを 500 uL BAW Buffer で希釀して 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 希釀(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：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)。

【0133】

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。各希釀について、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 L F D R 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。

【0134】

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。

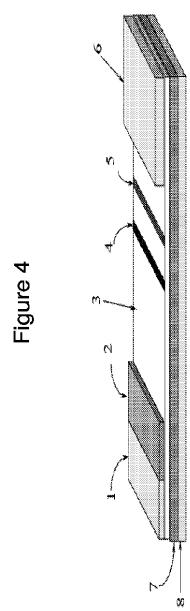
【0135】

引用したすべての文献は、参照により本明細書に援用されている；いずれの文献の引用も、それが本発明に関する先行技術であるとの承認と見なしてはならない。

【0136】

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。

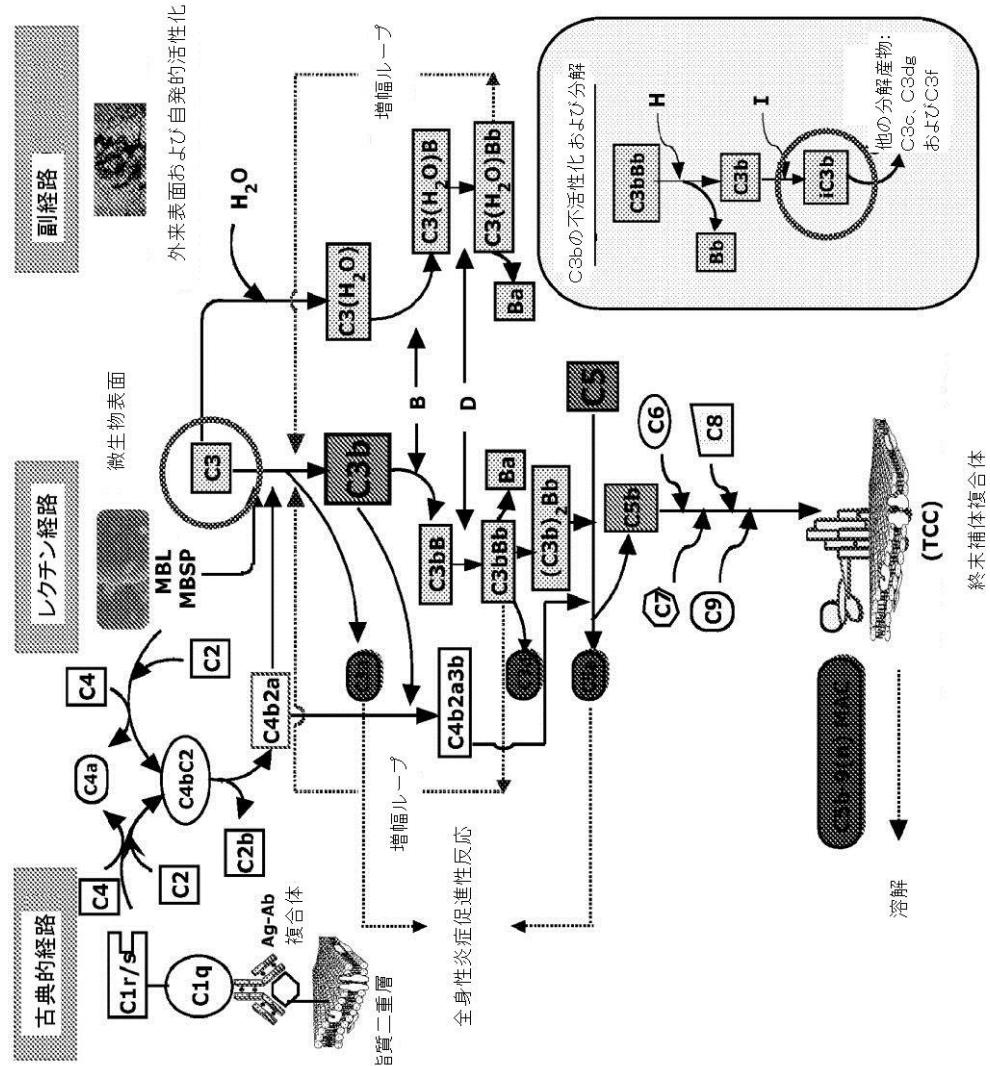
【図4】



【図1】

Figure 1

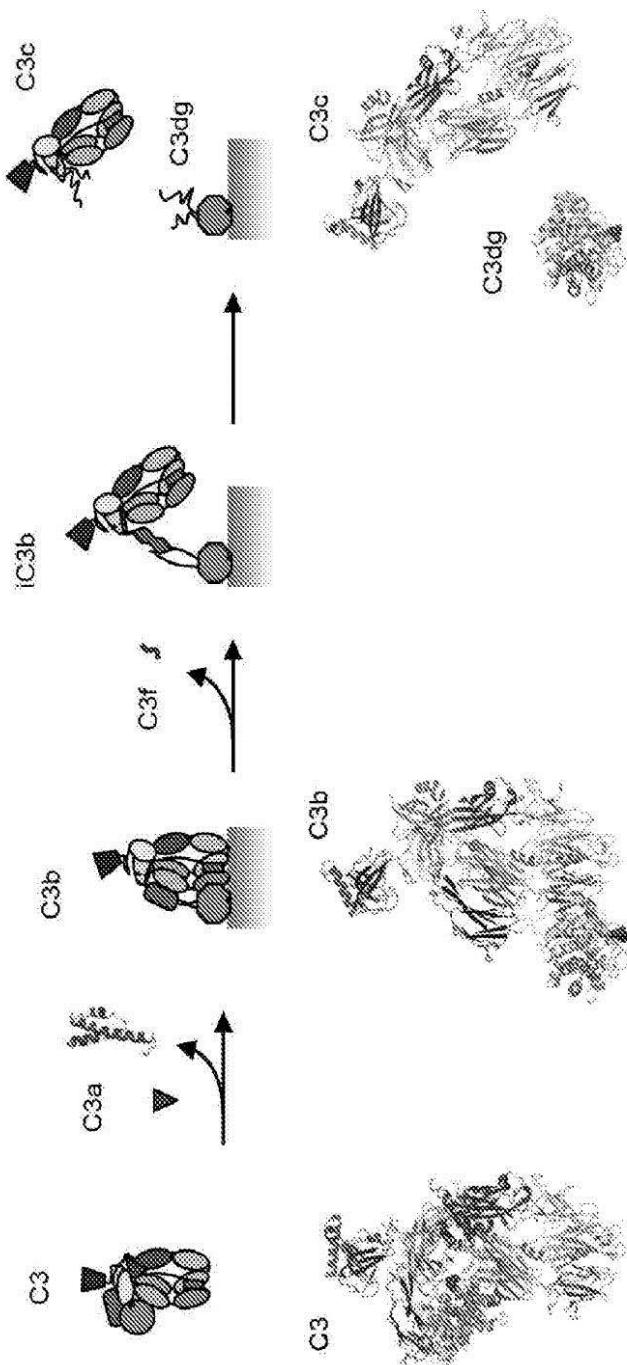
補体カスケード



【図2】

Figure 2

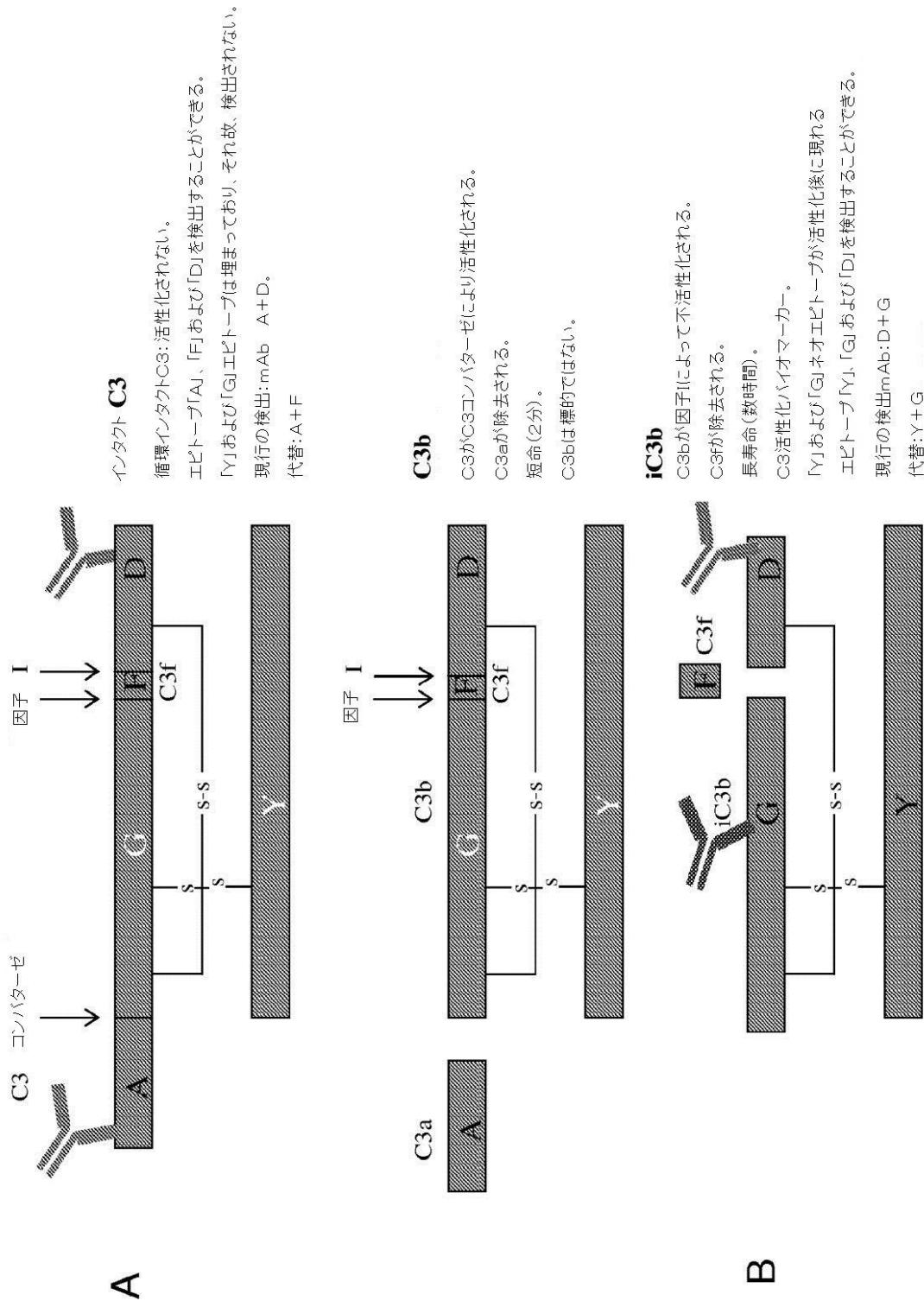
C3はプロテアーゼ活性により活性化および非活性化される



【図3】

Figure 3

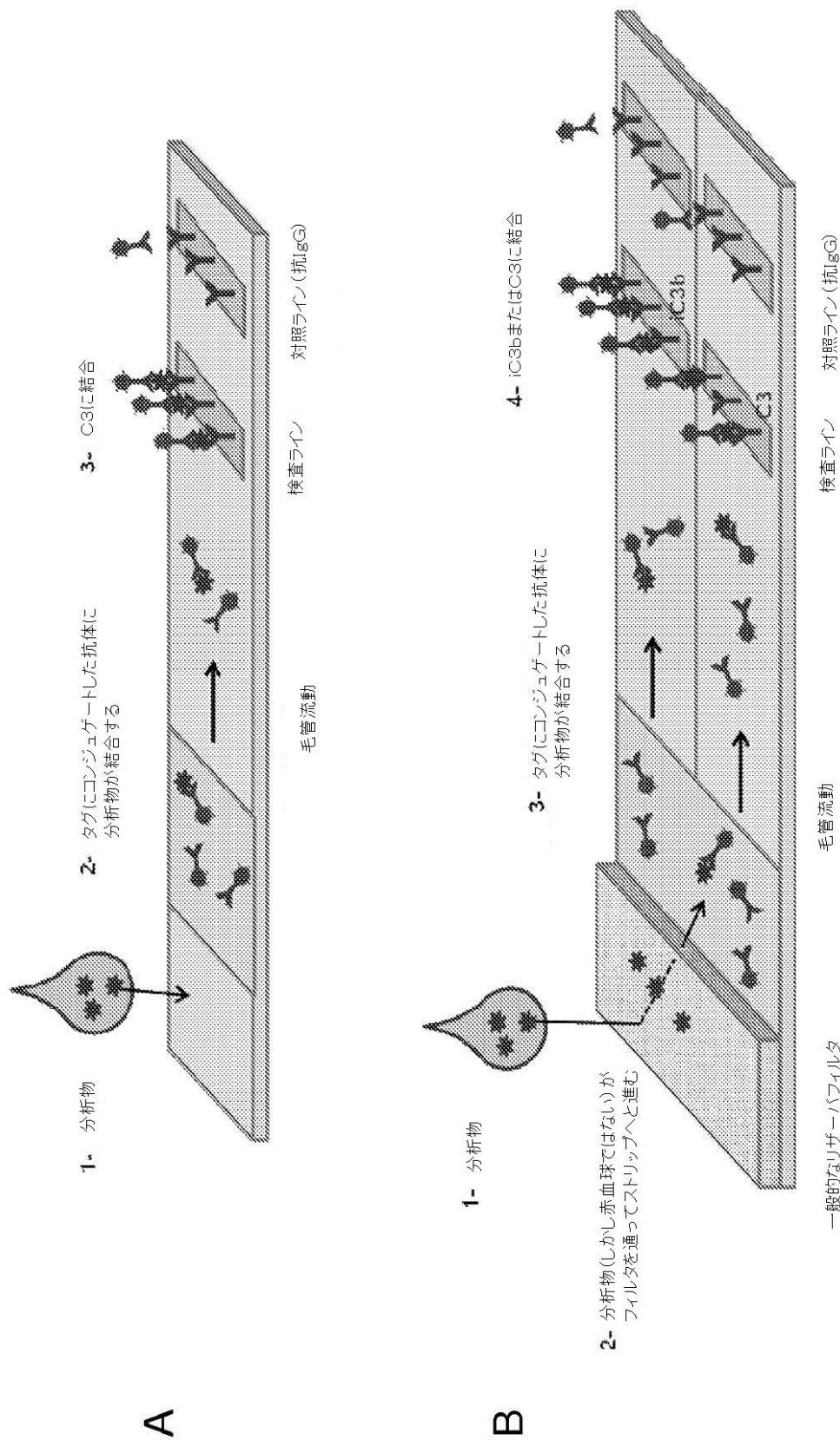
インタクトC3またはiC3bのいずれかを認識する抗体ペア



【図5】

Figure 5

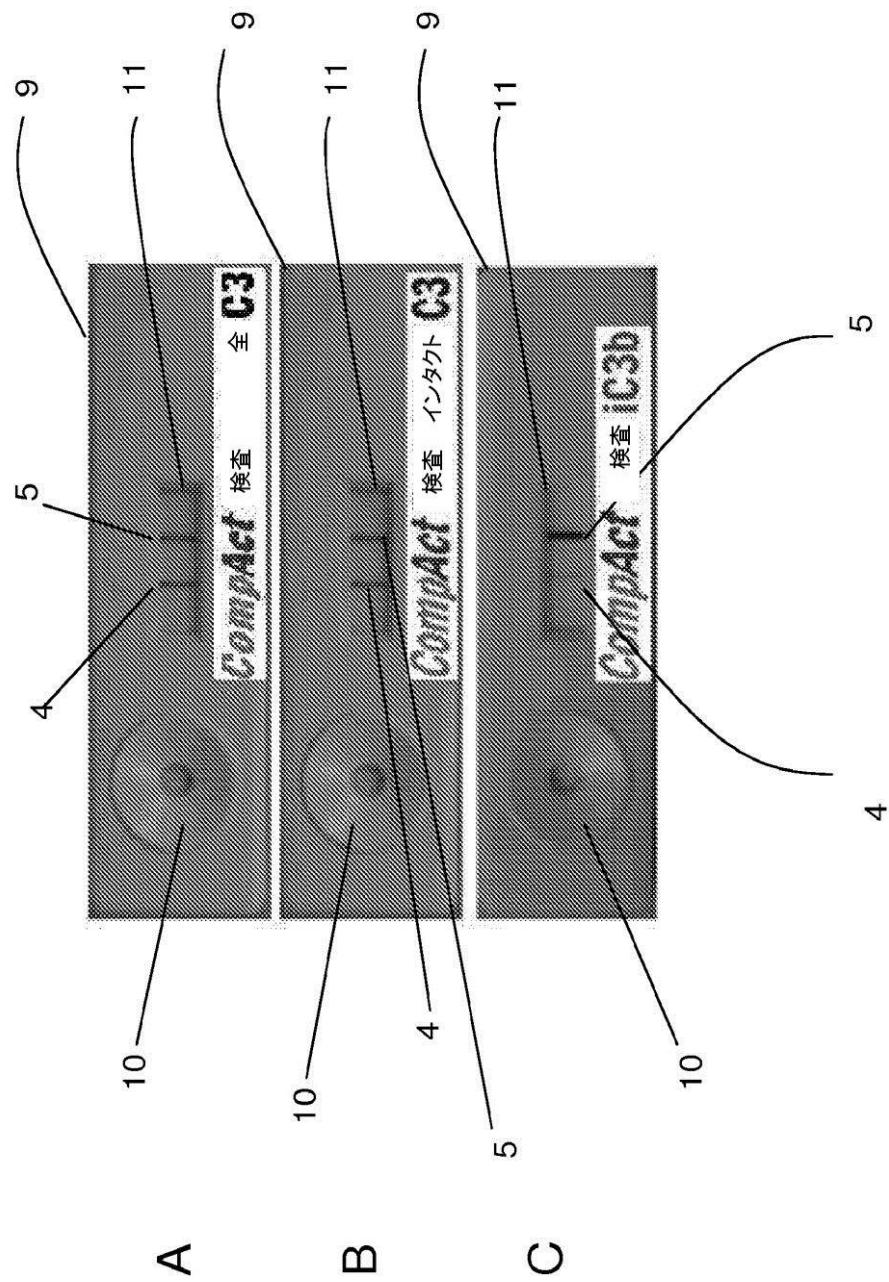
並列での單一および二重側方流動イムノアッセイメンブレンストリップ



【図6】

Figure 6

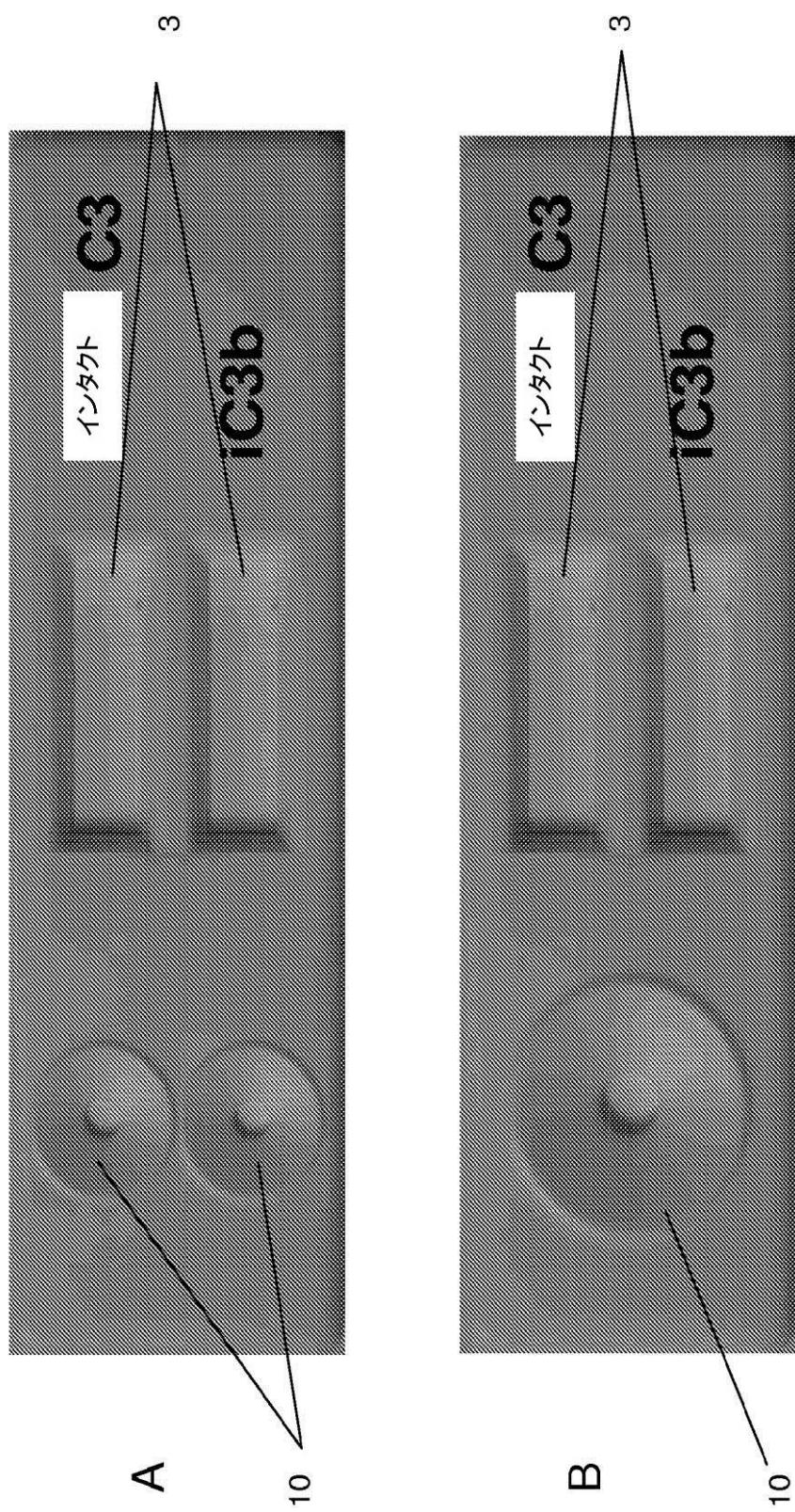
単一分析物用側方流動イムノアッセイ検査カセット



【図7】

Figure 7

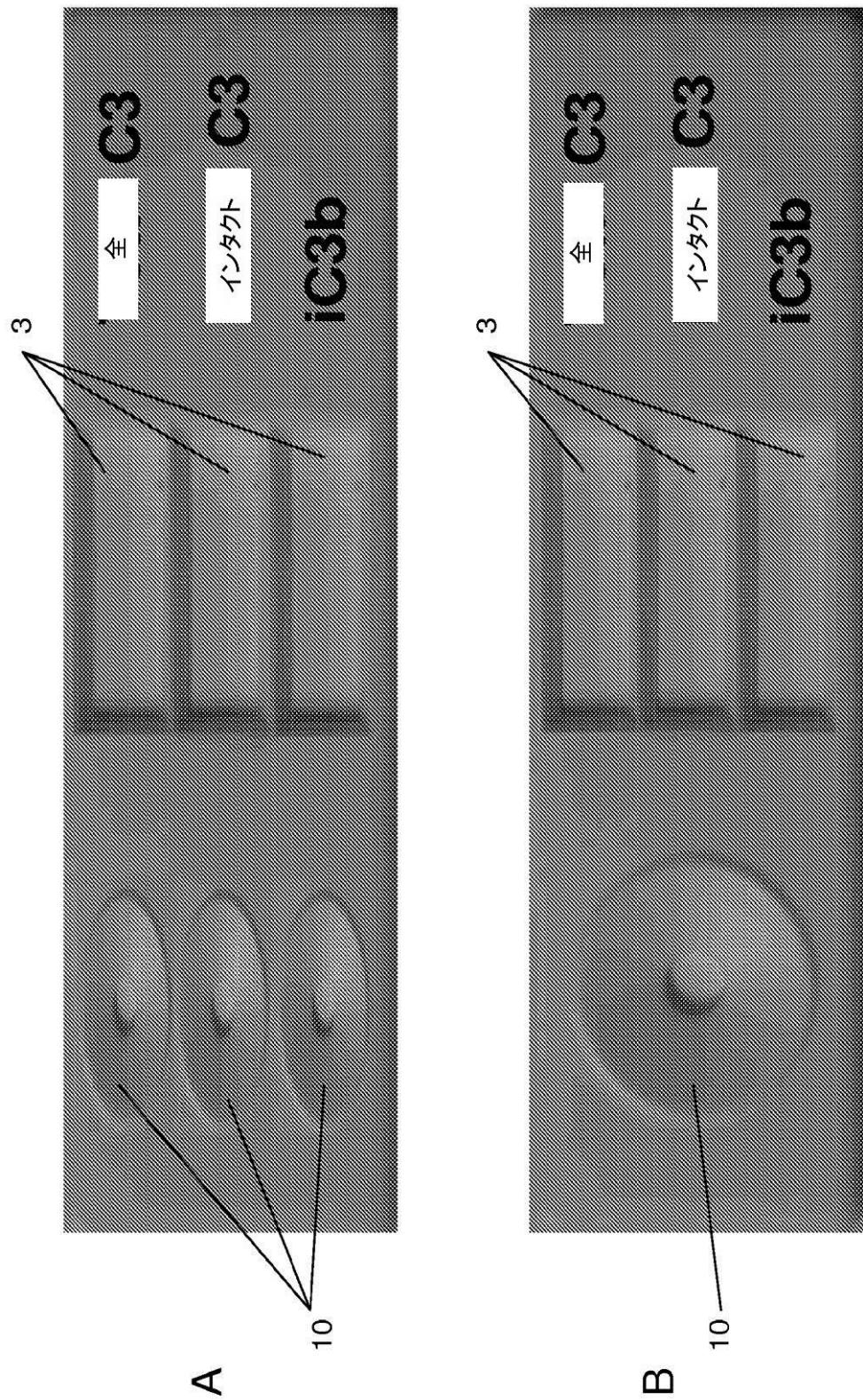
並列での三分析物用側方流動イムノアッセイ検査カセット



【図8】

Figure 8

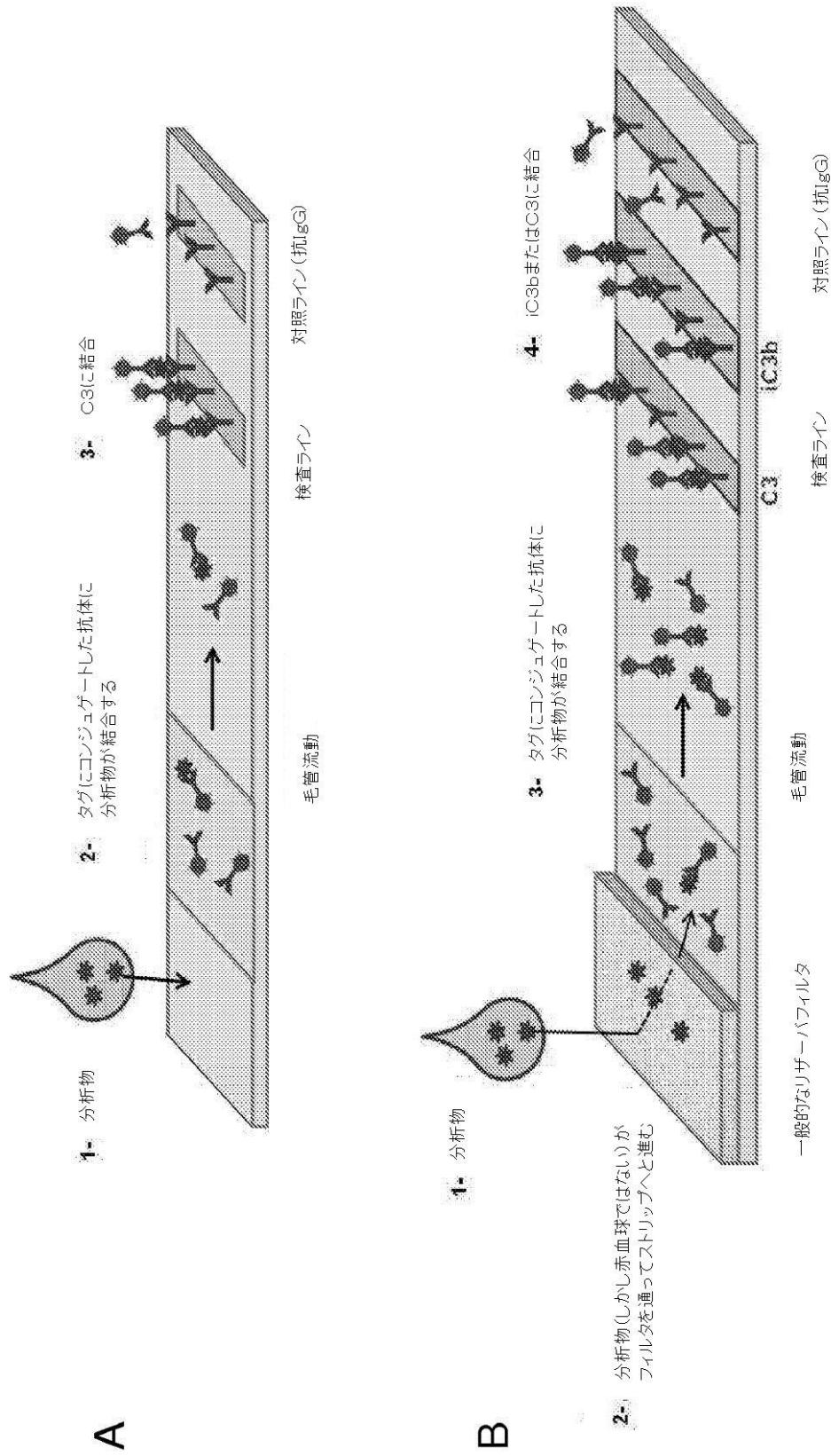
並列での三分析物用側方流動イムノアッセイ検査力セット



【図9】

Figure 9

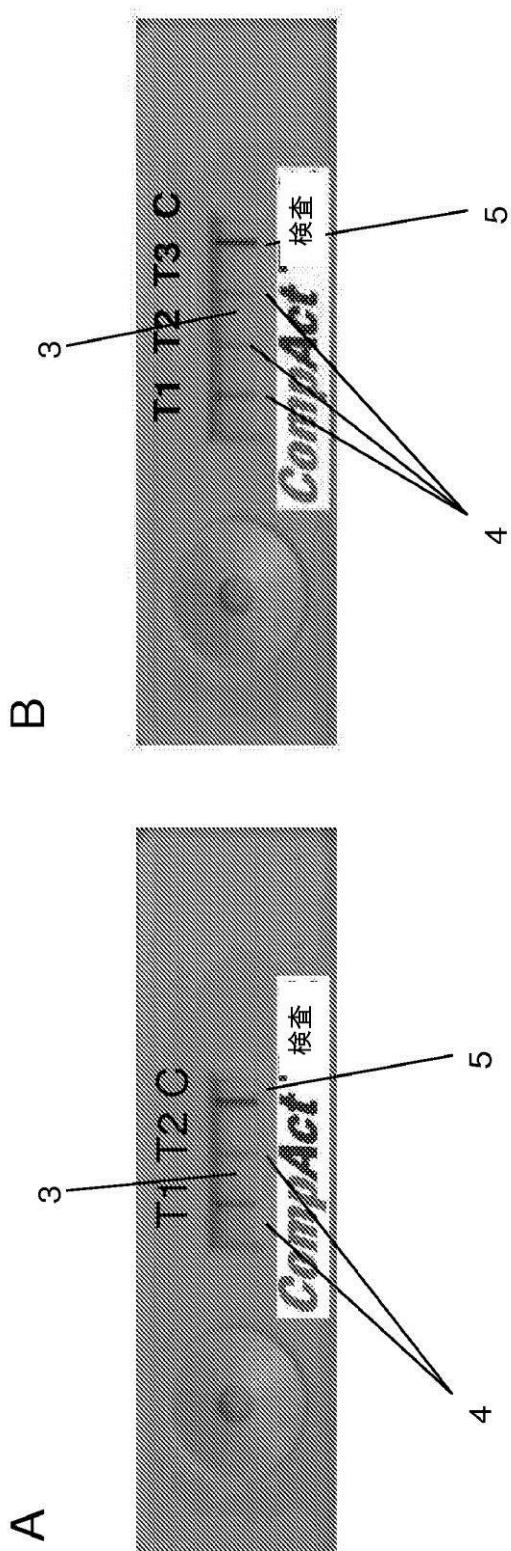
直列での單一および二重側方流動イムノアッセイメンブレンストリップ



【図 10】

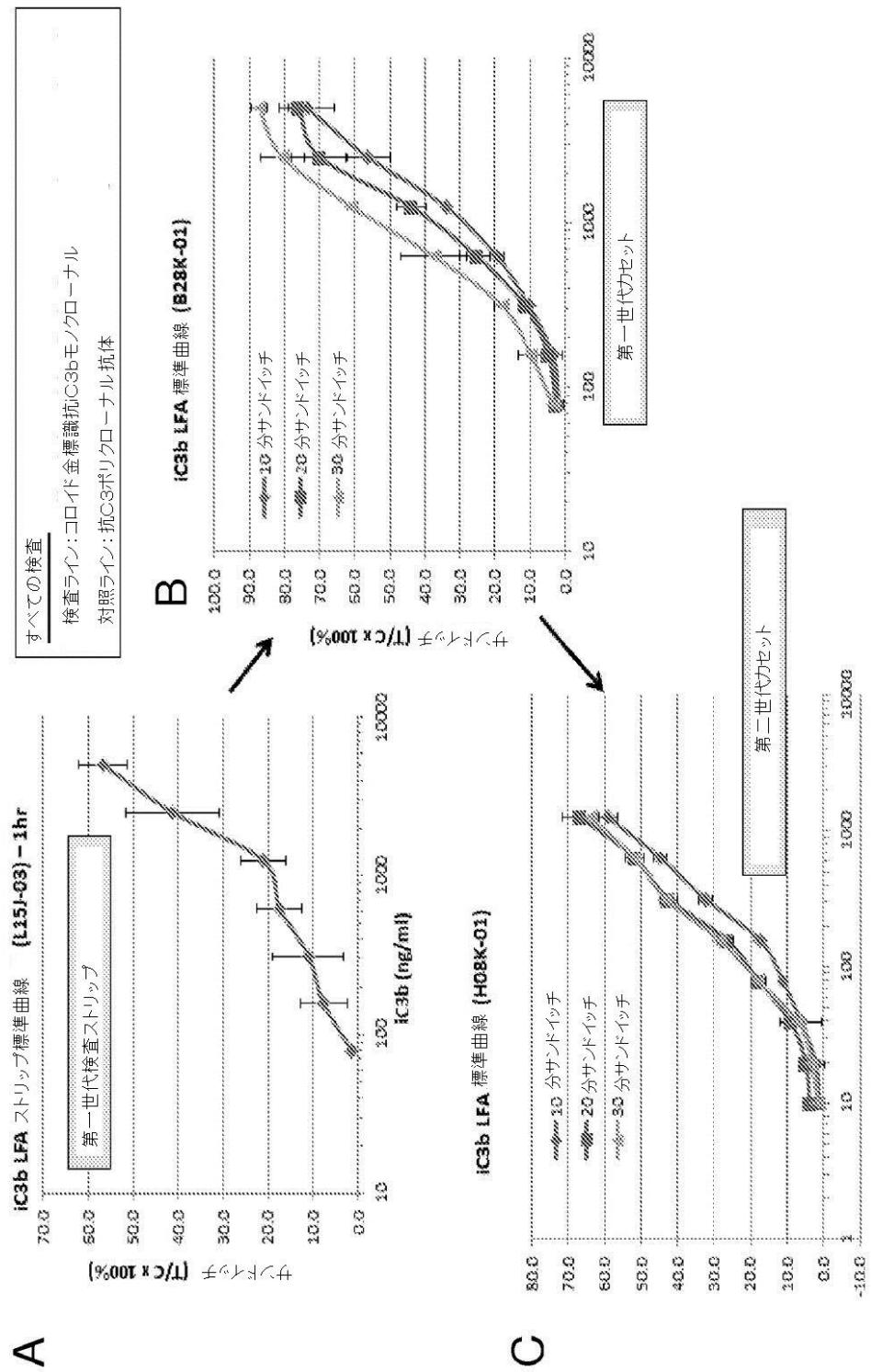
Figure 10

直列での複数の分析物用の側方流動イムノアッセイ検査カセット



【図 11】

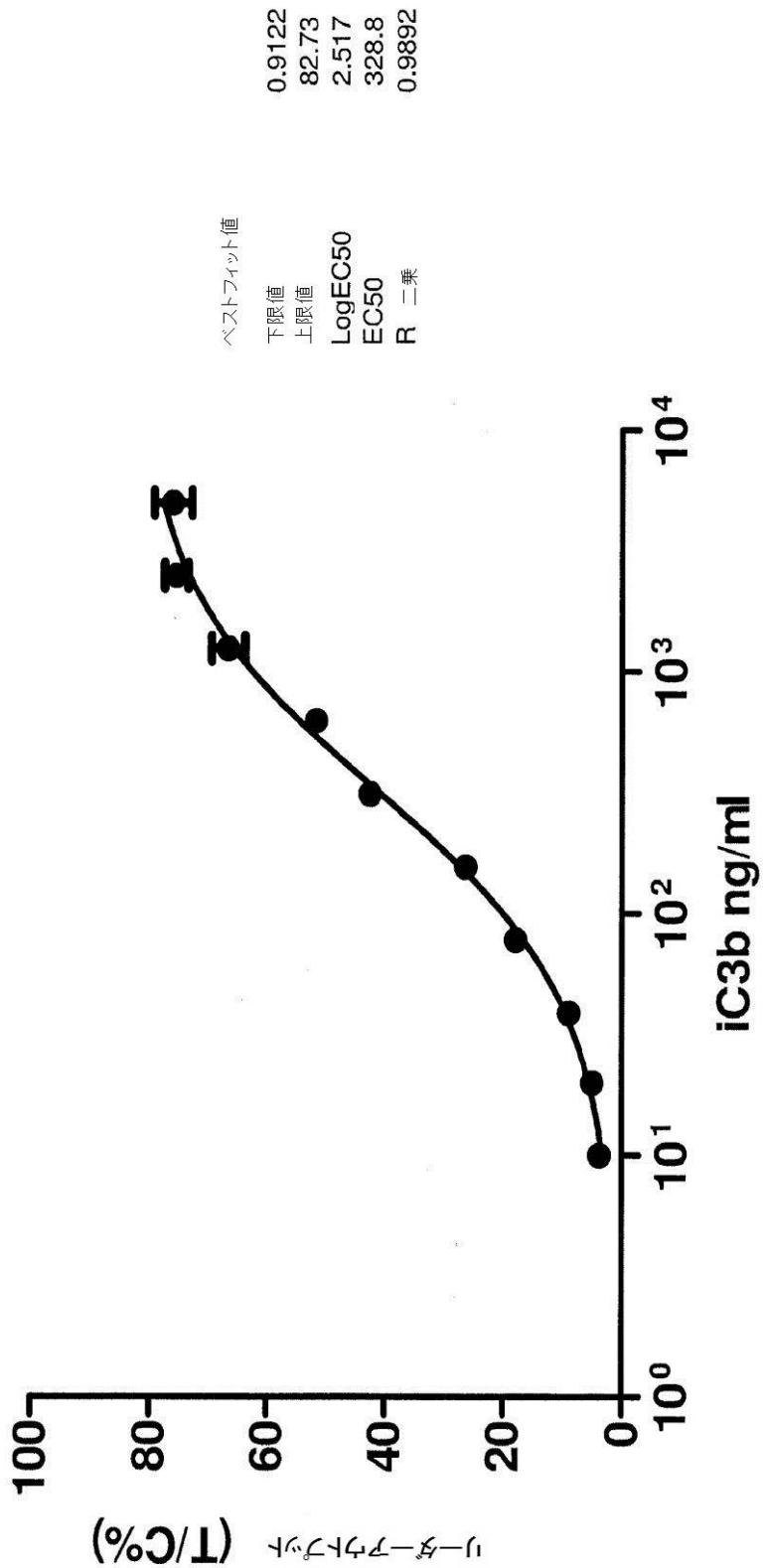
Figure 11



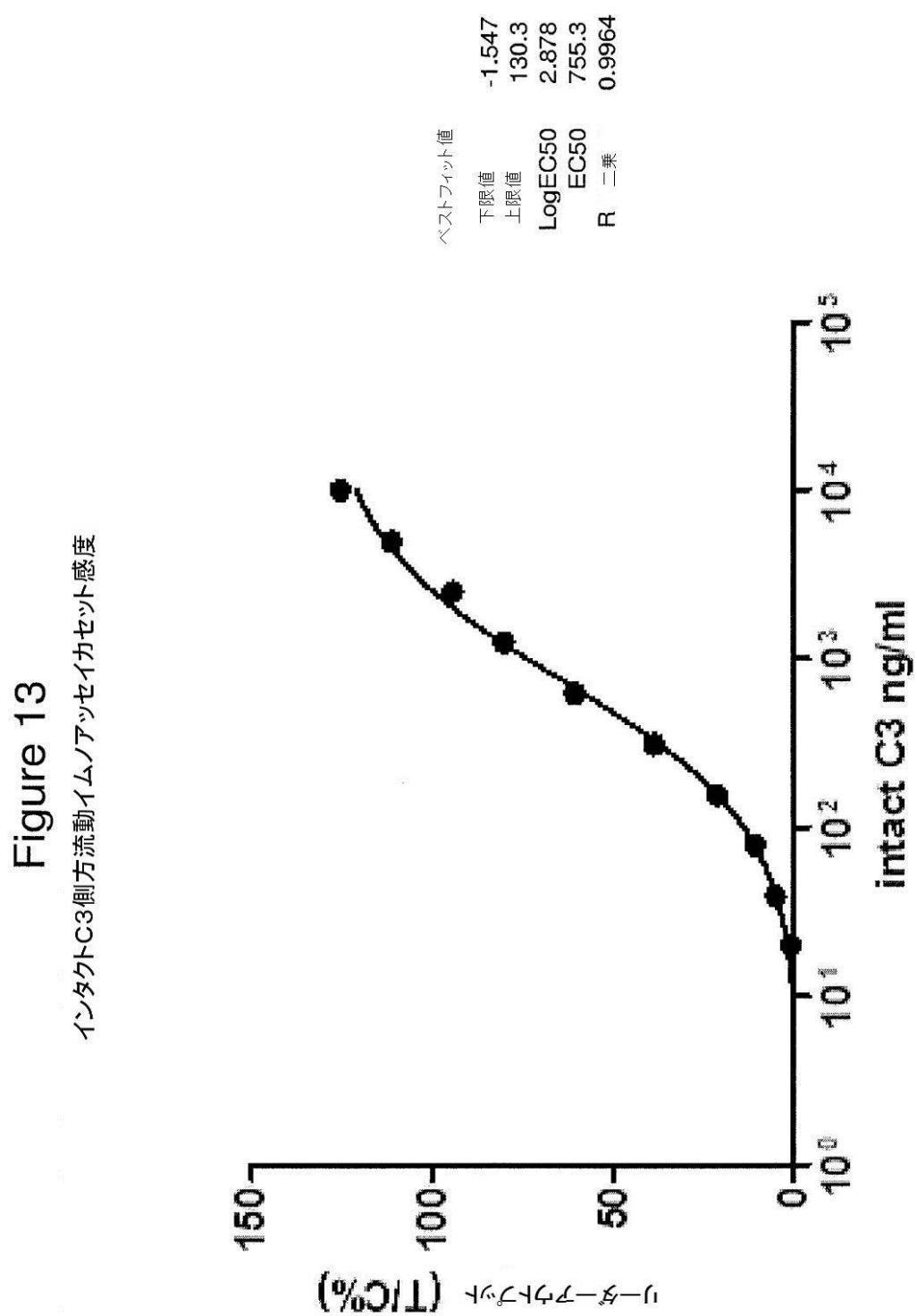
【図12】

Figure 12

iC3b側方流動イムノアッセイカセット感度



【図 13】



【図14】

Figure 14

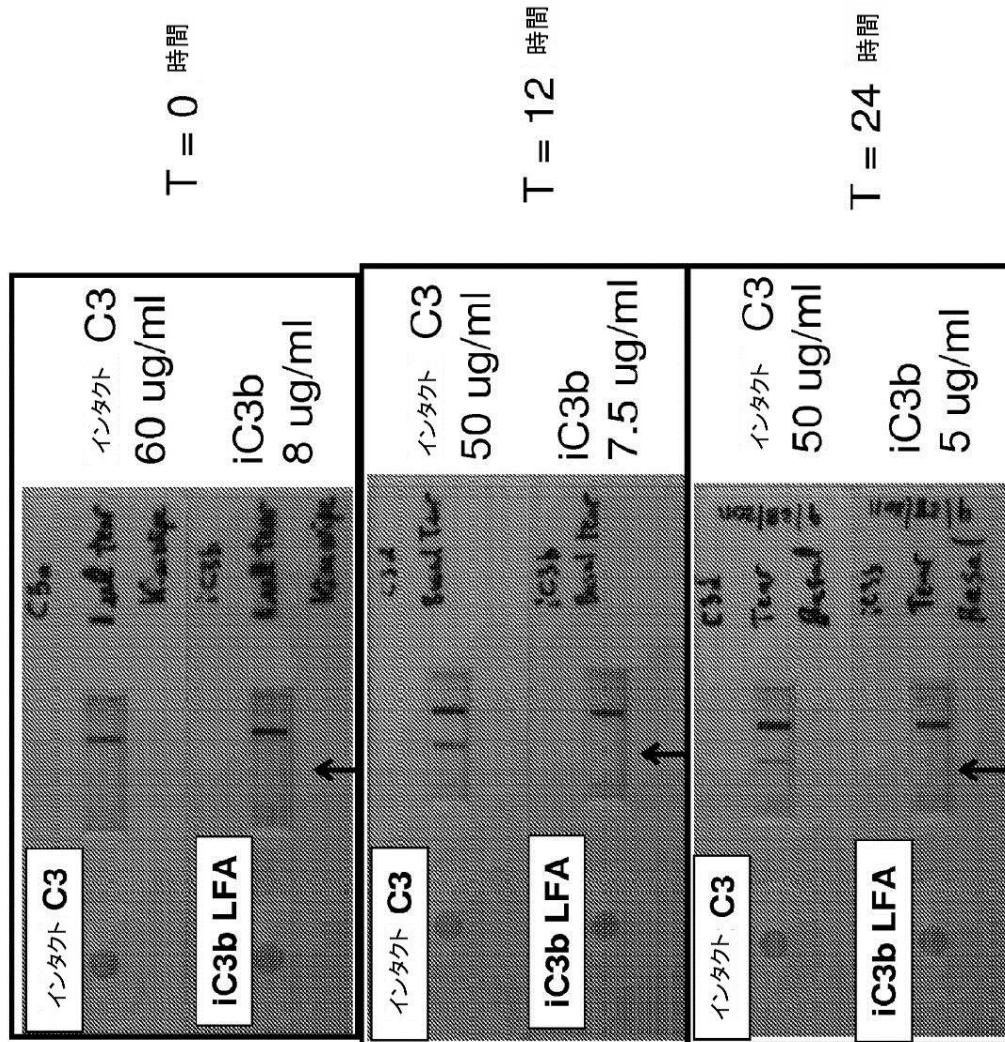
側方流動イムノアッセイにおけるインタクトC3とiC3bとの間のクロストーク

C3:iC3b比 インタクト	全iC3bアウトプットシグナル			iC3bシグナルへのインタクトC3の寄与率		
	(H08K-01)	(J24K-03)	(H08K-01)	(J24K-03)	(H08K-01)	(J24K-03)
2000 対 1	2.16	5.12	1.16	4.12		
1000 対 1	1.79	4.98	0.79	3.98		
500 対 1	1.67	4.69	0.67	3.69		
250 対 1	1.31	3.55	0.31	2.55		
125 対 1	1.24	N/A	0.24	N/A		
0 対 1	1.00	1.00	0.00	0.00		

【図 15】

Figure 15

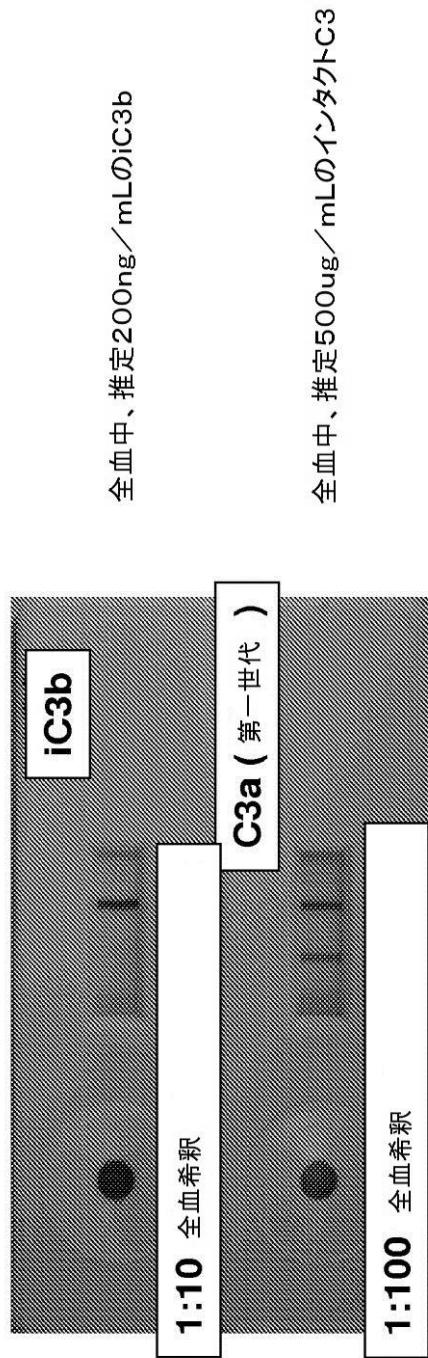
12時間間隔での一人の個体からの基礎涙液中のC3およびiC3bレベル



【図16】

Figure 16

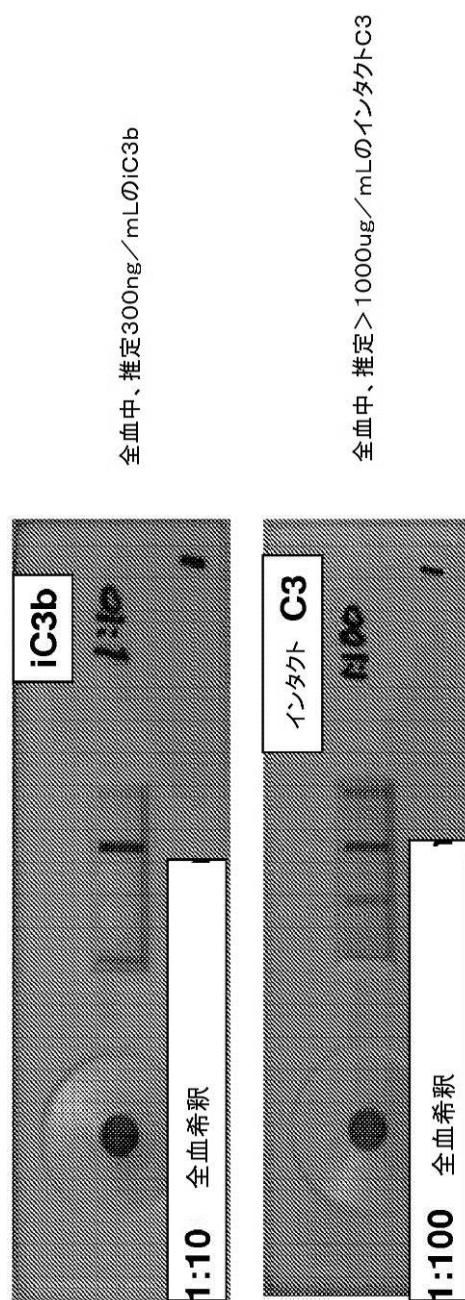
健常個体からの全血中のインタクトC3およびiC3bレベル



【図17】

Figure 17

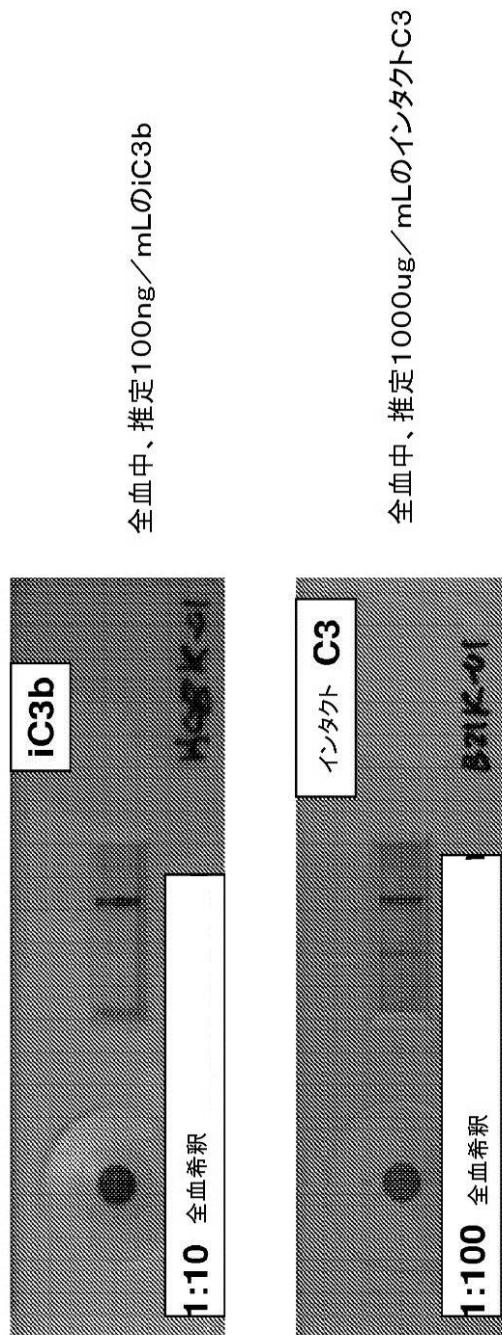
健常個体からの全血中のインタクトC3およびiC3bレベル



【図 18】

Figure 18

100マイル自転車走行の2時間後の全血検査結果



【図19】

Figure 19

体液	補体成分C3 の供給源公知	ELISAまたは LFAにより検証 済み	対照/ 正常/ 健常	障害 (comprised) (疾患/病気)	C3バイオマーカーが存在すると予想されたか または予想される炎症性疾患
			(はい)	(はい)	
全血			（はい）	インタクトC3, iC3b	感染症、自己免疫疾患(RA, MS、乾癬、クローソン病、狼瘡など)、外傷、心筋梗塞、卒中、心疾患、糖尿病、肝線維症、腎臓病、臓器移植／拒絶反応、がん、食物アレルギー
血漿			（はい）	インタクトC3, iC3b	
血清			（はい）	インタクトC3, iC3b	
脳脊髄液			（はい）	インタクトC3, iC3b	外傷、アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、感染症
涙液			（はい）	インタクトC3, iC3b	加齢性黄斑変性(AMD)、ドライアイ疾患(DED)、感染症
創傷渗出液			（はい）	インタクトC3, iC3b	外傷、火傷、様々な潰瘍、感染症
粘液分泌(鼻)			（はい）	（はい）	性アレルギーに罹患していることがある)
耳垢(耳あか)			iC3bのみ	検出されない	感染症
皮脂(sebum)(皮脂腺から の皮膚油分)、病変部または 一般に皮膚			iC3bのみ	検出されない (前腕摩擦)	
唾液			iC3bのみ	検出されない	滲出性中耳炎(OME) さ瘡、単純ヘルペス
尿			（はい）	検出されない	歯周病、アフタ
汗					糸球体腎炎、感染症
精液					無症候性男性生殖管感染症
膣液					感染症
母乳					
呼吸凝縮液					喘息、COPD、肺気腫、囊胞性線維症

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 P 7/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/02
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/04
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 31/00
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/06
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 27/02
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/00
A 6 1 P 13/02 (2006.01)	A 6 1 P 9/10
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 13/02
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 13/12
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/00
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 25/00
	A 6 1 P 31/04

(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 63103, セント ルイス, ワシントン アベニュー 120
9, アパートメント 302

(72)発明者 モス， ドナルド

アメリカ合衆国 ケンタッキー 40206, ルイビル, メルウッド アベニュー 2400
, アパートメント 1104

審査官 黒田 浩一

(56)参考文献 米国特許出願公開第2006/0292700(US, A1)

特表平04-501502(JP, A)

国際公開第2006/124888(WO, A2)

国際公開第2010/077722(WO, A1)

特表2007-501948(JP, A)

特開昭62-245964(JP, A)

特表昭63-503089(JP, A)

国際公開第2010/009206(WO, A2)

米国特許出願公開第2006/0110780(US, A1)

米国特許出願公開第2008/0233113(US, A1)

特開昭59-005958(JP, A)

米国特許出願公開第2012/0135430(US, A1)

国際公開第2010/135717(WO, A2)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 01 N 33/48 - 33/98

PubMed