

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5225097号
(P5225097)

(45) 発行日 平成25年7月3日(2013.7.3)

(24) 登録日 平成25年3月22日(2013.3.22)

(51) Int.Cl. F I
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 D
GO 1 N 33/543 (2006.01) GO 1 N 33/543 5 O 1 D
 GO 1 N 33/543 5 4 1 A

請求項の数 32 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2008-540262 (P2008-540262)	(73) 特許権者	391008788
(86) (22) 出願日	平成18年11月14日 (2006.11.14)		アボット・ラボラトリーズ
(65) 公表番号	特表2009-516170 (P2009-516170A)		ABBOTT LABORATORIES
(43) 公表日	平成21年4月16日 (2009.4.16)		アメリカ合衆国 イリノイ州 アボット
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/044059		パーク アボット パーク ロード 10
(87) 国際公開番号	W02007/059065		O
(87) 国際公開日	平成19年5月24日 (2007.5.24)	(74) 代理人	110001173
審査請求日	平成21年11月12日 (2009.11.12)		特許業務法人川口国際特許事務所
(31) 優先権主張番号	60/736,659	(74) 代理人	100114188
(32) 優先日	平成17年11月14日 (2005.11.14)		弁理士 小野 誠
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100140523
(31) 優先権主張番号	11/367,126		弁理士 渡邊 千尋
(32) 優先日	平成18年3月3日 (2006.3.3)	(74) 代理人	100119253
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 金山 賢教

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 子癇前症の検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

妊娠女性から得た生物学的サンプル中の遊離 s F l t - 1 の量を測定する工程、
 該生物学的サンプル中の遊離 P l G F の量を測定する工程、および
 観察された比を、予め決められた値または値の範囲と比較する工程
 を含む、子癇前症の、より低いリスクを予測する方法。

【請求項 2】

妊娠女性から得た生物学的サンプル中の全 s F l t - 1 および結合 s F l t - 1 の量を
 測定し、該生物学的サンプル中の遊離 P l G F の量を測定する工程、および
 観察された比を、予め決められた値または値の範囲と比較する工程
 を含む、子癇前症の、より低いリスクを予測する方法。

10

【請求項 3】

子癇前症の検出をする方法であって、
 (a) サンプル中の遊離 F l t - 1 の量を決定する工程、
 (b) サンプル中の遊離 P l G F の量を決定する工程、および
 (c) 工程 (a) の値を工程 (b) の値で割り算する工程
 を含む、

工程 (c) の結果が、予め決められた値を超える場合、それが子癇前症の検出となる、
 前記方法。

【請求項 4】

20

遊離 P l G F の量が、

(a) 標識部分を準備する工程、ここで標識部分は P l G F のフラグメントまたは s F l t - 1 のフラグメントであり、

(b) 該標識部分を該生物学的試料と接触させる工程、

(c) 該標識部分が P l G F を含む場合には、該標識部分と s F l t - 1 との結合の度を決定する工程、または (c ') 該標識部分が s F l t - 1 を含む場合には、該標識部分と P l G F との結合度を決定する工程、および

(d) 該サンプル中に存在する遊離 P l G F の濃度または量を決定する工程によって決定される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 5】

該方法が自動検出アッセイであり、

該アッセイが、系内において行われ、

サンプルおよび試薬が該系内に挿入されると、該系は、該サンプルおよび試薬を反応器へ運搬し、使用者の介入を伴うことなく、インキュベーションを行う、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記系が洗浄を行う、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

該サンプルおよび該試薬を該系内に挿入した後は使用者の介入を伴うことなく、該系が少なくとも 8 つのアッセイを 48 時間のうちに行い、請求項 5 または 6 に記載の方法。

【請求項 8】

該系が該結合ペアのタンパク質の濃度または量を計算し、使用者は該系の部分とはみなされない、請求項 5、6 または 7 に記載の方法。

【請求項 9】

該方法がサンドイッチアッセイである、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 10】

該方法が競合阻害アッセイである、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 11】

生物学的サンプル中の遊離 P l G F の量が、

(a) 遊離 P l G F を含有する又はそれを含有する疑いのあるサンプルを準備する工程、

(b) 該サンプルを、特異的結合パートナー (s b p) : P l G F 複合体を形成しうる P l G F の第 1 特異的結合パートナーと接触させる工程、

(c) 該サンプルを第 2 s b p と接触させる工程、

ここで、

第 2 s b p は特異的に標識されており、

第 1 s b p または第 2 s b p のいずれかは、F l t - 1 もしくは s F l t - 1 または s F l t - 1 の P l G F 結合性断片であり、

第 1 s b p、第 2 s b p および該遊離 P l G F は三者複合体を形成し得、および

(d) 該サンプル中の遊離 P l G F の量の尺度として、形成された三者複合体の量を決定する工程

によって決定され、

ここで、遊離 P l G F は、P l G F の F l t - 1 結合部位に結合した特異的結合パートナーを有さない、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 12】

全 s F l t - 1 の量が

(a) 特異的結合パートナー (s b p) : P l G F 複合体を形成しうる s F l t - 1 の第 1 特異的結合パートナーを、検出可能な標識で標識して、標識部分を形成させる工程、

(b) 該標識部分を該生物学的試料と接触させる工程、および

10

20

30

40

50

(c) 該試料中に存在する s F l t - 1 の量の指標として、該標識部分と該生物学的試料の成分との結合の割合を決定する工程
によって決定され、

ここで、該成分が、s F l t - 1 の第 2 の s b p であり、

第 1 の s b p または第 2 の s b p のいずれかは、P l G F、V E G F、または P l G F もしくは V E G F の s F l t - 1 結合性断片である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 1 3】

該方法が、カートリッジ形態で、または試験細片として行われ、または
アッセイ試薬が、単位用量の使い捨てのものとして提供され、および
該単位用量が、該方法を行うために必要なアッセイ試料の量を含む、請求項 1 1 に記載
の方法。 10

【請求項 1 4】

該方法が自動検出アッセイであり、
該アッセイが、系内において行われ、
サンプルおよび試薬が該系内に挿入されると、該系は、該サンプルおよび試薬を反応容
器へ運搬し、使用者の介入を伴うことなく、インキュベーションを行う、請求項 1 2 また
は 1 3 記載の方法。

【請求項 1 5】

系が洗浄を行う請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

該サンプルおよび該試薬を該系内に挿入した後は使用者の介入を伴うことなく、該系が
少なくとも 8 つのアッセイを 4 8 時間のうちに行いうる、請求項 1 4 または 1 5 に記載の
方法。 20

【請求項 1 7】

該系が s F l t - 1 の濃度または量を計算する、請求項 1 3、1 4 または 1 5 に記載の
方法。

【請求項 1 8】

該方法がサンドイッチアッセイである、請求項 1 2 から 1 7 のいずれか 1 項に記載の方
法。

【請求項 1 9】

該方法が競合阻害アッセイである、請求項 1 2 から 1 7 のいずれか 1 項に記載の方法。 30

【請求項 2 0】

2 未満の抗体または抗体の部分を使用し、
抗体または抗体の部分が s F l t - 1 または P l G F に特異的に結合する、請求項 1 2
から 1 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 1】

P l G F が細胞結合型である、請求項 1 2 から 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 2】

生物学的サンプル中の遊離 s F l t - 1 の量が、
(a) 遊離 s F l t - 1 を含有する又はそれを含有する疑いのあるサンプルを準備する 40
工程、
(b) 該サンプルを、特異的結合パートナー (s b p) : s F l t - 1 複合体を形成し
うる s F l t - 1 の第 1 特異的結合パートナーと接触させる工程、
(c) 該サンプルを第 2 s b p と接触させる工程、
ここで、第 2 s b p は、検出可能な状態で標識されており、
第 1 s b p または第 2 s b p のいずれかは、P l G F、V E G F、または P l G F
もしくは V E G F の s F l t - 1 結合性断片であり、
第 1 s b p、第 2 s b p および該 s F l t - 1 は三者複合体を形成し得、および
(d) 該サンプル中の s F l t - 1 の量の尺度として、形成された三者複合体の量を決定する工程 50

によって決定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 23】

生物学的サンプル中の遊離 s F l t - 1 の量が、

(a) 遊離 s F l t - 1 を含有する又はそれを含有する疑いのあるサンプルを準備する工程、

(b) 該サンプルを、s F l t - 1 に特異的に結合する、固体に結合した抗体と接触させ、それによって、生物学的サンプル中の全ての s F l t - 1 が固体に補足される工程、

(c) 該サンプルを P l G F / V E G F ファミリーメンバーの検知しうるラベル部分と接触させる工程、

(d) 該サンプル中の s F l t - 1 の量の尺度として、形成された三者複合体の量を決定する工程

10

によって決定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 24】

生物学的サンプル中の遊離 s F l t - 1 の量が、

(a) 遊離 s F l t - 1 を含有する又はそれを含有する疑いのあるサンプルを準備する工程、

(b) 該サンプルを、固体表面上に固定化させた P l G F 又は V E G F の部分と接触させる工程、

(c) 該サンプルを、s F l t - 1 に特異的に結合する検出可能な標識抗体と接触させる工程、

20

ここで、s F l t - 1、検出可能な標識抗体、及び P l G F 又は V E G F が三者複合体を形成することを含む、ことができ、

(d) 該サンプル中の s F l t - 1 の量の尺度として、形成された三者複合体の量を決定する工程

によって決定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 25】

P l G F または V E G F の部分が P l G F の部分であり、P l G F の s F l t - 1 結合性部分が P l G F の最初の 21 アミノ酸を欠く、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

P l G F の部分がドメイン 1 の最初の 20 アミノ酸残基以外のドメイン 1 の全てを更に含む、請求項 25 に記載の方法。

30

【請求項 27】

P l G F または P l G F の s F l t - 1 結合性断片が、固体表面以外の標識により、検出可能な状態で標識されている、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 28】

該標識がアクリジニウム誘導体である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

第 1 s b p または第 2 s b p のいずれかが s F l t - 1 に対する抗体である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 30】

40

生物学的サンプル中の遊離 s F l t - 1 の量が、

(a) s F l t - 1 に結合した P l G F を有さない遊離 s F l t - 1 を含有する又はそれを含有する疑いのあるサンプルを準備する工程、

(b) 該サンプルを、P l G F 又は V E G F の s F l t - 1 結合性部分を含む第 1 s b p および P l G F 又は V E G F の s F l t - 1 結合性断片に結合しうる s F l t - 1 の部分を含む第 2 s b p と接触させる工程、

ここで、少なくとも第 1 s b p または第 2 s b p は標識されており、

(c) 遊離 s F l t - 1 を欠くサンプルと接触させた場合の第 1 s b p と第 2 s b p との結合のレベルと対比させて、該サンプルにより引き起こされた、第 1 s b p と第 2 s b p との結合における減少または結合の阻害を決定することによって、該サンプル

50

中に存在する s F l t - 1 の濃度を決定する工程
によって決定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 1】

生物学的サンプル中の遊離 s F l t - 1 の量が、

(a) 遊離 s F l t - 1 を含有する又はそれを含有する疑いのあるサンプルを準備する工程、

(b) 第 1 特異的結合パートナー (s b p) : s F l t - 1 複合体を形成しうる s F l t - 1 の第 1 特異的結合パートナーを提供する工程、

ここで、第 1 特異的結合パートナーは磁性微粒子に結合させ、

(c) サンプルを第 1 s b p 結合磁性粒子と接触させる工程、

(d) サンプルを第 2 s b p と接触させる工程、

第 2 s b p は検出可能な標識 P l G F であり、

第 1 s b p、第 2 s b p 及び s F l t - 1 は三者複合体を形成することが可能であり、

(e) 未結合の標識 P l G F を磁性微粒子から洗い落とす工程、

(f) 該磁性微粒子に結合した標識 P l G F の量を、該生物学的試料中の遊離 s F l t - 1 の量の指標として検出することによって、三者複合体の量を決定する工程
によって決定される、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3 2】

該磁性微粒子を洗浄して、該生物学的サンプルの未結合部分を該微粒子から分離する工程を、工程 (c) の後に、さらに含む、請求項 3 1 に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の分野は、好ましくは患者から得られる生物学的サンプル中の胎盤成長因子 (P l G F)、可溶性 f m s 様チロシンキナーゼ (s F l t - 1) および関連分子の検出に関する。

【背景技術】

【0002】

免疫診断は、ヒトを含む動物を苦しめる又は冒す疾患、機能不全および他の状態の検出、診断、予後を可能にする。研究者がサンプルおよびデータを扱う時間を最短にする自動試験装置の助けにより免疫診断試験を行うことが非常に望ましくなっている。1980年以降の免疫診断の急速な商業的成長は1つには、生物学的サンプル中で見出されるマーカーに、該マーカーが認識されうるよう十分な特異性で結合する抗体および/または抗体フラグメントの迅速かつ効率的な単離を可能にする技術により可能となった。いくつかの診断試験に、より一層望ましいのは、モノクローナル抗体の使用であり、これは、多くの場合、アッセイの性能、特異性および感度を当業者が個々の必要性に合うよう注意深く適応させるのを可能にする。また、抗体は、遺伝的再操作による改良に或る程度なじみ易い予測可能な分子である傾向にある。したがって、それらは現代の免疫診断剤の必須要素になっている。

30

【0003】

生物学的サンプル中のマーカーの検出のためには他の試薬も利用可能であるが、これらの物質を注意深く特徴づけイムノアッセイにおけるそれらの使用のための特有の技術を開発する必要性が現代の免疫診断におけるそれらの使用を幾分妨げている。これは、非抗体試薬がポリペプチドまたはタンパク質である場合に特に言えることである。

40

【0004】

V E G F および P l G F は、血管形成および血管透過性を制御しうる調節ペプチドのファミリーに属する。これらのタンパク質は、この機能を達成するために F l t - 1 および K D R / F L K 1 と相互作用すると考えられている (M a t t e i ら , G e n o m i c s , 3 2 , 1 6 8 - 1 6 9 , (1 9 9 6)) 。 現在、P l G F の 3 つの推定アイソフォーム、すなわち、P l G F 1、P l G F 2 および P l G F 3 が特定されている。P l G F 2 は

50

ヘパリンと結合しうる。P L G F 2 はヒト臍静脈内皮細胞内のニューロピリン - 1 にヘパリン依存的に結合しうると考えられている。ニューロピリン - 1 は、より低いアフィニティーで P L G F 1 にも結合しうると考えられている (M i g d a l ー , J B i o l C h e m , 2 7 3 , 2 2 2 7 2 - 2 2 2 7 8 (1 9 9 8)) 。

【 0 0 0 5 】

P L G F は虚血性心臓および四肢の血管新生および側枝成長を良好な効率で刺激しうると考えられている (L u t t u n ー , N a t u r e M e d 8 , 8 3 1 - 8 4 0 (2 0 0 2)) 。 P L G F による F l t - 1 の活性化は血管新生を引き起こしうる。V E G F および P L G F は共に F l t - 1 に結合するが、F l t - 1 への P L G F の結合は、F l t - 1 への V E G F の結合とは異なる生物学的効果をもたらすと考えられている。

10

【 0 0 0 6 】

子癇前症に罹患した妊娠女性においては、可溶性 F l t - 1 (s F l t - 1) の増加は遊離 V E G F 、および特に P L G F の循環レベルの減少を引き起こして、外因性 V E G F および P L G F により軽減されうる内皮細胞機能不全を引き起こしうる (M a y n a r d ー , J C l i n I n v e s t , 1 1 1 , 6 4 9 - 6 5 8 (2 0 0 3)) 。 L e v i n e ー (N e w E n g J M e d , 3 5 0 , 6 7 2 - 6 8 3 (2 0 0 4)) により報告されている研究においては、後に子癇前症に罹患した女性では、後に子癇前症を発症しなかった女性の場合より P L G F の血清レベルが有意に低かった。該研究は、該差異が約 1 3 から約 1 6 週の妊娠により感知可能でありうること、および P L G F レベルにおける最大の差が、子癇前症の発症に近くなるほど明らかとなることを示唆した。L e v i n e はまた、子癇前症の女性において、血中の全 s F l t - 1 レベルの上昇もより顕著であることを示唆した。したがって、L e v i n e ーらは、全 s F l t - 1 のレベルの上昇および P L G F のレベルの低下が子癇前症のその後の発生を予測しうることを示唆した。

20

【 0 0 0 7 】

s F l t - 1 は、F l t - 1 タンパク質の可溶性変異体を与える F l t - 1 の選択的スプライシング形態であると考えられており、高いアフィニティーで血管内皮成長因子 (V E G F) (K e n d a l l ー , B i o p h y s R e s C o m m u n , 2 2 6 , 3 2 4 - 3 2 8 (1 9 9 6)) および P L G F の両方に結合しうる。s F l t - 1 のドメイン欠失研究は、(s) F l t - 1 ドメイン 2 および 3 が、s F l t - 1 と同じアフィニティーでの V E G F への結合を可能にすること、およびドメイン 2 の単体が完全長 s F l t - 1 より 6 0 倍も低い強度でしか結合しないことを示している。

30

【 発明の開示 】

【 0 0 0 8 】

発明の概要

本発明は、生物学的サンプル中の、抗体の部分以外の第 2 の結合パートナーの量または濃度を検出するために使用される、抗体の部分以外のタンパク質性結合パートナーの使用を含む。本発明においては、好ましくは、ただ 1 つの抗体またはその部分が使用される。本発明の好ましい結合パートナーには、胎盤成長因子 (P L G F) および可溶性 f m s 様チロシンキナーゼ (s F l t - 1) (これは、F l t - 1 遺伝子産物の選択的スプライシングにより産生される、F l t - 1 の部分であり、P L G F に結合しうる) が含まれるが、これらに限定されるものではない。

40

【 0 0 0 9 】

ある好ましい実施形態においては、本発明はまた、P L G F に結合していない s F l t - 1 (「遊離 s F l t - 1 」) の量を決定する方法、および s F l t - 1 に結合していない P L G F (「遊離 P L G F 」) の量を決定する方法を提供する。

【 0 0 1 0 】

さらに、本発明は、遊離 P L G F に対する遊離 s F l t - 1 の比を決定する方法を提供する。

【 0 0 1 1 】

もう 1 つの好ましい実施形態においては、子癇前症を診断し、予測し、モニターし、ま

50

たはその療法をモニターするために、遊離 P L G F に対する遊離 s F l t - 1 の比を用いる。

【 0 0 1 2 】

本発明における検出または定量に適した他のタンパク質性結合ペアには、心房性ナトリウム利尿ペプチド (A N P)、脳ナトリウム利尿ペプチド (a k a、b 型ナトリウム利尿ペプチド) (B N P) およびナトリウム利尿ペプチド受容体 a / グアニル酸シクラーゼ a (N P R 1) (心房性ナトリウム利尿ペプチド受容体 a 型 (A N P R A または N P R A)、心房性ナトリウム利尿ペプチド受容体 A 型および G U C 2 A としても公知であり、これは遺伝子座 1 q 2 1 - q 2 2 に位置すると考えられている) ; ならびにインスリン様成長因子受容体 (I G F - 1) およびその受容体 (I G F R 1) が含まれるが、これらに限定

10

【 0 0 1 3 】

発明の詳細な説明

本発明の説明においては、以下の用語および略語を用いる。

【 0 0 1 4 】

本発明を説明するために用いる略語

「 s b p 」なる略語は「特異的結合パートナー」を意味する。すべての生物学的物質は互いに或る程度のアフィニティーを有するが、特異的結合パートナーは、生物学的機能をもたらすよう互いに特異的に結合するものである。例えば、s F l t - 1 は、生物学的に有意なアフィニティーで P L G F に結合し、そうすることにより、P L G F の生物活性をモジュレーションしうる。したがって、s F l t - 1 と P L G F とは特異的結合パートナーである。同様に、s F l t - 1 の膜結合対応物、すなわち、F l t - 1 も、P L G F の s b p である。さらに、V E G F も F l t - 1 との s b p である。本発明の場合に有用なもう一つのタイプの s b p は、抗体と、それが結合するエピトープを含む分子とである。このタイプの s b p は本発明の実施形態のいくつかの機能に必須であるが、本発明のほとんどの実施形態は、第 1 s b p も第 2 s b p も抗体や抗体の部分ではない、その他の s b p への結合をアッセイ条件下で検出することによる 1 つの特異的結合パートナーの存在または量の決定 (測定) に向けられている。

20

【 0 0 1 5 】

本明細書においては、「タンパク質性」なる語は、少なくとも 1 つのヘリックス、シートまたは他の重要な (ポリペプチジル) 二次構造を形成するのに十分な程度に大きいポリペプチド、タンパク質断片およびタンパク質を示すために用いられる。タンパク質性なる語は、未修飾ポリペプチドと、グリコシル化、タンパク質分解された、プレニル化および二量体化ポリペプチドおよびタンパク質のような修飾ポリペプチドとの両方を含む。各タンパク質性結合性パートナーは、好ましくは、少なくとも 1 つの二次構造要素、例えばヘリックス構造またはシート構造 (例えば、ヘリックスまたはシート) を含む。したがって、各タンパク質性結合パートナーは、好ましくは少なくとも 8 アミノ酸残基、より好ましくは少なくとも 5 0 アミノ酸残基、さらに好ましくは少なくとも 1 0 0 アミノ酸残基を含む。タンパク質性結合パートナーは、複雑なタンパク質を形成するよう一緒に折り畳まれた複数のポリペプチド鎖をも含むうる。

30

40

【 0 0 1 6 】

「生物学的試料」または「生物学的サンプル」なる語は (特に明示されていない限り) 互換的に用いられ、タンパク質性分子を含有するヒトまたは他の動物に由来する任意の物質を意味する。本発明の方法は、限定的なものではないが下水、衣類、敷物類、呼吸凝縮物および組織生検を含む任意の適切なサンプルに対して有用に行われうる。本発明の好ましい「生物学的サンプル」には、血液、血漿、血清、尿、糞便、リンパ液および唾液が含まれる。実質的に固体の生物学的サンプルを使用する場合、本発明の方法を行う又は継続する前に該サンプルの一部を抽出または可溶化するのが最も一般に好ましいであろう。

【 0 0 1 7 】

「 P L G F 」なる語は胎盤成長因子を意味し、P G F と称されることもある。P L G F

50

をコードする遺伝子は遺伝子座 1 4 q 2 4 - q 3 1 に位置すると現在考えられている。P 1 G F は、当技術分野で現在公知の全 3 種のアイソフォーム、および本発明のいずれかの特定の実施形態において使用される P 1 G F s b p とそれらが結合するというほどまでには現在十分には特徴づけられていないいずれかの他のものを含む。

【 0 0 1 8 】

「標識」または「検出可能な標識」なる語は、それが結合している分子の直接的または間接的な定量的または相対的な測定を可能にする任意の適切な分子を意味する。本発明の場合に有用な適切な標識には、固体、酵素、酵素基質、酵素インヒビター、補酵素、酵素前駆体、アポ酵素、蛍光基質、色素、化学発光化合物、発光基質、発色物質、磁性物質、金属粒子、例えば金コロイド、放射性物質などが含まれる。有用な酵素マーカーには、デヒドロゲナーゼ、オキシドレダクターゼ、例えばレダクターゼおよびオキシダーゼ；官能基、例えばアミノ、カルボキシル、メチル、アシルおよびリン酸基の転移を触媒するトランスフェラーゼ；エステル、グリコシド、エーテルおよびペプチド結合のような結合を加水分解するヒドロラーゼ；リアーゼ；リガーゼなどが含まれるが、これらに限定されるものではない。検出のためのコンジュゲート化（共役）形態において、複数の酵素も使用されうる。

10

【 0 0 1 9 】

有用な固体標識には、マイクロタイタープレート、粒子、微粒子および顕微鏡スライドが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 2 0 】

検出可能なマーカーが酵素である場合、標識分子の検出は酵素サイクリングによっても促進されうる。例えば、検出可能な標識がアルカリホスファターゼである場合、測定は、ウンベリフェロン誘導体のような適切な基質から生じた蛍光または発光を観察することにより行われうる。有用なウンベリフェロン誘導体には、4 - メチル - ウンベリフェリルホスファートが含まれるが、これに限定されるものではない。

20

【 0 0 2 1 】

他の有用な標識には、リン酸化フェノール誘導体、例えばニトロフェニルホスファート、ルシフェリン誘導体、ジオキセタン誘導体が含まれる。

【 0 0 2 2 】

本発明の場合に有用な好ましい蛍光標識および化学発光標識には、フルオレセインイソチオシアナート；ローダミン誘導体、例えばローダミン B イソチオシアナートおよびテトラメチルローダミンイソチオシアナート；ダンシルクロリド（5 - （ジメチルアミノ） - 1 - ナフタレンスルホニルクロリド）、ダンシルフルオリド、フルオレスカミン（4 - フェニルスピロ [フラン - 2（3H）, 1' - （3' H） - イソベンゾフラン] - 3, 3' - ジオン）；フィコピリンタンパク質、例えばフィコシアニンおよびフィソエリトリン；アクリジニウム塩；ルミノール化合物、例えばルミフェリン、ルシフェラーゼおよびエクオリン；イミダゾール；シュウ酸エステル；ユウロピウム（Eu）、テルビウム（Tb）およびサマリウム（Sm）のような希土類元素のキレート化合物；ならびにクマリン誘導体、例えば 7 - アミノ - 4 - メチルクマリンが含まれる。

30

【 0 0 2 3 】

したがって、本発明の場合に有用な多種多様な検出可能なマーカーが利用可能であると理解されるであろう。検出可能な標識に結合した分子の量を定量するための任意の適切な検出手段（限定的なものではないが例えば、電極の使用、色、光または吸光度の分光光度測定および目視検査）も用いられうると理解されるであろう。

40

【 0 0 2 4 】

本発明の特定の実施形態

本発明は、生物学的試料中に存在するタンパク質性特異的結合ペアの濃度または量を決定する方法を提供する。該結合ペアは、好ましくは互いに直接結合する 2 つのタンパク質性部分（すなわち、第 1 タンパク質性部分および第 2 タンパク質性部分）を含み、いずれのタンパク質性結合パートナーも抗体（または抗体のフラグメント）ではない。ポリペプ

50

チドおよびタンパク質を含む任意の適切なタンパク質性結合パートナーが本発明の方法において使用されうる。抗体および抗体の部分が本発明の方法において使用されうるが、好ましくは、2未満の抗体またはその部分が使用される。

【0025】

あるいは、2つを超える抗体を使用する場合には、該方法の2つのタンパク質性特異的結合パートナーの1つは、該方法において観察される検出可能なマーカーで標識される。例えば、特定の波長における吸光度を用いる場合には、抗体またはその部分の使用以外の方法で、第1 s b pまたは第2 s b pのいずれかに発色団が連結される。同様に、放射能標識(例えば、 ^{125}I)を検出するためにシンチレーションまたはガイガーカウンターを使用する場合には、該 s b pは、間接的に、またはより好ましくは直接的に、第2 s b pに直接結合される。第1または第2 s b pを第1もしくは第2抗体または抗体の部分以外の手段で間接的に標識する場合には、直接標識部分は、好ましくは、第1または第2 s b pに対する生物特異的アフィニティーを有するもの(すなわち、第3 s b p)、あるいは第1または第2 s b pの成分に対するストリンジェントな(s t r i n g e n t)なアフィニティーを有するものである。ストリンジェントなアフィニティーを有する間接標識系の一例には、ビオチンおよびアビジンが含まれる。この非限定的な例においては、第2 s b pはビオチンで標識されることが可能であり、アビジン様部分(例えば、アビジン、ストレプトアビジン、エクストラビジン)は(例えばアクリジニウムエステルまたは他の化学発光アクリジニウム誘導体で)直接的に標識されることが可能である。

10

20

【0026】

本発明の方法の第1の実施形態においては、第1タンパク質性特異的結合パートナーは、検出可能な標識で標識され、したがって、それは標識部分を形成する。該標識部分は生物学的試料との接触に付され、該標識部分と、第2結合パートナーである該生物学的試料の成分との結合の度合が決定される。結合の度合は、第1結合パートナー、または該試料中に存在する第2結合パートナーの濃度または量の指標となる。結合の度合の決定は相対値によるものでありうるが、好ましくは定性的なものである。結合のこの度合は、任意の適切な手段により、例えば、結合ペアを凝集させ、固体支持体に結合させ、または液体媒体中を異なる速度で泳動させることにより、決定されうる。好ましくは、結合の度合は、結合ペアを固体支持体に付着させ、未結合標識部分を結合標識部分から分離し、該標識部分の結合または未結合(または両方の)画分を決定することにより決定される。

30

【0027】

本発明において使用される結合ペアは、好ましくは、T細胞受容体および主要組織適合性複合体、CD40およびCD40Lならびに抗体およびその標的のような、哺乳動物の免疫系において相互作用するタンパク質のペアではない。

【0028】

該方法は、場合によっては、カートリッジ、試験細片または一体型パッケージ(半自動または全自動免疫分析装置により使用されるよう適合化されたもの)で行われうる。本発明の場合の自動診断アッセイは、好ましくは、サンプルおよび試薬が系内に挿入されたら、使用者の介入を伴うことなく該サンプルおよび試薬を反応容器に運搬しインキュベーションを行い場合によっては未結合標識部分を結合標識部分から洗浄除去する該系において行われる。そのような系は、場合によっては、該系内に該サンプルおよび試薬を挿入した後は使用者の介入を伴うことなく該系が少なくとも8つのアッセイ、好ましくは少なくとも16のアッセイ、より好ましくは少なくとも64のアッセイ、最も好ましくは少なくとも128のアッセイを48時間のうちに行いうることにより、手動または非自動系から区別されうる。該系はまた、好ましくは、自動的に、すなわち、サンプルが系内に装填されたら人による計算または投入の必要性を伴うことなく、結合ペアの標的タンパク質の濃度または量を計算しうる。

40

【0029】

該方法はまた、カートリッジ形態または試験細片アッセイで行われうる。そのようなア

50

ッセイにおいては、該アッセイ試薬は、好ましくは、使い捨て装置内に装填可能な単位用量として提供され、該単位用量は、該方法を行うためにアッセイすることが必要な全ての試薬を含有する。そのような単位用量装置は、例えば、ナイロン、ニトロセルロースまたは他の適切な材料の使い捨て膜状構造体を含むプラスチックハウジングを含みうる。該サンプルは予備加工され、または直接的に装填領域上に装填されうる。ついで該サンプルは、場合によっては、該膜状構造体を通して、該膜上に含有される複数の領域を経由して流動しうる。該膜状構造体は、場合によっては更に、界面活性剤または側方流動補助物質を含有し、また、場合によっては、過剰の流体を集め及び/又は該膜を通る側方流動を促進するための吸収剤を含有する。また、本発明の方法は多パック系で行われることが可能であり、この場合、各パックは、2、4、8、10もしくは12のアッセイまたは好ましくは1つのアッセイを行うのに十分な試薬を含む。

10

【0030】

該方法はまた、マイクロリットル範囲（例えば、50 μ L未満、好ましくは12 μ L未満、場合によっては4 μ L未満の流体）のサンプルを分析するよう設計されたマイクロフルイディック（microfluidic）装置内で行われうる。そのようなマイクロフルイディック装置は、場合によっては、生物学的流体またはアッセイ試薬またはそれらの両方がマイクロフルイディック装置内で輸送されるのを補助するための流動補助剤、推進装置（限定的なものではないが、膨張性ゲル、ワックスおよび気体が含まれる）、ナノバルビング（nanovalving）などを含有しうる。

20

【0031】

該方法は、場合によっては、サンドイッチアッセイとして設計されうる。サンドイッチアッセイは、標識部分を、結合ペアのもう一方の特異的結合パートナーおよびもう1つの特異的標識試薬に結合させることを含む。多重サンドイッチアッセイは本発明の範囲内である。限定的なものとしてではなく主として例示および理解の促進のために、第1結合パートナーとしてのPLGFおよび第2結合パートナーとしてのsFlt-1の使用により、以下のサンドイッチアッセイが例示される。しかし、以下の例示におけるPLGFおよび/またはsFlt-1の代わりに、タンパク質性特異的結合パートナーの任意の適切なペアが使用されうる。

【0032】

本発明の範囲内の第1のサンドイッチアッセイにおいては、PLGF（-PLGF）に対する抗体はマイクロタイタープレートに結合され、該抗体は、予め又は後に、PLGFまたはそのsFlt結合性断片に結合される。本発明の場合、PLGFはこのように固体基体で標識され、標識部分である。遊離PLGFがマイクロタイタープレート上に実質的に存在しないことを保証するために、場合によっては、該マイクロタイタープレートを洗浄することが可能である。sFlt-1を含有することが判明している又はsFlt-1を含有する疑いのあるサンプルを該プレートと接触させる。したがって、該アッセイにおいてはPLGF:sFlt-1結合が用いられる。洗浄後、該プレートを標識抗体と接触させることにより、該サンプル中のsFlt-1の量が検出されうる。該抗体は任意の適切な検出可能な標識で標識されうる。

30

【0033】

本発明の範囲内の第2のサンドイッチアッセイにおいては、第1のサンドイッチアッセイのマイクロタイタープレートの代わりに微粒子を使用する。好ましい微粒子には、磁性微粒子、特に0.2から7.0ミクロンの平均サイズの磁性微粒子、ハプテン化微粒子、1つ又は好ましくは少なくとも2つの蛍光色素（特に、フローセル内での個々の単離およびレーザーによる励起の後に同定されうるもの）により含浸された微粒子、フェロ流体（ferrofluid）（すなわち、約0.1 μ m未満のサイズの磁性粒子）、および収集により取り出されうる又は濾過により取り出されうる他の微粒子が含まれるが、これらに限定されるものではない。

40

【0034】

本発明の範囲内の第3および第4のサンドイッチアッセイにおいては、PLGFを、そ

50

れぞれ、直接的にマイクロタイタープレートに又は微粒子に結合させる。

【 0 0 3 5 】

第5および第6のサンドイッチアッセイにおいては、P L G Fをビオチン化し、または適切なハプテン、例えばアダマンチン、フルオレセインイソチオシアナートまたはカルバゾールで標識する。これは、多価抗体または(ストレプト)アビジン含有部分と接触した際の凝集物の形成を可能にし、あるいはマイクロタイタープレート、顕微鏡スライドまたは微粒子のような固体基体へのP L G Fの容易な結合を可能にする。凝集を用いる実施形態においては、凝集物の沈殿もしくは濾過または凝集物の液体クロマトグラフィーのような任意の適切な分離または検出手段が用いられる。

【 0 0 3 6 】

同様に、本発明の方法は競合阻害アッセイを含む。競合阻害アッセイは、単一の特異的結合パートナーを使用するよう、あるいはまた、サンドイッチアッセイとして設計される。有用な競合阻害アッセイには、標識された第2特異的結合パートナー(またはその断片)(「標識第2 s b p」)を合成し、またはアッセイすべき生物学的サンプル以外の起源から単離し直接もしくは間接標識で標識する競合阻害アッセイが含まれる。ついで、標識第2 s b pが第1 s b pに結合するのが妨げられる度合を測定することにより、被検生物学的サンプル中の第2 s b pの量を決定する。限定的なものではないが例えば、前記で用いた例示的な取り決めを用いて、s F l t - 1またはそのP L G F結合性断片を任意の適切な検出可能な標識(限定的なものではないが前記のものが含まれる)で標識することが可能である。固定化P L G Fを生物学的サンプルと接触させた場合、該生物学的サンプル中のs F l t - 1はP L G Fへの結合に関して標識s F l t - 1と競合することになる。したがって、該固定化P L G Fに結合する標識の減少は、s - F l t - 1を含有することが判明している又はそれを含有する疑いのある生物学的サンプル中のs F l t - 1の量を示す。

【 0 0 3 7 】

したがって、本発明は、第1ポリペプチドまたはタンパク質と第2ポリペプチドまたはタンパク質との結合相互作用を用いて第2ポリペプチドまたはタンパク質の量または濃度を測定する多数の実施形態を提供する、と当業者は理解するであろう。本発明の実施形態を例示するために前記で用いた特異的結合パートナー、すなわち、P L G Fおよびs F l t - 1は、もちろん、本発明で使用するのに適した好ましい特異的結合パートナーに含まれる。追加的な好ましい実施形態は、他の血管新生成長因子およびそれらの受容体、例えばV E G F - A、V E G F - B、V E G F - C、V E G F - D、V P Fなど(これらに限定されるものではない)を含む。同様に、該成長因子の生物学的に重要な変異体、例えばV E G F - A₂₀₆、V E G F - A₁₈₉、V E G F - A₁₆₅、V E G F - A₁₄₅およびV E G F - A₁₂₁(これらに限定されるものではない)は、本発明の好ましい特異的結合パートナーである。同様に、これらの分子の受容体、例えばK D RまたはF l k - 1 (f m sチロシン様キナーゼ1)(V E G F RまたはV E G F R 2とも称される)も、本発明の好ましい第1または第2結合パートナーである。

【 0 0 3 8 】

本発明の他の好ましい特異的結合パートナーには、ナトリウム利尿因子、ナトリウム利尿因子受容体、インスリン様成長因子(I G F)またはI G F様受容体が含まれる。ナトリウム利尿因子の具体例には、心房性ナトリウム利尿ペプチド(A N P)、B型または脳ナトリウム利尿ペプチド(B N P)、およびc型ナトリウム利尿ペプチド(C N P)が含まれる。I G F、I G F RおよびI G F B Pファミリーの任意の適切なメンバーが第1特異的結合メンバーまたは第2特異的結合メンバーまたはそれらの両方として使用される。

【 0 0 3 9 】

第1特異的結合パートナーまたは第2特異的結合パートナーは、他のポリペプチドからのアミノ酸残基を含むキメラまたは融合体でありうる、と容易に理解されるであろう。同様に、特異的結合パートナーは完全長またはトランケート化体でありうる。該方法は、膜

10

20

30

40

50

結合型または結合可能な結合パートナーを使用して行うことも可能であるが、本発明の場合に有用な特に好ましいトランケート化として、該タンパク質の可溶性細胞外ドメインから膜貫通領域を切断するトランケート化が挙げられる。特異的結合パートナーが膜結合型である場合、該膜は、場合によっては、合成された又は細胞コンテクストから取り出された細胞構造体の部分（例えば、小胞、リポソームまたはエマルションにおけるもの）でありうる。この細胞外ドメイン自体は「完全長」であるか、またはN末端もしくはC末端もしくはそれらの両方においてトランケート化されていることが可能であり、外因性ポリペプチドに融合されていることが可能である。

【0040】

本発明はまた、sFlt-1のPLGF結合部位に結合した特異的結合パートナーを有さないsFlt-1の濃度を決定する方法を提供する。該方法は、sFlt-1のPLGF結合部位に結合した特異的結合パートナーを有さないsFlt-1を含有することが判明している又はそれを含有する疑いのあるサンプルを、sbp:sflt-1複合体を形成しうるsFlt-1の第1特異的結合パートナー(sbp)と、および検出可能な標識または固体構造体で特異的に標識された第2 sbpと接触させることを含む。第1または第2 sbpはPLGFまたはPLGFのsFlt-1結合性断片である。第1 sbp、第2 sbpおよびsFlt-1は、それが存在する場合には、三者複合体を形成し、これは該サンプル中のsFlt-1の量の指標として検出される。

【0041】

1つの好ましい実施形態においては、生物学的サンプル中の全sFlt-1はFlt-1結合性抗体で捕捉され、PLGFに結合しない該サンプル中のsFlt-1の部分またはsFlt-1のPLGF結合部位に結合する同様の結合パートナーは、上皮成長因子(EGF)スーパーファミリーの標識断片で検出される。EGFスーパーファミリーの適切なメンバーには、PLGFまたはVEGFの任意の適切な部分が含まれるが、これらに限定されるものではない。さらに好ましい実施形態においては、そのEGFスーパーファミリーメンバーは、検出可能な産物を産生しうる発光団または酵素、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ、フルオレセインまたはアクリジニウム（これらに限定されるものではない）で標識される。

【0042】

もう1つの好ましい実施形態は、PLGFを固体表面、例えば微粒子（これに限定されるものではない）上に固定することを含む。この試薬は遊離sFlt-1のみを捕捉する。いずれの特定の理論にも束縛されるものではないが、被検生物学的サンプル中のsFlt-1は固体結合PLGFには結合しないと考えられる。なぜなら、PLGFとsFlt-1との間の結合部位には既に非遊離sFlt-1が結合しているからである。ついで該複合体は任意の適切な方法で検出されうる。適切な直接的または間接的検出試薬には、sFlt-1に対する抗体、抗体フラグメントまたはアプタマーが含まれる。

【0043】

前記実施形態における試薬はいずれも、先行技術方法により容易にビオチン化されうる。したがって、PLGFはビオチン化されることが可能であり、これにより、固相または別の検出可能な分子へのその固定が促進され、該検出試薬は、ビオチンに対する特異的結合パートナーで検出可能となるようビオチン化されうる。本発明におけるビオチンに対する好ましい特異的結合パートナーには、ビオチン、アビジンおよびストレプトアビジンに対する抗体およびアプタマーが含まれる。

【0044】

sFlt-1の構造は当技術分野でよく知られている(Wiesmannら, Cell, 91, 695-704 (1997); Davis-Smythら, EMBO J, 15, 4919-4927 (1996); Barleonら, J Biol Chem, 272, 10382-10388 (1997); Cunninghamら, Biochem Biophys Res Commun, 231, 596-599 (1997); Fuhら(Wiesmannらにおいて引用されている)を参照されたい)。好ましいsFlt

10

20

30

40

50

- 1 特異的結合パートナーは P L G F に対する任意の適切な s F l t - 1 結合断片である。s F l t - 1 の第 2 および第 3 ドメインの少なくとも約 90 % を含むポリペプチドの好ましい s F l t - 1 結合断片。P L G F のトランケート化ポリペプチド (例えば、P L G F の第 21 アミノ酸から P L G F のドメイン 3 まで) も好ましい。P L G F および P L G F の s F l t - 1 結合性断片の一方または両方は、本明細書に開示されているとおりに標識されうる。

【 0 0 4 5 】

P L G F 捕捉または検出試薬と、被検生物学的サンプル中で遊離状態であった s F l t - 1 との相互作用の検出を促進するために、固体表面または検出可能な試薬への結合により標識された追加的な試薬を加えることが可能である。標識抗体は、好ましい追加的な試薬のうちの 1 つである。

10

【 0 0 4 6 】

本発明はまた、s F l t - 1 に結合した P L G F を有さない、被検生物学的サンプル中の s F l t - 1 (「遊離 s F l t - 1」) の量による、標識 s F l t - 1 部分の競合阻害に基づくイムノアッセイを提供する。該方法は、遊離 s F l t - 1 を含有するサンプルを、P L G F の s F l t - 1 結合性断片を含む第 1 s b p と接触させ、P L G F の s F l t - 1 結合性断片に結合しうる s F l t - 1 の断片を含有する第 2 s b p と接触させることを含み、ここで、少なくとも第 1 s b p または第 2 s b p は標識されている。ついで、該サンプルにより引き起こされた第 1 s b p と第 2 s b p との結合における減少を測定することにより、該サンプル中に存在する s F l t - 1 の濃度を決定する。

20

【 0 0 4 7 】

本発明はまた、サンプル中の全 s F l t - 1 に対する遊離 s F l t - 1 の比を決定する方法を提供する。該方法は、(i) 前記実施形態のいずれかにより s F l t - 1 の量を決定し、(i i) 該サンプル中の s F l t - 1 の全量を決定し、(i) 部と (i i) 部との結果を比較することを含む。サンプル中の s F l t - 1 の全量を決定するためには、任意の適切な方法が用いられうる。この工程を行うための適切な方法には、サンドイッチイムノアッセイおよび競合阻害アッセイが含まれるが、これらに限定されるものではない。該アッセイにおいて存在する全 s F l t - 1 を測定するためにイムノアッセイにおいて使用する少なくとも 1 つの抗体は、該生物学的サンプル中に存在する又は恐らく存在する P L G F または別の因子 (例えば、第 1 または第 2 s b p の活性部位に特異的な抗イディオタイプ抗体) の結合部位に結合する。ついで、場合によっては、該生物学的サンプル中の他のタンパク質への s F l t - 1 の結合を妨げるために、該サンプルの部分を変性させることが可能である。この場合、s F l t - 1 の活性部位への抗体結合を遮断するタンパク質が遊離されるよう s F l t - 1 を変性させるためには、任意の適切な技術が用いられうる。適切な技術には、酸、塩基、塩、洗剤もしくは界面活性剤、有機塩基、または前記のもの組合せが含まれ、これらは当業者の技量の範囲内である。診断試薬として使用する抗体またはもう 1 つの s b p の結合を促進するためには、サンプル中の s b p への s F l t - 1 の結合を妨げるために使用する変性剤は、好ましくは、容易に中和され、または該サンプルから除去される。しかし、好ましくは、全 s F l t - 1 を測定するためにイムノアッセイにおいて使用する 1 以上の抗体は s F l t - 1 の P L G F 結合部位に結合しない。

30

40

【 0 0 4 8 】

特に好ましい実施形態においては、抗 s F l t 免疫試薬を磁性微粒子に結合させ、生物学的試料を、該抗 s f l t - 1 結合微粒子と接触させて、サンプル中の s F l t - 1 を該

50

磁性微粒子に結合させる。ついで該複合体を、場合によっては、適切な溶液またはバッファ中で1回以上洗浄して、該アッセイを妨げうる未結合分子を除去することが可能である。ついで標識 P L G F を微粒子含有複合体と接触させ、未結合標識 P L G F を該磁性微粒子から除去し、または洗い落とす。ついで、該磁性微粒子に結合した標識 P L G F の量が該生物学的試料中の遊離 s F l t - 1 の量の指標となる。なぜなら、s b p (この s b p は s F l t - 1 の P L G F 結合部位に結合する) に結合した s F l t - 1 は該標識 P L G F に効率的に結合できないからである。

【 0 0 4 9 】

本発明のもう1つの実施形態においては、P L G F に結合した全 s F l t - 1 および s F l t - 1 の部分を測定する。サンプル中に存在する全および P L G F 結合 s F l t - 1 (「結合 s F l t - 1」) の量を決定するためには、任意の適切な方法が用いられうる。サンプル中の結合 s F l t - 1 の量を決定するための1つの適切な方法は、抗 P L G F 抗体、結合 s F l t - 1 (これ自体は少なくとも s F l t - 1 および P L G F を含む) および抗 s F l t - 1 抗体を含む少なくとも3つの成分を有する複合体の形成を検出すること、すなわち、1つの抗体が P L G F に特異的であり少なくとも1つの抗体が s F l t - 1 に特異的である2抗体サンドイッチアッセイを用いることである。本発明の他の好ましい実施形態においては、該抗体をそれぞれ、好ましくは、検出可能な標識で標識する。この実施形態の、より一層好ましい実施形態においては、1つの抗体を固体基体への結合により標識し、少なくとも1つの抗体を本明細書中に記載の別の標識への結合により標識する。

【 0 0 5 0 】

もう1つの実施形態においては、遊離 s F l t - 1 の検出は、P L G F が s F l t - 1 に結合している場合には接近不可能な(すなわち、隠れている)エピトープに結合する抗体を使用して行う。この点においては、本発明のアッセイは、それが遊離 s F l t - 1 のみを測定すること以外は、任意の伝統的なサンドイッチ、競合阻害または他の通常のアッセイ(s F l t - 1 に関するもの)である。これは、遊離 s F l t - 1 の量を、全 P L G F の量と、あるいはより好ましくは遊離 P L G F の量と比較することを可能にする。この実施形態の他の態様においては、本発明の他の実施形態において使用する s F l t - 1 の部分の代わりに、P L G F の s F l t - 1 結合部位に対する抗体を使用することが可能である。

【 0 0 5 1 】

P L G F および s F l t - 1 の測定(限定的なものではないが、結合状態および遊離状態のこれらの分子の測定が含まれる)は任意の適切な目的に用いられうる。例えば、これらのマーカーの測定は、非致死性心筋梗塞のような主要心血管事象の後の抗原の経過を予測するために用いられうる。同様に、これらのマーカーが測定可能であることを利用して、心臓薬の作用様式を、より深く理解することが可能である。さらに、これらのマーカーの正確な測定は再狭窄および新血管形成のメカニズムのより詳細な研究を可能にする。P L G F および s F l t - 1 の測定は、妊娠女性における子癇前症の、より低いリスクを実証することにおいて、最大の重要性を見出しうるであろう。

【 0 0 5 2 】

子癇前症は全妊娠女性の約5%を冒し、いくつかの民族集団においては全妊娠女性の約10%をも冒す。子癇前症の影響は重篤となることがあり、時には死亡を含みうる。したがって、子癇前症に関して高いリスクの妊娠から正常妊娠をより良く区別する必要がある。

【 0 0 5 3 】

本発明者らは、遊離 P L G F に対する遊離 s F l t - 1 の比が、遊離 P L G F に対する全 s F l t - 1 の比より良好な、子癇前症のリスクの予測因子であることを見出した。遊離 s F l t - 1 の量は全 s F l t - 1 および結合 s F l t - 1 の量に数学的に関連づけられるため、本発明の範囲において、これらの値を遊離 s F l t - 1 の量の代用物として用いることが可能であり、生物学的サンプル中の P L G F の量と比較することが可能である

【0054】

医学的診断のために関心が持たれる多数のタンパク質は、低濃度、例えば1 pg/mL未満から0.1 mg/mLで存在する。これらのタンパク質のいくつかは、抗体-抗原相互作用で観察されるものに類似したアフィニティーでタンパク質受容体に結合する。酵素活性と同様の方法で、遊離タンパク質の量、またはその天然受容体に結合した量を測定することが可能である。

【0055】

子癩前症は、現在は高血圧およびタンパク尿の臨床症状に基づいて診断されている妊娠後期の疾患である。最近の文献は、該疾患の誘発事象が、血管新生タンパク質である血管内皮成長因子(VEGF)および胎盤成長因子(PLGF)の循環レベルの低下であることを提示している。そして、それにより生じる胎盤内の血管形成の低下が、子癩前症として臨床的に判断される血圧上昇およびタンパク尿を招くと示唆されている。これらの2つのタンパク質の減少は受容体可溶性fms様チロシンキナーゼ1(sFlt-1)の可溶性形態の濃度の増加によるものであるらしい。本発明は、遊離しているか又はPLGFに結合しているsFlt-1の測定へのアプローチを含み、PLGFの遊離形態および結合形態を測定するためのアッセイ成分としてのその使用を含む。子癩前症の検出のための最も適切な情報は、PLGFに結合していないsFlt-1のレベルに関連しているPLGFのレベルである。高濃度の遊離sFlt-1は、大過剰の遊離受容体の存在によりPLGF濃度が低い可能性があることを示している。

【0056】

好ましい実施形態においては、すべての循環sFlt-1(PLGFに結合しているもの又は結合していないもの)に結合させるために抗体を使用する。したがって、シグナル生成分子およびPLGFのコンジュゲートが、固相に結合したsFlt-1と相互作用するのが可能となる。この例においては、PLGFから遊離しているsFlt-1のみがコンジュゲート化PLGFに結合するであろう。ついで未結合PLGFを洗い落とし、PLGF-コンジュゲートの濃度を表示するための必要な工程を行う。

【0057】

前記の形態は、コンジュゲートとしてPLGFと同様にしてVEGFを使用する場合にも構築されうるであろう。さらに、VEGFおよびPLGFのヘテロ二量体を使用することも可能であろう。

【0058】

該アッセイのもう一つの形態としては、固相に結合したPLGFを使用し、ついで、sFlt-1に結合するコンジュゲート化抗体で後に検出されうるいずれかの遊離PLGFを捕捉することが挙げられるであろう。その同じ形態は固相上のVEGFを使用することが可能である。

【0059】

該アッセイのもう一つの形態は、sFlt-1を固相に結合させ次いで可溶性受容体に結合していないいずれかの遊離成長因子を捕捉することにより遊離PLGFまたはVEGFを測定するものである。この場合も、検出は、該成長因子に結合するコンジュゲート化抗体で行われうる。該アッセイのこの形態は該成長因子の生物学的に活性な形態に特異的であろう。この形態においては、分解した成長因子は検出されず、したがって、子癩前症を引き起こす生物学的事象に対する該アッセイの特異性が改善される。

【0060】

関心のある生物学的問題が、受容体に結合したPLGFの量である場合には、最初の例と同様にsFlt-1を捕捉する固相を使用し、ついでPLGFまたはVEGFに対するコンジュゲート化抗体を使用して、結合成長因子の量を測定することも可能である。該アプローチの利用は、測定される種と病態との相関の成否に左右されるであろう。

【0061】

該アッセイのもう一つの形態は、サンプル中の遊離リガンドが標識リガンドと競合する

10

20

30

40

50

競合形態で固定化受容体を使用することである。例えば、標識 P L G F との競合形態でサンプル中の P L G F を捕捉するために、固相上の s F l t - 1 が使用されうる。該アッセイのこの形態は、該アッセイにおける抗体の必要性を無くすであろう。

【 0 0 6 2 】

前記の例の逆は、P L G F または V E G F を固定化し、サンプルおよびコンジュゲート化 s F l t - 1 を加えることであろう。この形態においては、遊離 s F l t - 1 が固相上の部位に関して競合するであろう。

【 0 0 6 3 】

該アッセイにおいて使用するタンパク質は患者のサンプルから誘導されうるが、細胞培養または細菌において発現された組換えタンパク質の使用がより実用的なアプローチである。 10

【 0 0 6 4 】

本明細書に記載のアプローチは、受容体または会合リガンドの活性に関してサンプルを試験するために用いられうる。ただし、該リガンドと該受容体との間のアフィニティーは、該アッセイプロトコールのシグナル生成において結合物質が検出できない程度の該結合物質の喪失を伴うことなく洗浄工程の利用を可能にするのに十分な程度に高いものでなければならない。

【 0 0 6 5 】

標的タンパク質の固有の生物学的結合活性に基づくアッセイは、患者の臨床状態を知るための優れた情報をもたらさう。疾患または医学的状态にタンパク質受容体が関わっている場合には、その生物活性の相対量を測定するアッセイは、該タンパク質の質量のみを知ることによって正確な臨床像をもたらすと予想されうる。 20

【 0 0 6 6 】

前記方法により、本発明はまた、少なくとも1つの s b p が検出可能な様態で標識されている2つのタンパク質性特異的結合パートナーを含むイムノアッセイを提供する。

【 0 0 6 7 】

また、前記に従い、本発明は、遊離 P L G F に対する遊離 s F l t - 1 の比を決定するための組成物、ならびに (i) 全 s F l t - 1 および結合 s F l t - 1、または (i i) 全 P L G F および結合 P L G F、または (i) および (i i) の両方を決定するための組成物を提供する。 30

【 0 0 6 8 】

実施例

本発明は、全 P L G F、遊離 P L G F、全 s F l t - 1 および遊離 s F l t - 1 に関する種々のイムノアッセイから得たデータにより例示される。選ばれているこれらのデータは本発明の最も例示的なものであるとみなされ、本発明の概念は添付図面に示されており、図面の簡単な説明において簡潔に説明されている。本発明の説明の全体から明らかとなり、これらの実施例は、特許請求されている本発明を例示するものであり、その範囲を限定するものではない。

【 0 0 6 9 】

他の実施例

以下の追加的な実施例は、本発明の2つの好ましい実施形態に関する更なる詳細を示す。 40

【 実施例 1 】

【 0 0 7 0 】

この実施例は、s F l t - 1 に対する s b p として P L G F の部分を使用して生物学的サンプル中の遊離 s F l t - 1 を検出するために用いるアッセイにおける本発明の方法例示する。

【 0 0 7 1 】

s F l t - 1 に対するモノクローナル抗体を、p H 6 . 0 の 5 0 m M ナトリウム M E S (2 - モルホリノエタンスルホン酸) 中の 1 重量 % の濃度の微粒子 1 m L 当たり 0 . 1 50

mgのタンパク質濃度で、磁性カルボキシル-ラテックス微粒子(4.7ミクロン)上にコーティングした。10分後、EDAC(エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド)を加え、1時間反応させた後、該粒子をリン酸緩衝食塩水で洗浄した。ついで、該粒子を、自動免疫化学分析装置において使用するために、バッファー中で0.1%に希釈した。

【0072】

PLGFをリン酸緩衝食塩水に溶解し、アクリジニウムに対するPLGFの質量比150,00/1でアクリジニウム-エステルと共にインキュベートすることにより、アクリジニル化PLGFを調製した。ついで該コンジュゲートをHPLCクロマトグラフィーにより精製し、約75ng/mLの濃度まで希釈した。

10

【0073】

ついで以下の一連の工程を行う。サンプルの0.05mLアリコート反応容器に加え、それに0.05mLの該0.1%標識微粒子を加える。該反応混合物を37で18分間インキュベートする。磁石で該微粒子を保持しながら、該反応溶液を除去する。該粒子を洗浄した後、コンジュゲート溶液の0.05mLアリコートを加える。4分間のインキュベーションの後、もう一度、該粒子を磁石および微粒子のペレットで保持し、該コンジュゲート溶液を除去し、ついで、もう一度、該粒子を洗浄する。水酸化ナトリウムおよび過酸化水素の添加の後、残ったアクリジニウム標識に発光させる。放出された光子を測定し、同じ方法で得られた基準体に線形的に関連づける。

【0074】

20

試験サンプルに関するデータを集め、通常のイムノアッセイで得られた結果と比較した。該データは、遊離PLGF濃度に対する遊離sFlt-1濃度の比を観察した場合に特に、本発明の方法が、非子癇前症サンプルを子癇前症サンプルから、より良好に識別することを示唆した。

【実施例2】

【0075】

この実施例は、PLGFに対するsbpとしてsFlt-1の部分を使用して生物学的サンプル中の遊離PLGFを検出するために用いるアッセイにおける本発明の方法を例示する。

【0076】

30

50mM MES(pH5.5)中の、微粒子の表面に吸収されるタンパク質の量を最大にするのに十分であることが示されたタンパク質濃度(2重量%の固体)にて、カルボキシル官能基で誘導体化された常磁性ラテックス微粒子(4.7ミクロン)を抗sFlt-1抗体(fms様チロシンキナーゼ1のドメイン1から3を含有する)でコーティングした。もう1つの実施形態においては、sFlt-1は固体基体に直接結合されうるであろう。10分後、該粒子をMESバッファーで複数回洗浄することにより、未吸収sFlt-1を除去した。該粒子の洗浄後、EDACを加え、反応させて、該粒子へのsFlt-1分子の共有結合を形成させた。ついで該粒子をリン酸緩衝食塩水で洗浄して反応を停止させ、未反応のEDACを除去した。ついで該粒子を、自動免疫化学分析装置において使用するために、バッファー中で0.1%まで希釈した。

40

【0077】

ポリクローナル抗体(あるいはモノクローナル抗体が使用可能であろう)をアクリジニウム-エステルと共に、抗体に対するアクリジニウムの1から100の範囲のモル比でインキュベートすることにより、アクリジニウム標識抗PLGF抗体を調製した。ついで未コンジュゲート化アクリジニウムをサイズクロマトグラフィーによりアクリジニウム標識抗体コンジュゲートから分離した。ついで、該アッセイにおける最大のシグナル対ノイズ比を与える濃度にまで、該精製コンジュゲートをバッファー中で希釈した。

【0078】

ついで以下の一連の工程を行った。サンプルの0.1mLアリコート反応容器に加え、それに0.05mLの該0.1%標識微粒子を加えた。該反応混合物を37で18

50

分間インキュベートした。該粒子の常磁性特性を利用して、該反応容器の側面に対して該粒子を磁石で引き付け保持しながら、該反応溶液を除去した。該粒子を洗浄した後、バッファを分注する。コンジュゲート溶液の0.05 mLアリコートを加え、該磁石を取り除き、該混合物をボルテックスする。4分間のインキュベーションの後、磁石で粒子を引き付け、洗浄し、再懸濁させることにより、過剰のコンジュゲートを除去した。ついで、sFlt-1/PLGF/抗PLGF抗体(アクリジニウム標識)サンドイッチを今や含有する該粒子を反応物にさらして、アクリジニウムに発光させる。該装置により測定される化学発光は該サンプル中のPLGF(遊離)の量に正比例する。

【0079】

試験サンプルに関するデータを集め、通常のイムノアッセイで得られた結果と比較した。該データは、本発明の方法が、予防または原因生物因子に対する抗体(これは該タンパク質の活性形態と不活性形態とを必ずしも識別しない)を使用する代わりに該予防または原因生物因子の生物活性を測定することにより、子癩前症状態を非子癩前症状態から、より良好に識別することを示唆した。

10

【0080】

本明細書に記載されている全ての特許、特許出願および刊行物を参照により本明細書に組み入れることとする。

【0081】

本発明は多数の変更に適合し、当業者により本明細書中の記載から誘導されうる修飾を包含する。すべてのそのような変更および修飾は、特許請求の範囲により定められる本発明の範囲および精神の範囲内であるとみなされる。

20

【図面の簡単な説明】

【0082】

【図1】図1は、sFlt-1がPLGFと相互作用しうることを示す。sFlt-1の2つの分子とPLGFのホモ二量体との結合が実験系の観察により示唆されているが、本発明者らは、この状態は、インピボでは存在し得ないか又は微々たるレベルでしか存在し得ないと認識している。しかし、本発明方法は、そのような複合体が存在する場合の該複合体の検出に有用であるため、それを図1に示す。

【図2】図2は、倫理的に適切な条件下で集められ調べられた少数のヒトサンプルにおける、遊離PLGFを捕捉するために使用されるモノクローナル抗体およびPLGFを検出するために使用されるポリクローナル抗体を使用するイムノアッセイにより観察されたPLGFレベルのヒストグラムを示す。図2は、低レベルのPLGFが子癩前症妊娠(PE)に関連していること、およびまた、PLGFに対する2つの抗体を使用する子癩前症妊娠からの非子癩前症(正常)妊娠の識別のための能力が改善される必要があることを示している。

30

【図3】図3は、sFlt-1に対する第1 sbpとしてのモノクローナル抗体およびsFlt-1に対する第2 sbpとしてのポリクローナル抗体を使用して集めたデータをヒストグラムを示す。これらのデータは、非子癩前症女性(正常)に関する全sFlt-1値の範囲と子癩前症女性(PE)に関する全sFlt-1値の範囲とにおける有意な重複が存在することを示している。該データによれば、妊娠女性から得られた診断サンプルにおけるsFlt-1に対する2つの抗体を使用するイムノアッセイにより観察されるsFlt-1レベルの精査に基づいて、正常妊娠と子癩前症妊娠とを識別する能力を改善する必要があるであろう。

40

【図4】図4は、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体との組合せの代わりにsFlt-1に対する2つのモノクローナル抗体を使用する以外は図3に示したデータの場合に類似した方法で得られたデータを示す。図3および4に示すデータは、sFlt-1に対するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を含むsFlt-1に関するイムノアッセイが、2つのモノクローナル抗体を含む同様のイムノアッセイを凌ぐことを示している。一般原理に基づけば、このアッセイは、図3のアッセイより良好な定量をもたらすと予想されるであろうが、それは、驚くべきことに、非子癩前症試料を子癩前症試料から識

50

別する、より低い能力しかもたらさない。

【図5】図5は、本発明の1つの好ましい実施形態を用いて集めたデータのヒストグラムを示す。これらのデータは、sFlt-1に対する微粒子標識モノクローナル抗体を含むイムノアッセイを用いて集めたものであり、この場合、サンプル中の全sFlt-1は該微粒子に結合するようにされている。結合したsFlt-1は、アクリジニウムで標識されたPLGFのsFlt-1結合性部分により検出された。このアッセイは試料中の遊離sFlt-1の量を決定する。これらのデータは、非子癩前症妊娠女性（正常）に関する遊離sFlt-1値と子癩前症妊娠女性（PE）に関する遊離sFlt-1の値の範囲との重複における有意な減少が認められることを示している。これらのデータによれば、遊離sFlt-1に対するsbpとしてのPLGFの部分の使用は、妊娠女性から得た診断

10

サンプルにおけるsFlt-1レベルの精査に基づいて正常妊娠と子癩前症妊娠とを識別する能力を改善する。

【図6】図6は、前記のデータをまとめたものであり、それを1つのグラフ表示で示している。

【図7】図7は、単一の非子癩前症サンプルに対して、図6に示すデータを正規化したものである。

【図8】図8は、該研究における「最も正常」な子癩前症女性（「mP-20」）から集めたデータを、非子癩前症女性のサンプルから集めたデータと比較している。sFlt-1の測定値は、このアッセイのモノクローナル+ポリクローナル抗体方式に関する、およびこのアッセイのモノクローナル+モノクローナル方式に関する全sFlt-1の測定値

20

であり、一方、「遊離受容体」に関しては、PLGFのsFlt-1結合性部分がサンドイッチイムノアッセイにおける1つのsbpとして使用され、したがって、遊離sFlt-1のみに結合した。これらのデータは、本発明の態様に合致して、遊離PLGFに対する遊離sFlt-1の比（約0から約1.0の範囲）が、該サンプルにおける全sFlt-1に対するPLGFの比より良好な、より低いリスク（すなわち、正常妊娠）の予測因子であることを示している。

【図9】図9は、非子癩前症サンプルを子癩前症サンプルから識別する本発明の能力の向上を表形態で示す。これらのデータは、2つの抗体に基づくイムノアッセイで測定した非子癩前症試料に関しては、遊離PLGFに対する遊離sFlt-1の比が、本発明の実施形態を用いた場合より高いと認められることを示している。したがって、これらのデータ

30

は、本発明が、子癩前症サンプルからの非子癩前症試料の優れた識別をもたらすことを示している。

【 図 1 】

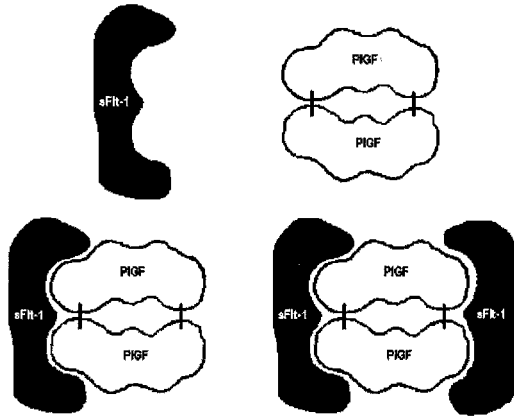


FIG. 1

【 図 2 】

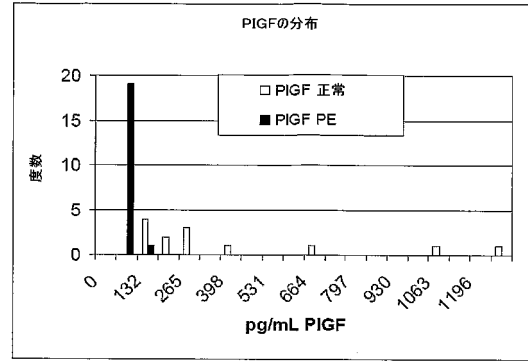


FIG. 2

【 図 3 】

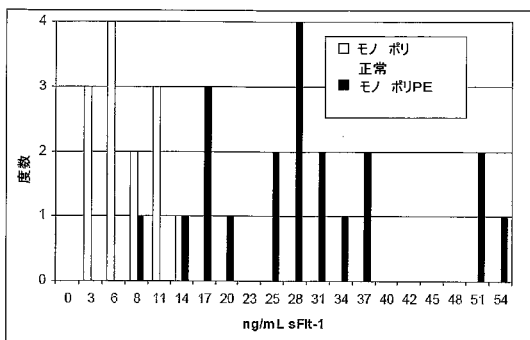


FIG. 3

【 図 4 】

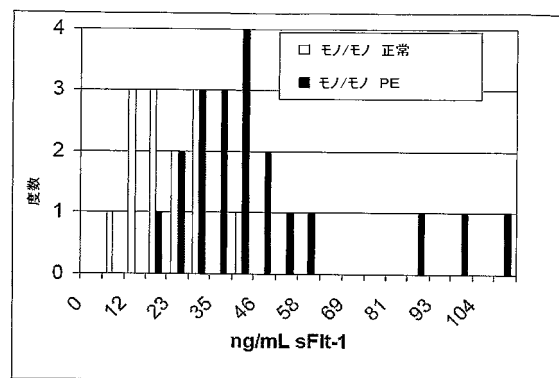


FIG. 4

【 図 5 】

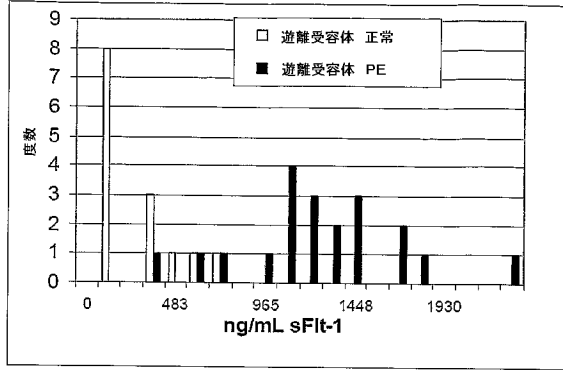


FIG. 5

【 図 6 】

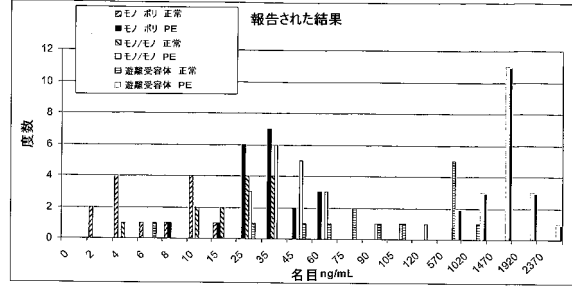


FIG. 6

【 図 7 】

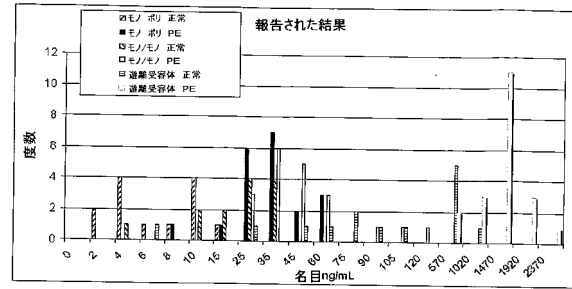


FIG. 7

【 図 8 】

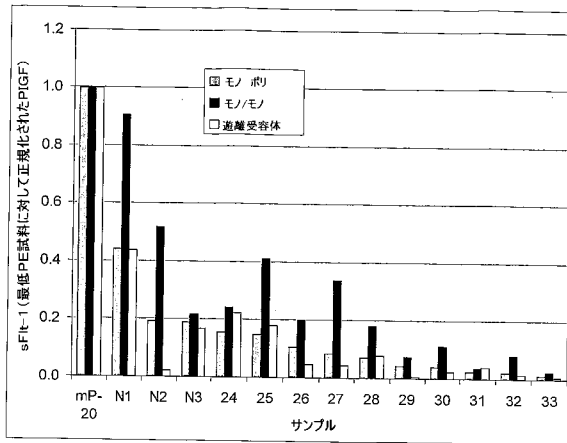


FIG. 8

【 図 9 】

モノ/ポリ	モノ/モノ	遊離受容体
平均正常(最も重度のPEサンプルを使用)		
0.0010	0.0036	0.0005
平均PE(最も重度のPEサンプルを使用)		
0.0975	0.1962	0.1228
平均正常(低PEサンプルを使用)		
0.0476	0.1000	0.0220
平均PE(最も軽度のPEサンプルを使用)		
4.7	5.4	5.4
平均正常(最も正常なサンプルを使用)		
0.108	0.110	0.050
平均正常(PE正常サンプルに最も近いものを使用)		
3.8	4.0	3.5

FIG. 9

フロントページの続き

- (74)代理人 100103920
弁理士 大崎 勝真
- (74)代理人 100124855
弁理士 坪倉 道明
- (72)発明者 ソージン, デイビッド・シー
アメリカ合衆国、イリノイ・60035、ハイランド・パーク、ウエイド・ストリート・1092
- (72)発明者 レアード, ドナルド・エム
アメリカ合衆国、イリノイ・60060、マンデライン、サークル・ドライブ・ウエスト・108
- (72)発明者 ユイ, チークワン
アメリカ合衆国、イリノイ・60048、リバティビル、サウス・イーグレット・コート・1986
- (72)発明者 ドス, ロバート・シー
アメリカ合衆国、イリノイ・60048、リバティビル、カンターベリー・サークル・1300

審査官 吉田 将志

- (56)参考文献 特表2003-517829(JP, A)
特表2005-516183(JP, A)
国際公開第2005/031364(WO, A1)
国際公開第2005/077007(WO, A1)
特表2000-516478(JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48-98