

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-519284  
(P2008-519284A)

(43) 公表日 平成20年6月5日(2008.6.5)

|                               |               |             |
|-------------------------------|---------------|-------------|
| (51) Int.Cl.                  | F I           | テーマコード (参考) |
| <b>GO 1 N 33/53</b> (2006.01) | GO 1 N 33/53  | N 4 H O 4 5 |
| C O 7 K 17/14 (2006.01)       | C O 7 K 17/14 |             |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 33 頁)

(21) 出願番号 特願2007-540147 (P2007-540147)  
 (86) (22) 出願日 平成17年11月8日 (2005.11.8)  
 (85) 翻訳文提出日 平成19年6月26日 (2007.6.26)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/040358  
 (87) 国際公開番号 W02006/052924  
 (87) 国際公開日 平成18年5月18日 (2006.5.18)  
 (31) 優先権主張番号 60/625,572  
 (32) 優先日 平成16年11月8日 (2004.11.8)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507148700  
 ナノバック ファーマシューティカルズ,  
 インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 フロリダ 33607,  
 タンパ, ダブリュー, マーチン ルーサー キング ブルーバード 2727,  
 スイート 850  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100062409  
 弁理士 安村 高明  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

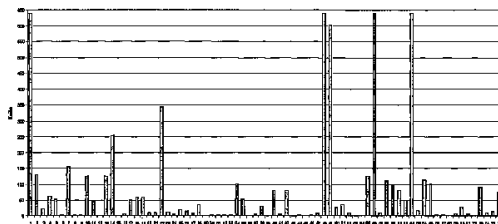
(54) 【発明の名称】 タンパク質-ヒドロキシアパタイト複合体に関する方法および組成物、ならびにカルシウム結合タンパク質-ヒドロキシアパタイト複合体に対する抗体の検出のための新規インビトロ試験を含む

(57) 【要約】

本発明は、哺乳動物の疾患の診断、予後、およびモニタリングのための免疫学的測定法の抗原の調製物として使える新規なヒドロキシアパタイト (HA) - カルシウム結合タンパク質 (CaBP) 複合体 (CaBP - HA 複合体) の製造並びに使用の方法および組成物に関する。CaBP - HA 複合体は血清タンパク質に供された合成HAを使用して、または哺乳動物から石灰化ナノ粒子 (CNP) とも呼ばれるナノ細菌 (NB) を採取することによって製造できる。ヒドロキシアパタイトは適切なタンパク質とともにインキュベートして調製すると、前記結合タンパク質に構造変化が起こる。前記CaBP - HA 複合体をトランスグルタミナーゼなどの酵素に供されると二次的な構造変化が起こり、それによって結合ネオエピトープが共有結合で生成する。

SAPIA HISTOGRAM

Epitope Project Capture: Sample CP 65



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

少なくとも1つのヒドロキシアパタイト(HA)と少なくとも1つの結合したカルシウム結合タンパク質および/またはそのフラグメント(CaBP)とを含む組成物であって、前記少なくとも1つのヒドロキシアパタイト(HA)と少なくとも1つの結合したカルシウム結合タンパク質および/またはそのフラグメントとがCaBP-HA複合体を含む、組成物。

## 【請求項 2】

前記少なくとも1つの結合したカルシウム結合タンパク質および/またはそのフラグメントが、少なくとも1回の構造変化を受ける、請求項1に記載の組成物。

10

## 【請求項 3】

前記構造変化が、一次的な構造変化と二次的な構造変化の少なくとも1つである、請求項2に記載の組成物。

## 【請求項 4】

前記構造変化が一次的な構造変化である、請求項2に記載の組成物。

## 【請求項 5】

前記構造変化が二次的な構造変化である、請求項2に記載の組成物。

## 【請求項 6】

前記構造変化の結果、宿主哺乳動物から免疫応答が生じる、請求項2に記載の組成物。

## 【請求項 7】

前記免疫応答が前記組成物に対する抗体の生成を含む、請求項6に記載の組成物。

20

## 【請求項 8】

前記少なくとも1つのヒドロキシアパタイト(HA)と少なくとも1つの結合したカルシウム結合タンパク質および/またはそのフラグメントとが、Gla含有ドメインをもつタンパク質、第II凝固因子、第VII凝固因子、第IX凝固因子、第X/Xa凝固因子、組織因子-凝固因子VIIa複合体、プロトロンビナーゼ複合体(第V因子、第Xa因子、第II因子)、第II因子のフラグメント、トロンピン、プロトロンピンフラグメント1、マトリックスGLAタンパク質およびオステオカルシン、オステオポンチン、オステオネクチン、タンパク質第XIIIa因子、フェチュインA、カルモジュリン、組織トランスグルタミナーゼII、MMP-9、MMP-3、CD42b、NF-カッパB、CD14、フェチュインB、CD40、ミエロペルオキシダーゼ、フィブロンectin、組織因子、ヒトの補体5b-9、CRP、CD61、カッパ軽鎖、マクロファージL1タンパク質、hsp60、フィブリリン-1、ベータ-2-ミクログロブリン、CD18、ラミニン、抗トリプシン、ノッチ-1、BSA、LPS結合タンパク質(LBP)、PTX3、補体C5、フィブリン/フィブリノゲン、Dダイマー、第V因子、抗キモトリプシン、アネキシンV、ピトロネクチン、トロンピン、トロポニンT、ビメンチン、トロポミオシン、ヒト血清アルブミン、心筋トロポニンI、アポリポタンパク質A1、MHCクラスI、アミロイドPタンパク質、sCD40L、カリクレイン、ATIII、第VIIII因子、硫酸ヘパリン、第XI因子、c-jun、Fra-2、Fra-1、JunB、P-c-Jun、トランスグルタミナーゼ3、アルファ-フェトプロテイン、前立腺特異抗原(PSA)、erbB2、VEGF、アルファ-シヌクレイン、並びにLPSおよびその成分の脂質Aなどの複合体と相互作用して結合する他の分子、Thomsen-Friedenreich抗原、およびトランスグルタミナーゼにより作られるイソペプチド結合などのタンパク質の修飾体のうちの少なくとも1つである、請求項1に記載の組成物。

30

40

## 【請求項 9】

前記構造変化は、前記ヒドロキシアパタイトにより媒介される、請求項2に記載の組成物。

## 【請求項 10】

前記少なくとも1つの結合したカルシウム結合タンパク質および/またはそのフラグメントは、哺乳動物の生物学的試料中の二価カチオンの遊離カルシウムが媒介する、請求項1

50

に記載の組成物。

【請求項 1 1】

前記少なくとも 1 回の構造変化が、トランスグルタミナーゼによって開始される、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 1 2】

前記少なくとも 1 回の構造変化の結果、ネオエピトープの形成が生じる、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 1 3】

前記組成物が哺乳動物の宿主で感染体として振る舞う、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 1 4】

前記組成物が哺乳動物の宿主で感染体として振る舞い、該哺乳動物が少なくとも 1 つの構造変化したカルシウム結合タンパク質および / またはそのフラグメントに対する抗体を産生し、該抗体は標準的な免疫試験法を用いて測定できる、請求項 1 に記載の組成物。

10

【請求項 1 5】

哺乳動物に由来する生物学的試料内のリン酸カルシウムヒドロキシアパタイト粒子に結合したことに反応して少なくとも 1 回の構造変化を受けたカルシウム結合タンパク質に対する抗体を検出する方法であって、該方法は、( i ) C a B P - H A 複合体を提供するステップ、( i i ) 抗体 - 抗原複合体が形成される時間および条件下で、該哺乳動物の生物学的試料を該 C a B P - H A 複合体に接触させるステップ、次いで、( i i i ) 該抗体と該 C a B P - H A 複合体との間に複合体が形成されるかどうかを検出するステップ、を含む、方法。

20

【請求項 1 6】

前記 C a B P - H A 複合体抗原、またはその抗体結合フラグメントがヒト供給源に由来する、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記 C a B P - H A 複合体がウシ供給源に由来する、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記 C a B P - H A 複合体が哺乳動物供給源に由来する、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記抗体と前記 C a B P - H A 複合体との間に複合体が形成されるかどうかを検出することが、免疫測定法によって決定される、請求項 1 5 に記載の方法。

30

【請求項 2 0】

前記抗体と前記 C a B P - H A 複合体との間に複合体が形成されるかどうかを検出することが、E L I S A 法によって決定される、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記抗体と前記 C a B P - H A 複合体との間に複合体が形成されるかどうかを検出することが、化学発光測定法によって決定される、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記抗体と前記 C a B P - H A 複合体との間に複合体が形成されるかどうかを検出することが、免疫比濁分析によって決定される、請求項 1 5 に記載の方法。

40

【請求項 2 3】

前記抗体と前記 C a B P - H A 複合体との間に複合体が形成されるかどうかを検出することが、イムノビーズ法によって決定される、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記抗体と前記 C a B P - H A 複合体との間に複合体が形成されるかどうかを検出することが、可視バンドを形成する抗体 - 抗原複合体に基づくラテラルフローファーストアッセイによって決定される、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記生物学的試料が、血清または血漿、全血、細胞培養試料、脳脊髄液、尿、唾液、精液、羊水、および囊胞液のうちの少なくとも 1 つである、請求項 1 5 に記載の方法。

50

## 【請求項 26】

前記生物学的試料が尿である、請求項 15 に記載の方法。

## 【請求項 27】

前記生物学的試料が血清である、請求項 15 に記載の方法。

## 【請求項 28】

前記生体液が粘液および唾液のうちの少なくとも 1 つである、請求項 15 に記載の方法。

## 【請求項 29】

前記生物学的試料がヒトの患者から採取される、請求項 15 に記載の方法。

## 【請求項 30】

前記 CaBP - HA 複合体が固体表面に結合させることによって固定される、請求項 15 に記載の方法。

10

## 【請求項 31】

前記 CaBP - HA 複合体が、市販のヒドロキシアパタイトまたは標準的なプロトコルに従い合成したヒドロキシアパタイトを用いて調製され、その後、哺乳動物の血清に供され、該血清または精製タンパク質または精製タンパク質の混合物中で約 1 分から約 1 ヶ月の間インキュベートされ、ここで該ヒドロキシアパタイトが該血清に含有されるカルシウム結合タンパク質、または添加した精製タンパク質と結合して、該ヒドロキシアパタイトに結合して一次的および二次的に構造変化したカルシウム結合タンパク質のコレクションの形成を可能にする、請求項 15 に記載の方法。

## 【請求項 32】

前記 CaBP - HA 複合体が、前記 CaBP - HA バイオミネラル NB / CNP - CaBP - HA 複合体から構成される哺乳動物から回収した NB / CNP に由来する、請求項 15 に記載の方法。

20

## 【請求項 33】

少なくとも 1 つの架橋酵素が添加される、請求項 31 に記載の方法。

## 【請求項 34】

前記少なくとも 1 つの架橋酵素がトランスグルタミナーゼである、請求項 33 に記載の方法。

## 【請求項 35】

少なくとも 1 つの架橋酵素の添加の結果、ネオエピトープが形成される、請求項 33 に記載の方法。

30

## 【請求項 36】

少なくとも 1 つの架橋酵素を添加する請求項 32 に記載の方法。

## 【請求項 37】

前記少なくとも 1 つの架橋酵素がトランスグルタミナーゼである、請求項 36 に記載の方法。

## 【請求項 38】

少なくとも 1 つの架橋酵素の添加の結果、ネオエピトープの形成が生じる、請求項 36 に記載の方法。

## 【請求項 39】

前記精製タンパク質またはタンパク質混合物が、G1a 含有ドメインをもつタンパク質、第 I I 凝固因子、第 V I I 凝固因子、第 I X 凝固因子、第 X / X a 凝固因子、組織因子 - 凝固因子 V I I a 複合体、プロトロンビナーゼ複合体 (第 V 因子、第 X a 因子、第 I I 因子)、第 I I 因子のフラグメント、トロンピン、プロトロンピンフラグメント 1、マトリックスメトリックス G L A タンパク質およびオステオカルシン、オステオポンチン、オステオネクチン、タンパク質第 X I I I a 因子、フェチュイン A、カルモジュリン、組織トランスグルタミナーゼ I I、MMP - 9、MMP - 3、C D 4 2 b、N F - カップ B、C D 1 4、フェチュイン B、C D 4 0、ミエロペルオキシダーゼ、フィブロンネクチン、組織因子、ヒトの補体 5 b - 9、C R P、C D 6 1、カップ軽鎖、マクロファージ L 1 タンパク質、h s p 6 0、フィブリリン - 1、ベータ - 2 - ミクログロブリン、C D 1 8、ラミニン、抗

40

50

トリプシン、ノッチ - 1、BSA、LPS結合タンパク質(LBP)、PTX3、補体C5、フィブリン/フィブリノゲン、Dダイマー、第V因子、抗キモトリプシン、アネキシンV、ビトロネクチン、トロンピン、トロポニンT、ビメンチン、トロポミオシン、ヒト血清アルブミン、心筋トロポニンI、アポリポタンパク質A1、MHCクラスI、アミロイドPタンパク質、sCD40L、カリクレイン、ATIII、第VIIII因子、硫酸ヘパリン、第XI因子、c-jun、Fra-2、Fra-1、Jun B、P-c-Jun、トランスグルタミナーゼ3、アルファ-フェトプロテイン、前立腺特異抗原(PSA)、erbB2、VEGF、アルファ-シヌクレイン、並びにLPSおよびその成分の脂質Aなどの複合体と相互作用して結合する他の分子、Thomsen-Friedenreich抗原、およびトランスグルタミナーゼにより作られるイソペプチド結合などのタンパク質の修飾体のうちの少なくとも1つである、請求項31に記載の方法。

10

【請求項40】

前記精製タンパク質またはタンパク質混合物が哺乳動物のプロトロンピンまたはその少なくとも1つのフラグメントである、請求項31の方法。

【請求項41】

前記精製タンパク質またはタンパク質混合物がヒト供給源に由来する、請求項31に記載の方法。

【請求項42】

前記精製タンパク質またはタンパク質混合物がウシ供給源に由来する、請求項31に記載の方法。

20

【請求項43】

前記抗体と前記CaBP-HA複合体との間で複合体が形成されるかどうかの検出が、結合抗体に特異的な二次抗体とともに前記複合体をインキュベートするステップを含み、該二次抗体が、該二次抗体の抗体-固定した抗原複合体への結合を示すために使用されるレポーター分子に連結する、請求項15に記載の方法。

【請求項44】

前記二次抗体が、抗ヒト免疫グロブリンまたは特定の動物種に対する免疫グロブリン、またはその特定のサブグループのIgG、IgM、IgA、もしくはIgE、あるいはそれらの混合物を含み得る、請求項43に記載の方法。

【請求項45】

前記レポーター分子が、二次抗体の抗体-固定した抗原複合体への結合の検出を可能にする同定可能なシグナルを提供する、請求項43に記載の方法。

30

【請求項46】

前記抗体と前記CaBP-HA複合体との間で複合体が形成されるかどうかを検出することが、病的石灰化に関連する少なくとも1つの疾患の診断、予後、および評価で有用である、請求項15に記載の方法。

【請求項47】

前記疾患が、動脈硬化症、アテローム性動脈硬化症、冠動脈心疾患、冠動脈疾患、慢性心不全、弁石灰化、動脈瘤、石灰性大動脈狭窄症、一過性脳虚血、発作、末梢血管疾患、脈管血栓症、歯苔、歯周病(歯髓結石)、唾液腺結石、慢性疲労症候群などの慢性感染症候群、腎臓結石、膀胱結石、胆石、膵臓病、腸疾患(膵管結石、クローン病、潰瘍性大腸炎など)、肝臓病(肝硬変、肝嚢胞など)、睾丸微石症(testicular microlith)、慢性前立腺結石、前立腺石灰化、血液透析患者における石灰化、マラコプラキア、自己免疫疾患、狼瘡、エリテマトーデス、強皮症、皮膚筋炎、抗リン脂質症候群、結節性動脈炎、血小板減少症、溶血性貧血、脊髄炎、網状皮斑、舞蹈病、片頭痛、若年性皮膚筋炎、グレーヴズ病、甲状腺機能低下症、I型真性糖尿病、アディソン病、下垂体機能低下症、胎盤障害、胎児障害、腎多嚢胞病、糸球体症、目の疾患(角膜石灰化、白内障、黄斑変性および網膜脈管構造誘導性プロセス並びにその他網膜変性、網膜神経変性、網膜炎、虹彩炎など)、耳の疾患(耳硬化症、耳石退化並びに前庭器および内耳に由来する症状(めまいおよび耳鳴))、甲状舌嚢胞、甲状腺嚢胞、卵巣嚢胞、癌(髄膜腫、乳癌

40

50

、前立腺癌、甲状腺癌、漿液性卵巣腺癌など)、皮膚疾患(皮膚石灰沈着症、カルシフィラキシー、乾癬、湿疹、扁平紅色苔癬など)、慢性関節リウマチ、石灰沈着性腱炎、変形性関節症、線維筋痛症、骨棘、びまん性間質性骨格過骨症、頭蓋内石灰化(変性疾患の進行および認知症など)、貧血、赤血球内ナノ細菌感染、および脾石灰化を伴う赤血球関連の疾患、慢性閉塞性肺疾患、気管支結石、気管支の結石、神経障害、インプラントの石灰化および痂皮形成、混合性の石灰化したバイオフィルム、骨髄変性障害(多発性硬化症、ルー・ゲーリグ病、アルツハイマー病など)、パーキンソン病のうちの少なくとも1つである、請求項46に記載の方法。

【請求項48】

少なくとも1つのヒドロキシアパタイト(HA)、リポ多糖類結合タンパク質(LPSB P)、および少なくとも1つのカルシウム結合タンパク質(CaBP)を含む組成物であって、該少なくとも1つのヒドロキシアパタイト(HA)、リポ多糖類結合タンパク質(LPSB P)、および少なくとも1つのカルシウム結合タンパク質(CaBP)が、HA-LPSB P-CaBP複合体を含む、組成物。

10

【請求項49】

前記少なくとも1つのリポ多糖類結合タンパク質と前記少なくとも1つのカルシウム結合タンパク質とが、少なくとも1回の構造変化を受ける、請求項48に記載の組成物。

【請求項50】

前記構造変化が一次的な構造変化および二次的な構造変化のうちの少なくとも1つである、請求項49に記載の組成物。

20

【請求項51】

前記構造変化が一次的な構造変化である、請求項49に記載の組成物。

【請求項52】

前記構造変化が二次的な構造変化である、請求項49に記載の組成物。

【請求項53】

前記組成物が哺乳動物の宿主で内毒素として振舞う、請求項48に記載の組成物。

【請求項54】

前記組成物に対する抗体が、免疫測定法によって検出され得る、請求項48に記載の組成物。

【請求項55】

少なくとも1つのヒドロキシアパタイトと少なくとも1つの結合したカルシウム結合タンパク質とを含む組成物を使用して、哺乳動物の抗CaBP-HA抗体を検出するプロセスであって、

30

a. 少なくとも1つのヒドロキシアパタイトを調製するステップと、

b. 少なくとも1つのヒドロキシアパタイトを哺乳動物の血清に供するステップと、

c. 該少なくとも1つのヒドロキシアパタイトと血清とを、血清または精製タンパク質または精製タンパク質の混合物中で約1分から約1ヶ月間インキュベートさせるステップと、

d. 該少なくとも1つのヒドロキシアパタイトを、該血清または精製タンパク質または精製タンパク質の混合物に含有されるカルシウム結合タンパク質と結合させるステップと

40

e. 該ヒドロキシアパタイトに結合し一次および二次的に構造変化したカルシウム結合タンパク質のコレクションの形成を可能にするステップと、を含む、プロセス。

【請求項56】

生物学的試料中の抗CaBP-HA抗体を検出するための酵素免疫吸着測定法(ELISA)用のキットであって、該キットは、

(a) クリアなCaBP-HA抗原でコーティングした固体支持体と、

(b) 哺乳動物に由来する生物学的試料と、

(c) 抗CaBP-HA抗体と反応性のレポーター分子に連結される二次抗体と、

50

(d) 比色剤と、

(e) 標準と、

を含む、キット。

【請求項 57】

試料中の抗 C a B P - H A 抗体を同定する方法であって、

(a) 単離した抗原および二次抗体と、試薬と、試験試料中の抗体結合反応を検出するための装置とを含む抗 C a B P - H A 抗体を同定するためのキットを提供し、該単離した抗体と該試料とを混合するステップと、

(b) 該試料に抗体結合反応があるかどうかを検出して、抗 C a B P - H A 抗体の存在を確かめるステップと、

を含む、方法。

【請求項 58】

さらに、前記試薬にカルシウムキレート剤を添加するステップを含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 59】

前記 C a B P - H A 複合体が、動脈硬化症、アテローム性動脈硬化症、冠動脈心疾患、冠動脈疾患、慢性心不全、弁石灰化、動脈瘤、石灰性大動脈狭窄症、一過性脳虚血、発作、末梢血管疾患、脈管血栓症、歯苔、歯周病（歯髓結石）、唾液腺結石、慢性疲労症候群などの慢性感染症候群、腎臓結石、膀胱結石、胆石、膵臓病、腸疾患（膵管結石、クローン病、潰瘍性大腸炎など）、肝臓病（肝硬変、肝嚢胞など）、睾丸微石症、慢性前立腺結石、前立腺石灰化、血液透析患者における石灰化、マラコプラキア、自己免疫疾患、狼瘡、エリテマトーデス、強皮症、皮膚筋炎、抗リン脂質症候群、結節性動脈炎、血小板減少症、溶血性貧血、脊髄炎、網状皮斑、舞蹈病、片頭痛、若年性皮膚筋炎、グレーブズ病、甲状腺機能低下症、I 型真性糖尿病、アディソン病、下垂体機能低下症、胎盤障害、胎児障害、腎多嚢胞病、糸球体症、目の疾患（角膜石灰化、白内障、黄斑変性および網膜脈管構造誘導性プロセス並びにその他網膜変性、網膜神経変性、網膜炎、虹彩炎など）、耳の疾患（耳硬化症、耳石退化並びに前庭器および内耳に由来する症状（めまいおよび耳鳴））、甲状舌嚢胞、甲状腺嚢胞、卵巣嚢胞、癌（髄膜腫、乳癌、前立腺癌、甲状腺癌、漿液性卵巣腺癌など）、皮膚疾患（皮膚石灰沈着症、カルシフィラキシー、乾癬、湿疹、扁平紅色苔癬など）、慢性関節リウマチ、石灰沈着性腱炎、変形性関節症、線維筋痛症、骨棘、びまん性間質性骨格過骨症、頭蓋内石灰化（変性疾患の進行および認知症など）、貧血、赤血球内ナノ細菌感染および脾石灰化を伴う赤血球関連の疾患、慢性閉塞性肺疾患、気管支結石、気管支の結石、神経障害、インプラントの石灰化および痂皮形成、混合性の石灰化したバイオフィルム、骨髄変性障害（多発性硬化症、ルー・ゲーリグ病、アルツハイマー病など）、ならびにパーキンソン病のうちの 1 つまたはそれ以上と関連する、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 60】

前記抗 C a B P - H A 複合体抗体の存在が、石灰化関連の疾患に関連する、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 61】

前記抗 C a B P - H A 複合体抗体の存在が、冠動脈石灰化のレベルに関連する、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 62】

前記抗 C a B P - H A 複合体抗体の存在が、将来の心臓の事象について最もリスクが高い患者を同定する、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 63】

前記抗 C a B P - H A 複合体抗体の存在が、冠動脈石灰化のリスクがある患者を同定する、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 64】

前記抗 C a B P - H A 抗体の存在が、冠動脈疾患のリスクがある患者を同定する、請求項

10

20

30

40

50

28に記載の方法。

【請求項65】

前記抗CaBP-HA複合体抗体の存在が、動脈硬化症、アテローム性動脈硬化症、冠動脈心疾患、冠動脈疾患、慢性心不全、弁石灰化、動脈瘤、石灰性大動脈狭窄症、一過性脳虚血、発作、末梢血管疾患、脈管血栓症、歯苔、歯周病（歯髓結石）、唾液腺結石、慢性疲労症候群などの慢性感染症候群、腎臓結石、膀胱結石、胆石、膵臓病、腸疾患（膵管結石、クローン病、潰瘍性大腸炎など）、肝臓病（肝硬変、肝嚢胞など）、睾丸微石症、慢性前立腺結石、前立腺石灰化、血液透析患者における石灰化、マラコプラキア、自己免疫疾患、エリテマトーデス、狼瘡、強皮症、皮膚筋炎、抗リン脂質症候群、結節性動脈炎、血小板減少症、溶血性貧血、脊髄炎、網状皮斑、舞蹈病、片頭痛、若年性皮膚筋炎、グレーヴズ病、甲状腺機能低下症、I型真性糖尿病、アディソン病、下垂体機能低下症、胎盤障害、胎児障害、腎多嚢胞病、糸球体症、目の疾患（角膜石灰化、白内障、黄斑変性および網膜脈管構造誘導性プロセス並びにその他網膜変性、網膜神経変性、網膜炎、虹彩炎など）、耳の疾患（耳硬化症、耳石退化並びに前庭器および内耳に由来する症状（めまいおよび耳鳴））、甲状舌嚢胞、甲状腺嚢胞、卵巣嚢胞、癌（髄膜腫、乳癌、前立腺癌、甲状腺癌、漿液性卵巣腺癌など）、皮膚疾患（皮膚石灰沈着症、カルシフィラキシー、乾癬、湿疹、扁平紅色苔癬など）、慢性関節リウマチ、石灰沈着性腱炎、変形性関節症、線維筋痛症、骨棘、びまん性間質性骨格過骨症、頭蓋内石灰化（変性疾患の進行および認知症など）、貧血、赤血球内ナノ細菌感染、および脾石灰化を伴う赤血球関連の疾患、慢性閉塞性肺疾患、気管支結石、気管支の結石、神経障害、インプラントの石灰化および痂皮形成、混合性の石灰化したバイオフィルム、骨髄変性障害（多発性硬化症、ルー・ゲーリグ病、アルツハイマー病など）、ならびにパーキンソン病のうちの1つまたはそれ以上のリスクがある患者を同定する、請求項28に記載の方法。

10

20

【請求項66】

ヒドロキシアパタイトと、リポ多糖類結合タンパク質と、CaBPと（「HA-LPSBP-CaBP」）を含む内毒素含有粒子の形成により哺乳動物の宿主で感染体として振舞う、粒子。

【請求項67】

前記粒子の抗HA-LPSBP-CaBP抗体の検出が免疫測定法による、請求項35に記載の粒子。

30

【請求項68】

抗血清抗体または抗プロトロンビン抗体を検出するために、ヒドロキシアパタイトをヒトまたはウシの血清あるいは精製プロトロンビンもしくはそのフラグメントとともにインキュベートすることによって、CaBP-HA複合体を生成する方法。

【請求項69】

ヒドロキシアパタイトと会合する血清または精製タンパク質における共有的に修飾したネオエピトープの検出。

【請求項70】

レシピエントにとって潜在的に有害となりうるCaBP-HA複合体に対する抗体の存在についての、血液および組織ドナーのスクリーニング。

40

【請求項71】

診断および治療目的のためにドナーのプールおよび抗体の精製のための、抗CaBP-HA抗体の検出。

【請求項72】

血液試料をCaBP-HA複合体の表面に曝露すること、およびその抗体またはT細胞レセプタが該複合体を特異的に認識することに起因して表面に結合した細胞を単離することによる、CaBP-HA複合体を認識するBリンパ球およびTリンパ球の富化。

【請求項73】

適した表面に固定した前記複合体に結合させることによる、請求項43の細胞の除去。

【請求項74】

50

ブロッキングおよび治療上の免疫応答を引き起こすための、C a B P - H A 複合体によるヒトまたは動物の免疫化または免疫調節。

【請求項 7 5】

抗 C a B P - H A 複合体抗体を使用して、感染性 C a B P - H A 複合体に曝露されたヒトまたは動物の受動的保護。

【請求項 7 6】

C a B P - H A 複合体の非感染性の形態を使用する、感染性 C N P に対するワクチン接種。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2004年11月8日に提出された米国仮特許出願第60/625,572号の出願日の利益を主張する。

【0002】

発明の分野

本発明は、一般的に哺乳動物においてカルシウムを介する構造変化を受けたタンパク質を標的とする抗体を迅速なインビトロの検出に供する方法およびキットに係る。より具体的には、本発明は、ヒドロキシアパタイトまたは鉱物カルシウム基質に結合する結果として構造変化したタンパク質に対する宿主抗体の検出方法を開示する。リン酸カルシウム鉱物の表面は、カルシウムと相互作用するタンパク質に非常に高い結合能と非常に高い結合親和性を提供する。リン酸カルシウム鉱物（アパタイト）は光を通すため、この基質は本発明の本文に記載する光学的定量デバイスと一緒に適用できる。これらタンパク質ヒドロキシアパタイトの調製液は固体支持体に固定してもよく、そうすることで診断および予後目的で実験室において、並びに哺乳動物の免疫応答を迅速に検出するキットを利用する方法においてテストキットで日常的に使える。

20

【背景技術】

【0003】

発明の背景

高分子の細胞外基質内における不連続に組織化した無機結晶構造の形成は、一般にバイオミネラリゼーションといわれる広範囲にわたる生物学的現象である。バイオミネラリゼーションの一例がリン酸カルシウムの形成である。組織内にリン酸カルシウムが沈着する場合、石灰化として知られる。哺乳動物の骨と歯のエナメル質が石灰化の例である。哺乳動物、特にヒトが罹患する周知の全疾患のうち50%以上が鉱物カルシウムの沈着が原因である、または鉱物カルシウムの沈着に関連する。リン酸カルシウムからなり、ヒドロキシアパタイトとも呼ばれる鉱物カルシウムは骨や歯を形成する健康な過程ではなく、疾患で見られる。病的石灰化は様々な疾患で見られる。病的石灰化の原因はまだ分かっていないが、研究者たちはこれら疾患の各々に共通のつながりを発見している。すなわち、ナノ細菌または石灰化ナノ粒子（NB/CNP）と呼ばれる極小の鉱物関連細菌様粒子の存在である。

30

40

【0004】

哺乳動物内にヒドロキシアパタイト表面の沈着をもたらす病的石灰化はカルシウム結合タンパク質（C a B P）を集める独特な基質を生成する。C a B P がリン酸カルシウムヒドロキシアパタイトに結合するのは当業者にはよく知られている。現在 Swiss - Prot タンパク質データベースには3千以上のC a B P とそのフラグメントが掲載されている。血液に曝露するヒドロキシアパタイトはプロトロンビン、C 反応性タンパク質、マトリックスメトリックスタンパク質などのカルシウム結合タンパク質と結合する。心臓血管医学における臨床実験から、曝露したヒドロキシアパタイト表面に血液が接触すると血栓を引き起こすことが示唆される。最近の冠動脈石灰化スコアデータはその実験を裏付けている。プラスのスコアは、心筋梗塞や発作などの将来のアテローム性動脈硬化症の血栓の事象を

50

予測する良好なバイオマーカーであるからである。多くの研究から、アテローム性動脈硬化症、腎臓病、自己免疫疾患、糖尿病、および癌などの石灰化関連疾患にかかっている患者は多くの場合継続的に異常な血液凝固および血栓症をおこしていることも分かっている。

#### 【0005】

リン酸カルシウムはそのタンパク質との多重相互作用のためにタンパク質の三次元構造において多くの場合構造変化を媒介できる。かかる構造上の形態は骨や一時的には細胞内で普通に見られ、代謝または生理的な経路および反応を制御する素早いスイッチとして様々な生体調節系で機能する。リン酸カルシウム鉱物は血液または軟組織では正常な構成要素ではなく、骨では骨内膜によって血液および免疫系への直接の曝露から守られる。リン酸カルシウム粒子が血液に曝露すると、免疫系は粒子の表面に安定化された新たなタンパク質構造を「予測」でき、それに反応する。これによって自己抗体の構成体が生成され、自己抗体は自己免疫疾患および新規なタンパク質構造を曝露し免疫学的に認識されるようになる他の疾患の病理学的プロセスを媒介することがよく知られている。自己免疫はアテローム性動脈硬化症でも認知されている。

10

#### 【0006】

4つの凝固因子（第ⅠⅠ因子、第ⅤⅠⅠ因子、第ⅠⅩ因子、第Ⅹ因子）はG1aドメインおよび他のカルシウム結合部位をもつカルシウム結合タンパク質である。例えば、G1aドメインは、石灰化防御系の一部として石灰化を調節することが知られるマトリックスG1aタンパク質、オステオポンチン、オステオカルシン、オステオネクチンからなる他のG1aタンパク質ファミリーと同様にヒドロキシアパタイト/リン酸カルシウムに活性結合する〔（非特許文献1）&非特許文献2〕。フィブリン、第ⅩⅠⅠⅠa因子、第ⅠⅠ因子のフラグメント、トロンピン、プロトロンピンフラグメントⅠはすべてCaBPの例である。

20

#### 【0007】

ヒドロキシアパタイト表面は哺乳動物の血液または血清においてCaBPの適切な基層および活性化剤として二重の機能を果たす。ヒドロキシアパタイトが血液と接触する状況が数多く存在するため、ヒトの（病態）生理学にとってのこのことの重要性は大きい。すなわち、1）骨折、骨の手術、および歯の手術中に急性に、2）コーティングしていないインプラント、詰め物、アパタイト補助薬の導入により人工的に、3）アテローム硬化性血管におけるリン酸カルシウム沈着物の成長により慢性的に、易破綻性プラークの破裂、細胞の死亡、病的石灰化の曝露（例、ランダル斑、アテローム硬化性プラーク、癌の石灰化）、および結石により破局的に、4）大量の骨の退化を受けた動物の血液におけるリン酸カルシウム/ヒドロキシアパタイト高分子複合体により血液から、および5）NB/CNPにより全身に。

30

#### 【0008】

ヒドロキシアパタイトに結合するCaBPは血液または血清中の遊離カルシウムの存在によって媒介される。遊離カルシウムは体内の鉱物カルシウムヒドロキシアパタイトとは異なる。遊離カルシウム原子は生理的pHで正味2の陽電荷をもつ。遊離カルシウムは約1mMのヒトの血液中の典型的な濃度で哺乳動物の体内で極めてよく維持される。遊離カルシウムのレベルの上昇は異常活性または疾患を示す。遊離カルシウムが存在すると、CaBPは利用できればリン酸カルシウム鉱物と結合し、それによって構造変化を起こす。そのため、構造変化したCaBPに対する哺乳動物の体内に存在する抗体の検出は、病的石灰化を伴う疾患の診断および予後または病理において便利であろう。

40

#### 【0009】

カルシウムに結合したときのCaBPの構造変化は十分に記録され、当業者には周知である。述べられるようにカルシウムイオンはCaBPの結合特性に直接影響する。様々な親和性をもつCaBPのカルシウム結合により、カルシウムイオンは構造変化をもたらし、その標的タンパク質を安定させ、CaBPをタンパク質分解から守り、ドメインの相互作用を調節することによってカルシウム依存機能を媒介する。例えば細胞内EFハンドカ

50

ルシウム結合タンパク質であるカルモジュリンはカルシウム依存の構造変化により100以上のタンパク質を調節する。構造トポロジーがCD2に似た細胞外非EFハンドカルシウム結合タンパク質であるカドヘリンは、組織の発達および維持を制御する上で重要な役割を果たす。(Jenny J Yang Laboratory)。

【0010】

スクリプス研究所、分子生物学部門のM. R. NelsonおよびW. J. Chazinは「Ca(2+)センサータンパク質におけるカルシウム誘発構造変化の相互作用に基づく分析(A n i n t e r a c t i o n - b a s e d a n a l y s i s o f c a l c i u m - i n d u c e d c o n f o r m a t i o n a l c h a n g e s i n C a ( 2 + ) s e n s o r p r o t e i n s ) 」という題で、代表的なカルシウムセンサーカルモジュリン(CaM)およびトロポニンにおけるカルシウム結合誘発の構造変化の詳細な分析を発表し、そこでこれらタンパク質におけるカルシウム誘発の構造変化は各ドメイン内の4つのヘリックスのpackingの再構築により支配されること、閉鎖構造と開放構造との比較からカルシウム結合がEFハンドの各々内の開放を引き起こすことを確認したと述べている。Aalim M. Weljie他の「拡散NMR分光法で研究したタンパク質の構造変化:ヘリックス-ループ-ヘリックス型カルシウム結合タンパク質への適用(P r o t e i n c o n f o r m a t i o n a l c h a n g e s s t u d i e d b y d i f f u s i o n N M R s p e c t r o s c o p y : A p p l i c a t i o n t o h e l i x - l o o p - h e l i x c a l c i u m b i n d i n g p r o t e i n s ) 」はいくつかのヘリックス-ループ-ヘリックス型調節性Ca<sup>2+</sup>結合タンパク質で実施したパルス磁場勾配(PFG)拡散NMR分光法の研究を利用して、Ca<sup>2+</sup>飽和および/または結合する標的に関連付けて構造変化を特徴付けた。

【非特許文献1】R. W. Romberg, P. G. Werness, B. L. Riggs, K. G. Mann, Biochemistry 25, 1176 (1986)

【非特許文献2】G. E. Donley, L. A. Fitzpatrick, Trends Cardiovasc. Med. 8, 199 (1998)

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0011】

発明の概要

カルシウム結合タンパク質が構造変化を受けている、ヒドロキシアパタイト基質に結合することによって複合体を形成するカルシウム結合タンパク質(CaBP)に対する抗体の有意性を検出および評価する方法および組成物を開示する。開示される方法および組成物は一般的に結合および構造変化したカルシウム結合タンパク質(抗原)またはCaBP-HA複合体(以下、CaBP-HA複合体という)を含有するヒドロキシアパタイト基質の製造に関わる。

【0012】

本発明の開示される方法および組成物は、ヒドロキシアパタイト基質によるタンパク質の結合中に発生する一次および二次変化の測定に利用できる技術を記述する。一次変化はCaBPまたはそのフラグメントがリン酸カルシウムと最初に相互作用するとき、例えば、生理的变化をするときにおこる。二次変化は、Ca結合およびCa活性タンパク質である酵素、トランスグルタミナーゼを含むがそれだけに限定されないCa結合および/またはCa活性酵素である他のタンパク質または酵素により生じる架橋タイプの変化である。二次変化は、例えば、架橋したCaBP-HA複合体の形成に十分に長い時間での培養など適切な条件で起こすことができ、前記二次変化は一次結合中に生成されたタンパク質複合体にネオエピトープを生成する。この過程はトランスグルタミナーゼがNB/CNPで架橋を開始するナノ細菌/石灰化ナノ粒子(NB/CNP)培養株の調製でおこる。参照によりこれに組み込む本発明の譲受人に譲渡された米国特許第5,135,851号はNB/CNPの培養株の方法を記述している。

【0013】

C a B P タンパク質はヒドロキシアパタイト基質に結合してC a B P - H A 複合体を形成し、前記C a B P は、これらタンパク質を抗原性に見せることによって哺乳動物の体内で免疫応答を開始する特異的な構造変化を受ける。この鉱物/タンパク質複合体の形成と宿主哺乳動物によるC a B P - H A に対して生成された抗体が、前記抗体を、そのため疾患もしくは健康状態のリスクまたは疾患もしくは健康状態の傾向を検出、分析、および評価する手段を提供する。

【0014】

抗C a B P - H A 複合体抗体の検出は、疾患のリスクを判断するとともに患者の「治癒」状態を判断する独特かつ新規な診断および予後ツールを提供する。例えば、K a j a n d e r 他が実施した研究では、13人の患者に400mgのエチドロネートと500mgのテトラサイクリンを1週間毎日投与し、その後3ヶ月間投与量を半分にして抗C N P 療法で治療した。3ヶ月間の療法の間と療法終了後の3ヶ月間、抗C a B P - H A 複合体に対する抗体を血清E L I S A 法を用いて測定した。12人の患者の血清抗体レベルが低下し、平均で4.15倍低下した。1人の患者の抗体レベルは6ヶ月の間同じままであった。その患者は指示に反してカルシウムサプリメント（すなわち、C a l c i p o s ）を摂取していた。結果によると、抗体レベルは療法終了後の3ヶ月間変化しなかった。胃のヘリコクターピロリ菌感染により生じる消化性潰瘍などの慢性感染において、抗ヘリコクターピロリ菌I g G 力価の低下を観察することによって、根絶を測定および検証する。力価の25%の低下を前記病原体をうまく根絶した確実な指標と考える。そのため、この類推に基づくと、抗C a B P - H A 複合体抗体の定量化はN B / C N P およびそれにより引き起こされる数多くの疾患を治癒する療法の便利な指標となれる。

【0015】

数多くの疾患で病的石灰化、または有害なヒドロキシアパタイトの沈着が見られる。これだけには限定されないが次のような疾患がある。動脈硬化症、アテローム性動脈硬化症、冠動脈心疾患、冠動脈疾患、慢性心不全、弁石灰化、動脈瘤、石灰性大動脈狭窄症、一過性脳虚血、発作、末梢血管疾患、脈管血栓症、歯苔、歯周病（歯髓結石）、唾液腺結石、慢性疲労症候群などの慢性感染症候群、腎臓結石、膀胱結石、胆石、膵臓病、腸疾患（膵管結石、クローン病、潰瘍性大腸炎など）、肝臓病（肝硬変、肝嚢胞など）、睾丸微石症、慢性前立腺結石、前立腺石灰化、血液透析患者における石灰化、マラコプラキア、自己免疫疾患、紅斑性狼瘡、強皮症、皮膚筋炎、抗リン脂質症候群、結節性動脈炎、血小板減少症、溶血性貧血、脊髄炎、網状皮斑、舞蹈病、片頭痛、若年性皮膚筋炎、グレーブズ病、甲状腺機能低下症、I型真性糖尿病、アディソン病、下垂体機能低下症、胎盤障害、胎児障害、腎多嚢胞病、糸球体症、目の疾患（角膜石灰化、白内障、黄斑変性および網膜脈管構造誘導性プロセス並びにその他網膜変性、網膜神経変性、網膜炎、虹彩炎など）、耳の疾患（耳硬化症、耳石退化並びに前庭器および内耳に由来する症状（めまいおよび耳鳴））、甲状舌嚢胞、甲状腺嚢胞、卵巣嚢胞、癌（髄膜腫、乳癌、前立腺癌、甲状腺癌、漿液性卵巣腺癌など）、皮膚疾患（皮膚石灰沈着症、カルシフィラキシー、乾癬、湿疹、扁平紅色苔癬など）、慢性関節リウマチ、石灰沈着性腱炎、変形性関節症、線維筋痛症、骨棘、びまん性間質性骨格過骨症、頭蓋内石灰化（変性疾患の進行および認知症など）、貧血、赤血球内ナノ細菌感染、および脾石灰化を伴う赤血球関連の疾患、慢性閉塞性肺疾患、気管支結石（b r o n c h o l i t h s ）、気管支の結石（b r o n c h i a l s t o n e ）、神経障害、インプラントの石灰化および痂皮形成、混合性の石灰化したバイオフィルム（m i x e d c a l c i f i e d b i o f i l m ）、骨髄変性障害（多発性硬化症、ルー・ゲーリグ病、アルツハイマー病など）、パーキンソン病。

【0016】

開示される方法は、構造変化を受けたC a B P - H A 複合体タンパク質に対する1つまたはそれ以上の抗体の検出に関わることができる。本発明の方法において、抗体は動物の血清または血漿、哺乳動物の細胞培養標本、脳脊髄液、尿、唾液、精液、羊水、および嚢胞液で検出される。好適な実施形態では、抗体は哺乳動物の血液、血清、または尿で試験する。

10

20

30

40

50

## 【0017】

従って、血液、血清、または尿を希釈せずに、もしくは適切な希釈液（蒸留水など）で希釈して測定できるが、感度が高まるため希釈が好ましい（特に回収装置を使用する場合）。

## 【0018】

CaBP-HA複合体の調製液は便宜的にかつなるべくなら固体支持体に結合する。適する固体支持体はニトロセルロース膜、ガラス、またはポリマーを含む。多数の基質へのヒドロキシアパタイトコーティングおよびその沈着は当業者にはよく知られている。使用に望ましいポリマーはセルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、またはポリプロピレンを含むが、これだけに限定されない。固体支持体は細片、管、ビード、円板、またはマイクロプレートの形態、あるいは免疫測定法を実施するのに適したあらゆる他の表面でよい。

10

## 【0019】

抗原は様々な経路から生産できる。これだけには限定されないが、1) 0.020から200 μmの厚さの合成ヒドロキシアパタイトを使用し、適切なCaBPと結合することによってCaBP-HA複合体を形成するために適切な条件下で適した期間哺乳動物の血液または血清もしくは精製タンパク質に供する、または2) 哺乳動物由来のNB/CNPを使用し、前記バイオミネラルのNB/CNPはCaBP-HA複合体から構成される。

## 【0020】

CaBP-HA複合体タンパク質に対する抗体は、構造変化したCaBPタンパク質および他の分子とのその複合体に対する抗体である。以下に多くのCaBPの代表的なものを列挙するが、本発明の範囲を制限するつもりはない。CaBP-HA複合体の構造変化したタンパク質は、これだけに限定されないが、次のものを含む。G1a含有ドメインをもつタンパク質、第II凝固因子、第VII凝固因子、第IX凝固因子、第X/Xa凝固因子、組織因子-凝固因子VIIa複合体、プロトロンビナーゼ複合体（第V因子、第Xa因子、第II因子）、第II因子のフラグメント、トロンピン、プロトロンピンフラグメント1、マトリックスGLAタンパク質およびオステオカルシン、オステオポンチン、オステオネクチン、タンパク質第XIIIa因子、フェチュインA、カルモジュリン、組織トランスグルタミナーゼII、MMP-9、MMP-3、CD42b、NF-カッパB、CD14、フェチュインB、CD40、ミエロペルオキシダーゼ、フィブロネクチン、組織因子、ヒトの補体5b-9、CRP、CD61、カッパ軽鎖、マクロファージL1タンパク質、hsp60、フィブリリン-1、ベータ-2-ミクログロブリン、CD18、ラミニン、抗トリプシン、ノッチ-1、BSA、LPS結合タンパク質(LBP)、PTX3、補体C5、フィブリノ/フィブリノゲン、Dダイマー、第V因子、抗キモトリプシン、アネキシンV、ピトロネクチン、トロンピン、トロポニンT、ビメンチン、トロポミオシン、ヒト血清アルブミン、心筋トロポニンI、アポリポタンパク質A1、MHCクラスI、アミロイドPタンパク質、sCD40L、カリクレイン、ATIII、第VIIII因子、硫酸ヘパリン、第XI因子、c-jun、Fra-2、Fra-1、JunB、P-c-Jun、トランスグルタミナーゼ3、アルファ-フェトプロテイン、前立腺特異抗原(PSA)、erbB2、VEGF、アルファ-シヌクレイン、並びにLPSおよびその成分の脂質Aなどの複合体と相互作用して結合する他の分子、Thomsen-Friedenreich抗原、トランスグルタミナーゼにより作られるイソペプチド結合などのタンパク質の修飾体。

20

30

40

## 【0021】

本発明により、哺乳動物の抗体と二次抗体の間で複合体の形成を検出して健康リスクを診断する。抗体は血液、血清、または尿の標本中の抗ヒトまたは抗特異的動物種のIgG、IgM、IgA、IgE抗体（またはその混合物）および抗CaBP-HA抗体を含むことができる。そのためある形態の検出手段は抗体-抗原複合体の存在（または必要なら、その量）を同定する必要がある。

## 【0022】

50

検出手段はレポーター分子とコンジュゲートした二次抗体にでき、これは哺乳動物の体液に見られる少なくとも1つのCaBP-HA抗体に特異的なものである。「レポーター分子」とは、その化学的な性質により、分析により同定可能な特性をもつ、もしくは抗原に結合する抗体の検出を可能にする分析により同定可能なシグナルを提供する分子または群である。検出は定性的または定量的のいずれでもよい。この種の測定法で最も一般的に使用されるレポーター分子は、酵素、蛍光物質または放射性核種含有分子（すなわち、ラジオアイソトープ）のいずれかである。酵素免疫測定法の場合、酵素は、一般的にグルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸塩によって、二次抗体にコンジュゲートする。ただし、容易に分かるように、多様なコンジュゲート技術が存在し、当業者には容易に利用できる。一般に使用される酵素には、特にホースラディッシュペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、およびアルカリホスファターゼが含まれる。特異的酵素とともに使われる基質は一般的に、対応する酵素による加水分解の際、検出可能な色の変化を生じさせるために選ばれる。基質は選ぶ用途により可溶性または不溶性にできる。例えば、アルカリホスファターゼコンジュゲートでの使用には、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸/ニトロブルーテトラゾリウムが適する。ペルオキシダーゼコンジュゲートには、1,2-フェニレンジアミン-5-アミノサリチル酸、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、トリジン、またはジアニシジンが一般に使われる。前述した発色基質ではなく、蛍光生成物を生む蛍光基質を採用することも可能である。蛍光基質の例は、3-p-ヒドロキシフェニルプロピオン酸(HPPA)およびジヒドロテトラメチロースアミンであり、蛍光標識の例はフルオレセインおよびローダミンである。ある波長の光で照射することによって活性すると、蛍光色素標識のついた抗体は分子の興奮性の状態を誘導しながら光エネルギーを吸収し、その後通常光学顕微鏡で目視によって検出可能な特徴的な色の光を放出する。免疫蛍光検査法およびEIA技術はともに当分野で十分に定着しており、本方法に特に好ましい。ただし、ラジオアイソトープ、化学発光、生物発光分子および/または染料、および他の発色物質など、他のレポーター分子も採用できる。

10

20

30

40

50

#### 【0023】

抗CaBP-HA抗体の検出および測定は疾患の診断に役立てられる。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0024】

好適な実施形態の詳細な説明

開示される方法および組成物は、以下の特定の実施形態とそれに含まれる例の詳細な説明並びに図面およびその以上および以下の説明を参照することによりよく理解できる。

#### 【0025】

CaBP-HA複合体の存在を検出、分析、並びに評価する方法および組成物を開示する。開示される方法および組成物は一般的に哺乳動物の生体液に存在するCaBP-HA複合体の1つまたはそれ以上の抗体の検出に関わる。

#### 【0026】

本発明の一実施形態による免疫測定試験キットは、二次抗体の調製を含めいくつかの成分を組み入れ、抗ヒトまたは抗特異的動物種のIgG、IgM、IgA、IgEもしくはその混合物、二次抗体とプローブのコンジュゲート、抗原の調製、抗原をコーティングしたマイクロタイプレートまたは縦型テストストリップの調製、試薬の調製、および免疫測定を含むことができる。本発明の実施に便利な免疫測定法は、ウエスタンブロット、放射性同位元素標識免疫測定法、ELISA（酵素免疫吸着測定法）、「サンドイッチ」免疫測定法、免疫沈降測定法、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散測定法、凝集反応測定法、補体結合測定法、イムノラジオメトリックアッセイ、蛍光免疫測定法、タンパク質A免疫測定法、量子ドット測定法、電気化学発光などの技術または当業者に周知の他の技術を用いた系の測定を含むが、これだけに限定されない。そのため、例として、本発明をELISAに関連して説明していく。ただし、以下の実施形態は本発明の組成物を組み込む免疫測定法に関係するが、特定の種類の免疫測定法に限定されるものでないことは理

解されるべきである。

【0027】

従って、抗ヒトまたは抗特異的動物種のIgG、IgM、IgA、IgEもしくはその混合物を含むことのできる二次抗体の調製は、当業者によく知られるあらゆる方法で行うことができる。

【0028】

抗CaBP-HA複合体抗体を認識する抗ヒトまたは抗特異的動物種のIgG、IgM、IgA、もしくはIgE抗体は抗CaBP-HA複合体抗体と結合できる。これらは抗CaBP-HA複合体抗体を固定する、もしくは除去、測定、および精製のために生物学的試料から抗CaBP-HA複合体抗体を取り出すのに利用できる。抗CaBP-HA抗体の免疫測定法を構成するのに抗体は多数の方法で使用できる。また、抗体は細胞培養株もしくは動物またはヒトから抗CaBP-HA抗体を除去するときにも使える。さらに、細胞培養株、動物、またはヒト由来の生成物の精製に抗体を使用できる。これらには、血液、血清、およびその生成物、または細胞および器官、あるいは細胞を含むインビトロで培養した生成物が含まれるであろう。

10

【0029】

注目すべきことに、CaBP-HA複合体とそこで構造変化したタンパク質の存在は細胞内および細胞外石灰化および石灰化関連の疾患の病因に關与してきたため、抗ヒトまたは抗特異的動物種のIgG、IgM、IgA、もしくはIgE抗体を使用して、検体内の抗CaBP-HA複合体抗体の存在、実際には抗NB/CNP抗体の存在を検出および定量化できる。この検出および定量化は、翻って、抗CaBP-HA複合体抗体レベルを細胞内および細胞外の石灰化のレベルと関連付けることにより診断および予後の目的に、あるいは治療または療法に対する反応をモニタリングするために使用できる。

20

【0030】

抗ヒトまたは抗特異的動物種のIgG、IgM、IgA、もしくはIgE抗体の調整後、次のステップは抗体とプローブのコンジュゲートに関わる。本発明の一実施形態では、まずpH9.0の約0.01Mの炭酸ナトリウム緩衝液で抗体溶液を一晩透析してこれを行うことができる。次に、当業界に周知の実務に従い、酵素標識プローブを調製すべきである。プローブを調製する一実施形態は、まず個別容器で、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)とNaIO<sub>4</sub>の溶液を混合するステップを必要とする。例えば、一方の容器で、約1mLの水に約2mgから10mgのHRPを加える。別の容器で、約1mLの水に約21.4mgのNaIO<sub>4</sub>を加える。さらに、ピペットで約100マイクロリットルのNaIO<sub>4</sub>をHRP混合物に移すことによって、NaIO<sub>4</sub>溶液とHRP溶液を化合させることができる。この混合物をさらに室温で約10分間放置すると、その間に色が深緑色に変わる。その間、抗体コンジュゲートプローブを調製する本実施形態に従い、プローブをpH4.0の5mMの酢酸ナトリウム緩衝液に対して一晩透析する。翌日、活性化したHRPを含有する酢酸ナトリウム緩衝液にpH9.5の約0.2Mの炭酸ナトリウム緩衝液を添加する。この緩衝液をさらに抗体溶液と混合して、得られた抗体-緩衝液混合物を2回培養する。抗体-緩衝液の混合物の初回の培養は室温で約2時間行う。この2時間の終わりに、0.1MのNaBH<sub>4</sub>水溶液を約100マイクロリットル添加した後、2回目の培養を行い、2回目の培養で得られた混合物を4 でさらに2時間培養する。最後に、得られた混合物を透析チューブに入れて、PBSに対して一晩透析する。

30

40

【0031】

別の実施形態では、約5mg/mLのモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体の溶液をpH6.8の0.1Mのリン酸塩緩衝液(PBS)に入れて、約4 で一晩透析する。さらに、透析した約0.5mgのモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を、約10mLの10mM PBS中の約1.5mgのアルカリホスファターゼ(免疫測定法グレード、Boehringer Mannheim、インディアナ州インディアナポリス)に添加する。混合物を調製したら、80マイクロリットルの25%グルタルアルデヒドを添加して、溶液を静かに混合して化合させる。得られた溶液をさらに室温で約2時間

50

放置する。2時間後、PBSLE(100mMのリシンと100mMのエタノールアミンを含有する10mMのPBS)をほぼ等価容量(10mL)で添加することによって反応を停止する。次にこの溶液を脱塩しなければならない。本実施形態によると、溶液はPBSN(10mMのPBSに0.05MのNaN<sub>3</sub>を添加)に入れたセファデックスG25カラムで脱塩する。アルカリホスファターゼ-抗体コンジュゲートを脱塩した後、20mLのコンジュゲートを40mLのプロッキング用緩衝液(2.5mMのMgCl<sub>2</sub>、0.05%Tween20、1mMのEDTA、0.25%BSA、0.05%NaN<sub>3</sub>を含有する0.17Mのホウ酸塩緩衝液)と混合する。最後に、滅菌のために60mLのコンジュゲートを低タンパク質結合フィルター、Milliplex HV 0.45マイクロ-m(Millipore Corp.、マサチューセッツ州ベッドフォード)で濾過する。濾過して滅菌してしまえば、コンジュゲートは4で保管できる。

10

#### 【0032】

別の実施形態では、当業者の周知のように、プローブの基質として機能させるためにパサデナのMOSS社が製造した基質溶液を利用してもよい。

#### 【0033】

次のプロセスは、免疫測定法用の抗原の調製に関わる。抗原の調製には2種類の方法及び開始組成物がある。1)哺乳動物の体内から回収して超音波処理したナノ細菌/石灰化ナノ粒子の使用、または2)市販または合成のリン酸カルシウム鉱物ヒドロキシアパタイトを哺乳動物の血液または血清あるいは精製タンパク質またはタンパク質の混合物に、一次結合および、望む場合、前記血液または血清、もしくはトランスグルタミナーゼまたは他の適した酵素を添加した溶液に含有されるCaBPの二次的な構造変化ができるのに十分な時間供する。

20

#### 【0034】

組織培養株と同様な条件下でNB/CNPを培養する抗原培養法。本発明の実施において標準的なあらゆる組織培地が役立つ。細胞または組織培地は一般的に哺乳動物の細胞の培養に使われる。培養中、NB/CNPはその繁殖、凝集、バイオフィルムの分泌および/またはそのアパタイト細胞外皮の肥厚化のため光学顕微鏡法で見えるようになる。対照として比較のために生育不能なまたは「死んだ」NB/CNPを提供することによってその検出を助ける。また、一般細菌よりはるかに少ないが、培養株で汚染物質になりうる、粒子が染色可能な核酸を含むか確認するヘキスト染色法を変更したものが開発されている。この方法は本発明の譲受人に譲渡された、参照によりこれに組み込む米国特許第5,135,851号に開示される。

30

#### 【0035】

本発明の一実施形態は、その成長の必要条件を満たすことによって、NB/CNPの複製に適した合成培地に関わる。液体培地はRPMI 1640またはDMEMとして知られる標準的な組織培地を含むことができる。この培地はGibco社(イギリス、ミドルセックス、アクスブリッジ)から入手できるアミノ酸、塩等の標準化された組成物である。

#### 【0036】

培地の組成物は基本的に滅菌水に溶かす。水が未同定物質の細胞毒性不純物を含有することがあるため、使用する水質は極めて重要である。水が汚染源とならないように注意しなければならない。例えば、水道水、脱イオン水、または注射用の滅菌水は、その滅菌を事前に点検していればすべて適切であろう。

40

#### 【0037】

本発明の抗原としてNB/CNPの使用を望む場合、培地も寒天培地またはアガロースを使用して凝固できる。ただし、ここでも寒天培地またはアガロースが細胞毒性の不純物を含有することがある。LまたはD,L-セレノメチオニンなどのヌクレオチド前駆体および栄養素を添加することによって、成長も任意に刺激する。このように培地はD,L-セレノメチオニン、アデノシン、チミジン、ウラシル、グアニン、シトシンから分離して調製した混合物(50~100倍濃縮)を補うことが好ましく、これら物質はすべてミズ

50

ーリ州セントルイスのSigma Chemical Co.から入手できる。例えば、100倍濃縮液は溶媒に溶かして、10mMのDL-セレノメチオニンと、アデノシン、チミジン、ウラシル、グアニン、およびシトシンの化合物をそれぞれ1mMずつ含有する。最終的な培地は、99mLの基本培地に1mLの100倍濃縮液を溶かして添加して準備する。基本培地と栄養素の準備には、脱イオン水または蒸留水を利用する。医薬品グレードの成分と生物滅菌装置を利用するときの標準的な手順に従う。

#### 【0038】

NB/CNP培養株を細胞スクレーパーで静かに掻き取る。培養を遠心分離管に移す。管を超遠心機で約15000gで45分間遠心分離する。ペレットを滅菌PBSで洗浄し、滅菌したエッペンドルフチューブに入れる。容量約50 $\mu$ Lのコロイド状のナノマテリアル-鈹物複合体を10mLのPBSで懸濁して、10秒間2回音波破碎する(10秒の間隔をあけて)。濁度の値を一定になるまで音波破碎を繰り返す。音波破碎の間、氷で冷却して温度を制御し、最高に達する温度は60とする。懸濁液はPBSで400mLまで希釈する。溶液の濁度の値は5NTUから20NTUまでが許容できる。コーティング溶液であるこの溶液をさらにELISA用マルチウェルプレートにピペットで100 $\mu$ L/ウェル移す。プレートを+2から+8の間で一晩振動させずに培養する。プレートをTBS-Tweenで1回洗浄する。次に、Tweenを含有するブロッキング用溶液をピペットで300 $\mu$ L/ウェル移してプレートをブロックする。さらにプレートを室温で2時間または+2から+8の間で一晩培養する(振動させない)。プレートを1回TBS-Tweenで洗浄し、適した防止剤( $\text{NaN}_3$ )を添加した保存液を150 $\mu$ L/ウェル添加して、ウェットプレートとして保管するプレートを準備する。プレートをテープで密閉し、湿度調整したボックスで保管する。代替の方法として、プレートをTBS-Tweenで1回洗浄してドライプレートを準備する。その後、ショ糖、ソルビトール、または他の適した糖を含有する飽和溶液を100 $\mu$ L/ウェル添加し、プレートシェーカーで5分間培養してプレートを飽和させる。プレートを紙に当てて軽く叩いて乾燥させ、空にする。プレートを+30の乾燥オープンにシリカゲルと一緒に入れ(空気を循環させながら)、2時間半(乾燥するまで)培養する。プレートをオープンから取り出して、室温で安定させる。さらにプレートをアルミニウム製の袋に乾燥剤の袋(Desipak(R))(11g/プレート)と一緒に詰めて、プレートを包んだ袋を加熱密閉する。プレートは+2から+8で保管する。

10

20

30

#### 【0039】

古い培養(1ヶ月超え)で特に顕著なNB/CNPの鈹化作用は測定を阻害することが知られている。希釈した試料では、最終濃度30mMのカルシウムキレート剤を用いてこれを避けられる。本発明の実施形態によると、カルシウムキレート剤は、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、エチレングリコ四酢酸(EGTA)、ジエチレントリアミンペンタ酢酸(DTPA)、ヒドロキシエチルエチレンジアミン三酢酸(HEEDTA)、ジアミノシクロヘキサン四酢酸(CDTA)、1,2-Bis(2-アミノフェノキシ)エタン-N,N,N',N'-四酢酸(BAPTA)、その薬剤として許容される塩のうちまたは複数を含むことができる。カルシウムキレート剤の添加は利用可能な抗原のすべてを曝露するが、背景に対する影響はもたない。NB/CNPの若い(1ヶ月未満)培養からのシグナルは、カルシウムキレート剤の処理により2倍から4倍増加し、無血清培養株からのシグナルはカルシウムキレート剤の処理により10倍以上増加する。カルシウムキレート剤は非培養NB/CNPから得たシグナルに対する影響はもたない。このように、本発明によると、本明細書で開示するキットおよび方法は、培養したNB/CNPを試験するとき試料を希釈するために使用する測定用緩衝液にカルシウムキレート剤を添加するステップを含むことができる。本発明の一実施形態では、NaOHを添加してpHを約7.5に調整した500mMのEDTA水溶液を使用する。

40

#### 【0040】

代替の方法として、ヒトまたはウシ由来の血清、血清タンパク質、または精製タンパク質は、合成ヒドロキシアパタイト(HA)表面をタンパク質溶液に1分から1ヶ月の間

50

曝露することによって当該表面に結合できる。この期間中、タンパク質はHA表面に吸着し、HA表面との相互作用に典型的なその立体構造を得る。また、血清に自然に存在する、またはタンパク質溶液に添加できる架橋を含む共有的に修飾、例えばトランスグルタミナーゼなどの酵素によりネオエピトープを生成できる。コーティング手順の後、前述した免疫測定法で使用する前に材料を洗浄してブロックしなければならない。方法は飽和カルシウム溶液およびリン酸塩溶液を使用して、実施例4に示すように低温でELISAプレートまたは他の適したデバイスにアパタイト表面を作ることができる。さらに、合成HAコーティングを準備する他の方法を、当業者によく知られる当該プロセスに適した材料に適用できる。アパタイトコーティングは可視光に透過性で、そのため当業者によく知られる光学読取式および他の光学的な分析器およびプロトコルまたは光散乱分析器およびプロトコルに適合する。

10

#### 【0041】

具体的には、ヒドロキシアパタイトに結合し構造変化したタンパク質に対するヒトの自己抗体を、基層として作用する合成アパタイトを用いて測定した。合成アパタイトはいくつかの出版されている手順を用いて作成できる。プラスチック表面をコーティングするために、Poser and Price [J. W. Poser, P. A. Price, J Biol Chem 254, 43 (1979)] に従い滅菌溶液を用いて合成アパタイトを準備した。代替法は高温に加熱したリン酸カルシウムのスプレーの使用で、これはそれに適した金属およびセラミックタイプの表面にコーティングするために使える。100 mL / ウェルのヒドロキシアパタイト溶液を96ウェルのポリスチレンプレート (Nunc) にピペットで落とした。プレートを空気循環するオープンの中で+37 °C の温度で一晩乾燥させた。精製タンパク質、ヒトのプロトンピンフラグメント1.2 (US Biological) をPBSで10 mg / mLの濃度まで希釈し、溶液を100  $\mu$  L / アパタイトコーティングしたウェルに加えた。プレートを+4 °Cで一晩培養した。翌日、タンパク質溶液を除去し、プレートをTBS - Tweenで1回洗浄して、Tween含有溶液を加えて室温で2時間ブロックした。ブロッキング用溶液を除去し、プレートをウェットプレートまたはドライプレートとして保管する準備をした。ウェットプレートは保存液 (NaN<sub>3</sub> / Proclina - PBS) を添加して準備し、プレートをテープで密閉した。貯蔵寿命を延ばすために、プレートを前述のようにブロックした後乾燥させ、ショ糖または他の糖を含有する溶液で5分間飽和させた。飽和溶液を除去し、プレートを+30 °C

20

30

のオープンで2時間半乾燥させた。乾燥後、プレートをテープで密閉した、または水分量を制御する活性化した乾燥剤の袋と一緒にアルミニウム製の袋に入れた。プレートは使用前にTBS - Tweenで洗浄した。血清または血漿試験試料をTween含有測定用緩衝液で1 : 500に希釈し、複製してピペットで100 mL / ウェル入れた。測定は、陽性対照液から作成した希釈シリーズを用いて定量化できる。試料は適度に振動させながら室温で1時間培養し、培養後プレートをTBS - Tweenで4回洗浄した。二次抗体HRP - 抗ヒトIgG (Zymed) を1 : 4000に希釈してTween含有の希釈溶液にし、それを100 mLずつすべてのウェルに添加した。プレートを適度に振動させながら室温で1時間培養した。プレートはTBS - Tweenで4回洗浄し、100 mLの基質溶液TMB (Moss社) をすべてのウェルに添加した。さらにプレートを光から保護しながら培養したところ、630 nmの吸光度を読み取った。必要な場合、反応はH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で停止でき、405 nmまたは450 nmの吸光度を読み取った。

40

#### 【0042】

前述したように、ヒドロキシアパタイトはカルシウムとリン酸塩の飽和溶液から沈殿させることができ、それによって適した基質に付着する。HAは、噴霧乾燥または流動層乾燥などの凝結および/または溶媒抽出のメカニズムによって球または同様なものなどの固体粒子にすることもできる。HAの形状または起源は本発明の目的に限られることはなく、どのHA表面もCaBP - HA複合体の形成の適切な基質であることが知られる。

#### 【0043】

次のプロセスは本発明で開示する免疫測定キットと使用する試薬の調製に関わる。本発

50

明の一実施形態では、試薬は96ウェルのマイクロタイタープレートと使用する試薬を含むことができ、目標値の標準、測定用緩衝液(50 mL)、二次抗体濃縮液(1.1 mL)、二次抗体希釈液(12 mL)、洗浄用緩衝液濃縮液(25倍)(40 mL)、基質溶液(前述したように、プローブとして使用する)(13 mL)、反応停止液(13 mL)、マイクロタイタープレート(上記の通りコーティングした陽性対照を有し、陰性対照として測定用緩衝液を使用する。

#### 【0044】

試験試料での抗CaBP-HA複合体抗体の検出は多様な方法で行うことができる。一実施形態では、免疫測定を実施して個体から回収した検体中の抗CaBP-HA複合体抗体を同定する。検体を回転して、回収から2時間以内に血清を凝血塊から分離する。検体は2 から8 で最長4日間保管でき、-20 から-80 では少なくとも1年間保管できる。冷凍と解凍を繰り返すのは避けるべきである。

10

#### 【0045】

別の実施形態では、免疫測定は蛍光測定法、化学発光測定法、または放射性同位元素標識免疫測定法を用いて実施し、抗CaBP-HA複合体抗体レベルを検出し測定する。本実施形態では、二次抗体は、直接、もしくはラジオアイソトープあるいは検出可能な分子またはタンパク質などの検出可能な標識を使用して間接的に標識するのが好ましい。様々な種類の標識並びにポリペプチドおよび抗体に直接もしくは間接的に標識をコンジュゲートする方法が当業者にはよく知られており、酵素、ラジオアイソトープ、蛍光物質、発光物質、コロイド金、ラテックスビーズなどの着色粒子を含む発色物質が含まれる。以下の例は酵素結合免疫反応吸着法(ELISA)および放射性同位元素標識免疫測定法を含む免疫測定法に適する標識である。(1)抗体は、これだけに限定されないが、 $^{32}\text{P}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、または $^{131}\text{I}$ などの放射性同位元素標識にコンジュゲートできる。標識の検出はシンチレーション計数、ガンマ線スペクトロメトリー、またはオートラジオグラフィなどの方法で行える。(2)代替りの方法として、発光性飛翔昆虫のルシフェリンの派生物などの生物発光標識を使用できる。生物発光物質は従来の方法でポリペプチドに共有結合し、ルシフェラーゼなどの酵素が生物発光分子を生じるATPとの反応を触媒して、光の光子を発するとき、標識されたポリペプチドを検出する。(3)あるいは、発蛍光団も標識として使える。発蛍光団の例は、フルオレセインおよびその派生物、フィコエリトリン、アロ-フィコシアニン、フィコシアニン、ローダミン、テキサスレッドを含む。発蛍光団は一般に蛍光検出器で検出する。(4)さらに別の方法として、ポリペプチドと抗体は色素原で標識して、酵素またはアフィニティ標識を提供できる。例えば、抗体をビオチン-アビジン反応で利用できるようにビオチン標識でき、これは酵素または発蛍光団などの標識にも結合できる。(5)代替りの方法として、抗体はペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、または基質を添加すると発色もしくは発蛍光反応をする他の酵素で標識できる。5-アミノ-2,3-ジヒドロ-1,4-フタラジンジオン(ルミノールT.M.としても知られる)(Sigma Chemical Company、ミズーリ州セントルイス)などの添加物と、p-ヒドロキシビフェニル(p-フェニルフェノールとしても知られる)(Sigma Chemical Company、ミズーリ州セントルイス)などの反応速度増強剤を使用して、ホースラディッシュペルオキシダーゼなどの酵素を発光反応によって増強でき、酵素基質の発光性または発蛍光性ジオキセタン派生物も使用できる。(6)さらに、二次抗体は当業者によく知られる方法に従う免疫電子顕微鏡法またはラテラルフローファーストアッセイ(lateral flow fast assay)で使用するためにコロイド金で標識してもよい。当該標識は酵素免疫測定法(ELISA)を用いて検出でき、または分光光度計、屈折計、またはスキャナーを用いて色の変化を検出することによって検出する。抗体とアッセイコンジュゲートを標識する以上の方法並びに他の方法は当業者にはよく知られている。上記標識は単なる例として列挙しており、当分野で周知の標識の範囲を制限するものではない。

20

30

40

#### 【0046】

免疫原性試験は様々な方法で行える。以下の実施例1は、ELISA試験を実施できる

50

ある方法を記述する。以下の実施例 2 は、抗 NB / CNP 抗体の定量化を用いて、患者の冠状動脈疾患の罹患性を判断するある方法を記述する。実施例 3 は生体 CaBP - HA 複合体および人工的に作った CaBP - HA 複合体に対するヒトの免疫応答を記述する。以上の例は非制限的なものであり、検体中の抗 NB / CNP 抗体を検出し、免疫原性試験を診断および予後の目的に採用するために免疫原性試験を実施できる多くの方法の単なる例を提供する。

#### 【0047】

図面において

図 1 は、これだけには限定されないが、NB / CNP 粒子に見られる多数のタンパク質を含むヒストグラムである。CNP に複数のタンパク質の存在を検出するために表面抗原パターン免疫測定法 (SAPIA) 試験を開発した。高結合ポリスチレン ELISA プレート (Corning, USA) を抗石灰化タンパク質に対する抗体および Gla 凝固因子および対照抗体でコーティングして SAPIA プレートを作成した。SAPIA は、ヒト血清アルブミン、Dダイマー、NF - B、およびフィブロネクチンに対する抗体を用いて対照とした。これらタンパク質は粒子表面に特異的に結合しないと予想されるためである。モノクローナル抗体を pH 7.4 の 1 倍の PBS を 100  $\mu$ L / ウェル ELISA プレートに加えて最終濃度 1  $\mu$ g / ml まで希釈して、+4 で一晩培養した。ポリクローナル抗体は 10  $\mu$ g / ml の濃度まで希釈し、プレートを上記のようにコーティングした。コーティング手順の後、プレートを TBS - Tween 20 で 1 回洗浄し、TBS - Tween 20 を 300  $\mu$ L / ウェル添加してブロックし、室温で 2 時間培養した。その後、ブロッキング用溶液を除去し、保存液 0.05% NaN<sub>3</sub> - TBS を 200  $\mu$ L / ウェル添加して、プレートをテープで密閉して冷蔵庫で保管した。使用前に、保存液を除去し、プレートを TBS - Tween で 1 回洗浄した。複製に 50  $\mu$ L / ウェルの測定用緩衝液 (0.05 M のトリス、0.15 M の NaCl、1% マウス血清を加えた pH 7.5 の 0.05% Proclon 300) を添加し、50  $\mu$ L / ウェルの血清試料を添加した。プレートをテープで密閉し、適度に振動させながら室温で 1 時間培養した。プレートは TBS - Tween を用いて 4 回洗浄し、検出用抗体 HRP - 8D10 (Nanobac Oy) を 100  $\mu$ L / ウェル添加した。プレートを適度に振動させながら室温で 1 時間培養した。プレートは TBS - Tween を用いて 4 回洗浄し、TMB 基質 (Moss Inc.、メリーランド州パサデナ 21123) を 100  $\mu$ L / ウェル添加した。プレートを密閉し、ホイルで光から保護して、適度に振動させながら室温で 20 分培養した。マイクロプレートリーダー (Biohit BP 808) で 630 nm の吸光度を読み取った。ブランク値を引いて、Table Curve 2D プログラム (SySTAT、カリフォルニア州ポイント・リッチモンド) を用いて Nanocapture ELISA 試験の標準曲線から単位の値を計算した。ピアソンの相関係数 (N = 16、H<sub>0</sub> :  $\rho = 0$  の確率 > |r|) を計算した。抗石灰化タンパク質と凝固 Gla 因子が他のいくつかのタンパク質とともに CNP に存在することが分かった。

#### 【0048】

SAPIA 法はまず 8 人の血漿および血清試料を用いて試験した。ヒトの血漿および血清試料は、まず比較可能な試料であるかどうかを判断するために試験した。図示する陽性試料は凝固因子が例外的に高いことに留意する。これら 8 試料で得られた結果に基づくと、血清試料および血漿試料はどちらも特異的なパラメータを試験するために使えるであろう。その後、SAPIA 試験のために、ELISA 結果が 0 単位から 640 単位の範囲の無作為群 (n = 16、各試料は CNP 単位の値が似ている 1 から 5 のヒト血清試料から組み合わせて、複製を行って多くの試験を実施するのに必要な量を作成した) を選択した。

#### 【0049】

図 2 は SAPIA 試験で得たデータを示し、NB / CNP がヒドロキシアパタイトコーティング内もしくはヒドロキシアパタイトコーティング上に構造変化したタンパク質を含有することが示されている。これらタンパク質は、これだけには限定されないが、Gla 含有ドメインをもつタンパク質、第 II 凝固因子、第 VII 凝固因子、第 IX 凝固因子、

第 X / X a 凝固因子、組織因子 - 第 V I I a 凝固因子複合体、プロトロンビナーゼ複合体 (第 V 因子、第 X a 因子、第 I I 因子)、第 I I 因子のフラグメント、トロンピン、プロトロンピンフラグメント 1、マトリックス G L A タンパク質、オステオカルシン、オステオポンチン、オステオネクチン、タンパク質第 X I I I a 因子、フェチュイン A、カルモジュリン、組織トランスグルタミナーゼ I I、M M P - 9、M M P - 3、C D 4 2 b、N F - カップ B、C D 1 4、フェチュイン B、C D 4 0、ミエロペルオキシダーゼ、フィブロネクチン、組織因子、ヒト補体 5 b - 9、C R P、C D 6 1、カップ軽鎖、マクロファージ L 1 タンパク質、h s p 6 0、フィブリリン - 1、ベータ - 2 - ミクログロブリン、C D 1 8、ラミニン、抗トリプシン、ノッチ - 1、B S A、L P S 結合タンパク質 (L B P)、P T X 3、補体 C 5、フィブリノゲン、D ダイマー、第 V 因子、抗キモトリプシン、アネキシン V、ピトロネクチン、トロンピン、トロポニン T、ピメンチン、トロポミオシン、ヒト血清アルブミン、心筋トロポニン I、アポリポタンパク質 A 1、M H C クラス I、アミロイド P タンパク質、s C D 4 0 L、カリクレイン、A T I I I、第 V I I I 因子、硫酸ヘパリン、第 X I 因子、c - j u n、F r a - 2、F r a - 1、J u n B、P - c - J u n、トランスグルタミナーゼ 3、アルファフェトプロテイン、前立腺特異抗原 (P S A)、e r b B 2、V E G F、アルファ - シヌクレイン、L P S およびその成分の脂質 A、T h o m s e n - F r i e d e n r e i c h 抗原、並びにトランスグルタミナーゼで作られるイソペプチド結合などのタンパク質の修飾体など、当該複合体と相互作用および結合する他の分子。

10

#### 【 0 0 5 0 】

20

図 3 は、ウシ胎仔血清に短期間曝露したアパタイト粒子上のタンパク質のプロテオーム解析で、培養期間後にヒドロキシアパタイト基質への様々な C a B P の付着が証明されたことを示す表である。D M E M ( G i b c o ) 中の無タンパク質のアパタイト粒子を添加物を加えずに 1 0 % F B S - D M E M に懸濁し、すぐに + 4 で 3 0 分、1 4 0 0 0 r p m で遠心分離した。滅菌 P B S で懸濁してペレットを 2 回洗浄した後、室温で 2 0 分、1 3 2 0 0 r p m で遠心分離した。分析前にペレットを冷凍した。プロテオーム解析は、カナダ、モントリオールの P r o t a n a 社が行った。S D S で沸騰処理した試料を還元条件で 1 D S D S - P A G E を行った。タンパク質バンドを C o o m a s s i e 染色法で検出し、切除して次の標準手順で処理した。1) ゲルブラグ中のタンパク質を D T T で還元した。2) 遊離システイン残基をヨードアセトアミドでアルキル化した。3) タンパク質をエンドプロテアーゼトリプシンで蒸解した。4) 生成されたペプチドを中性条件、酸性条件、および塩基性条件で抽出した。

30

#### 【 0 0 5 1 】

ペプチド混合物は C 1 8 逆相クロマトグラフィーで分離して、ナノスプレーインターフェースに連結した T h e r m o - F i n n i g a n 社製 L T Q - F T イオントラップ / F T I C R ハイブリッド型質量分析計に入れた。質量分析計はデータ依存モードで操作して、クロマトグラフィーカラムから出たときの強度閾値を上回る各ペプチドのタンデム ( m s / m s ) スペクトルを得た。生データファイルを L C Q - D T A を用いて処理し、タンデムスペクトルのピークリストを作成した。処理したデータを N C B I 非冗長データベースを用いて M a s c o t ( M a t r i x S c i e n c e s、イギリス、ロンドン) で調査した。M a s c o t の結果を質量分析法の科学者に手伝ってもらい、結果を生データに相関させた。

40

#### 【 0 0 5 2 】

図 4 は、1 3 人の患者にエチドロネートとテトラサイクリンを 3 ヶ月間投与した実施例 4 の治療プロトコルに従う抗 N B / C N P 抗体レベルを示す。表は、治療中と追跡調査中の患者の抗体レベルが著しく減少したことを示しており、新規な抗原複合体を用いた抗体価レベルは治療の反応の定量化に便利な診断ツールであることを表している。

#### 【 0 0 5 3 】

図 5 および 6 は、追跡検査の 6 0 ヶ月の時点で N B / C N P の純培養株に曝露した研究所員の抗体レベルを示す線グラフである。曝露の経路は結膜嚢 ( 眼 ) からとした。図 4 は

50

60 から 63 ヶ月の時点の抗 NB / CNP 抗体の急激な増加を示す。曝露から 72 ヶ月後、治療を試みないで、抗体レベルは安定し、それ以降変わらなかった。図 5 は抗ヒト CaBP - HA 複合体抗体を抗ヒトプロトロンビン F1 - HA 複合体抗体に相関させた ELISA データを示す。この図は抗 CaBP - HA 複合体抗体試験法の使用の有効性を示しており、例として、NB / CNP 感染したことが分かっている被験者に、抗原としてヒトの生体 CaBP - HA 複合体と合成的に作成したヒトプロトロンビンフラグメント 1 - HA 複合体を用いている。抗ヒト CaBP - HA 複合体抗体の割合は、全希釈液で抗ヒトプロトロンビン F1 - HA 複合体抗体の割合に従う。

#### 【0054】

図 7 は、病的石灰化関連の疾患にかかっている人に存在する抗 CaBP - HA 複合体抗体を示す。図は実施例 5 に対応し、600 の血清試料をニューヨーク州ウォーターブリーの Clinomic Bioscience 社から購入した。血清抗体は、クローン病の患者から回収した血清試料を除き、すべての疾患グループで検出可能であった。抗 NB / CNP 抗体の平均値はすべての疾患グループでクローン病より統計的に大きかった。このデータは、抗 NB / CNP 抗体のレベルは多数の疾患に関連することを表しており、疾患の早期警告の兆候となりうる。これら疾患は、アルツハイマー、大動脈狭窄症、頸動脈狭窄症、冠動脈疾患、慢性前立腺炎、前立腺癌、乳癌、卵巣癌、腎臓結石疾患、パーキンソン病、多発性嚢胞腎臓結石疾患、慢性関節リウマチ、膵臓炎、胆嚢炎が含まれるが、これだけに限定されるものではない。

10

#### 【実施例】

20

#### 【0055】

##### 実施例 1 : ELISA 試験

手順：血液または血清を適切かつ当分野で確立したよく知られるプロトコルにより哺乳動物から回収する。冷凍 / 解凍サイクルは避けるべきである。試験前に、試薬を適切に希釈した後で、室温に戻して、典型的には前記試薬を室温で約 15 分間静置して調製しなければならない。試薬は絶対にロット番号の異なる試験キットと交換してはならない。

#### 【0056】

測定法で使用するマイクロプレートを手袋から取り出して、使用前に室温に戻す。必要な数のテストストリップを取り出したら、すぐに袋を再密閉して 2 から 8 で保管し、プレートの完全性を維持する。

30

#### 【0057】

標準および対照液は各バイアルに蒸留水または脱イオン水を 1 mL 添加して復元する必要がある。Replace the stopped、材料を室温で少なくとも 15 分間放置する。使用前に標準と対照液のウェルを混合する。復元の後、標準と対照液は室温で一日安定させる。冷凍している場合もあるが、1 ヶ月以内に使用しなければならない。冷凍・解凍は 2 回以上行ってはならない。キットに同梱される洗浄用緩衝液とコンジュゲートは蒸留水または脱イオン水で適切に希釈して混合する。患者の血清を培養用緩衝液で 2  $\mu$ L / mL に希釈して、室温で少なくとも 15 分間静置する。

#### 【0058】

測定の前に、使用する各テストストリップを洗浄用緩衝液で 1 回だけ洗浄する。各標準および対照液と希釈した試料を 100  $\mu$ L ずつピペットで適切なウェルに入れる。100 rpm  $\pm$  10 のプレートシェーカーに載せて室温 (22  $\pm$  2 ) で 60 分間培養する。優良試験所技術を用いて、ウェル間の汚染を避けながら注意して手で洗浄する。容器の上でプレートを逆さにし、元に戻さずに、ウェルの内容物を移し、プレートを吸い取り紙で拭き取る。各ウェルは 300  $\mu$ L の洗浄用緩衝液で 4 回洗浄する。最後の洗浄時に、紙に液体の跡が見えなくなるまでプレートを吸い取り紙で軽く叩いて洗浄用緩衝液を完全に拭う。次に、各ウェルに 100  $\mu$ L の希釈コンジュゲートを添加する。100 rpm  $\pm$  10 のプレートシェーカーに載せて室温 (22  $\pm$  2 ) で 60 分間培養する。ウェル間の相互汚染を避けるよう注意しながら、もう一度手で洗浄する。容器の上でプレートを逆さにし、元に戻さずに、ウェルの内容物を移し、プレートを吸い取り紙で拭き取る。各ウェルは 3

40

50

00  $\mu$ L の洗浄用緩衝液で4回洗浄する。最後の洗浄時に、紙に液体の跡が見えなくなるまでプレートを吸い取り紙で軽く叩いて洗浄用緩衝液を完全に拭う。ピペットで各ウェルに100  $\mu$ L のTMB基質を入れる。手順のこの時点では、光から保護する。100 rpm  $\pm$  10のプレートシェーカーに載せて室温(22  $\pm$  2)で20分間培養する。ピペットで各ウェルに100  $\mu$ L の反応停止液を入れる。450 nmの吸光度を読み取る。吸光度はすぐに読み取る。

#### 【0059】

計算：品質管理ガイドラインに一致してデータが受け入れられるかを検証する。異常値ははねてもよい。標準ゼロの吸光度の値は0.3を超えてはならない。ただし、これは不注意な洗浄のしるしで、測定を繰り返さなければならない。標準、対照液、未知試料のそれぞれについて、光学密度の値を平均する(複製がある場合)。ゼロ標準の吸光度の値の平均値を、他の標準、対照液、および試料の吸光度の値の平均値から引く。縦座標に光学密度を、横座標に標準濃度(単位/mL)をとった方眼紙に、滑らかな標準曲線を描く。代替りの方法として、4パラメータ曲線適合プログラムを使用できる。対照液と未知試料の値は標準曲線から直に読み取る。試料の希釈因数(2  $\mu$ L/mLまたは1/500)と試料の容積因数(100  $\mu$ Lまたは1/10)を標準曲線の濃度を含める。そのため、未知試料の値は標準曲線から直に読み取り、これら因数を掛けない。

10

#### 【0060】

結果の解釈：期待値は<0.2単位/mL(陰性結果)である。陽性結果(>0.2単位/mL)はCaBP-HA複合体に対する抗体の存在を表す。血清または血漿検体の陽性結果は動脈石灰化または他の形態の病的石灰化を伴う疾患に非常に一般的である。

20

#### 【0061】

実施例2：抗NB/CNP抗体と冠動脈疾患の相関関係

冠動脈石灰化が冠動脈疾患(CAD)のリスクに関係するという研究が提案されている。本実施例は、NB/CNPに対する抗体が症状発現前のCADを反映していると思われる冠動脈石灰化のレベルに関連しているかどうかを検証した。

#### 【0062】

電子ビームコンピュータ断層撮影を受けた201人の健康な無症状の被験者(男性52%、平均年齢56.6歳)から採取した血清検体を用いて、NB/CNPの抗体、他の感染症の病原体の抗体、およびCRPの抗体のレベルを測定した。高い石灰化指数には冠動脈石灰化のレベル 75パーセンタイルを定義するカットオフ値を定義し、高い抗体レベルにはNB/CNP抗体レベル 第2三分位を定義した。

30

#### 【0063】

NB/CNPに対する血清抗体は被験者の94%で検出可能であった。平均抗体値は1.07単位で、抗体の三分位値はそれぞれ0~0.21、0.22~0.73、および0.74~19.26単位であった。抗体価が高いグループのうち石灰化指数の高い人は31%で、対して抗体価が最低のグループ(P=0.024)では16%であった。NB/CNP抗体レベルの高さと冠動脈石灰化指数の高さの関連性は、年齢、男性であること、喫煙、糖尿病、高血圧、高コレステロール血症、CADの家族歴を含めたCAD危険因子とは無関係であった(95%の信頼限界1.39から7.15で3.15のオッズ比調整済み)。ただし、冠動脈石灰化とCRPレベルとの関連性も、またはNB/CNPと他の病原体感染との関連性もみられなかった。このデータは、ナノ細菌IgGの血清による抗体陽性のレベルが冠動脈石灰化の高い指数と関連していることを示しており、病原体関連のメカニズムが早期アテローム硬化症においてある役割を担っていることを示唆している。

40

#### 【0064】

実施例3：生体CaBP-HA複合体および人工的に作成したCaBP-HA複合体に対するヒトの免疫応答

CaBP-HA複合体は、参照によりこれに組み込むKajander他の米国特許第5,135,851号が特許を取得したように、ラビットで、およびラットとマウスで

50

免疫抗原性である。実施例 1 および 2 に示すように、CaBP-HA 複合体に対する抗体はヒトにも存在する。本実施例では、この複合体が感染性であり、ヒトの体内に取り込まれた後に抗体応答を引き起こす証拠を提供する。図 3 は、本特許出願を共同執筆した研究者の追跡調査を記述する。彼女を 60 ヶ月間追跡調査し、ELISA 法を用いて陰性の抗体値を得た。その後、彼女の左目をウシ由来の CNP ペレットに曝露した。結膜完成経路は関係する特異的な防御系がなく、リンパ管を通らずに静脈系に循環する直接のアクセス経路があるため、一般的に病原体を体内に取り込む効果的な方法だと考えられている。曝露した後、彼女は CaBP-HA 複合体に対する抗体が非常に高いレベルで陽性になり、何年もの間そのまま変わらなかった。図 3 を参照。抗ヒト CaBP-HA 複合体抗体を前述のように測定し、抗ヒトプロトンピン F1-HA 抗体を前述のように測定した。希釈

10

#### 【0065】

##### 実施例 4：新しい抗炎症・抗感染治療

Dr. Kajander (Kajander 他) は、FDA 認証薬のテトラサイクリン HCL とエチドロネート (ビスフォスフォネート、商標 Didronate (R)) の新規な組み合わせを用いて実験療法を行った。これら 2 つの薬剤は、それぞれ、細菌感染と骨粗しょう症 / パジエット病の治療に処方される投薬量で安全かつ効能の長い歴史がある。

20

#### 【0066】

13 人の患者が炎症と潜在的な病原体に関わる慢性病だと同定された。例えば、アテローム性動脈硬化症とその合併症、腎臓結石、胆石、その他の結石；病的石灰化、カルシフィラキシー、骨粗しょう症、パジエット病、自己免疫疾患：慢性関節リウマチ、強皮症乾癬、白斑。患者全員が成人で、妊娠もしくは妊娠の可能性はなく、HIV または他の形態の免疫欠損にかかっていなかった。患者は全員正常な腎臓機能をもっていた。

#### 【0067】

薬剤処方 は 13 週間の療法から構成された。第 1 週目：1 日 1 回 Didronate (R) 400 mg を経口投与、1 日 1 回テトラサイクリン 500 mg を経口投与、1 日 1 回ピリドキシン 40 ~ 200 mg を経口投与。第 2 週目から第 13 週目：1 日 1 回 Didronate 200 mg を経口投与、テトラサイクリンを 1 日 2 回 250 mg、または 1 日 1 回 500 mg 経口投与、1 日 1 回ピリドキシン 40 ~ 200 mg 経口投与。ピリドキシンはホモシステイン代謝を助けるために使用した。

30

#### 【0068】

療法の追跡検査：2 週間ごとに患者から血液と尿の試料を回収した。療法の完了後、さらに 2 つの試験試料を毎月回収した。症状と全身状態の変化の記録に重点をおいて、患者日記を記録するように依頼した。

#### 【0069】

13 人の患者を実験に登録した。12 人では抗体の減少がみられた。結果として、平均で 4.15 倍の抗 CaBP-HA 複合体抗体の減少が検出され、これは 80% の減少に相当し、抗 CaBP-HA 複合体抗体を使用して療法の効能と CaBP-HA 複合体の根絶に繋げることができることを示している。そのため、抗 CaBP-HA 複合体抗体を使用して、治療薬に対する反応をモニタリングでき、NB / CNP およびそれにより生じる多数の疾患を治療できる療法の便利な指標とすることができることを示される。

40

#### 【0070】

##### 実施例 5：CaBP-HA 複合体およびその抗体との疾患の関連性

本実施例は、NB / CNP に対する抗体が病的石灰化を伴う様々な疾患に関連するかどうかを検証した。600 の血清試料をニューヨーク州ウォーターブリーの Clinomics Bioscience 社から購入した。血清抗体は、クローン病の患者から回収した血清試料を除き、すべての疾患のグループで検出可能であった。抗 CNP / NB 抗体

50

の平均値は、全疾患グループでクローン病よりも統計的に高かった。このデータから抗CNP/NB抗体のレベルは多数の疾患に関連することが示され、疾患の早期警告の兆候となりうる。これらの疾患には、アルツハイマー、大動脈狭窄症、頸動脈狭窄症、冠動脈疾患、慢性前立腺炎、前立腺癌、乳癌、卵巣癌、腎臓結石疾患、パーキンソン病、多発性嚢胞腎臓結石疾患、慢性関節リウマチ、膵臓炎、胆嚢炎が含まれる。図5を参照。

【図面の簡単な説明】

【0071】

本発明をよりよく理解し、本明細書に組み込み、本明細書の一部をなす添付の図面は、本発明の実施形態を例示し、説明と合わせて本発明の原則を説明するのに役立つ。

【図1】図1は、NB/CNP粒子に見られる多数のタンパク質のヒストグラムを图示する。

【図2-1】図2は、NB/CNPが構造変化したタンパク質を含有することを示すSAPIA試験のデータを图示する。

【図2-2】図2は、NB/CNPが構造変化したタンパク質を含有することを示すSAPIA試験のデータを图示する。

【図3】図3は、ウシ胎仔血清に短期間曝露したアパタイト粒子のタンパク質のプロテオーム解析を图示する。

【図4】図4は、実施例4の治療プロトコルに従う抗NB/CNP抗体レベルを图示する。

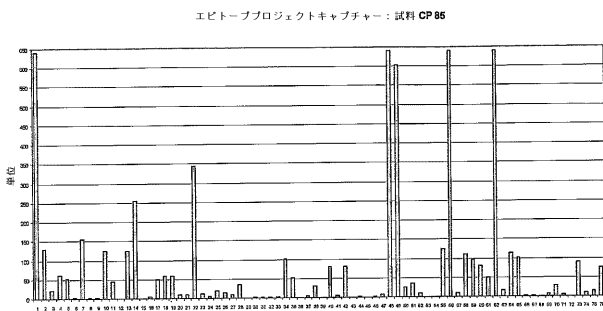
【図5】図5は、抗ヒトプロトロンビンF1-HA複合体抗体に相関させた抗ヒトCaBP-HA複合体抗体のELISAデータを图示する。

【図6】図6は、CaBP-HA複合体に対する抗体反応性を图示する。

【図7】図7は、病的石灰化に関連する疾患をもつ人に存在する抗CaBP-HA複合体抗体を图示する。

【図1】

FIGURE 1: SAPIA ヒストグラム



【図2-1】

Figure 2. NB/CNPに結合したタンパク質の例の凡例表

|    |                |
|----|----------------|
| 1  | ウツCaBP-HA複合体   |
| 2  | フェチユインA        |
| 3  | カルモジュリン        |
| 4  | 凝集トランスグロチナーゼII |
| 5  | MMP-9          |
| 6  | MMP-3          |
| 7  | CD 42b         |
| 8  | INCaPPaB       |
| 9  | オステオポンチン       |
| 10 | 第VIIc因子        |
| 11 | CD14           |
| 12 | チトロンピン         |
| 13 | 第IX因子          |
| 14 | フェチユインB        |
| 15 | CD40           |
| 16 | ヒドロキシカルキニンターゼ  |
| 17 | チトロンチン         |
| 18 | 第VII因子         |
| 19 | 凝集因子           |
| 20 | ヒトの補体C5b-9     |
| 21 | ヒトCRP          |
| 22 | マトリックスGLAタンパク質 |
| 23 | CD63           |
| 24 | 骨質             |
| 25 | マトリックスGLIタンパク質 |
| 26 | 凝集因子           |
| 27 | CD69           |
| 28 | チトロンチン         |
| 29 | 第IX因子          |
| 30 | CD 18          |
| 31 | オステン           |
| 32 | 抗チトロンチン        |
| 33 | ラヂチン           |
| 34 | B2A            |
| 35 | ILBP           |
| 36 | PTX3           |
| 37 | 凝集因子           |
| 38 | チトロンチン         |
| 39 | D-タイマー         |
| 40 | 第VII因子         |
| 41 | CD11c          |
| 42 | IL-1β          |
| 43 | 抗チトロンチン        |
| 44 | アネキニンV         |
| 45 | 凝集因子           |
| 46 | チトロンチン         |
| 47 | チトロンチン         |
| 48 | チトロンチン         |
| 49 | チトロンチン         |
| 50 | チトロンチン         |
| 51 | チトロンチン         |
| 52 | チトロンチン         |
| 53 | B2A            |
| 54 | 凝集因子           |
| 55 | Apo A1         |
| 56 | 凝集因子           |
| 57 | チトロンチン         |
| 58 | CD40L          |
| 59 | チトロンチン         |
| 60 | チトロンチン         |
| 61 | チトロンチン         |
| 62 | チトロンチン         |
| 63 | 凝集因子           |
| 64 | 凝集因子           |

10

20

【 図 2 - 2 】

|    |                |
|----|----------------|
| 65 | αXII因子         |
| 66 | C-Jun          |
| 67 | Fra-2          |
| 68 | Fra-1          |
| 69 | Ran-B          |
| 70 | P-c-Jun        |
| 71 | FGase3         |
| 72 | アルファファクトドプロテイン |
| 73 | 血小板特異抗体        |
| 74 | hsh2           |
| 75 | VEGF           |
| 76 | β2ミクログロブリン     |

【 図 3 】

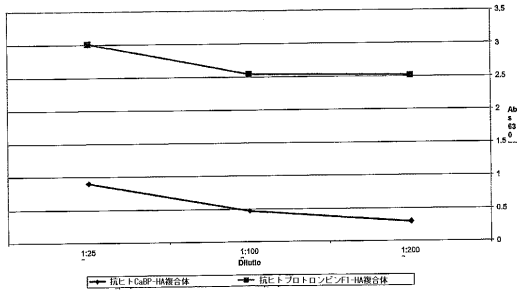
Figure 3. ウシ胎仔血清中に短期間曝露したアバタイト粒子上のタンパク質の  
プロテオーム解析

| データベース中のタンパク質名                    | アミノ酸<br>カバレッジ | 別個に合計した MS/MS<br>検索スコア | 別個の<br>ペプチド |
|-----------------------------------|---------------|------------------------|-------------|
| 血清アルブミン前駆体                        | 72            | 912.08                 | 52          |
| アポリポタンパク質 A-1 前駆体                 | 52            | 321.51                 | 18          |
| アルファ1-抗プロテイナーゼ前駆体                 | 39            | 261.59                 | 14          |
| IgG1 重鎖定常領域                       | 62            | 251.72                 | 15          |
| アルファ2-HS-糖タンパク質前駆体                | 47            | 234.91                 | 13          |
| ピタミン様タンパク質前駆体                     | 22            | 221.73                 | 13          |
| 第II型因子                            | 14            | 144.06                 | 9           |
| Endopin 1                         | 27            | 131.14                 | 8           |
| 血清トランスフェリン前駆体                     | 13            | 128.21                 | 8           |
| 抗テストステロン抗体                        | 30            | 92.71                  | 5           |
| ヘモグロビンアルファ鎖                       | 22            | 78.07                  | 5           |
| 免疫グロブリン軽鎖可変領域                     | 60            | 74.94                  | 5           |
| 胎児性ヘモグロビンベータ鎖                     | 30            | 73.16                  | 4           |
| アルファマクログロブリン前駆体                   | 3             | 65.05                  | 4           |
| セルロプラスミン                          | 5             | 59.91                  | 4           |
| インテグリンαIIbβ3前駆体                   | 3             | 54.06                  | 3           |
| ベータ2-ミグロブリン                       | 13            | 48.78                  | 3           |
| 免疫グロブリン重鎖定常領域                     | 10            | 48.58                  | 3           |
| C4b-結合タンパク質アルファ鎖前駆体               | 6             | 47.06                  | 3           |
| ヒトロネクチン前駆体                        | 3             | 43.03                  | 2           |
| IgM ラムダ鎖C領域                       | 13            | 33.32                  | 2           |
| 補体C3前駆体                           | 1             | 32.27                  | 2           |
| IgG3 重鎖定常領域                       | 5             | 28.10                  | 2           |
| 補体C9                              | 2             | 21.00                  | 1           |
| アポリポタンパク質 A-II (抗菌ペプチド<br>BAMF-1) | 21            | 21.00                  | 1           |
| 補体成分C3                            | 4             | 20.75                  | 1           |
| 第V型因子                             | 0             | 19.47                  | 1           |
| RIKEN cDNA 2210010C04             | 4             | 19.14                  | 1           |
| ヒトロネクチン前駆体                        | 2             | 16.83                  | 1           |
| 補体成分3                             | 10            | 15.33                  | 1           |
| β2ミクログロブリン前駆体                     | 3             | 14.65                  | 1           |
| リポタンパク質CIII                       | 20            | 14.33                  | 1           |
| アディポネクチン                          | 6             | 13.71                  | 1           |
| アルファ2-抗プラスミン前駆体                   | 2             | 13.28                  | 1           |

【 図 6 】

FIGURE 6: CaBP-HA複合体に対する抗体反応性

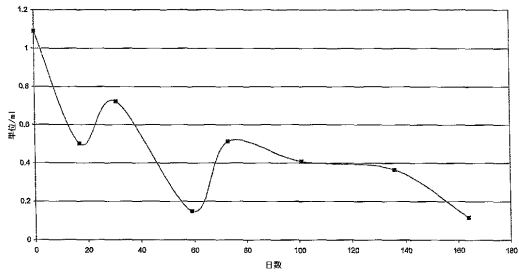
図4. 研究所員NのCaBP-HA複合体に対する抗体反応性



【 図 4 】

Figure 4. 3ヶ月の治療後0~164日の抗ナノバクテリア/CNPレベル

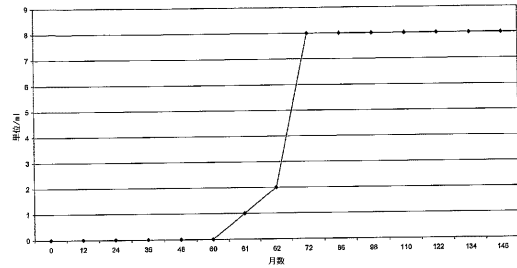
患者1、0~164日後の抗ナノバクテリア抗体レベル。3ヶ月間治療した。



【 図 5 】

FIGURE 5: 14年間の追跡調査にわたる抗CNP抗体

研究所員N(匿名)、14年の追跡調査中の抗CNP抗体。結核菌のCNP曝露により60ヶ月目に免疫応答を生じた。



【 図 7 】

【 図 7 】

FIGURE 7: 抗NB/CNP抗体およびそれに関連する疾患

| コード | 疾患血清               | 容積  | 症例 | 平均(単位/ml) | SD    | 中央値   |
|-----|--------------------|-----|----|-----------|-------|-------|
| Alz | アルツハイマー病           | 2ml | 40 | 0.176     | 0.098 | 0.134 |
| Aor | 大動脈狭窄症             | 2ml | 40 | 0.135     | 0.094 | 0.109 |
| Car | 頸動脈狭窄症             | 2ml | 40 | 0.115     | 0.093 | 0.077 |
| CAD | 冠動脈疾患<br>≥3血管      | 2ml | 40 | 0.13      | 0.096 | 0.101 |
| Pst | 慢性前立腺炎<br>カテゴリーIII | 2ml | 40 | 0.245     | 0.196 | 0.184 |
| Pro | 前立腺癌               | 2ml | 40 | 0.248     | 0.194 | 0.184 |
| Bre | 浸潤性乳癌<br>≥病期III    | 2ml | 40 | 0.085     | 0.055 | 0.07  |
| Ova | 卵巣内腫瘍<br>≥病期III    | 2ml | 40 | 0.254     | 0.25  | 0.157 |
| Cro | 結腸クローン病            | 2ml | 40 | 0.064     | 0.039 | 0.064 |
| Kid | 腎臓結石症              | 2ml | 40 | 0.3       | 0.271 | 0.234 |
| Par | パーキンソン病            | 2ml | 40 | 0.274     | 0.19  | 0.247 |
| Pol | 腎多発癌               | 2ml | 40 | 0.428     | 0.18  | 0.48  |
| RA  | 慢性関節リウマチ           | 2ml | 40 | 0.12      | 0.11  | 0.072 |
| Pan | 膵臓炎                | 2ml | 40 | 0.13      | 0.116 | 0.103 |
| Cho | 胆嚢炎                | 2ml | 40 | 0.359     | 0.371 | 0.201 |

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|   |   |  |                              |
|---|---|--|------------------------------|
|   |   | Internati<br>PCT/  | pplication No<br>.005/040358 |
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER<br>INV. G01N33/543  |   |  |                              |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC   |   |  |                              |
| B. FIELDS SEARCHED  |   |  |                              |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>G01N   |   |  |                              |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched   |   |  |                              |
| Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)<br>EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS   |   |  |                              |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  |   |  |                              |
| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  |  | Relevant to claim No.        |
| X   | CINQUINI M. ET AL: "Ruolo degli anticorpi anti-protrombina nella sindrome da anti-foffolipidi"<br>REUMATISMO,<br>vol. 54, no. 3, 2002, pages 243-250,<br>XP002376401<br>the whole document  |  | 1-71                         |
| X   | ATMANI FOUAD ET AL: "Identification of proteins extracted from calcium oxalate and calcium phosphate crystals induced in the urine of healthy and stone forming subjects"<br>UROLOGICAL RESEARCH,<br>vol. 26, no. 3, June 1998 (1998-06), pages 201-207, XP002376402<br>ISSN: 0300-5623<br>the whole document |  | 1-14                         |
|   |   | -----<br>-/--<br>-----   |                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.  |   | <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.   |                              |
| * Special categories of cited documents :   |   |  |                              |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier document but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed |   | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.<br>"Z" document member of the same patent family |                              |
| Date of the actual completion of the international search<br><br>11 April 2006  |   | Date of mailing of the international search report<br><br>30. 06. 2006   |                              |
| Name and mailing address of the ISA/<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax: (+31-70) 340-3016   |   | Authorized officer<br><br>Vanhalst, K  |                              |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|                       |                              |
|-----------------------|------------------------------|
| International<br>PCT/ | Application No<br>005/040358 |
|-----------------------|------------------------------|

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |   |                       |
|--|---|-----------------------|
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
| X  | FR 2 624 613 A (TOLEDANO JACQUES)<br>16 June 1989 (1989-06-16)<br>abstract<br>-----   | 1-14                  |
| X  | DE 195 33 346 A1 (ASAHI KOGAKU KOGYO K.K.,<br>TOKIO/TOKYO, JP; KITANO, TADAHIKO,<br>HACHIOJI,) 14 March 1996 (1996-03-14)<br>abstract<br>-----  | 1-14                  |
| X  | NISHIO S ET AL: "Calcium phosphate<br>crystal-associated proteins:<br>alpha-2-HS-glycoprotein, prothrombin<br>fragment 1 and osteopontin."<br>INTERNATIONAL JOURNAL OF UROLOGY :<br>OFFICIAL JOURNAL OF THE JAPANESE<br>UROLOGICAL ASSOCIATION. AUG 2001,<br>vol. 8, no. 8, August 2001 (2001-08),<br>pages S58-S62, XP002376404<br>ISSN: 0919-8172<br>abstract<br>-----            | 1-14                  |
| X  | NISHIO S ET AL: "Inhibitory effect of<br>calcium phosphate-associated proteins on<br>calcium oxalate crystallization:<br>alpha2-HS-glycoprotein, prothrombin-F1 and<br>osteopontin"<br>BJU INTERNATIONAL,<br>vol. 86, no. 4, September 2000 (2000-09),<br>pages 543-548, XP008062854<br>ISSN: 1464-4096<br>abstract<br>-----  | 1-14                  |
| X  | DATABASE BIOSIS [Online]<br>BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE,<br>PHILADELPHIA, PA, US; 1997,<br>HONDA M ET AL: "Characterization of<br>protein components of human urinary<br>crystal surface binding substance"<br>XP002376526<br>Database accession no. PREV199799821611<br>abstract<br>& UROLOGICAL RESEARCH,<br>vol. 25, no. 5, 1997, pages 355-360,<br>ISSN: 0300-5623<br>----- | 1-14                  |
| A  | US 5 135 851 A (KAJANDER ET AL)<br>4 August 1992 (1992-08-04)<br>cited in the application<br>the whole document<br>-----<br>-----<br>-/--   | 1-76                  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|                              |
|------------------------------|
| International Application No |
| PCT/JP05/040358              |

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |   |                       |
|--|---|-----------------------|
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
| A  | <p>BROWN M A ET AL: "IDENTIFICATION AND PURIFICATION OF VITAMIN K-DEPENDENT PROTEINS AND PEPTIDES WITH MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC FOR GAMMA-CARBOXYGLUTAMYL (GLA) RESIDUES" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,, US, vol. 275, no. 26, 30 June 2000 (2000-06-30), pages 19795-19802, XP002943077<br/>ISSN: 0021-9258<br/>abstract</p> <p>-----</p> |                       |
| A  | <p>CHARIFSON P S ET AL: "SOLUTION CONFORMATIONS OF THE GAMMA CARBOXYGLUTAMIC ACID DOMAIN OF BOVINE PROTHROMBIN FRAGMENT 1 RESIDUES 1-65" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 88, no. 2, 1991, pages 424-428, XP002376406<br/>ISSN: 0027-8424<br/>abstract</p> <p>-----</p>  |                       |
| A  | <p>WU J R ET AL: "FOURIER TRANSFORM IR SPECTROSCOPIC STUDY OF CALCIUM AND MEMBRANE-INDUCED SECONDARY STRUCTURAL CHANGES IN BOVINE PROTHROMBIN AND PROTHROMBIN FRAGMENT 1" BIOPHYSICAL JOURNAL, vol. 60, no. 1, 1991, pages 70-80, XP002376407<br/>ISSN: 0006-3495<br/>abstract</p> <p>-----</p>   |                       |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
T/US2005/040358

**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 72-76 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on those parts relating to in vitro methods only.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

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

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-71 (all partially)

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ US2005/ 040358

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1: claims 1-71 (all partially)

the provision of methods or compositions comprising or using a complex of hydroxyapatite (HA) or calcium phosphate and the (CaBP) calcium-binding protein prothrombin in relation to diagnosis of several diseases (see claim 47 for the complete list).  
---

Inventions 2-71: claims 1-76 (all partially)

the provision of methods or compositions comprising or using a complex of hydroxyapatite (HA) or calcium phosphate and one of the remaining 76 (CaBP) calcium-binding proteins in relation to diagnosis of several diseases (see claim 47 for the complete list).  
---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Annex on patent family members

International application No  
PCT/JP2005/040358

| Patent document cited in search report |    | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|----|------------------|-------------------------|------------------|
| FR 2624613                             | A  | 16-06-1989       | NONE                    |                  |
| -----                                  |    |                  |                         |                  |
| DE 19533346                            | A1 | 14-03-1996       | GB 2293009 A            | 13-03-1996       |
|  |    |                  | JP 3300542 B2           | 08-07-2002       |
|  |    |                  | JP 8075747 A            | 22-03-1996       |
| -----                                  |    |                  |                         |                  |
| US 5135851                             | A  | 04-08-1992       | AT 122725 T             | 15-06-1995       |
|  |    |                  | DE 69109744 D1          | 22-06-1995       |
|  |    |                  | DE 69109744 T2          | 12-10-1995       |
|  |    |                  | DK 460414 T3            | 10-07-1995       |
|  |    |                  | EP 0460414 A2           | 11-12-1991       |
|  |    |                  | ES 2072478 T3           | 16-07-1995       |
|  |    |                  | GR 3016991 T3           | 30-11-1995       |
| -----                                  |    |                  |                         |                  |

## フロントページの続き

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

(72)発明者 カヤンデル, イー. オラビ  
フィンランド国 エフアイエヌ - 7 1 8 0 0 シーリンヤルビ, カスリランマンティエ 2 4 9

(72)発明者 アホ, ケー. エム.  
フィンランド国 エフアイエヌ - 7 1 8 0 0 シーリンヤルビ, カスリランマンティエ 2 4 9

(72)発明者 チフトチオグル, ネバ  
アメリカ合衆国 テキサス 7 7 0 5 8, ヒューストン, エグレ ベイ ブールバード 1 8  
8 0 0, スイート 1 1 4

Fターム(参考) 4H045 AA11 AA20 AA30 BA50 CA42 EA50

(54)【発明の名称】タンパク質 - ヒドロキシアパタイト複合体に関する方法および組成物、ならびにカルシウム結合タンパク質 - ヒドロキシアパタイト複合体に対する抗体の検出のための新規インビトロ試験を含む免疫系を試験および調節することにおけるそれらの適用

|                |   |         |            |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 蛋白质 - 羟基磷灰石复合物的方法和组合物及其在测试和调节免疫系统中的应用，包括用于检测钙结合蛋白 - 羟基磷灰石复合物抗体的新型体外试验 |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2008519284A</a>   | 公开(公告)日 | 2008-06-05 |
| 申请号            | JP2007540147  | 申请日     | 2005-11-08 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 纳米回制药公司   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 纳米回制药公司   |         |            |
| [标]发明人         | カヤンデルイーオラビ<br>アホケーエム<br>チフトチオグルネバ                                     |         |            |
| 发明人            | カヤンデル, イー. オラビ<br>アホ, ケー. エム.<br>チフトチオグル, ネバ                          |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/53 C07K17/14   |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/6893 G01N33/57407 G01N33/57488 G01N33/6854                     |         |            |
| FI分类号          | G01N33/53.N C07K17/14   |         |            |
| F-TERM分类号      | 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA50 4H045/CA42 4H045/EA50     |         |            |
| 代理人(译)         | 夏木森下  |         |            |
| 优先权            | 60/625572 2004-11-08 US   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>   |         |            |

摘要(译)

本发明涉及一种新型羟基磷灰石 ( HA ) - 钙结合蛋白 ( CaBP ) 复合物 ( CaBP-HA ( CaBP-HA ) )，其可用作免疫学测定抗原的制剂，用于哺乳动物疾病的诊断，预后和监测。用于制备和使用复合物的方法和组合物。钙结合蛋白-HA复合物可以通过使用已经进行了血清蛋白，或纳米细菌也被称为纳米颗粒钙化 ( CNP ) 从哺乳动物 ( NB ) 合成HA服用来制备。当通过与合适的蛋白质温育制备羟基磷灰石时，结合蛋白质发生结构变化。当CaBP-HA复合物经历诸如转谷氨酰胺酶的酶时，发生二级结构变化，由此通过共价键形成结合的新表位。

SAPTA HISTOGRAM

Epitope Project Capture: Sample CP 05

