

(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2018-502818

(P2018-502818A)

(43) 公表日 平成30年2月1日(2018.2.1)

| (51) Int.Cl.                        | F I           | テーマコード (参考)       |
|-------------------------------------|---------------|-------------------|
| <b>C07K 2/00 (2006.01)</b>          | C O 7 K 2/00  | 4 H O 4 5         |
| <b>C07F 9/09 (2006.01)</b>          | C O 7 F 9/09  | C S P Z 4 H O 5 O |
| <b>C07F 9/10 (2006.01)</b>          | C O 7 F 9/10  | C                 |
| <b>C07F 9/572 (2006.01)</b>         | C O 7 F 9/572 | Z                 |
| <b>G01N 33/53 (2006.01)</b>         | G O 1 N 33/53 | N                 |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 44 頁) 最終頁に続く |               |                   |

(21) 出願番号 特願2016-570984 (P2016-570984)  
 (86) (22) 出願日 平成27年11月12日 (2015.11.12)  
 (85) 翻訳文提出日 平成28年11月29日 (2016.11.29)  
 (86) 国際出願番号 PCT/DK2015/050346  
 (87) 国際公開番号 W02016/082835  
 (87) 国際公開日 平成28年6月2日 (2016.6.2)  
 (31) 優先権主張番号 PA201470739  
 (32) 優先日 平成26年11月26日 (2014.11.26)  
 (33) 優先権主張国 デンマーク (DK)  
 (31) 優先権主張番号 PA201570273  
 (32) 優先日 平成27年5月11日 (2015.5.11)  
 (33) 優先権主張国 デンマーク (DK)

(71) 出願人 516358222  
 スーデンダスク ユニヴァシテーツ  
 SYDDANSK UNIVERSITET  
 デンマーク M オデンセ DK-245  
 O コンピーシヴァイ 55  
 Campusvej 55, DK-523  
 O Odense M Danmark  
 (74) 代理人 110002170  
 特許業務法人翔和国際特許事務所  
 (72) 発明者 キラ イリーナ アスタホフ  
 デンマーク SV コペンハーゲン DK  
 -2450 サッドジョーンズ ヴァイ  
 6

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体分子認識のための新規の人工リン脂質-タンパク質共役体

## (57) 【要約】

【課題】自己免疫疾患の研究及び臨床診断の双方において、標的抗体の検出の安定性、感度、及び選択性が高いカルジオリピン及び他のリン脂質の新しい合成類似体を提供すること。

【解決手段】自己抗体、特にリン脂質に対する自己抗体の識別に有用なリン脂質-ペプチド又はリン脂質-タンパク質共役体が提供される。更に、リン脂質-ペプチド及びリン脂質-タンパク質共役体の中間体、及びそれらの調製方法、及び合成方法が提供される。

【選択図】図1

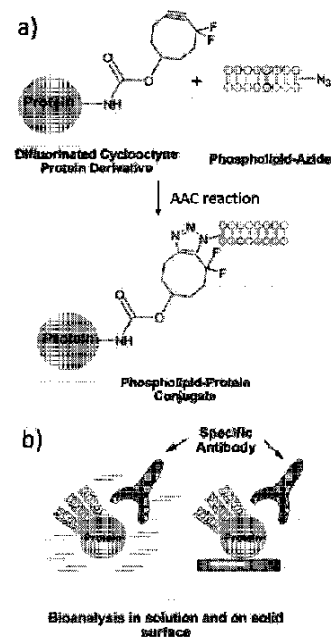


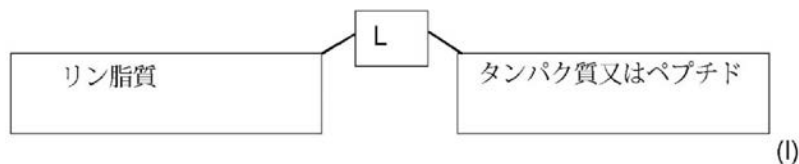
Fig. 1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下の式 (I) のリン脂質タンパク質共役体であって、

## 【化 1】



L が、1, 2, 3 - トリアゾール、一般式  $RC(O)NHR'$  のアミド、ポリエチレングリコール (PEG)、又はそれらの組み合わせ等のリンカーであり、R はリン脂質であり、R' はタンパク質 / ペプチドであり、前記リン脂質及びタンパク質又はペプチドが生物学的に相補的である、リン脂質タンパク質共役体。

10

## 【請求項 2】

前記タンパク質又はペプチドが、 $\beta 2$  - 糖タンパク質 I、プロトロンビン、及び少なくとも 10 であり最大で 100 までのアミノ酸残基を有する合成ペプチドから選択される、請求項 1 に記載のリン脂質 - ペプチド又はリン脂質 - タンパク質共役体。

## 【請求項 3】

前記リン脂質が、カルジオリピン、1, 2 - ジステアロイル - ホスホエタノールアミン等のホスホエタノールアミンの脂肪酸誘導体から選択される、請求項 1 又は 2 に記載のリン脂質 - ペプチド又はリン脂質 - タンパク質共役体。

20

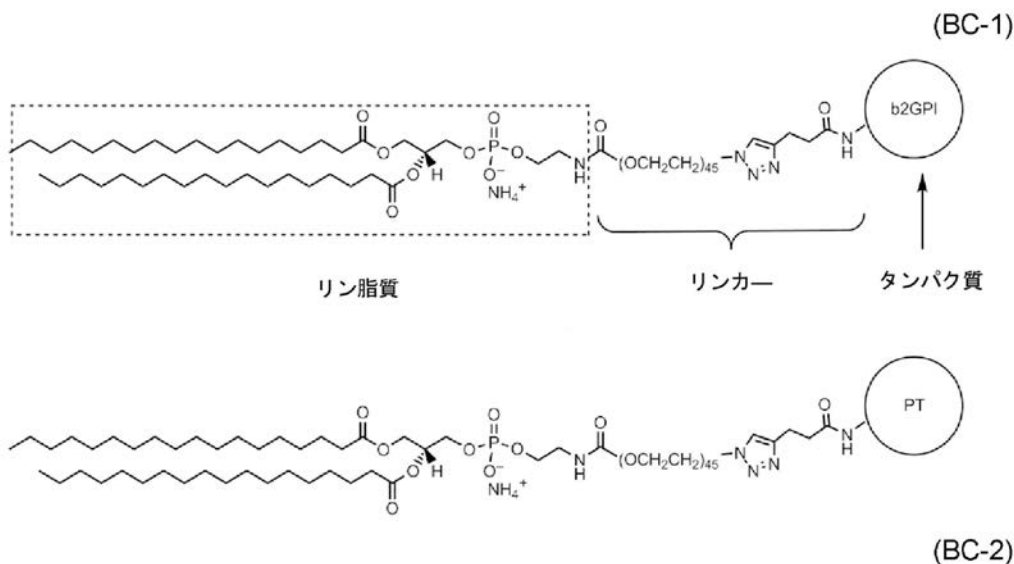
## 【請求項 4】

前記リンカーが、アミドによって共役された 1, 2, 3 - トリアゾールである、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載のリン脂質 - ペプチド又はリン脂質 - タンパク質共役体。

## 【請求項 5】

前記共役体が式 BC - 1 及び BC - 2 の化合物から選択され、

## 【化 2】

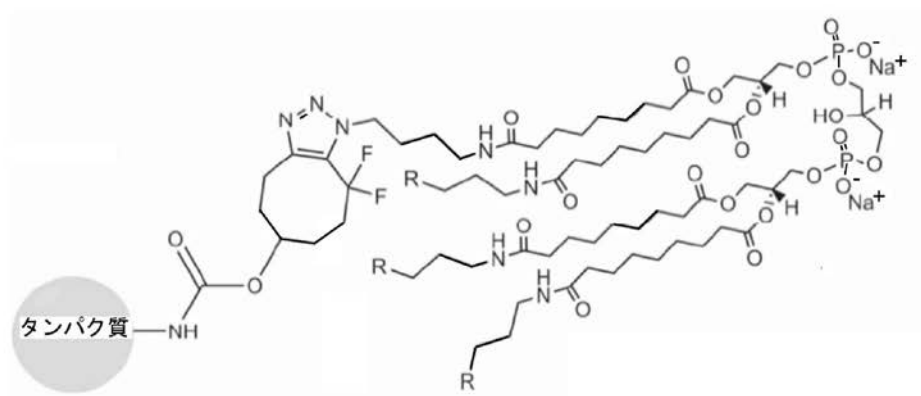


b2GPI が  $\beta 2$  - 糖タンパク質 I を表し、PT がプロトロンビンを表す、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載のリン脂質 - ペプチド又はリン脂質 - タンパク質共役体。

## 【請求項 6】

以下の式を有する、請求項 1 に記載のリン脂質 - タンパク質共役体。

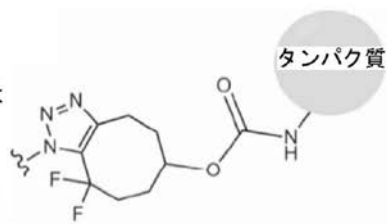
## 【化 3】



10

(BC-3)

式中、

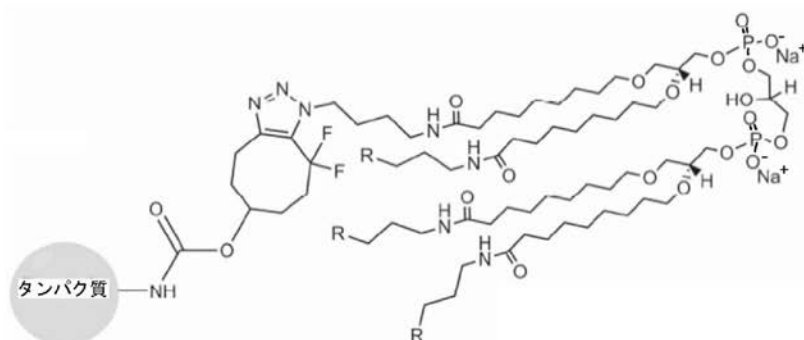
RはN<sub>3</sub> 又は

## 【請求項 7】

以下の式を有する、請求項 1 に記載のリン脂質 - タンパク質共役体。

20

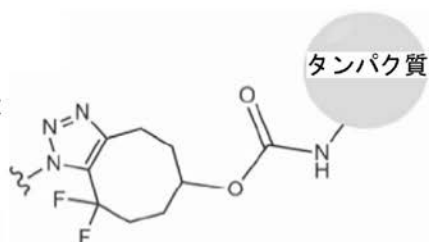
## 【化 4】



30

(BC-4)

式中、

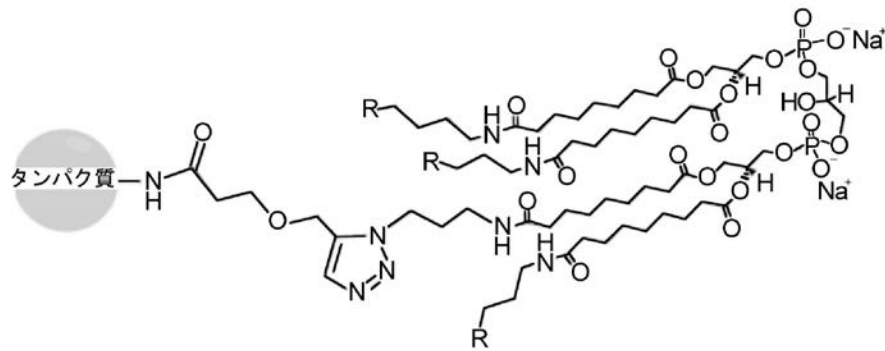
RはN<sub>3</sub> 又は

40

## 【請求項 8】

以下の式を有する、請求項 1 に記載のリン脂質 - タンパク質共役体。

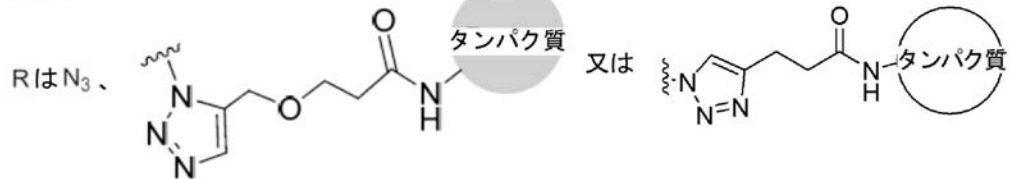
## 【化 5】



(BC-5)

10

式中、

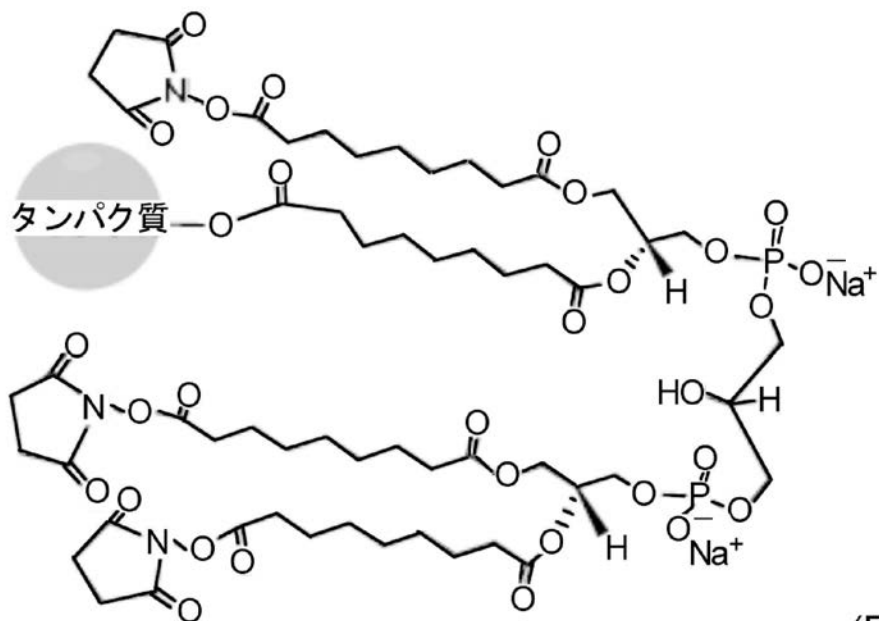


## 【請求項 9】

以下の式を有する、請求項 1 に記載のリン脂質 - タンパク質共役体。

20

## 【化 6】



(BC-6)

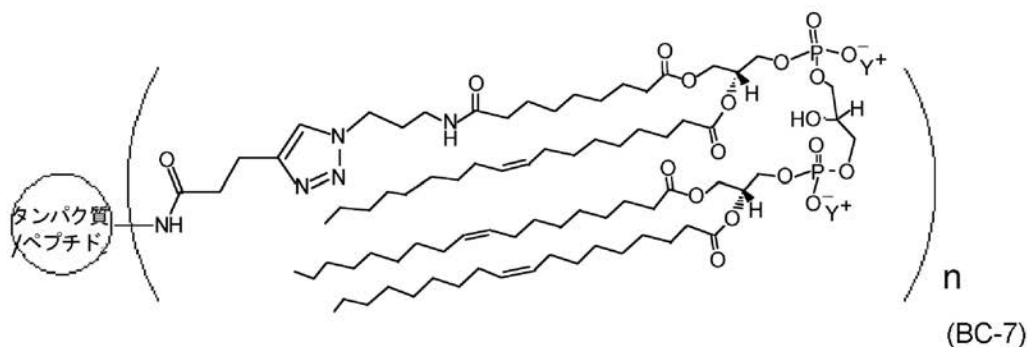
30

40

## 【請求項 10】

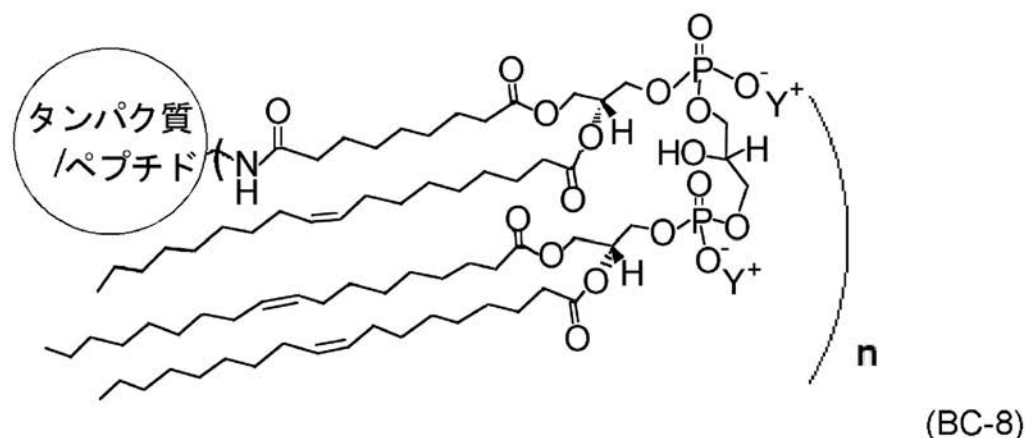
以下の式 (BC - 7) 及び (BC - 8) を有する化合物から成る群から選択され、

## 【化 7】



10

## 【化 8】



20

n が 1 ~ 20 の範囲内の整数であり、 $Y^+$  が任意の適切なカチオンである、請求項 1 に記載のリン脂質 - タンパク質共役体。

## 【請求項 1 1】

$Y^+$  が  $Na^+$ 、 $K^+$ 、又は  $1/2 Ca^{2+}$  である、請求項 10 に記載のリン脂質 - タンパク質共役体。

30

## 【請求項 1 2】

前記タンパク質/ペプチドが、 $\beta 2$  - 糖タンパク質 I、プロトロンビン、及び少なくとも 10 であり最大で 100 までのアミノ酸基を有する合成ペプチドから成る群から選択される、請求項 10 から 11 のいずれか 1 項に記載のリン脂質 - タンパク質共役体。

## 【請求項 1 3】

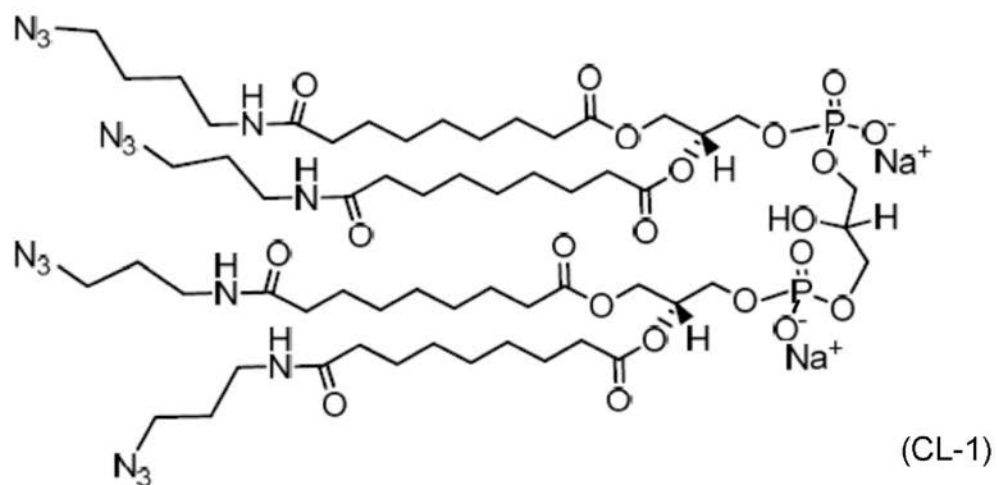
前記タンパク質/ペプチドが、 $\beta 2$  - 糖タンパク質 I、プロトロンビンから成る群から選択される、請求項 10 から 11 のいずれか 1 項に記載のリン脂質 - タンパク質共役体。

## 【請求項 1 4】

以下の式 (CL - 1) から (CL - 6) の 1 つから選択され、

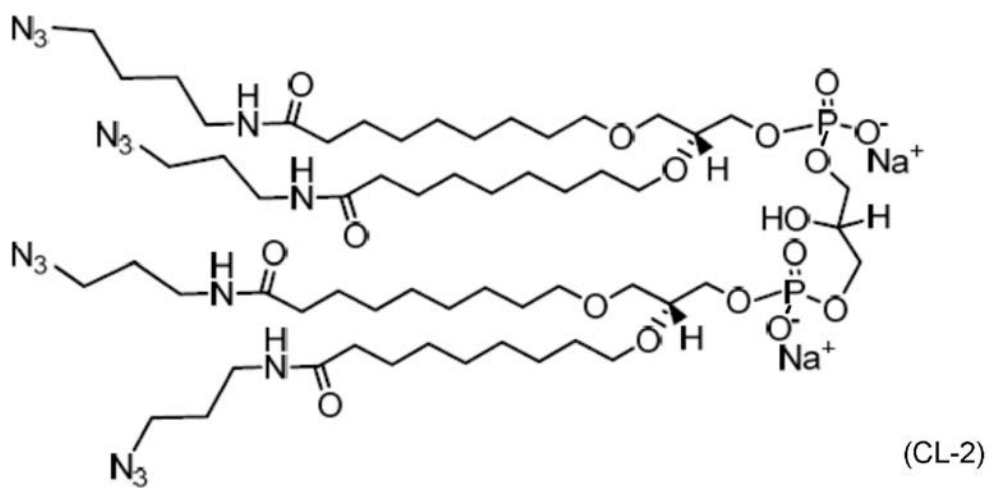
40

【化 9】



10

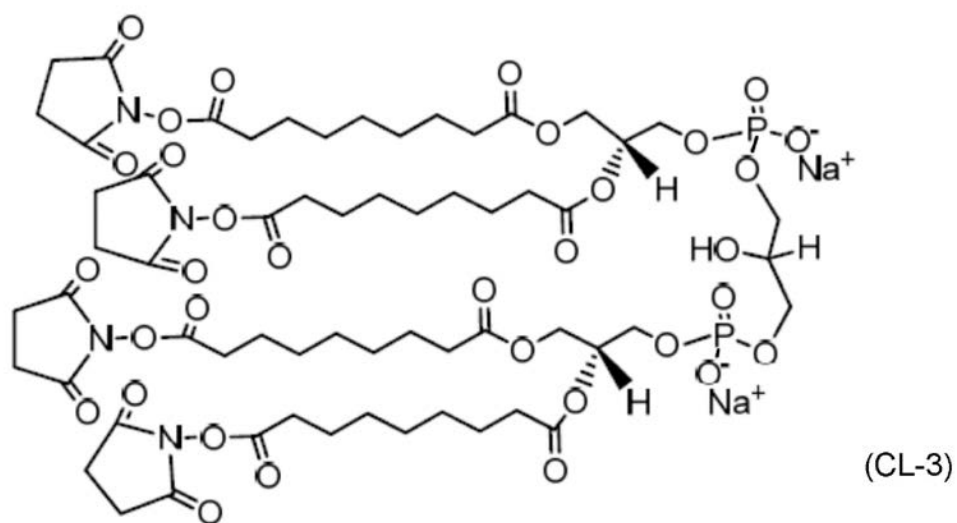
【化 10】



20

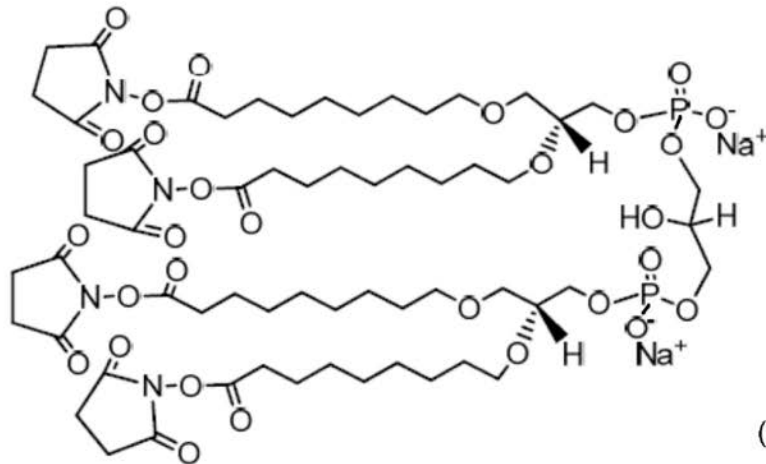
30

【化 11】



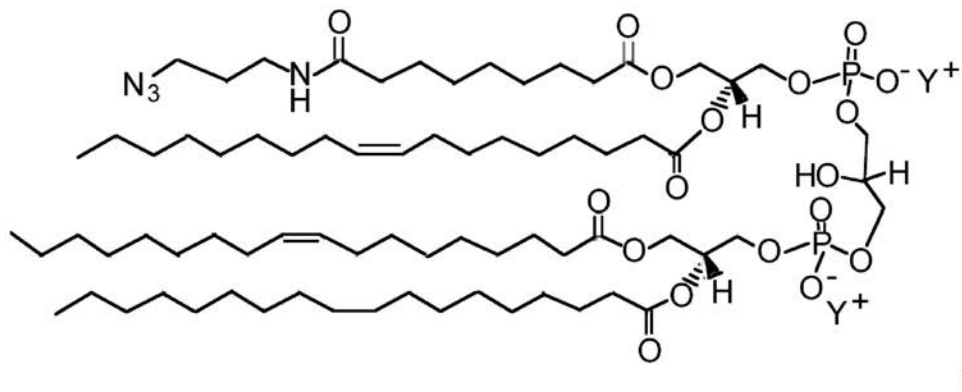
40

## 【化 1 2】



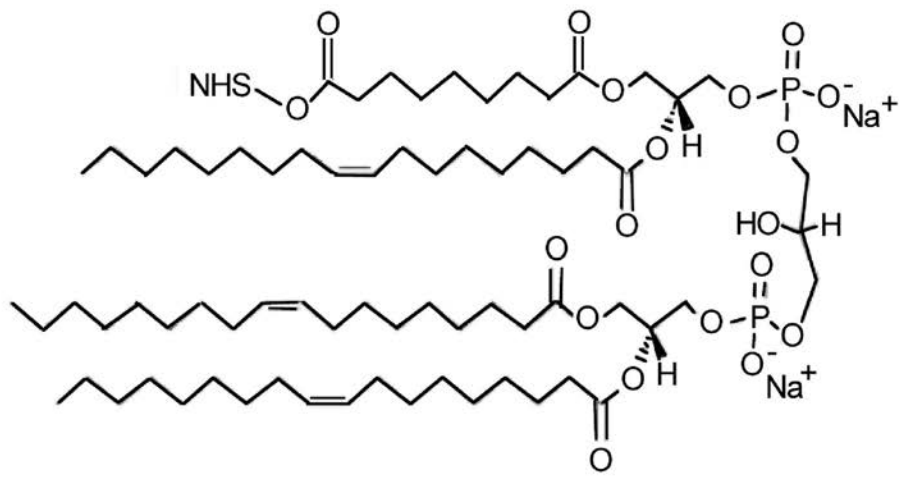
10

## 【化 1 3】



20

## 【化 1 4】



30

40

$Y^+$ が任意の適切なカチオンであり得る、タンパク質又はペプチドと共役するための、カルジオリピン類似体。

## 【請求項 1 5】

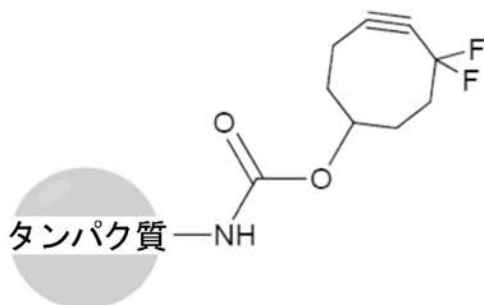
$Y^+$ が $Na^+$ 、 $K^+$ 、又は $1/2 Ca^{2+}$ である、請求項 1 4 に記載のカルジオリピン類似体。

## 【請求項 1 6】

以下の式の化合物から成る群から選択されるタンパク質又はペプチド誘導体：

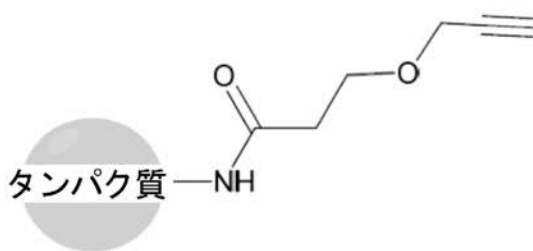
50

## 【化 1 5】



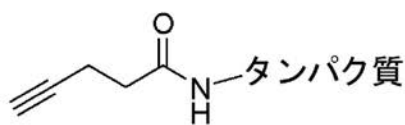
(int-1)

10



(int-2)

20



(int-3)

## 【請求項 17】

前記タンパク質が、 $\beta$ 2-糖タンパク質I、プロトロンビン、及び少なくとも10であり最大で100までのアミノ酸残基を有する合成ペプチドから成る群から選択される、請求項16に記載のタンパク質又はペプチド誘導体。

30

## 【請求項 18】

前記タンパク質が、 $\beta$ 2-糖タンパク質I、プロトロンビンから成る群から選択される、請求項16に記載のタンパク質又はペプチド誘導体。

## 【請求項 19】

請求項1から13のいずれか1項に記載の前記共役体に対する自己免疫抗体を検出するための酵素結合免疫吸着検査法(ELISA)。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

40

本発明は、自己抗体、特にカルジオリピン等のリン脂質及びカルジオリピン-b2-糖タンパク質I(アポリポタンパク質H)等のリン脂質-タンパク質複合体に対する自己抗体を識別するのに有用なリン脂質-ペプチド及びリン脂質-タンパク質共役体(conjugate)に関する。本発明は更に、リン脂質類似体と、そのような類似体並びにリン脂質-ペプチド及びリン脂質-タンパク質共役体を調製するための方法と、を提供する。

## 【背景技術】

## 【0002】

生体分子の合成類似体は、人の疾患の研究及び臨床診断における分子認識のための極めて重要で多様なツールを含んでいる。近年、ナノバイオテクノロジー及び生体分子認識のための合成プローブに関して、人工的な核酸及びタンパク質の生物共役体(biocon

50

j u g a t e ) の調製では著しい進展があった。更に、新しい銅触媒を用いるアジド - アルキン環化付加及び歪みで促進される銅フリーのアジド - アルキン環化付加 ( C u A A C 及び S P A A C ) クリックケミストリー反応は、生物共役の有効であり、優れた収率で安定した生成物が得られることが証明された。しかしながら、C u A A C / S P A A C クリックケミストリーは、脂質の生物共役の分野では詳細な調査が行われていない。

#### 【 0 0 0 3 】

脂質は、生物における最も重要なプロセスに関与する生体分子であり、従って、人の疾患の分子診断及び研究には極めて重要である。脂質は、他の生体分子よりも水媒体の溶解度が低く、酸化に対する感受性が高いので、生物共役には非常に困難な物体である。

#### 【 0 0 0 4 】

C u A A C 及び S P A A C クリックケミストリー反応によって典型的に示される近年の生物共役戦略の進展 ( 非特許文献 1 参照 ) は、人工的な脂質生物共役体の調製を更に推進するための基礎となる可能性がある。

#### 【 0 0 0 5 】

自己免疫疾患の診断は過去 5 0 年間にわたって行われてきたが、今なお対処すべき疑問及び問題は多い。例えば、自己のリン脂質に対する抗体は、人の抗リン脂質症候群 ( A P S : A n t i p h o s p h o l i p i d e s y n d r o m e ) の最大の謎の 1 つである。A P S は、血栓症及び反復性 ( r e c u r r e n t ) 妊娠損失を含む多くの発現及び重大な損害を患者に引き起こす自己免疫疾患である。かつて、A P S の診断には、哺乳動物のミトコンドリア内膜の重要成分のリン脂質であるカルジオリピンに対する抗体の検出が必要であった。

#### 【 0 0 0 6 】

しかしながら、いくつかのウィルス及び細菌感染を有する患者で抗体が生成されることがわかった。更に、近年、カルジオリピンに対する一部の抗体はカルジオリピンそのものではなく、カルジオリピンに結合する血漿タンパクの  $\beta 2 - G P I$  に対するものであることが実証された。このため、A P S の最新の診断では、抗カルジオリピン抗体、抗  $\beta 2 - G P I$  抗体、他のリン脂質 ( ホスファチジルセリンを含む ) に対する抗体、及びループスアンチコアグラントと呼ばれる混合リン脂質の抗体について、別個の試験が必要である。

そのような診断手法は時間がかかり、費用も高い。更に、抗カルジオリピン抗体についての現在の試験は天然源から得られた不均質なリン脂質分子を使用しているので、化学安定性が低く、選択性が低く、異なる作業グループ間で結果に著しい不一致が生じる。

#### 【 0 0 0 7 】

特許文献 1 は、クリック反応基、リンカー、及び求核基を含む担体分子を有する化合物について記載している。反応基は、標準的な N - ヒドロキシスクシンイミド ( S E ) エステル及びペルフルオロフェノール ( P F P : p e r f l u o r o p h e n o l i c ) エステルよりも加水分解安定性が高く、介在リンカーを介してクリック反応基に付着されるとクリック標識試薬を形成する。

#### 【 先行技術文献 】

#### 【 特許文献 】

#### 【 0 0 0 8 】

【 特許文献 1 】 W O 2 0 1 2 / 1 3 4 9 2 5 A 1 号

#### 【 非特許文献 】

#### 【 0 0 0 9 】

【 非特許文献 1 】 M . G . P a u l i c k , A . R . W i s e , M . B . F o r s t n e r , J . T . G r o v e s , C . R . B e r t o z z i , J . A m . C h e m . S o c . , 2 0 0 7 年、1 2 9、1 1 5 4 3

#### 【 発明の概要 】

#### 【 発明が解決しようとする課題 】

#### 【 0 0 1 0 】

自己免疫疾患の研究及び臨床診断の双方において、標的抗体の検出の安定性、感度、及

10

20

30

40

50

び選択性が高いカルジオリピン及び他のリン脂質の新しい合成類似体が強く望まれている。

【課題を解決するための手段】

【0011】

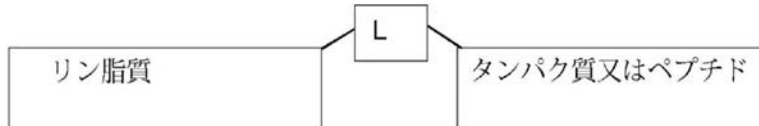
本発明は、標的抗体の検出の安定性、感度、及び選択性が向上した新規のリン脂質 - ペプチド及びリン脂質 - タンパク質共役体を提供する。これらの新規のリン脂質 - ペプチド及びリン脂質 - タンパク質共役体は、人の自己免疫疾患の研究及び診断、特にカルジオリピン等のヒトリン脂質に対する自己抗体の識別に有用である。

【0012】

本発明の第1の態様において、以下の式のリン脂質タンパク質共役体を提供される。

10

【化1】



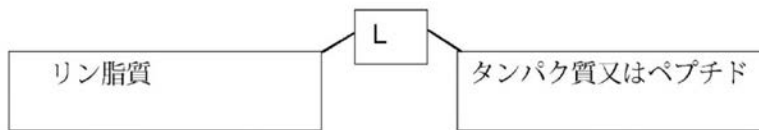
Lは、1, 2, 3 - トリアゾール、アミド、又はそれらの組み合わせ等のリンカーであり、リン脂質及びタンパク質は生物学的に相補的である、すなわちインビボ (in vivo) で相互作用する。

【0013】

本発明の代替的な実施形態において、以下の式 (I) のリン脂質タンパク質共役体を提供される。

20

【化2】



Lは、1, 2, 3 - トリアゾール、一般式  $RC(O)NHR'$  のアミド、ポリエチレングリコール (PEG)、又はそれらの組み合わせ等のリンカーであり、Rはリン脂質でR'はタンパク質/ペプチドであり、リン脂質及びタンパク質又はペプチドは生物学的に相補的である。

30

【0014】

本発明の好適な実施形態において、リン脂質 - ペプチド共役体及びリン脂質 - タンパク質共役体のタンパク質又はもっと短いペプチド部分、例えば10から100のアミノ酸は、 $\beta 2$  - GPI及びプロトロンビンから選択される。特に好適な実施形態において、本発明者は、1, 2, 3 - トリアゾールリンカーを介して、生物学的に相補的な分子、すなわち、ホスホエタノールアミンとヒト $\beta 2$  - 糖タンパク質I及びプロトロンビン、並びにカルジオリピンと一連の免疫原性ペプチド及びタンパク質 (ヒト $\beta 2$  - 糖タンパク質I、プロトロンビン、及びそれらのフラグメント) を共有結合した。好ましくは、リン脂質は、カルジオリピン、1, 2 - ジステアロイル - ホスホエタノールアミン等のホスホエタノールアミンの脂肪酸誘導体から選択される。タンパク質及びペプチドは、末端アミノ末端、又はリシン等のアミノ酸を含有するアミンを介して、リンカーに結合することができる。

40

【0015】

得られたリン脂質 - ペプチド共役体及びリン脂質 - タンパク質共役体は、自己免疫複合体に対する自己免疫抗体について驚くほど高い結合親和性及び特異性を示す。従って、これらの共役体は、抗リン脂質症候群や全身性エリテマトーデス等、上記のリン脂質及びタンパク質に対する自己抗体の生成を伴う自己免疫疾患の診断及び治療において極めて有用である。また、これら新規の共役体では驚くべきことに保存時の安定性が向上した。

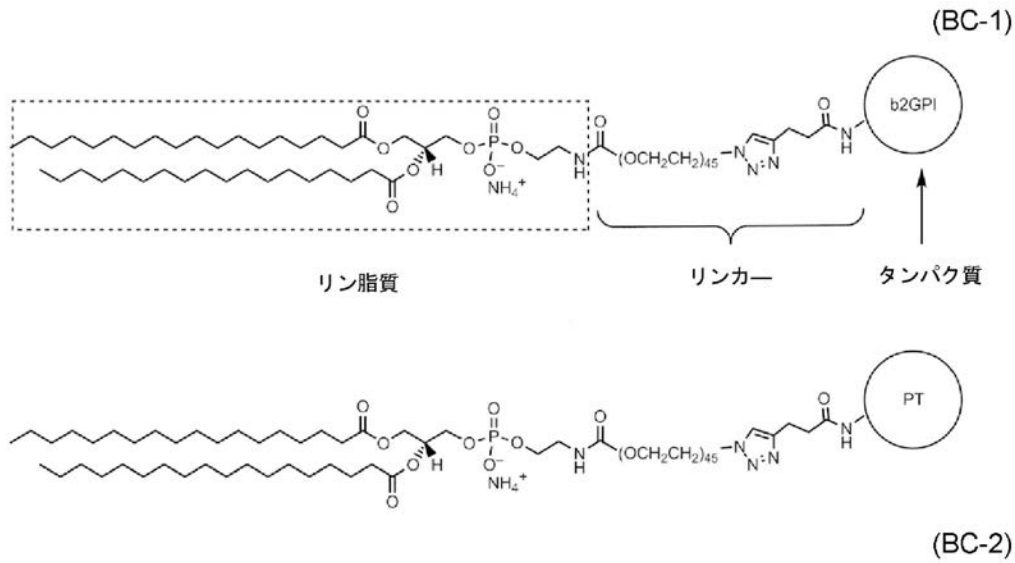
【0016】

本発明の好適な生物共役体

50

本発明の好適な生物共役体は、以下の式（BC-1）及び（BC-2）から成る群から選択することができる。

【化3】



10

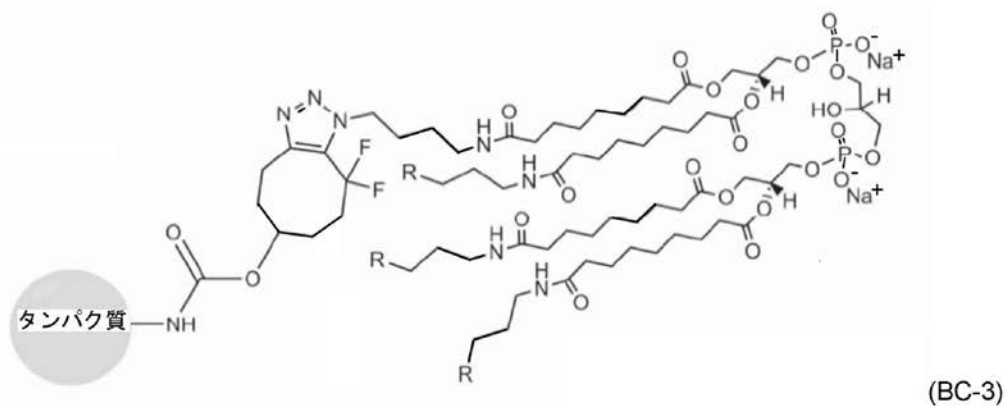
式中、b2GPIは $\beta$ 2-糖タンパク質Iを表し、PTはプロトロンピンを表す。

20

【0017】

本発明に従った更に別の有用な共役体は、以下から成る群から選択された化合物である。

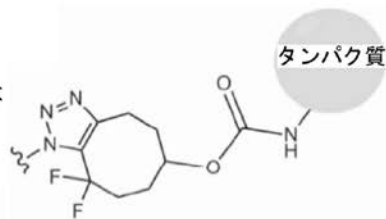
【化4】



30

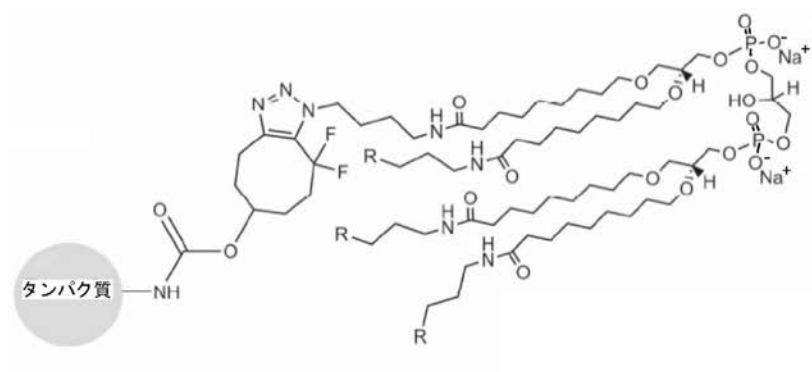
式中、

Rは $N_3$ 又は



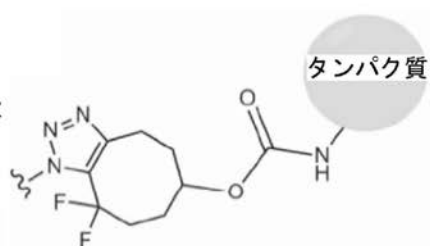
40

## 【化 5】



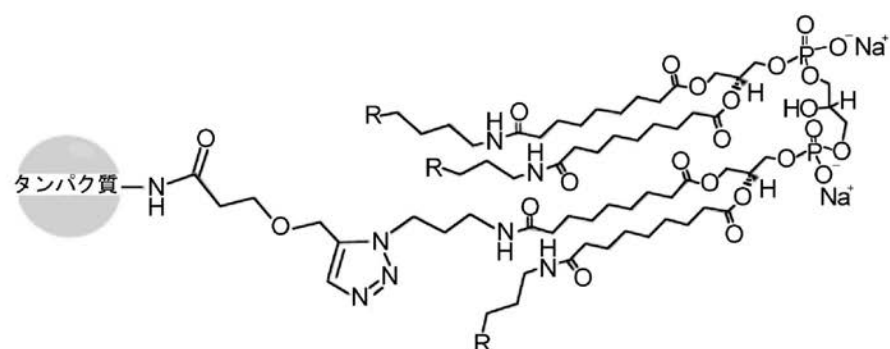
10

式中、

RはN<sub>3</sub> 又は

20

## 【化 6】



30

式中、

RはN<sub>3</sub>、

40

タンパク質

Chemical structure of a cardiolin derivative, showing a glycerol backbone with three fatty acid chains. The structure is labeled "タンパク質" (Protein) on the left.

10

## 20

タンパク質ペプチド

Chemical structure of a lipid-modified protein. The structure shows a protein chain (タンパク質ペプチド) linked to a lipid chain. The lipid chain consists of a triazole ring, a long alkyl chain, and a phosphate group. The phosphate group is linked to a glycerol backbone, which is further linked to a long alkyl chain. The structure is enclosed in large parentheses with a subscript 'n'.

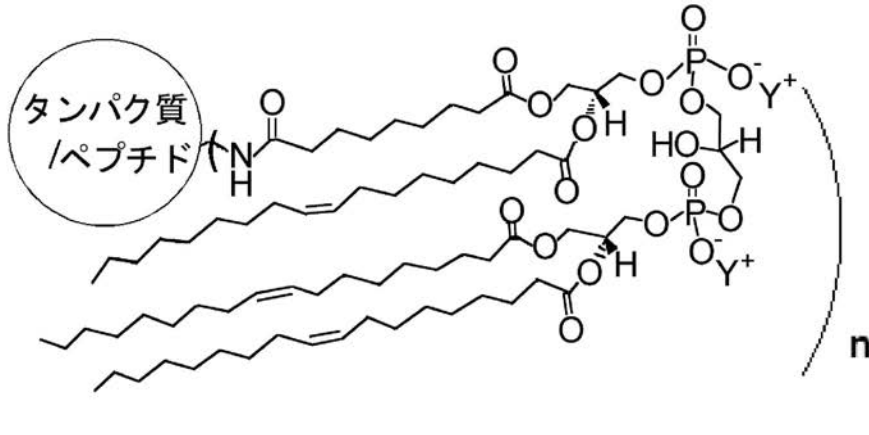
30

40

## 50

更に別の好適な実施形態において、本発明の共役体は、式（ＢＣ－８）の共役体である。

【化９】



10

n は整数であり、1～20の範囲内とすることができ、例えば5～15であり、好ましくは10～13である。タンパク質/ペプチド部分は、β2-糖タンパク質Ⅰ及び/又はプロトンピンを含む本発明のタンパク質及びペプチドのいずれかとすればよい。タンパク質/ペプチドがプロトンピンである場合、n は好ましくは12～13である。タンパク質部分がβ2糖タンパク質Ⅰである場合、n は好ましくは10～11である。Y<sup>+</sup>は任意の適切なカチオンとすればよい。好ましくは、Y<sup>+</sup>はNa<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、又は1/2Ca<sup>2+</sup>とすることができる。

20

【0023】

本発明の別の態様は、式（Ⅰ）及び/又は式（ＢＣ－１）から（ＢＣ－８）の共役体を用いて自己免疫抗体を検出するための方法である。別の態様は、式（Ⅰ）及び/又は式（ＢＣ－１）から（ＢＣ－８）の共役体に対する自己免疫抗体を検出するための酵素結合免疫吸着検査法（ＥＬＩＳＡ）である。好適な共役体は、（ＢＣ－７）及び（ＢＣ－８）であり、特に（ＢＣ－８）である。

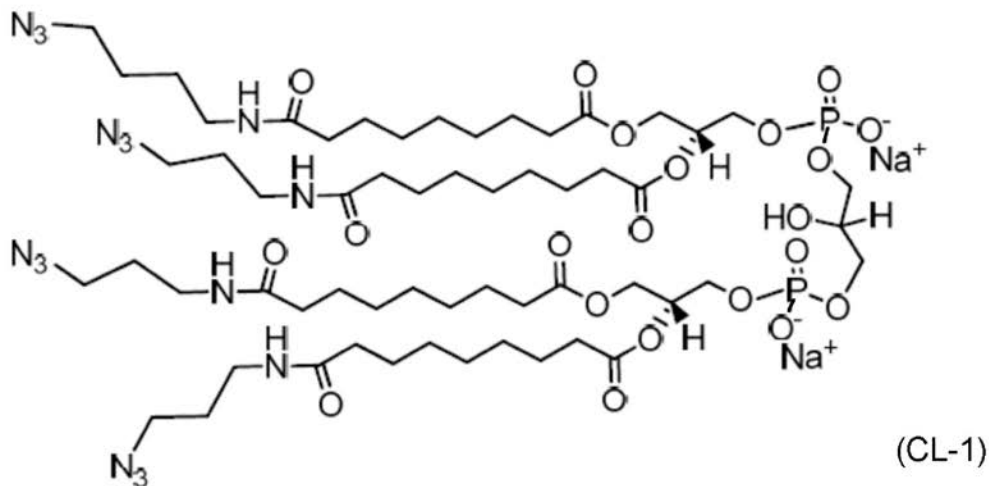
30

【0024】

本発明の好適なリン脂質中間体

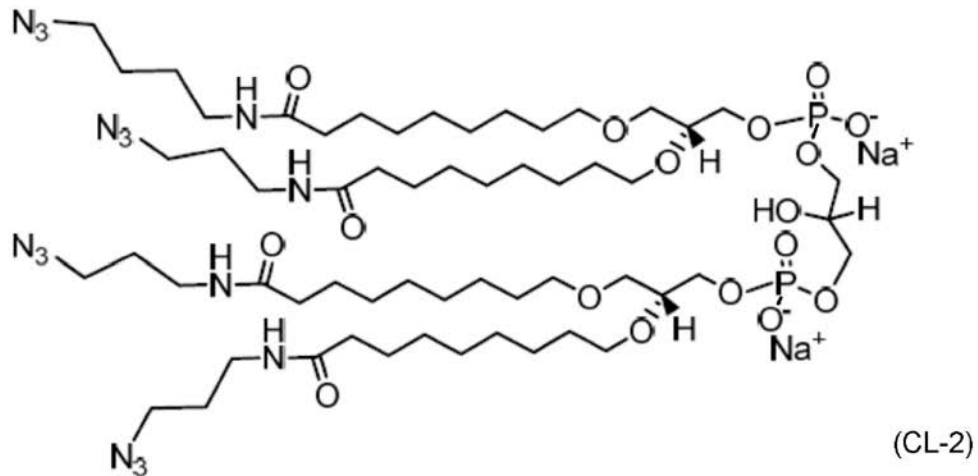
本発明は更に、以下から成る群から選択されたペプチド又はタンパク質との共役のためのカルジオリピン類似体（ＣＬ－１）～（ＣＬ－４）を提供する。

【化１０】



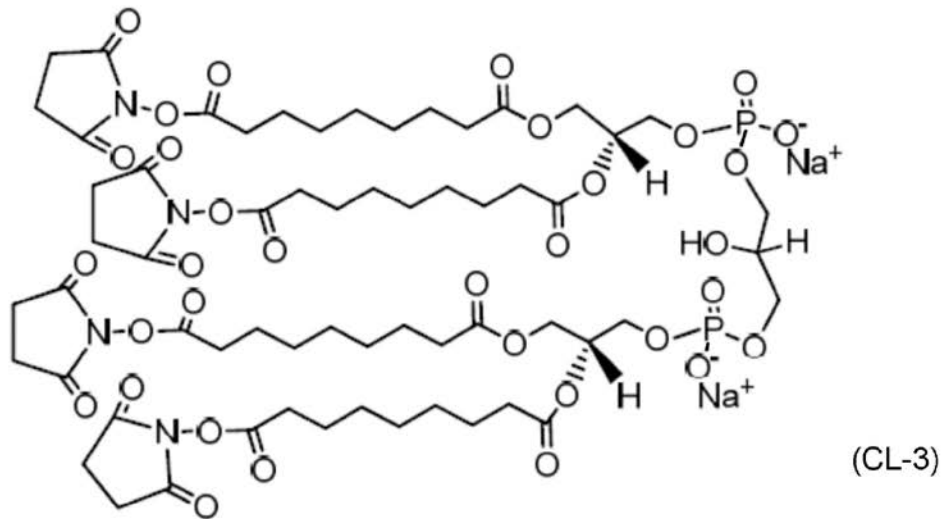
40

## 【化 1 1】



10

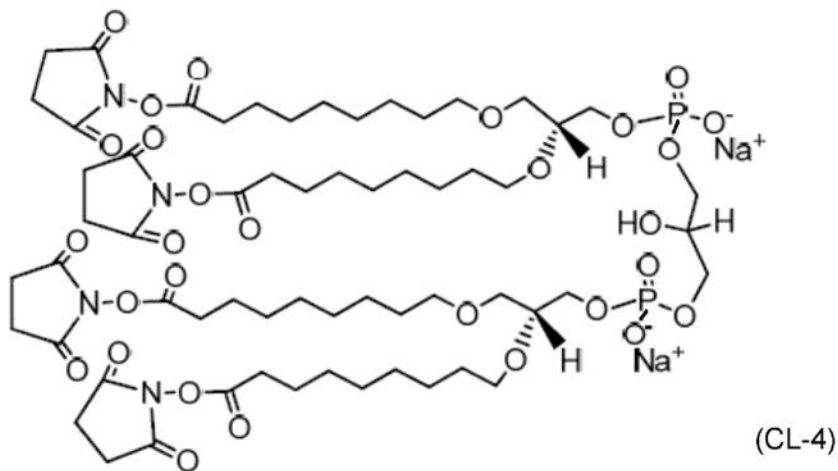
## 【化 1 2】



20

30

## 【化 1 3】



40

## 【0025】

重要な点として、CL-1からCL-4では、 $\text{Na}^+$ を、 $\text{K}^+$ 又は $\text{Ca}^{2+}$ 等の他の任意の適切なカチオンで置き換えることができる。

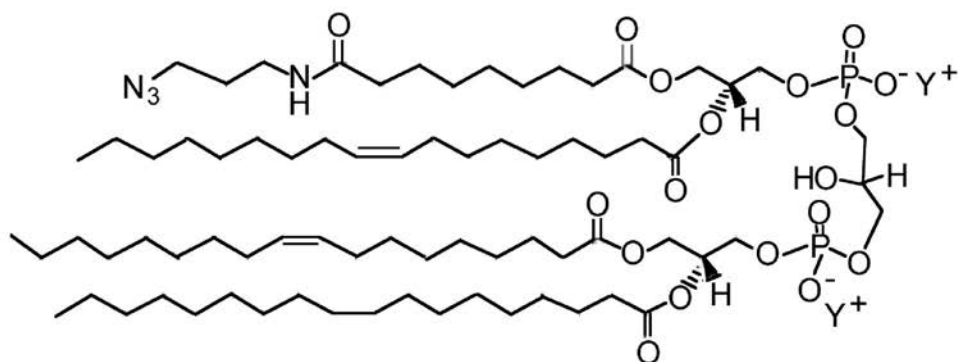
## 【0026】

本発明の好適な実施形態では、ペプチド又はタンパク質との共役のためのカルジオリピ

50

ン類似体は、式 ( C L - 5 ) 及び式 ( C L - 6 ) から成る群から選択された化合物である。

【化 1 4】

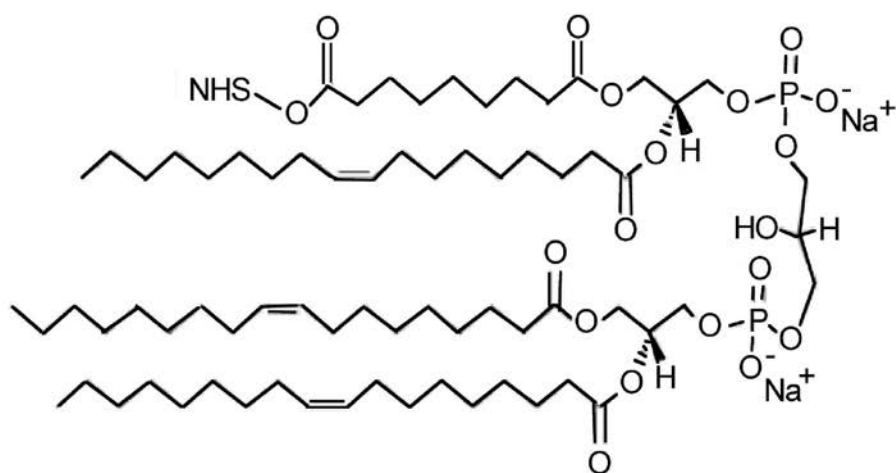


(CL-5)

10

$Y^+$  は任意の適切なカチオンとすればよい。好ましくは、 $Y^+$  は、 $Na^+$ 、 $K^+$ 、又は  $1/2 Ca^{2+}$  とすることができる。

【化 1 5】



(CL-6)

20

30

NHS は N - ヒドロキシスクシンイミドを表す。( C L - 6 ) では、 $Na^+$  を、 $K^+$  又は  $1/2 Ca^{2+}$  等の他の任意の適切なカチオンで置き換えることができる。

【0027】

上述の試薬は、本発明に従って適用可能である広範囲にわたる同様の化合物からのいくつかの例である。

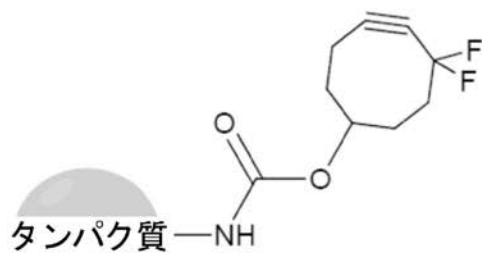
【0028】

本発明の好適なタンパク質及びペプチド中間体

本発明は更に、本発明の共役体の調製に有用な、以下の一般式 ( i n t - 1 ) ~ ( i n t - 3 ) から選択されるペプチド及びタンパク質誘導体を提供する。

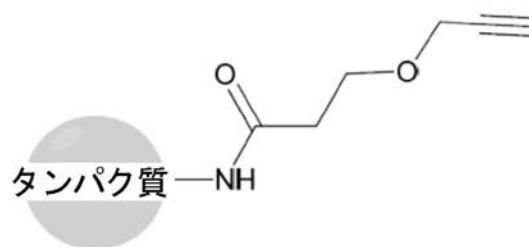
40

## 【化 1 6】



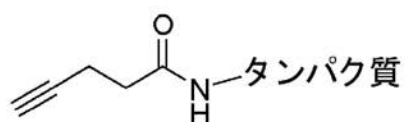
(int-1)

10



(int-2)

20



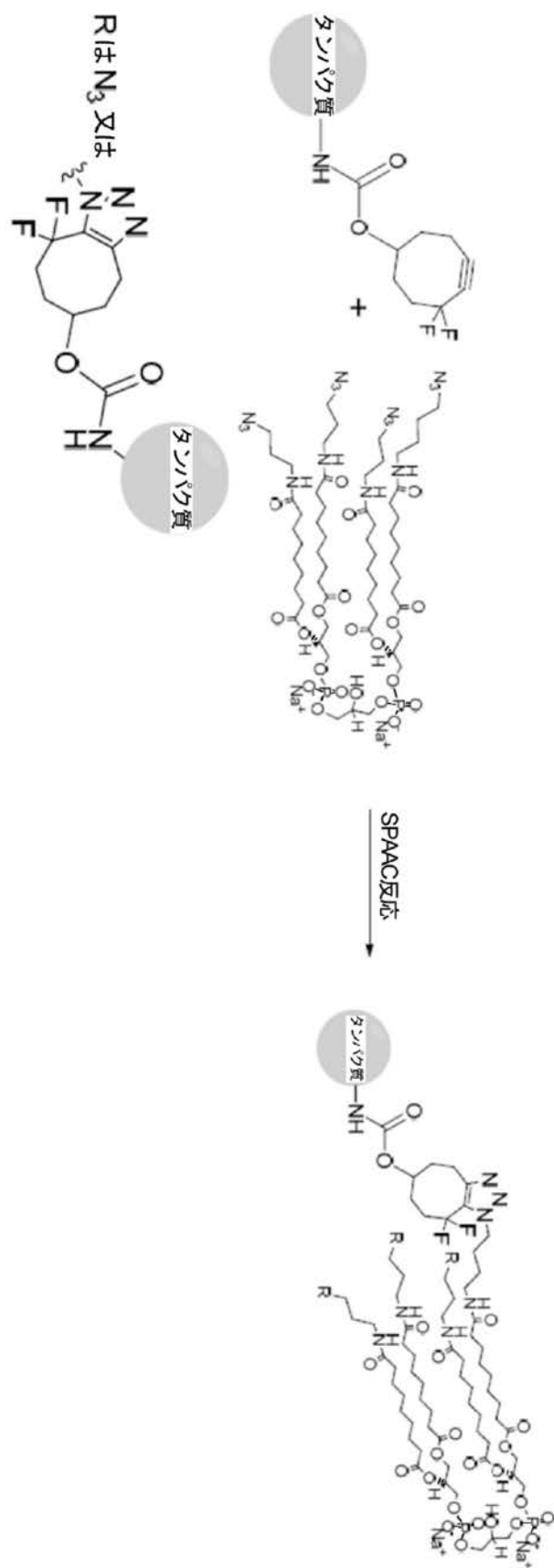
(int-3)

## 【 0 0 2 9 】

本発明の更に別の態様では、本発明のリン脂質 - ペプチド及びリン脂質 - タンパク質共役体を調製するための方法が提供される。この方法は、以下のスキーム I、スキーム I I、又はスキーム I I I に従って、本発明のタンパク質誘導体をカルジオリピンリン脂質と反応させることを含む。

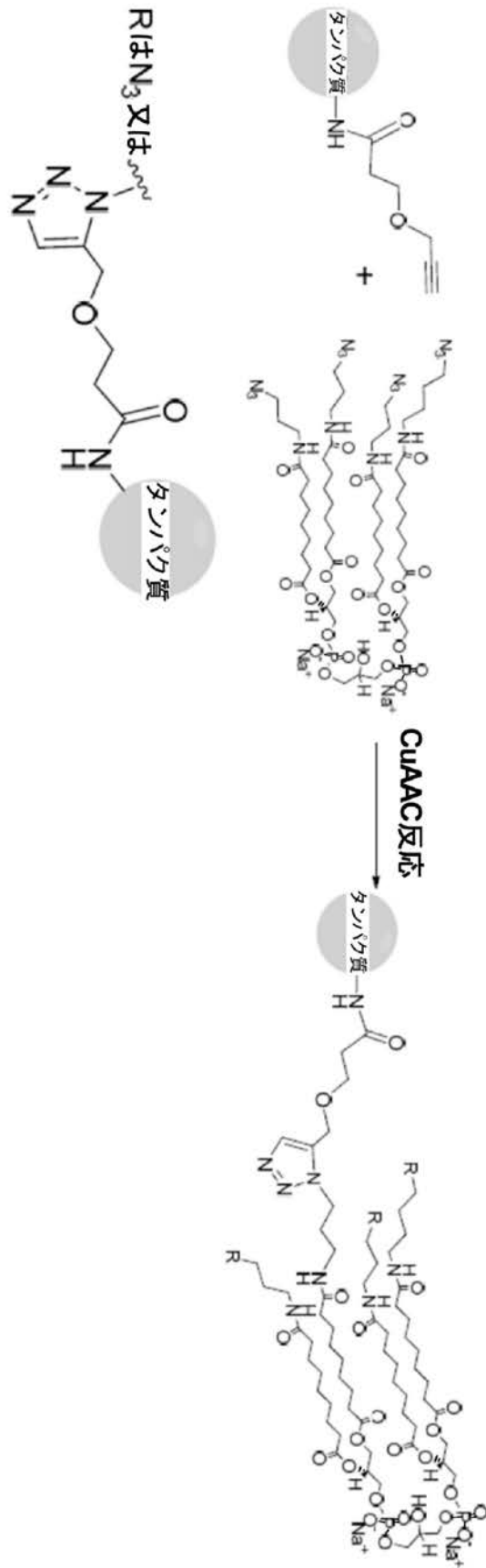
30

【化 1 7】



スキームI

【化 1 8】



スキームII

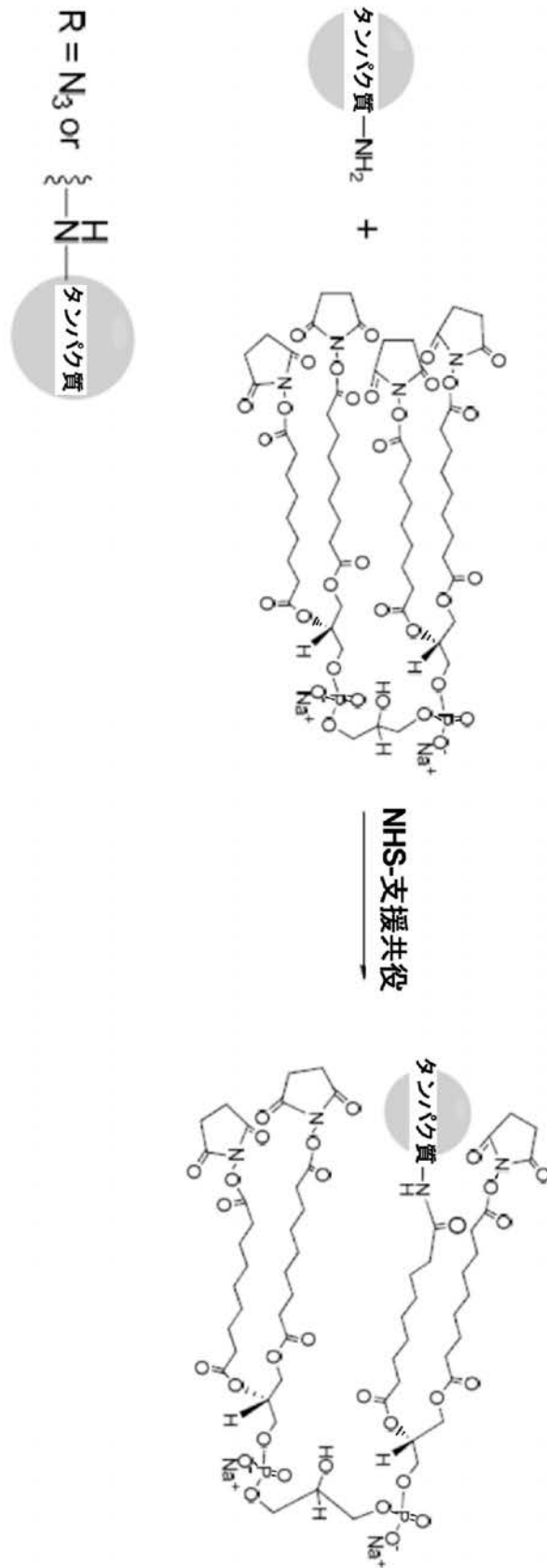
10

20

30

40

【化 1 9】



スキームⅢ

【 0 0 3 0 】

「タンパク質」部分は、 $\beta 2$ -GPI及びプロトロンビンを含む本発明のタンパク質及びペプチドのいずれかとすればよい。

#### 【0031】

本発明の更に別の態様では、抗リポイド抗体に対する抗原の抗原性及び特異性を維持しながら、カルジオリピン類似体（又は本明細書に記載するように修飾されたカルジオリピンを含むリポイド抗原）をペプチド/タンパク質（又は固体支持体）に付着させるための手法が提供される。本明細書に記載する方法を用いて、カルジオリピン-付着分子複合体を生成することができる。このように免疫原性カルジオリピン複合体を付着させる能力によって、ELISA及び免疫学的検定デバイス等の非溶液ベースの免疫学的検定における使用が可能となる。

10

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0032】

【図1】SPAACクリックケミストリーによって新規の生物共役体を調製するための合成戦略を示す。図1bは、均質フォーマット及び2Dアレイフォーマットにおける新規のリン脂質-ペプチド及びリン脂質-タンパク質生物共役体による特異抗体の検出を示す。

【図2】化学安定性が向上した新規のカルジオリピン類似体を合成するための一般的な戦略を示す。

【図3】本発明の抗原に対する自己免疫抗体を検出するための酵素結合免疫吸着検査法（ELISA）のスキームを示す。

【図4】自己免疫抗体のELISA検出における本発明のリン脂質抗原の性能比較を示す。

20

【図5】カルジオリピン- $\beta 2$ -GPI及びカルジオリピン-PT複合体、特に化合物7及び8の合成戦略を示す。試薬及び条件：(i) 0.1Mの重炭酸塩緩衝剤-DMSO 9:1、4、12時間。(ii) 対応するアジド、 $\text{CuSO}_4$ :TBTA 1:1.1、アスコルビン酸、1xPBS-DMSO-tBuOH 3:2:0.1、v/v/v、(iii)  $\text{KMnO}_4$ 、 $\text{NaIO}_4$ 、t-BuOH-H<sub>2</sub>O 9:1、v/v、室温、12時間。(iv) スクシンイミドエステル、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、DMSO、室温、12時間。(v) タンパク質2、3、8、0.1M重炭酸塩緩衝剤-DMSO 9:1、v/v、室温、12時間。(vi)  $\text{KMnO}_4$ 、 $\text{NaIO}_4$ 、t-BuOH-H<sub>2</sub>O 9:1、v/v、45、1時間、マイクロ波反応器。(vii) スクシンイミドエステル、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、DMSO、室温、5時間。3-アジドプロパン-1-アミン、室温、12時間。

30

【図6】図5の化合物7~8及び対照を用いて得られたIgG ELISAアッセイの結果を示す〔抗原間でグルーブ化した患者(6B)及び健康な対照(6A)の吸収度〕。陰性及び陽性の対照(HNP及びHCL、Immunovision)を、それぞれ「x」及び星印で示す。図6Aの共役体5及び6は、それぞれ本明細書のスキームVIの化合物6及び7に対応する。

【図7】病気の状態の患者(SUHコホート)について、aPLPと臨床パラメータとの間で観察された相関のデータプロットを示す。スチューデントt検定は、排他的に図5の抗原8を用いてスミス正值性(Smith positivity)と上昇aPLPタイターとの間の相関を示した。

40

【図8】病気の状態の患者(SUHコホート)について、aPLPと臨床パラメータとの間で観察された相関の線形回帰プロットを示す。Stataを用いて最小二乗回帰(OLS)解析を行った。図5の抗原8について、スミス陰性(Smith negative)群及びスミス陽性(Smith positive)群のaPLPタイターの差は、0.002のp値で統計的に有意であることがわかった。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0033】

本明細書において、焦点となる生物共役体は、 $\beta 2$ -糖タンパク質I( $\beta 2$ -GPI)、プロトロンビン、及びそれらの短い免疫原性フラグメント（一般配列Anを有するペプ

50

チドであり、ここでAはアミノ酸、nは10から50である)に付着したカルジオリピン及びホスファチジルセリンである。図2に従って、化学安定性を高めた合成カルジオリピン類似体を調製し、次いで $\beta$ 2-糖タンパク質I又はその短いフラグメントとの生物共役に適用する。

#### 【0034】

次に、CuAAC及びSPAAC反応条件下で(図1a)、カルジオリピン及びホスファチジルセリンの新規のアジド誘導体の化学修飾を、対応するタンパク質の末端アルキン又はジフルオロシクロオクチン(difluorinated cyclooctyne)部分にリンクさせる。

#### 【0035】

自己免疫疾患の診断及び研究のためのリン脂質-ペプチド及びリン脂質-タンパク質共役体の調製において、便利な生物共役戦略を求める要望は大きい。今日まで利用可能な方法の中で、アジド-アルキン環化付加の2つの変形、すなわち銅触媒を用いるクリック反応及び歪みで促進されるクリック反応(それぞれCuAAC及びSPAAC)は、近年、インビトロ(in vitro)及びインビボの双方で安定した1,2,3-トリアゾール生成物が得られる有望な合成手法であることが実証された(H. C. Hang, J. P. Wilson, G. Charron, Acc. Chem. Res. 2011年、44、699、及びJ. A. Precher, C. R. Bertozzy, Nat. Chem. Biol. 2005年、1、13)。例えば、アジド及びアルキン官能化脂肪酸及び脂質レポーターは、CuAAC反応によって細胞への付着が成功し、脂質輸送及び代謝のための強力なツールを与えた(H. C. Hang, J. P. Wilson, G. Charron, Acc. Chem. Res. 2011年、44、699)。更に、CuAACプロトコルを用いて、いくつかの脂質レポーターによるビオチンの生物共役が高い収率で達成された(J. A. Precher, C. R. Bertozzy, Nat. Chem. Biol. 2005年、1、13)。CuAAC反応の欠点は、反応のために必要な銅の毒性が高いことである。このため、CuAAC生物共役戦略はインビトロ条件のみに制限される。一方、SPAAC手法はインビボの生物共役に広く利用されて、生物全体の細胞プロセス及び代謝経路を監視する機会を与えたが、主な焦点はタンパク質及びグリカンである(J. A. Precher, C. R. Bertozzy, Nat. Chem. Biol. 2005年、1、13)。

#### 【0036】

SPAAC手法によって生物共役を実行するため、生体分子にアジド及びシクロオクチン官能基を付着させる必要がある(図1a)。これは、市販の試薬を用い、文献に記載されたプロトコルに従って実行可能である(M. G. Paulick, A. R. Wise, M. B. Forstner, J. T. Groves, C. R. Bertozzi, J. Am. Chem. Soc. 2007年、129、11543(非特許文献1))。穏和な無毒条件下で高収率の所望の生物共役体を提供するので、SPAACクリックケミストリーは、インビトロ及びインビボの双方で生物分析に適用できる新規のリン脂質-タンパク質共役体の調製において理想的な最適の方法であるように見える。

#### 【0037】

現在の生物分析は、様々な試薬の調製を必要とし、厳密にこの方法のために適合された条件の適用も必要とするいくつかのフォーマットで実行することができる。特定の抗体を検出するための1つの有望な方法は、単純かつ迅速な技法である均質性(「オールインソリューション(all-in-solution)」)分析である(M. Chassignol, Y. Aubert, V. Roig, U. Asseline, Nucleos. Nucleot. Nucl. Acids 2007年、26、1669)。均質性分析は、例えば標的生体分子の蛍光標識及び蛍光信号を監視することによるそれらの相互作用の追跡を用いて実行することができる。もう1つの有望な生物分析方法は2Dアレイ上の固定化であり、この方法は感度が高く、標的の抗体タイプ検証の可能性があるので、人の疾患の血清診断には特に強力である。前述の方法に従って、タンパク質、ペプチド、及びDN

10

20

30

40

50

Aを2Dアレイ上で固定化することができる(A. M. Rouquette, C. Desgruelles, Lupus 2006年、15、403、及びこの中で言及された参考文献、及びA. Castro, H. Wang, WO2007/061793A2号、PCT/US2006/044572号)。しかしながら、比較的小さい脂質分子の場合、アレイに付着させるために、脂質を表面との相互作用から保護し、従って免疫原性活性の低下を防ぐタンパク質積み荷(cargo)が必要である。かつては、BSA及びKLHタンパク質に付着させた天然カルジオリピンを含有するニトロセルロースストリップを調製し、更に血清診断研究に適用した(A. Castro, H. Wang, WO2007/061793A2号、PCT/US2006/044572号)。得られた共役体は、調製後に高い免疫原性活性を与えて、未知の機構によってアレイ保存された状態で急速に劣化した(degrade)(この観察は最近、中央疫学研究機構(ロシア国モスクワ)で行われたが、反復合成手順はWO2007/061793A2号に記載されている)。従って、この分野における全体的な方向性は、天然プロトタイプに比べて化学安定性を高めた合成カルジオリピン類似体を調製し、その後でタンパク質/ペプチドへの付着及び固定化を行うというものである(J. S. Yadav等、Tetrahedron Lett. 1996年、37、6603、及びK. Kasireddy等、Bioorg. Chem. 2005年、33、345)。

#### 【0038】

##### 実施例

実施例1 図2の式10~11のタンパク質リン脂質共役体の合成手法

図2に従った合成のための試薬及び条件は以下の通りである。

a) 9-デセン酸、DCC、DMAP、DCM、0。b) NaH、10-プロモ-1-デセン、DMF、0から室温。c) DDQ、DCM、H<sub>2</sub>O、0。d) MeOPCl<sub>2</sub>、DIPEA、THF、-78。HOCH<sub>2</sub>CH(OMPM)CH<sub>2</sub>OH、-78から室温。30%水溶液H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、DCM、室温。e) DDQ、DCM、H<sub>2</sub>O、0。f) NaI、2-ブタノン、80。g) NaIO<sub>4</sub>、KMnO<sub>4</sub>、tBuOH、H<sub>2</sub>O、室温。h) DIC、NHS、室温。i) タンパク質、緩衝剤12t、室温。

#### 【0039】

図2の類似体(8~9)のタンパク質又はペプチドに対するアンカリングは、NaIO<sub>4</sub>-KMnO<sub>4</sub>で酸化させた末端二重結合による脂肪酸残基の付着を行い、その後タンパク質とのNHS支援の結合によって達成することができる。あるいは、リン脂質8~9のアジド誘導体及びアルキン標識タンパク質を用いたCuAAC及びSPAAC手法を実行することができる。これらの共役について、上記のステップh)は以下の通りである。

#### 【0040】

##### SPAAC共役

h) DIC、NHS、12t、室温。i) 3-アジドプロパン-1-アミン、tBuOH、Et<sub>3</sub>N、3t、室温。j) タンパク質/ペプチドシクロオクチン誘導体、3~24t、室温。

#### 【0041】

##### CuAAC共役

h) DIC、NHS、12t、室温。i) 3-アジドプロパン-1-アミン、tBuOH、Et<sub>3</sub>N、3t、室温。j) タンパク質/ペプチドアルキン誘導体、Cu-TBTA、アスコルビン酸、3~24t、室温。

#### 【0042】

##### 実施例2 蛍光標識及びELISAアッセイ

リン脂質-ペプチド及びリン脂質-タンパク質共役体の確認された化学構造及び純度に伴う合成脂質の実証された免疫原性によって、リン脂質-抗体結合プロセスに関する化学的及び臨床的に重要な新規の情報が与えられている。

#### 【0043】

これらの主な研究は2つの試験で実行することができる。第1に、蛍光標識を用いた均

10

20

30

40

50

質性アッセイにおいて本発明のリン脂質 - ペプチド及びリン脂質 - タンパク質構造物 (constructs) の試験を行う。また、調製した生物共役体によって特定の自己抗体を標的とするための酵素結合免疫吸着検査法 (ELISA) も用いる。本明細書では、APS 及び他の自己免疫疾患と診断された患者の血清サンプルにおいて、二次 HPR 標識抗体が、合成リン脂質 - ペプチド抗原及びリン脂質 - タンパク質抗原と抗体との間の相互作用の信号となる (例えば図 1 b 及び図 3 を参照のこと)。

#### 【0044】

実施例 3 タンパク質 - カルジオリピン生物共役体の合成及び安定性の研究

試薬及び溶剤 ウシ心臓からのカルジオリピンナトリウム塩 (Sigma - Aldrich)、合成カルジオリピン (Avanti Polar Lipids)、卵からのホスファチジルコリン (PC L -  $\alpha$  異性体、Avanti Polar Lipids)、合成ホスファチジルコリン (18 : 1  $\Delta 9$  - シス異性体、Avanti Polar Lipids)、 $\text{KMnO}_4$ 、 $\text{NaIO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{SO}_3$ 、ウシ血清からのアルブミン (BSA)、リゾジム (lysozyme)、ミオグロビン、スカシガイからのヘモシアニン (KLH)、N - ヒドロキシスクシンイミド (NHS、全て Sigma - Aldrich から)、 $\beta 2$  - 糖タンパク質 I ヒト、非組み換え型 (Direc 抗原)、N, N' - ジイソプロピルカルボジイミド (DIC、Fluka)、DMSO (Sigma - Aldrich)、t - ブタノール (Sigma - Aldrich)、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS、Sigma - Aldrich)。

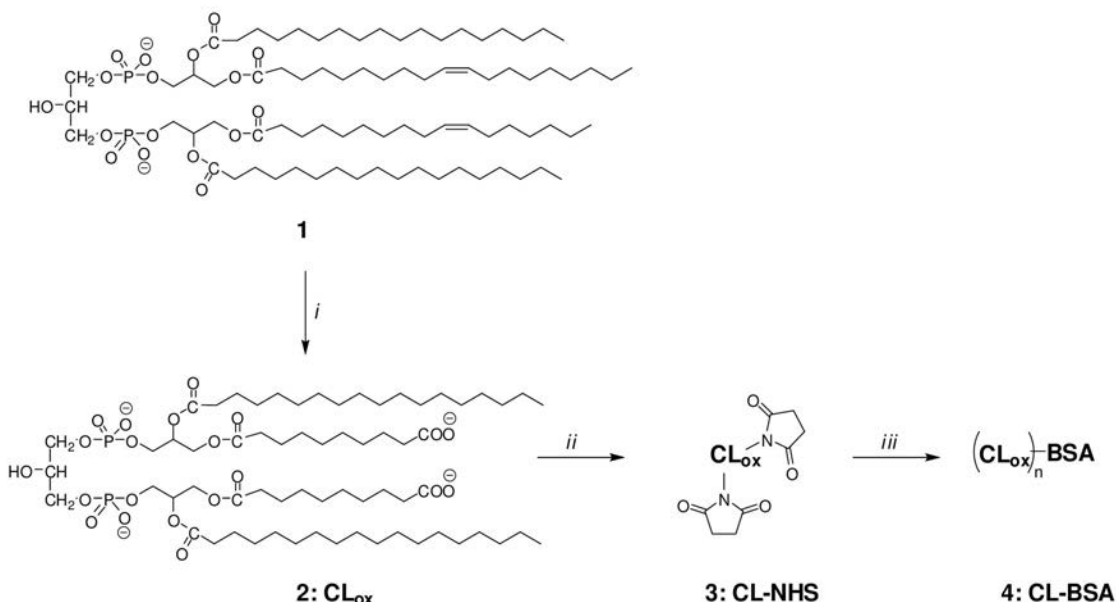
#### 【0045】

方法 1. 5 mL プラスチック製エッペンドルフ型チューブで反応を行った。エッペンドルフ型サーモミキサ 5436 シェーカを用いて混合を行い、回転遠心分離機 (HETOVAC VR - 1) を用いて蒸発を行った。

#### 【0046】

分析 MALDI HRMS (Bruker microflex) を用いて脂質分子を分析した。LC - MS (Bruker) を用いてタンパク質 - 脂質共役体を分析した。

#### 【化 20】



スキーム IV カルジオリピン - タンパク質共役体の代表的な合成。試薬及び条件：(i)  $\text{KMnO}_4$  -  $\text{NaIO}_4$  / t - BuOH - 水 1 : 1 (v / v)、2 t。(ii) NHS / DIC / DMSO、12 t。(iii) 対応するタンパク質 (BSA、KLH、 $\beta 2$  - GPI、リゾチーム又はミオグロビン) / DMSO - 炭酸塩緩衝剤 (pH 8.5) 9 : 1 (v / v)、12 t

#### 【0047】

## 酸化カルジオリピン C l o x ( 2 ) の合成 ステップ i

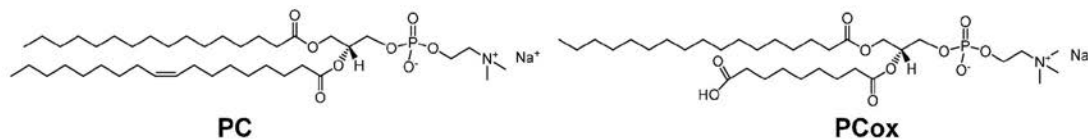
2 m L の t - B u O H 中のカルジオリピン 1 ( 2 0 m g 、天然 ( n ) 又は合成 ( s ) ) 溶液に、1 0 0 m k l の M Q 水中の 2 0 m g の N a H C O <sub>3</sub> を加え、5 分間混合した。その後、1 2 0 m k l の水中の 1 2 m g の N a I O <sub>4</sub>、4 0 0 m k l の水中の 1 5 m g の K M n O <sub>4</sub>、及び 5 0 0 m k l の t - B u O H を続けて加えた。この混合物を 2 時間室温に維持し、次いで 1 5 0 m g の N a <sub>2</sub> S O <sub>3</sub> を加え、更に 1 0 分間混合した。得られた混合物を 1 2 0 0 0 r p m で 5 分間遠心分離させ、上の相をピペットで取った。t - B u O H 相を、飽和 N a C l 水溶液中の 5 % H C l 水溶液で洗い、s p e e d v a c で蒸発乾固させ、D M S O に再び溶かした。

【 0 0 4 8 】

10

並行して、空気に触れるとカルジオリピンの酸化を防ぐことが知られているホスファチジルコリン 1 6 m g の存在下で、上述のようにカルジオリピンの酸化を行った ( スキーム V、P C 天然 ( n ) 又は P C 合成 ( s ) )。従ってこの酸化実験により、タンパク質積荷に付着させるための 4 つの脂質試薬が得られた。すなわち、C L o x ( n )、C L o x ( s )、C L o x ( n ) - P C o x ( n )、及び C L o x ( s ) - P C o x ( s ) である。H R M S M A L D I スペクトルによって酸化を確認した。

【 化 2 1 】



20

スキーム V ホスファチジルコリン ( P C ) 及び酸化ホスファチジルコリン ( P C o x ) の化学構造。双方ともナトリウム塩。

【 0 0 4 9 】

## カルジオリピン C L - N H S ( 3 ) の活性化エステル合成 ステップ i i

1 m L の D M S O 中の酸化脂質試薬 2 ( 1 0 m g のカルジオリピン ) の溶液に、5 m g の N H S 及び 1 0 m k l の N , N ' - ジイソプロピルカルボジイミドを加えた。脂質が完全に溶けるまで ( 約 2 時間 ) 反応混合物を撹拌した。反応を室温で一晩そのまま放置した。得られた溶液を精製せずに次のステップで用いた。C L - N H S の保存 : - 7 0 。

30

【 0 0 5 0 】

## タンパク質 - カルジオリピン共役体の合成 ( C L - タンパク質 )

0 . 2 M の炭酸塩緩衝剤 ( p H 8 . 5 ) 1 0 0 m k l 中の 1 m g のタンパク質の溶液に、8 7 5 m k l の D M S O 及び 1 5 m k l の C L - N H S 3 の溶液 ( 1 0 m g / m L ) を加えた。反応を 2 0 分間混合し、次いで一晩そのまま放置した。得られた試薬は、精製なしで、文献に従った診断に有用である。我々は、+ 4 で 4 か月間保存した後、及び - 2 0 で 1 年間保存した後に、L C - M S によって、以下に記載する混合物内の共役の安定性を評価した ( 表 1 )。天然脂質成分は他の群によって以前に適用した。見てわかるように、これらの試薬は保存中に急速に劣化するが、合成脂質及び開発した保存条件 ( 特に 3 及び 4 ) を用いると、共役体は脱気の必要なく - 2 0 で 1 年間まで安定していた。保存時の劣化に対する安定性の最良の結果は、本明細書で調製した新規の共役体 8、1 0、1 6、及び 1 8 によって示された。下の表 1 に安定性を示す。

40

【表 1】

表 1. 本研究で調製した脂質-タンパク質共役体の組成及び安定性\*

| 試薬パッケージ番号 | 脂質成分           | タンパク質成分     | 脂質サンプルの由来                  | 安定性 % |    |    |    |     |    |    |    |    |
|-----------|----------------|-------------|----------------------------|-------|----|----|----|-----|----|----|----|----|
|           |                |             |                            | 4 か月  |    |    |    | 1 年 |    |    |    |    |
|           |                |             |                            | 保存混合物 |    |    |    |     |    |    |    |    |
|           |                |             |                            | 1     | 2  | 3  | 4  | 1   | 2  | 3  | 4  |    |
| 1         | プラスチック製の<br>小瓶 | CL(n)       | ウシ血清<br>アルブミ<br>ン          | 天然    | 40 | 40 | 50 | 53  | 32 | 30 | 42 | 43 |
| 2         | プラスチック製の<br>小瓶 | CL(s)       |                            | 合成    | 66 | 68 | 70 | 66  | 64 | 58 | 68 | 56 |
| 3         | プラスチック製の<br>小瓶 | CL(n)・PC(n) |                            | 天然    | 34 | 35 | 54 | 57  | 31 | 33 | 42 | 47 |
| 4         | プラスチック製の<br>小瓶 | CL(s)・PC(s) |                            | 合成    | 64 | 65 | 60 | 78  | 54 | 50 | 64 | 58 |
| 5         | プラスチック製の<br>小瓶 | CL(n)       | ヘモシア<br>ニン                 | 天然    | 32 | 37 | 52 | 53  | 37 | 30 | 45 | 50 |
| 6         | プラスチック製の<br>小瓶 | CL(s)       |                            | 合成    | 40 | 38 | 73 | 78  | 38 | 42 | 85 | 79 |
| 7         | プラスチック製の<br>小瓶 | CL(n)・PC(n) |                            | 天然    | 38 | 40 | 44 | 54  | 38 | 40 | 44 | 54 |
| 8         | プラスチック製の<br>小瓶 | CL(s)・PC(s) |                            | 合成    | 44 | 50 | 65 | 84  | 44 | 50 | 65 | 84 |
| 7         | プラスチック製の<br>小瓶 | CL(n)       | アポリポ<br>タンパク<br>質 H、ヒ<br>ト | 天然    | 45 | 44 | 50 | 56  | 46 | 44 | 53 | 54 |
| 8         | プラスチック製の<br>小瓶 | CL(s)       |                            | 合成    | 65 | 60 | 75 | 84  | 65 | 60 | 77 | 89 |
| 9         | プラスチック製の<br>小瓶 | CL(n)・PC(n) |                            | 天然    | 55 | 59 | 46 | 57  | 50 | 49 | 43 | 60 |
| 10        |                | CL(s)・PC(s) |                            | 合成    | 70 | 64 | 86 | 95  | 64 | 66 | 90 | 92 |
| 11        | プラスチック製の<br>小瓶 | CL(n)       | リソジウム                      | 天然    | 34 | 31 | 56 | 45  | 34 | 22 | 36 | 40 |
| 12        | プラスチック製の<br>小瓶 | CL(s)       |                            | 合成    | 45 | 61 | 74 | 45  | 44 | 45 | 70 | 56 |
| 13        | プラスチック製の<br>小瓶 | CL(n)・PC(n) |                            | 天然    | 32 | 36 | 65 | 32  | 30 | 30 | 65 | 45 |
| 14        | プラスチック製の<br>小瓶 | CL(s)・PC(s) |                            | 合成    | 55 | 68 | 74 | 55  | 50 | 47 | 70 | 58 |
| 15        | プラスチック製の<br>小瓶 | CL(n)       | ミオグロ<br>ビン                 | 天然    | 34 | 30 | 45 | 42  | 33 | 45 | 67 | 70 |
| 16        | プラスチック製の<br>小瓶 | CL(s)       |                            | 合成    | 60 | 49 | 90 | 95  | 52 | 45 | 88 | 94 |
| 17        | プラスチック製の<br>小瓶 | CL(n)・PC(n) |                            | 天然    | 40 | 39 | 51 | 50  | 44 | 34 | 78 | 75 |
| 18        | プラスチック製の<br>小瓶 | CL(s)・PC(s) |                            | 合成    | 63 | 46 | 88 | 92  | 50 | 41 | 80 | 93 |

\*劣化した生成物の 1 つに対する平均質量の共役体の対応する LC ピークエリアの比 (%) として安定性を評価した。

## 【0051】

カルジオリピン-タンパク質共役体の保存及び分析

以下の共役混合物を +4 及び -20 で保存した。

1. DMSO - 0.2 M 炭酸塩緩衝剤の共役体 1 ~ 18 の溶液 (濃度 - 10 mg / mL)。

2. DMSO - 0.2 M 炭酸塩緩衝剤の共役体 1 ~ 18 の溶液 (濃度 - 10 mg / mL) に、1 - チオグリセリンを加える (最終濃度 - 1 mM)。

3. DMSO - 0.2 M 炭酸塩緩衝剤の 1 ~ 18 の溶液 (濃度 - 10 mg / mL) に、1 - チオグリセリンを加える (最終濃度 - 5 mM)。

4. DMSO - 0.2 M 炭酸塩緩衝剤の 1 ~ 18 の溶液 (濃度 - 10 mg / mL) に、1 - チオグリセリン (最終濃度 - 5 mM) 及び SDS (最終濃度 - 0.01 %) を加える

。

## 【0052】

結果を上表 1 に示す。

## 【0053】

実施例 4 トリアゾール - アミドリナーを用いたタンパク質リン脂質共役体の合成手法

この例では、臨床的に関連した  $\beta 2$  GPI 及び PT に対して合成 PE (ホスホエタノールアミン) 抗原を付着させるための新しい CuAAC クリック手法を実証する。構造上の差があるにもかかわらず、CL 及び PE は双方とも免疫源性であり、抗リン脂質 (aPL) の診断に有用であることが証明されている。クリック手順は、酸化リン脂質に比べて化学安定性が向上した生成物の収率及び純度が高いという利点を有する。更に、この新しい手順は、同様の量の様々なリン脂質及びタンパク質に対して直接使用することができる。以前に報告された類似体と比較するため、PE - BSA 共役体も調製した (下記のスキーム VI)。

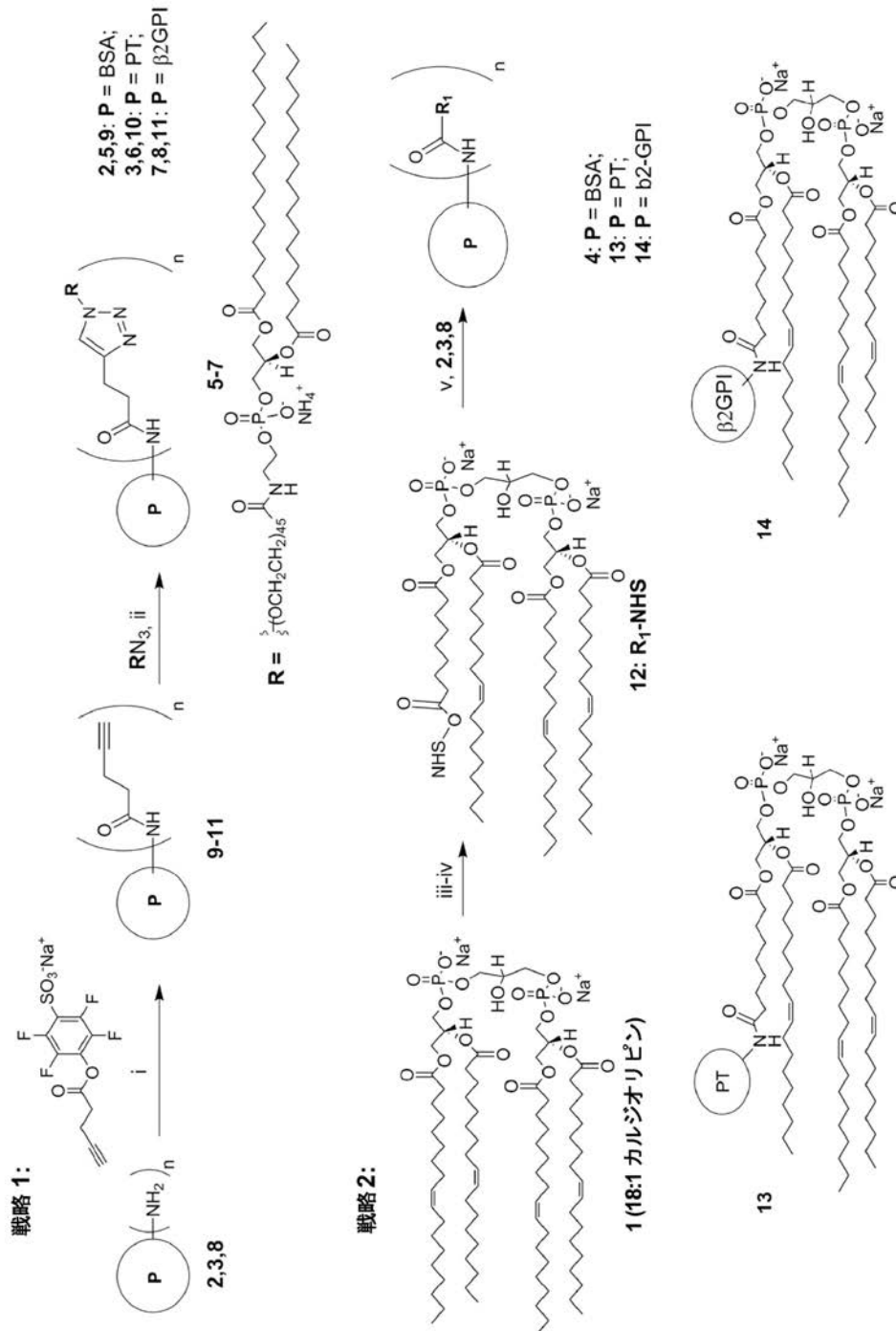
10

## 【0054】

スキーム VI アミドカップリング及びクリックケミストリーによる新しいリン脂質 - タンパク質共役体の合成。試薬及び条件: (i) 0.1 M の重炭酸塩緩衝剤 - DMSO 9:1、+ 4、12 時間。(ii) PE アジド、CuSO<sub>4</sub>:TBTA 1:1.1、アスコルビン酸、1x PBS - DMSO - tBuOH 3:2:0.1、v/v/v、(iii) KMnO<sub>4</sub>、NaIO<sub>4</sub>、t-BuOH - H<sub>2</sub>O 9:1、v/v、室温、12 時間。(iv) スクシンイミドエステル、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、DMSO、室温、12 時間。(v) タンパク質 2, 3, 8、0.1 M 重炭酸塩緩衝剤 - DMSO 9:1、v/v、室温、12 時間。

20

【化 2 2】



【 0 0 5 5 】

まず、我々は、各タンパク質を水溶性アルキン活性化エステルアルキン基で官能化し、次いでこれにモル比 1 : 25 で市販の P E アジドによる C u A A C クリック反応を行った。簡単な沈殿の後、良好な収率及び純度で所望の共役 5 ~ 7 を得た（スキーム 1、収率 80 %、ゲル電気泳動によって決定されるような完全な変換）。本発明者は、C u A A C ケミストリーが、自己免疫疾患診断の高い可能性を有する新規のリン脂質 - タンパク質共役体を調製するための改良された方法であることを実証した。得られたリン脂質 - タンパク質共役体は、自己免疫抗体に対して高い結合親和性及び特異性を示す。

【 0 0 5 6 】

図 3 は、本発明の抗原、すなわちリン脂質、タンパク質、及びリン脂質 - タンパク質共役体に対する自己免疫抗体を検出するための酵素結合免疫吸着検査法（ELISA）の代

表的なスキームを示す。P = タンパク質、L = リンカー、R = リン脂質残基である。T M B = 3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジン、H P R = 西洋わさびペルオキシダーゼである。

#### 【 0 0 5 7 】

一連の疾患関連の血漿又は人の正常な血漿 ( H N P 、 n = 1 0 、 図 3 、 表 2 ) を適用して、酵素結合免疫吸着検査法 ( E L I S A ) において共役体及び対照抗原を用いた。疾患関連のサンプルは、リン脂質、 $\beta$  2 P P I に対する高レベルの抗体 ( a P L ) を含んだ。交差反応を評価するための対照サンプルは、一本鎖及び二本鎖 D N A に対する自己抗体を含んだ。

#### 【 表 2 】

表 2 . 様々な抗原、すなわちカルジオリピン、プロトロンビン、 $\beta$  2 - 糖タンパク質、ホスホエタノールアミンアジド、及びスキーム V I の合成共役体 5 ~ 7 を用いた E L I S A アッセイの結果\*

| 抗原                           | 450 nmでの吸収度<br>分析 |                 |         |         |            |
|------------------------------|-------------------|-----------------|---------|---------|------------|
|                              | a-PL              | a- $\beta$ 2GPI | a-ssDNA | a-dsDNA | HNP (n=10) |
| CL                           | 1.97              | 0.90            | 0.90    | 0.63    | 0.45       |
| $\beta$ 2GPI                 | 0.75              | 1.01            | 0.60    | 0.32    | 0.22       |
| CL $\beta$ 2GPI <sup>5</sup> | 0.98              | 0.80            | 0.55    | 0.61    | 0.52       |
| PT                           | 0.45              | 0.31            | 0.43    | 0.45    | 0.23       |
| BSA                          | 0.31              | 0.25            | 0.34    | 0.28    | 0.24       |
| PEアジド                        | 1.03              | 0.91            | 0.80    | 0.54    | 0.33       |
| 5(BSA-PE)                    | 1.44              | 0.56            | 1.44    | 1.21    | 0.43       |
| 6(PT-PE)                     | 1.05              | 0.44            | 1.01    | 0.72    | 0.45       |
| 7( $\beta$ 2GPI-PE)          | 1.02              | 1.15            | 0.5     | 0.4     | 0.19       |

\* a - P L 、 a -  $\beta$  2 G P I 、 a - s s D N A 、 及び a - d s D N A = それぞれ、リン脂質、 $\beta$  2 G P I 、 一本鎖 D N A 、 及び二本鎖 D N A に対して極めて陽性であると試験された人の血漿。HNP = 人の正常な血漿。n 人の患者の平均吸収度を示す ( $\Delta \pm 0.20$ )。非共有結合を生じるブロッキング条件下でカルジオリピンに $\beta$  2 G P I ( 0 . 0 0 1 % ) を加えた。CL = カルジオリピン、PT = プロトロンビンである。各サンプルを複写 ( d u p l i c a t e ) で測定し、吸収度の偏差  $\Delta \pm 0.20$  となった。

#### 【 0 0 5 8 】

s s D N A 及び d s D N A のような他の抗原との a P L の高い交差反応性は、自己免疫疾患の研究及び診断における有用性を妨げるものである。PE と PT 及び PE と  $\beta$  2 - G P I のような、生物学的に相補的な分子の共有結合架橋によって、a P L の特異性の向上を達成した。I g G E L I S A 実験により、これが PE -  $\beta$  2 - G P I 共役体で達成されたことが示される ( A P L 、 a - s s D N A 、 及び a - d s D N A で培養した場合、吸収度は 1 . 0 2 対 0 . 4 7 ~ 0 . 5 4 ) ( 表 2 ) 。

#### 【 0 0 5 9 】

E L I S A 試験の再現性及び - 2 0 で溶液中に保存した時の抗原の安定性を試験した ( 図 4 ) 。 後者は T L C 及びゲル電気泳動によって行った。図 4 から明らかであるように、共役体 5 ~ 7 は、個々のリン脂質及び酸化カルジオリピン共役体よりも優れた再現性を示した ( それぞれ 9 7 ~ 9 8 % 対 8 3 ~ 8 9 % ) 。 溶液中に保存した時の安定性は、酸化 C L 類似体の 1 . 5 ~ 2 か月に対し、- 2 0 で 6 か月まで延長した。これにより、新規の分子の高い純度及び免疫原性がそれらの診断性能に良い影響を与え、様々な自己免疫症状の研究での適用が可能となることが示される。

#### 【 0 0 6 0 】

実施例 5 カルジオリピンアジド試薬の調製及びタンパク質に対する「クリック」共役のための新しい戦略

10

20

30

40

50

新しい合成の背後にある (beyond) 基本原理は、純粹かつ充分に特徴付けられた合成脂質を使用すること、及びタンパク質に対する生物共役の際に生じる立体障害を低減することであった。後者は、カルジオリピン及びアジド部分の間の拡張リンカーを用いて行った (図5を参照のこと)。

#### 【0061】

##### 5.1 図5のカルジオリピン - アジド10の合成

1.5 mL の  $t\text{-BuOH}$  100  $\mu\text{L}$  中のカルジオリピン (CL) 1 (10 mg、6.6  $\mu\text{mol}$ ) の溶液を、 $\text{NaHCO}_3$  (100  $\mu\text{L}$  中 10 mg)、 $\text{NaIO}_4$  (200  $\mu\text{L}$  水中 30 mg)、及び  $\text{KMnO}_4$  (200  $\mu\text{L}$  水中 10 mg) と混合した。反応に3分間アルゴンを流し、その後45 で1時間マイクロ波反応器 (15 V) 内に保持した。出発物質が TLC によって検出不可能となった後、150 mg の  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  を加えることで反応を急冷した。その後、混合物を 5%  $\text{HCl}$  で pH 3.0 に酸性化し、 $t\text{-BuOH}$  で2度洗った。 $t\text{-BuOH}$  部分を  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥させ、真空中で蒸発させた。収率 86%、 $R_f$  0.37 (クロロホルム:メタノール:水 3:1.5:0.2、 $v/v/v$ )、 $\text{HRMS} - \text{ESI} \quad m/z$ 、1406.84772 ( $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 、 $\text{C}_{72}\text{H}_{130}\text{Na}_2\text{O}_{19}\text{P}_2$  計算値 1406.84766)。1 mL の  $\text{DMSO}$  中の酸化カルジオリピン (5 mg) の溶液に、20  $\mu\text{L}$  の  $\text{DMSO}$  中の 4 mg のスクシンイミドエステル及び 8  $\mu\text{L}$  の  $\text{N}$ 、 $\text{N}'$  - ジイソプロピルカルボジイミドを加えた。反応を5時間室温に維持した後、TLC は出発物質の完全な変換を示した。中間体  $\text{NHS}$  - カルジオリピンを更に室温で暗所において12時間、3 - アジドプロパン - 1 - アミン (1.1 eq、0.35 mg) と反応させた。生成物を精製せずに更に別のステップで使用した。 $R_f$  0.55 (クロロホルム:メタノール:水 3:0.5:0.2、 $v/v/v$ )、 $\text{HRMS} - \text{ESI} \quad m/z$ 、1488.91209 ( $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 、 $\text{C}_{75}\text{H}_{136}\text{N}_4\text{Na}_2\text{O}_{18}\text{P}_2$  計算値 1488.91203)。

#### 【0062】

##### 5.2 クリック反応

本明細書で前述したようにクリック反応を行った。生成物を、まず  $\text{Zeba}$  スピン脱塩カラム ( $\text{Life Technologies}$ ) を用いてゲルろ過によって精製し、その後、冷アセトン (-20 ) から沈殿させた。得られた共役体を冷アセトンで2度洗浄し、真空中で乾燥させ、質量分析及びゲル電気泳動で分析した。280 nm の吸収度に基づく生成物の最終収率は、88% (6、スキーム VI)、92% (7、スキーム VI)、89% (7、図5)、84% (8、図5) であった。

#### 【0063】

生成物抗原 7 ~ 8 (図5) の化学組成をゲル電気泳動及び  $\text{MALDI} \quad \text{MS}$  スペクトルによって検証した。 $\text{MS}$  データによると、カルジオリピン残基は  $\beta 2\text{GPI}$  及び  $\text{PT}$  にそれぞれ付着した。これは、タンパク質 (1 ~ 2 残基) に対する  $\text{NHS}$  - カルジオリピン誘導体の直接結合を用いた以前の手法に比べて顕著であり、カルジオリピン試薬の立体障害が低減した結果であり得る。

#### 【0064】

##### 実施例 6 対照と比較される新しい分子の優れた特異性及び安定性

上述のように、現在適用されているリン脂質抗原の大きな問題は、低い安定性と高い交差反応性である。この結果、検出される抗体は自己免疫疾患に対して特異的でなく、試験は診断のための価値が低い又はゼロである。我々は、生物学的に関連した自己免疫抗原を模倣する共有結合リン脂質及びタンパク質を含有する新しい抗原を調製した。対照と比較した安定性及び特異性を確認するため、我々は、 $\text{HIV} - 1$  抗原及び健康な対照に対する充分に特徴付けられたヒト単クローン抗体による  $\text{ELISA}$  アッセイを実行した。

#### 【0065】

6.1  $\text{ELISA}$  アッセイ、再現性分析、及び抗原安定性の試験を前述のように行った ( $\text{Molecules}$  2015、20、10253 ~ 10263)。簡潔に述べると、 $\text{ELISA}$  アッセイは2つの培養ステップ及びその後の酵素促進信号発生を含む。最初の培

養は、マイクロプレートの表面上で固定化した抗原にサンプル内の標的抗体を結合させることを含む。第2のステップでは、結合した抗体が、西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）等の酵素で共有結合標識された二次抗体（例えば抗ヒトIgG又はIgM）と相互作用する。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の存在下で、HRPは、無色の有機基質TMBの酸化TMB（ox）への変換に触媒作用を及ぼす。これは450nmで特有の吸収度信号を有する（A<sub>450</sub>）。従って、A<sub>450</sub>を測定することにより、固定化した抗原に対する特定の抗体のタイターを定量化することができる。

#### 【0066】

まず、最初の実験と同じ条件でブロッキング時にコーティングしていないマイクロプレートを用いて、各サンプルのバックグラウンド信号がA<sub>450</sub>0.06未満であることを試験した。aPLP-抗原結合の平衡時間を決定するため、予めコーティングしたマイクロプレートに1:200の希釈の血漿サンプルによる培養を40分から3時間にわたって行った。二次培養は常に、1:35.000希釈の対応するHRP共役体を用いて室温で1時間行った。このアッセイの結果は支援情報（Supporting information）に提出されている。

10

#### 【0067】

一連の対照希釈の試験を行うことで（HNP、HCL、1:50から1:2000の希釈）、各抗原の線形範囲を決定した。結果によると、血漿の希釈1:100~1:750が各抗原のアッセイの線形範囲内であった（R<sup>2</sup>>0.97）。対照及び患者サンプルでは、弱い正（+/-）及び正（+）の信号は、それぞれ健康な対照コホート（n=16）の平均値の2倍及び3倍の信号と判定された。

20

#### 【0068】

6.2 特異性の評価（化合物の番号は上記のスキームVI又は図5で各化合物について注記したものと同様）

表1に、HIV-1抗原及び健康な血清サンプルに対する単クローン抗体を用いて得られた新規の抗原及び対照についてのIgGクラスELISAの結果を示す。我々は、PL及びタンパク質1+8及び1+3の非共有結合複合体の最高レベルの非特異的結合を観察した（スキームVI、混合抗原対照）。これに対して、架橋共役（6~7、スキームVI）及び（7~8、図5）では、1+8及び1+3、スキームVIに比べ、同様の実験（例えば表3、（8、図5）のデータにおいて、非特異的結合は低度からゼロである。共役6~7（スキームVI）は、抗gp41に対する弱い結合を示したのに対し、PL-タンパク質共役において抗p24及びB12抗体に対する結合は完全に消えた。HIV-1特異的単クローン抗体及び混合PLP対照で観察された健康な対照血清における高い反応性は、ポリクローナル抗体との非特異的相互作用を生じる非共有結合構造の高い不均質性の結果である可能性がある。また、抗原6~7（スキームVI）を含むホスホエタノールアミンの交差反応性は、PEGリンカーの存在によって生じ得る。タンパク質に対するホスホエタノールアミン付着のための代替的なリンカー設計は、我々の進行中の研究の目的であり、近い将来に発表されるはずである。最後に、図5の最も特異的な抗原7~8を以下で述べる人のサンプルの研究に更に適用した。

30

## 【表 3】

表 3. 架橋抗原及び対照の結合特異性の分析。特に明記しない限り、番号はスキーム V I と同様である

| 抗原 番号／詳細*                                   | ヒト単クローン抗原結合 |        |     | 健康な対照の応答<br>(患者の%) |
|---------------------------------------------|-------------|--------|-----|--------------------|
|                                             | a-p24       | a-gp41 | B12 |                    |
| 6/PE <sup>PEG</sup> -PT                     | -           | +      | -   | +/- (12%)          |
| 7/PE <sup>PEG</sup> -β2GPI                  | -           | +/-    | -   | + (6%), +/- (12%)  |
| 7, Fig 5)/CL-PT                             | -           | +/-    | -   | +/- (6%)           |
| 8, Fig 5)/CL-β2GPI                          | -           | -      | -   | -(100%)            |
| 8/β2GPI                                     | -           | +/-    | -   | +/- (25%)          |
| 3/PT                                        | +/-         | -      | +/- | +/- (25%)          |
| 1+8/CL + β2GPI                              | +/-         | +/-    | +/- | + (44%), +/- (25%) |
| 1+3/CL + PT                                 | +/-         | +/-    | +   | + (25%), +/- (25%) |
| 8+RN <sub>3</sub> /PE <sup>PEG</sup> +β2GPI | +/-         | +/-    | +   | + (25%), +/- (12%) |
| 3+RN <sub>3</sub> /PE <sup>PEG</sup> +β2GPI | +/-         | +/-    | +   | + (25%), +/- (25%) |

\*弱い正 (+/-) 及び正 (+) の信号は、それぞれ健康な対照群の平均値の 2 倍及び 3 倍の吸収度信号と定義した。PE<sup>PEG</sup>、PT、CL、β2GPI は、それぞれペグ化 (PEGylated) ホスホエタノールアミン、プロトロンビン、カルジオリピン、及び β2-糖タンパク質 I である。抗原の共有結合架橋及び非共有混合 (non-covalent mixing) は、それぞれハイフン及びプラスと定義されている。

## 【0069】

## 6.3 多様な保存条件下での図 5 の抗原 7 ~ 8 の再現性及び化学安定性

本明細書に記載したように実験を行い、これにより、図 5 の 7 ~ 8 を用いた ELISA アッセイが高い再現性を有し、吸収度値の変動は独立した各分析について 0.5 ~ 0.8 の平均タイター範囲内であることが示された。また、抗原 7 ~ 8 及びカルジオリピンを、-20 及び +4 で暗い色のガラス瓶に保存し、+4 でマイクロタイタープレート上に固定化した後、ゲル電気泳動、ELISA、及び MALDI MS によって分析した。抗原 7 ~ 8 は、ガラス瓶内及びマイクロタイタープレート表面上で +4 で 3 か月まで安定し、ガラス瓶内で -20 で 1 年まで安定していた。注目すべきことに、現在のキットで用いられるカルジオリピンは、ガラス瓶内又はマイクロタイタープレート上で +4 で約 3 週間保存した後、及びガラス瓶内で -20 で 3 か月保存した後に劣化した。

## 【0070】

## 実施例 7 新しい抗原を用いた患者サンプルにおける自己抗体検出

スキーム V I の抗原 6 ~ 7 及び図 5 の 7 ~ 8 又は対照抗原でコーティングしたマイクロタイタープレートを用いて、最初の ELISA アッセイを手作業で行った。まず、市販の多クローン対照 (人の正常な血漿 HNP 及びカルジオリピンに対する抗体を含有する人の血漿 HCL (Immuno vision)) を用いて、予めコーティングしたマイクロプレート进行分析した。血漿滴下実験により、希釈に対する IgM 抗原の低い応答性が示される一方、IgG 抗原は高度の線形性で希釈に対して信号の低減を示した (R<sup>2</sup> > 0.95、支援情報)。従って、この研究で我々は IgG アッセイに焦点を当てた。更に、アッセイの再現性及び PLP 安定性を前述のように調査したところ、我々の以前のデータと一致して、対照と比べて優れたレベルが示された。

## 【0071】

次に、抗原 7 及び 8 (図 5) を適用した場合、開発した ELISA 条件下での SUH コホート (小児 SLE と診断された 27 人の患者) の調査により、5 人及び 7 人の aPLP 陽性の患者を識別した (19% 及び 26%)。これは、β2GPI 及び混合抗原カルジオリピン + β2GPI を用いてそれぞれ検出した 9 人及び 3 人の陽性患者 (33% 及び 11%) と対照的である。新しい抗原の口バスト性及び臨床関連性について、オーデンセ大学病院 (OUH、デンマーク国) から得られた成人患者の血液サンプルの分析によって更に

評価した。このアッセイは、S U H コホートと同様のプレートコーティング、培養条件、対照、及びカットオフ値を用いて実行したが、完全自動化レジメン ( r e g i m e n ) で行った。その結果を、同様の条件下でO U H 患者について実行された抗カルジオリピン試験及び抗  $\beta$  2 G P I 試験 ( E u r o D i a g n o s t i c a ) と比較した。

#### 【 0 0 7 2 】

図 6 に、多クローン対照抗原、健康な対照血清、及び 2 人の患者コホートについての E L I S A 結果の要約を示す ( 「 5 」 及び 「 6 」 はそれぞれスキーム V I の化合物 6 及び 7 に対応する)。陰性及び陽性の対照 ( H N P 及び H C L 、 I m m u n o v i s i o n ) を、それぞれ「 x 」及び星印で示す。見てわかるように、健康な対照のバックグラウンド信号は、カルジオリピン 1、P T、及びホスホエタノールアミンと P T の混合物で、最も高かった。S U H サンプルは、特に図 5 の抗原 8、及び混合抗原カルジオリピン +  $\beta$  2 G P I を適用した場合、O U H コホートよりも高い a P L P タイターを示した。留意すべきことは、図 5 の化合物 7 ~ 8 で示される a P L P 陽性サンプルが、分離した抗原で示されるものとは劇的に異なったことである。A N O V A を用いた群分析により、0 . 0 1 の p 値で、S U H コホート及び O U H コホート内の群間で統計的に有意な差を確認した。

#### 【 0 0 7 3 】

最後に我々は、投薬使用に関して患者の医療記録を分析した。データを、1 つ以上の投薬を含む群に分割し、S t a t a で統計的な分析を行った。2 つの独立した試験を用いて ( スチューデント t 検定及びフィッシャー検定 )、特定の投薬又は投薬群と上昇 a P L P タイターとの間に相関がないことを確認した。

#### 【 0 0 7 4 】

実施例 8 図 5 の抗原 8 の疾患活動性と a P L P タイターとの間の相関

統計分析のため、各患者の以下の臨床パラメータについて検討する。すなわち、年齢 ( 開始時及びサンプル日時 )、性別、民族、人種、診断、疾患活動性 ( 開始時及びサンプル日時 )、臨床症状、患者の訴え、及び治療履歴である。S t a t a でスチューデント t 検定及び最小二乗回帰 ( O L S : o r d i n a r y l e a s t s q u a r e s ) 分析を用いて、表 1 に報告した抗原及び対照について差を分析した。A N O V A を用いて抗原タイター平均の差について群間で比較を行った。各相関について、0 . 0 5 未満の p 値を有意と見なした。

#### 【 0 0 7 5 】

スチューデント t 検定は、排他的に抗原 8 を用いてスミス正值性と上昇 a P L P との間の相関を示した ( 図 7 )。

#### 【 0 0 7 6 】

観察された臨床パラメータと a P L P タイターとの間の統計的な差を更に評価するため、S t a t a を用いて最小二乗回帰 ( O L S ) 分析を行った。スミス陰性群及びスミス陽性群の a P L P タイターの差は、0 . 0 0 2 の p 値で統計的に有意であることがわかった ( 図 8 )。

#### 【 0 0 7 7 】

留意すべきこととして、抗原 7 又は他の抗原及び対照では、臨床パラメータとの相関は観察されなかった (  $p > 0 . 0 9$  )。これによって、抗原 8 による特性の一意性、及びスミス正值性が示す高活性自己免疫状態の予測における可能性が示唆される。

#### 【 0 0 7 8 】

#### 結論

この研究において我々は、新規の合成リン脂質 - タンパク質抗原、すなわちカルジオリピン -  $\beta$  2 G P I 及びカルジオリピン - P T を紹介し、自己抗体の診断法におけるそれらの有用性を証明する。本明細書に報告する新規の抗原は、従来の C u A A C クリックケミストリー手法によって、高い収率及び純度で調製される ( 実施例 5 )。ヒト単クローン抗体に対する特異性の試験により、位置選択的に生物学的に相補的な分子を共役させる結果として、特異性向上の仮説が証明される ( 実施例 6 )。次に我々は、患者サンプル及び健康な対照を用いた酵素結合免疫吸着検査法 ( E L I S A ) で、調製した P L P の有用性を

10

20

30

40

50

示す（実施例 7）。最後に我々は、観察した a P L P と多数の臨床パラメータとの相関を証明し、上昇 a P L P タイターに対する高い疾患活動性の因果効果を検証する（実施例 8）。

#### 【0079】

我々の所見によって、架橋 P L P の予測可能性が、市場で現在入手できるその成分の単純な混合物、又はそれぞれに対する別個の試験よりも大きいことが示される〔37〕。更に、（図 5 の）調製された抗体 7～8 は、現在入手できる P L 抗原よりも高い再現性及び安定性を示し、直接的な合成ルート、高い化学的均質性、及び非特異ヒト抗体に対する交差反応性の低減という利点を有する（表 3）。

#### 【0080】

##### 参考文献

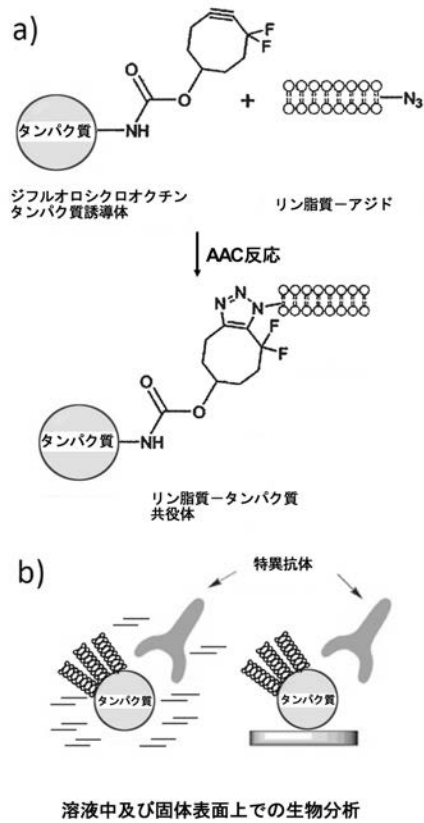
- ・ M . G . P a u l i c k 、 A . R . W i s e 、 M . B . F o r s t n e r 、 J . T . G r o v e s 、 C . R . B e r t o z z i 、 J . A m . C h e m . S o c . 2 0 0 7 年、1 2 9 、 1 1 5 4 3
- ・ W O 2 0 1 2 / 1 3 4 9 2 5 A 1 号
- ・ H . C . H a n g 、 J . P . W i l s o n 、 G . C h a r r o n 、 A c c . C h e m . R e s . 2 0 1 1 年、4 4 、 6 9 9
- ・ J . A . P r e c h e r 、 C . R . B e r t o z z y 、 N a t . C h e m . B i o l . 2 0 0 5 年、1 、 1 3
- ・ M . C h a s s i g n o l 、 Y . A u b e r t 、 V . R o i g 、 U . A s s e l i n e . N u c l e o s . N u c l e o t . N u c l . A c i d s 2 0 0 7 年、2 6 、 1 6 6 9
- ・ A . M . R o u q u e t t e 、 C . D e s g r u e l l e s 、 L u p u s 2 0 0 6 年、1 5 、 4 0 3 、 及びこの中で言及された参考文献
- ・ A . C a s t r o 、 H . W a n g 、 W O 2 0 0 7 / 0 6 1 7 9 3 A 2 号、P C T / U S 2 0 0 6 / 0 4 4 5 7 2 号
- ・ J . S . Y a d a v 等、T e t r a h e d r o n L e t t . 1 9 9 6 年、3 7 、 6 6 0 3
- ・ K . K a s i r e d d y 等、B i o o r g . C h e m . 2 0 0 5 年、3 3 、 3 4 5
- ・ M o l e c u l e s 2 0 1 5 、 2 0 、 1 0 2 5 3 ~ 1 0 2 6 3

10

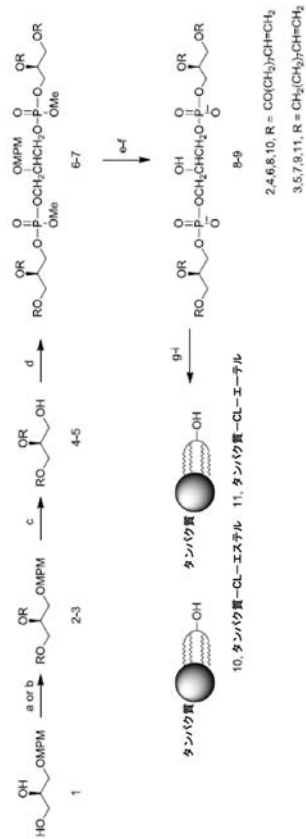
20

30

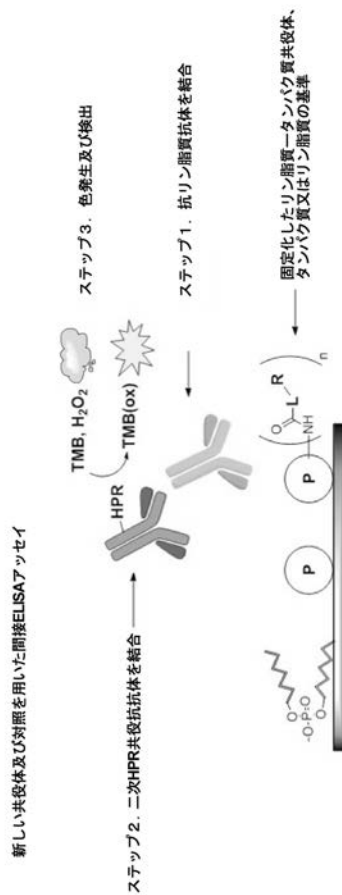
【図 1】



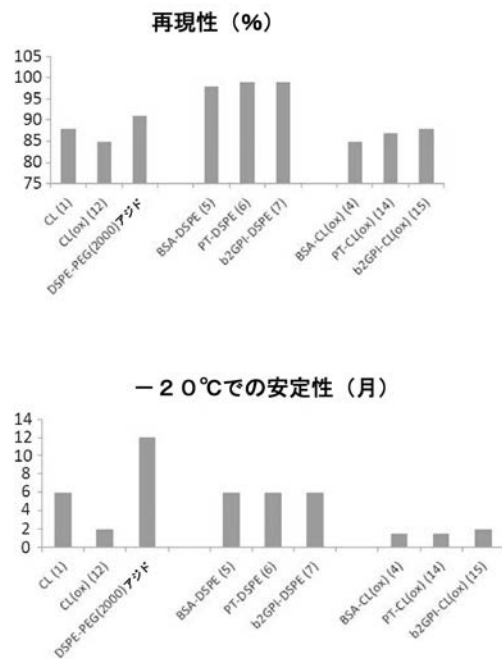
【図 2】



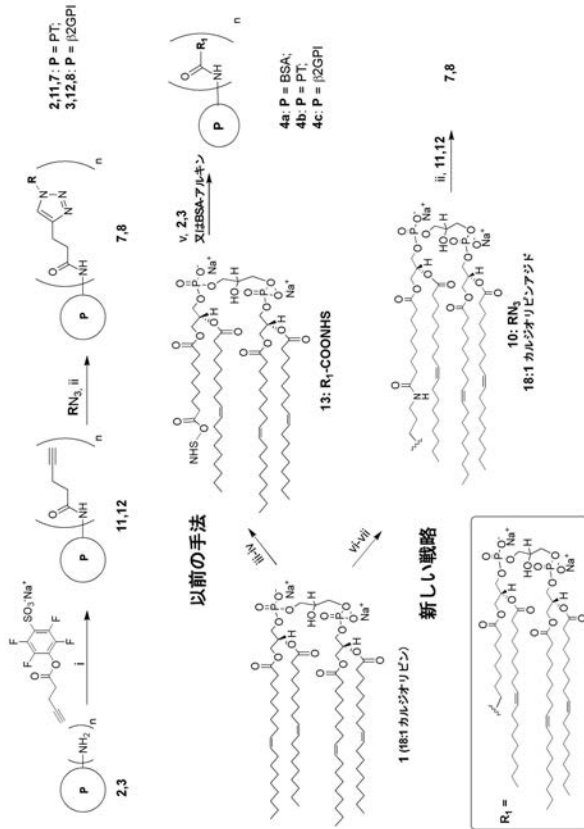
【図 3】



【図 4】

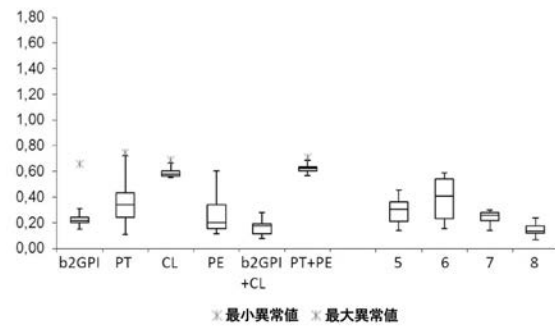


【図 5】

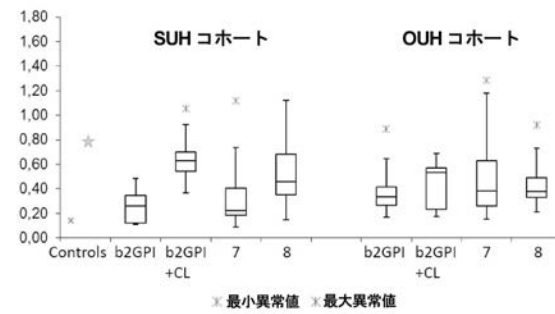


【図 6】

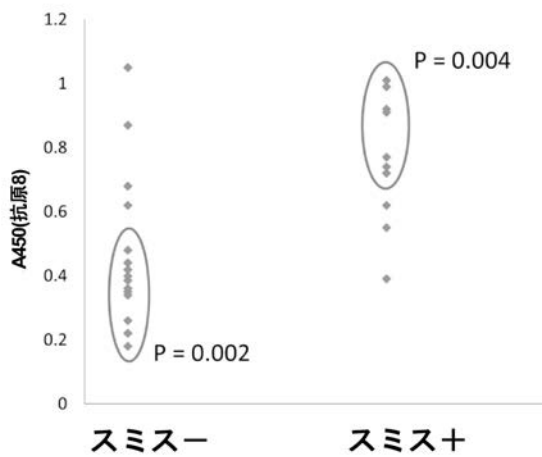
## A) 吸収度、健康な対照



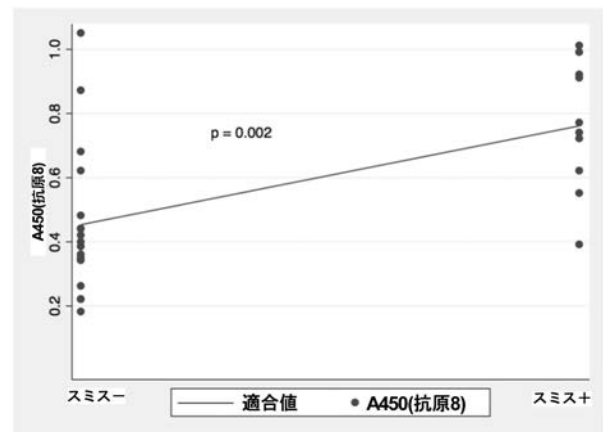
## B) 吸収度、OUH及びSUHコホート



【図 7】



【図 8】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/DK2015/050346

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/564 G01N33/86 G01N33/92  
ADD.

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)  
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 practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                              | Relevant to claim No. |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | US 2006/234392 A1 (WATKINS MICHAEL [US] ET AL) 19 October 2006 (2006-10-19)<br>whole document, in particular par. 3, 7-8, 27, 55-58; example 1, 2; figure 3, 4<br>-----<br>-/-- | 1-3                   |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ 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

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 January 2016

Date of mailing of the international search report

20/04/2016

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chrétien, Eva Maria

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/DK2015/050346

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

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

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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 additional fees.
  
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-3(partially)

## Remark on Protest

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

International Application No. PCT/DK2015/050346

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

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

1. claims: 1-3(partially)

A phospholipid protein conjugate of formula (I),  
Phospholipid - Linker - Protein/peptide wherein phospholipid  
and protein or a peptide are biologically complementary and  
the linker is 1,2,3-triazole  
---

2. claims: 1-3(partially)

A phospholipid protein conjugate of formula (I),  
Phospholipid - Linker - Protein/peptide wherein phospholipid  
and protein or a peptide are biologically complementary and  
the linker is an amide with the general formula  $RC(O)NHR'$   
wherein R is a phospholipid and R' is protein/peptide  
---

3. claims: 1-3(partially)

A phospholipid protein conjugate of formula (I),  
Phospholipid - Linker - Protein/peptide wherein phospholipid  
and protein or a peptide are biologically complementary and  
the linker is a polyethyleneglycol (PEG)  
---

4. claims: 1-4(partially)

A phospholipid protein conjugate of formula (I),  
Phospholipid - Linker - Protein/peptide wherein phospholipid  
and protein or a peptide are biologically complementary and  
the linker L is 1,2,3-triazole conjugated with an amide  
---

5. claims: 1-5(partially)

A phospholipid protein conjugate of formula (I),  
Phospholipid - Linker - Protein/peptide wherein phospholipid  
and protein or a peptide are biologically complementary and  
wherein the conjugate is BC-1  
---

6. claims: 1-5(partially)

A phospholipid protein conjugate of formula (I),  
Phospholipid - Linker - Protein/peptide wherein phospholipid  
and protein or a peptide are biologically complementary and  
wherein the conjugate is BC-2  
---

7. claims: 6(completely); 1(partially)

A phospholipid protein conjugate of formula (I),

International Application No. PCT/DK2015/050346

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Phospholipid - Linker - Protein/peptide wherein phospholipid and protein or a peptide are biologically complementary and wherein the conjugate is BC-3  
---

8. claims: 7(completely); 1(partially)

A phospholipid protein conjugate of formula (I),  
Phospholipid - Linker - Protein/peptide wherein phospholipid and protein or a peptide are biologically complementary and wherein the conjugate is BC-4  
---

9. claims: 8(completely); 1(partially)

A phospholipid protein conjugate of formula (I),  
Phospholipid - Linker - Protein/peptide wherein phospholipid and protein or a peptide are biologically complementary and wherein the conjugate is BC-5  
---

10. claims: 9(completely); 1(partially)

A phospholipid protein conjugate of formula (I),  
Phospholipid - Linker - Protein/peptide wherein phospholipid and protein or a peptide are biologically complementary and wherein the conjugate is BC-6  
---

11. claims: 1, 10-13(all partially)

A phospholipid protein conjugate of formula (I),  
Phospholipid - Linker - Protein/peptide wherein phospholipid and protein or a peptide are biologically complementary and wherein the conjugate is BC-7  
---

12. claims: 1, 10-13(all partially)

A phospholipid protein conjugate of formula (I),  
Phospholipid - Linker - Protein/peptide wherein phospholipid and protein or a peptide are biologically complementary and wherein the conjugate is BC-8  
---

13. claims: 14, 15

A cardiolipin analogue  
---

14. claims: 16-18

A protein or peptide derivative  
---

International Application No. PCT/DK2015/050346

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

15. claim: 19

Enzyme-linked immunosorbent assay

---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/DK2015/050346

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                       |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                                            | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Relevant to claim No. |
| X                                                    | <p>HANS-JÜRGEN MUSIOL ET AL: "Toward Semisynthetic Lipoproteins by Convergent Strategies Based on Click and Ligation Chemistry",<br/> CHEMBIOCHEM - A EUROPEAN JOURNAL OF CHEMICAL BIOLOGY.,<br/> vol. 6, no. 4,<br/> 18 February 2005 (2005-02-18), pages 625-628, XP055242696,<br/> DE<br/> ISSN: 1439-4227, DOI:<br/> 10.1002/cbic.200400351<br/> whole document, in particular p. 625, col.1, bridging par. - p. 626, col.1, bridging par.; scheme 1, 2<br/> -----</p>                                                                                                          | 1-3                   |
| A                                                    | <p>GUBBENS J ET AL: "Photocrosslinking and Click Chemistry Enable the Specific Detection of Proteins Interacting with Phospholipids at the Membrane Interface",<br/> CHEMISTRY AND BIOLOGY, CURRENT BIOLOGY, LONDON, GB,<br/> vol. 16, no. 1,<br/> 30 January 2009 (2009-01-30), pages 3-14, XP025897056,<br/> ISSN: 1074-5521, DOI:<br/> 10.1016/J.CHEMBIOL.2008.11.009<br/> [retrieved on 2009-01-30]<br/> whole document, in particular p. 4, col. 2, par. 1 - p. 5, col. 1, bridging par.; p. 6, col. 1, par. 1 - p. 7, col. 1, bridging par.; fig. 2-6; table 1<br/> -----</p> | 1-3                   |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/DK2015/050346

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 2006234392                             | A1                  | 19-10-2006                 |                     |
|                                           |                     | AU 2006236403 A1           | 26-10-2006          |
|                                           |                     | CA 2603814 A1              | 26-10-2006          |
|                                           |                     | EP 1872132 A2              | 02-01-2008          |
|                                           |                     | JP 4898785 B2              | 21-03-2012          |
|                                           |                     | JP 2008537121 A            | 11-09-2008          |
|                                           |                     | US 2006234392 A1           | 19-10-2006          |
|                                           |                     | WO 2006113720 A2           | 26-10-2006          |
| -----                                     |                     |                            |                     |

## フロントページの続き

|               |        |           |         |             |
|---------------|--------|-----------|---------|-------------|
| (51) Int. Cl. |        | F I       |         | テーマコード (参考) |
| C 0 7 K       | 14/745 | (2006.01) | C 0 7 K | 14/745      |
| C 0 7 K       | 14/775 | (2006.01) | C 0 7 K | 14/775      |

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

F ターム(参考) 4H045 AA10 AA30 BA09 BA10 BA34 BA55 EA50 FA43 GA05  
4H050 AA01 AA03 AB20

|                |                                                                                                                                     |         |            |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 用于生物分子识别的新型人工磷脂 - 蛋白质缀合物                                                                                                            |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2018502818A</a>                                                                                                       | 公开(公告)日 | 2018-02-01 |
| 申请号            | JP2016570984                                                                                                                        | 申请日     | 2015-11-12 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 赛丹思科大学                                                                                                                              |         |            |
| [标]发明人         | キラ イリーナ アスタホワ                                                                                                                       |         |            |
| 发明人            | キラ イリーナ アスタホワ                                                                                                                       |         |            |
| IPC分类号         | C07K2/00 C07F9/09 C07F9/10 C07F9/572 G01N33/53 C07K14/745 C07K14/775                                                                |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/564 G01N33/86 G01N33/92 G01N2333/974 G01N2800/226 C07F9/141                                                                  |         |            |
| FI分类号          | C07K2/00 C07F9/09.CSP.Z C07F9/10.C C07F9/572.Z G01N33/53.N C07K14/745 C07K14/775                                                    |         |            |
| F-TERM分类号      | 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/BA10 4H045/BA34 4H045/BA55 4H045/EA50 4H045/FA43 4H045/GA05 4H050/AA01 4H050/AA03 4H050/AB20 |         |            |
| 优先权            | 201470739 2014-11-26 DK<br>201570273 2015-05-11 DK                                                                                  |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>                                                                                                           |         |            |

# 摘要(译)

要解决的问题：提供一种新的心磷脂和其他磷脂的合成类似物，具有高稳定性，灵敏度和选择性，可用于检测自身免疫性疾病的研究和临床诊断中的靶抗体。 解决方案：提供了用于鉴定针对自身抗体，特别是磷脂的自身抗体的磷脂 - 肽或磷脂 - 蛋白质缀合物。此外，提供了磷脂 - 肽和磷脂 - 蛋白质缀合物的中间体，其制备方法和合成方法。 点域1

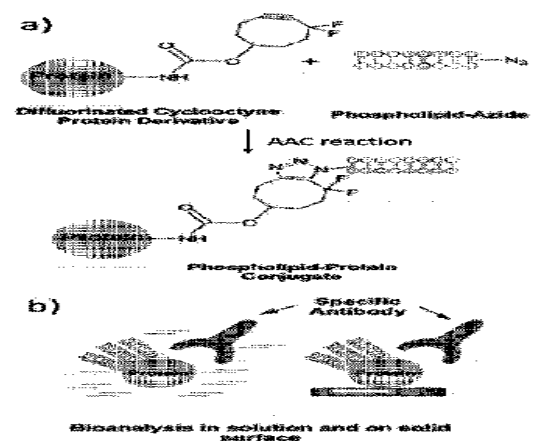


Fig. 1