

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 502289

(P2003 - 502289A)

(43)公表日 平成15年1月21日(2003.1.21)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 0 7 K 14/47		C 0 7 K 14/47	2 G 0 4 5
A 6 1 K 39/00		A 6 1 K 39/00	G 4 B 0 2 4
			H 4 C 0 8 4
45/00		45/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 9/04		A 6 1 P 9/04	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 48数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 620360(P2000 - 620360)

(86)(22)出願日 平成12年5月22日(2000.5.22)

(85)翻訳文提出日 平成13年11月20日(2001.11.20)

(86)国際出願番号 PCT/IB00/00688

(87)国際公開番号 W000/072023

(87)国際公開日 平成12年11月30日(2000.11.30)

(31)優先権主張番号 9911772.3

(32)優先日 平成11年5月21日(1999.5.21)

(33)優先権主張国 イギリス(GB)

(71)出願人 ゼメルヴァイス ユニヴァーシティー オ
ブ メディスン

ハンガリー ブダペスト エイチ - 1085

ユロイストラーセ 26

(71)出願人 シン・マハヴィール

ドイツ ブラウンシュバイク ディー - 38

124 ヴァルトブリック 6

(72)発明者 シン・マハヴィール

ドイツ ブラウンシュバイク ディー - 38

124 ヴァルトブリック 6

(74)代理人 弁理士 鈴木 弘男

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アテローム性動脈硬化症および冠状動脈性心疾患の診断および治療

(57)【要約】

本発明は、ヒートショック蛋白誘発補体活性化への傾向を有するアテローム性動脈硬化症に起因する血管疾患、例えば、冠状動脈性心疾患のような心筋疾患を患う患者のための、人体の治療または診断方法、特に、診断試験方法、診断試験の作成、および診断試験キットにおける、ヒトHSP60の心悸使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 人体の治療または診断法で用いるためのhHSP60またはその免疫原性フラグメント。

【請求項2】 ヒートショック蛋白誘発補体活性化への傾向の診断試験方法であって、

(i) 患者サンプルをhHSP60に接触させる工程、

(ii) 補体活性化を検出する工程、および

(iii) 検出工程(ii)の結果を、ヒートショック蛋白誘発補体活性化への傾向と関連付ける工程を含む方法。

【請求項3】 ヒートショック蛋白誘発補体活性化への傾向の診断試験方法であって、

(i) 患者からサンプルを得る工程、

(ii) hHSP60のみに特異的な工程(i)のサンプル中の抗体を検出する工程、および

(iii) 検出工程(ii)の結果を、ヒートショック蛋白誘発補体活性化への傾向と関連付ける工程を含む方法。

【請求項4】 検出工程(ii)が

i) hHSP60以外の、HSP60蛋白の科の一員とサンプルを接触させる工程、

ii) 工程i)から得られるサンプルをhHSP60と接触させる工程、および

iii) 抗体-hHSP60結合反応を検出する工程

を含んでなる請求項3に記載の診断試験方法。

【請求項5】 検出工程(ii)が

i) hHSP60に独自のエピトープを提示するが他のHSP60エピトープは提示しない抗原とサンプルを接触させる工程、および

ii) 抗体-抗原結合反応を検出する工程

を含んでなる請求項3に記載の診断試験方法。

【請求項6】 抗体-hHSP60結合反応が、補体活性化の検出により検出により検出される請求項4または5に記載の診断試験方法。

【請求項7】 補体活性化がC4bの結合により検出される請求項2または6に記載の診断試験方法。

【請求項8】 ヒートショック蛋白誘発補体活性化への傾向を有する患者用の診断試験の作成におけるhHSP60の使用。

【請求項9】 ヒートショック蛋白誘発補体活性化への傾向を有する患者用の診断試験の作成における、hHSP60および、hHSP60以外のHSP60蛋白の科の一員の使用。

【請求項10】 ヒートショック蛋白誘発補体活性化への傾向を有する患者用の診断試験の作成における、hHSP60に独自のエピトープを提示し他のHSP60エピトープは提示しない抗原の使用。

【請求項11】 hHSP60または、hHSP60に独自のエピトープを提示し他のHSP60エピトープを提示しない抗原を含んでなる、ヒートショック蛋白誘発補体活性化への傾向を有する患者用の診断試験キット。

【請求項12】 hHSP60および、hHSP60以外のHSP60蛋白の科の一員を含んでなる、ヒートショック蛋白誘発補体活性化への傾向を有する患者用の診断試験キット。

【請求項13】 hHSP60に独自のエピトープを提示し他のHSP60エピトープを提示しない抗原を含んでなる、ヒートショック蛋白誘発補体活性化への傾向を有する患者用の診断試験キット。

【請求項14】 ヒートショック蛋白誘発補体活性化の治療用の薬剤の製造における、hHSP60または、hHSP60に独自のエピトープを提示し他のHSP60エピトープを提示しない抗原の使用。

【請求項15】 薬剤がワクチンを含む、請求項14に記載のhHSP60または、hHSP60に独自のエピトープを提示し他のHSP60エピトープを提示しない抗原の使用。

【請求項16】 hHSP60を用いることを特徴とする、ヒートショック

蛋白誘発補体活性化の治療用の薬剤の製造方法。

【請求項17】 人体を診断する方法である、請求項2～7のいずれかに記載の診断試験方法。

【請求項18】 ヒートショック蛋白誘発補体活性化への傾向が、アテローム性動脈硬化症関連疾患への傾向である、請求項2～17のいずれかに記載の診断試験方法、使用または診断試験キット。

【請求項19】 ヒートショック蛋白誘発補体活性化への傾向が、心筋疾患への傾向である、請求項2～17のいずれかに記載の診断試験方法、使用または診断試験キット。

【請求項20】 ヒートショック蛋白誘発補体活性化への傾向が、冠状動脈性心疾患への傾向である、請求項2～17のいずれかに記載の診断試験方法、使用または診断試験キット。

【請求項21】 hHSP60誘発補体活性化を阻害する化合物、物質または剤を同定する方法におけるhHSP60の使用。

【請求項22】 hHSP60を使用することを特徴とする、hHSP60誘発補体活性化を阻害する化合物、物質または剤を同定する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、人体の治療または診断の方法におけるヒトHSP60（ヒートショック蛋白60）の使用に関し、特に、ヒートショック蛋白誘発補体活性化への傾向を有するアテローム性動脈硬化症に起因する血管疾患、例えば、冠状動脈性心疾患のような心筋疾患を患う患者のための診断試験方法、診断試験の作成および診断試験キットに関する。

【0002】

補体系（McAleer, M. A. および Sim, R. B. 著、Activators and Inhibitors of Complement, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, R. B. Sim 編, 1993年, 1~15頁; Reid, K. B. M. および Law, A. 著、1998年、Complement, IRL Press, Oxford を参照）は感染に対する宿主防御に関係し、系の活性化時に触媒的反応および相互作用が生じ、活性化細胞、生物または粒子が破壊のために標的化される。系の破壊的性質故に、誤って誘発された場合、宿主系に重大な損傷を引き起こす可能性があり（Davis, A. E. 著, 1988年, Ann. Rev. Immunol., 第6巻, 595~628頁; Frank, M. M. 著, 1993年, Complement in Health and Disease, 第2版, Whaley, K. ら編, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 229頁）、その活性が減少した場合、感染性病原からの攻撃に宿主がさらされる可能性がある。

【0003】

補体の活性化は、冠状動脈性心疾患および、例えば末梢性のアテローム性動脈硬化症および発作を含むアテローム性動脈硬化症による他の血管併発症の進行において重要な役割を果たすことが発見された（Prohaeska, Z ら著、1999年9月, Int. Immunol, 第11(9)巻, 1363~1370頁; Torzewski ら著, 1997年, Atherosclerosis, 第132巻, 131頁）。Xu, Q. ら著（1993年, The Lance

t, 第341巻, 225頁)、Hoppichler, F.ら著(1996年, *Atherosclerosis*, 第126巻, 333頁)、AT398495、およびBirnie, D. H.ら著(1998年, *Eur. Heart J.*, 第19巻: 387頁)のような最近の出版物は、冠状動脈性心疾患と、アテローム性動脈硬化症におけるマイコバクテリウム65 kDaヒートショック蛋白(HSP)に対して特異的な抗体との関係に関するものである。ヒートショック蛋白(シャペロンとも呼ぶ)、例えば、蛋白のHSP60科は、高度に保存されており、それらに対する抗体は高度に交差反応性であることが分かっている(Ellas, D.ら著, 1990年, *PNAS USA*, 第87巻: 1576頁; Daniele, M. G.ら著, 1992年, 第5巻, 443頁; de Graeff-Meeder, E. R.ら著, 1994年, *Pediatr. Res.*, 第152巻, 3656頁; Metzler, B.ら著, 1997年, *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 第17巻; 536頁; Latif, N.ら著, 1997頁, *Transplant. Proc.*, 第29巻, 1039~1040頁; Schett, G.ら著, 1995年, *J. Clin. Invest.*, 第96(6)巻: 2569~2577頁; Schett, G.ら著, 1997頁, *Atherosclerosis*, 第128(1)巻: 27~38頁)。これらの、HSPに対する交差反応性抗体は、アテローム性動脈硬化症に関係することが知られており、補体活性化がアテローム性動脈硬化症に関係することも知られているが、これらの関係の正確な性質は知られておらず、アテローム性動脈硬化症、補体活性化および交差反応性抗HSP抗体の間の原因的關係は知られていない。HSPの他の使用が、例えばWO97/06821に詳説されている。

【0004】

病原からの保存ヒートショック蛋白が心臓疾患を引き起こすという一般的に支持されている考えは、例えば、Bachmaler, K.ら著, 1999年, *Science*, 第283巻, 1335~1339頁により確認されている。

【0005】

本発明者らは、従来技術で教示されていなかった心筋疾患の原因(実際、冠状

動脈性心疾患、心筋梗塞および発作のようなアテローム性動脈硬化症関連疾患の原因)の同定に成功した。

【0006】

(i) ヒトHSP60(hHSP60)と抗-hHSP60抗体との免疫複合体の形成は、投与量依存的に古典的経路(CP)を介して補体系の活性化を引き起こすが、hHSP60単独では補体活性化を引き起こさないこと；および

(ii) 複合体中の抗-hHSP60抗体により結合されると共に補体活性化を引き起こすhHSP60エピトープはhHSP60に独自のものであること。

【0007】

患者が冠状動脈性心疾患を患うかどうか、および冠状動脈性心疾患の過酷度と、hHSP60に特異的な患者血清中の抗体(すなわち、マイコバクテリウムHSP65のような他のHSPに結合しない抗体)の水準との間に強い正の関係がある。従って、これは、患者を同定するための診断試験の基礎として用いて良く、これから得られるサンプルはヒートショック蛋白誘発補体活性化を起す傾向がある。

【0008】

このように、本発明の第1の要旨によれば、人体の治療または診断の方法において用いるための、hHSP60またはその免疫原性フラグメントが提供される。

【0009】

当然、組換えhHSP60を用いてよく、そのような組換え分子は、例えば、そのアミノ酸配列の変化の結果、または発現系において成される(または成されない)翻訳後修飾の結果として修飾が少ない。そのような分子は、BLAST2プログラム(www.ncbi.nlm.nih.gov)により用いられるアルゴリズムを用いて決められる、少なくとも50、例えば、少なくとも60、70、80、90または95%のhHSP60への相同性を有し得る。前述したように、hHSP60と他のHSP60分子との相同性は非常に高く、従って、本発明の範囲に入るためには、修飾された分子は、本発明に必須のものについてhHSP60と同じ機能的特性を提示しなければならない、すなわち、hHSP6

0 特異的エピトープを提示しなければならない。例えば、これは、hHSP60 および修飾分子との比較試験を行うことにより決めることができる。hHSP60 に結合することができ補体活性化を行うことができる抗体を有する患者から得られたサンプルも、hHSP60 に取って代わる修飾hHSP60 を用いて同じ結果を達成しなくてはならない。ここで、そのような修飾分子は、「本質的にhHSP60 を含んでなる」と表現され、hHSP60 と呼ぶ場合も、本質的にhHSP60 を含んでなる分子を意味する。

【0010】

補体系の不適當な活性化は、アテローム性動脈硬化症の進行または併発、特に冠状動脈性心疾患を含む広範な疾患につながり得る。すなわち、本発明は、冠状動脈性心疾患および、アテローム性動脈硬化症の他の血管合併症を発症する傾向のある患者の診断を可能とする。極めて驚くべきことには、実験（下記）によって、補体活性化抗 - ヒトHSP60 抗体の高水準を作る性能は、成人における冠状動脈性心疾患の発生への高い感受性（すなわち、傾向）に関係する若年者で診断可能な遺伝性の形質であることが示された。これは、本発明のアッセイにおける高水準の結果が、他の面では全く健康な若い患者におけるこの疾患への感受性を示すことを意味している。

【0011】

本発明によれば、

(i) 患者からサンプルを採取する工程；

(ii) サンプルをhHSP60 に接触させる工程；

(iii) 補体活性化を検出する工程；および

(iv) 工程(iii)からの結果を、ヒートショック蛋白誘発補体活性化への傾向に関連付ける工程

を含んでなる、ヒートショック蛋白誘発補体活性化への傾向のための診断試験方法も提供される。

【0012】

本発明によれば、

(i) 患者からサンプルを採取する工程；

(i i) h H S P 6 0 のみに特異的な (i) のサンプル中のいずれかの抗体を検出する工程 ; および

(i i i) 検出工程 (i i) の結果を、ヒートショック蛋白誘発補体活性化への傾向に関連付ける工程
を含んでなる、ヒートショック蛋白誘発補体活性化への傾向のための診断試験方法も提供される。

【 0 0 1 3 】

前記検出工程 (i i) は、

i) h H S P 6 0 以外の、H S P 6 0 蛋白の科の一員 (例えば、H S P 6 5) とサンプルを接触させる工程、

i i) 工程 i) から得られるサンプルを h H S P 6 0 と接触させる工程、および

i i i) 抗体 - h H S P 6 0 結合反応を検出する工程
を含み得る。

【 0 0 1 4 】

また、検出工程 (i i) は、

i) h H S P 6 0 に独自のエピトープを提示するが他の H S P 6 0 エピトープは提示しない抗原とサンプルを接触させる工程、および

i i) 抗体 - 抗原結合反応を検出する工程
を含み得る。

【 0 0 1 5 】

抗体 - h H S P 6 0 結合反応は、いずれかの補体活性化の検出により、特に、C 4 b (補体因子 4 b) の結合により検出することができる。

【 0 0 1 6 】

この診断試験方法は、人体の診断方法である。

【 0 0 1 7 】

本発明の診断試験方法において、E L I S A (酵素結合免疫吸着検査法) のような診断試験、および R a p i d - T e s t (E P 2 9 1 1 8 4) のような免疫クロマトグラフィー試験を使用することができ、他の適当な試験方法およびキッ

トは当業者に明白であり、適切なものとして用いることができる。

【0018】

患者がいつhHSP60媒介補体活性化の傾向を示すかを決めるのと同様に、ヒートショック蛋白誘発補体活性化への傾向を示す患者の治療がいかに進行するかを決めるために診断試験を用いることができ、この場合、hHSP60誘発補体活性化または抗-hHSP60抗体の低下した水準は、治療が効果的であることを示す。同様に、他の結果は、適当な場合には、治療が症状の妨害的進行（悪化）であることを示す、または症状が悪化しつつあることを示す。

【0019】

本発明は、ヒートショック蛋白誘発補体活性化への傾向を有する患者のための診断試験の作成においてhHSP60の使用も提供する。本発明は、ヒートショック蛋白誘発補体活性化への傾向を有する患者のための診断試験の作成における、hHSP60および、hHSP60以外のHSP60蛋白の科の一員の使用も提供する。また、ヒートショック蛋白誘発補体活性化への傾向を有する患者用のための診断試験の作成における、hHSP60に独自のエピトープを提示し他のHSP60エピトープは提示しない抗原の使用も提供される。下記のように、そのような抗原は、エピトープマッピングおよびミモトープ(mimotope)デザインのような技術を用いて、または利用できる種々の多能技術を用いて、容易に生成することができる。同様に、hHSP60への抗-hHSP60抗体の結合を競合的に阻害する結合剤も有用であり得る。そのような結合剤として作用するその性能についてスクリーニングすることができる分子は、ポリペプチド、
型模擬体、多糖類、リン脂質、ホルモン、プロスタグランジン、ステロイド、芳香族化合物、ヘテロ環式化合物、ベンゾジアゼピン、オリゴマーN-置換グリシンおよびオリゴカルバメートを含む。これらの化合物の大規模組み合わせライブラリーは、コードされた合成ライブラリー(ESL)により構成することができ、その方法がAffymaxのWO95/12608、AffymaxのWO93/06121、コロンビア大学のWO94/08051、PharmacopeiaのWO95/35503およびScrripsのWO95/30642(その各々を、全ての目的のために参考に取り入れる。)に記載されている。ペプ

チドライブラリーは、ファージ表示法 (phage display method) により生成することもできる。例えば、DevlinのWO91/18980を参照されたい。抗 - hHSP60抗体に競合するhHSP60への結合について、化合物のライブラリーをスクリーニングする。抗 - hHSP60抗体の結合の阻害は、対照から得られる結果と比較した補体活性化の阻害により検出される。そのような化合物の同定は、薬剤発見プロセスにおいて特に有用であり、hHSP60または抗 - hHSP60抗体と特異的に結合し従って抗 - hHSP60抗体の活性を誘発する補体を阻害する化合物を同定する。

【0020】

本発明により、ヒートショック蛋白誘発補体活性化への傾向を有する患者用の診断試験キットであって、hHSP60を含むことを特徴とするキットも提供される。本発明により、hHSP60および、hHSP60以外のHSP60蛋白の科の一員を含んでなる、ヒートショック蛋白誘発補体活性化への傾向を有する患者用の診断試験キットも提供される。本発明により、hHSP60に独自のエピトープを提示し他のHSP60エピトープを提示しない抗原を含んでなる、ヒートショック蛋白誘発補体活性化への傾向を有する患者用の診断試験キットも提供される。

【0021】

診断的に有用であるのみならず、本発明は、治療機会も提供する。患者においてヒートショック蛋白誘発補体活性化を引き起こすために抗 - hHSP60抗体に結合することが必要なhHSP60エピトープ (または種々のエピトープ) は、ヒートショック蛋白誘発補体活性化の傾向のある (患っている) 患者からの血清を用いて容易に決めることができる。エピトープマッピング (Geysen , H . M . 著 , 1987年 , Journal of Immunological Methods , 第102巻 : 259 ~ 274頁 ; Geysen , H . M . 著 , 1988年 , J . Mol . Recognit . , 第1 (1) 巻 : 32 ~ 41頁 ; Jung , G . およびBeck - Sickinger , A . G . 著 , 1992年 , Angew . Chem . Int . Ed . Eng . , 第31巻 : 367 ~ 486頁) を用いて、一連の重複ペプチドが、hHSP60の配列のために生成

される。次に、重複ペプチドの各々を、患者血清のサンプルと混合することができる。補体活性化（すなわち、C4bへの結合）を引き起こすものは、抗体結合および補体活性化のために必要なエピトープを提示している。これらから、コアエピトープ配列を決めることができ、エピトープを提示する（すなわち、運ぶ）が補体活性化は引き起こさないペプチド（または他の分子）が生成される。エピトープマッピングが失敗した場合、ミモトープデザイン（Geysen, H. M. らの前掲書, 1987年, 1988年; Jung, G. および Beck-Sickinger, A. G. の前掲書, 1992年）のような他の技術を用いて、例えば、その効能のアッセイにおける対照材料として患者抗体を用いて、エピトープを提示する分子を合成することができる。特に、これにより、さもなければエピトープマッピングにより同定されない例えば3級および4級の構造的特徴を有するエピトープが決定および複製される。このように、本発明は、hHSP60のフラグメントの使用にも関する。モノクローナル抗体を生成するクローン（Harlow, E. および Lane, D. 著, 「Using Antibodies: A Laboratory Manual」, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1998年）は、補体活性化に必要な（前記）hHSP60エピトープに結合する性能により、または、hHSP60の存在下に補体活性化を引き起こす性能により容易に決めることができ、本発明は、そのようなモノクローナル抗体およびその抗原結合フラグメントの使用に関する。同様に、hHSP60はフラグメント化され、hHSP60特異的エピトープを運び提示する特異的フラグメントが同定される。他の技術（前述のような）を、抗体標的および結合の競合的阻害剤の同定に利用でき、容易に用いることができる。

【0022】

このように、本発明によれば、ヒートショック蛋白誘発補体活性化の治療、特にアテローム性動脈硬化症による血管疾患の治療のための薬剤の製造におけるhHSP60の使用も提供される。薬剤は、健康の維持および/または回復のためにである、すなわち、ヒートショック蛋白誘発補体活性化の徴候を治癒、緩和、除去または低下させる、またはその可能性を防止または低下させることができる

。薬剤は、例えば、ワクチンであり得る。その使用は、エピトープまたは、hHSP60により提示されるエピトープを運ぶがHSP60分子の科の他の構成員によっては提示されないペプチドの使用を含み得る。また、ヒートショック蛋白誘発補体活性化の治療のための薬剤を製造する方法であって、hHSP60を用いることを特徴とする方法も提供される。

【0023】

今では、hHSP60は、ヒートショック蛋白誘発補体活性化の原因として同定されており、hHSP60（または、前述のようなそのフラグメント）を、補体活性化の誘因を防止する薬剤を同定する薬剤発見工程において用いることができる。このように、本発明によれば、hHSP60誘発補体活性化を阻害する化合物、物質または薬剤を同定するための方法であって、hHSP60（または、そのフラグメント）を用いることを特徴とする方法も提供される。hHSP60誘発補体活性化を阻害する化合物、物質または薬剤を同定する方法におけるhHSP60（または、そのフラグメント）の使用も提供される。薬剤発見工程における本発明のアッセイの使用も提供され、例えば、組み合わせ化学的ライブラリーをスクリーニングすることにより、hHSP60誘発補体活性化またはアテローム性動脈硬化症もしくは冠状動脈性心疾患の発症を阻害し得る化学物質または薬剤が検出される。

【0024】

本発明は、ヒートショック蛋白誘発補体活性化への傾向を有する患者の検出方法を単なる例として示す添付の図面を参照して以下の記載により明らかになり、
図面において：

図1は、hHSP60の投与量依存補体活性化を示す。ヒトHSP60を、正常ヒト血清（NHS；中実四角）または熱不活化ヒト血清（HIHS；中実円）とインキュベートした。hHSP60に固定されたC4bの量は、抗-C4b抗体を用いて決めた。非被覆対照プレートを、NHS（中空円）またはHIHS（中空三角）とインキュベートした。数値は4つの平行測定値の平均OD値および標準偏差を示す。合計3回の繰り返しのうちの1回の代表的実験の結果を示す。非被覆対照プレートと比較して大幅に増加したC4b結合が、指示された（**

) ケースにおいて見られた。

【0025】

図2は、グロブリン欠乏血症血清 (AGS) における hHSP60 による古典系経路活性化の欠乏を示す。ヒトHSP60 (0.1 μg/ml) を、NHS と、または2つの異なるAGSとインキュベートした。抗C4b抗体を用いて、プレートに結合されたC4bの量を決めた。対照として非被覆ウエルを用いた。AGS + IgGは、抗体と再構成したAGS (5%熱不活化血清) を示している。合計で2回の繰り返しのうちの1回の繰り返し実験からの結果を示す。非被覆対照プレート (スチューデント t 検定) と比較して著しく増加したC4b結合が、指示した (***, $p < 0.0001$; *, $p < 0.05$) 場合において見られた。

【0026】

図3は、抗hHSP60抗体水準と、hHSP60 - 固定C4bの量との関係を示す (パネルA)。抗hHSP60抗体の水準とhHSP60固定C4bとの間において、高度に有意 ($r = 0.459$, $p < 0.0001$) な正の関係が観察された。パネルBは、抗M. bovis HSP65抗体水準と、HSP65固定C4bの量との間の関係の欠乏を示す ($r = 0.1068$, $p = 0.554$)。標準としての各プレート上で試験した8つの個々の血清の結果を用いて、異なるプレート上で得られる結果の正規化を達成した。

【0027】

図4は、競合ELISAによる、抗hHSP60と抗M. bovis HSP65抗体との間の相違を示す。ELISAプレートを、hHSP60 (左パネル) またはM. bovis HSP65 (右プレート) で被覆し、系列希釈した患者血清とインキュベートした。プレートへのIgG型抗体の結合を、インキュベーション混合物 (対照の場合において緩衝液を添加した, 中実四角) に添加された5 μg/mlのhHSP60 (中空円) またはHSP65 (点線) により遮断した。合計で3回の繰り返しのうちの1つの代表的実験の結果を示す。値は、3つの平行測定の平均およびSEM OD値を示す。

【0028】

図5は、家族歴によるリスク状態にある子供の冠状動脈性心疾患の感受性の予想への検討からの結果を示す。Y軸は、補体活性化指数を示す。X軸は、対照子供（左側のデータ）（中央値0.58、四分位数間距離0.33~0.17）とリスク状態の子供（右側のデータ）（中央値1.27、四分位数間距離0.53~2.33）との中央値（四分位数間距離）についての2組のデータを示す。Mann-Whitney試験を用いる結果において、 $P = 0.0002$ 。

【0029】

実験

実験を以下に詳説するように行い、その結果として：

i) hHSP60は、抗HSP60抗体を通しての補体カスケードの活性化を誘発することができる；

ii) hHSP60誘発補体活性化と、抗ESP60抗体の水準との間に関係がある；

iii) 抗HSP抗体の組から、hHSP60との相互作用による補体カスケードの活性化を引き起こす他のHSP60蛋白と交差反応しないhHSP60特異的抗体である。

【0030】

結果は、患者血清における抗hHSP60抗体（他のHSP60蛋白と交差反応しない）の水準と、アテローム性動脈硬化症に起因する冠状動脈性心疾患との間の正の関係を示す。

【0031】

さらなる独立して行った研究は、本発明のアッセイが、補体活性化抗hHSP60抗体と冠状動脈性疾患の発生との間の極めて強度の関係を提供し、第2および第3の分数についてのオッズ比が5.24および6.37であることを示している。

【0032】

45歳前に心筋梗塞を患った父母および/または祖父母を持つ健康な子供からのサンプルを用いた研究も行った。結果は、補体活性化抗hHSP60抗体の高水準を生み出す性能が、成人における冠状動脈性心疾患の発症についての高めら

れた感受性と関係する遺伝性体質であり、従って、若年者のための極めて有用な診断であることを示している。

【0033】

定義

ここで、種々の文法形の「抗体」という用語は、イムノグロブリン分子、およびイムノグロブリン分子の免疫学的活性部位、すなわち、抗体結合部位またはパラトープを含む分子に言及するために用いられる。そのような分子は、イムノグロブリン分子の「抗原結合性フラグメント」としても呼ばれる。

【0034】

例証となる抗体分子は無傷のイムノグロブリン分子、実質的に無償のイムノグロブリン分子、および、当該分野においてFab、Fab'、F(ab')₂およびF(v)として知られている部分を含む、パラトープを含むイムノグロブリン分子の部分である。

【0035】

「治療」は、ヒトまたは動物体の疾患または機能不全の徴候を治癒、緩和、除去または低下させる、またはそれの可能性を予防または低下させる治療である。

【0036】

発明の実施態様

実施例1

材料および方法

1. ヒートショック蛋白

プラスミドpRIB1300を有する熱(42)誘発大腸菌K12菌株M1164から、組換えhHSP60および組換えMycobacterium bovis HSP65を生成および精製した(Thole, J.E.R.ら著, 1987年, Infect. Immun., 第55巻, 1466~1475頁)。細胞は、ライソザイム処理および音波破碎により溶解した。可溶性蛋白を、アニオン交換クロマトグラフィーにより精製した。緩衝液を透析により10mM重炭酸アンモニウムに変え、蛋白を少量取り凍結乾燥した。

【0037】

2. 補体活性化ELISA

酵素結合免疫吸着検査法(ELISA)を用いて、Prohaeszka Z. 著(1988年, *Annal. N. Y. Acad. Sci.*, 第851頁: 94~98頁)、Prohaeszka Z. ら著(1995年, *Immunology*, 第85巻: 184頁)およびProhaeszka Z. ら著(1997年, *Mol. Immunol.*, 第34巻: 809頁)に記載のように、固相hHSP60またはマイコバクテリウムHSP65の補体活性化性能を決めた。ELISAプレートを、異なる量のhHSP60または0.1μg/ウエルのM. bovis HSP65で被覆した。洗浄後、ウエルを、50μlの正常ヒト血清(NHS、10人の若い健康な固体からの貯蔵血清)、Ca²⁺およびMg²⁺を含むベロナール緩衝生理食塩水と1:1で予備希釈した熱不活化(56℃, 30分)ヒト血清、Mg²⁺EGTAキレート化血清、またはホモ接合性C2欠損SLE(全身性エリテマトーデス)患者の血清と、37℃で30分間インキュベートした。もう一つの組の実験において、Ca²⁺およびMg²⁺を含むベロナール緩衝生理食塩水と1:1で予備希釈した個々の患者の血清を用いた。プレートに固定された補体蛋白の量を、特定の山羊抗C4b抗体および山羊抗C3b抗体(*Atlantic Antibodies, Stillwater, MN, USA*)を用いて決めた。

【0038】

3. グロブリン欠乏血症血清

補体活性化酵素-免疫アッセイにおいて、低水準の抗体を有する2つの血清サンプルを用いた。グロブリン欠乏血症血清AGS-1を、4歳の少年から得た。IgG、IgAおよびIgM型抗体の水準は、それぞれ0.375、<0.01および0.037g/lであった。試験した全ての補体パラメーター(CH₅₀、C3、C4水準および溶血活性)は正常範囲であった。グロブリン欠乏血症血清AGS-2を、33歳女性から供与してらった。IgG、IgAおよびIgM型抗体の水準は、それぞれ0.380、<0.063および<0.042g/lであった。試験した全ての補体パラメーター(C3、C4水準および溶血活

性)は正常範囲であった。

【0039】

4. 抗hHSP60/HSP65抗体の決定

シャペロニン60科(組換えhHSP60、組換えM. bovis HSP65)蛋白と反応するIgG型抗体の量を、既述(Prohaeszká, Z.ら著、1995年、前掲書)のようにELISAにより検定した。プレートに、0.1 µg/ウエルのhHSP60またはM. Bovis HSP65を被覆した。洗浄および阻害(PBS、0.5%ゼラチン)後、ウエルを、0.5%ゼラチンおよび0.05%Tween20を含むPBS中に1:500で希釈した100 µlの血清サンプルとインキュベートした。鎖特異的抗ヒトIgGペルオキシダーゼ標識抗体(Sigma, St. Louis, USA)およびo-フェニレンジアミン(Sigma)検出システムを用いて、抗HSP抗体の結合を決めた。光学濃度を492 nm(620 nmで対照)で測定し、二重ウエルから平均結果を計算した。標準として、系列希釈した対照抗HSP60ウサギポリクローナル抗血清(StressGen SPA-804)を用いた。光学濃度値として得られた値を、この標準に対する単位/ml値に計算した。

【0040】

5. 競合ELISA

組換えHSPの抗体競合効果を検定するために、前記ELISA試験の一つの段階を変化させた。試験すべき血清を、0.5%ゼラチンと0.05%Tween20およびさらなる5 µg/mlのhHSP60またはHSP65を含むPBS中に希釈した。対照サンプルにPBSを添加した。アッセイは前述のように行った。

【0041】

6. 統計的分析

相関係数を、ノンパラメトリック・スピアマン(Spearman)法により計算した。GraphPad Prism2.0ソフトウェアパッケージ(San Diego, CA USA)を用いて、グループ比較を、スチューデントt検定またはノンパラメトリック・スピアマン法により計算した。

【0042】

7. 患者

冠状動脈性心疾患を患う74人の患者（男性60人、女性14人、中央値年齢60歳）をこの試験で用いた。患者の基本的データを表1に要約する。全ての患者は、冠状動脈撮影法およびバイパス手術を行った。急性疾患および発作の影響を制御するために、手術から6ヶ月後にサンプルを採取した。血清を分取し、使用まで-70℃に維持した。74人の患者は、抗HSP60抗体水準により357人の患者から選んだ（37人の患者は「高」（中央値より高い）水準であり37人の患者は「低」（中央値より低い）水準であった）。

【0043】

実験

1. hHSP60による補体活性化

抗相hHSP60が補体カスケードの活性化を誘発し得るかどうか試験するために、Prohászka, Zら著（1995年、前掲書）およびProhászka, Zら著（1997年、前掲書）の固相ELISA試験システムを適用した。ヒトHSP60被覆ELISAプレートを、NHS（中間水準（ 114.8 ± 15.7 U/ml、平均 \pm SD）の抗HSP60抗体を含む）とインキュベートし、C4bおよびC3b結合を測定した（表2）。hHSP60被覆プレートへの両補体蛋白の、非被覆のものより極めて高い結合は、hHSP60が補体カスケードを引き起こし得ることを示した。NHSの熱不活化は、C4bおよびC3bの背景水準への結合を低下させたので、hHSP60による補体システムの活性化は、血清とhHSP60との相互作用を必要するようである。この活性化は、 Mg^{2+} -EGTA含有血清においてC4b結合もC3b結合も見られなかったため、古典的経路により起こる。 Ca^{2+} イオンのキレート化は、CPを阻害することが知られている。hHSP60によるCP活性化を、著しいC4b結合が血清において見られた（表2）ので、CPの開始が起こったにも拘わらず、ホモ接合性C2欠損SLE患者から得られた血清からのC3b結合の欠損を示すことにより、さらに証明した。hHSP60によるCP活性化の特異性を、その投与量依存性（図1）を示すことにより証明した。

【0044】

2. hHSP60が、抗HSP60抗体を通るCPを引き起こす

補体カスケードのCPの開始は2つの経路により進行することができる：免疫複合体の形成による、または特定の分子、ウイルスまたはバクテリア産物によりC1q(CPの第1成分)の結合を行うことによる。hHSP60がどのようにCPを開始するか決めるために、固相hHSP60をAGSサンプルとインキュベートした。図2に示すように、いずれのAG血清においても重大なCP活性化は観察されなかった。AGS-1血清と抗体(HIHSから提供)との再構成により、重大なCP活性化が得られ、これは、抗体の存在下の場合にのみ、すなわち、免疫複合体の形成により、hHSP60がCPを引き起こすことを示している。

【0045】

3. hHSP60誘発CPと抗HSP60抗体の水準との関係

hHSP60によるCP活性化への特定の抗HSP60抗体(アテローム性動脈硬化症病巣を有する患者の血清中に異なる量で存在することが知られている)の影響を調べるために、既知量の抗hHSP60および抗M.bovisHSP65抗体を用いて個々の血清サンプル中でhHSP60誘発CP活性化(hHSP60被覆プレートへのC4bの結合)の程度を試験した。これらのサンプルを、74人の冠状動脈性心疾患のバイパス手術から6ヶ月後に得た。hHSP60誘発CP活性化の程度(C4b結合により測定)と、抗hHSP60抗体の量との高度に有意な正の関係($r = 0.459$ 、 $p < 0.0001$)が見られた(図3、パネルA)。これに対して、CP活性化の程度は、抗HSP65抗体の量が抗hHSP60抗体の量と著しく関連している($r = 0.425$ 、 $p = 0.0005$)にも拘わらず、抗M.bovisHSP65抗体の水準と関連しなかった($r = 0.09$ 、 $p = 0.451$)。同じ血清サンプルの一部において、抗M.bovisHSP65による古典的経路の活性化を分析した(図3、パネルB)。HSP65による個々の血清におけるCP活性化は、hHSP60と比べて非常に弱く、おそらく、抗HSP65抗体の量により影響されない(スピアマン相関係数、 $r = 0.106$ 、 $p = 0.554$)。次に、抗hHSP60抗体の水準

が高いまたは低い血清検体におけるhHSP60誘発CP活性化の程度における相違について、分析を行った。抗HSP60抗体の中央値水準よりも高い血清中のhHSP60によるCP活性化は、抗HSP60抗体の中央値水準よりも低い血清中よりも、かなり高い($p = 0.0001$ 、Mann-Whitney試験)。マイコバクテリウムHSP65誘発CP活性化および抗HSP65抗体の場合において同じ相違は見られなかった($p = 0.787$)。

【0046】

4. 抗hHSP60および抗HSP65抗体との相違

抗HSP60/65抗体が、異なる抗原上の同じエピトープに特異的であるかどうか(すなわち、同じ抗体が異なる抗原と交差反応するかどうか)、または、異なる抗原により提示される異なるエピトープに特異的であるかどうか決めるために、競合的ELISAを用いた。ELISAプレートを、hHSP60または、M.bovisHSP65蛋白で被覆し、系統希釈した試験血清とインキュベートした。インキュベーション混合物は、各場合(または、対照としての緩衝液)における競合的抗原として、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ のhHSP60またはHSP65を含んでいた。このアッセイにおいて、研究群からの合計10個の血清を試験した。図4は、3人の患者の血清において得られた結果を示す。患者4101の血清は、多量の抗hHSP60抗体を含んでいたが、抗HSP65抗体は含まなかった。この血清をhHSP60とインキュベーションすると、固相hHSP60への抗体の結合活性を著しく低下したが、HSP65とのインキュベーションは抗体固定に影響を与えなかった。患者KMの血清は、HSP65に対して強度の活性を示したが、hHSP60に対しては示さなかった。この血清をHSP65とインキュベーションすると、固相HSP65の抗体の結合活性を著しく低下したが、hHSP60とのインキュベーションは抗体固定に影響を与えなかった。患者4395の血清は、hHSP60とHSP65の両方に反応する抗体を含んでいた。このサンプルにおいて、同種のHSP製剤(すなわち、hHSP60およびHSP65の対の他の一方)とインキュベーションすると、抗体結合が殆ど完全に阻害されたが、hHSP60は抗HSP65の固定を僅かに阻害したのみで、逆もまた同じであった。図4に示さない他の7人の血清サンプルにおいて、同

様の結果は得られなかった。

【0047】

結論

実験の結果から、2つの重要な結論を推断することができる。第1に、hHSP60単独では、補体系を活性化しないが、固相hHSP60に抗体を複合すると、特定抗体の量に依存する著しい補体活性化につながる。第2に、hHSP60およびM. bovis HSP65への抗体は、その抗原特異性および補体活性化性能において互いに相違する。

【0048】

さらに、固相組換えhHSP60は、冠動脈性心疾患の血清においてのみならず、貯蔵された正常ヒト血清において補体系を活性化させることができる。Mg²⁺-EGTAによる第1の補体成分の阻害は、C4の活性化および結合を遮断し、ホモ接合性C2欠損を有する患者の血清においてhHSP60へのC3bの結合は生じなかったため、hHSP60がCPを介してヒト結成中の補体を活性化すると結論することができる。

【0049】

CPは、異なる物質により直接にまたは、特定の抗体の貢献により、すなわち、免疫複合体形成により活性化することができる。hHSP60の場合、CPの開始は、グロブリン欠乏血症血清サンプルにおいて補体活性化が見られなかったため、免疫複合体形成により起こるようである。

【0050】

これらの発見は、hHSP60に指向された特定の抗体が、hHSP60による補体活性化を引き起こし、投与量依存的に高めることを示している。

【0051】

さらに、抗IgG抗体(リウマチ因子)もこの活性化に影響する。さらに、マイコバクテリウムHSP65もCPを活性化することが発見されたが、この活性化の程度は、抗HSP60水準にも抗HSP65抗体水準にも関連しない。抗HSP65と抗H. pylori抗体は互に関連する(Birnie, D.H.ら著, 1998年、前掲書)ので、抗H. pylori抗体の量が、HSP6

5 誘発補体活性化の程度に関連するかどうかを決めるために試験を行った。H S P 6 5 に固定された C 4 b の量と、C H D 患者の血清中の抗 H . p y l o r i 抗体の水準との間に非常に共同の正の関連が発見された。H S P 6 5 誘発 C P 活性化と、抗 H S P 6 5 抗体水準との間に関連を欠くことのもう一つの可能な説明は、抗 H S P 6 5 抗体の異なる（補体非活性化）サブタイプであり得る。

【0052】

これらの発見は、補体系が、h H S P 6 0 と特定抗体との複合体にさらされたときに、効率的に活性化され得ることを示している。異なる病状およびストレス刺激は、内皮細胞において h H S P 6 0 発現を著しく増加させる（W i c k , G . ら著，1995年，*Immunol . Today*，第16巻：27頁；X u , Q . および W i c k , G . 著，1996年，*Mol . Med . Today*，第2（9）巻：372頁）。例えば、非毒性虚血 - 再灌流は、ヒト臍帯静脈内皮細胞がヒト結成中の補体系を活性化し得るようにすることがわかった（C o l l a r d , C . D . ら著，1997年，*Circulation*，第96巻：326頁）。このプロセスのメカニズムは、十分に理解されていない。しかしながら、これらの結果は、内皮細胞の表面上の h H S P 6 0 の過剰発現が、特に多量の抗 H S P 6 5 抗体が存在する場合に培養内皮細胞の補体活性化性能を増加させる因子の一つであり得ることを示している。補体活性化は、アテローム性動脈硬化症の初期相と晩期相の両方において重要な役割を有するので、これらの発見は重要な病気の含蓄を有する。

【0053】

アテローム性動脈硬化症の進行における抗 H S P 6 5 抗体の推定される役割は、幾つかの近年の発見により支持される。X u ら（1999年，前掲書）は、抗マイコバクテリウム H S P 6 5 抗体の高められた水準と、頸動脈アテローム性動脈硬化症との関係を見出した。より最近では、H o p p l i c h e r ら（1996年，前掲書）は、冠状動脈性心疾患を有する114人の患者において、76歳の性が同じの健康対照と比較して非常に増加した抗 H S P 6 5 の量を測定した。同様に、B i r n i e ら（1998年，前掲書）は、冠状動脈性アテローム性動脈硬化症の程度と、抗 H S P 6 5 抗体の量との間の正の関係を示した。

【0054】

抗原認識および補体活性化性能における抗hHSP60と抗HSP65抗体と
の間の相違を示すことは極めて重要であり、以前には示唆されていなかった。6
0kDa科のヒートショック蛋白への抗体は、健康被検体と比較して、幾つかの
疾患を有する患者において高められる。シャペロニン科の異なる構成員に対する
抗体を並行して測定すると、通常(いつもではないが(Handley, H.H
.ら著, 1996年, Clin. Exp. Immunol., 第103巻: 42
9頁))、それらの量の中に強い関連が見られる。HIV患者(Prohasz
ka, Zら著, 1998年, Ann. NY Acad. Sci., 第851巻:
94~98頁)および冠状動脈性心疾患を患う患者の血清における抗HSP60
と抗HSP65抗体の水準の間に有意な関係が存在することも発見された。

【0055】

実施例2

中年男性における冠状動脈性心疾患の感受性の予測の研究

以下の研究は、独立した第3のグループにより引き受けられ、CardioP
ath Ltd.により供給される以下に詳説するような診断試験キットを用い
て、Professor G J Miller, MD FRCPおよびDr
David Howarth of the MRC Epidemiolog
y and Medical Care Unit, Wolfson Inst
itute of Preventive Medicine, Charter
house Square, London EC1M6BQ, United K
ingdom, により行われた。

【0056】

合計で265個のクエン酸塩を加えた血漿サンプルを以下に詳説するように調
べた。一つのケース、すなわち冠状動脈性疾患を患う患者から得られる各サンプ
ルについて、いかなる心臓疾患の徴候もない患者から2つのサンプルを選択した
。

【0057】

・110の対照を用いて、事象前のケースから56個のサンプルを得た。

【0058】

・66の対照を用いて、事象後のケースから33個のサンプルを得た。

【0059】

中年男性から得られる全てのサンプル、およびこのケースおよび2つの対照サンプルの年齢を合わせた。サンプルを採取し、直ちに遠心分離し-45で凍結してから、ドライアイスに乗せてMRCユニットに移した。次に、血漿を-80で貯蔵し、特にこの評価のためだけに溶解させた。アッセイの実際の試験は、盲検的に行い、全ての試験が完了するまで分析を開始しなかった。

【0060】

1. 試験の原理

精製した組換えヒトHSP60蛋白を、マイクロ滴定ウエルの表面上に被覆する。次に試験サンプルを適用する。抗hHSP60抗体は、ウエル中の抗原に複合する。非結合材料を洗い流し、ペルオキシダーゼ共役抗C4bを適用する。抗体が補体カスケードを結合し活性化すると、C4b共役体は、抗原に共有結合したC4bフラグメントに結合する。非結合材料を再度、洗い流す。基質である安定化3,3',5,5'テトラメチルベンジジン(TMB)の添加時に、酵素が存在しているウエルのみにおいて色が発現し、ヒトC4bの存在を示している。次に、酵素反応を、硫酸の添加により停止し、吸光度を450nmで測定する。

【0061】

2. 材料

【0062】

【表1】

成分/化学物質	市販元	生成物コード
プレート	Dynex	Immulon 4
プレート リッド	Griener	n/a
hHSP60	Stressgen	SPP-740
Na ₂ CO ₃	Fisher	S/2920/53
NaHCO ₃	BDH	10247
スクロース	Sigma	S9378
Tris	Sigma	T1503
NaCl	Sigma	S9625
Tween20	Sigma	T1379
ゼラチン	Sigma	G0262
ウサギ抗hHSP60	Stressgen	SPA-804-1
C4b	Diasorin	80225
Stablzyme	Surmodics	SZ02
山羊抗ウサギAb	Amdex	AX01-0301X
TMB基質	Dako	S1600
H ₂ SO ₄	Sigma	102761C

【0063】

HSP60 (www.stressgen.com) は、ヒト前骨髄球白血病 (HL-60) cDNAライブラリーからクローンされた組換えhHSP60である。

【0064】

プレート被覆： pH9.6の0.05M炭酸塩緩衝液中の1μg/mlのhHSP60の50μlを各ウェルに添加し、4℃で一晩インキュベートする。次にプレートを洗ってから、200μlの1%ゼラチン、5%スクロース、0.15M NaCl、0.05M Tris、0.1%Tween20で遮断し、RT（室温）で1時間インキュベートしてから、液体を除去し、プレートを37℃で一晩乾燥した。

【0065】

天然対照：0.05M Tris、0.15M NaCl、5%ゼラチン、pH7.5

低正対照：低正対照は、pH7.5の0.05M Tris、0.15M NaCl、5%ゼラチン中に約1/500で希釈されているウサギ抗hHSP60を含む。この対照を用いて、変異を検査し、補体活性化指数を計算する。

【0066】

共役体：C4bのヘテロ2官能HRP共役体が、Stabzyme共役希釈液中に約1/500で希釈される。山羊抗ウサギHSP共役体も、低正対照について約1/60000の希釈率で含まれる。

【0067】

洗浄緩衝液：0.05M Tris、0.15M NaCl、0.1%Tween 20、pH7.5

停止溶液：0.2% H₂SO₄

【0068】

アッセイキット：

【0069】

【表2】

1. Instruction Leaflet, EIA Data Recording Sheet	1 + 1
2. マイクロ滴定プレートおよびプレートリッド： ウエルをhHSP60蛋白で被覆し、プラスチックシールで封止し、プレートリッドで覆い、乾燥剤と一緒に再封止性箔袋に入れる	12 × 8 ウエル + 1
3. 負対照（青）（試薬2）	1 × 1 ml
4. 低正対照（LP）（緑）（試薬3）	1 × 1 ml
5. 抗C4b1eHRP IgG共役体（紫）（試薬4）	1 × 1 ml
6. 洗浄緩衝液：20倍濃縮液（無色）（試薬5）	1 × 50 ml
7. TMB基質（無色）（試薬7）	1 × 1 ml
8. 停止溶液（無色）（試薬8）	1 × 1 ml

【0070】

試薬調製：

洗浄緩衝液：19部の蒸留水と共に1部の洗浄緩衝濃縮液を用いて濃縮洗浄緩衝液を希釈する。8個毎のウエルストリップについて、蒸留水76mlに濃縮洗浄緩衝液4mlを添加することにより希釈洗浄緩衝液80mlを調製する。各アッセイランの前に新しい希釈洗浄緩衝液を調製する。

【0071】

3. 試験手順

1. アッセイの開始前に、全てのキット成分および試験サンプルを室温（20～25）にする。

【0072】

2. 試験性能をチェックするために、試験体の各バッチを用いてキット対照を実行すべきである。キット対照は、2度実施しなくてはならない。キット対照を含む試験すべきサンプルの数について、十分な微小ウエルストリップを選択する。フレーム中にストリップを置き、保護用プラスチックシールを取り去る。提供されるEIAデータ記録シート上にキット対照および試験サンプルの位置を記録する。未使用ストリップは、貯蔵のために2～8℃で置く前に、乾燥剤を含む再封止性箔袋に貯蔵しなくてはならない。

【0073】

3. 対照または試験体を希釈することなく、適当なウエルに50μlのサンプルまたは対照血清(試料2、3)を分注する。対照は、結果の正確な解釈を確保するために、最後に添加すべきである。穏やかに50秒間振とうする。プレートをプレートリッドで覆い、室温20～30℃で湿った吸収性紙の上にそれを20分間置く。

【0074】

4. インキュベーション期間の終わりに、プレートを除き湿った吸収性紙を残し、プレートを以下に記載のように洗う。

【0075】

5. 試薬調製部分に記載のように洗浄緩衝液を希釈する(試薬5)。プレートを希釈洗浄緩衝液で、手で3回洗う、または自動プレート洗浄機を用いて洗う。機械洗浄については、各ウエルに300μlが分注され、適当な殺菌剤が廃液収集瓶に添加されることを確保する。洗浄後、吸収性紙の上で逆さまにしたプレートをたたくことにより過剰の液体を除去する。

【0076】

手洗いについては、適当な殺菌剤を含む溶液中に内容物を注意深く空けることによりウエルを洗い、次に、ウエルを廃液容器内に仕込む。この手順をさらに2回繰り返す。洗浄後、吸収性紙の上で逆さまにしたプレートをたたくことにより過剰の液体を除去する。試験血清の生物災害の可能性を留意して、適切な注意を払うべきである。これらの注意は、地域の労働法に固守しなければならない。不

十分な洗浄は正確さに劣り、吸光度が誤って評価されるので、洗浄工程は重要である。

【0077】

6. 100 μ l の共役体（試薬4）を各ウェルに分注する。プレートを穏やかに5秒間振とうしてから、リッドをプレートに乗せ、インキュベーターに戻し、湿った吸収性紙の上にプレートが位置することを確保する。室温20～30 で60分間インキュベートする。

【0078】

7. インキュベーション期間の終わりに、工程4および、工程5に記載の洗浄手順を繰り返す。

【0079】

8. 6. 100 μ l の安定化TMB基質（試薬7）を各ウェルに分注する。穏やかに5秒間振とうしてから、リッドをプレートに乗せ、室温（20～30）で暗所に15分間置く。

【0080】

9. 各ウェルに停止溶液（試薬8）100 μ l を添加することにより反応を停止する。これにより、酵素を含むウェルにおいて色が青から黄に変化し、これは、補体活性化の存在を示している。空中のプレートリーダーを空にする。各ウェルの450 nmでの吸光度を反応停止直後に測定する。

【0081】

4. 計算および結果の解釈

各試験および対照について、ウェル中で得られるODを決める。

【0082】

アッセイの実証：低正対照の平均ODは、アッセイ結果が有効であるために、0.3以上でなくてはならない。

【0083】

正の結果を示すOD水準、すなわち、補体活性化抗hHSP60抗体の有意な水準は、サンプル集団間で、例えば、成人と若年者の集団の間で変化することが期待され得る。例えば、一つの集団で陽性と考えられる結果は、別の集団におい

で重要でないことがある。従って、ODを実際のリスクに関連付け、結果が陽性と考えられる遮断値を定義する標準曲線が、研究される集団について確立される。

【0084】

アッセイ間の比較のために、補体活性化指数(CAI)を計算しなくてはならない。

【0085】

$CAI = \text{サンプルのOD} / \text{低正対照の平均OD}$

低正対照の平均ODのこの使用により、例えば異なる装置を用いる異なる組の実験の間において結果の標準化がなされる。

【0086】

5. 結果

生データを収集後、以下の統計的分析を行った。

【0087】

ケースおよび対照における補体活性化指数：

結果を表3に示す。1つの異常値を対照から除いた。

【0088】

条件付き論理的回帰分析

オッズ比(OR)は、 $\log CAI$ における1sd増加(0.94)によるこれは、CAIの2.6倍の増加に等しい。

【0089】

データを表4に示す。

【0090】

事象の時間：

56のケースにおいては、事象前にサンプルを採取した。33のケースにおいては、サンプルを事象後に採取した。

【0091】

事象の時間との優位の相互作用があった($p = 0.007$)。事象前にサンプルを採取した場合はCAIが大きく増加したが、事象後にサンプルを採取した場

合には関係は見つからなかった。

【0092】

事象前のサンプル：

事象前に採取したサンプルについてのデータを表5に示す。

【0093】

事象後に採取したサンプル：

事象後に採取したサンプルについてのデータを表6に示す。

【0094】

事象前に採取したサンプルを用いる場合、事象の近接に従って関係が変化することも証明はない ($p = 0.65$)。

【0095】

6. 分数の分析

分数によるCAIの分析は、関係が、最も低い分数においてのみ低下するリスクを有する非線形であることを示している。CAI分数についての遮断点は、0.27および0.6である。ここでも、事象の時間との有意な相互作用がある ($p = 0.007$)。

【0096】

全体の結果を、表7の分数において示す。事象前のサンプルについての分数の結果を表8に示し、事象後のサンプルについての分数の結果を表9に示す。

【0097】

補体活性化指数 (CAI) 埋め込み (nested) ケース - 対照研究における一変量の間接関係を表10に示す。

【0098】

補体活性化指数：

事象前に得たサンプルについて、補体活性化指数の分数とケース / 対照状態の間接関係は、喫煙状態、収縮期血圧、コレステロール、トリグリセリド、線維素および肥満指数の調整後に、維持された ($p = 0.003$)。

【0099】

分数1に対して、分数2および3についてのオッズ比は、それぞれ5.24 (

1.50 ~ 18.26) および 6.37 (1.80 ~ 22.58) である。

【0100】

フルモデルを表11に示す。分析は155の観察：53のケースと102の匹敵する対照を用いる。オッズ比は、喫煙および抗体指数を除いて、変数における1sd増加についてのものである。トリグリセリドおよび線維素は、log変換されている。

【0101】

モデルにおいて補体活性化指数のみの分数を用いて、ROC (受信者動作特性) 曲線下の面積は0.65である。

【0102】

7. 結論

データは、本発明のアッセイにより決められる補体活性化指数 (CAI) が冠動脈性疾患のリスクに強度に関連することを示している。これを表8に示す。

【0103】

表10は、コレステロール、喫煙、線維素および収縮期血圧も、これらの男性のリスクに有意に関係することを示している。

【0104】

表11は、リスクを有するこれらの因子の独立した関係の強さについての多変数分析である。この表におけるp値および95%信頼区間から、このアッセイのみが独立してリスクと関連していたことがわかる。分布の低い方の3番目における水準を有する男性と比較して、中間の3番目の男性はリスクが5.2倍であり、上の3番目の男性はリスクが6.4倍であった。

【0105】

この評価において、用いたアッセイキットは、冠動脈性疾患のリスクを高度の予想すると考えられる

【0106】

実施例3

家族歴故にリスクのある子供の冠動脈性心疾患の感受性の予想の研究

1. 導入

冠状動脈性疾患を患った家族からの子供は、家族歴陰性の同等者よりも、成長した時に冠状動脈性心疾患の発症への感受性がかなり高いことが分かる。45歳前に心筋梗塞を患った父母および/または祖父母を有する健康な子供が、本発明のアッセイキットを用いて、対照サンプルよりも有意に高い結果を与えるかどうかを調べるために研究を行った。

【0107】

合計で117の血清サンプルを分析した。

【0108】

リスク子供において：45歳前に心筋梗塞を患った父母または祖父母の少なくとも1人を有する10～16歳の年齢の64人の健康な子供。

【0109】

対照：選択的手術前または外傷後の53人の年齢が匹敵するランダムに選択された健康な子供。一部しか家族歴について問われていないので対照は十分に適切ではなく、よって、このグループがリスクのある子供も含んでいることを排除できない。従って、結果（下記）に示す相違が、リスクのある子供を適当な対照と、すなわち冠状動脈性心疾患について証明された陰性家族歴を有する子供と比較した場合に、かなり高いことが予想される。

【0110】

血清サンプルを、試験前に - 70 で貯蔵した。

【0111】

1. 試験の原理

前述と同様

2. 材料

前述と同様

3. 試験手順

前述と同様

4. 計算および結果の解釈

前述と同様

5. 生データを収集後、以下の統計的分析を行った。

【0112】

リスクのある子供のオッズ比(OR)を、対照群で測定した75%および95%パーセンタイルの2つの別々の遮断限界を用いて計算した。これにより、それぞれ、1.07および2.0の補体活性化指数(CAI)を用いる遮断値が得られる。

【0113】

データを、表12および13および図5において示す。

【0114】

結果は、リスクのある群の子供が、対照群と比較すると有意に高められた結果を与えることを示している。

【0115】

7. 結論

データは、この評価において、補体活性化抗hHSP60抗体の高水準を生成する性能が、成人における冠状動脈性心疾患の発症の高い感受性に関連する遺伝性体質であることを示している。

【0116】

これは、このアッセイにおける高水準結果が、さもなければ全く健康な若年患者におけるこの疾患への感受性を示すことを意味する。

【0117】

実施例4

また、患者サンプルをhHSP60に接触させる前に抗hHSP60抗体を有する患者サンプルを同定するために、非ヒトHSP60を被覆したさらなるマイクロ滴定プレートが提供される。サンプルを非ヒトHSP60と接触させ、そこに結合される。次に非結合サンプルをウエルから分離し、ウエル中にhHSP60を有するマイクロ滴定プレートに接触させ、プロセスを前述のように続ける。これが、hHSP60上のみで見つかるエピトープに特異的な抗体のみがhHSP60に結合することを確認する助けとなる。

【0118】

実施例5

hHSP60誘発補体活性化への傾向を有する患者からサンプルを検出するためにマイクロ滴定プレートのウェルに結合したhHSP60を用いる代わりに、hHSP60特異的抗体を患者血清から単離し、次に、hHSP60特異的エピトープのミモトープを生成するためのミモトープ設計のために用いる。次に、これらのミモトープを用いて、マイクロ滴定プレートのウェルを被覆し、患者サンプルに接触させる。これらのミモトープへの患者抗体の結合は、患者サンプル中の抗hHSP60抗体を示しており、従って、hHSP60誘発補体活性化への患者の傾向を示している。

【0119】

実施例6

抗hHSP60抗体の結合のためにhHSP60と競合することができ、それによりhHSP60による補体誘発を低下させるように、hHSP60誘発補体活性化への傾向がある患者に実施例4のミモトープを注入する。同様に、抗hHSP60抗体のhHSP60との結合を競合的に阻害するために、抗hHSP60抗体以外のhHSP60特異的結合剤を患者に注入する。

【0120】

【表3】

表1 既知水準の抗HSP60抗体を有する患者の基本的データ

	低い (<中央値) 水準の抗HSP60抗体を有する患者 (n=37)	高い (>中央値) 水準の抗HSP60抗体を有する患者 (n=37)
年齢 (年)	60, 35-76	60, 40-69
性別	男性31人、女性6人	男性29人、女性8人
BMI (kg/m ²)	27.5, 22-34	29, 24-38
MIの家族歴	48.64%	45.94%
血清コレステロール, mmol/l	6.1, 3.4-9.0	6.75, 3.5-11.0
HDL-コレステロール	1.26, 0.7-1.4	1.25, 0.73-1.92
LDL-コレステロール	4.11, 1.7-6.5	3.98, 2.0-8.1
血清トリグリセリド, mmol/l	1.77, 0.3-9.6	2.2, 0.6-5.5
喫煙皆無	44%	31%
喫煙経験者	53%	55%
現在喫煙者	3%	14%
抗hHSP60 (ユニット/ml)	22.5, 0-71.8	447.9, 137.6-2410
抗M. bovisHSP65 (ユニット/ml)	6.6, 0-103.3	20.63, 2.0-380.5

【0121】

変数は中央値、範囲として表される；BMIは肥満指数；MIは心筋梗塞；HDLは高密度リポ蛋白；LDLは低密度リポ蛋白を表す。

【0122】

【表4】

表2 固相hHSP60による補体活性化

	C4bの結合先		C3bの結合先	
	HSP60被覆プレート	非被覆プレート	HSP60被覆プレート	非被覆プレート
NHS	0.383 ± 0.036*	0.083 ± 0.02	0.507 ± 0.028	0.28 ± 0.037
スチューデントt検定, p	<0.0001	-	<0.0001	-
HIHS	0.121 ± 0.015	0.118 ± 0.008	0.217 ± 0.022	0.255 ± 0.027
スチューデントt検定, p	0.65	-	0.023	-
Mg ²⁺ EGTA-NHS	0.077 ± 0.012	0.081 ± 0.025	0.1 ± 0.005	0.123 ± 0.027
スチューデントt検定, p	0.68	-	0.13	-
C2D	0.179 ± 0.036	0.088 ± 0.017	0.242 ± 0.022	0.285 ± 0.011
スチューデントt検定, p	0.0002	-	0.0014	-

【0123】

*数は、6 (NH, HIHS) または3 (Mg²⁺EGTA-NHS, C2D) 並行測定の前平均OD値 ± 標準偏差を意味する。3つの同様のもののうち1つの代表的実験を示す。NHS = 正常ヒト血清；HIHS = 熱不活化ヒト結成；C2D = ホモ接合性C2欠損患者の血清

【0124】

【表5】

表3 ケースおよび対照における補体活性化指数(CAI)

	対照	ケース
幾何学的平均(略s d)	0.43 (0.41)	0.52 (0.47)
中央値	0.36	0.47
N	N=176	N=89

【0125】

【表6】

表4 条件付き論理的回帰分析

OR (95%CI)	p値
1.23 (0.94-1.62)	p=0.14

【0126】

【表7】

表5 事象前に得たサンプル

	対照	ケース	OR (95%CI) p値
幾何学的平均(略s d)	0.39 (0.37)	0.6 (0.54)	1.74 (1.18-2.56)
中央値	0.33	0.55	p=0.003
N	110	56	

【0127】

【表8】

表6 事象後に得たサンプル

	対照	ケース	OR (95%CI) p値
幾何学的平均(略s d)	0.50 (0.50)	0.40 (0.36)	0.80 -
中央値	0.41	0.39	(0.53-1.21) p=0.29
N	66	33	

【0128】

【表9】

表7 分数による結果の全体分析

CAIの分数	OR (95%CI)	p値
1	1.00	p = 0.02
2	2.48 (1.24 - 4.97)	
3	2.16 (1.08 - 4.31)	

【0129】

【表10】

表8 事象前のサンプルの分数による分析

CAIの分数	OR (95%CI)	p値
1	1.00	p = 0.0002
2	5.57 (1.96 - 15.84)	
3	5.92 (2.04 - 17.21)	

【0130】

【表11】

表9 事象後のサンプルの分数による分析

CAIの分数	OR (95%CI)	p値
1	1.00	p = 0.67
2	0.92 (0.32 - 2.68)	
3	0.65 (0.24 - 1.78)	

【0131】

【表12】

表10 補体活性化指数埋め込みケース-対照研究における一変量の関係

	オッズ比	P > Z	(95%信頼区間)
肥満指数	1.17	0.370	0.83 - 1.63
コレステロール	1.74	0.003	1.20 - 2.53
トリグリセリド	1.22	0.249	0.87 - 1.71
喫煙	2.04	0.052	0.99 - 4.18
線維素	1.59	0.009	1.12 - 2.25
収縮期血圧	1.50	0.021	1.06 - 2.12

【0132】

【表13】

表11 フルCAIモデル

	オッズ比	P> Z	(95%信頼区間)
肥満指数	0.98	0.950	0.60-1.60
コレステロール	1.52	0.060	0.98-2.36
トリグリセリド	1.02	0.936	0.64-1.62
喫煙	1.49	0.361	0.63-3.54
線維素	1.22	0.367	0.80-1.86
収縮期血圧	1.13	0.600	0.72-1.78
CAI分数1	1.00		
CAI分数2	5.24	0.009	1.50-18.26
CAI分数3	6.37	0.004	1.80-22.58

【0133】

【表14】

表12 75%および95%パーセンタイルによるCAIサンプル分布

CAI値	対照群におけるN ^o	リスク群におけるN ^o
<1.07	40	28
>1.07	13	36
<2.0	49	41
>2.0	4	23

【0134】

【表15】

表13 オッズ比 (OR)

遮断 (CAI)	OR (95%CI)	p値
1.07	3.95 (1.78-8.73)	p=0.0007
2.0	6.87 (2.19-21.49)	p=0.0003

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、hHSP60の投与量依存補体活性化を示す。

【図2】

図2は、グロブリン欠乏血症血清 (AGS) におけるhHSP60による古典系経路活性化の欠乏を示す。

【図3】

図3は、抗hHSP60抗体水準と、hHSP60-固定C4bの量との関係

を示す(パネルA)。

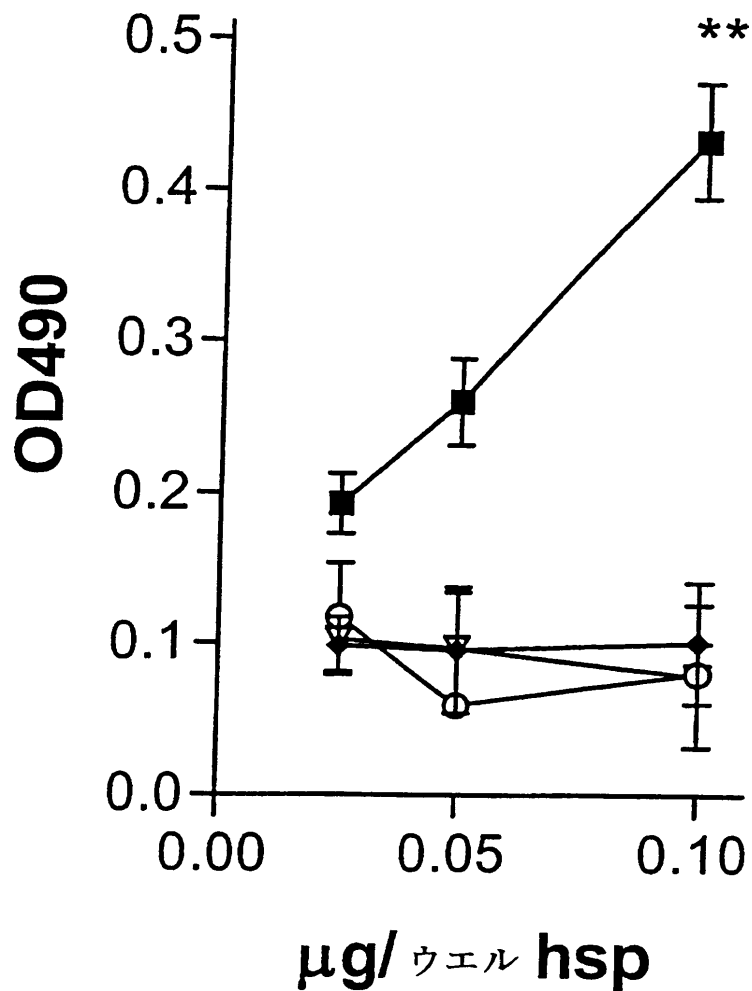
【図4】

図4は、競合ELISAによる、抗hHSP60と抗M.bovisHSP65抗体との間の相違を示す。

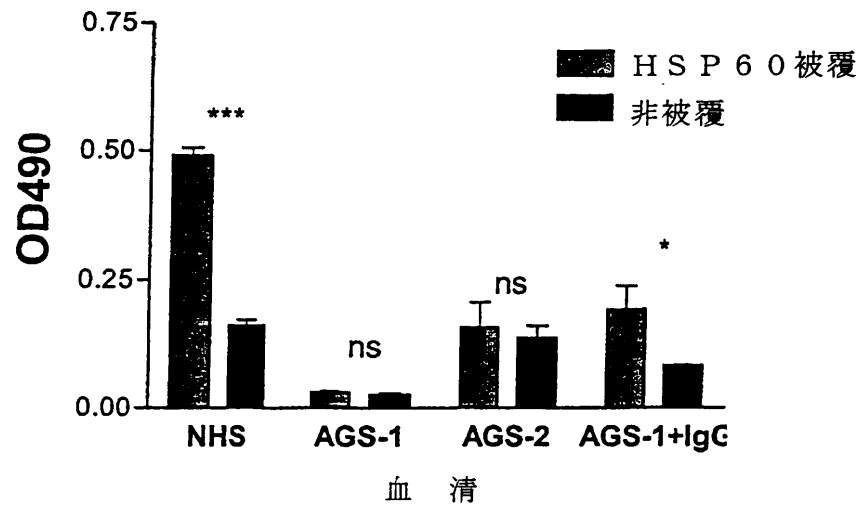
【図5】

図5は、家族歴によるリスク状態にある子供の冠状動脈性心疾患の感受性の予想への検討からの結果を示す。

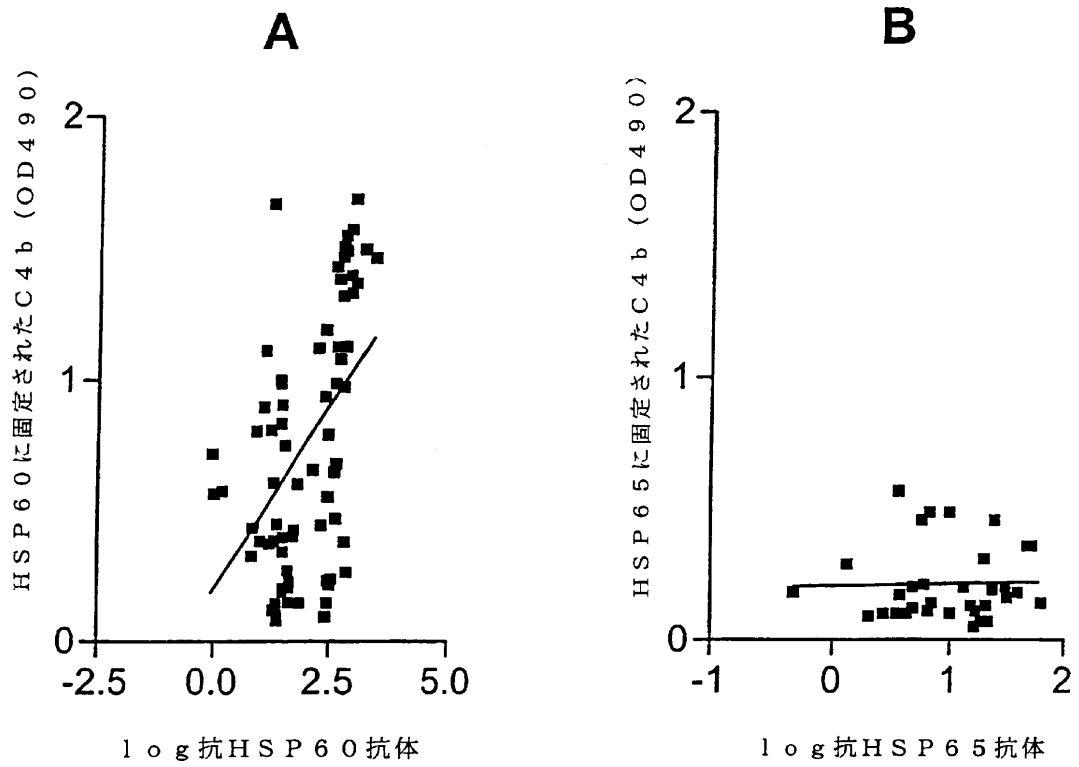
【図1】



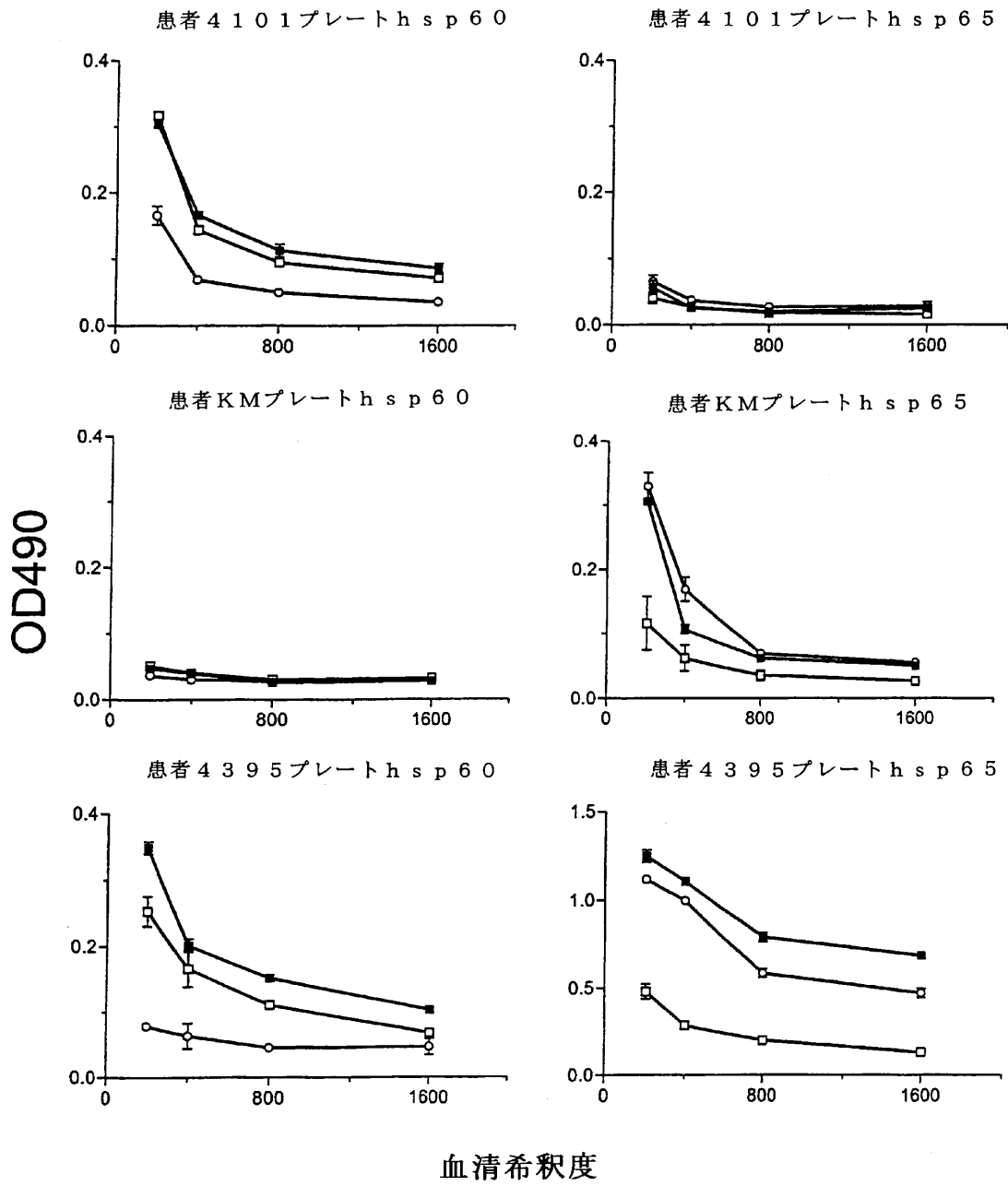
【図2】



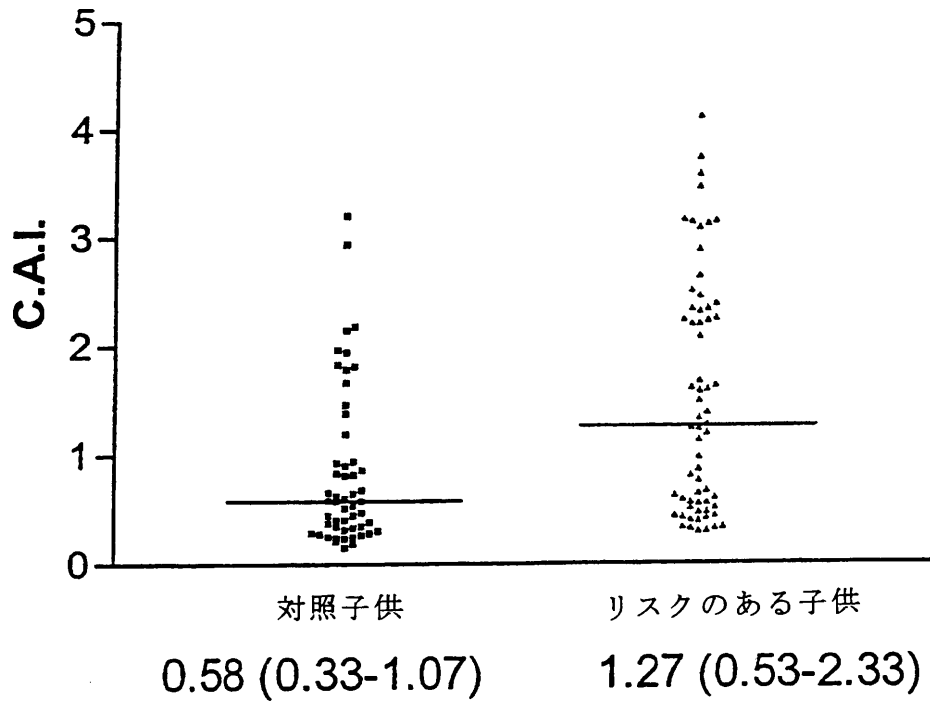
【図3】



【図4】



【図5】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Intern. of Application No PCT/IB 00/00688
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/564 A61K39/00 A61P9/00		
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) IPC 7 G01N A61K		
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) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AT 398 495 B (WICK GEORG DR) 27 December 1994 (1994-12-27) cited in the application the whole document ---	1,3,8,9, 11,12, 17,18
X	SCHETT G ET AL: "Autoantibodies against heat shock protein 60 mediate endothelial cytotoxicity." JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 96, no. 6, 1995, pages 2569-2577, XP000971181 cited in the application page 2575, column 2 the whole document --- -/-	1-3, 6-13,17, 18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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 "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 December 2000		Date of mailing of the international search report 22/12/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Teysnier, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Intern: Application No
 PCT/IB 00/00688

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MAYR M ET AL: "Endothelial cytotoxicity mediated by serum antibodies to heat shock proteins of Escherichia coli and Chlamydia pneumoniae: Immune reactions to heat shock proteins as a possible link between infection and atherosclerosis." CIRCULATION, vol. 99, no. 12, 30 March 1999 (1999-03-30), pages 1560-1566, XP000971179 conclusion the whole document ----	1-3, 6-13,17, 18
X	WO 98 08536 A (COHEN IRUN R ;YEDA RES & DEV (IL); BIRK OHAD (US)) 5 March 1998 (1998-03-05) page 1 -page 3, line 17 ----	1,14-16, 21,22
P,X	PROHASZKA Z ET AL: "Antibodies against human heat-shock protein (hsp) 60 and mycobacterial hsp65 differ in their antigen specificity and complement-activating ability." INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, vol. 11, no. 9, September 1999 (1999-09), pages 1363-1370, XP000971301 cited in the application the whole document -----	1-22

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 2-7,17-20 are directed in part to a diagnostic method practised on the human body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.

It was assumed that claims 18-20 refers to claims 2-7, 11-13 and 17 and not to claims 2-17 as written, since claims 8-10 and 14-16 do not pertain to a diagnostic method or kit.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/IB 00/00688

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
AT 398495 B	27-12-1994	AT 117192 A	15-04-1994
WO 9808536 A	05-03-1998	US 5993803 A	30-11-1999
		AU 722576 B	10-08-2000
		AU 4242697 A	19-03-1998
		EP 0921810 A	16-06-1999

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト [*] (参考)	
A 6 1 P	9/10	A 6 1 P	9/10	
C 1 2 N	15/09	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/15		33/50	Z
	33/50		33/53	D
	33/53	C 1 2 N	15/00	A
(81)指定国	E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E) , O A (B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W			
(72)発明者	プロハズカ・ゾルタン ハンガリー ブダペスト エイチ - 1015 オストロム ユー 8エイ			
(72)発明者	フスト・ギョルギー ハンガリー ブダペスト エイチ - 1016 ヘギャリア ウト 10			
(72)発明者	ロミクス・ラズロ ハンガリー ブダペスト エイチ - 1112 ゾリヨミ ユー 40エイ			
Fターム(参考)	2G045 AA40 CA25 CA26 DA36 FA26 FA29 FB01 FB03 FB11 GC10 4B024 AA01 AA11 BA31 BA58 HA11 4C084 AA17 NA14 ZA361 ZA451 ZB012 4C085 AA03 AA14 BA99 CC07 CC21 DD62 4H045 AA10 AA11 AA30 CA40 DA86 EA50			

专利名称(译)	动脉粥样硬化和冠心病的诊断和治疗		
公开(公告)号	JP2003502289A	公开(公告)日	2003-01-21
申请号	JP2000620360	申请日	2000-05-22
[标]申请(专利权)人(译)	医学泽梅尔韦斯盐湖城大学 Shinmahaviru		
申请(专利权)人(译)	医学Zemeruvaisu盐湖城大学 申Mahaviru		
[标]发明人	シンマハヴィール プロハズカゾルタン フストギョルギー ロミクスラズロ		
发明人	シン・マハヴィール プロハズカ・ゾルタン フスト・ギョルギー ロミクス・ラズロ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K39/00 A61K45/00 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/10 C07K14/47 C12N15/09 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/564 G01N33/68		
CPC分类号	A61K39/0008 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/10 C07K14/47 G01N33/6893 G01N2333/47 G01N2800/324		
FI分类号	C07K14/47 A61K39/00.G A61K39/00.H A61K45/00 A61P9/04 A61P9/10 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA36 2G045/FA26 2G045/FA29 2G045/FB01 2G045 /FB03 2G045/FB11 2G045/GC10 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/BA58 4B024/HA11 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA361 4C084/ZA451 4C084/ZB012 4C085/AA03 4C085/AA14 4C085 /BA99 4C085/CC07 4C085/CC21 4C085/DD62 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/EA50		
代理人(译)	铃木 弘男		
优先权	1999011772 1999-05-21 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及对患有由动脉粥样硬化引起的血管疾病的患者的的人体的治疗，该疾病具有热休克蛋白诱导的补体激活的趋势，例如心肌病如冠心病。替代地，其涉及诊断方法，特别是诊断测试方法，诊断测试的创建以及在诊断测试套件中人HSP60的心跳使用。

成分/化学物質	市販元	生成物コード
プレート	Dynex	Immulon4
プレート リッド	Griener	n/a
hHSP60	Stressgen	SPP-740
Na ₂ CO ₃	Fisher	S/2920/53
NaHCO ₃	BDH	10247
スクロース	Sigma	S9378
Tris	Sigma	T1503
NaCl	Sigma	S9625
Tween20	Sigma	T1379
ゼラチン	Sigma	G0262
ウサギ抗hHSP60	Stressgen	SPA-804-1
C4b	Diasorin	80225
Stablzyme	Surmodics	SZ02
山羊抗ウサギAb	Amdex	AX01-0301X
TMB基質	Dako	S1600
H ₂ SO ₄	Sigma	102761C