

(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2016-505634

(P2016-505634A)

(43) 公表日 平成28年2月25日(2016.2.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28 ZNA	4B064
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 H	4H045
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/543 501D	
GO1N 33/566 (2006.01)	GO1N 33/566	
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全28頁)

(21) 出願番号 特願2015-554173 (P2015-554173)
 (86) (22) 出願日 平成26年1月27日(2014.1.27)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年9月15日(2015.9.15)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2014/051482
 (87) 国際公開番号 WO2014/114780
 (87) 国際公開日 平成26年7月31日(2014.7.31)
 (31) 優先権主張番号 13152851.5
 (32) 優先日 平成25年1月28日(2013.1.28)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(71) 出願人 515204524
 ディアソリン ソシエタ ベル アチオニ
 イタリア国 イー 13040 ヴェル
 チェッリ、サルツジャ、ヴィア クレシェ
 ンティーノ エッセエンネチ
 (74) 代理人 110000855
 特許業務法人浅村特許事務所
 (72) 発明者 ソルド、ジョシュア
 アメリカ合衆国、ミネソタ、プライオア
 レイク、ケンジントン アヴェニュー エ
 ヌイー 13899
 (72) 発明者 オルソン、グレゴリー
 アメリカ合衆国、ミネソタ、レイクランド
 、ディヴィジョン ストリート 1637
 0

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 1, 25-ジヒドロキシビタミンDを検出するための方法及びキット並びに関連する抗体

(57) 【要約】

生物学的液体試料中の1, 25-ジヒドロキシ-ビタミンDを選択的に検出するためのアッセイ方法が開示される。本発明の方法によれば、試験試料のpHは6から9に調整され、ビタミンD受容体のリガンド結合ドメイン(VDR-LBD)を含む受容体タンパク質が試験試料に添加され、それによって、未結合VDR-LBDと比較してVDR-LBD部分が立体構造的に変化しているVDR-LBD/1, 25-ジヒドロキシビタミンD複合体が形成される。次いで、VDR-LBD/1, 25-ジヒドロキシビタミンD複合体は、1, 25-ジヒドロキシビタミンDに結合したVDR-LBDに特異的に結合できる捕捉部分を用いて検出される。また、本発明の方法を実施するためのアッセイキット及び抗体も開示される。好ましくは、本発明のアッセイは、サンドイッチ型アッセイである。

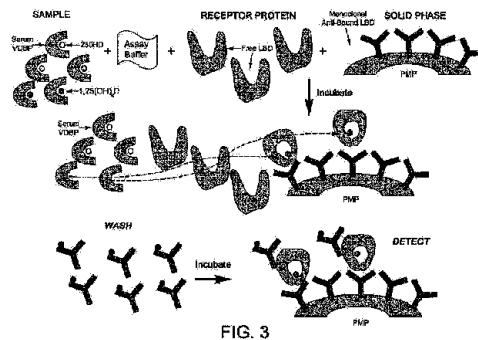


FIG. 3

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

複合体を形成していないビタミンD受容体のリガンド結合ドメイン(VDR-LBD)と交差反応せずに、VDR-LBDと1,25-ジヒドロキシビタミンD又は1,25-ジヒドロキシビタミンDの類似体との間で形成される複合体のVDR-LBDに特異的に結合する、抗体。

【請求項 2】

重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含み、前記重鎖可変ドメインが、配列番号1、2、及び3からなる群から選択される少なくとも1つのCDRを含むモノクローナル抗体である、請求項1に記載の抗体。

10

【請求項 3】

前記軽鎖可変ドメインが、配列番号4、5、及び6からなる群から選択される少なくとも1つのCDRを含む、請求項1から2までに記載の抗体。

【請求項 4】

前記重鎖可変ドメインが、配列番号1、2、及び3を含む、請求項2に記載の抗体。

【請求項 5】

前記軽鎖可変ドメインが、配列番号4、5、及び6を含む、請求項3又は4に記載の抗体。

【請求項 6】

前記重鎖可変ドメインが、配列番号7を含むか、又は配列番号8を含む核酸配列によりコードされる、請求項4に記載の抗体。

20

【請求項 7】

前記軽鎖可変ドメインが、配列番号9を含むか、又は配列番号10を含む核酸配列によりコードされる、請求項5又は6に記載の抗体。

【請求項 8】

全長免疫グロブリン、又はF(ab)、F(ab')、F(ab')₂、F(v)、F(c)、F(d)、単鎖抗体(scFv)からなる群から選択される抗体断片である、請求項1から7までのいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 9】

生物学的液体試料中の1,25-ジヒドロキシビタミンD(1,25(OH)₂D)又はその類似体を検出するための方法であって、

30

(i) 6から9の間に含まれる値に前記生物学的液体試料のpHを調整するステップ、同時に又は続いて、ビタミンD受容体のリガンド結合ドメイン(VDR-LBD)を含む受容体タンパク質を、前記生物学的液体試料に添加するステップであって、それによって、前記受容体タンパク質のVDR-LBDに1,25-ジヒドロキシビタミンD又はその類似体を結合させるステップと、

(ii) 1,25-ジヒドロキシビタミンD又はその類似体に結合したビタミンD受容体のリガンド結合ドメイン(VDR-LBD)を含む前記受容体タンパク質を、複合体を形成していないVDR-LBDと交差反応せずに、1,25-ジヒドロキシビタミンD又はその類似体に結合したビタミンD受容体のリガンド結合ドメイン(VDR-LBD)に特異的に結合することができる捕捉部分によって捕捉するステップと、

40

(iii) 1,25-ジヒドロキシビタミンD又はその類似体に結合したビタミンD受容体のリガンド結合ドメイン(VDR-LBD)を含む捕捉された前記受容体タンパク質を検出するステップとを含む、上記方法。

【請求項 10】

前記受容体タンパク質が、単離された形態又は操作された形態の完全体のビタミンD受容体タンパク質又はそのリガンド結合ドメイン(LBD)である、請求項9に記載の方法。

【請求項 11】

前記ビタミンD類似体が、19-ノル-1-25-ジヒドロキシビタミンD₂、1

50

- ヒドロキシビタミンD₂、1 - ヒドロキシエルゴカルシフェロール、又は2 - メチレン - 19 - ノル - (20S) - 1 , 25 - (OH)₂D₃である、請求項9又は10に記載の方法。

【請求項12】

前記捕捉部分が、請求項1から8までのいずれか一項に記載の抗体である、請求項9から11までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

前記捕捉部分が、固体支持体上に固定される、請求項9から12までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

前記生物学的液体が、全血、血漿、血清、又は尿である、請求項9から13までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

ステップ(i)において、前記生物学的液体試料のpHが、7から8.6の間に含まれる値に調整される、請求項9から14までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

サンドイッチイムノアッセイである、請求項9から15までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

1, 25 - ジヒドロキシビタミンD又はその類似体に結合したビタミンD受容体のリガンド結合ドメイン(VDR - LBD)を含む捕捉された前記受容体タンパク質を検出するステップ(iii)が、標識された抗VDR - LBD検出抗体を用いて実施される、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

生物学的液体試料中の1, 25 - ジヒドロキシビタミンD又はその類似体を検出するためのキットであって、

- ビタミンD受容体のリガンド結合ドメイン(VDR - LBD)を含む受容体タンパク質；

- 複合体を形成していないVDR - LBDと交差反応せずに、VDR - LBDと1, 25 - ジヒドロキシビタミンD又はその類似体との間で形成される複合体のビタミンD受容体のリガンド結合ドメイン(VDR - LBD)に特異的に結合することができる捕捉部分、及び

- 6から9の間に含まれるpHを有する結合緩衝液を含む、上記キット。

【請求項19】

前記受容体タンパク質が、単離された形態又は操作された形態の完全体のビタミンD受容体タンパク質又はそのリガンド結合ドメインである、請求項18に記載のキット。

【請求項20】

前記捕捉部分が、請求項1から8までのいずれか一項に記載の抗体である、請求項18又は19に記載のキット。

【請求項21】

前記結合緩衝液が、7から8.6の間に含まれるpHを有している、請求項18から20までのいずれか一項に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、全血試料、血漿試料、血清試料、又は尿試料などの生物学的液体試料中の全1, 25 - ジヒドロキシビタミンDを検出するための方法及びキットに関する。

【0002】

より具体的には、本発明は、25 - ヒドロキシビタミンDなどの他の非活性型ビタミン

10

20

30

40

50

Dと共に1,25-ジヒドロキシビタミンDを含有する場合がある生物学的液体試料中の全1,25-ジヒドロキシビタミンDを検出するのに適しているイムノアッセイ方法及びキット、並びに関連する抗体に関する。

【背景技術】

【0003】

ビタミンDは、骨格代謝及びカルシウム恒常性における根本的な役割を果たしているステロイドホルモンである。ヒト及び動物において、ビタミンDの主要な型はビタミンD₃（コレカルシフェロール）及びビタミンD₂（エルゴカルシフェロール）である。ビタミンD₃は主に、太陽紫外線B（UVB）への曝露に反応して、皮膚中で7-デヒドロコレステロールから合成されるが、油の多い魚、すなわちサケ及びサバなどの食物源からのビタミン摂取も起こり得る。ビタミンD₂は主に、キノコ源及び野菜源並びに補助（supplementation）（例えば、Drisdol（商標）又はSterogyl 15「A」）に由来する食物中から、獲得される。

10

【0004】

供給源とは関係なく、ビタミンD₂及びビタミンD₃が生物活性化合物に変換されるには、2つの別々の水酸化ステップが必要である。肝臓において、酵素25-水酸化酵素が、ビタミンDを25-ヒドロキシビタミンD（以下、「25(OH)D」と呼ぶ）に変換する。この中間代謝産物は、このホルモンの主要な循環型であり、さらに水酸化されて生物活性のある代謝産物1,25-ジヒドロキシビタミンD（以下、「1,25(OH)₂D」と呼ぶ）のためのリザーバーとして働く。

20

【0005】

後者の段階は、主に腎尿細管細胞において起こり、酵素1- α -水酸化酵素に触媒される。1,25(OH)₂Dの血漿中濃度は、血清副甲状腺ホルモン（PTH）を含めて様々な因子によって高度に調節されており、通常、前駆体化合物25(OH)Dの約100分の1である。

【0006】

ビタミンD及びその代謝産物の大部分は、それらの親油性性質が理由で、Gcグロブリンとしても公知のビタミンD結合タンパク質（DBP）（80～90%）及びアルブミン（10～20%）に結合された状態で血流中を循環する。DBPは、ビタミンD代謝産物に対して高い親和性を有しており（25(OH)D及び24,25(OH)₂Dに対しては $K_a = 5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 、1,25(OH)₂D及びビタミンDに対しては $K_a = 4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ）、通常的环境下では約0.03%の25(OH)D及び24,25(OH)₂D並びに約0.4%の1,25(OH)₂Dのみが遊離型で存在している。

30

【0007】

1,25(OH)₂Dの生物学的作用は、主に、特異的な細胞内ビタミンD受容体（VDR）にこの生物活性ホルモンが結合することによってもたらされ、この細胞内ビタミンD受容体は、主に、ビタミンD応答エレメント（VDRE）として公知の特異的DNA配列を自らのプロモーターが含む遺伝子の発現を調節することによって作用する。

【0008】

ビタミンD受容体（VDR）は、核内受容体（NR）のスーパーファミリーに属するリガンド依存性転写調節因子である。この受容体ファミリーの他のメンバーと同様に、VDRは、アミノ末端A/Bドメイン、高度に保存されているDNA結合ドメイン（DBD）、柔軟なリンカー領域、及びより変化しやすいC末端リガンド結合ドメイン（LBD）を含むモジュラー構造を有している（Mangelsdorf DJら、1995年、Cell 83（6）：835～9ページ）。C末端LBDは、球状の多機能性ドメインであり、ホルモン結合、レチノイドX受容体（RXR）との二量体形成、並びにコリプレッサー及びコアクチベーターとの相互作用を担っており、これらはそろって、転写活性の調節に不可欠である（Hausler MRら 1998年、J Bone Miner Res. 13（3）：325～49ページ）。

40

【0009】

50

VDRのリガンド結合ドメイン(LBD)は結晶化され、その構造が解明されている(Rochel N、Wurtz JM、Mitschler A、Klaholz B、Moras D 天然リガンドに結合したビタミンD核内受容体の結晶構造(The crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand.) Mol Cell 2000; 5: 173~179ページ)。

【0010】

VDRにリガンドが結合すると、受容体のリガンド結合ドメインの立体構造変化が誘発され、その結果として、標的遺伝子のプロモーター領域中のビタミンD応答性エレメント(VDRE)上で、VDRと補助因子であるレチノイドX受容体(RXR)とのヘテロ二量体化が増大する。これにより、その結果として、プロモーターが転写機構に対して開放される(Glenville J.ら、1998年 Physiological Reviews 78(4): 1193~1231ページ)。

10

【0011】

核内受容体のリガンド結合ドメイン(LBD)は、 α -ヘリックスの含有量が高いことが公知であり、 α -ヘリックスはリガンド結合に応答して大規模な立体構造変化を経て、疎水性ポケットを形成し得る。最近、様々なリガンドに結合した際のドブネズミ(Rattus norvegicus)のリガンド結合ドメイン(r-VDR-LBD)の立体構造の差が、NMR分光法によって解明された(Kiran K. Singarapura 2011年 Biochemistry 50(51): 11015~24ページ)。

20

【0012】

現在、ビタミンDは、ヒトにおいて最適な健康を維持するにあたって多数の役割を有しているプロホルモンと認識されている。著しいビタミンD欠乏が、成人の骨軟化症及び小児のくる病などの組織学的に明らかな骨疾患をもたらすことがずっと前から確立されており、一方、ビタミンD不足は、副甲状腺ホルモン濃度の変化を引き起こす場合があり、長期に渡って持続すると、骨量減少及び骨折の一因となり得る。しかし、ビタミンDは、カルシウム恒常性の古典的な調節因子として最初は同定されたのであるが、ビタミンD受容体(VDR)のヒト組織における広範な発現及び分布によって推進される広範囲の作用を有することが現在では公知である。

30

【0013】

この数十年間に、臨床データ及び疫学的データから、25(OH)Dレベルの異常が、心血管系疾患、高血圧、心筋梗塞、糖尿病、癌、神経筋機能の低下、感染性疾患、及び自己免疫疾患を含めて様々な慢性疾患のリスク増大に関連しているといういくつかの証拠が提供された。子かん前症、妊娠糖尿病、帝王切開、及び早産などの妊娠合併症でさえ、妊娠期におけるビタミンD欠乏の悲惨な続発症である可能性がある(Holick MF; 2007年 N Engl J Med. 357(3): 266~81ページ、Holick MF及びChen TC. 2008年 Am J Clin Nutr.; 87(4): 1080S~6S)。

40

【0014】

しかし、現在利用可能である測定方法の複雑さ及び信頼性の不足の両方が原因で、慢性疾患のリスクを1,25(OH)₂Dレベルと関連付けるための研究はごく少数しか実施されていない。

【0015】

したがって、活性型ビタミンDである循環血中1,25(OH)₂Dの測定は、診断マーカー及び/又は治療法のモニタリング指標のいずれかとして、多くの様々な臨床応用において関連性を増しつつある。例えば、1,25(OH)₂D及び副甲状腺ホルモン(PTH)の血清レベル並びにそれらの存在し得る相関関係の測定は、副甲状腺疾患の診断を助けるため、並びに腎不全又はビタミンD抵抗性くる病(VDRR)の発症の過程での二次性副甲状腺機能亢進症の発病を検出するための重要な手段になり得る。

50

【0016】

現在、日常的な臨床的用途及び調査用途の両方において、全25(OH)D(すなわち、25(OH)D₃+25(OH)D₂)の循環血中レベルを測定するために利用可能である幅広い方法がある。市販の迅速で自動化された化学発光に基づくイムノアッセイ方法が、Abbott Diagnostics (Abbott Park, IL, USA, ARCHITECT 25-OH vitamin D assay)、DiaSorin Inc. (Stillwater, MN, USA, LIAISON (登録商標) 25 OH Vitamin D Total Assay)、Immunodiagnostic Systems (Baldon, England, IDS-iSYS 25-Hydroxy Vitamin D (25OHD))、Roche Diagnostics (Mannheim, Germany, Modular Analytics E170 Elecsys (登録商標) Vitamin D Total assay)、及びSiemens Healthcare Diagnostics (Tarrytown, NY, USA, ADVIA Centaur (登録商標) Vitamin D Total assay)によって供給されている。これらのアッセイプラットフォームに加えて、最近、クロマトグラフィー分離とそれに続く非免疫学的な直接検出(半自動化液体クロマトグラフィー-タンデム型質量分析、LC-MS/MS)に基づく物理的方法の使用が着実に増加しており、これらの方法は、アメリカ合衆国(例えば、Esoterix Inc., Calabasas Hills, CA, Mayo Clinic, Rochester, MN, ARUP Laboratories, Salt Lake City, UT、及びQuest Diagnostics, Lyndhurst, NJ)、ヨーロッパ(例えば、Ghent University, Ghent, Belgium及びCHU de Liege, Liege, Belgium)、及びオーストラリア(例えば、Pathology Queensland, Herston Queensland及びDouglass Hanly Moir Pathology, Macquarie Park NSW)の専門家の研究室で主に開発された。

【0017】

25(OH)Dを測定するためのアッセイプラットフォームの選択範囲は広いものの、臨床試料中の活性型ビタミンDを定量的に測定するために現在利用可能である自動化アッセイ方法は存在しない。1,25(OH)₂Dの全身での循環血中レベルは極めて低くpg/mlの範囲であり、したがって、臨床的モニタリングにとって重要な生物分析の課題を示している。従来より、血漿中の1,25(OH)₂Dの定量は、ラジオイムノアッセイ(RIA)によって実施されている。放射能の取扱い及び放射性標識の限られた有効期間に関する問題を回避するために、LC-MS/MS方法の使用に主に依拠する新しいビタミンD試験方法が最近台頭してきた。しかし、報告されている1,25(OH)₂DのLC-MS/MS生物分析アッセイには、必要な感度及び選択性を実現するために実施される必要がある大規模な試料調製手順又は誘導体化プロトコルという欠点がある。現在、1,25(OH)₂Dの検出のために利用可能である主な方法は、いくつかの試料前処理ステップ又は解析前ステップを実施する必要がある、これらのステップは通常、手作業で実施され、したがって、非常に時間がかかり、大きな労働力を要し、且つ費用がかかる場合がある。

【0018】

EP0583945Aは、1,25(OH)₂Dのアッセイを開示しており、このアッセイは、酢酸エチルなどの有機溶媒を用いて血清を抽出すること、干渉する可能性がある他のビタミンD代謝産物をシリカカラムを用いて分離すること、並びにブタ受容体タンパク質、放射性標識した1,25(OH)₂D、受容体に結合できるビオチン標識した抗体、及びBSAなどの促進(facilitator)タンパク質を免疫沈降競合結合測定法の一部として次いで添加することを含む。

【0019】

WO/8901631は、ブタ受容体タンパク質、放射性標識した1,25(OH)₂

D、及び受容体に結合できるビオチン標識した抗体を未処理の血清に添加することを含む、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ の競合結合測定法(3)を開示している。この競合結合測定法は、関連する代謝産物からの干渉を最小限にするためのふるいとして働くビタミンD輸送タンパク質の使用を必要とする。

【0020】

S. SWAMIら、Bone、第28巻、第3号、2001年3月：319～326ページでは、ビタミンD受容体(VDR)のヒンジ部分に結合し、VDRの測定のための方法において使用される抗体を開示している。しかし、このような抗体は、リガンドで占拠されたVDRとリガンドで占拠されていないVDRとを区別することができず、したがって、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ の検出に有用ではない。

10

【0021】

DiaSorin RIA(部品(Part)番号65100E/100チューブ； $1,25$ -ジヒドロキシビタミンD)は、代謝産物測定に先立って試験試料から $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ を単離するために、有機溶媒、抽出器具、並びに $24,25(\text{OH})_2\text{D}$ 、 $25,26(\text{OH})_2\text{D}$ 、及び $25(\text{OH})\text{D}$ など干渉する可能性があるビタミンD代謝産物を分離するためのC18-OHカラムの使用を伴う。

【0022】

$1,25(\text{OH})_2\text{D}$ の測定のためのImmunodiagnositicsによって供給される最近商品化された自動アッセイ(部品番号IS-2400；IDS-iSYS $1,25$ -ジヒドロキシビタミンD)でさえ、IDS自社開発のImmunocapsulesを利用し、時間がかかり大きな労働力を要する試料の前処理ステップを必要とする。

20

【0023】

さらに、先行技術の方法は、解析前ステップ又は試料前処理ステップの間に試験標本から完全に排除されなかった他のビタミンD代謝産物との交差反応性事象が原因で、誤って高濃度の $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ が測定される場合があるため、アッセイの特異性の点で制限を受けることが多い。例えば、ほとんどのイムノアッセイ用抗体は、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ より1000倍高いレベルで血液中に存在し得る $25(\text{OH})\text{D}$ 、 $24,25(\text{OH})_2\text{D}$ 、及び $25,26(\text{OH})_2\text{D}$ と顕著に交差反応する。

【発明の概要】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0024】

したがって、先行技術の欠点及び制限を有していない、全 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_2 + 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$)を検出するためのアッセイ方法を開発することが大いに必要とされている。

【0025】

特に、時間がかかり大きな労働力を要する試料前処理ステップを必要とせずに、正確で感度が高く、且つ精密な全 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_2 + 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$)の検出を可能にし、自動化された形態でおそらく提供され得るアッセイ方法が必要とされている。

40

【0026】

また、試験試料中に存在し得る他のビタミンD代謝産物と実質的に交差反応しない $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ アッセイ方法も必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0027】

本明細書の不可欠な部分をなす添付の特許請求の範囲において定義される方法、並びに関連するキット及び抗体が、これら及び他の必要性を満たす。

【0028】

下記の例においてさらに例示するように、本発明は、アッセイが実施される媒体のpHが、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ に対するビタミンD結合タンパク質(DBP)及びビタミンD

50

受容体のリガンド結合ドメイン (VDR - LBD) の結合親和性に大きく影響するという調査結果に基づいている。

【0029】

より具体的には、本発明者らが行った実験の結果から、試験試料の pH 値が 6 より上、好ましくは 7 より上に変化すると、驚くべきことに、それにより 25 (OH) D と比較して 1, 25 (OH)₂ D に対する VDR - LBD の親和性が約 200 倍に上昇するのを誘発し、一方、同じ pH 値において、DBP は、1, 25 (OH)₂ D と比較して約 1000 倍大きな親和性を 25 (OH) D に対して示すことがはっきりと示された。したがって、DBP に結合した 1, 25 (OH)₂ D と VDR - LBD に結合した 1, 25 (OH)₂ D の間の平衡に対する pH のこのような有利な効果を活用することは、モル過剰の VDR - LBD の存在下で天然 DBP から循環血中 1, 25 (OH)₂ D を選択的に捕捉しつつ、同時に 25 (OH) D の大半を DBP に結合した隔絶された形態で残すための、容易さ及び有効性の両方の点から独特な手段となる。このような手法は、臨床試料中の 1, 25 (OH)₂ D の測定を可能にするために時間がかかり大きな労働力を要する試料前処理ステップを必要とする先行技術の方法よりも特に有利である。

10

【0030】

VDR - LBD への 1, 25 (OH)₂ D の結合は、VDR - LBD 分子の立体構造変化を誘発することが公知であることから、本発明者らは、様々な生物学的マトリックス中の未結合 VDR - LBD から VDR - LBD / 1, 25 (OH)₂ D 複合体を選択的に識別するために、複合体を形成していない VDR - LBD と交差反応せずに、1, 25 (OH)₂ D に結合した VDR - LBD を特異的に認識し結合することができる捕捉部分、例えば抗体を開発するための大規模な実験を実施した。このような立体構造特異的捕捉部分は、循環血中の活性型ビタミン D の迅速且つ信頼性が高い検出のための大変貴重な手段となるため、特に有用である。

20

【図面の簡単な説明】

【0031】

【発明を実施するための形態】

【0032】

したがって、本発明の 1 つの態様は、添付の請求項 9 で定義するような、生物学的液体試料中の 1, 25 (OH)₂ D 又はその類似体を検出するための方法である。

30

また、添付の請求項 18 で定義するような、生物学的液体試料中の 1, 25 (OH)₂ D 又はその類似体を検出するためのキットも、本発明の範囲内にある。

【0033】

本明細書において使用される場合、「ビタミン D」という用語は、ビタミン D₃ (コレカルシフェロール) 及びビタミン D₂ (エルゴカルシフェロール) の両方を意味し、「1, 25 (OH)₂ D」という用語は、1, 25 (OH) D₃ 及び 1, 25 (OH) D₂ の両方を意味する。「1, 25 (OH)₂ D」の類似体には、その修飾種及び構造的類似体が含まれ、例えば、19 - ノル - 1 - 25 - ジヒドロキシビタミン D₂ (例えば、Abbott 製の Zemplar 又はパリカルシトール)、1 - ヒドロキシビタミン D₂ 又は 1 - ヒドロキシエルゴカルシフェロール (例えば、Genzyme 製の Hectorol 又はドキセルカルシフェロール)、及び 2 - メチレン - 19 - ノル - (20S) - 1, 25 - (OH)₂ D₃ (例えば、Deltanoid Pharmaceuticals 製の 2MD) などである。

40

【0034】

前述したように、本発明の検出方法を特徴付ける特色は、検査される生物学的液体試料の pH が 6 より大きい、すなわち 6 から 9 の間に含まれる値に調整されることである。好ましい pH 値は、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、又は 8.6 など、7 から 8.6 の間に含まれる。生物学的液体試料の pH を前述の値に調整するのに適した緩衝剤及び緩衝液は、当業者に周知である。

50

【0035】

本発明の文脈において、好ましくは、生物学的液体試料は、全血、血清、血漿、及び尿からなる群から選択される。生物学的液体試料は、例えば、希釈剤、保存剤、安定化剤、及び/又は緩衝剤などさらに別の成分を任意で含んでよい。必要な場合は、当技術分野において公知の任意の適切な希釈用緩衝液を用いて、生物学的液体試料の希釈物が調製される。

【0036】

本発明の検出方法は、ビタミンD受容体のリガンド結合ドメイン(VDR-LBD)を含む受容体タンパク質が、 $1, 25(OH)_2D$ 又はその類似体に結合するために使用されるということをさらに特徴とする。

10

【0037】

本明細書において使用される場合、「ビタミンD受容体のリガンド結合ドメイン(VDR-LBD)を含む受容体タンパク質」という用語は、単離された形態又は操作された形態の、C末端リガンド結合ドメインを含む完全体のビタミンD受容体タンパク質(VDR)とビタミンD受容体のリガンド結合ドメイン(LBD)の両方を包含する。例えば、完全体のビタミンD受容体タンパク質又はそのリガンド結合ドメインは、DNA技術によって作製される組換えタンパク質である。様々な動物種に由来するビタミンD受容体をコードするヌクレオチド配列が入手可能であり、特徴を明らかにされている。したがって、本発明において受容体タンパク質として使用される完全体のビタミンD受容体タンパク質又はそのリガンド結合ドメインは、例えば、それだけには限らないが、哺乳動物由来(例えば、ヒト、マウス、若しくはラットのタンパク質)、又は鳥類由来、又は両生類由来であり、或いは、そのようなタンパク質のいずれかの変異した変種である。

20

【0038】

任意で、本発明において受容体タンパク質として使用される完全体のビタミンD受容体タンパク質又はそのリガンド結合ドメインは、精製手順及び/又は検出手順を実質的に改良するために、アフィニティータグをさらに含むか、又はアフィニティータグに結合される。最も一般的なアフィニティータグのうちで、対象のタンパク質のC末端又はN末端に付けられるポリヒスチジンタグ(「Hisタグ」)がタンパク質科学の分野でごく普通に使用され、したがって、本発明の状況内でのそれらの使用は、十分に当業者の知識の範囲内である。発現されたHisタグ付きタンパク質は、例えば、遷移金属イオンを含有するマトリックス上で容易に精製され、抗Hisタグ抗体の使用は、局在化研究及び免疫沈降研究において有用且つ公知の手段となる。

30

【0039】

したがって、本発明の好ましい実施形態において、受容体タンパク質として使用される完全体のビタミンD受容体タンパク質又はそのリガンド結合ドメインは、組換え型のHisタグ付き融合タンパク質である。しかし、例えば、Arg5、Strep-タグII、FLAG、フルオレセイン(FITC)、ポリ(A)、ポリ(dT)、及びビオチンなど他のアフィニティータグが使用されてもよい。エピトープタグ付き組換えタンパク質を作製するための技術は、当技術分野において一般に公知である。別の好ましい実施形態において、受容体タンパク質として使用される完全体のビタミンD受容体タンパク質又はそのリガンド結合ドメインは、タンパク質の折りたたみを助け、且つ/又は安定性を向上させるために、シャペロンタンパク質、又は一般に、シャペロン様機能を有している他の任意のタンパク質に結合されている。安定性を向上させることを狙いとするアミノ酸配列変異を有している受容体タンパク質(すなわち、アフィニティータグ又はシャペロンタンパク質若しくはシャペロン様タンパク質に結合されている可能性がある完全体のビタミンD受容体タンパク質又はそのリガンド結合ドメイン)も、本発明の状況内で使用されてよい。

40

【0040】

前述したように、本発明の検出方法は、複合体を形成していないVDR-LBDと交差反応せずに、 $1, 25(OH)_2D$ 又はその類似体に結合した立体構造的に変化したVDR-LBDを特異的に認識することによって、VDR-LBD/ $1, 25(OH)_2D$ 複

50

合体に結合することができる捕捉部分の使用を伴う。

【0041】

好ましい実施形態において、捕捉部分は、添付の請求項1において定義される抗体である。

【0042】

添付の請求項1において定義される結合特異性を有する抗体が本発明者らによって初めて利用可能にされたため、抗体それ自体も、本発明の範囲内に入る。

【0043】

したがって、本発明の別の態様は、複合体を形成していないVDR-LBDと交差反応せずに、VDR-LBDと1,25-ジヒドロキシビタミンD又は1,25-ジヒドロキシビタミンDの類似体との間で形成される複合体のビタミンD受容体のリガンド結合ドメインに特異的に結合する抗体である。

10

【0044】

好ましくは、本発明の抗体は、モノクローナル抗体である。実施例で説明するように、複合体を形成していないVDR-LBDと実質的に交差反応せずに、1,25(OH)₂Dに結合した立体構造的に変化したVDR-LBDを特異的に認識し結合できるモノクローナル抗体を産生するいくつかのハイブリドマクロンが、本発明者らによって作製された。このようなハイブリドマクロンの内の1つは、11B4H11H10と名付けられ、その重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインの核酸配列及びアミノ酸配列を同定するために配列決定によって完全に特徴を明らかにされたモノクローナル抗体を産生する。また、重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインの両方のCDR(CDR1、CDR2、及びCDR3)も同定された。

20

【0045】

このような核酸配列及びアミノ酸配列は、本明細書の不可欠な部分をなす配列表に示される。配列表において、11B4H11H10の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列及び核酸配列は、それぞれ配列番号7及び配列番号8と呼ばれ、11B4H11H10の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列及び核酸配列は、それぞれ配列番号9及び配列番号10と呼ばれ、11B4H11H10の重鎖可変ドメインのCDRは、配列番号1、2、及び3と呼ばれ、11B4H11H10の軽鎖可変ドメインのCDRは、配列番号4、5、及び6と呼ばれる。

30

【0046】

したがって、好ましい実施形態によれば、本発明の抗体は、重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含むモノクローナル抗体であって、重鎖可変ドメインが、配列番号1、2、及び3からなる群から選択される少なくとも1つのCDRを含み、且つ/又は軽鎖可変ドメインが、配列番号4、5、及び6からなる群から選択される少なくとも1つのCDRを含む、モノクローナル抗体である。

【0047】

より好ましい実施形態において、重鎖可変ドメインは、配列番号1、2、及び3のCDRを含み、且つ/又は軽鎖可変ドメインは、配列番号4、5、及び6のCDRを含む。

40

【0048】

特定の実施形態において、重鎖可変ドメインは、配列番号7のアミノ酸配列を含むか、若しくは配列番号8の配列を含む核酸によりコードされ、且つ/又は軽鎖可変ドメインは、配列番号9のアミノ酸配列を含むか、若しくは配列番号10の配列を含む核酸によりコードされる。

【0049】

本明細書において使用される場合、「抗体」という用語は、(完全長の重鎖及び軽鎖を有するポリクローナル型、モノクローナル型、キメラ型、ヒト化型、又はヒト型を含めて)全長抗体分子、並びに抗原結合抗体断片を包含する。「抗体断片」は、対応する全長抗体と同じ結合特異性を有する任意の免疫グロブリン断片を含む。このような断片は、標準的な方法に従って作製される。例えば、Harlow及びLane、「抗体、実験マニユ

50

アル (Antibodies, A Laboratory Manual)」、CSH Press、Cold Spring Harbor、USA、1988年を参照されたい。抗体断片の非限定的な例としては、F(ab)、Fab'、F(ab')₂、F(v)、単鎖抗体(scFv)、F(c)、F(d)が挙げられる。

【0050】

好ましくは、本発明の抗体は、動物免疫感作によって作製される。簡単に説明すると、モノクローナル抗体は、それ自体が公知の方法に従って(Costagliolaら、J Immunol 1998年; 160: 1458~65ページ)、動物、例えば、ラット、ハムスター、ウサギ、又はマウスに、1, 25(OH)₂ビタミンD又はその類似体に結合した立体構造的に変化したVDR-LBDを含む免疫原を注射することによって、
10 作製される。特異的抗体の産生が起こっているかが、注射された動物から得られた血清試料に対して免疫検出アッセイを実施することによって、最初の注射後、及び/又はブースター注射後に、観察される。対象の特異的抗体(単数又は複数)を産生することが判明している動物から、脾臓細胞が摘出され、続いて、融合相手である骨髓腫細胞と融合されて、ハイブリドーマ細胞系が作製される。次いで、このハイブリドーマ細胞系が、対象の抗体(単数又は複数)、すなわち、VDR-LBDと1, 25(OH)₂D又はその類似体との間で形成される複合体のVDR-LBDに特異的に結合する抗体を分泌する能力についてスクリーニングされる。

【0051】

本発明の検出方法において、捕捉されたVDR-LBD/1, 25(OH)₂D複合体の検出は、広範囲な技術によって達成され得る。例えば、標識された受容体タンパク質を使用することによって直接的に、又は捕捉部分によって捕捉されたVDR-LBD/1, 25(OH)₂D複合体に結合できる標識された検出分子を介して間接的に、検出可能なシグナルが生成され得る。典型的には、検出分子は、本発明の捕捉部分によって認識されるエピトープと異なる、VDR-LBD/1, 25(OH)₂D複合体上のエピトープを対象とする別の抗体(すなわち、抗VDR-LBD検出抗体)である。
20

【0052】

検出可能な標識は、視覚的手段又は機器を用いた手段によって検出可能であるシグナルを生じることができる任意の物質であってよい。本発明において使用するのに適切な標識としては、例えば、蛍光性化合物、化学発光性化合物、放射性化合物、酵素及び酵素基質、
30 比色定量検出に適した分子、結合タンパク質、エピトープ、酵素、又は基質が挙げられる。実際には、当技術分野において公知の任意のシグナル分子又は標識が、本発明の方法及びキットの実施形態に組み入れられてよい。

【0053】

生物学的液体試料とビタミンD受容体のリガンド結合ドメイン(VDR-LBD)を含む受容体タンパク質との接触を可能にする任意のアッセイ形式が、本発明の検出方法を実施するのに適している。

【0054】

好ましい実施形態によれば、本発明の検出方法は、対象又は患者の生物学的液体試料に対して実施される*in vitro*のイムノアッセイである。イムノアッセイには、均一系アッセイ及び不均一系アッセイの両方、並びに競合的サンドイッチアッセイ及び非競合的サンドイッチアッセイが含まれる。
40

【0055】

例えば、図1及び図2は、本発明による一部位非競合的イムノアッセイを例示しており、これらのアッセイでは、ビタミンD受容体のリガンド結合ドメイン(VDR-LBD)を含む標識された受容体タンパク質への1, 25(OH)₂Dの結合を介して形成された複合体が、固体支持体上に固定された本発明の立体構造特異的捕捉抗体(図1及び図2において、「モノクローナル抗結合型LBD」と呼ばれる)によって捕捉される。図1及び図2の例において、固体支持体は常磁性粒子(PMP)であり、標識は、アミノ-ブチル-エチル-イソルミノール(ABEI)である。
50

【0056】

図1の特定の実施形態において、アッセイ緩衝液を用いて生物学的液体試料のpHを調整するステップ及びVDR-LBDを含む受容体タンパク質を試料に添加するステップは、同時に実施される。図2の特定の実施形態において、このようなステップは、逐次的に実施される。

【0057】

例えば、図3は、サンドイッチイムノアッセイを例示する。サンドイッチイムノアッセイの一般的な特徴及び手順は、十分に確立されており、当業者に公知である。サンドイッチイムノアッセイは、本発明の方法の特に好ましい実施形態である。

【0058】

図3のサンドイッチイムノアッセイは、固体支持体（例えば、常磁性粒子、PMP）上に固定された立体構造特異的捕捉抗体（「モノクローナル抗結合型LBD」と呼ばれる）へのVDR-LBD/1, 25(OH)₂D複合体の結合、及びサンドイッチの第2の部分としての標識された検出抗体の使用を伴う。検出抗体は、直接標識されるか、又は標識された抗免疫グロブリン抗体からなる結合体によって認識される（図3の具体的な例において、検出抗体は、ABEIで直接的に標識されている）。次いで、VDR-LBD/1, 25(OH)₂D複合体に直接的に又は間接的に結合した標識抗体の量が、適切な手段によって測定される。

10

【0059】

サンドイッチイムノアッセイは、抗タグ検出抗体と組み合わせた、VDR-LBDを含むタグ付き受容体タンパク質の使用を伴ってもよい。この実施形態において、立体構造特異的捕捉抗体によって捕捉されるVDR-LBD/1, 25(OH)₂D複合体の検出は、複合体上に存在するタグへの検出抗体の特異的結合によって実現される。好ましくは、タグは、ポリヒスチジンタグである。より具体的な実施形態において、タグは、シャペロンタンパク質である。

20

【0060】

本発明の範囲内に入るイムノアッセイは、任意の適切な形式、例えば、ラジオイムノアッセイ(RIA)、化学発光イムノアッセイ又は蛍光イムノアッセイ、酵素結合免疫測定法(ELISA)、Luminexに基づくビーズアレイ、タンパク質マイクロアレイアッセイ、又は迅速な試験形式、例えば免疫クロマトグラフィーストリップ試験などであってよい。

30

【0061】

イムノアッセイの形式によって、捕捉抗体及び/又は検出抗体が、固体支持体上に固定されてよい。適切な固体支持体の非限定的な例は、マイクロタイタープレートのウェル、ラテックス、ポリスチレン、シリカ、キレート化セファロース、若しくは磁性ビーズなどの微粒子の表面、膜、ストリップ、又はチップである。

【0062】

前述したように、本発明の別の態様は、生物学的液体試料中の1, 25(OH)₂D又はその類似体を検出するためのキットであって、受容体タンパク質及び方法に関連して上記に定義した捕捉部分、並びに6から9の間に含まれるpHを有する結合緩衝液を含むキットである。好ましいpH値は、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、又は8.6など、7から8.6の間に含まれる。試験試料のpHを調整するための結合緩衝液の好ましいが非限定的な例としては、50mMトリス(Tris)緩衝液(pH7.4)、ヘペス(Hepes)(6.5~7.5)、PBSが挙げられる。

40

【0063】

本発明のキットは、限定されるわけではないが、ビーズ、微粒子、ナノ粒子、超常磁性粒子、マイクロタイタープレート、キュベット、ラテラルフロー装置、フローセル、又はタンパク質若しくはペプチドが受動的に若しくは共有結合的に結合され得る任意の表面などの固体支持体をさらに含んでもよい。本発明のキットの受容体タンパク質又は捕捉部分

50

のいずれかが、固体支持体上に固定されてよい。

【0064】

さらに、本発明のキットは、検出方法に関連して前述した検出手段も含んでよい。

【0065】

以下の実験のセクションは、あくまでも例証として提供され、添付の特許請求の範囲において定義される本発明の範囲を限定することを意図しない。

【実施例】

【0066】

(例1)

ラットVDR-LBDタンパク質の発現及び精製

本発明の方法及びキットのための適切な試薬として使用され得る組換えVDR-LBDタンパク質を作製するために、プラスミドベースの発現ベクターを構築した。手短に言えば、47アミノ酸の内部ループ(165~211)が欠失しているドブネズミに由来するビタミンD受容体のリガンド結合ドメインの残基116~423(rVDR-LBD)をコードするDNAを、Nde I/Bgl II制限部位組合せを用いることによってpET-29bプラスミド(Novagen)中にクローニングした。組換えVDR-LBDタンパク質の検出及び精製を容易にするために、VDR-LBDコード配列の下流にHisタグコード配列、続いて停止コドン进行クローニングすることによって、対象のタンパク質のC末端にポリヒスチジンタグを付加することができる。

【0067】

VDR-LBDタンパク質をコードするプラスミドを、カナマイシン(40µg/L)及びクロラムフェニコール(40µg/L)を添加したLB中で増殖させたBL21-CodonPlus(DE3)-RiPL(Stratagene)細胞において封入体として発現させた。開始培養物(starter culture)(5mL)に、単一の細菌コロニーを植え付け、14mL容チューブ中で37(250rpm)にて6時間増殖させて、光学濃度(OD600)を約1に到達させた。開始培養物を2500倍希釈して一晚培養物(35mL)とし、125mL容フラスコ中で30(250rpm)にて15時間増殖させた(典型的なOD600は約3.7)。この一晚培養物を2L容フラスコ中で0.5Lの発現培地で希釈し、OD600を約0.09にした。培養物は、OD600が0.6~0.8になるまで約2.5時間(250rpm)増殖し、IPTGを最終濃度が0.35mMになるように添加することによって、VDR-LBDの発現を誘導した。培養物は37で6時間増殖し続け、その後、5000rpm(GS3ローター)、4で15分間の遠心分離によって細胞を採取した。新しく回収した細胞沈殿物(典型的には、5.5g/Lの培養物)を、さらにタンパク質精製するために-80で保管した。

【0068】

細胞沈殿物(5.5g)を、50mM Tris-HCl(pH8.0)、2mM EDTA、10mM DTT、0.3mMフッ化フェニルメチルスルホニル、及び0.5mg/mLリゾチームを含有する溶解緩衝液135mL中に再懸濁し、ソニックディスペンレーター(Fisher)を用いた超音波処理に供した。11000rpm(SS34ローター)、4で15分間の遠心分離によって、細胞片及び封入体を含む沈殿物を得、洗浄緩衝液(50mM Tris-HCl、2mM EDTA、100mM NaCl、pH8.0)200mL、続いて0.5%(v/v) Triton X-100を含む同じ洗浄緩衝液200mLを用いて洗浄した。各添加後に、スラリーを穏やかに5分間攪拌し、次いで、12000rpm、4で20分間、遠心分離した。最終的な沈殿物を、40mM Tris-酢酸(pH7.6)、2mM EDTA、6M Guanidinium-HCl、及び100mM DTTを含有する変性緩衝液200mL中に極めて穏やかに懸濁し、室温で2時間攪拌した。12000rpm、4で20分間の遠心分離によって、清澄な溶液が得られた。この上清を、25mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄(pH7.4)、50mM KCl、及び2mM DTTを含有する透析緩衝液20Lに対して4で-

10

20

30

40

50

晩透析した。翌日、遠心分離によって白色沈殿物を除去し、上清を回収し、さらに24時間、16mM HEPES (pH 7.4)、25mM NaCl、15mM KCl、及び2mM DTTを含有する緩衝液を2回交換して、透析を継続した。タンパク質溶液を、Amicon遠心式フィルター(10K MWCO)に入れて濃縮し、16mM HEPES (pH 7.4)、25mM NaCl、15mM KCl、及び10mM TCEPを含有する最終緩衝液に交換した。希釈及び濃縮を繰り返して緩衝液交換を行って、Hisタグビーズと相性が悪いDTTを除去した。12% SDS-PAGEによって、タンパク質の純度を分析した。BSAを標準物質(係数 $0.055 \mu\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1}$)として用いたブラッドフォード法によって、タンパク質濃度を測定した。VDR-LBDの典型的な収量は、培養物1リットル当たり25~30ミリグラムであり、培養物の健康状態によって決まる発現レベル、及び透析手順によって大きく左右される。

10

【0069】

(例2)

VDR-LBD/1, 25(OH)₂D複合体を認識できる立体構造特異的モノクローナル抗体の作製

立体構造特異的抗体を作製するために本発明者らが追究する戦略は、1, 25(OH)₂Dに結合したビタミンD受容体の結合ドメイン(VDR-LBD)からなる複合体を免疫原として利用することに基づいた。適切なアジュバントを用いて配合した免疫原の個々の使用アリコートを手用BALB/cマウスに注射した。4週間後、6週間後、及び8週間後に、ポリエチレングリコール(PEG)を融合剤として用いて、マウス脾臓由来のリンパ球をSP2/0マウス骨髄腫細胞と融合した。これらのハイブリッド細胞を、ハイスルーブットな96ウェル培養プレート形式で、384個のウェルに播種した。

20

【0070】

対象の免疫原、すなわちVDR-LBD/1, 25(OH)₂D複合体、及び陰性対照としての単独の未結合ビタミンDリガンド結合ドメインを用いて、大もとの(master)融合プレートにおいて直接的にELISAを行って、抗原特異的免疫活性を測定した。手短かに言えば、96ウェルのマイクロタイタープレートを、未結合型又は1, 25(OH)₂Dと予め結合させた $0.56 \mu\text{g}/\text{ml}$ のHisタグ付き組換えVDR-LBDタンパク質それぞれ $100 \mu\text{l}$ でコーティングした。事前結合反応は、3モル過剰の1, 25(OH)₂D($1 \text{mg}/\text{ml}$)の存在下でVDR-LBDタンパク質を一晩インキュベートすることによって実施した。マイクロタイタープレートへのタンパク質吸着は、ポリヒスチジンタグとウェル表面に存在するニッケルイオンのコーティングとの特異的相互作用を介して実現された。タンパク質吸着後、PBS-T(PBS中0.1% Tween 20)でプレートを洗浄し、1:16000希釈した検査中のモノクローナル抗体 $100 \mu\text{l}$ と共に、穏やかに混ぜながら室温で1時間、インキュベートした。インキュベーション後、プレートをPBS-Tで3回洗浄し、PBS-T中で1:30000希釈したHRP結合型ヤギ抗マウスIgG($1 \text{mg}/\text{ml}$) $100 \mu\text{l}$ と共に、室温で1時間、インキュベートした。次いで、洗浄したプレートを、 $100 \mu\text{l}/\text{ウェル}$ のTMB基質と共に室温で10分間インキュベートした。 $150 \mu\text{l}/\text{ウェル}$ の1% HCl溶液を添加することによって反応を停止させた。マイクロプレートリーダーを用いて450nmでの吸光度を測定した。

30

40

【0071】

このようなスクリーニング戦略により、VDR-LBD/1, 25(OH)₂D複合体に対してのみ特異性を示し、未結合のリガンド結合ドメインに対しては特異性を示さない抗体分泌クローンの検出及び選択が可能になった(表1)。次いで、選択されたハイブリドーマを、限界希釈法によってクローニングし、前述のELISA法によって再びスクリーニングした。抗体発現を安定させるために、所望の力価及び特異性を有するクローンをサブクローニングした。

【0072】

選択された各クローンを最初に試験して、マウス免疫グロブリンのアイソタイプを決定

50

し、続いて、生産規模まで増殖させた。クローン増殖後に、AKTAPRIME plusを用いたプロテインAアフィニティー精製によってマウスIgGを単離し、Hitrap脱塩カラムを用いた1×DPBS緩衝液への緩衝液交換に供した。このようにして得られた抗体試料を0.2µmフィルターを用いて滅菌し、試料濃度を概算し、生産物をポリプロピレンチューブ中に滅菌包装し、4℃で保存した。

【0073】

前述の研究の結果として、11B4H11H10と名付けられたハイブリドーマクローンをさらなる解析のために選択した。

【表1】

表1

(抗VDR-LBD/1,25(OH)₂D複合体に特異的に結合する本発明による4種の抗体を用いて得られたELISAスクリーニングデータ)

抗体クローン ID	450nmにおけるELISA吸光度		比
	VDR-LBD/1,25(OH) ₂ D複合体	未結合型VDR-LBD	
10A3	3.659	0.103	35.5
11B4	3.028	0.121	25.0
12C11	0.569	0.090	6.32
8E2	0.480	0.382	1.26

【0074】

上記に例示した選択方法は、本発明による抗体、すなわち、1,25-ジヒドロキシ-ビタミンD又はその類似体に結合したビタミンD受容体のリガンド結合ドメインに特異的に結合できるmAb又はその機能的断片を分泌する別のハイブリドーマクローンを同定するのにも使用され得る。

【0075】

(例3)

ハイブリドーマクローン11B4H11H10によって発現された免疫グロブリンGのVH遺伝子及びVL遺伝子のDNAコンセンサス配列の同定

11B4H11H10の大もとの貯蔵バイアルを解凍し増殖させて、cDNAライブラリー構築のために典型的な(representative)数の細胞を生じさせた。手短かに言えば、75cm²フラスコ中の活発な対数増殖細胞培養物から1×10⁷個のハイブリドーマ細胞を単離し、50cm²のポリプロピレン製滅菌済み遠心分離チューブ中、500×gで4分間、遠心分離した。TRIzol(登録商標)試薬(Invitrogen)を用いて全RNAを単離し、Nanodrop(商標)を用いて定量した。オリゴdTプライマー手順を用いて、ハイブリドーマの全RNA(500ng)を逆転写した。マウスの免疫グロブリン可変重鎖(VH)及び可変軽鎖(VL)を、特異的プライマーを用いることによってcDNAライブラリーから増幅させた(RT-PCR)。増幅されたそれらの鎖を、TAクローニングによってTOPOベクター(Invitrogen)中にランダムな向きで独立に挿入した。このライゲーション産物を、エレクトロポレーションによって、大腸菌(E.coli)のエレクトロコンピテント維持株にトランスフォー

【0076】

各トランスフォーメーションプレートから20個の独立した細菌コロニーを選択し、15ml容スナップキャップ付きポリプロピレンチューブに入れたLBA培養液(100µg/mlアンピシリン)10ml中に接種し、250rpmで回転振盪して37℃で一晩増殖させることによって、拡大させた。すなわち、VHとVLの両方について、20個の精製プラスミドDNAを作製した。

【0077】

最初の20個のVH TOPOプラスミド及びVL TOPOプラスミドのそれぞれを、T7配列決定用プライマーを用いた1回のフォワード(5'-3')複製反応を用いた

10

20

30

40

50

自動DNA配列決定 (Functional Biosciences, Madison、Wisconsin) によってスクリーニングして、完全長のVh挿入物又はVl挿入物が存在するかどうか判定した。配列アラインメントの際、単一の代表的なVh及びVlが出現したことから、RNA単離時のハイブリドーマ集団はモノクローナルであることが示唆された。

【0078】

DNA配列決定をさらに反復するために、対応する完全長挿入物を含む代表的なプラスミドをVh及びVlの両方について最大10個選択した。より具体的には、各プラスミドをさらに2回のT7フォワード反応及びBGHリバーズ反応に供して、コンセンサス配列を構築した。

10

【0079】

新規のマウス免疫グロブリン可変重鎖及び可変軽鎖のコンセンサス配列を作製するために、CLC Workbenchを用いてDNAアラインメントを実施した。同定されたDNAコンセンサス配列をアミノ酸ストレッチに翻訳する際、Vh及びVlのタンパク質ドメイン解析のためにNCBI BLASTを使用して、これらの配列がマウス免疫グロブリン遺伝子であることを確認し、相補性決定領域(CDR)を含めて重要な構造ドメインを位置付けた。

【0080】

11B4H11H10と呼ばれるモノクローナル抗体のDNAコンセンサス配列、並びにそのCDRを配列表に示した。

20

【0081】

(例4)

1,25(OH)₂Dアッセイ

本発明のアッセイの好ましい実施形態の内の1つを次のようにして発展させた。常磁性微粒子(PMP)(Dyna1、Norway)を、供給業者の取扱い説明書に従って11B4モノクローナル抗体でコーティングした。このアッセイで使用した組換えVDR-LBDは、実施例1で説明したようにして調製し、アフィニティタグと結合させた(以下、「TAG」と呼ぶ)。このアッセイで使用した11B4H11H10モノクローナル抗体は、実施例2で説明したようにして調製した。マウスモノクローナル抗TAG抗体を、pH7.4のPBS緩衝液に溶かした環状アミノブチルエチルイソルミノール(cABEI)と結合させた。算出されたcABEI組込みは、抗体分子1個当たり2~3分子であった。ステロイドを含まないチャコール処理済ヒト血清中に様々な濃度の1,25(OH)₂Dエタノール溶液を添加することによって、標準物質を調製した。アッセイ用緩衝液配合物は、50mM TRIS(pH7.4)、0.02%CHAPS、1mM EDTA、8mg/mlヘパリン、及び異好性のヒト抗マウス(HAMA)干渉を軽減するための1%マウス血清からなった。

30

【0082】

いかなるオフラインの解析前ステップ/試料前処理ステップも用いない自動アッセイの主要課題は、アッセイが、1,25(OH)₂Dより1000倍高いレベルで存在し得る25(OH)D、24,25(OH)₂D、及び25,26(OH)₂Dなどの他のビタミンD代謝産物による干渉を受けずに、生物学的マトリックス(例えば、血清又は血漿)中の1,25(OH)₂D又は活性型ビタミンDの類似体の全量の特異的に捕捉及び検出することができるようになることである。この課題は、ビタミンD結合タンパク質(DBP)及びアルブミンの存在によってさらに複雑になり、これらは血液循環中に豊富に存在し、25(OH)D、1,25(OH)₂D、及び他のビタミンD代謝産物の主要な結合タンパク質として働き、85%~90%がDBPに結合し、10~15%がアルブミンに結合する。さらに、DBPレベルは、妊娠などの高エストロゲン状態では最高で2~5倍に上昇する。

40

【0083】

したがって、本発明のアッセイが循環血中1,25(OH)₂Dの全量をVDBPに無

50

関係な様式で特異的に捕捉及び検出する能力を検証するために、本発明者らは、アッセイの測定範囲にまたがるヒト血清試料パネル (N = 17 ; 健康に見受けられる個体 8 名及び妊娠した女性 9 名) を準備した。これらの 17 個の試料の予想される $1, 25(\text{OH})_2\text{D}$ 値 (pg/mL) を、Stillwater、MN USA 所在の DiaSorin Inc. 製の FDA に認可された $1, 25(\text{OH})_2\text{D}$ ラジオイムノアッセイ (部品番号 65100E / 100 チューブ ; $1, 25$ -ジヒドロキシビタミン D) を用いることによって測定し、次いでこれを参照方法として使用した。

【0084】

図 3 に概略的に示したアッセイを、DiaSorin LIAISON (登録商標) 解析装置 (Saluggia、Italy) において実施した。最初に、ヒト血清試料 $50\ \mu\text{l}$ をアッセイ緩衝液 $100\ \mu\text{l}$ 及び VDR-LBD-TAG $50\ \mu\text{l}$ と共に 30 分間インキュベートした。次に、11B4H11H10 モノクローナル抗体でコーティングした PMP $20\ \mu\text{l}$ を添加し、反応混合物をさらに 30 分間インキュベートした。反応混合物を洗浄した後、cABEI を結合させた抗 TAG モノクローナル抗体 $40\ \mu\text{l}$ を添加し、反応混合物をさらに 30 分間インキュベートした。2 回目の洗浄後、反応誘発 (trigger) 溶液を添加し、解析装置の読取りチャンパーにおいて反応混合物の相対発光量 (RLU) を読み取った。

10

【0085】

本発明の $1, 25(\text{OH})_2\text{D}$ アッセイを参照方法としての DiaSorin RIA と比較するために、各試料を用いて得られた RLU を、図 4 に示す検量線を用いて得られた、量 (dose) (pg/mL) に対する RLU の関係に基づいて、 pg/mL に変換した。図 4 の検量線は、以下のようにして得た。ステロイドを含まないチャコール処理済ヒト血清中に様々な濃度の $1, 25(\text{OH})_2\text{D}$ エタノール溶液を添加することによって、検量線用の標準物質を調製した。散布図を三次多項式当てはめと共に用いて、標準物質の反応 (RLU) を量 (pg/mL) に対してプロットした。次いで、試料の RLU を pg/mL に変換し (表 2)、アッセイと参照方法の相関付け (correlation) を、パッシング及びパブロックの当てはめ、線形回帰、並びにブランドアルトマンの差異 (%) プロット解析を用いることによって実施した。得られた結果をそれぞれ図 5 A、図 5 B、及び図 5 C に示している。これらの解析から、本発明のアッセイ及び DiaSorin RIA 参照アッセイによって測定された量は、実質的に同じ値 (傾き 0.89、切片 $6.6\ \text{pg}/\text{mL}$ 、 R^2 は 0.96、及び平均差 (%) は -2.8%) であることが実証され、したがって、本発明のアッセイが、DBP 血清濃度とは無関係に、ヒト血清中の循環血中 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}$ の全量を正確に捕捉及び検出できることが示唆される。

20

30

【0086】

最後に、ヒト血清中の $1, 25(\text{OH})_2\text{D}$ を特異的に回収していることを実証するために、各パネル試料 (N = 17) 中の全 $25(\text{OH})\text{D}$ の濃度 (ng/mL) を、FDA 510(k) の認可を受けた LIAISON (登録商標) $25\ \text{OH}\ \text{Vitamin D}\ \text{TOTAL}\ \text{Assay}$ (部品番号 310600、DiaSorin Inc.、Stillwater、MN、USA) を用いて測定した。510(k) の認可を受けた DiaSorin RIA による $1, 25(\text{OH})_2\text{D}$ 量と 510(k) の認可を受けた LIAISON (登録商標) $25\ \text{OH}\ \text{Vitamin D}\ \text{TOTAL}\ \text{Assay}$ による $25(\text{OH})\text{D}$ 量の間に関連関係はなかったため (図 6)、本発明者らは、本発明の $1, 25(\text{OH})_2\text{D}$ アッセイが、血清中の全 $25(\text{OH})\text{D}$ の濃度とは無関係に、ヒト血清中の $1, 25(\text{OH})_2\text{D}$ の全量を特異的且つ定量的に回収すると結論付けた。これらの結果を図 6 に示している。図 6 は、 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}$ 量と $25(\text{OH})\text{D}$ 量の間に関連関係はなかった ($p = 0.4546$) ことを示している。

40

【表 2】

表 2

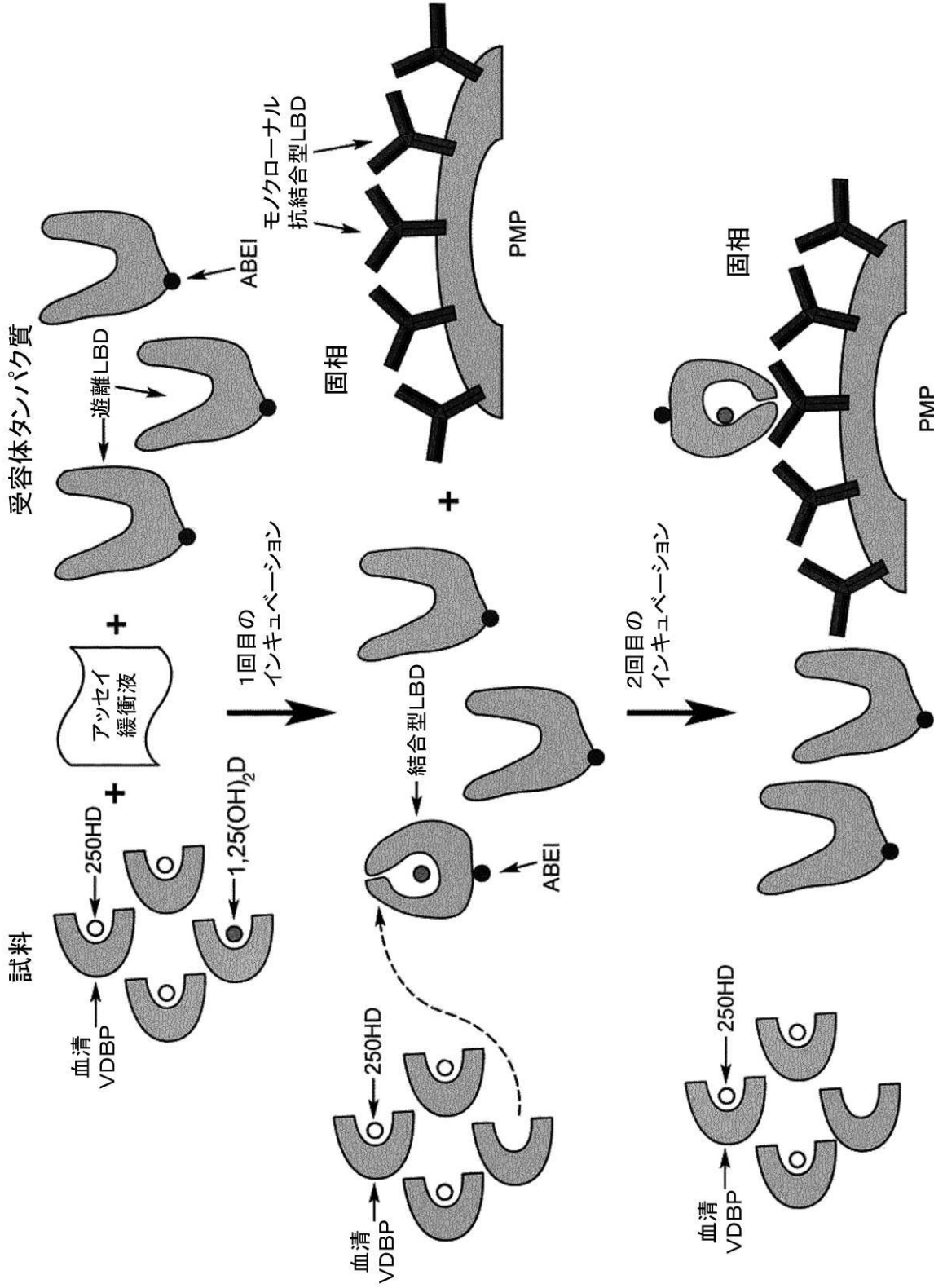
(各試料を用いて得られたRLUを、図4のLIAISON検量線を用いて得られた、量に対するRLUの関係に基づいて、量(pg/mL)に変換した。量は、23.8pg/mL(最小値)から164.0pg/mL(最大値)までのアッセイ測定範囲に及び、平均値は83.54pg/mLであり、95%CIは65.04~102.03pg/mLであった。)

番号	試料 ID	性別	種類	LIAISON 1,25(OH) ₂ D	
				RLUs	量 (pg/mL)
1	M10284	男性	健康に見受けられる	246,408	81.9
2	M10279	男性	健康に見受けられる	231,717	73.7
3	M10302	男性	健康に見受けられる	183,344	48.1
4	F20378	女性	健康に見受けられる	182,691	47.8
5	F20436	女性	健康に見受けられる	260,932	89.8
6	F20198	女性	健康に見受けられる	208,126	60.7
7	F20151	女性	健康に見受けられる	221,471	68.0
8	F20416	女性	健康に見受けられる	137,640	23.8
9	8316745	女性	妊娠中	245,686	81.5
10	8316205	女性	妊娠中	419,906	164.0
11	8315465	女性	妊娠中	276,473	97.5
12	8315505	女性	妊娠中	201,329	57.1
13	8316605	女性	妊娠中	208,752	61.1
14	8316585	女性	妊娠中	373,007	142.0
15	8316765	女性	妊娠中	298,588	107.0
16	8316815	女性	妊娠中	261,589	90.1
17	8315375	女性	妊娠中	338,801	126.0

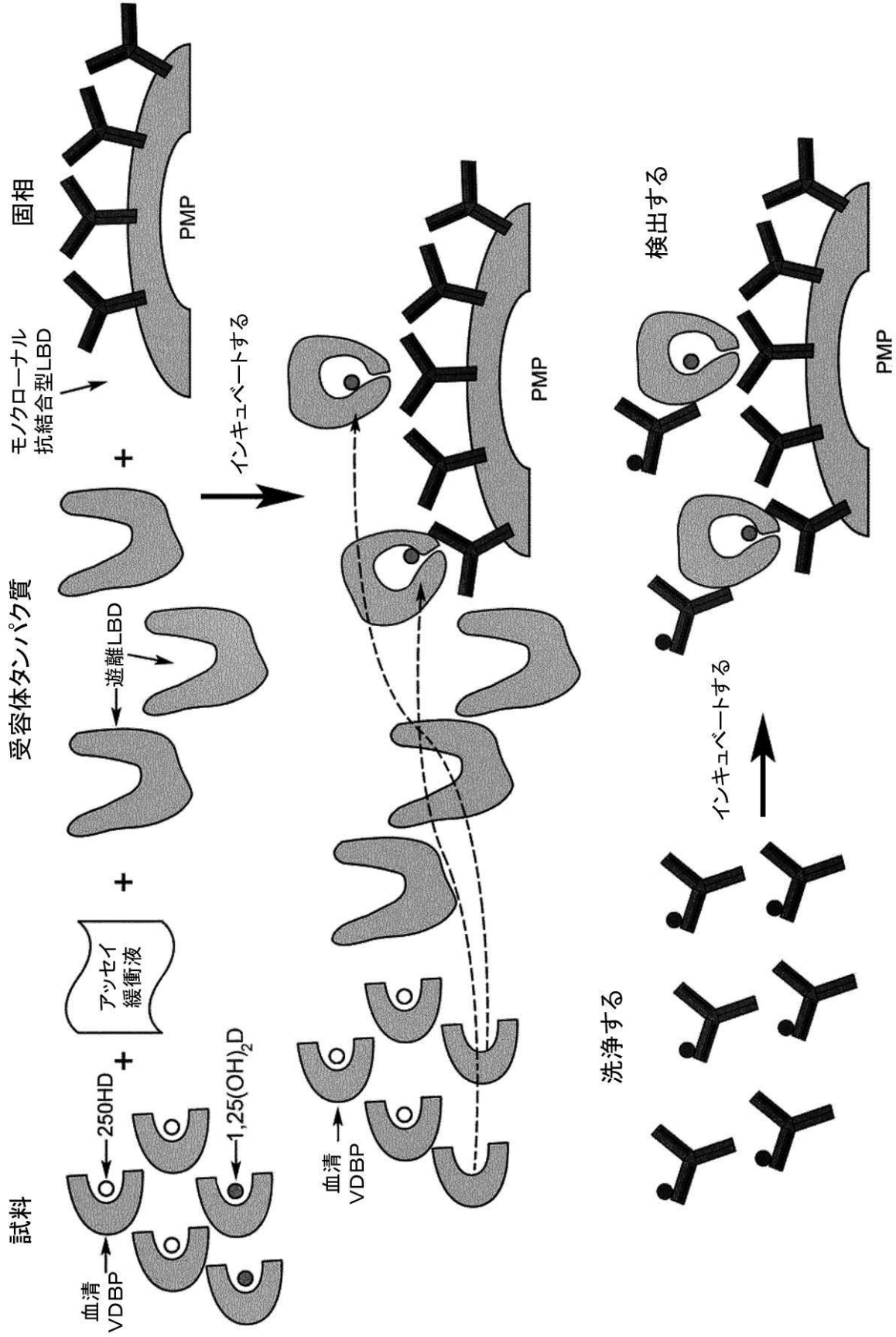
10

20

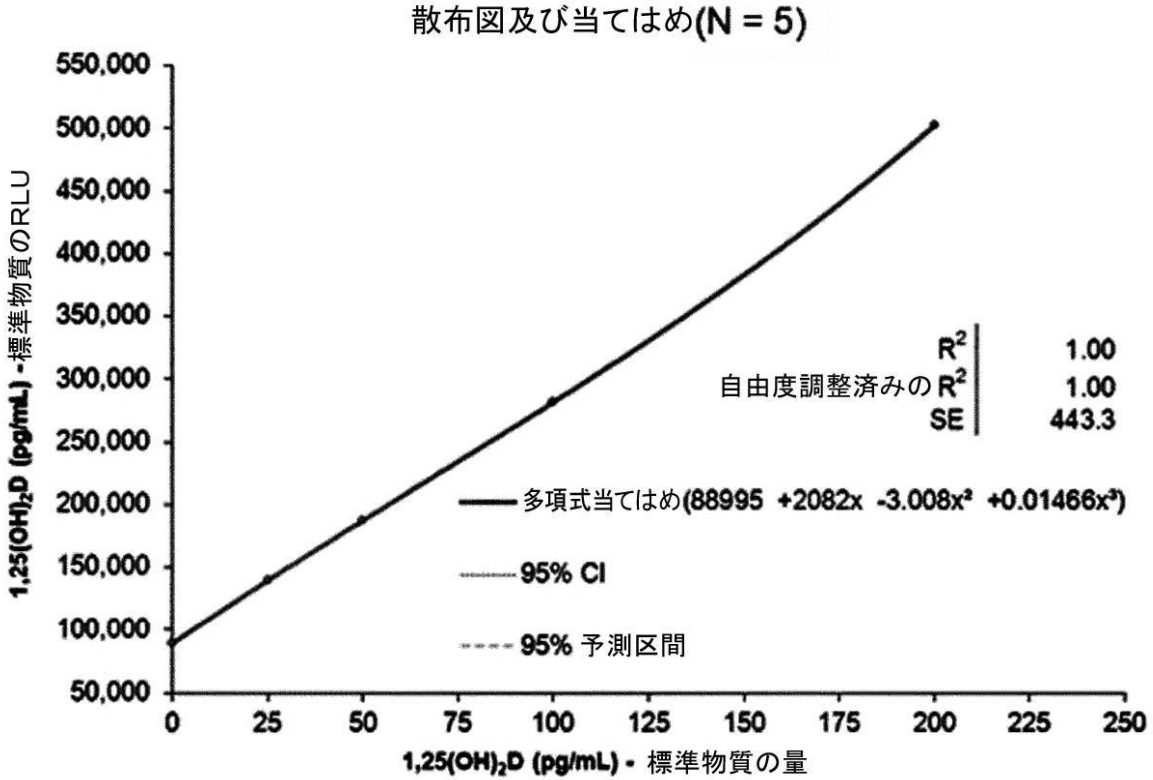
【 図 2 】



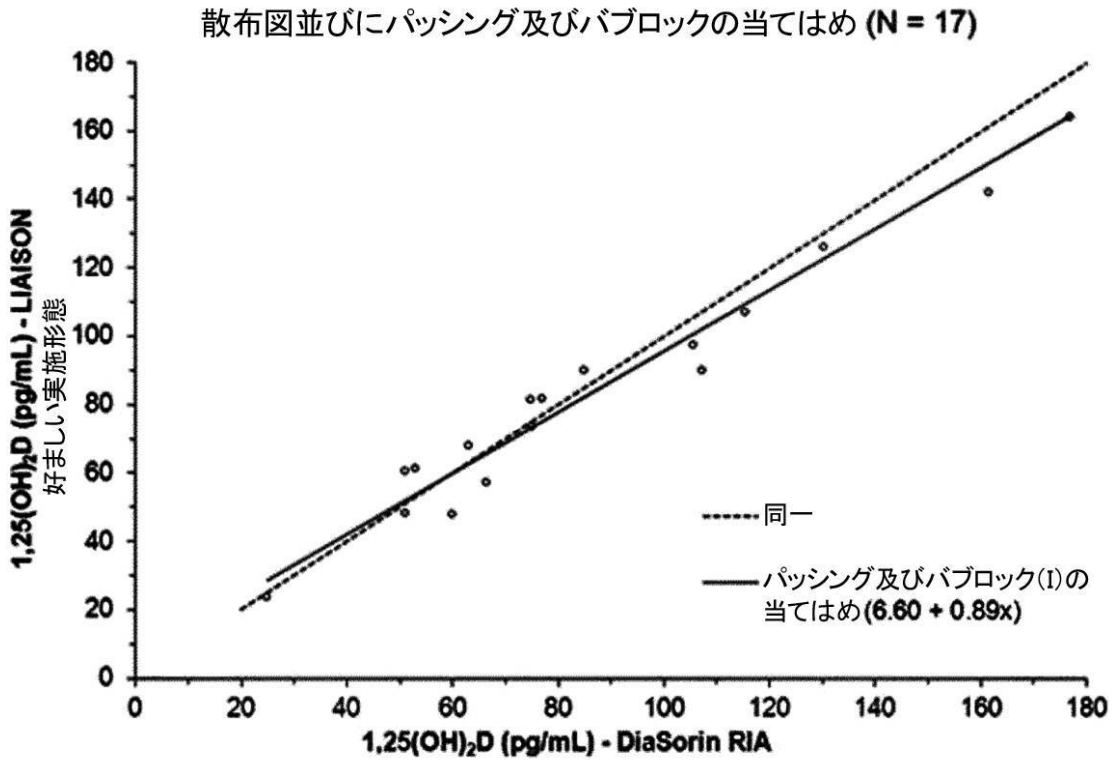
【 図 3 】



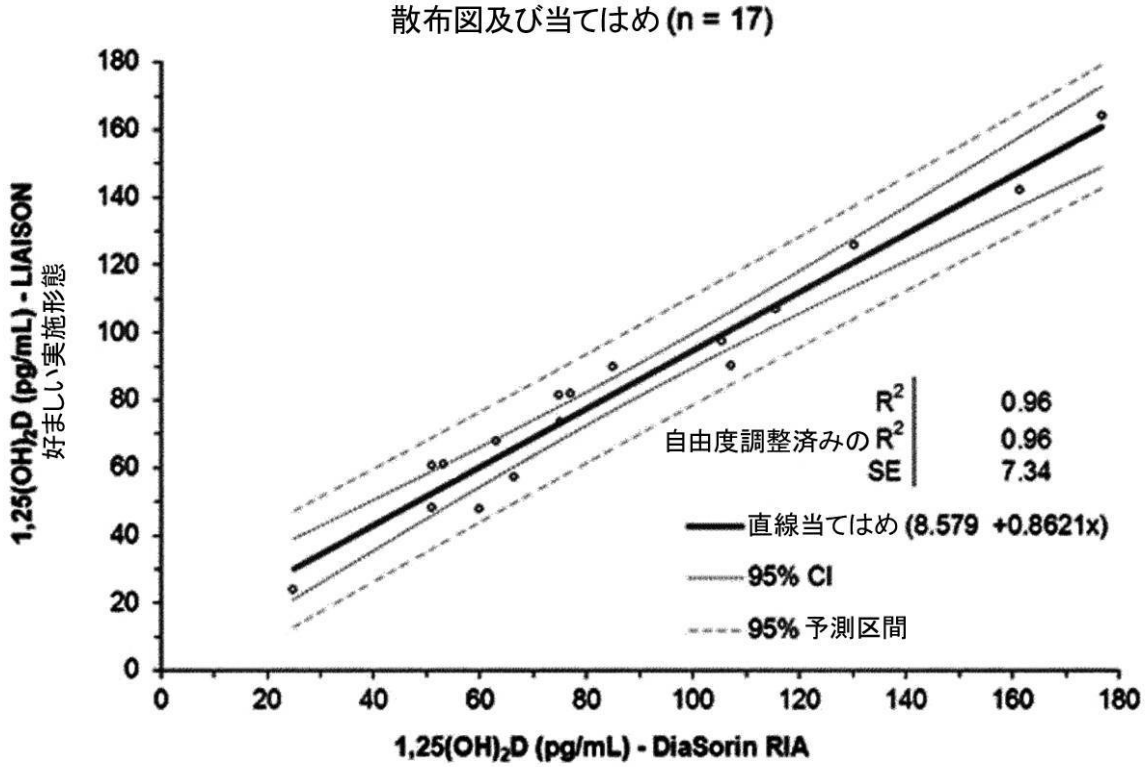
【 図 4 】



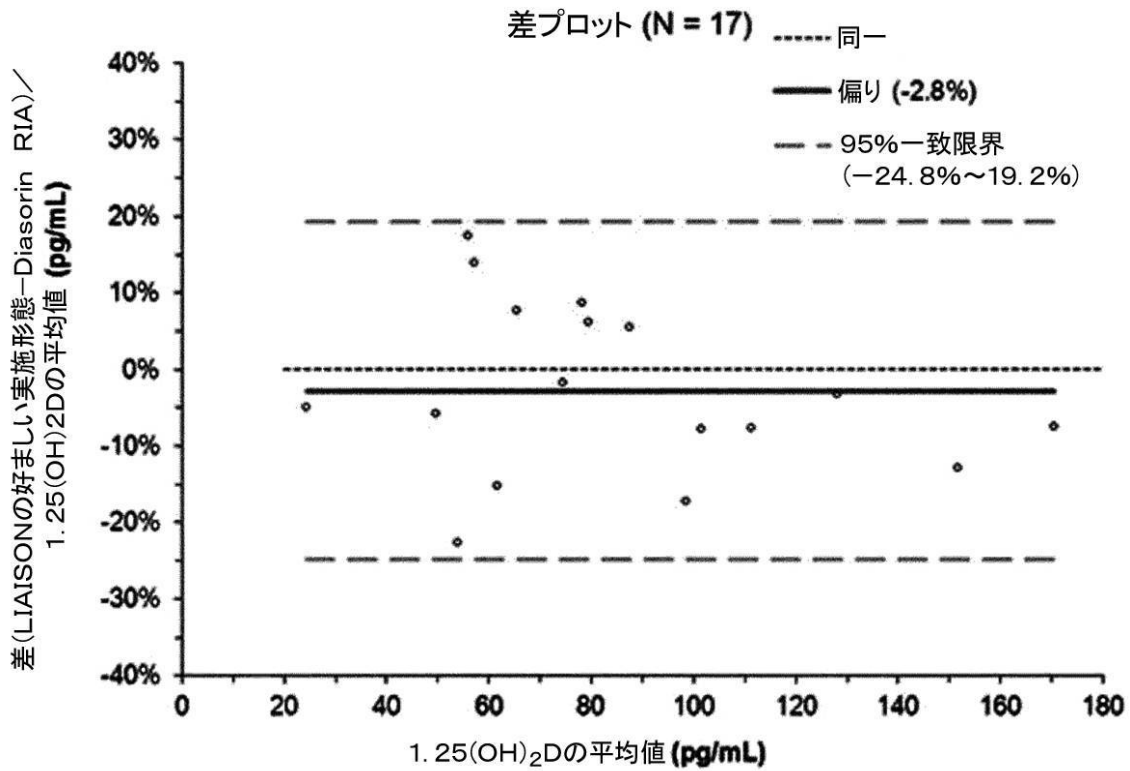
【 図 5 a 】



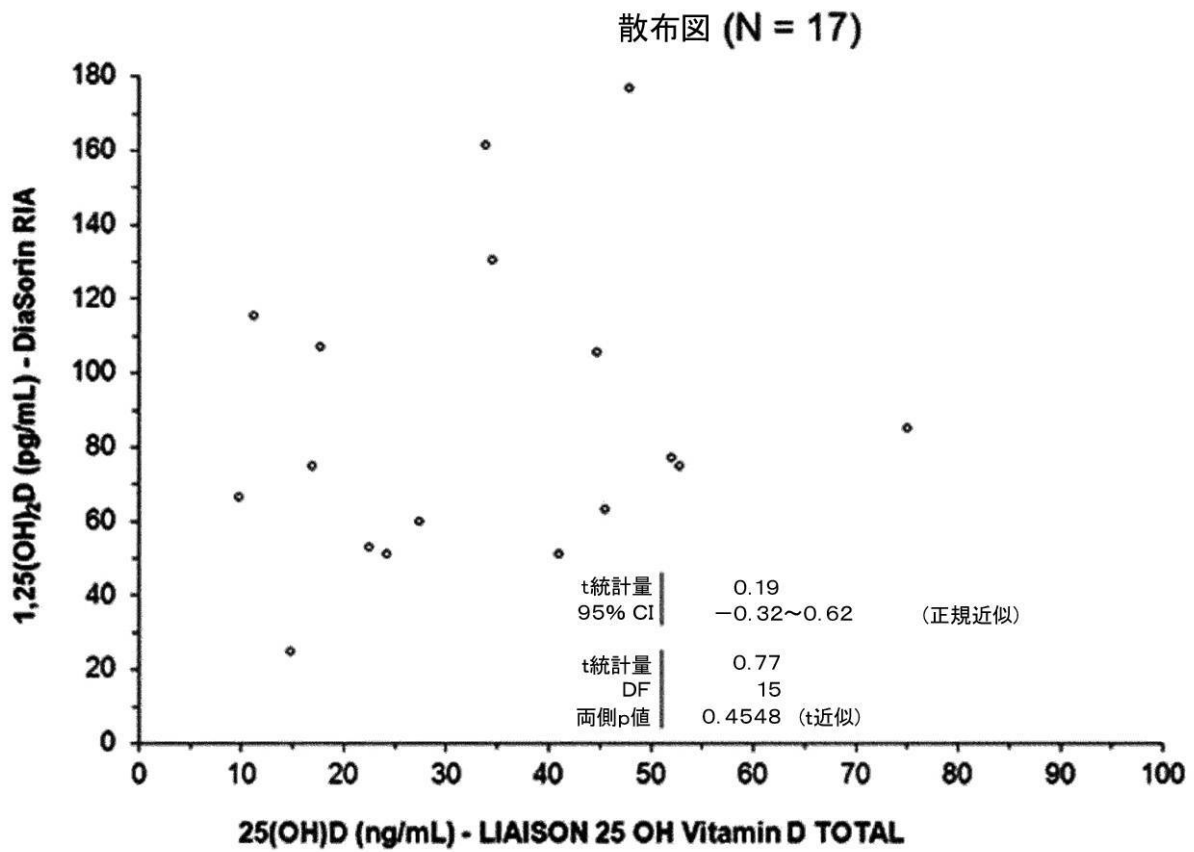
【 図 5 b 】



【 図 5 c 】



【 図 6 】



【 配列表 】

[2016505634000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2014/051482

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/26 G01N33/541 G01N33/543 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) C07K 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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SWAMI S ET AL: "A new enzyme-linked immunosorbant assay for the measurement of human vitamin D receptor", BONE (NEW YORK), vol. 28, no. 3, March 2001 (2001-03), pages 319-326, XP002694951, ISSN: 8756-3282 abstract page 320, column 1, paragraph 3 - column 2, paragraph 3 page 325	1-21
A	----- WO 2008/092917 A1 (IMMUNDIAGNOSTIK AG [DE]; ARMBRUSTER FRANZ PAUL [DE]; ROTH HEINZ-JUERGE) 7 August 2008 (2008-08-07) abstract; claim 1 ----- -/--	1-21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
24 February 2014		10/04/2014
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 Klee, Barbara

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/051482

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 89/01631 A1 (WISCONSIN ALUMNI RES FOUND [US]) 23 February 1989 (1989-02-23) claim 1 -----	1-21
A	EP 0 583 945 A2 (WISCONSIN ALUMNI RES FOUND [US] WISCONSIN ALUMNI RES FOUND [JP]) 23 February 1994 (1994-02-23) abstract; claims 1,8 -----	1-21
X	VAISANEN SAMI ET AL: "Conformational studies of human vitamin-D receptor by antipeptide antibodies, partial proteolytic digestion and ligand binding", EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 248, no. 1, 1997, pages 156-162, XP002720791, ISSN: 0014-2956 abstract; figures 2-6 page 161, column 2, paragraph 2 - paragraph 3 -----	1-8
X	YONGJI WANG ET AL: "Where is the vitamin D receptor?", ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, vol. 523 mouse monoclonal antibody against the C-terminu, no. 1, 6 April 2012 (2012-04-06), pages 123-133, XP028509235, ISSN: 0003-9861, DOI: 10.1016/J.ABB.2012.04.001 [retrieved on 2012-04-06] abstract page 3, column 1, paragraph 1 - paragraph 3 -----	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/051482

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 2008092917 A1	07-08-2008	AT 472734 T	15-07-2010		
		AU 2008209736 A1	07-08-2008		
		DK 2126586 T3	11-10-2010		
		EP 2126586 A1	02-12-2009		
		ES 2348126 T3	30-11-2010		
		HR P20100532 T1	30-11-2010		
		JP 5185291 B2	17-04-2013		
		JP 2010518369 A	27-05-2010		
		PT 2126586 E	17-09-2010		
		US 2010068725 A1	18-03-2010		
		WO 2008092917 A1	07-08-2008		
		WO 8901631 A1	23-02-1989	AU 618025 B2	12-12-1991
				CA 1306189 C	11-08-1992
DE 3875619 T2	11-03-1993				
DK 37590 A	06-04-1990				
EP 0374172 A1	27-06-1990				
IE 61127 B1	05-10-1994				
IL 87378 A	15-07-1992				
JP H0551863 B2	03-08-1993				
JP H02503355 A	11-10-1990				
US 4816417 A	28-03-1989				
WO 8901631 A1	23-02-1989				
EP 0583945 A2	23-02-1994			EP 0583945 A2	23-02-1994
				JP H06109727 A	22-04-1994

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, LT, 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

(72) 発明者 ラターマン、マイケル

アメリカ合衆国、ミネソタ、ニュー ブライトン、サード アヴェニュー エスイー 230

(72) 発明者 ウォール、ジョン

アメリカ合衆国、ミネソタ、ウッドベリー、ファルコン リッジ ロード 682

(72) 発明者 ニュー、マイケル

アメリカ合衆国、ミネソタ、ブルーミントン、リトル アヴェニュー エス 10918

(72) 発明者 デルーカ、ヘクター フロイド

アメリカ合衆国、ウィスコンシン、ディアフィールド、カウンティー ハイウェイ ビービー 1809

(72) 発明者 ボネッリ、ファブリツィオ

イタリア国、アレッサンドリア、カザレ モンフェラート、ヴィア ムッソ 2

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA20 CC24 CE12

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA50 FA72 GA26

专利名称(译)	检测1,25-二羟基维生素D和相关抗体的方法和试剂盒		
公开(公告)号	JP2016505634A	公开(公告)日	2016-02-25
申请号	JP2015554173	申请日	2014-01-27
申请(专利权)人(译)	DIASORIN Soshietta佩尔Achioni		
[标]发明人	ソルドジョシュア オルソングレゴリー ラターマンマイケル ウォールジョン ニューマイケル デルーカヘクターフロイド ボネッリファブリツィオ		
发明人	ソルド、ジョシュア オルソン、グレゴリー ラターマン、マイケル ウォール、ジョン ニュー、マイケル デルーカ、ヘクター フロイド ボネッリ、ファブリツィオ		
IPC分类号	C07K16/28 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/566 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/26 C07K16/2869 C07K2317/32 G01N33/82		
FI分类号	C07K16/28.ZNA G01N33/53.H G01N33/543.501.D G01N33/566 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/GA26		
优先权	2013152851 2013-01-28 EP		
其他公开文献	JP2016505634A5 JP6471099B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)	(21) 出願番号	特願2015-554173 (P2015-554173)	(71) 出願人	515204524
	(86) (22) 出願日	平成26年1月27日 (2014.1.27)	ディアソリン ソシエタ ベル アチオニ	
公开了一种用于选择性检测生物流体样品中的1, 25-二羟基维生素D的测定方法。根据本发明的方法, 将测试样品的pH从6调节至9, 并将包含维生素D受体的配体结合结构域的受体蛋白 (VDR-LBD) 添加至测试样品, 由此未结合形成VDR-LBD / 1, 25-二羟基维生素D复合物, 其中, 与VDR-LBD相比, VDR-LBD部分在构象上发生变化。然后使用能够与结合1,25-二羟基维生素D的VDR-LBD特异性结合的捕获部分检测VDR-LBD / 1,25-二羟基维生素D复合物。还公开了用于实施本发明方法的测定试剂盒和抗体。优选地, 本发明的测定是夹心免疫测定。	(85) 翻訳文提出日	平成27年9月15日 (2015.9.15)	イタリア国 イ - 13040 ヴェル	
	(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/051482	チェッリ、サルツジャ、ヴィア クレシエ	
	(87) 国際公開番号	W02014/114780	ンティ-ノ エッセエンネチ	
	(87) 国際公開日	平成26年7月31日 (2014.7.31)	(74) 代理人	110000855
	(31) 優先権主張番号	13152851.5	特許業務法人浅村特許事務所	
	(32) 優先日	平成25年1月28日 (2013.1.28)	(72) 発明者	ソルド、ジョシュア
	(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	アメリカ合衆国、ミネソタ、ブライオア	
			レイク、ケンジントン アヴェニュー エ	
			ヌイー 13899	
			(72) 発明者	オルソン、グレゴリー
		アメリカ合衆国、ミネソタ、レイクランド		
		、デイヴィジョン ストリート 1637		
		0		