

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-501636

(P2008-501636A)

(43) 公表日 平成20年1月24日(2008.1.24)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 M	4 C 0 8 5
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 H 0 4 5
G O 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
G O 1 N 33/547 (2006.01)	G O 1 N 33/53 N	
G O 1 N 33/544 (2006.01)	G O 1 N 33/547	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 37 頁) 最終頁に続く

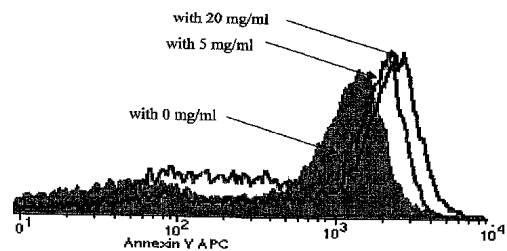
(21) 出願番号 特願2007-507849 (P2007-507849)
 (86) (22) 出願日 平成17年4月15日 (2005.4.15)
 (85) 翻訳文提出日 平成18年11月30日 (2006.11.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2005/001463
 (87) 国際公開番号 W02005/100405
 (87) 国際公開日 平成17年10月27日 (2005.10.27)
 (31) 優先権主張番号 60/521,384
 (32) 優先日 平成16年4月15日 (2004.4.15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 506338881
 アテラ バイオテクノロジーズ エービー
 スウェーデン ストックホルム S-17
 177 ホグデベテン 2B
 (74) 代理人 100093894
 弁理士 五十嵐 清
 (72) 発明者 デファイア ウルフ
 スウェーデン タビー S-18733
 ロバケン 22
 (72) 発明者 フロストガード ヨハン
 スウェーデン ナッカ S-13147
 トノサバジェン 9
 Fターム(参考) 4C085 AA14 BB13 CC23 DD33 DD88
 EE01 GG01
 4H045 AA11 DA76 EA24 FA72 FA74
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規組成物

(57) 【要約】

高血圧症(拡張期血圧 > 95 mmHg)の被験体において、ホスホリルコリンに対する I g G および I g M 自己抗体レベルを、アテローム性動脈硬化症の発症のための抗体の重要性を調べるためにベースラインで調べた。この結果は、ベースライン後追跡調査4年で内膜-中膜肥厚 (IMT) の増加が、ホスホリルコリンに対する高い自己抗体、特に、高い I g M 自己抗体を有する被験体では、有意にあまり広まっていなかったことを示す。したがって、ホスホリルコリンに対する自己抗体、特に I g M 自己抗体の有無は、虚血性心臓血管疾患を発症する危険の増減と関連している。本発明では、虚血性心臓血管疾患を発症する危険のある被験体を同定するために、ホスホリルコリンに対する抗体、特に I g M 抗体を測定する方法を提案する。動物実験は、中~高レベルの抗体、特に I g M 抗体は、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH-ホスホリルコリン複合体) での能動免疫化後の血漿で検出できることを示している。ホスホリルコリン複合体(能動免疫化)または抗体調製物、例えばホスホリルコリン複合体(受動免疫化)に



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アテローム性動脈硬化症またはアテローム性動脈硬化症関連疾患に対して、ヒトをはじめとする哺乳類を免疫化および治療するための医薬の製造における、少なくとも1種のホスホリルコリン複合体、または抗体調製物、例えばホスホリルコリン複合体に対して特異性を有するモノクローナル抗体を含む薬剤組成物の使用。

【請求項 2】

アテローム性動脈硬化症またはアテローム性動脈硬化症関連疾患に対して、ヒトをはじめとする哺乳類を免疫化および治療する方法であって、哺乳類に、少なくとも1種のホスホリルコリン複合体、または抗体調製物、例えばホスホリルコリン複合体に対して特異性を有するモノクローナル抗体を含む薬剤組成物を投与するステップを含む、方法。

10

【請求項 3】

医薬が注射による投与用のものであるか、または組成物を注射によって投与する、請求項 1 に記載の使用または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

ホスホリルコリンがスパーサーを介して担体と結合している、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の使用または方法。

【請求項 5】

担体がタンパク質である、請求項 4 に記載の使用または方法。

【請求項 6】

タンパク質が K L H (キーホールリンベットヘモシアニン) またはヒト血清アルブミン (H S A) である、請求項 5 に記載の使用または方法。

20

【請求項 7】

担体がラテックスビーズである、請求項 4 に記載の使用または方法。

【請求項 8】

虚血性心臓血管疾患の治療のための免疫療法または療法のための薬剤組成物の製造における、適宜、アジュバントと組合せた、請求項 1 ~ 7 のいずれか一つに定義される1種以上のホスホリルコリン複合体の使用。

【請求項 9】

アテローム性動脈硬化症を患っているか、虚血性心臓血管疾患を発症する危険に直面している、哺乳類、例えばヒトの予防的または治療的処置方法であって、治療上有効な量の少なくとも1種のホスホリルコリン複合体、または抗体調製物、例えばホスホリルコリン複合体に対して特異性を有するモノクローナル抗体を投与する、方法。

30

【請求項 10】

虚血性心臓血管疾患を発症する危険の増減に関連している I g M または I g G 抗体の有無をホスホリルコリン複合体を用いて診断する方法。

【請求項 11】

ホスホリルコリンがスパーサーを介して担体と結合している、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

担体がタンパク質である、請求項 11 に記載の方法。

40

【請求項 13】

タンパク質が K L H (キーホールリンベットヘモシアニン) またはヒト血清アルブミン (H S A) である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

担体がラテックスビーズである、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 15】

分析評価が免疫分析評価である、請求項 10 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

患者の虚血性心臓血管疾患の発症または進行の危険を評価する方法であって、患者の、

50

ホスホリルコリン複合体に反応性の I g M または I g G 抗体のレベルを評価する方法における、ホスホリルコリン複合体の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アテローム性動脈硬化症および虚血性心臓血管疾患の治療および危険評価の分野に関する。

【背景技術】

【0002】

アテローム性動脈硬化症は、大動脈および中動脈の最内側層（内膜）の肥厚を引き起こす慢性疾患である。これは血流を減少させ、影響を受けた血管によって供給されている組織において虚血および組織破壊を引き起こし得る。アテローム性動脈硬化症は、心筋梗塞、卒中および末梢動脈疾患をはじめとする心臓血管疾患の主な原因である。これは西欧諸国における死亡の主な原因であり、20年以内に世界全体の主な死亡原因となると予測されている。

【0003】

この疾患は、血管の細胞外マトリックスにおけるリポタンパク質、主として低密度リポタンパク質（LDL）の蓄積によって始まる。こういったLDL粒子は凝集し、酸化修飾を受ける。酸化LDLは炎症性、毒性であり、血管損傷を引き起こす。アテローム性動脈硬化症は、炎症および繊維症をはじめ、この損傷に対する応答を多くの点で表す。

【0004】

1989年に、パリンスキ（Palinski）らは、ヒトにおいて酸化LDLに対する循環性自己抗体を同定した。この観察結果は、アテローム性動脈硬化症は酸化リポタンパク質に対する免疫応答によって引き起こされる自己免疫疾患であり得るということを示唆した。この時点でいくつかの研究所が酸化LDLに対する抗体力価と心臓血管疾患の間の関連性を捜し始めた。しかし、これらの研究から分かった状況は全く理解できないものであった。抗体は、酸化LDL中の多数の種々のエピトープに対して存在したが、これらのエピトープの構造は分からなかった。したがって、用語「酸化LDL抗体」とは、1種の特定の抗体ではなく種々の抗体の未知の混合物を指す。

【0005】

アテローム性動脈硬化症病変には、免疫担当細胞の活性化および炎症性サイトカインの産生を特徴とする、進行中の炎症があることは十分に確証されている。高血圧症、血中脂質、糖尿病および喫煙のような確立された危険因子はこの炎症反応を促進する可能性が高いが、これが起こる機構は十分には特性決定されておらず、種々の互いに矛盾しない可能性が存在する。酸化された低密度リポタンパク質（oxLDL）および熱ショックタンパク質（HSP）をはじめ、この免疫反応を引き起こし得るいくつかの異なる自己抗原が提案されている^{2、3}。アテローム性動脈硬化症における免疫反応の役割に関する入手可能なデータは複雑な関係を示している。この一例として、動物モデルにおけるアテローム発生に影響を及ぼす免疫化がある。HSPを用いる場合には、アテローム性動脈硬化症は増加するが、oxLDLが抗原である場合には減少する^{4、5}。

【0006】

ヒト疾患におけるaOxLDLの役割は複雑であるようである。ヒトでは、これまでに、aOxLDLは、境界域高血圧症、例えば初期心臓血管疾患の男性においてよりも、健全な対照において高いということが実証されている^{7、8}。最近の研究はこの観察結果と一致している⁶。他方、何人かの著者が、aOxLDLはヒト心臓血管疾患（CVD）、とりわけ後期段階のヒト心臓血管疾患において高まるということを報告している^{2、3、9、10}。一例としては、CVDの極めて高い危険を伴う全身性紅斑性狼瘡（SLE）および自己免疫疾患がある。CVDの病歴を有するSLE患者のaOxLDLレベルは明らかに上昇していた¹¹。これらのある程度矛盾する結果は、抗原性の相違をもたらす、種々の方法およびLDL酸化段階に応じて変わり得る。また、疾病段階および危険因子プロ

10

20

30

40

50

フィールが抗体レベルと関係していると思われる。

【0007】

酸化された低密度リポタンパク質 (oxLDL) 自体が、T細胞^{1 2}、^{1 3}、単球/マクロファージおよび内皮細胞^{1 4} ~ ^{1 6} の活性化をはじめ、多数の炎症誘発性特性を有している。oxLDLは、アテローム性動脈硬化症病変に由来する免疫担当細胞においても炎症を促進する^{1 7}。しかし、oxLDLはまた、アテローム性動脈硬化症において見られるように、急性炎症反応を寛解させ、代わりにより軽度の慢性炎症を促進する場合があるということは留意しなければならない^{1 8}。興味深いことに、oxLDLの多数の生化学的作用はoxLDL中の血小板活性化因子 (PAF) 様脂質によって引き起こされる^{1 9} ~ ^{2 1}。

10

【0008】

ホスホリルコリン (PC) は、血小板活性化因子 PAF (これは PAF 受容体との相互作用に必須である) のような炎症性リン脂質や oxLDL において主要な成分であるだけでなく、肺炎連鎖球菌 (S. Pneumoniae) をはじめ多数の細菌の免疫原性成分としても主要な成分である。さらに、PC はアポトーシス細胞によって発現される²、^{2 3}。

【0009】

US 5 4 5 5 0 3 2 では、肺炎連鎖球菌などの感染に対する免疫保護を誘導するためのワクチンにホスホリルコリン複合体を用いている。バインダー (Binder) らによるマウスにおける肺炎球菌ワクチンに関する最近の研究では^{2 4}、ワクチン接種はアテローム性動脈硬化症病変形成を低減させるということも分かった。アテローム性動脈硬化症マウスから得た oxLDL に対する多数の自己抗体は、肺炎連鎖球菌をはじめとする一般的な感染性病原体に対して保護する抗体と構造上の同一性を共有しているということも分かった。ヒトではなくマウスにおけるこの研究からは特異性については何の情報も得られず、つまり、IgM 抗ホスホリルコリン抗体は、アテローム性動脈硬化症における保護因子として、対応する IgG 抗体よりも有意により重要である。さらに、ホスホリルコリン複合体は肺炎球菌ワクチンに用いられていない。

20

【0010】

別の研究では、抗ホスホリルコリン抗体レベルは歯周病を患うヒトでは上昇するということが分かった^{2 5}。結論は、ホスホリルコリンは歯周細菌叢中の生物に関連する重要な経口抗原であり、抗 PC 抗体は歯周病の結果として高まるということである。アテローム性動脈硬化症の抗体および可能性ある保護またはアテローム性動脈硬化症の進行に関しては何の情報も示されていない。

30

【0011】

アテローム性動脈硬化症の免疫治療に関する2つの文書 (例えば、WO 2 0 0 2 0 8 0 9 5 4 および WO 0 1 6 8 1 1 9) が公開されているが、これらはアポリポタンパク質 B のペプチド断片または T 細胞受容体の / 鎖に対する抗体のいずれかの使用に基づくものである。リポタンパク質上の酸化特異的エピトープに対するモノクローナル抗体を用いてアテローム斑を検出する方法も記載されている (WO 9 9 0 8 1 0 9)。これは、被験体サンプルにおいて、抗体、例えば IgM または IgG 抗体を検出するためにホスホリルコリン複合体を用いる、本発明において提案される方法とは異なっている。

40

【発明の開示】

【0012】

本発明はホスホリルコリン複合体、または抗体調製物、例えばホスホリルコリン複合体に対して特異性を有するモノクローナル抗体を含む薬剤組成物の使用および、アテローム性動脈硬化症の治療または予防、例えばアテローム性動脈硬化症の治療、予防またはさらなる進行の低減における、これらの組成物の使用に関する。さらに、本発明はまた、適宜、アジュバントを含む薬剤組成物を製造するための、ホスホリルコリン複合体または前記抗体調製物、例えばモノクローナル抗体の使用に関する。さらに、本発明はまた、虚血性心臓血管疾患を発症する危険の増減に関連している抗体、例えば IgM または IgG 抗体の有無を診断することに関する。

50

【0013】

本発明の第1の態様は、アテローム性動脈硬化症またはアテローム性動脈硬化症関連疾患に対して、ヒトをはじめとする哺乳類を免疫化および治療するための医薬の製造における、少なくとも1種のホスホリルコリン複合体、または抗体調製物、例えばホスホリルコリン複合体に対して特異性を有するモノクローナル抗体を含む薬剤組成物の使用を提供する。この医薬は、アテローム性動脈硬化症に対する免疫原性特性または治療特性を有する免疫化を提供することを目的とするものである。

【0014】

本発明の第2の態様は、アテローム性動脈硬化症またはアテローム性動脈硬化症関連疾患に対して、ヒトをはじめとする哺乳類を免疫化および治療する方法を提供し、この方法は哺乳類に、少なくとも1種のホスホリルコリン複合体、または抗体調製物、例えばホスホリルコリン複合体に対して特異性を有するモノクローナル抗体を含む薬剤組成物を投与するステップを含む。この薬剤組成物は、アテローム性動脈硬化症に対する免疫原性特性または治療特性を有する免疫化を提供することを目的とするものである。

10

【0015】

ホスホリルコリン複合体とは、好ましくは、スパーサーを介して担体と結合しているホスホリルコリン部分を意味する。構造要素ホスホリルコリンはホスホリルコリンの誘導体を含み得る。上述のように、適したホスホリルコリン複合体の例は、US 5,455,032に記載されている。例えば、US 5,455,032は、ホスホリルコリン部分が直鎖アルキルおよび種々の免疫学的担体とのアミド結合によって結合されているホスホリルコリン複合体を提供している。ホスホリルコリン複合体は、例えばヒト血清アルブミン(HSA) - もしくはキーホールリンペット(limpet)ヘモシアニン(KLH) - ホスホリルコリン複合体またはウシ血清アルブミン(BSA) - ホスホリルコリン複合体(例えば、実施例に記載されるようなもの)であり得る。PC - BSA(ホスホリルコリン - ウシ血清アルブミン)はバイオサーチ・テクノロジーズ社(Biosearch Technologies, INC)(米国、カリフォルニア州)から購入できる。HSA - BSAは化学手順、例えば以下の手順によって、結合できる：

20

【0016】

O - (4 - アミノフェニルホスホリル) - コリン(I)は、チーズブロ(Chesebro), Bによってバイオケミストリー(Biochemistry) 11, (1972) 766頁に記載された手順にしたがって、O - (4 - ニトロフェニル - ホスホリル) - コリン(シグマ(Sigma) N5879)から、触媒として炭の10%パラジウムを用い、1 atmの水素ガスで還元することによって定量的収量で調製できる。

30

【0017】

(I)は、パディリヤ(Padilla), N. D. らによってジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソツズ(Journal of Immunological Methods) 293(2004) 1~11頁に記載された手順に本質的にしたがって、MESバッファーpH4中、EDC(1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - カルボジイミド)を用いてHSAとカップリングすることができる。結合されたHSAは、pH7.4の緩衝食塩水に対する透析によって単離できる。

40

【0018】

担体は、例えば、タンパク質、脂質またはポリマーであり得る。担体は、例えば、実施例に記載されるようなラテックスビーズであり得る。

【0019】

医薬は注射による投与を意図するものであり得る。

【0020】

本発明のさらなる態様は、虚血性心臓血管疾患の治療のための免疫療法または療法のための薬剤組成物の製造における、適宜、アジュバントと組合せた、本発明の前記の態様に関連して定義される、1種以上のホスホリルコリン複合体の使用を提供する。

【0021】

50

本発明のさらなる態様は、アテローム性動脈硬化症を患っているか、虚血性心臓血管疾患を発症する危険に直面している、ヒトなどの哺乳類の予防的または治療的処置方法であって、治療上有効な量の少なくとも1種のホスホリルコリン複合体、または抗体調製物、例えばホスホリルコリン複合体に対して特異性を有するモノクローナル抗体を投与方法を提供する。

【0022】

本発明はまた、虚血性心臓血管疾患を発症する危険の増減に関連しているホスホリルコリンに対する抗体、例えばIgMまたはIgG抗体の有無を調べる方法に関する。

【0023】

本発明のさらなる態様は、虚血性心臓血管疾患を発症する危険の増減に関連している抗体、例えばIgMまたはIgG抗体の有無を、ホスホリルコリン複合体を用いて診断する方法を提供する。 10

【0024】

したがって、本発明のさらなる態様は、患者の虚血性心臓血管疾患を発症するか、虚血性心臓血管疾患が進行する危険を評価する方法であって、患者の、ホスホリルコリン複合体に反応性の抗体、例えばIgMまたはIgG抗体のレベルを評価する方法における、ホスホリルコリン複合体の使用を提供する。

【0025】

ホスホリルコリン複合体は、上記に記載されている。ホスホリルコリンはスペーサーを介して担体と結合できる。担体はタンパク質であり得、これはKLH(キーホールリンペットヘモシアニン)またはヒト血清アルブミン(HSA)であり得る。担体はラテックスビーズであり得る。 20

【0026】

患者の、ホスホリルコリン複合体に反応性の抗体、例えばIgMまたはIgG抗体のレベルは、免疫分析評価を用いて評価できる。適した免疫分析評価の例を以下に記載するが、どんな場合も当業者には明らかであろう。

【0027】

oxLDLまたはMD-LDLと反応性の抗体を測定することと、ならびにホスホリルコリン複合体に反応性の抗体、例えばIgMまたはIgG抗体を測定することが望ましい場合がある。あるいはまたはさらに、(実施例に論じられるように)HSP70、HDL、TNFおよび/またはHSP60のレベルを測定することと、ならびにホスホリルコリン複合体に反応性の抗体、例えばIgMまたはIgG抗体を測定することが望ましい場合がある。 30

【発明を実施するための最良の形態】

【0028】

以下に開示する実施例は、単に本発明を例示する目的で提供されるものであって、添付の特許請求の範囲に概説される範囲の何らかの制限と考えるはならない。本明細書において記載された文書は、参照により本明細書に組込まれる。

【0029】

虚血性心臓血管疾患を発症する危険の増減と関連している、ホスホリルコリンに対するIgM抗体の有無(またはレベル)を調べる方法の一例を記載する。当技術分野で公知の他の方法も使用できる。同様の方法を用いてホスホリルコリンに対するIgG抗体の有無(またはレベル)を調べることができる。 40

【0030】

ホスホリルコリンに対するIgM抗体の有無を調べる方法

PC-BSAに対するIgM抗体を、酵素結合免疫測定法によって調べた。

【0031】

マイクロタイタープレートをリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に入れたPC-BSA(10µg/ml;例えばバイオサーチ・テクノロジー社(Biosearch Technologies, INC)(米国、カリフォルニア州)製)でコーティングした。 50

【0032】

PBSで洗浄した後、2%BSA溶液でプレートをブロッキングした。血清サンプルは0.2%BSA-PBSで希釈した(1:30)。プレートを40℃で一晩インキュベートし、洗浄した。アルカリホスファターゼ標識ヤギ抗ヒトIgM(サンプルバッファーで1:7000希釈したもの)を100μl/ウェル(well)で加え、40℃で一晩インキュベートした。洗浄後、アルカリホスファターゼ基質を加え、プレートを室温、暗所で60分間インキュベートすることによって色を発現させた。吸光度は分光光度計において405nmで読み取った。

【0033】

ホスホリルコリンに対して種々の担体およびスペーサーを試験した。例示した担体はこれらに制限するものではない。その他のタンパク質、脂質またはポリマー、例えば当技術分野で公知であるラテックスビーズなどのその他の担体も使用できる。担体は、上述のようにUS5,455,032に開示されている。

10

【0034】

本発明の方法によって検出されるIgMまたはIgG抗体はまた、PCが露出しているPC含有化合物中、例えばリゾホスファチジルコリン(リゾPC;例えば、キム(Kim)ら、ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン(Journal of Experimental Medicine)、2002年9月2日、196(5)、655~65頁参照)中に存在するホスホリルコリン(PC)と結合できる。したがって、本発明の方法は、リゾホスファチジルコリンと結合するIgMまたはIgG抗体を検出できる。

20

【0035】

ホスホリルコリン複合体の合成および薬剤組成物の調製

ラテックスビーズ(0.20μmまたは0.81μm)をPBSに懸濁し、ホスホリルコリン-BSAの10μg/ml溶液と一晩混合した。次いで、このビーズを遠心分離し、バッファーで数回洗浄し、BSAの10μg/ml溶液でブロッキングした。さらに洗浄を反復した後、ビーズに適したバッファーで適した濃度に再懸濁し、使用まで冷蔵保存した。

【0036】

リンカーアームを有するホスホリルコリンはまた、ジアゾフェニル基を介してKLH(キーホールリンペットヘモシアニン)に結合できる。チーズボロ(Chesebro), Bおよびメツガー(Metzger), H、(1972)バイオケミストリー(Biochemistry)11:776頁にしたがい、PCのp-ニトロフェニル-6-(O-ホスホコリン)ヒドロキシヘキサノエート誘導体を合成できることがより好ましい。p-ニトロフェニル-6-(O-ホスホコリン)ヒドロキシヘキサノエートは、これをKLHに添加する直前に乾燥アセトニトリルに溶解した(100mg/ml)。誘導体およびKLHを4℃で一晩混合し、次いで、結合していないスペーサーと脱離基であるp-ニトロフェニレート透析して除去した。

30

【0037】

適したバッファーに懸濁した、調製したホスホリルコリン複合体の注射溶液は、免疫化に直接使用できる。

40

【0038】

ホスホリルコリン複合体での免疫化

200μg[p-ニトロフェニル-6-(O-ホスホコリン)ヒドロキシヘキサノエート-KLH]腹腔内で免疫化した後にBALB/cマウスから得た血漿において、提案された免疫分析評価法を用い、ホスホリルコリンを認識する高力価のIgM抗体を調べた。

【0039】

ホスホリルコリン複合体に対するモノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、当技術分野で公知のいずれかの標準的な方法を用いて作製できる。例えば、「ブリルス(Briles) DE、フォアマン(Forman) C、ヒュダック(Hudak) S、クラフリン(Claflin) JL、T15インディオタイプの抗ホスホリルコリン

50

ン抗体はストレプトコッカス肺炎に対し最適に保護する (Anti-phosphorylcholine antibodies of the T15 idiotype are optimally protective against Streptococcus pneumoniae)。ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン (Journal of Experimental Medicine)、1982、156、1177～85頁」または「モノクロナル抗体に結合している T15 PC は、IgM から IgG に変換されたときに特異性を維持する (T15 PC binding monoclonal antibodies retain specificity when they switch from IgM to IgG)。スピラ, ギャド (Spira, Gad)、アギラ, ヘクター (Aguila, Hector) L、シャーフ, マシュー (Scharff, Matthew) D. テクニオン - イスラエル工科大学、医学部 (Fac. Med., Technion-Israel Inst. Technol.)、イスラエル、ハイファ、ジャーナル・オブ・イムノロジー (Journal of Immunology) (1988)、140(8)、2675～80頁。

【0040】

ホスホリルコリン複合体に対するその他の抗体は当業者に周知の方法を用いて調製できる。例えば、以下に記載のように、例えば、ホスホリルコリン複合体を用いるアフィニティ精製によって、ヒト免疫グロブリン製剤の a PC 活性を有するサブフラクションを調製できる。静脈内免疫グロブリン投与製剤 (例えば、IGIV; バクスター (Baxter) 他) は、市販されている IgG の高度に精製された製剤であり、抗体産生がないか、抗体産生レベルが極めて低い患者の治療に用いられている。免疫グロブリン製剤としては、以下の製造業者から入手できるものが挙げられる; バクスター (Baxter) (米国) 例えばガンマガード (Gammagard) (登録商標)、イシベン (Isiven) (イタリア、アンティモナプレス (Antimo Naples))、オムリックス (Omrix) (イスラエル、テルアシヨメル (Tel-Hashomer))、マイルス (Miles) (生化学製品部門 (Biological Products Division)、コネチカット州、ウェストヘブン)、スクラボ (Sclavo) (イタリア、ルッカ)、サンド (Sandoz) (スイス、バーゼル、ノバウティス (Novartis))、例えばサンドグロブリン (Sandoglobulin) (登録商標)、ピオテスト・ダイアグノスティック社 (Biotest Diagnostic Corporation) (ニュージャージー州、ダビール (Deville))。免疫グロブリン製剤の例としては、ガンマガード (Gammagard) S/D (登録商標)、ガンマー (Gammar) IV (登録商標)、ガンマー (Gammar) -PIV (登録商標)、ガムイミュン (Gammimune) N (登録商標)、イベガム (Iveegam) (登録商標)、パングロブリン (Panglobulin) (登録商標)、ポリガム (Polygam) S/D (登録商標)、サンドグロブリン (Sandoglobulin) (登録商標)、ベノグロブリン (Venoglobulin) (登録商標) がある。免疫グロブリン製剤は、通常、数種の IgM ならびに IgG を含む。ガンマーガード (Gammagard) (登録商標) 中には微量の IgM が存在する。ペンタグロビン (ピオテスト (Biotest)) は、SARS の治療に用いられている濃縮 IgM 製剤である。a PC 活性を有するサブフラクションは IgG と IgM の双方を含む場合もあり、または主に IgG を含むよう選択することもでき (例えば、ガンマーガード (Gammagard) (登録商標) などの IgG が豊富な製剤で出発することによって、および/または IgG について選択することによって)、もしくは主に IgM を含むよう選択することもできる (例えば、ペンタグロビンなどの IgM が豊富な製剤で出発することによって、および/または IgM について選択することによって)。

【0041】

ホスホリルコリン複合体に対して特異性を有する抗体調製物は、結合していないホスホリルコリンと結合し、また、PC が露出している PC 含有化合物中に、例えば、リゾホスファチジルコリン (リゾPC; 例えば、キム (Kim) ら、ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン (Journal of Experimental Medicine)、2002年9月2日、196(5)、655～65頁参照) 中に存在するホスホリルコリン (PC) とも結合し得る。したがって、ホスホリルコリン複合体に対して特異性を有する抗体調製物は、また、リゾホスファチジルコリンと結合し得る。

【0042】

アテローム性動脈硬化症の被験体における I g M 免疫グロブリンレベル

高血圧症の被験体（拡張期血圧 > 95 mmHg）において、ホスホリルコリンに対する I g M 自己抗体レベルを、ベースラインおよび 4 年後にアテローム性動脈硬化症の危険因子の相関研究において調べた。結果を以下に要約する。

【0043】

登録時に 77 人の被験体（35%）で、4 年後の追跡調査では 84 人の被験体（38%）で頸動脈プラークが検出された。この研究には全部で 218 人のヒト被験体があった。追跡調査時の内膜 - 中膜肥厚（IMT）の増加は、登録の時点で PC に対する I g M の高血清レベルを有する被験体（75 または 90 パーセント）ではあまり広まっていなかった。IMT が増加した個体と IMT が低下した個体間の I g M 抗ホスホリルコリン抗体レベルの平均値間には有意な相違がある（ 638.8 ± 219.6 対 734.8 ± 266.9 、 $p = .004$ ）。

【0044】

PC に対する I g M 自己抗体と IMT の変化の関係は、年齢、喫煙習慣、アテノロールまたはラシジピン（lacidipine）での治療および血中脂質とは無関係であった。I g M 自己抗体はまた I g G 値とも無関係であった。

【0045】

したがって、本発明の一実施形態は、アテローム性動脈硬化症の治療または予防に用いられる薬剤組成物の調製のために、ホスホリルコリン複合体を使用することである。複合体は、タンパク質またはポリマーに結合したホスホリルコリンであり得る。薬剤組成物は注射によって与えられることが好ましい。

【0046】

能動免疫化という提案される方法は、自己抗体力価を調節し、これが順にアテローム性動脈硬化症の発症に対して正の作用を有することとなる。

【0047】

本発明のもう 1 つの実施形態は、アテローム性動脈硬化症の治療または予防に用いられる薬剤組成物の調製のために、ホスホリルコリン複合体を認識する抗体調製物、例えば、モノクローナル抗体を使用することである。モノクローナル抗体は当技術分野で公知の方法を用いて作製できる。

【0048】

本発明のさらなる実施形態は、ホスホリルコリン複合体を用いて、ホスホリルコリンに対する抗体、例えば I g M または I g G 抗体の有無を診断する方法を提供することであり、この因子は虚血性心臓血管疾患を発症する危険の増減と関連している。好ましい方法は免疫分析評価である。この方法は、患者の、虚血性心臓血管疾患を発症するか、虚血性心臓血管疾患が進行する危険の評価に使用できる。

【実施例】

【0049】

被験体

血清サンプルは、226 人の確立した高血圧症の被験体（拡張期血圧 > 95 mmHg）から得、その後、それらをアテローム性動脈硬化症に対する欧州のラシジピン研究（the European Lacidipine Study on Atherosclerosis）（ELSA）²⁵、²⁶ のスウェーデン成分に登録した。サンプルは、測定されるパラメーターに対する治療の作用を最小にするために、投薬を全くしない 4 週間の休薬期間の後に集めた。血圧、コレステロールおよびトリグリセリドレベルを先に記載された通りに調べた²⁵、²⁶。その後、115 人の被験体を遮断薬アテノロールでの処置に割り当て、111 人の被験体をカルシウムアンタゴニストラシジピンでの処置に割り当てた。この研究はカロリンスカ病院（Karolinska Hospital）の倫理委員会によって承認され、ヘルシンキ宣言にしたがって実施した。すべての被験体にはインフォームドコンセントを与えた。

【0050】

10

20

30

40

50

頸動脈超音波

頸動脈超音波測定を実施し、他で詳細に記載された通りに分析した²⁵、²⁶。ベースラインおよび4年後追跡調査で全部で218人の患者が有効な超音波測定値を有していた。簡単に言えば、8.0MHz環状アレイトランスデューサーを用いるBio-sound 2000 IIAデュプレクス(duplex)スキャナーで、左右の頸動脈を調べた。奥の壁において、内膜-中膜(I-M)肥厚を、内腔-内膜エコーの前縁と中膜-外膜エコーの前縁間の距離として測定した。アテローム性動脈硬化症の代用指標としての結果判定は、4年後追跡調査での末梢側総頸動脈と頸動脈両側分岐部中の4箇所奥の壁の平均最大内膜-中膜肥厚(IMT)の変化(CBMMax)とした。研究に登録した時点でのPCに対する抗体レベルと、4年後追跡調査時のIMTの増減の間の関連を評価した。

10

【0051】

試薬

ポリソープ(Polysorp)F96マイクロタイターイムノプレートはヌンク(Nunc)(デンマーク、ロスキレ)から購入し、PC-BSA(ホスホリルコリン-ウシ血清アルブミン)はバイオサーチ・テクノロジーズ社(Biosearch Technologies, INC)(米国)から購入した。

【0052】

ウシ血清アルブミン(BSA)、アルカリホスファターゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(r鎖特異的)、アルカリホスファターゼ標識ヤギ抗ヒトIgM(u鎖特異的)、PNPP(アルカリホスファターゼ基質)はシグマ(Sigma)(米国、ミズーリ州、セントルイス)から入手した。カルジオリピン(CL)はAVANTT(米国)から購入し、₂糖タンパク質(₂GP1)はカルバイオケム(Calbiochem)(米国)から入手した。

20

【0053】

総IgGおよびIgMレベルは、先に記載されているような慣例の技術によって求めた⁶。

【0054】

CRPは、血清において、粒子増感された免疫比濁分析(ベイリング・ネフェロメーター・アナライザー(Behring Nephelometer Analyzer)、BN II(デイドベイリング社(Dade Behring GmbH)、ドイツ、マルブルク))を用いる高感度法によって分析し、アンチイア(antir)分析評価変動<4%であった。

30

【0055】

PC、oxLDLおよびMDA-LDLに対する自己抗体の測定

PC-BSAに対するIgGおよびIgM抗体を、酵素結合免疫測定法(ELISA)によって調べた。17人の抗リン脂質症候群の患者から得たプールした血清を、内部標準として用い、プレート毎に試験した。抗体結合のプラトーは10μg/mlという抗原濃度で到達した。したがって、F96マイクロタイターポリソープ(polysorp)プレートを、PBS中PC-BSA(10μg/ml)50μgウェルでコーティングした。コーティングしたプレートを4で一晩インキュベートした。PBSで5回洗浄した後、2%BSA-PBSを用い、室温で2時間プレートをブロックし、上記のように洗浄した。血清サンプルは0.2%BSA-PBSで希釈(1:30)し、50μl/ウェルで加えた。

40

【0056】

LDLは、記載されたように⁶、健全なドナーの血漿から連続分離超遠心によって単離し、銅イオンの使用によって酸化させるか(OxLDL)、MDAを用いて誘導体化した(MDA-LDL)。

【0057】

OxLDLおよびMDA-LDLは、本質的には記載されたように⁶ELISAによって測定した。OxLDLまたはMDA-LDLはコーティングバッファー(炭酸-重炭酸バッファー50mM pH9.7)で2μg/mlに希釈し、100μl/ウェルを用いて

50

E L I S A プレート (コスター (Costar) 2 5 8 1) をコーティングした。このプレートを 4 で一晩維持し、P B S で 4 回洗浄し、次いで、P B S 中 2 0 % 成体ウシ血清 (2 0 % A B S - P B S) を用い、室温で 2 時間ブロッキングした。次いで、それらを、2 0 % A B S - P B S で 1 : 3 0 希釈した 1 0 0 μ l の血清とともに 4 で一晩インキュベートした。

【 0 0 5 8 】

プレートを 4 で一晩インキュベートし、上記のように洗浄した。アルカリホスファターゼ標識ヤギ抗ヒト I g G (サンプルバッファーで 1 : 9 0 0 0 希釈したもの) およびアルカリホスファターゼ標識ヤギ抗ヒト I g M (サンプルバッファーで 1 : 7 0 0 0 希釈したもの) を、1 0 0 μ l / ウェルで加え、4 で一晩インキュベートした。5 回洗浄した後、アルカリホスファターゼ基質 (P N P P) を 1 0 0 μ l / ウェルで加え、プレートを室温、暗所で 6 0 分間インキュベートすることによって色を発現させた。プレートは、E L I S A マルチスキャンプラススペクトロフォトメーター (Multiskan Plus spectrophotometer) において 4 0 5 n m で読み取った。すべてのサンプルを単一の分析評価したところ、変動係数は 1 0 ~ 1 5 % より小さかった。

【 0 0 5 9 】

抗ホスホリルコリン - B S A 抗体の特異性

抗ホスホリルコリン - B S A の特異性を調べるために、プールした高力価血清を使用することによって吸収分析評価を実施した。P C - B S A との最大結合の 5 0 % を生じる希釈で、高力価血清を、種々の濃度の P C - B S A とともにプレインキュベートした。ボルトックス処理した後、試験管を 4 0 で一晩インキュベートし、1 3 0 0 0 r . p . m . で 3 0 分間 (4 0) 遠心分離した。上清を、記載したように P C - B S A との抗体結合について調べた。阻害のパーセンテージは以下のように算出した：

【 0 0 6 0 】

阻害パーセント = (競合物のない O D - 競合物のある O D) \times 1 0 0 / 競合物のない O D

【 0 0 6 1 】

統計分析

抗ホスホリルコリンレベルを 7 5 パーセンタイルと 9 0 パーセンタイルで二分した。示したように、ロジスティック回帰分析およびオッズ比 (O R) の算出および 9 5 % 信頼区間 (C I)、またはスピアマン相関を用いる比較を用いて、I M T の増加 (はいまたはいいえ) を評価することによって、抗ホスホリルコリン (またはその他の抗体) と 4 年間にわたるアテローム性動脈硬化症の進行の間の関連を調べた。年齢、喫煙習慣、血清コレステロール、血清トリグリセリドおよび抗高血圧治療の様式 (ラシジピン、アテノロール) をはじめ、可能性ある交絡因子について調製を行った。両側 p 値 < 0 . 0 5 を有意と考えた。

【 0 0 6 2 】

結果

研究に登録した時点での被験体の基本特性は他で詳細に記載されており (ポックレー (Pockley) ら (2 0 0 3) ハイパーテンション (Hypertension) 4 2、2 3 5 ~ 2 3 8 頁)、表 1 に示す。

【 0 0 6 3 】

競合研究は、I g M および I g G サブクラスの a P C は、P C - B S A とともにプレインキュベーションすることによって競合されたが、カルジオリピンは弱い競合能しか有しておらず、ホスファチジルセリンは競合能を有していなかったことを示す (図 1 a、1 b)。2 - 糖タンパク質 I は P C - B S A との I g G 結合について、ある程度まで競合したが、I g M についてはそれほどではなかった (図 1 a、1 b)。P C - B S A は、調べた他の抗原とは競合して結合する低い能力しか有していなかった (データは示していない)。O x L D L および M D A - L D L は P C - B S A との I g M a P C の結合に競合し得、また、I G G a P C の結合にも同程度までではないが競合し得た (図 2 a、2 b)。

10

20

30

40

50

【0064】

追跡調査時のIMTの増加は、登録の時点でPC(75または90パーセントイル)、oxLDLおよびMDA-LDL(90パーセントイル)に対するIgMの血清レベルが高い被験体ではあまり広まっていなかったが、CRPはIMT変化と関連がなかった(表2)。

【0065】

ロジスティック回帰分析により、PC、oxLDLおよびMDA-LDLに対するIgM自己抗体とIMTの変化の関係は、年齢、喫煙習慣、アテノロールまたはラシジピンでの治療および血中脂質とは無関係であったということが示された。aPC IgMはまた、75パーセントイルと90パーセントイルの双方でIMTの変化と有意に関連していたが、IgMサブクラスのアOxLDLおよびaMDA-LDLは、90パーセントイルでしか有意性を示さなかった(表3a~d)。IgM自己抗体はIgG値とも無関係である(データは示していない)。さらに、全IgGおよびIgMレベルはIMT測定値または変化と関連していなかった(データは示していない)。

10

【0066】

IMTが増加した被験体ではPCに対するIgG自己抗体は傾向的に低かったが、この相違は統計的な有意性には達しなかった。(表2)。

【0067】

男性と女性のaPC、aMDA-LDLおよびaOxLDLのIgMサブクラス間には著しい相違があり、男性においてよりも女性において有意に高かった($p < 0.05$)。対照的に、これらの自己抗体のIgGレベルには男性と女性の間で相違はなかった。さらに、女性はベースラインおよび追跡調査時のプラークの発生が有意に低かった($p < 0.05$)。

20

【0068】

aPC IgMレベルはIMTの増加と負に相関しており($Rho = 0.18$ 、 $p = 0.006$)、対照的に2種の他の保護因子、HDLおよびHSP70は、連続測定時のIMT変化と相関していなかった(データは示していない)。aPC IgMとは異なり、これらの測定ではaOxLDLおよびaMDA-LDLはこれらの有意性に到達しなかった(データは示していない)。

【0069】

aPC IgMレベルとaOxLDL IgM($Rho = 0.74$ 、 $p < 0.001$)およびaMDA-LDL IgM($Rho = 0.51$ 、 $p < 0.001$)の間には有意な関連があった。同様にaPCは、HSP60($Rho = 0.28$ 、 $p < 0.001$)、HSP70($Rho = 0.35$ 、 $p < 0.001$)と相関があり、これらは本発明者らがこのコホートにおけるヒトアテローム性動脈硬化症の新規保護因子として最近記載し(Pockleyら(2003)前掲)、またHDLとも相関があった($Rho = 0.23$ 、 $p < 0.01$)。aPC IgM、aOxLDL IgMまたはaOxLDL、MDA-LDLおよびLDL、CRPまたはトリグリセリド間には関連はなかった(データは示していない)。

30

【0070】

年齢、総コレステロール、トリグリセリド、喫煙および治療について制御しつつ、男性および女性について別個のロジスティック回帰分析を行った場合、IgM aPCはそれぞれ、女性においては90パーセントイルを調べた場合にのみ有意な保護作用を示し($EXP(B) = .17$ 、 $95\%CI = 0.05 \sim .68$; $p = 0.01$)、男性では75パーセントイルを調べた場合にのみ有意な保護効果を示した(それぞれ、 $EXP(B) = .18$ 、 $95\%CI = 0.04 \sim .74$; $p = 0.01$)。

40

【0071】

MDA-LDLおよびoxLDLに対するIgMは、女性の値のみが独立に統計的に有意に達したのでこの点において異なっている。したがって、年齢、総コレステロール、トリグリセリド、喫煙および治療について制御しつつ、男性および女性について別個のロジ

50

スティック回帰分析を行った場合に、MDA-LDLに対するIgMおよびoxLDLに対するIgMは女性では有意な保護作用を示したが（それぞれ、EXP(B) = 17、95%CI = .05 ~ .68、p = 0.01およびEXP(B) = .18、95%CI = .04 ~ .74、p = 0.01）、男性の間では作用は有意性に達せず（それぞれ、EXP(B) = .60、95%CI = .15 ~ 2.2、p = 0.44およびEXP(B) = .39、95%CI = .10 ~ 1.5、p = 0.17）、このことはoxLDLに対する、およびMDA-LDLに対する高いIgM力価は女性の間で特異的に保護的であり得るということを示す。

【0072】

【表1】

10

登録時の研究群の基本特性。結果は平均(SD)またはパーセンテージ(%)および脂質についてはmg/dLとして示されている。

	トータル (N=226)	アテノロール (N=115)	ラシジピン (N=111)
年齢 (歳)	57.7(7.8)	57.6(7.6)	57.7(7.9)
性別 (男性%)	50	46	53
BMI	26.7(3.7)	26.3(3.3)	27.1(3.9)
総コレステロール	232.4(37.8)	233.5(38.1)	231.4(37.4)
HDL	55.6(27.6)	56.5(25.8)	54.7(27.6)
LDL	149.4(37.8)	149.7(37.1)	149.2(38.6)
トリグリセリド	131.6(58.2)	128.6(57.0)	134.7(59.5)

20

【0073】

30

【表 2】

ホスホリルコリン（PC）に対する I g G および I g M 自己抗体のベースラインレベル
 についての、I M T の変化の未調製予測

変数	オッズ比	(95%CI) 下側	上側	P
	75 パーセントイル			
aPC (IgG)	.60	.32	1.1	.10
aPC (IgM)	.46	.25	.85	.01
aOxLDL (IgG)	1.2	.64	2.3	.57
aOxLDL (IgM)	.77	.41	1.4	.40
aMDA-LDL (IgG)	.80	.43	1.5	.48
aMDA-LDL (IgM)	.67	.36	1.2	.18
C-反応性タンパク質	.80	.43	1.5	.46
	90 パーセントイル			
aPC (IgG)	.60	.25	1.4	.24
aPC (IgM)	.36	.15	0.87	.024
aOxLDL (IgG)	.94	.38	2.31	.90
aOxLDL (IgM)	.27	.11	.69	.006
aMDA-LDL (IgG)	.63	.26	1.5	.30
aMDA-LDL (IgM)	.27	.11	.69	.006
C-反応性タンパク質	.60	.24	1.4	.24

10

20

30

【 0 0 7 4 】

【表 3 a】

確立された高血圧症の被験体における、ベースラインの a P C I g M 自己抗体の 75 パーセントイルを用いる 4 年間にわたる MT の変化の予測

モデルにおける変数	係数 (B)	推定オッズ比 E x p (B)	P	95% C I	
				下側	上側
喫煙	-0.1	.99	.95	.66	1.5
性別	-.05	.95	.87	.54	1.4
総コレステロール	.003	1.0	.45	.99	1.0
血漿トリグリセリド	-.001	.99	.63	.99	1.0
年齢 (歳)	.01	1.0	.59	.97	1.0
治療 (A/L)	-.23	.79	.40	.45	1.4
A P C I g M	-1.0	.37	.0027	.15	.89

10

20

【0075】

【表 3 b】

確立した高血圧症の被験体における、a P C I g M 自己抗体の 90 パーセントイルを用いる 4 年間にわたる IMT の変化の予測

モデルにおける変数	係数 (B)	推定オッズ比 E x p (B)	P	95% C I	
				下側	上側
喫煙	-0.2	.97	.90	.65	1.5
性別	-.005	1.0	.98	.56	1.8
総コレステロール	.003	1.0	.42	.99	1.0
血漿トリグリセリド	-.001	0.99	.67	.99	1.0
年齢 (歳)	.003	1.0	.87	.97	1.0
治療 (A/L)	-.22	.80	.43	.46	1.4
a P C I g M	-.77	.46	.017	.24	.87

30

40

【0076】

【表 3 c】

確立された高血圧症の被験体における、OxLDLに対するIgM自己抗体およびその他の危険因子に関して90パーセントイルを用いる4年間にわたるIMTの変化の予測

モデルにおける変数	係数 (B)	推定オッズ比 Exp (B)	P	95%CI	
				下側	上側
喫煙	-.01	.99	.95	.66	1.5
性別	.001	1.1	.98	.56	1.8
総コレステロール	.001	1.0	.72	.99	1.1
血漿トリグリセリド	-.001	1.0	.71	.99	1.0
年齢 (歳)	.01	1.0	.60	.97	1.1
治療 (A/L)	-.28	.77	.35	.44	1.3
aOxLDL IgM	-1.3	.26	.008	.11	.72

10

20

【0077】

【表 3 d】

確立された高血圧症の被験体における、MDA-LDLに対するIgM自己抗体およびその他の危険因子に関して90パーセントイルを用いる4年間にわたるIMTの変化の予測

モデルにおける変数	係数 (B)	推定オッズ比 Exp (B)	P	95%CI	
				下側	上側
喫煙	-.07	0.93	.73	.62	1.4
性別	-0.01	.99	.99	.56	1.7
総コレステロール	0.001	1.0	.78	.99	1.0
血漿トリグリセリド	-.001	.99	.74	.99	1.1
年齢 (歳)	0.01	1.0	.54	.97	1.0
治療 (A/L)	-.27	.76	.34	.44	1.3
aMDM-LDL IgM	-1.1	.31	.01	.12	.79

30

40

【0078】

参照文献

1. フロストガード (Frostegard) J、ウルフグレン (Ulfgren) A K、ニーベリ (Nyberg) P、ヘディン (Hedin) U、スウェーデンボリ (Swedenborg) J、アンダーソン (Andersson) U、ハンソン (Hansson) G K。Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1)

50

- and macrophage- stimulating cytokines. アテロスクレロシス (Atherosclerosis) 1999、145、33～43頁。
2. バインダー (Binder) C J、チャン (Chang) M K、ショー (Shaw) P X、ミラー (Miller) Y I、ハートビグセン (Hartvigsen) K、デワン (Dewan) A、ウィツタム (Witztum) J L。Innate and acquired immunity in atherogenesis. ネイチャー・メディシン (Nature Medicine) 2002、8、1218～26頁。
3. フロストガード (Frostegard) J。Autoimmunity, oxidized LDL and cardiovascular disease. オートイムニティー・レビューズ (Autoimmunity Reviews) 2002、1、233～7頁。 10
4. パリンスキ (Palinski) W、ミラー (Miller) E、ウィツタム (Witztum) J L。Immunization of low density lipoprotein (LDL) receptor-deficient rabbits with homologous malondialdehyde-modified LDL reduces atherogenesis. プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミック・サイエンス・オブ・ユーエスエー (Proceedings of National Academic Science of USA) 1995、92、821～5頁。
5. スー (Xu) Q、ディートリッヒ (Dietrich) H、ステイナー (Steiner) H J、ゴーン (Gown) A M、シェル (Schoel) B、ミクツ (Mikuz) G、カウフィナン (Kaufmann) S H、ウィック (Wick) G。Induction of arteriosclerosis in normocholesterolemic rabbits by immunization with heat shock protein 65. アルテリオスクレロシス・アンド・トロンボシス (Arteriosclerosis and Thrombosis)、1992、12、789～99頁。 20
6. ウー (Wu) R、デ・フェア (de Faire) U、レムン (Lemne) C、ウィツタム (Witztum) J L、フロストガード (Frostegard) J。Autoantibodies to OxLDL are decreased in individuals with borderline hypertension. ハイパーテンション (Hypertension)、1999、33、53～9頁。
7. ヒュルテ (Hulthe) J、ウィクランド (Wiklund) O、ハート - カメジヨ (Hurt-Camejo) E、ボンジャーズ (Bondjers) G。Antibodies to oxidized LDL in relation to carotid atherosclerosis, cell adhesion molecules, and phospholipase A(2). アルテリオスクレロシス・トロンボシス・バスキュラー・バイオロジー (Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology)、2001、21、269～74頁。 30
8. カルボネン (Karvonen) J、パイバンサロ (Paivansalo) M、ケサニエミ (Kesaniemi) Y A、ホルコ (Horkko) S。Immunoglobulin M type of autoantibodies to oxidized low-density lipoprotein has an inverse relation to carotid artery atherosclerosis. サーキュレーション (Circulation) 2003、108、2107～12頁。
9. ベルグマーク (Bergmark) C、ウー (Wu) R、デ・フェア (de Faire) U、レフバート (Lefvert) A K、スウェーデンボリ (Swedenborg) J。Patients with early-onset peripheral vascular disease have increased levels of autoantibodies against oxidized LDL. アルテリオスクレロシス・トロンボシス・バスキュラー・バイオロジー (Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology)、1995、15、441～5頁。 40

10. サロネン (Salonen) J T、イラーヘルツアラ (Ylä-Herttuala) S、ヤマモト R、バトラー (Butler) S、コルペラ (Korpela) H、サロネン (Salonen) R、ニソネン (Nyyssönen) K、パリンスキ (Palinski) W、ウィツタム (Witztum) J L. Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *ランセット (Lancet)*、1992、339、883～887頁。

10

11. スベナングソン (Svenungsson) E、ジェンセン - ウルスタド (Jensen-Urstad) K、ヘイルンバーガー (Heilnburger) M、シルベイラ (Silveira) A、ハムステン (Hamsten) A、デ・フェア (de Faire) U、ウィツタム (Witztum) J L、フロストガード (Frostegard) J. Risk factors for cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus. *サーキュレーション (Circulation)*、2001、104、1887～93頁。

12. フロストガード (Frostegard) J、ウー (Wu) R、ギスコンベ (Giscombe) R、ホルム (Holm) G、レフパート (Lefvert) A K、ニルソン (Nilsson) J. Induction of T-cell activation by oxidized low density lipoprotein.

アルテリオスクレロシス・アンド・トロンボシス (Arteriosclerosis and Thrombosis) 1992、12、461～7頁。

20

13. シュテメ (Stemme) S、ファーバー (Faber) B、ホルム (Holm) J、ウィクランド (Wiklund) O、ウィツタム (Witztum) J L、ハンソン (Hansson) G K. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミック・サイエンス・オブ・ユーエスエー (Proceedings of National Academic Science of USA)* 1995、92、3893～7頁。

14. ベルリナー (Berliner) J A、テリト (Territo) M C、セバニアン (Sevanian) A、ラミン (Ramin) S、キム (Kim) J A、バムシャド (Bamshad) B、エスターソン (Esterson) M、フォーゲルマン (Fogelman) A M. Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション (Journal of Clinical Investigation)* 1990、85、1260～6頁。

30

15. フロストガード (Frostegard) J、ニルソン (Nilsson) J、ヘゲルストランド (Haegerstrand) A、ハムステン (Hamsten) A、ウィグゼル (Wigzell) H、ギドランド (Gidlund) M. Oxidized low density lipoprotein induces differentiation and adhesion of human monocytes and the monocytic cell line U937. *プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミック・サイエンス・オブ・ユーエスエー (Proceedings of National Academic Science of USA)* 1990、87、904～8頁。

40

16. フロストガード (Frostegard) J、ヘゲルストランド (Haegerstrand) A、ギドランド (Gidlund) M、ニルソン (Nilsson) J. Biologically modified LDL increases the adhesive properties of endothelial cells. *アテロスクレロシス (Atherosclerosis)* 1991、90、119～26頁。

17. フェイ (Fei) G Z、ファン (Huang) Y H、スウェーデンボリ (Swedenborg) J、フロストガード (Frostegard) J. Oxidised LDL modulates immune-activation by an IL-12 dependent mechanism. *アテロスクレロシス (Atherosclerosis)* 2003、169、77～85頁。

18. ボチコフ (Bochkov) V N、カドル (Kadl) A、ヒューバー (Huber) J、グルバー (Gruber) F、バインダー (Binder) B R、レイティンガー (Leitinger) N. Protecti

50

ve role of phospholipid oxidation products in endotoxin-induced tissue damage. *ネイチャー* 2002、419、77～81頁。

19. フロストガード (Frostegard) J、ファン (Huang) Y H、ロネリッド (Ronnelid) J、シェーファー - エリンダー (Schafer-Elinder) L。Platelet-activating factor and oxidized LDL induce

immune activation by a common mechanism. *アルテリオスクレロシス・トロンボシス・バスキュラー・バイオロジー* (Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology) 1997、17、963～8頁。

20. ヒーリー (Heery) J M、コザック (Kozak) M、スタフォリニ (Stafforini) D M、ジョーンズ (Jones) D A、ジンマーマン (Zimmerman) G A、マッキンタイア (McIntyre) T M、プレスコット (Prescott) S M。Oxidatively modified LDL contains phospholipids with platelet-activating

factor-like activity and stimulates the growth of smooth cells. *ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション* (Journal of Clinical Investigation) 1995、96、2322～30頁。

21. サバナグンダー (Subbanagounder) G、レイティンガー (Leitinger) N、シー (Sih) P T、ファウル (Faul) K F、ベルリナー (Berliner) J A。Evidence that phospholipid oxidation products and/or platelet-activating factor play an important role in early atherogenesis: in vitro and In vivo inhibition by WEB 2086.

サーキュレーション・リサーチ (Circulation Research) 1999、85、311～8頁。

22. ハーネット (Harnett) W、ハーネット (Harnett) M M。Phosphorylcholine: friend or foe of the immune system? *イムノロジー・トゥデイ* (Immunology Today) 1999、20、125～9頁。

23. ショー (Shaw) P X、ホルコ (Horkko) S、チャン (Chang) M K、カーティス (Curtiss) L K、パリンスキ (Palinski) W、シルバーマン (Silverman) G J、ウィツタム (Witztum) J L。Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance,

and protective immunity [注釈参照]。 *ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション* (Journal of Clinical Investigation) 2000、105、1731～40頁。

24. バインダー (Binder) C J、ホルコ (Horkko) S、デワン (Dewan) A、チャン (Chang) M K、キュウ (Kieu) E P、グッドイヤー (Goodyear) C S、ショー (Shaw) P X、パリンスキ (Palinski) W、ウィツタム (Witztum) J L、シルバーマン (Silverman) G J。Pneumococcal vaccination decreases atherosclerotic lesion formation: molecular mimicry between *Streptococcus pneumoniae* and oxidized LDL. *ネイチャー・メディシン* (Nature Medicine) 2003、9、736～43頁。

25. ザンチェッティ (Zanchetti) A、ボンド (Bond) M G、ヘニング (Hennig) M、ネイス (Neiss) A、マンシア (Mancia) G、ダル・パル (Dal Palu) C、ハンソン (Hansson) L、マグナニ (Magnani) B、ラーン (Rahn) K H、レイド (Reid) J、ロディシオ (Rodicio) J、セイファー (Safar) M、エッケス (Eckes) L、ラビネット (Ravinetto) R。Risk factors associated with alterations in carotid intima-media thickness in hypertension: baseline data from the European Lacidipine Study on Atherosclerosis. *ジャーナル・オブ・ハイパーテンション* (Journal of Hypertension) 1998、16、949～61頁。

26. ザンチェッティ (Zanchetti) A、ボンド (Bond) M G、ヘニング (Hennig) M、ネイス (Neiss) A、マンシア (Mancia) G、ダル・パル (Dal Palu) C、ハンソン (Hansson) L、マグナニ (Magnani) B、ラーン (Rahn) K H、レイド (Reid) J L、ロディ

10

20

30

40

50

シオ (Rodicio) J、セイファー (Safar) M、エッケス (Eckes) L、リジニ (Rizzini) P。 Calcium antagonist lacidipine slows down progression of asymptomatic carotid atherosclerosis: principal results of the European Lacidipine Study on Atherosclerosis (ELSA), a randomized, double-blind, long-term trial. サーキュレーション (Circulation) 2002、106、2422 ~ 7頁。

【0079】

PCの保護作用を示す研究

マルメ (Malmo) の観察研究 (ザ・マルメ・ダイエット・アンド・キャンサー・スタディー (the Malmo Diet and Cancer Study)) では、頸動脈の超音波測定による無症状アテローム性動脈硬化症の非侵襲評価を含む、大規模な心臓血管研究にコーホートからの30000人の被験体のうち約6000人が当てられた。さらに、さらなる心臓血管の危険因子をベースラインで測定した。これらの被験体を、心臓血管疾患の新規イベント (心筋梗塞、慢性冠動脈心疾患、アテローム血栓性卒中) の発生に関して10年間追跡調査した。95%信頼区間で (相対ハザードとして算出される) 相対危険度を評価するために、低レベルの、ホスホリルコリンに対する抗体 (aPC-IgM) について、コーホート内症例対照解析 (症例あたり3対照) を行った。全部で145CVD症例 (主に、心筋梗塞 (MI) および虚血性卒中) があり、400の年齢および性別がマッチした対照があった。aPCのカットオフレベルは、aPCレベルの10パーセンタイルの307とした。10パーセンタイルより低いaPCレベルにおいて20CVD症例 (14%) があり、34 (9%) の対照があり、これは1.9 (95%CI 1.1 ~ 4.3) という相対ハザードに相当していた。aPCの10パーセンタイルよりも低い男性CVD症例の対応する数は、16 (19%) であり、このレベルより低い25 (11%) の対照患者があり、これは1.9 (95%CI 1.1 ~ 3.5) という相対ハザードに相当していた。女性の症例の数は、相対危険度に関して確固たる情報を得るには少なすぎた (表1および2参照)。結果から、健常な被験体における低いaPCレベルは心臓血管疾患の発生の予測となり、心臓血管疾患のマーカーとして作用し得るということが示唆される。

10

20

【0080】

【表1】

aPC (<10パーセンタイル) の記述統計学

30

		性別				すべて	
		男性		女性		症例	対照
		症例	対照	症例	対照		
10パーセンタイルより低い							
いいえ	n	68	206	57	160	125	366
	%	81	89	93	95	86	92
はい	N	16	25	4	9	20	34
	%	19	11	7	5	14	9

40

【0081】

【表 2】

すべての患者、男性および女性それぞれについての従来のロジスティック回帰による、
CVDに対する a P C (< 10 パーセントイル) の影響についての単変量解析

	変数	p 値	ハザード比	95%ハザード比信頼限界	
すべての患者	a P C	0.0308	1.939	1.063	3.536
男性	a P C	0.0262	2.181	1.097	4.338
女性	a P C	0.6556	1.331	0.379	4.676

10

【0082】

a P C の作用

はじめに

本発明者らは、P C - B S A、P C - K L H または肺炎球菌ワクチン (スタテンズ・セラム社 (Statens Serum Institute)、デンマーク) を予め吸着させたカラムを用いることによって、これらの化合物に対して反応性を有する抗体を抽出した。a P C I g G のレベルはこれらのうち少なくとも最初に2種では上がる。I V I G から少量の I g M も抽出し、次いで、前記の抗原を予め吸着させたカラムに流すこともできる。本発明者らは、この方法によって I g G および I g M サブクラスのポリクローナルヒト a P C を得ることができる。タンパク質測定値から、0.5 mg/ml という a P C I g M レベルを抽出できたことが示唆される。本発明者らはこれらの抗体を用い、in vitro モデルを用いて、その機能的特性を試験できる：

20

1. 漸増濃度の a P C I g M を、酸化した L D L とともにプレインキュベーションすることによって、単球/マクロファージ細胞株、T H P 1 における結合および取り込みを低減し得るか？共焦点顕微鏡および/または F A C S を用いる試験系を使用できる。

2. 漸増濃度の a P C I g M を対照として正常な I g M とともに、P A F、リゾホスファチジルコリン (L P C) とともにプレインキュベートすることによって、これらの脂質による内皮細胞での接着分子 I C A M の誘導を阻害できるか？また、その他のサイトカインは市販のキットを用いて試験できる (数種の異なるサイトカイン；バイオソース (BioSource))。試験には F A C S c a n を使用できる。

30

【0083】

細胞培養

2 継代の低温保存したプールした H U V E C を、カスケード・バイオリジックス社 (Cascade Biologics Inc.) (米国、オレゴン州、ポートランド) から購入した。培養物は、2% ウシ胎児血清およびサプリメントを含有する、E G M (商標) フェノールレッド不含培地 (クロネティクス (Clonetics)、米国、カリフォルニア州、サンディエゴ) で維持した。この細胞を、加湿した 5% C O₂ 条件下、75 cm² のフラスコ (T P P、A G、トラサディングン (trasadingen)、スイス) 中、37 °C でインキュベートした。

40

【0084】

すべての実験は 3 ~ 4 継代で実施した。細胞を、フローサイトメトリー分析のために 2 × 10⁴ 個細胞/ml の密度で 12 ウェルプレート (ヌンク社 (NUNC Inc.)、米国、イリノイ州、ネーパービル) に播種した。12 ~ 24 時間付着させた後、細胞を処理の前に少なくとも 12 時間 S F M で静止状態にした。

【0085】

単球細胞株 T H P - 1 は A T & T (米国) から入手した。細胞は 10% F C S を含む R P M I で維持した。

【0086】

a P C の調製

50

I g MまたはI g Gの総フラクションは、ハイトラップ (HiTrap) I g MまたはI g Gカラム (アマシャム・バイオサイエンス (Amersham Biosciences)) を用いて、50 mg/mlの市販のプールされたヒト免疫グロブリン (ガンマーガード (Gammagard) (登録商標)) から分離した。ホスホリルコリン (PC) に対する抗体は、I g MまたはI g Gフラクションを、キーホールリンペットタンパク質 (KLH) (1もしくは5 mg/ml) またはウシ血清アルブミン (BSA) (1 mg/ml) のいずれかと結合しているPCとカップリングしているNHS-セファロースカラムに装填した後、続いてBSAのみのカラムにより溶出した。PC-BSA (ホスホリルコリン-ウシ血清アルブミン) およびPC-KLHは、バイオサーチ・テクノロジーズ社 (Biosearch Technologies, INC) (米国、カリフォルニア州) から購入した。溶出フラクションは、PD-10カラムでバッファー交換し、ミリポアセントリコン (Millipore Centricon) (登録商標) 装置で濃縮した。手順は、製造業者によって与えられた説明書にしたがって実施した。調製したI g M a PCの濃度は、通常、50 µg/mlであり、I g G a PCの濃度は、通常30 µg/mlであった。

【0087】

THP-1由来マクロファージによる、oxLDLのスカベンジャー結合および取り込み

酸化されたLDL (oxLDL) は、記載されたように、銅イオンとともにインキュベーションすることによって調製する。第1に、oxLDLをDiI (DiI - (1, 1' - ジオクタデシル - 3, 3, 3', 3' - テトラメチルヨードカルボシアニンパーコレート; モレキュラー・プローブス社 (Molecular Probes, Inc)) で標識し、生理食塩水 - EDTAバッファーで1 mg/mlに希釈する。その後、1 mgのoxLDLにつき2 mlのリポタンパク質欠乏血清を加え、次いで、濾過する (0.45 µm)。1 mgのoxLDLにつき50 µlのDMSO中DiI (3 mg/ml) を加え、混合物を15時間、37 °Cでインキュベートし、次いで、数回交換する生理食塩水 - EDTAに対して6時間透析する。この後、混合物を再度、0.45 µmで濾過する。

【0088】

蛍光/共焦点顕微鏡を用いてoxLDLの取り込みを調べる。単球/マクロファージのモデルとしてTHP-1細胞を、スライドチャンバー上で一晚増殖させる (培地: DMEM/10% FBS/Glu/PEST)。

FBSを含まないDMEM培地で3回洗浄する。

oxLDL - DiI 0.5 µg/ml (SFM培地) とともに6時間インキュベートする。

細胞を0.2% BSA - PBSで5回、PBSで1回洗浄する。

【0089】

マクロファージ核染色: 細胞を1 µg/mlのビスベンジミドとともに10分間インキュベートし、PBSで3回洗浄した。

【0090】

固定およびマウント: 次いで、細胞をPBS中4%パラホルムアルデヒドで30分、PBSで3回、最後に1滴のマウントゲルで固定した。スライドはカバースリップで覆った。

【0091】

内皮細胞とのアネキシンV結合

アネキシンV結合を阻害する高い能力を有する、ヘパリン保存した血漿を、SFM中10%という濃度でHUVEC単層に加えた。24時間後、細胞を細胞解離溶液 (Cell Dissociation Solution) (CDS; シグマ-アルドリッチ (Sigma-Aldrich)、米国、ミズーリ州、セントルイス) で回収し、上清を用い、はがれた浮遊細胞の選択的減少をなくすよう注意深くプールし、1200 rpmで7分の遠心分離を続けた。100 µlのアネキシンV結合バッファー (モレキュラー・プローブス社 (Molecular Probes Inc)、米国、オレゴン州、ユージーン) に再懸濁した後、サンプルを2 µlの5 mg/mlアネキシンV-FITC (モレキュラー・プローブス (Molecular Probes)) で染色し、氷上で15分間インキュベートした。獲得の直前に、1 mg/mlのヨウ化プロピジウム (PI; 生

体染色色素；R & Dシステムス・ヨーロッパ社（R&D Systems Europe Ltd）、英国、アビンドン）を加えた。分析は上記の通り実施した。

【0092】

統計分析

統計はstattview（Stat View）ソフトウェア、SASインスティテュートAB（SAS Institute AB）、スウェーデン、エーテボリを用いてコンピュータで計算した。非対称の連続型変数を対数的に変形した。連続型変数についてANOVAおよびカテゴリ変数についてカイ二乗を用いて研究群を比較した。フィッシャーのPLSDを、ポストホックテストとして用いた。相関係数は単純回帰または正規分布変数についてではないスピアマンの順位相関を用いて算出した。有意レベルは $p < 0.05$ で設定した。

10

【0093】

結果

内皮細胞とのアネキシンV結合の測定

アネキシンV染色のHUVEC陽性の頻度を、二変数ドットプロットでのアネキシンV⁺/PI⁻細胞のパーセンテージとしてか、ヒストグラムに基づくアネキシンV⁺細胞のパーセンテージのいずれかとして求めた。結合を低下させると知られている血清の存在下でのHUVECとの、およびIVIGとプレインキュベートしたHUVECとのアネキシンV結合を調べた。IVIGとのプレインキュベーションはアネキシンの結合を回復させることができ、このことはIVIG中に存在する抗体が結合を中和できたということを示す（図4）。

20

【0094】

ECとのアネキシンV結合を有するCVDの病歴のあるSLE患者では、APC-B SAおよびaPC-KHLは双方とも有意に関連していた（それぞれ、 $r = 0.45$ ； $p = 0.02$ ならびに $r = 0.42$ および $p = 0.03$ ）。aPCは上記のように測定した。

【0095】

PCによる、マクロファージにおけるoxLDL取り込みに対する作用

指摘したようにIVIGから抽出した、IgMおよびIgGサブクラスのaPCを必要性を示すoxLDLとともにプレインキュベートした（図3）。本発明者らは総IgMをaPC-IgMおよびマクロファージ取り込みに対する効果の対照として用いた（マクロファージ+ Dil-oxLDL+IgM）。陽性染色細胞の全パーセンテージは46.62%であり、これはIgM自体はaPCが有する阻害作用を有していないということを示す。IgMはシグマ（SIGMA）から購入し、精製ヒトIgMは、通常のヒト血清を出発物質として用いて沈殿およびゲル濾過技術によって製造されている。免疫グロブリンは少なくとも95%純粋であると測定されている。

30

【0096】

内皮細胞におけるICAM誘導に対するaPCの作用

PAFを、必要性を示す濃度のECとともにインキュベートした。図5に示されるように、この脂質はICAM発現の有意な増加を誘導できた。指摘したようにIVIGから抽出したIgMサブクラスのaPCを、必要性を示されるようにこれらの脂質とともにプレインキュベートした（図5）。

40

【0097】

先に記載したような（高血圧症の226個体の）ELSA研究におけるaPCとその他の危険マーカー間の相関

表4に示されるように、aPC-IgMは2つのその他の保護因子、HSP70およびHDLと関連していた。また、TNF、つまり、炎症のマーカーでありアテローム生成性サイトカインとも、弱くはあるが有意な関連があった。

【0098】

TNFは重要な炎症性サイトカインであり、TNFレベルはaPC-IgMレベルと負に関連していた。この関連は弱い有意である。

50

【0099】

HSP70は、本発明者等によって最近記載された新規保護因子である。明確な正の関連がある。また、HSP60は、弱い保護因子であるが、これも関連している。

【0100】

HDLはよく知られている「良性」コレステロールであり、抗炎症特性を有する。HDLは、aPC IgMと有意に関連している。

【0101】

			ANTPCIGG	ANTPCIGM
スピアマンの rho	ANTPCIGG	相関係数	1,000	,245
		有意 (両側)	,	,000
		N	220	220
	ANTPCIGM	相関係数	,245	1,000
		有意 (両側)	,000	,
		N	220	220
HDL		相関係数	,008	,233
		有意 (両側)	,906	,001
		N	206	206
TNFA		相関係数	-,012	-,136
		有意 (両側)	,863	,044
		N	220	220
HSP60		相関係数	,138	,279
		有意 (両側)	,047	,000
		N	209	209
HSP70		相関係数	,157	,356
		有意 (両側)	,022	,000
		N	213	213

**相関は、.01レベルで有意である (両側)。

*相関は、.05レベルで有意である (両側)。

【図面の簡単な説明】

【0102】

(図1a) 2GPI、PSおよびCLによる、抗体(IgM)の、PCアルブミンでコーティングされたELISAプレートとの結合の阻害を示す図である。種々の抗原によるPCアルブミンコーティングされたプレートとの結合の阻害。aPCの特異性を調べるために、実験の項に記載されたように競合分析評価イを実施した。結果は平均値 ± SDとして示されている。

(図1b) 2GPI、PSおよびCLによる、抗体(IgG)の、PCアルブミンでコーティングされたELISAプレートとの結合の阻害を示す図である。種々の抗原によるPCアルブミンコーティングされたプレートとの結合の阻害。aPCの特異性を調べるために、実験の項に記載されたように競合分析評価を実施した。結果は平均値±SDとして示されている。

(図2a) oxLDLおよびMDA-LDLによる、抗体(IgM)の、PCアルブミンでコーティングされたELISAプレートとの結合の阻害を示す図である。種々の抗原によるPCアルブミンコーティングされたプレートとの結合の阻害。aPCの特異性を調べるために、実験の項に記載されたように競合分析評価を実施した。結果は平均値±SDとして示されている。

(図2b) oxLDLおよびMDA-LDLによる、抗体(IgG)の、PCアルブミンでコーティングされたELISAプレートとの結合の阻害を示す図である。種々の抗原によるPCアルブミンコーティングされたプレートとの結合の阻害。aPCの特異性を調べるために、実験の項に記載されたように競合分析評価を実施した。結果は平均値±SDとして示されている。

(図3) IGI Vから抽出したaPCによる、マクロファージにおけるoxLDL取り込みに対する作用を示す図である。

本発明者らは2つのグループを試験した。：1つは、oxLDLとマクロファージを共にし、もう1つは、oxLDLとマクロファージを共にし、+IGI Vから抽出したaPCとともにプレインキュベーションした。

マクロファージ+oxLDL(全107細胞)：弱い染色37/107=34.58%、強い染色10/107=9.35%全染色陽性47/107=43.93%

マクロファージ+Dil-oxLDL+aPC群(156細胞を調査)：弱い染色37/156=23.72%、強い染色2/156=1.28%全染色陽性39/156=25%。

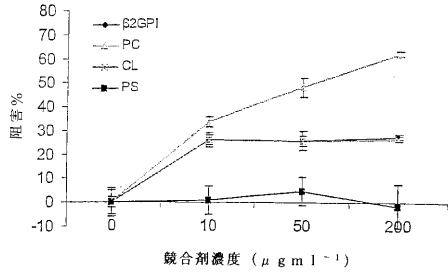
図3AはDil標識oxLDLでの染色を示す。図3Bは未標識oxLDLでの染色を示す。

(図4)高抗リン脂質抗体(aPL)力価血清を、ヒトのプールされた免疫グロブリンガンマガード(Gammagard)(登録商標)とともにプレインキュベーションしたことのアネキシンVとヒト臍帯内皮細胞(HUVEC)との結合に対する効果：24時間培養後のフローサイトメトリ解析を示す図である。

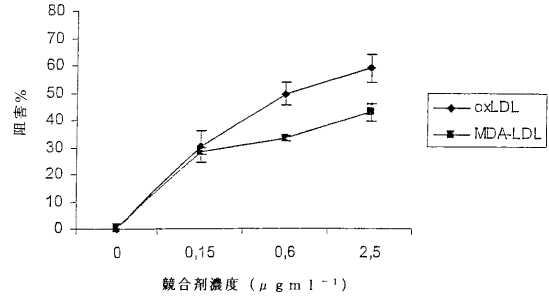
IVI Gを以下の血清とともに プレインキュベートした	アネキシンV結合の蛍光強度中央値 (MFI)
0 mg/ml	649
2.5 mg/ml	913
5 mg/ml	1269
10 mg/ml	1382

(図5)内皮細胞におけるICAM誘導に対するaPCの作用を示す図である。内皮細胞の培養物に1μg/mlのPAFを加え、aPC IgMとともにプレインキュベーションを行うか行わなかった。ICAM-1の発現を、FACSscanによって調べた。緑色の線はPAF作用を表し、赤色はPAF+aPC IgMを表し、黒色は対照を表す。データは、aPC IgMを添加した場合のヒストグラムの左への移動を明確に示す。

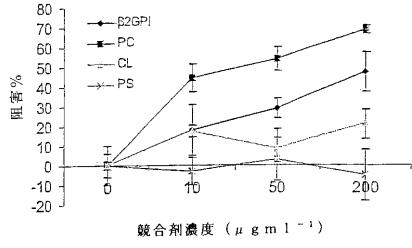
【 図 1 A 】



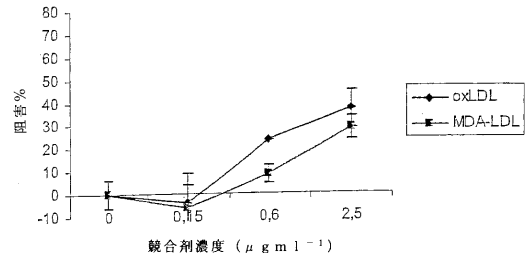
【 図 2 A 】



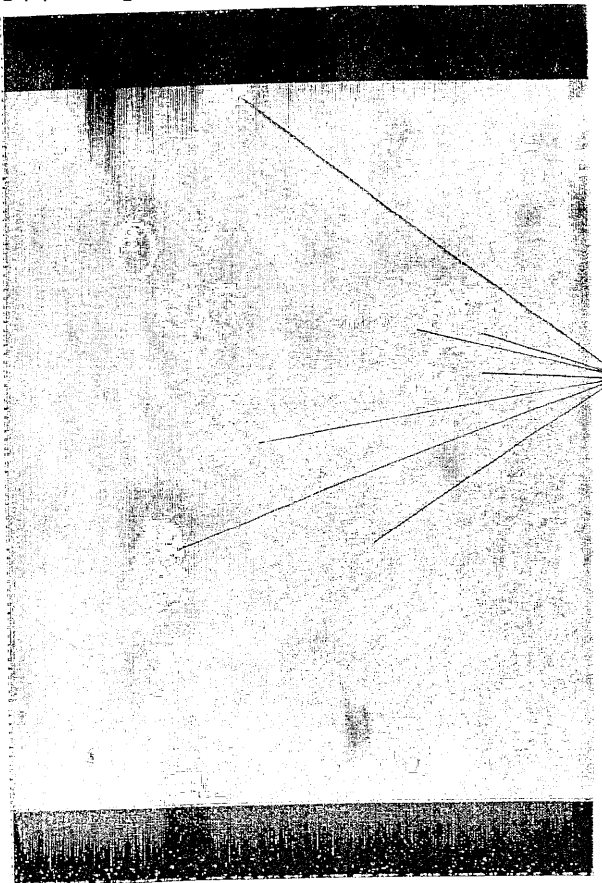
【 図 1 B 】



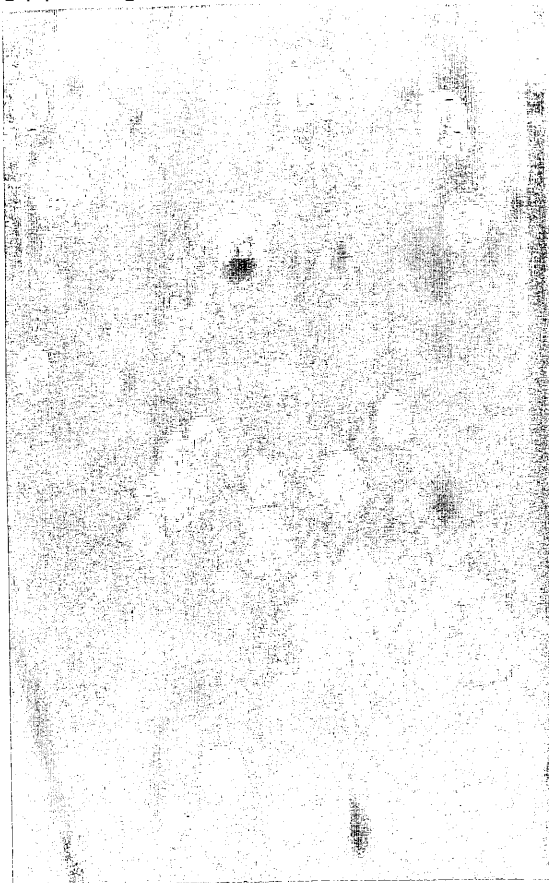
【 図 2 B 】



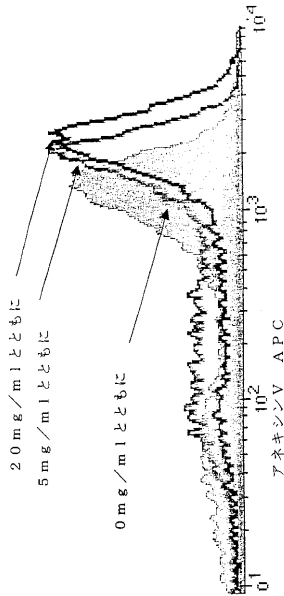
【 図 3 A 】



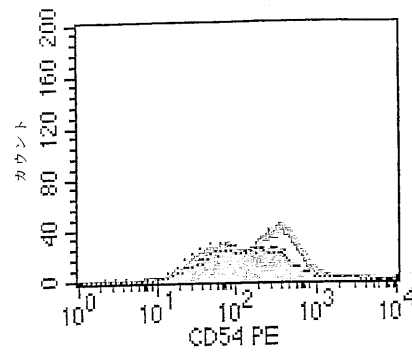
【 図 3 B 】



【 図 4 】



【 図 5 】



キー	名称	パラメーター	ゲート
—	paf 1.004	FL2-H	ゲートなし
■	CM.002	FL2-H	ゲートなし
□	P1-PC IgM.015	FL2-H	ゲートなし

【 手続補正書 】

【 提出日 】平成18年4月28日(2006.4.28)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

アテローム性動脈硬化症またはアテローム性動脈硬化症関連疾患に対して、ヒトを免疫化および治療するための医薬の製造における、抗体調製物、例えばホスホリルコリン複合体に対して特異性を有するモノクローナル抗体を含む薬剤組成物の使用。

【 請求項 2 】

アテローム性動脈硬化症またはアテローム性動脈硬化症関連疾患に対して、ヒトを免疫化および治療する方法であって、ヒトに、抗体調製物、例えばホスホリルコリン複合体に対して特異性を有するモノクローナル抗体を含む薬剤組成物を投与するステップを含む、方法。

【 請求項 3 】

医薬が注射による投与用のものであるか、または組成物を注射によって投与する、請求項 1 に記載の使用または請求項 2 に記載の方法。

【 請求項 4 】

ホスホリルコリンがスパーサーを介して担体と結合している、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の使用または方法。

【 請求項 5 】

担体がタンパク質である、請求項 4 に記載の使用または方法。

【請求項 6】

タンパク質が K L H (キーホールリンベットヘモシアニン) またはヒト血清アルブミン (H S A) である、請求項 5 に記載の使用または方法。

【請求項 7】

担体がラテックスビーズである、請求項 4 に記載の使用または方法。

【請求項 8】

アテローム性動脈硬化症を患っているか、虚血性心臓血管疾患を発症する危険に直面している、ヒトの予防的または治療的処置方法であって、治療上有効な量の抗体調製物、または例えばホスホリルコリン複合体に対して特異性を有するモノクローナル抗体を投与する、方法。

【請求項 9】

ヒト患者の心臓血管疾患の発症または進行の危険を評価する方法であって、患者の、ホスホリルコリン複合体に反応性の抗体のレベルを評価し、健常なヒト患者における、ホスホリルコリン複合体に反応性の抗体の低いレベルが心臓血管疾患の発生の予測となる方法における、ホスホリルコリン複合体の使用。

【請求項 10】

心臓血管疾患が虚血性心臓血管疾患である、請求項 9 に記載の使用。

【請求項 11】

心臓血管疾患がアテローム性動脈硬化症である、請求項 9 に記載の使用。

【請求項 12】

ホスホリルコリン複合体に反応性の I g M 抗体の患者のレベルを評価する、請求項 9 乃至請求項 11 のいずれか一つに記載の使用。

【請求項 13】

ホスホリルコリン複合体に反応性の I g G 抗体の患者のレベルを評価する、請求項 9 乃至請求項 11 のいずれか一つに記載の使用。

【請求項 14】

ホスホリルコリンがスペーサーを介して担体と結合している、請求項 1 乃至 13 のいずれか一つに記載の方法。

【請求項 15】

担体がタンパク質である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

タンパク質が K L H (キーホールリンベットヘモシアニン) またはヒト血清アルブミン (H S A) である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

担体がラテックスビーズである、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 18】

分析評価が免疫分析評価である、請求項 9 乃至請求項 17 のいずれか一つに記載の方法。

。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		national application No T/GB2005/001463
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K16/44 A61K47/48 G01N33/92 G01N33/68		
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) A61K G01N C07K		
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, DISSERTATION ABS, CHEM ABS Data, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE DISSERTATION ABSTRACTS 'Online! ProQuest Info&Learning; 2002, BINDER, CHRISTOPH JOHANNES: "Defining innate and adaptive immune mechanisms in the atheroprotective effect of immunization with oxidized low-density lipoproteins" XP002355546 retrieved from DIALOG accession no. 01907366 Database accession no. AADAA-I3064459 abstract & DISSERTATION ABSTRACTS INTERNATIONAL, vol. 63, no. 09-b, 2002, page 4109, -/--	1-9
<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 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. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
10 February 2006		24/02/2006
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Dullaart, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
 T/GB2005/001463

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& BINDER, CHRISTOPH JOHANNES: "Ph. D. thesis" 2002, UNIVERSITY OF CALIFORNIA, SAN DIEGO, US ISBN: 0-493-83264-5	
X	BINDER, CHRISTOPH J. ET AL: "Pneumococcal vaccination decreases atherosclerotic lesion formation: molecular mimicry between Streptococcus pneumoniae and oxidized LDL" NATURE MEDICINE, vol. 9, no. 6, June 2003 (2003-06), pages 736-743, XP002355525 ISSN: 1078-8956 abstract page 738, left-hand column, last paragraph - page 740, left-hand column, paragraph 3	1-9
X	ROSE N ET AL: "Autoimmunity: Busting the atherosclerotic plaque" NATURE MEDICINE 01 JUN 2003 UNITED STATES, vol. 9, no. 6, 1 June 2003 (2003-06-01), pages 641-642, XP002355526 ISSN: 1078-8956 page 641, left-hand column, paragraph 3	1-9
X	BINDER C J ET AL: "Innate and acquired immunity in atherogenesis" NATURE MEDICINE 01 NOV 2002 UNITED STATES, vol. 8, no. 11, 1 November 2002 (2002-11-01), pages 1218-1226, XP002355527 ISSN: 1078-8956 figure 3 page 1224, right-hand column, paragraph 2	1-9
X	SHAW P X ET AL: "The autoreactivity of anti-phosphorylcholine antibodies for atherosclerosis-associated neo-antigens and apoptotic cells" JOURNAL OF IMMUNOLOGY 15 JUN 2003 UNITED STATES, vol. 170, no. 12, 15 June 2003 (2003-06-15), pages 6151-6157, XP002355528 ISSN: 0022-1767 abstract table 1 figure 1 page 6153, right-hand column page 6155, left-hand column, last paragraph - page 6156, left-hand column, line 5	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
T/GB2005/001463

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>BINDER CHRISTOPH J ET AL: "Molecular mimicry between epitopes of oxidized LDL and Streptococcus pneumoniae" ABSTRACTS FROM AMERICAN HEART ASSOCIATION SCIENTIFIC SESSIONS 2000, 'Online! 12 November 2000 (2000-11-12), XP002355529 NEW ORLEANS, LOUISIANA, US, Abstract ID: 108867 Retrieved from the Internet: URL: http://aha.agora.com/abstractviewer 'retrieved on 2005-11-10! the whole document & CIRCULATION, vol. 102, no. 18, Supplement, 31 October 2000 (2000-10-31), pages II.114-II.115, ISSN: 0009-7322</p>	1-9
Y	<p>PURKALL D ET AL: "Opsonization of Actinobacillus actinomycetemcomitans by immunoglobulin G antibody reactive with phosphorylcholine" INFECTION AND IMMUNITY 2002 UNITED STATES, vol. 70, no. 11, 2002, pages 6485-6488, XP002355530 ISSN: 0019-9567 abstract page 6485, right-hand column, paragraph 2 page 6486, left-hand column, paragraph 3</p>	1-9
Y	<p>US 5 455 032 A (KENNY ET AL) 3 October 1995 (1995-10-03) cited in the application examples claims table 2</p>	1-9
Y	<p>WO 99/33522 A (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM; SCHROIT, ALAN, J) 8 July 1999 (1999-07-08) examples claims</p>	1-15
Y	<p>SHOJI TETSUO ET AL: "Inverse relationship between circulating oxidized low density lipoprotein (oxLDL) and anti-oxLDL antibody levels in healthy subjects" ATHEROSCLEROSIS, vol. 148, no. 1, January 2000 (2000-01), pages 171-177, XP002355531 ISSN: 0021-9150 abstract page 174, paragraph DISCUSSION - page 176, left-hand column, last line</p>	1-9
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

T/GB2005/001463

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 02/080954 A (FORSKARPATENT I SYD) 17 October 2002 (2002-10-17) cited in the application examples claims	1-9
Y	WO 01/68119 A (KAROLINSKA INNOVATIONS AB; HANSSON, GOERAN, K; STEMME, STEN; NICOLETTI) 20 September 2001 (2001-09-20) cited in the application examples claims	1-9
X	KEARNEY JOHN F: "Immune recognition of OxLDL in atherosclerosis" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 105, no. 12, June 2000 (2000-06), pages 1683-1685, XP002367018 ISSN: 0021-9738 page 1683, right-hand column, last paragraph - page 1684, middle column, paragraph 1; figure 1	10-16
Y	WO 01/32070 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA; WITZTUM, JOSEPH; TSIMIKAS) 10 May 2001 (2001-05-10)	1-3,9
X	page 17 - page 18 claims 10-16	10-15
X	CHYU KUANG-YUH ET AL: "Changes in innate and adaptive humoral immune responses and indices of atherosclerosis in aging." JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY, vol. 43, no. 5, Supplement A, 3 March 2004 (2004-03-03), page 499A, ABSTRACT NO. 1122-173, XP002367019 & 53RD ANNUAL SCIENTIFIC SESSION OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY; NEW ORLEANS, LA, USA; MARCH 07-10, 2004 ISSN: 0735-1097 the whole document	10-16
X	WO 93/18161 A (THE ROCKEFELLER UNIVERSITY) 16 September 1993 (1993-09-16) page 16, line 34 - page 17, line 10	10-16
X	WO 90/12632 A (THE UNITED STATES OF AMERICA, REPRESENTED BY THE S) 1 November 1990 (1990-11-01) examples claims	1-3,9

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
T/GB2005/001463

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 475 100 A (HASHINO ET AL) 12 December 1995 (1995-12-12) example 4	10-15
Y	KOH-ZOH KAMEYAMA ET AL: "CONVENIENT PLASMID VECTORS FOR CONSTRUCTION OF CHIMERIC MOUSE/HUMAN ANTIBODIES" FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 244, no. 2, 27 February 1989 (1989-02-27), pages 301-306, XP000007812 ISSN: 0014-5793 abstract page 304, left-hand column, paragraph 3.3	1-3,9
X	SHAW PETER X ET AL: "Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 105, no. 12, June 2000 (2000-06), pages 1731-1740, XP002204419 ISSN: 0021-9738 abstract page 1736, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 18	10-16
Y	EP 0 466 505 A (FUJITA HEALTH UNIVERSITY; TAKARA SHUZO CO. LTD) 15 January 1992 (1992-01-15) examples	1-3,9
Y	WO 94/14454 A (ENTREMED, INC) 7 July 1994 (1994-07-07) examples	1-9
Y	US 5 955 584 A (DITLOW ET AL) 21 September 1999 (1999-09-21) abstract column 206 - column 210, line 25 column 210, line 38 - column 211, line 33	1-3,9-15
P,Y	US 2004/185039 A1 (KOHLEER HEINZ ET AL) 23 September 2004 (2004-09-23) paragraph '0042! - paragraph '0043!	1-3,9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2005/001463

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

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claim 9 is directed to a method of treatment of the human/animal body, a search has been carried out, based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

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

Remark on Protest

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

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 and 9 in part, and 4-8

Use of a phosphorylcholine conjugate in the treatment of atherosclerosis or related disease, and corresponding method of prophylactic or therapeutic treatment.

2. claims: 1-3 and 9 in part

Use of an antibody specific for a phosphorylcholine conjugate in the treatment of atherosclerosis or related disease, and corresponding method of prophylactic or therapeutic treatment.

3. claims: 10-15

Method of diagnosing the presence or absence of IgM or IgG antibodies as defined in these claims.

4. claim: 16

Use of a phosphorylcholine conjugate for assessing a patient's risk of developing or progression of ischemic cardiovascular disease as defined in this claim.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

national application No

T/GB2005/001463

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5455032	A	03-10-1995	NONE	
WO 9933522	A	08-07-1999	AU 2210899 A CA 2317120 A1 EP 1044013 A2 US 6300308 B1 US 2003004097 A1	19-07-1999 08-07-1999 18-10-2000 09-10-2001 02-01-2003
WO 02080954	A	17-10-2002	BR 0208685 A CA 2443223 A1 CN 1505525 A EE 200300487 A EP 1383526 A1 JP 2004529143 T PL 367301 A1 SE 0103754 A	30-03-2004 17-10-2002 16-06-2004 16-02-2004 28-01-2004 24-09-2004 21-02-2005 06-10-2002
WO 0168119	A	20-09-2001	AU 4295201 A EP 1335742 A1 US 2004002111 A1	24-09-2001 20-08-2003 01-01-2004
WO 0132070	A	10-05-2001	AU 773370 B2 AU 3790801 A CA 2389849 A1 EP 1224461 A2 JP 2003513027 T MX PA02004244 A	20-05-2004 14-05-2001 10-05-2001 24-07-2002 08-04-2003 04-11-2002
WO 9318161	A	16-09-1993	AU 3992597 A CA 2131150 A1 EP 0631624 A1 JP 7504817 T	12-02-1998 16-09-1993 04-01-1995 01-06-1995
WO 9012632	A	01-11-1990	AU 5522390 A	16-11-1990
US 5475100	A	12-12-1995	NONE	
EP 0466505	A	15-01-1992	DE 69111930 D1 DE 69111930 T2 JP 3283041 B2 JP 6087899 A	21-09-1995 04-01-1996 20-05-2002 29-03-1994
WO 9414454	A	07-07-1994	AU 5959494 A	19-07-1994
US 5955584	A	21-09-1999	NONE	
US 2004185039	A1	23-09-2004	NONE	

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 16/44	(2006.01)	G 0 1 N 33/544	Z	
		C 0 7 K 16/44		

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

【要約の続き】

対して特異性を有するモノクローナル抗体を含む薬剤組成物を提案し、能動または受動免疫原としてのこれらの組成物の使用は、アテローム性動脈硬化症の治療または予防である。

专利名称(译)	新作文		
公开(公告)号	JP2008501636A	公开(公告)日	2008-01-24
申请号	JP2007507849	申请日	2005-04-15
[标]申请(专利权)人(译)	阿瑟拉生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	ATERA生物技术AB		
[标]发明人	デファイアウルフ フロストガードヨハン		
发明人	デファイア ウルフ フロストガード ヨハン		
IPC分类号	A61K39/395 A61P9/10 G01N33/53 G01N33/547 G01N33/544 C07K16/44 A61K47/48 C07K16/18 G01N33/68 G01N33/92		
CPC分类号	A61K47/646 C07K16/18 C07K16/44 C07K2317/52 G01N33/6854 G01N33/92 A61P9/00 A61P9/10 A61K39/39583 G01N33/6893 G01N2800/323 G01N2800/50 G01N2800/52		
FI分类号	A61K39/395.M A61K39/395.N A61P9/10 G01N33/53.N G01N33/547 G01N33/544.Z C07K16/44		
F-TERM分类号	4C085/AA14 4C085/BB13 4C085/CC23 4C085/DD33 4C085/DD88 4C085/EE01 4C085/GG01 4H045 /AA11 4H045/DA76 4H045/EA24 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	五十嵐清		
优先权	60/521384 2004-04-15 US		
其他公开文献	JP4891228B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

摘要：为了确定抗体对动脉粥样硬化发展的重要性，在基线时测定了高血压（舒张压 > 95 mmHg）受试者中抗磷酸胆碱的IgG和IgM自身抗体水平。结果显示，在具有高自身抗体，特别是高IgM自身抗体对磷酸胆碱的受试者中，基线后4年随访时内膜中层厚度（IMT）的增加明显较少。因此，抗磷酸胆碱的自身抗体，特别是IgM自身抗体的存在或不存在与发生缺血性心血管疾病的风险增加或降低有关。本发明提出了一种测定针对磷酸胆碱的抗体，特别是IgM抗体的方法，以鉴定有发展缺血性心血管疾病风险的受试者。动物实验表明，在用钥匙孔血蓝蛋白（KLH）-磷酸胆碱缀合物主动免疫后，可以在血浆中检测到中等至高水平的抗体，特别是IgM抗体。提出了包含磷酸胆碱缀合物（主动免疫）或抗体制剂（例如单克隆抗体）的药物组合物，其对磷酸胆碱缀合物具有特异性（被动免疫），并且这些组合物在治疗或预防中用作主动或被动免疫原。动脉粥样硬化

