

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6454360号
(P6454360)

(45) 発行日 平成31年1月16日(2019.1.16)

(24) 登録日 平成30年12月21日(2018.12.21)

(51) Int.Cl.		F I			
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N	33/53		D
CO 7 K 16/18	(2006.01)	GO 1 N	33/53		R
		CO 7 K	16/18	Z N A	

請求項の数 23 (全 40 頁)

(21) 出願番号	特願2016-569622 (P2016-569622)	(73) 特許権者	508318845
(86) (22) 出願日	平成27年5月28日 (2015. 5. 28)		ラントメネン・アーエス・ファクトール・
(65) 公表番号	特表2017-517733 (P2017-517733A)		アーベー
(43) 公表日	平成29年6月29日 (2017. 6. 29)		スウェーデン国S-104 25ストック
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/061899		ホルム, ボックス30192
(87) 国際公開番号	W02015/181324	(74) 代理人	100127926
(87) 国際公開日	平成27年12月3日 (2015. 12. 3)		弁理士 結田 純次
審査請求日	平成29年5月26日 (2017. 5. 26)	(74) 代理人	100140132
(31) 優先権主張番号	1450640-6		弁理士 竹林 則幸
(32) 優先日	平成26年5月28日 (2014. 5. 28)	(72) 発明者	シュテファン・ランゲ
(33) 優先権主張国	スウェーデン (SE)		スウェーデン国エス-411 28 ヨー
微生物の受託番号	DSMZ DSM ACC3271		テポリ, ネードレ・フォーゲルベリスガタ
			ン9パー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗分泌因子複合体アッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

体液におけるプロテアソーム - 補体複合体形成を検出する方法であって、体液を、

- a . プロテアソームサブユニットに特異的な抗体である第 1 の抗体、および
- b . 補体因子 C 3 に特異的な抗体である第 2 の抗体

を含む免疫学的アッセイに供することを含む前記方法。

【請求項 2】

前記第 1 の抗体が、プロテアソームタンパク質 A F 1、L M P 2、2 0 S アルファ 6、2 0 S アルファ 1、2、3、4、および R p t 5 に特異的な抗体からなる群から選択され、前記第 2 の抗体が、補体因子 C 3 に特異的な抗体である、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記第 2 の抗体が、補体因子 C 3、C 3 c、C 3 b または i C 3 b に特異的な抗体である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の体液におけるプロテアソーム - 補体複合体形成を検出する方法であって、体液を、

- a . プロテアソームタンパク質 A F 1 に特異的な抗体、および
- b . 補体因子 C 3 c に特異的な抗体

を含む免疫学的アッセイに供することを含む前記方法。

【請求項 5】

20

前記免疫学的アッセイが、E L I S A 試験として行われる、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の体液におけるプロテアソーム - 補体複合体形成を検出する方法。

【請求項 6】

前記第 1 の抗体が、プロテアソームタンパク質 A F 1 に特異的な抗体であり、プロテアソームタンパク質 A F 1 に特異的な前記抗体が、受託番号 D S M A C C 3 2 7 1 の下、D S M Z に寄託されている、ハイブリドーマ細胞培養物 2 3 4 1 に由来するモノクローナル 3 H 8 抗体である、請求項 2 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の体液におけるプロテアソーム - 補体複合体形成を検出する方法。

【請求項 7】

前記第 2 の抗体が、補体因子 C 3 c に特異的な抗体であり、補体因子 C 3 c に特異的な前記抗体が、補体因子 C 3 c に特異的なポリクローナル抗体である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の体液におけるプロテアソーム - 補体複合体形成を検出する方法。

10

【請求項 8】

前記体液が、血液、血清、血漿、乳、涙液、涙、精液、精漿、腔液、唾液、痰、汗、腹水、羊水、滑液、胃液、脳脊髄液、髄液、眼の液体、膿、および / または粘液から選択される、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記体液が、ヒト、ウマ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、およびラクダからなる群から選択される哺乳類から選択される、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記体液がトリから選択される、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 11】

第 1 の抗体および第 2 の抗体を使用して、体液におけるプロテアソーム - 補体複合体形成の存在もしくは不存在、および / または濃度を決定するための免疫学的アッセイであって、前記第 1 の抗体が担体に固定され、前記第 2 の抗体が標識物質で修飾されており、前記第 1 の抗体および前記第 2 の抗体が、

- a . プロテアソームサブユニットに特異的な抗体、および
- b . 補体因子 C 3 または補体因子 C 4 に特異的な抗体

から選択される、前記免疫学的アッセイ。

【請求項 12】

前記第 1 の抗体が、プロテアソームタンパク質 A F 1、L M P 2、2 0 S アルファ 6、2 0 S アルファ 1、2、3、4、および R p t 5 に特異的な抗体からなる群から選択され、前記第 2 の抗体が、補体因子 C 3 に特異的な抗体、または補体因子 C 4 に特異的な抗体からなる群から選択される、請求項 1 1 に記載の免疫学的アッセイ。

30

【請求項 13】

前記第 2 の抗体が、補体因子 C 3、C 3 c、C 3 b または i C 3 b に特異的な抗体である、請求項 1 2 に記載の免疫学的アッセイ。

【請求項 14】

前記第 1 の抗体および前記第 2 の抗体が、

- a . プロテアソームタンパク質 A F 1 に特異的な抗体、および
- b . 補体因子 C 3 c に特異的な抗体

から選択される、請求項 1 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の免疫学的アッセイ。

40

【請求項 15】

E L I S A 試験キットである、請求項 1 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の免疫学的アッセイ。

【請求項 16】

前記第 1 の抗体が、プロテアソームタンパク質 A F 1 に特異的な抗体であり、プロテアソームタンパク質 A F 1 に特異的な前記抗体が、受託番号 D S M A C C 3 2 7 1 の下、D S M Z に寄託されている、ハイブリドーマ細胞培養物 2 3 4 1 に由来するモノクローナル 3 H 8 抗体である、請求項 1 2 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の免疫学的アッセイ。

50

【請求項 17】

前記第2の抗体が、補体因子C3cに特異的な抗体であり、補体因子C3cに特異的な前記抗体が、補体因子C3cに特異的なポリクローナル抗体である、請求項11～16のいずれか1項に記載の免疫学的アッセイ。

【請求項 18】

血漿中の循環性26Sプロテアソームのレベルを検出/決定/モニタリングするための、請求項1～17のいずれかに記載の方法および/またはアッセイの使用。

【請求項 19】

体液中のインタクトなプロテアソームのレベルを検出/決定/モニタリングするための、請求項1～17のいずれかに記載の方法および/またはアッセイの使用。

10

【請求項 20】

哺乳類の身体における炎症のレベルを検出/決定/モニタリングするための、請求項1～17のいずれかに記載の方法および/またはアッセイの使用。

【請求項 21】

哺乳類の身体における補体系下方制御を検出するための、請求項1～17のいずれかに記載の方法および/またはアッセイの使用。

【請求項 22】

高含有量の抗分泌因子(NASP)を有する卵黄として提供される、特別加工穀類(SPC)および/または天然の抗分泌因子(NASP)を含む医療食品を摂取する患者のコンプライアンスを検証するための、請求項1～17のいずれかに記載の方法および/またはアッセイの使用。

20

【請求項 23】

医薬における使用のための、請求項1～17のいずれかに記載の方法および/またはアッセイ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

抗分泌因子(AF)は、炎症を阻害し、体液輸送を制御するタンパク質複合体である。本発明は、AF複合体が、修飾されたプロテアソーム、ならびに補体C3および/またはC4に存在するという驚くべき知見に関する。さらに、初めて、プロテアソームと補体因子C3および/またはC4との間の、ウイルスにより誘導される複合体が記載される。本明細書では、プロテアソーム-補体C3および/またはC4複合体は、ヒト血液から初めて精製され、ウエスタンブロットおよび質量分析により分析される。プロテアソームサブユニットに特異的な抗体および新規イムノアッセイにおけるそれらの使用が、本明細書において開示される。一実施形態において、ELISA試験は、AFを曝露するプロテアソームの補体因子C3c、C3b、iC3b、C4b、iC4b、またはC4cへの結合を開示し、別の一実施形態において、ELISA試験は、インタクトなプロテアソームの補体因子C3、C3c、C3b、iC3b、C4、C4b、iC4b、またはC4cへの結合を開示する。本明細書に記載されるアッセイは、AFを測定し、それは、加工穀類(SPC)の摂取後に約10倍増大される。補体因子HおよびIのレベルの差は見られなかった。プロテアソームサブユニットは、部分的に分割され、従前の隠れた抗分泌ペプチド配列を曝露することが示される。また、C3は、プロテアソーム結合の際にその不活性な形態C3cに部分的に分割され、AF複合体形成中に抗炎症効果をもたらす。

30

40

【0002】

したがって、第1の抗体および第2の抗体を使用して、体液におけるAF-C3複合体形成の存在もしくは不存在、および/または濃度を決定するための免疫学的アッセイキットであって、第1の抗体が担体に固定され、第2の抗体が標識物質で修飾されている、免疫学的アッセイキットが開示される。

【0003】

AFを測定するため、第1の抗体および第2の抗体は、AF1特異的な抗体、およびC3

50

cのような補体因子C3に特異的な抗体から選択される。

【0004】

プロテアソームと補体因子C3またはC4との間の一般的な複合体形成を測定するために、第1の抗体および第2の抗体は、プロテアソームに対する抗体、および補体因子C3またはC4に対する抗体から選択される。

【0005】

開示されるアッセイは、哺乳類の身体における補体系下方制御の測定および/またはモニタリングを含む、哺乳類の身体における炎症のレベルのモニタリング、ならびにヒトまたは動物の、高レベルの天然の抗分泌タンパク質(NASP)を含む加工穀類(SPC)および/または機能性食品に対するコンプライアンスの検証、ならびに体液における補体系制御に対するウイルスの影響の測定および/またはモニタリングのために使用される。

10

【背景技術】

【0006】

補体系

補体系は、病原体に対する防御において主要な役割を果たす。それはまた、死にかけている細胞、免疫複合体またはミスフォールディングされた分子も同定し、適応免疫もガイドする。補体の生理学的関連性は、反復感染、自己免疫疾患および腎疾患のような補体欠損患者を侵す病気により示される。

【0007】

侵入している病原体は、宿主細胞と比較した表面組成における差に起因して自然発生的に、または抗体もしくはペントラキシン結合を介してのいずれかで補体を活性化する。これは、タンパク質分解性補体カスケードの迅速な開始、血管透過性に影響する炎症促進性アナフィラトキシン(C5a、C3a)および白血球細胞を誘因する炎症促進性アナフィラトキシン(C5a)の放出、C3bでの標的のオプソニン作用、ならびに膜侵襲複合体(MAC)の最終的な形成を導く。

20

【0008】

補体は、自己組織を補体により媒介される損傷から保護するために、溶解性および膜結合制御因子の両方により、堅固に制御されなければならない。これらの阻害剤の多くが、染色体1q32に位置し、それらは、補体活性化(RCA)の制御因子とまとめて呼ばれる。RCAタンパク質は、C3およびC5転換酵素の崩壊を促進することにより、ならびに/またはC3bおよびC4bの分解においてセリンプロテイナーゼ因子I(FI)の補因子として作用することにより、補体系を阻害する。FIは、活性化されたC3bおよびC4bタンパク質を切断することにより、補体の経路の全てを阻害する。しかしながら、これは、補因子の存在下でのみ生じる。

30

【0009】

補体系は、異なる補体因子が、順に反応して、細菌の細胞壁を最終的に溶解する、細菌感染への炎症性応答と最も関連する。鍵となる因子C3およびC3bが、C3cへの加水分解により不活性化されることはあまり知られておらず、それは、タンパク質分解性因子I(FI)により活性化されることが知られている。この下方制御は、炎症後に補体系を回復させるのに必要であり、そうでなければ、それは、無期限に刺激されるだろう。

40

【0010】

プロテアソーム

プロテアソームは、全ての細胞に存在し、そこで、プロテアソームは、タンパク質の分解および制御に必須である。その触媒性20Sサブユニットは、7個の構造タンパク質および7個のタンパク質分解性タンパク質からなり、一方、2種の制御性19Sサブユニットは、19個の異なるタンパク質からなる。全てのプロテアソームタンパク質とは言わないまでも、大抵のプロテアソームタンパク質は、HUPOPプロジェクト遺伝子カード(<https://www.GeneCards.org>)に記載されている通り、組織において見出されたものと同様の濃度で血漿において同定された。例えば、ヒト血清において検出された20Sプロテアソームは、「循環性プロテアソーム」(c-プロテアソーム)

50

と一般に命名される。血漿循環性プロテアソームのレベルは、ある種のがんの形態および自己免疫疾患において上昇することが示されている。

【0011】

本発明者らは、以前に、AF1（抗分泌因子1）と名付けられたタンパク質を血液から単離し、そのコード遺伝子を配列決定した。後に、AF1は、19Sプロテアソームサブユニットの構成成分であり、それ自体は、PSMD4、RPN10またはS5aと名付けられたことが示された。細菌のエンテロトキシンおよび加工穀類が、抗分泌因子（AF）の変化した形態を誘導することができ、それが、腸において炎症および体液分泌を阻害したことがさらに示された。AFのこの修飾した形態は、多糖類アガロースに結合することが見出された。メチルグルコシドでの溶出後、その濃度はELISAにより決定できる。

10

【0012】

驚くべきことに、本発明では、プロテアソームが、加工穀類（SPC）の摂取後、補体因子C3と反応することが初めて示された。この反応は、従前の隠れた抗分泌エピトープの曝露をもたらし、それが、AF-1およびC3に対する抗体を使用したダブルサンドイッチELISAにおいてアッセイされる。さらに、本発明では、プロテアソーム/補体複合体形成が、C3のその不活性形態C3cへの分割をもたらすことが初めて示された。

【0013】

抗分泌因子（AF）

抗分泌因子（AF）は、下痢性疾患および腸炎症に対する保護をもたらすと元々記載された、41kDaのタンパク質である（概説について、非特許文献1を参照）。抗分泌因子（AF）タンパク質が配列決定され、そのcDNAがクローニングされた。抗分泌活性は、抗分泌因子（AF）タンパク質配列のアミノ酸35位と50位との間に位置し、共通配列の4、6、7、8、または16のような少なくとも4～16個のアミノ酸を含むペプチドにより主に発揮されると思われる。免疫化学および免疫組織化学的調査は、抗分泌因子（AF）タンパク質が、身体中の大抵の組織および器官に存在し、また合成されることを明らかにした。止痢配列を含む、合成ペプチドは、以前に特徴付けられている（特許文献1；特許文献2）。抗分泌因子（AF）タンパク質およびペプチドは、例えば、コレラ毒素での負荷後に腸および中枢神経系における脈絡叢において病理学的な体液輸送および/または炎症反応を正常化させることが既に開示されている（特許文献1）。それ故に、AFの内在性合成または加えられたAFの取り込みのいずれかを誘導する能力を有する食品ならびに飼料は、例えば、特許文献1において、浮腫、下痢、脱水、および炎症の処置に有用であることが示唆された。特許文献3は、抗分泌因子（AF）タンパク質の形成を誘導する食品の生産のため酵素活性を有する生成物の使用を開示する。特許文献4は、（NASP）のような天然の抗分泌因子（AF）タンパク質が豊富にある食品製品をさらに開示する。

20

30

【0014】

抗分泌因子（AF）タンパク質およびその断片はまた、細胞の減少および/または増加と関連する状態の処置において神経組織の修復、ならびに幹細胞および前駆細胞、ならびにその誘導された細胞の増殖、アポトーシス、分化、および/または遊走を改善すること（特許文献2）、ならびに眼内高血圧の処置および/または予防において（特許文献5）、コンパートメント症候群の処置および/または予防の場合（特許文献6）も同等に有効であることが示された。

40

【0015】

その上、本発明者らは、AFが膜における脂質ラフト、受容体、および/またはカベオラの構造、分布、および多機能をモニタリングし、および/または有益に影響を及ぼすことができ、したがって、細胞膜における脂質ラフトおよび/またはカベオラの構造の組織崩壊および機能障害の処置および/または予防のため利用できることを最近示した（特許文献7）。

【0016】

50

本発明者らは、同一の抗分泌因子（AF）タンパク質、ならびにそのペプチドおよび断片が、膜貫通型タンパク質、例えば、NKCC1の生物学的活性化にFAKおよびCAPを介して介入すること、ならびに、したがって、それが、病理学的細胞および/または乱された細胞におけるイオンチャネルの病理学的活性を直接制御し、前記細胞における細胞内圧および膜貫通型タンパク質機能を有効に正常化し、故に、例えば、がん療法において使用される薬物の改善された取り込みを可能にすることをさらに証明できた（特許文献8）。

【0017】

本出願は、従前に文書化されていない、補体系とプロテアソームとの間の相互作用、およびこの相互作用の結果として、AFの抗分泌配列が曝露され、血中におそらく放出されるという事実に初めて光明を投じた。これらの異なる化合物間の天然の相互作用経路におけるこの新たに見出された見識により、本発明者らは、体液においてプロテアソーム-C3複合体形成を検出するための新規かつ非常に有効な免疫学的アッセイを初めて開発することができた。新しいアッセイは、哺乳類の身体における補体系制御を含む、哺乳類の身体における炎症のレベルをモニタリングするため、ならびにヒトおよび/もしくは動物の、高レベルの天然の抗分泌因子タンパク質（NASP）を含む加工穀類（SPC）および/または機能性食品に対するコンプライアンスを検証するための、迅速かつ効率的なツールを初めてもたらす。

【0018】

単純ヘルペスウイルス1型

単純ヘルペス脳炎（HSE）は、西欧諸国におけるウイルス性脳炎の最も一般的な原因であり、最大20%のケースに関与する。年間100万人当たり2～4人の居住者に影響を及ぼし、HSEは、単純ヘルペスウイルス1型（HSV-1）の1次または反復感染のいずれかにより引き起こされる。HSEをもたらす脳の感染は、三叉神経、嗅索を介した、または両方の経路を介したウイルスの侵入後に生じることが示唆されている。HSEの初期段階において、嗅球（OB）ならびに嗅索におけるHSV-1抗原の存在量が、中枢神経系（CNS）における炎症および壊死の最終位置と関連することが報告されている。加えて、脳内、および2つの脳半球間でのウイルス拡散は、あまり大規模には調べられていないが、HSEの臨床症状の位置および発症に最も決定的でありそうである。

【0019】

げっ歯類モデルにおいて、マウスおよびラットにおける嗅索を介したHSEのウイルス拡散は、鼻腔からCNSに拡大することが観察された。嗅覚受容体ニューロンは、嗅覚上皮を通過し、篩板を貫通し、OBに入ってCNSに達する。OBにおいて、嗅覚受容体ニューロンは、糸球体において僧帽細胞（2次ニューロン）につながり、それは、次に、嗅覚系および辺縁系に突き出る。扁桃核、海馬およびOBを含む、辺縁系は、脳の最古の部分の進化したものであり、HSEは、辺縁系全体の灰白質に選択的損傷を引き起こすので、HSEの臨床症状は、HSV-1についての辺縁皮質への特有の親和性に起因することが示唆されている。故に、HSV-1は、進化した保存された経路を使用してOBから脳に通じるその通路を見出し得る。

【0020】

本出願は、さらに、補体C3およびC4は、それぞれ、HSV-1ウイルス感染後、プロテアソームとの複合体を形成することを初めて示す。この反応は、インタクトなプロテアソームに対する抗体、およびC3またはC4に対する抗体を使用したサンドイッチELISAで推定される。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0021】

【特許文献1】WO97/08202

【特許文献2】WO05/030246

【特許文献3】WO98/21978

10

20

30

40

50

【特許文献4】WO00/038535

【特許文献5】WO07/126364

【特許文献6】WO07/126363

【特許文献7】WO07/126365

【特許文献8】WO2010/093324

【非特許文献】

【0022】

【非特許文献1】The antisecretory factor: synthesis, anatomical and cellular distribution, and biological action in experimental and clinical studies, Int Rev Cytol, 2001、210巻:39~75頁

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0023】

本発明は、体液における異なるプロテアソーム - C3および/またはC4複合体形成を検出するための免疫学的アッセイおよび免疫学的アッセイキットを提供する。

【課題を解決するための手段】

【0024】

本明細書において、例えば、これらに限定されないが、進行中のウイルス感染症後および/もしくは中に、哺乳類の身体における炎症の状態、および前記哺乳類の身体における補体系(下方)制御をモニタリング、検証、および/または検出するため、ならびにヒトおよび/または動物の、高レベルの、卵黄(Salovum(著作権))のような天然の抗分泌タンパク質(NASP)を含む加工穀類(SPC)および/または機能性食品、栄養補助食品、飼料もしくは栄養補助飼料に対するコンプライアンスを検証するための、迅速かつ効率的なツールとなる、新規免疫学的アッセイおよび/または免疫学的アッセイキットが開示される。

20

【0025】

本免疫学的アッセイ、ならびに本免疫学的アッセイキットは、AF1のような、AFを曝露するプロテアソームを検出するため、もしくはインタクトなプロテアソームを検出するためのいずれかの、プロテアソームタンパク質に特異的な抗体、ならびにC3、C3c、C3b、iC3bのような補体因子C3に特異的な抗体、またはC4、C4b、iC4b、もしくはC4cのような補体因子C4に特異的な抗体から選択される、第1の抗体ならびに第2の抗体を少なくとも使用する。第1および第2の抗体は、同一の抗原に特異的ではない、すなわち、第1の抗体が、AF1もしくはインタクトなプロテアソームのようなプロテアソームタンパク質に特異的な抗体から選択されるとき、次に、第2の抗体は、C3、C3c、C3b、iC3bのような補体因子C3に特異的な抗体、またはC4、C4b、iC4b、もしくはC4cのような補体因子C4に特異的な抗体から選択されなければならない、または逆も同様である。2種より多くの選択された異なる抗体が存在するならば、選択されたものの少なくとも2種が、同一の抗原に特異的でない抗体から選択される必要がある、すなわち、1種の抗体が、AF1もしくはインタクトなプロテアソームのようなプロテアソームタンパク質に特異的な抗体から選択されるとき、次に、少なくとも1種の他の抗体は、C3、C3c、C3b、iC3bのような補体因子C3に特異的な抗体、またはC4、C4b、iC4b、もしくはC4cのような補体因子C4に特異的な抗体から選択されなければならない。

30

40

【0026】

抗体は、AF1もしくはインタクトなプロテアソームのようなプロテアソームタンパク質、またはC3、C3c、C3b、iC3bのような補体因子C3に特異的な市販の抗体、またはC4、C4b、iC4b、もしくはC4cのような補体因子C4に特異的な抗体、および/またはプロテアソームタンパク質AF1に特異的な抗体(例えば、受託番号D

50

S M A C C 3 2 7 1の下、D S M Zに寄託されている、A Fモノクローナル抗体(m A b)、ハイブリドーマ細胞培養物2341由来の3H8(=3H8B3)から選択される。第1の抗体と第2の抗体とのかかる組合せは、体液におけるプロテアソーム-C3および/またはプロテアソーム-C4複合体形成の迅速な測定、ならびに体液におけるA Fを曝露するプロテアソームの迅速な測定を可能にする。例えば、第1の抗体は、プロテアソームタンパク質A F 1または任意の他のプロテアソームエピトープに特異的な抗体からなる群から好ましくは選択され、第2の抗体は、C3、C3c、C3b、i C3bのような補体因子C3に特異的な抗体、またはC4、C4b、i C4b、もしくはC4cのような補体因子C4に特異的な抗体から好ましくは選択される。

【0027】

特に、体液におけるA Fの測定時間は、1~30、5~15、10~20、10~30、10~60分までのような、数十分まで、または10、20、30、40、50、60、90、120、もしくは180分以下まで短縮され、一方、体液におけるA Fの測定は、ほぼ1日を通常必要とした。その上、本免疫学的アッセイおよび/または本免疫学的アッセイキットは、当業者が、従前に必要とされたものより、ずっと少ないアリコート of 液体試料においてA Fのレベルを測定することを可能にする。

【0028】

プロテアソームと補体C3またはC4との間の一般的な反応を、一方で、プロテアソームエピトープに対して向けられた抗体、および他方で、補体因子3または4上のエピトープに対して向けられた抗体で測定することがさらに可能である。

【0029】

結果として、3つの特定の実施形態において、本発明は、体液における、1) A F 1-C3相互作用、2) インタクトなプロテアソーム-C3複合体形成、および/または3) インタクトなプロテアソーム-C4複合体形成を検出するためのキットであって、1) A Fのような、A Fを曝露するプロテアソームタンパク質に特異的な抗体、および補体因子C3、またはC3の誘導体に特異的な抗体、2) インタクトなプロテアソームのプロテアソームタンパク質に特異的な抗体、および補体因子C3、またはC3の誘導体に特異的な抗体、ならびに3) インタクトなプロテアソームのプロテアソームタンパク質に特異的な抗体、および補体因子C4、またはC4の誘導体に特異的な抗体を含むキットに関する。

【0030】

一実施形態において、キットは、第1の抗体および第2の抗体を使用して、体液におけるプロテアソーム-C3複合体形成、またはプロテアソーム-C4複合体形成の存在もしくは不存在、および/または濃度を決定するための免疫学的アッセイキットであって、第1の抗体が担体に固定され、第2の抗体が標識物質で修飾されており、第1の抗体および第2の抗体が、A F 1もしくはインタクトなプロテアソームのようなプロテアソームタンパク質に特異的な抗体、および補体因子C3、もしくはC3の誘導体、または補体因子C4、もしくはC4の誘導体に特異的な抗体から選択される、免疫学的アッセイキットである。

【0031】

補体因子C3またはC4の誘導体は、本文脈において、C3c、C3b、i C3b、C4b、i C4b、およびC4cからなる群から選択される。

【0032】

本発明による免疫学的アッセイキットは、E L I S A試験キットであってよい。

【0033】

本発明の一実施形態において、本発明による免疫学的アッセイキットは、プロテアソームタンパク質A F 1に特異的な抗体を含み、これは、モノクローナル抗体3H8であり、本明細書においてm A b 3H8(受託番号D S M A C C 3 2 7 1の下、D S M Zに寄託されている、A Fモノクローナル抗体(m A b)、ハイブリドーマ細胞培養物2341由来の3H8(=3H8B3))と称される。本発明の一実施形態において、本発明による免疫学的アッセイキットは、補体因子C3cに特異的なポリクローナル抗体である、補

10

20

30

40

50

体因子 C 3 c に特異的な抗体を含む。

【 0 0 3 4 】

本発明の一実施形態は、プロテアソームタンパク質 A F 1 に特異的な抗体（例えば、A F モノクローナル抗体（m A b）、ハイブリドーマ細胞培養物 2 3 4 1 由来の 3 H 8（= 3 H 8 B 3）、これは、受託番号 D S M A C C 3 2 7 1 の下、D S M Z に寄託されている）、および補体因子 C 3 c に特異的なポリクローナル抗体である、補体因子 C 3 c に特異的な抗体を含む、本発明による免疫学的アッセイキットに関する。

【 0 0 3 5 】

さらに本明細書において、第 1 の抗体および第 2 の抗体を使用して、体液におけるプロテアソーム - C 3 複合体形成またはプロテアソーム - C 4 複合体形成の存在もしくは不
10
存在、および/または濃度を決定するための免疫学的アッセイであって、第 1 の抗体が担体に固定され、第 2 の抗体が標識物質で修飾されており、第 1 の抗体および第 2 の抗体が、A F 1 もしくはインタクトなプロテアソームのようなプロテアソームタンパク質に特異的な抗体（例えば、受託番号 D S M A C C 3 2 7 1 の下、D S M Z に寄託されている、A F モノクローナル抗体（m A b）、ハイブリドーマ細胞培養物 2 3 4 1 由来の 3 H 8（= 3 H 8 B 3））、および C 3、C 3 c、C 3 b、i C 3 b のような補体因子 C 3 に特異的な抗体、または C 4、C 4 b、i C 4 b、もしくは C 4 c のような補体因子 C 4 に特異的な抗体から選択される、免疫学的アッセイが記載される。かかる免疫学的アッセイは、E L I S A 試験であってよい。第 1 の抗体は、プロテアソームタンパク質 A F 1 に特異的な
20
抗体（例えば、L M P 2 に特異的な抗体、2 0 S アルファ 6 に特異的な抗体、2 0 S アルファ 1、2、3 もしくは 4 に特異的な抗体、および R p t 5 に特異的な抗体）からなる群から好ましくは選択され、第 2 の抗体は、C 3、C 3 c、C 3 b、i C 3 b のような補体因子 C 3 に特異的な抗体、または C 4、C 4 b、i C 4 b、もしくは C 4 c のような補体因子 C 4 に特異的な抗体からなる群から好ましくは選択される。

【 0 0 3 6 】

本発明の一実施形態において、本発明による免疫学的アッセイは、プロテアソームタンパク質 A F 1 に特異的な抗体を含む。現在好ましい実施形態において、選択される抗体は、受託番号 D S M A C C 3 2 7 1 の下、D S M Z に寄託されている、A F モノクローナル抗体（m A b）、ハイブリドーマ細胞培養物 2 3 4 1 由来の 3 H 8（= 3 H 8 B 3）である。
30

【 0 0 3 7 】

本発明の一実施形態において、本発明による免疫学的アッセイは、補体因子 C 3 に特異的なポリクローナル抗体である、補体因子 C 3 に特異的な抗体を含む。

【 0 0 3 8 】

本発明の一実施形態において、本発明による免疫学的アッセイは、補体因子 C 3 c に特異的なポリクローナル抗体である、補体因子 C 3 c に特異的な抗体を含む。

【 0 0 3 9 】

本発明の一実施形態において、本発明による免疫学的アッセイは、補体因子 C 4 に特異的なポリクローナル抗体である、補体因子 C 4 に特異的な抗体を含む。

【 0 0 4 0 】

体液におけるプロテアソーム - C 3 複合体形成を検出する方法であって、体液を、A F 1 またはインタクトなプロテアソームのようなプロテアソームタンパク質に特異的な抗体、および C 3 c のような補体因子 C 3 に特異的な抗体を含む免疫学的アッセイに供することを
40
含む方法がさらに開示される。抗体は、プロテアソームタンパク質 A F 1 に特異的な抗体、L M P 2 に特異的な抗体、2 0 S アルファ 6 に特異的な抗体、2 0 S アルファ 1、2、3 または 4 に特異的な抗体、および R p t 5 に特異的な抗体からなる群から好ましくは選択され、他方の抗体は、C 3、C 3 c、C 3 b、i C 3 b のような、補体因子 C 3 に特異的な抗体からなる群から好ましくは選択される。

【 0 0 4 1 】

体液におけるプロテアソーム - C 4 複合体形成を検出する方法であって、体液を、A F
50

1 またはインタクトなプロテアソームのようなプロテアソームタンパク質に特異的な抗体、およびC4cのような補体因子C4に特異的な抗体を含む免疫学的アッセイに供することを含ま方法がさらに開示される。抗体は、プロテアソームタンパク質AF1に特異的な抗体、LMP2に特異的な抗体、20Sアルファ6に特異的な抗体、20Sアルファ1、2、3または4に特異的な抗体、およびRpt5に特異的な抗体からなる群から好ましくは選択され、他方の抗体は、C4、C4b、iC4b、またはC4cのような、補体因子C4に特異的な抗体からなる群から好ましくは選択される。

【0042】

本発明による体液におけるプロテアソーム - C3複合体形成および/またはプロテアソーム - C4複合体形成を検出する方法は、ELISA試験として行ってよい。

10

【0043】

本発明の一実施形態において、体液におけるプロテアソーム - C3複合体形成を検出する前記方法は、プロテアソームタンパク質AF1に特異的な抗体（例えば、受託番号DSM ACC3271の下、DSMZに寄託されている、AFモノクローナル抗体(mAb)、ハイブリドーマ細胞培養物2341由来の3H8(=3H8B3))の使用を含む。

【0044】

本発明の一実施形態において、体液におけるプロテアソーム - C3複合体形成を検出する前記方法は、補体因子C3に特異的なポリクローナル抗体である、補体因子C3に特異的な抗体の使用を含む。

【0045】

20

本発明の一実施形態において、体液におけるプロテアソーム - C3複合体形成を検出する前記方法は、補体因子C3cに特異的なポリクローナル抗体である、補体因子C3cに特異的な抗体の使用を含む。

【0046】

本発明の一実施形態において、体液におけるプロテアソーム - C4複合体形成を検出する方法は、補体因子C4に特異的なポリクローナル抗体である、補体因子C4に特異的な抗体の使用を含む。

【0047】

本明細書において開示される、キット、アッセイ、および/または方法は、血液、血漿、尿、乳、唾液、卵黄、涙液、精液、膣液、痰、滑液、胃液、脳脊髄液、眼の液体、膿、および粘液からなる群から選択される非常に様々な体液におけるプロテアソーム - C3複合体形成および/またはプロテアソーム - C4複合体形成を測定、決定、モニタリング、および/または検出するために利用することができる。

30

【0048】

本発明は、哺乳類の身体における炎症のレベルを検出、測定、決定、および/またはモニターするため、ならびに哺乳類の身体における、下方制御のような補体系制御を検出、測定、決定、および/またはモニタリングするための、本明細書に記載されるキット、アッセイ、および/または方法の使用をさらに含む。

【0049】

その上、本発明は、一実施形態において、卵黄のような、高レベルの天然の抗分泌タンパク質(NASP)を含む加工穀類(SPC)および/もしくは機能性食品の有効性、ならびに/またはヒトおよび/もしくは動物の、卵黄のような、高レベルの天然の抗分泌タンパク質(NASP)を含む加工穀類(SPC)および/もしくは機能性食品に対するコンプライアンスを検証するための、本発明によるキット、アッセイ、および/または方法の使用を含む。

40

【0050】

本明細書において以下で、本発明の実施形態が詳細に記載される。以下で個々に開示される実施形態は、本発明の免疫学的アッセイおよび免疫学的アッセイキット、ならびに方法および意図される使用の例であることに留意されたい。本発明は、これらの例に限定されない。

50

【図面の簡単な説明】

【0051】

【図1】2種の異なる方法によるヒト血漿における抗分泌因子(A F)の検出の図である。被検人4~6は、特別加工穀類(S P C)を消費し、人1~3は対照であった。図1 aにおいて、血漿は、タンパク質サブユニットA F 1に対するモノクローナル抗体(P S M D 4)での免疫検出の前に、アガロースゲル上で精製された。図1 bにおいて、血漿は、表1に記載されるプロテアソーム-補体C 3複合体を検出する、ダブルE L I S Aにおいて直接展開された。捕獲抗体は、抗A F 1(明るいカラム)または抗L M P 2(黒色カラム)のいずれかであり;検出抗体は抗C 3 cであった。Y軸値は、逆力価として示す。

【図2】C 3 cに対する抗体を使用した健常人由来の血漿のウエスタンブロットの図である。人1および2は対照であり;人3および4は、特別加工穀類(S P C)を消費した。被検人において、C 3のより大きなおよびより小さなペプチドへの部分的変換が観察された。ウェル5は、37 °Cにおいて4時間アガロースゲルとの*in vitro*でのインキュベーション後の人1由来の血漿を示し、-のc-ペプチドへの総変換を明らかにする。-、-、およびc-ペプチドの分子量は、それぞれ、115、75、および43 k D aである。

【図3】プロテアソーム-結合補体3タンパク質のウエスタンブロットの図である。血漿をアガロースゲルとインキュベーションして、凝集したプロテアソームおよびC 3タンパク質を得た。プロテアソームは、マトリックス-結合抗プロテアソーム抗体により続いて精製された。図は、プロテアソームで同時に精製されたC 3の および サブユニットを示す(列2;列1における参照)。

【図4】表1 サンドイッチE L I S Aにおいて決定される、A F 1 / C 3凝集体に対するアガロースによる刺激の効果を示す図である。人1~3は対照であり;人4~6は加工穀類を消費した。アガロースゲルとのインキュベーションは、全ての試料においてC 3へのプロテアソーム結合を実質的に刺激した。逆力価として与えられたデータ。

【図5】表2 血漿における補体因子I(C F I)およびH(C F H)の濃度を示す図である。人1~3は対照であり;人4~6は加工穀類を消費した。対照群と比較して、試験群における因子Iまたは因子H濃度の有意な差は存在しない。逆力価として与えられたデータ。

【図6 A】4日間H S V 1(H S V、N = 6)または対照としてP B S(C T R、N = 5)を鼻腔内に負荷されたS Dラットの図である。捕獲抗体としてプロテアソームサブユニット(20 S 4、20 S 6、L M P 2、L M P 7、R P T 5)に対するモノクローナル抗体、および検出抗体として補体C 3に対するポリクローナル抗体を用いたダブルE L I S A。血漿および髄液において、20 S 6サブユニットとC 3との複合体は、有意により高く(それぞれ、 $p < 0.05$ および $p < 0.01$)、L M P 2または20 S 4と補体C 3は、血漿において有意により高かった。

【図6 B】4日間H S V 1(H S V、N = 6)または対照としてP B S(C T R、N = 5)を鼻腔内に負荷されたS Dラットの図である。捕獲抗体としてプロテアソームサブユニット(20 S 4、20 S 6、L M P 2、L M P 7、R P T 5)に対するモノクローナル抗体、および検出抗体として補体C 3に対するポリクローナル抗体を用いたダブルE L I S A。血漿および髄液において、20 S 6サブユニットとC 3との複合体は、有意により高く(それぞれ、 $p < 0.05$ および $p < 0.01$)、L M P 2または20 S 4と補体C 3は、血漿において有意により高かった。

【図6 C】4日間H S V 1(H S V、N = 6)または対照としてP B S(C T R、N = 5)を鼻腔内に負荷されたS Dラットの図である。捕獲抗体としてプロテアソームサブユニット(20 S 4、20 S 6、L M P 2、L M P 7、R P T 5)に対するモノクローナル抗体、および検出抗体として補体C 3に対するポリクローナル抗体を用いたダブルE L I S A。血漿および髄液において、20 S 6サブユニットとC 3との複合体は、有意により高く(それぞれ、 $p < 0.05$ および $p < 0.01$)、L M P 2または20 S 4と補体C 3は、血漿において有意により高かった。

10

20

30

40

50

【図7】4日間HSV1 (HSV)または対照としてPBS (CTR)を鼻腔内に負荷されたSDラットの図である。捕獲抗体としてプロテアソームサブユニット(20S 6)に対するモノクローナル抗体、および検出抗体として補体C4に対するポリクローナル抗体を用いたダブルELISA。血漿および髄液において、20S 6サブユニットとC4との複合体は、有意により高かった($p < 0.05$)。

【図8】アガロース精製した血漿の2D分析の図である。試料は、SPC摂取の前(A)および4週間後(B)に3人の個人1~3から採取された。Immobiline乾燥ストリップpH3~10が、等電点電気泳動のため、10%トリス-グリシンゲルが、2次元のため使用された。左に、分子量標準が適用され、40kDaのバンドが示される。タンパク質含有量は、銀染色により視覚化された。続く分析のため選択されたスポットが、矢印で示される。

10

【図9】表3 AFのSPC誘導後のアガロース精製された血漿の2D分離後の銀染色したゲルにおいて選んだスポットについてのLC-MS/MS同定の要約を示す図である。混入タンパク質は、結果から除去された。* = プロピオンアミドでの配列修飾が、文字cとして挿入される。

【図10】AFのSPC導入後の分離されたアガロース精製された血漿での2Dゲルにおけるウエスタンブロットの図である。1次元電気泳動等電点電気泳動が、7cmのストリップゲル、pH3~10にて実行され、一方、10%トリス-グリシンゲルが、2次元のため使用された。PVDf膜は、抗C3cとインキュベーションされた。左に、40および80kDaのバンドを示す、分子量標準が適用される。

20

【図11】抗C3cを使用したELISAにより試験された、アガロース精製された血漿($n = 4$)におけるC3cのレベルの図である。SPC摂取の前および6週間後由来の試料が分析され、正味の吸光度レベルが決定された。データは、平均 \pm SEMとして示される。* * SPC食の前と後に採取された試料間の有意差($p = 0.0039$)。

【図12】AF活性および補体因子のELISA決定の図である。SPCの摂取前、中、および1週間後の、3人の個人由来のアガロース精製された血漿における、(A)モノクローナル抗体AF 3H8(受託番号DSM ACC3271の下、DSMZに寄託されている、AFモノクローナル抗体(mAb)、ハイブリドーマ細胞培養物2341由来の3H8(=3H8B3))、およびC3c、C4c、または因子Hに対して反応する抗体(B、C、D)で決定された、AF活性および補体因子のレベル。データは、平均 \pm SEMとして表される。試料間の有意差は、* = $p < 0.05$ および* * = $p < 0.01$ により視覚化される。

30

【図13】ヒト血漿における抗C3c検出を使用したウエスタンブロット分析の図である。レーン1: SPC摂取前の直接の血漿。レーン2: SPC摂取後の直接の血漿。レーン3: SPC摂取前のアガロース精製された血漿。レーン4: SPC摂取後のアガロース精製された血漿。中心において、分子量標準が適用され、43および75kDaのバンドが印づけられる。

【図14A】DSM ACC3271についての寄託の図である。

【図14B】DSM ACC3271についての寄託の図である。

【図14C】DSM ACC3271についての生存率検証の図である。

40

【図14D】DSM ACC3271についての生存率検証の図である。

【図15】DSM ACC3271についての寄託者の宣誓の図である。

【発明を実施するための形態】

【0052】

定義および略語

略語

IFP: 間質液圧;

PBS: リン酸緩衝食塩水;

AF: 抗分泌因子、全長AFタンパク質(配列番号1において示される)

AF-6: ヘキサペプチドCHSKTR(配列番号2において示される);

50

A F - 1 6 : アミノ酸 V C H S K T R S N P E N N V G L で構成されるペプチド (配列番号 3 において示される) ;

A F - 8 : セプタペプチド V C H S K T R (配列番号 4 において示される) ;

オクタペプチド I V C H S K T R (配列番号 5 において示される) ;

ペンタペプチド H S K T R (配列番号 6 において示される) ;

S P C : 特別加工穀類 ;

R T T : A F (A S P) の含有量の測定について S E 9 0 0 0 0 2 8 - 2 (公開番号第 4 6 6 3 3 1 号) において公開されている、ラット小腸における標準化分泌応答を測定する方法 ;

A F : 抗分泌因子 ;

E L I S A : 酵素結合免疫吸着アッセイ ;

P B S : リン酸緩衝食塩水 ;

A P : アルカリホスファターゼ ;

B S A : ウシ血清アルブミン ;

m A b : モノクローナル抗体 ;

L C - M S / M S : ナノフロー液体クロマトグラフィー - タンデム質量分析 ;

P A G E : ポリアクリルアミドゲル電気泳動 ;

H S V 1 : 単純ヘルペスウイルス 1 型

【 0 0 5 3 】

定義

タンパク質は、ペプチド結合により一緒に結合されるアミノ酸残基により構築される生物学的高分子である。アミノ酸の直線状ポリマーとしてのタンパク質は、ポリペプチドとも呼ばれる。典型的には、タンパク質は、50 ~ 800 個のアミノ酸残基を有し、故に、約 6 , 0 0 0 ~ 約数十万ダルトンまたはそれ以上の範囲内の分子量を有する。小さいタンパク質は、ペプチド、ポリペプチド、またはオリゴペプチドと呼ばれる。用語「タンパク質」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」は、本文脈において互換的に用いられる。ペプチドは、2 ~ 50 個のアミノ酸残基 (a a) のような、非常に少数のアミノ酸残基を有する。

【 0 0 5 4 】

用語「抗分泌性」は、本文脈において、分泌および/または体液輸送を阻害すること、または低減することを指す。本文脈において、用語「抗分泌因子タンパク質」、「抗分泌因子 (A F) タンパク質」、「A F - タンパク質」、A F、またはその相同体、誘導体、もしくは断片は、W O 9 7 / 0 8 2 0 2 において定義される、用語「抗分泌因子」または「抗分泌因子タンパク質」と互換的に用いられ、抗分泌活性ならびに/または均等な機能活性および/もしくは類似の活性を有する抗分泌因子 (A F) タンパク質もしくはペプチド、またはその相同体、誘導体および/もしくは断片、またはペプチドの機能が変化していないその修飾物を指す。故に、本文脈における「抗分泌因子」、「抗分泌因子タンパク質」、「抗分泌ペプチド」、「抗分泌断片」、または「抗分泌因子 (A F) タンパク質」はまた、その誘導体、相同体、または断片を指し得ることは理解されるべきである。これらの用語は、本発明の文脈において互換的に全て使用される。さらに、本文脈において、用語「抗分泌因子」は、「A F」と省略される。本文脈における抗分泌因子 (A F) タンパク質はまた、W O 9 7 / 0 8 2 0 2 および W O 0 0 / 3 8 5 3 5 において従前に定義された、抗分泌特性を有するタンパク質も指す。抗分泌因子はまた、例えば、W O 0 5 / 0 3 0 2 4 6 においても開示されている。

【 0 0 5 5 】

S P C (著作権) は、特別加工穀類 (S P C) を含む医療食品である。

【 0 0 5 6 】

「医療食品」は、本文脈において、食品、補助飼料もしくは食品、または特別な食事療法上の使用のための食品を指し、これは、抗分泌因子 (A F) タンパク質で調製されるか、あるいは内在性 A F の合成および/もしくは活性化を誘導する能力を有する。前記食品

10

20

30

40

50

は、液体もしくは粉末のような、流体もしくは固体形態の任意の適当な食品、または任意の他の適当な食糧である。かかる事項の例は、W O 0 0 3 8 5 3 5 または W O 9 1 / 0 9 5 3 6 において見られる。

【 0 0 5 7 】

抗分泌因子という用語によりまた意図される S a l o v u m (著作権) は、例えば、S E 9 0 0 0 2 8 - 2 および W O 0 0 / 3 8 5 3 5 において開示され、以下でさらに記載される、高含有量の抗分泌因子 (N A S P) を有する卵黄として提供される天然抗分泌因子 (N A S P) である。

【 0 0 5 8 】

コンプライアンスは、アドヒアランスまたは維持と区別される、患者が規定のレジメンに従う恒常性および正確さの程度を記載するために本文脈において利用される。それは、彼または彼女自身の健康管理における患者の積極的な参加；医療アドバイスを求めること、約束を守ること、ライフスタイルに関する提案に従うこと、ならびに医療レジメンに従うことを包含する。

【 0 0 5 9 】

発明の詳細な説明

臨床研究は、炎症および/または分泌障害を含む慢性疾患を有する患者が、低い血漿 A F 活性を有することを示した (L a n g e ら、2003年；L a u r e n i u s ら、2003年)。したがって、慢性病において、疾患プロセスは、A F 活性における内在性の増大に十分な刺激でないように見える。依然、これらの患者は、A F 活性における食事により誘導される上昇の恩恵を受け得る。

【 0 0 6 0 】

ポリクローナル抗体を使用した、本発明者らによる従前の研究は、組織において、多数の A F の構造上の変異体が存在することを示し (J e n n i s c h e ら、2006年)、A F 活性の制御が、構造上の変化に関与し、それが、A F タンパク質の活性な配列を曝露するか、または隠すことが示唆された。血漿に存在する A F の大部分が、抗分泌の不活性な状態にあり、A F の分画の活性化が、細菌の毒素での腸の負荷に対する、または特定の食品化合物に対する応答として生じる。本開示は、活性化ステップが、プロテアソーム中の A F 1 タンパク質の抗分泌部位の曝露を含むことを証明する。

【 0 0 6 1 】

本発明者らは、A F 1 のアガロースへの結合の増大が、その抗分泌および抗炎症活性に結び付けられることを以前に示した。驚くべきことに、S P C の消費は、A F 1 のアガロースへの結合ばかりでなく、補体因子 C 3 への結合も導くことが本明細書において開示される。A F 1 と C 3 との間の関連は、最小量のみ血漿を必要とする高感度 E L I S A 試験により示される。以前に使用された試験は、アガロースカラム上での一次精製が行われなければならないので、10倍より多い血漿を必要とし、より長時間を費やす。結果は、制御性 1 9 S サブユニットばかりでなく、触媒性 2 0 S サブユニットも、C 3 と関連することをさらに示す。

【 0 0 6 2 】

モノクローナル A F 1 抗体 (受託番号 D S M A C C 3 2 7 1 の下、D S M Z に寄託されている、A F モノクローナル抗体 (m A b)、ハイブリドーマ細胞培養物 2 3 4 1 由来の 3 H 8 (= 3 H 8 B 3)) が、インタクトなプロテアソームと反応しないことが、本明細書において初めて開示され、タンパク質構造の開放が、S P C の摂取後、C 3 の結合において生じることを示している。したがって、通常、A F 1 が、1 9 S プロテアソームサブユニットと 2 0 S プロテアソームサブユニットとの間で隠されることを示しているが、C 3 c との反応は、A F 複合体の抗分泌活性に関与するペプチド配列を広げるように見える。

【 0 0 6 3 】

プロテアソームへの結合は、C 3 のその不活性な形態、C 3 c への変換を導く。C 3 の C 3 c への分割が、タンパク質分解性補体因子 I を、補因子としての因子 H と常に関与さ

10

20

30

40

50

せることは、以前示された。循環性プロテアソームは補因子としても作用するか、またはむしろタンパク質分解性分割において直接含まれるかどうかは、見られるままである。C3の鎖全体をC3cに変換するアガロースの能力は、優れている。血漿は異なる表面活性材料に曝露されたので、本開示に先立ち、C3cへの部分的な変換のみが記載されている。

【0064】

その上、ウイルス感染は、プロテアソームと補体因子C3および/またはC4との間の複合体形成を誘導することが、初めて示される。細胞内プロテアソームは、例えば、NF-Bの活性化中、炎症の開始中に重要な役割を果たす。リポ多糖によるインフラマソーム初回刺激は、プロテアソーム機能に依存する。本発明を化学的仮説に限定することを望むことなく、恐らく、血中のプロテアソームは、補体作用を増強することにより、炎症の引き金を引く。他方、SPCは、プロテアソームとC3補体因子の下方制御を引き起こす、プロテアソームならびに補体の分割を引き起こすことにより、これに対抗する。この仮説は、プロテアソーム阻害性食品成分を用いた最近の実験により強化され、それは、患者において抗炎症性に作用する。さらに、ある種の食品成分は、血中のC3レベルを低減する能力を有し、これは、プロテアソーム-C3凝集に起因する。

10

【0065】

体液におけるインタクトなプロテアソームの従前の研究は存在しない。しかしながら、GeneCardsによると、AF1のような分離したプロテアソームタンパク質は、組織中と同一の濃度、例えば、1ppmにおいて血漿で生じると想定される(<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PSMD4>)。この濃度は、現在提示される推定値、ならびに循環性20Sプロテアソームサブユニットの報告されたレベルより高い。矛盾は、血中のプロテアソームが、組織中のものと異なり、それは、開示されるアッセイにおける標準として使用されることを示唆する。興味深いことに、循環性20Sプロテアソームの濃度は、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、およびシェーグレン病のような、自己免疫疾患と相関する。これらの20Sサブユニットが、19S制御性サブユニットとも関連するかどうかは、未解決の問題である。

20

【0066】

結論として、初めて、プロテアソームと補体因子3との複合体、およびプロテアソームと補体因子C4との複合体の存在が、それぞれ、開示される。この形成は、単純ヘルペスウイルス1型により本明細書において誘導されるが、もちろん他の炎症剤により誘導することができる。この反応は、プロテアソーム-補体複合体の分解を導くSPCの消費により対抗され、ここで、成分の両方が、部分的に分割され：隠れた抗分泌ペプチド配列を曝露するプロテアソーム、およびC3cに変換されているC3を導く。

30

【0067】

この見識は、抗原-抗体反応を利用した、試料に含有されるプロテアソーム-C3複合体形成を測定するための新しい免疫学的アッセイの開発を導き、ここで、第1の抗体および第2の抗体の上述の組合せは、体液におけるプロテアソーム-C3複合体形成および/またはプロテアソーム-C4複合体形成の迅速な測定を可能にするような組合せである。特に、体液における1)プロテアソーム-C3形成、2)プロテアソームC4形成、および3)AFを曝露するプロテアソーム、ならびに血漿中の循環性26Sプロテアソームを決定することのできる、いくつかの新しいELISA方法が記載される。

40

【0068】

免疫学的アッセイ

本発明の一実施形態において、本発明の免疫学的アッセイは、抗原-抗体反応を利用した、試料に含有されるプロテアソーム-C3複合体形成を測定するための免疫学的アッセイであり、ここで、第1の抗体と第2の抗体の上述の組合せは、プロテアソーム-C3複合体形成の迅速な測定を可能にするような組合せである。

【0069】

50

本発明の別の実施形態において、本発明の免疫学的アッセイは、抗原 - 抗体反応を利用した、試料に含有されるプロテアソーム - C 4 複合体形成を測定するための免疫学的アッセイであり、ここで、第 1 の抗体と第 2 の抗体の上述の組合せは、プロテアソーム - C 4 複合体形成の迅速な測定を可能にするような組合せである。

【 0 0 7 0 】

本発明のなお別の実施形態において、本発明の免疫学的アッセイは、抗原 - 抗体反応を利用した、試料に含有される A F 1 曝露プロテアソーム - C 3 複合体形成を測定するための免疫学的アッセイであり、ここで、第 1 の抗体と第 2 の抗体の上述の組合せは、A F 1 曝露プロテアソーム - C 3 複合体形成の迅速な測定を可能にするような組合せである。

【 0 0 7 1 】

すなわち、本発明の免疫学的アッセイは、測定されるべき物質である、A F 1 またはインタクトなプロテアソームのようなプロテアソームタンパク質への第 1 の抗体結合と、補体因子 C 3 もしくは C 4、または C 3 もしくは C 4 の誘導体への第 2 の抗体結合との組合せとして可能な組合せのいずれか 1 つを使用した、プロテアソーム - 補体複合体形成を測定するための免疫学的アッセイである。上記によると、本発明の免疫学的アッセイは、試料に含有されるプロテアソーム - 補体複合体形成の迅速な測定を可能にする。

【 0 0 7 2 】

免疫学的アッセイの例は、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A、E I A)、蛍光イムノアッセイ (F I A)、ラジオイムノアッセイ (R I A)、発光イムノアッセイ (L I A)、酵素抗体技術、蛍光抗体アッセイ、イムノクロマトグラフィー、免疫比濁法、ラテックス比濁法、およびラテックス凝集アッセイを含む。

【 0 0 7 3 】

さらに、本発明の免疫学的アッセイにおける測定は、手動で、または分析装置のような装置を使用して行われる。

【 0 0 7 4 】

さらに、本発明の免疫学的アッセイは、公知の方法により操作される。例えば、担体に固定された第 1 の抗体、試料、および標識物質で修飾された第 2 の抗体は、同時に、または連続して反応される。「担体に固定された第 1 の抗体と、標識物質で修飾された第 2 の抗体」の複合体は、上記反応により形成され、試料に含有されるプロテアソーム - 補体複合体形成の量 (濃度) は、複合体に含有される、標識物質で修飾された第 2 の抗体の量に基づき、測定される。

【 0 0 7 5 】

例えば、酵素結合免疫吸着アッセイは、第 1 の抗体が固定されたマイクロプレート、検体の希釈溶液、H R P のような酵素で修飾された第 2 の抗体、洗浄バッファー、および基質溶液を使用して行われる。さらに、測定は、第 2 の抗体を修飾する酵素が、酵素に最適な条件下でその基質と反応させること、および光学的な方法により酵素反応の生成物の量を測定することなどにより行われる。

【 0 0 7 6 】

また、蛍光イムノアッセイは、第 1 の抗体が固定された光導波路、検体の希釈溶液、蛍光物質で修飾される第 2 の抗体、および洗浄バッファーを使用して行われる。また、測定は、第 2 の抗体を修飾する蛍光物質を励起光で照射すること、および蛍光物質により放出された蛍光の強度を測定することにより行われる。

【 0 0 7 7 】

さらに、ラジオイムノアッセイが行われるとき、放射性物質により放出された放射線の量が測定される。また、発光イムノアッセイが行われるとき、発光反応系から放出された光の量が測定される。

【 0 0 7 8 】

さらに、免疫比濁法、ラテックス比濁法、ラテックス凝集アッセイなどが行われるとき、透過光および散乱光は、エンドポイント法またはレート法により測定される。また、イムノクロマトグラフィーなどが、視覚的に行われるとき、試験ラインに出現する標識物質

10

20

30

40

50

の色が、視覚的に測定される。分析装置のような機器は、視覚的測定の代わりに用いられることは注意されるべきである。

【0079】

本発明の免疫学的アッセイまたは方法において使用されるべき試料は、哺乳類の血液、血清、血漿、乳、涙液、涙、精液、精漿、腔液、唾液、痰、汗、腹水、羊水、滑液、胃液、脳脊髄液、髄液、眼の液体、膿、および/または粘液を含む体液のような、プロテアソーム-補体複合体を含有する可能性のある生物学的試料の全てを含む。

【0080】

本発明の免疫学的アッセイまたは方法において使用されるべき試料は、任意の哺乳類から回収される。一実施形態において、哺乳類は、ヒト、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、げっ歯類、イヌ、ネコ、またはラクダからなる群から選択される。

10

【0081】

本発明の特定の一実施形態において、本発明の免疫学的アッセイまたは方法において使用されるべき試料は、雌鶏のような、トリから回収される。当業者は、この特定の実施形態において、トリ抗原に対する抗体が選択される必要があることが分かる。したがって、選択される抗体は、測定されるべき物質である、AF1またはインタクトなプロテアソームのようなトリプロテアソームタンパク質に結合する第1の抗体、およびトリ補体因子C3もしくはその誘導体、または補体因子C4もしくはその誘導体に結合する第2の抗体である。本発明の免疫学的アッセイまたは方法のこの特定の実施形態において使用されるべき試料は、特に、血液、血清、血漿、およびこれに限定されないが、雌鶏のようなトリの卵黄を含む体液のようなプロテアソーム-補体複合体を含有する可能性がある生物学的試料の全てを含む。

20

【0082】

免疫学的アッセイキット

本発明の免疫学的アッセイキットは、抗原-抗体反応を利用した、試料に含有されるプロテアソーム-C3複合体形成、プロテアソーム-C4複合体形成、およびAF1曝露プロテアソーム-C3c複合体形成を測定するために免疫学的アッセイキットであり、ここで、第1の抗体と第2の抗体との上述の組合せは、プロテアソーム-補体複合体形成の迅速な測定を可能にするような組合せである。

【0083】

本発明による免疫学的アッセイキットは、本発明の上述の免疫学的アッセイのために使用することができる。したがって、上述の免疫学的アッセイに類似の測定原理などは、本発明の免疫学的アッセイキットに適用する。

30

【0084】

免疫学的アッセイキットにおける他の試薬成分

本発明の免疫学的アッセイキットにおいて、種々の水性溶媒が、溶媒として用いられる。水性溶媒の例は、精製水、生理食塩水、またはトリスバッファー、リン酸バッファー、もしくはリン酸緩衝生理食塩水のような種々のバッファーを含む。特定の制限は、これらのバッファーのpHに課せられず、適当なpHが適当に選択されるが、pHは、pH3~12の範囲内で一般に選択される。

40

【0085】

さらに、本発明の免疫学的アッセイキットは、担体に固定された上述の第1の抗体および標識物質で修飾された第2の抗体に加えて、1種またはそれ以上の、ウシ血清アルブミン(BSA)、ヒト血清アルブミン(HSA)、カゼイン、もしくはその塩のようなタンパク質、種々の塩、種々の糖、脱脂粉乳、正常なウサギ血清のような種々の動物の血清、アジ化ナトリウムおよび抗生物質のような種々の保存剤、活性化因子、反応促進剤、ポリエチレングリコールのような感度増強剤、非特異的反応阻害剤、非イオン界面活性剤、両性界面活性剤、もしくは陰イオン界面活性剤のような種々の界面活性剤などを適当に含む。特定の制限は、アッセイ試薬中のこれらの物質の濃度に課せられないが、濃度は、0.001~10%(W/V)であってよく、特に、0.01~5%(W/V)であってよい

50

。

【0086】

免疫学的アッセイキットの組成

上述の第1ならびに第2の抗体が、測定されるべき物質である、AF1またはインタクトなプロテアソームのようなプロテアソームタンパク質に結合している第1の抗体、およびC3、C3c、C3b、iC3bのような補体因子C3に結合している第2の抗体、またはC4、C4b、iC4b、もしくはC4cのような補体因子C4に特異的な抗体の少なくとも1つを含む限り、特定の制限は、本発明の免疫学的アッセイキットに課せられない。典型的には、少なくとも第1および第2の抗体は、別々の容器において提供される。

【0087】

さらに、販売用の本発明の免疫学的アッセイキットは、上述の2種の抗体を含有する試薬に加えて、組合せでおよび別々の他の試薬を含んでよい。

【0088】

上述の他の試薬の例は、バッファー、試料の希釈溶液、試薬の希釈溶液、標識物質を含有する試薬、発色のようなシグナルを生じる物質を含有する試薬、発色のようなシグナルの生成に關与する物質を含有する試薬、校正のための物質を含有する試薬、精度制御のために使用される物質を含有する試薬を含む。

【0089】

次に、本発明の上述の他の試薬および免疫学的アッセイ試薬は、種々の組合せで適当に使用され、販売され、例えば、他の試薬が、第1の試薬として提供され、本発明の免疫学的アッセイ試薬が、第2の試薬として提供されるか、または本発明の免疫学的アッセイ試薬が、第1の試薬として提供され、上述の他の試薬が、第2の試薬として提供される。

【0090】

また、特定の制限は、本発明の免疫学的アッセイキットの構成に課せられない一方、単純な方法で迅速な測定を行うために、本発明の免疫学的アッセイキットは、一体化された診断キットとして提供され、ここに、本発明の免疫学的アッセイキットの成分が組込まれる。特定の制限は、上述の一体化された診断キットに課せられないが、その例は、ELISAキット、蛍光イムノアッセイキット、およびイムノクロマトグラフィーキットを含む。

【0091】

例えば、ELISAキットの配置は、第1の抗体が固定されたマイクロプレート、検体の希釈溶液、HRPのような酵素で修飾された第2の抗体、洗浄バッファー、基質溶液などを含む。

【0092】

さらに、蛍光イムノアッセイキットが提供されるとき、キットは、第1の抗体が固定された光導波路、検体の希釈溶液、蛍光物質で修飾された第2の抗体、洗浄バッファーなどを含む。

【0093】

さらに、イムノクロマトグラフィーキットが提供されるとき、次の実施形態が例として提供される。その1つの端（下流側）に固定された上述の第1の抗体を有する膜は、反応カセットにおいて保存される。それと同時に、現像液が膜の他の端（上流側）にセットされ、それに加えられる上述の標識物質の基質を有するパッドが、現象液がセットされる下流側近くに配置され、上述の標識物質で標識された第2の抗体を有するパッドが、膜の中間部分に配置される。

【0094】

抗体

本発明の免疫学的アッセイおよび免疫学的アッセイキットにおける第1の抗体は、担体に固定されている。すなわち、第1の抗体は、抗体の1つが、担体に物理吸着、化学結合、もしくはこれらの組合せのような方法を介して吸着するか、または結合することを可能にすることにより、調製される。

10

20

30

40

50

【0095】

物理吸着により固定化される抗体は、公知の方法により調製される。かかる方法の例は、抗体と担体とが混合され、バッファーのような溶液において互いに接触される方法、およびバッファーなどに溶解された抗体が、担体に接触することを可能にさせる方法を含む。

【0096】

典型的には、第1の抗体および第2の抗体は、AF1またはインタクトなプロテアソームのようなプロテアソームタンパク質に特異的な抗体（例えば、受託番号DSM ACC 3271の下、DSMZに寄託されている、AFモノクローナル抗体(mAb)、ハイブリドーマ細胞培養物2341由来の3H8(=3H8B3))、およびC3、C3c、C3b、iC3bのような補体因子C3に特異的な抗体、またはC4、C4b、iC4b、もしくはC4cのような補体因子C4に特異的な抗体から選択される。

10

【0097】

第1の抗体は、プロテアソームタンパク質AF1に特異的な抗体（例えば、受託番号DSM ACC 3271の下、DSMZに寄託されている、AFモノクローナル抗体(mAb)、ハイブリドーマ細胞培養物2341由来の3H8(=3H8B3))、LMP2に特異的な抗体、20Sアルファ6に特異的な抗体、20Sアルファ1、2、3、または4に特異的な抗体、およびRpt5に特異的な抗体からなる群から好ましくは選択され、第2の抗体は、C3、C3c、C3b、iC3bのような補体因子C3に特異的な抗体、またはC4、C4b、iC4b、もしくはC4cのような補体因子C4に特異的な抗体からなる群から好ましくは選択される。

20

【0098】

Anders Oldfors、Dept. Pathology、Institute of Biomedicine、University of Goteborg、P.O.B. 420、S-40530 Goteborg、Swedenが、Department of Infectious Diseases、Institute of Biomedicine、Goteborg University、Guldhedsgatan 10、41346 Goteborg、Swedenの名前の下、2015年5月12日に、ブタベスト条約に著すものと同一の用語の受託番号DSM ACC 3271生物学的材料の下、Leibniz-Institute DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH、Inhoffenstr. 7 B、D-38124 Braunschweig、Germanyに寄託したことを立証する、承認および同意の寄託者の宣誓が、本出願において添付される。寄託者は、Lantmannen AS-Faktor AB、BOX 30192、104 25 Stockholmが、国際および欧州および米国特許出願番号[代表的な参照番号PS 54728 PC 00 / PS 54728 EP 00 / PS 54728 US 00]における上述の寄託された生物学的材料を指すことをここで承認し、上述の特許出願の出願日より、EPC施行規則第33条に従い公的に入手可能となる寄託された材料に対する彼の無条件かつ取消不能な同意を与えた。

30

【0099】

さらに、化学的結合により固定された抗体はまた、公知の方法により調製される。かかる方法の例は、抗体および担体が、抗体および担体の両方のアミノ基、カルボキシル基、チオール基、アルデヒド基、ヒドロキシル基などが反応するように、グルタルアルデヒド、カルボジイミド、イミドエステル、またはマレイミドのような2価の架橋結合試薬と混合され、互いに接触される方法を含む。

40

【0100】

さらに、抗体が固定された担体の非特異的反応、自発的な凝集などを阻害するための処置が、必要なら、公知の方法により行われる。かかる方法の例は、抗体が固定された担体の表面または内部表面が、担体の表面または内部表面がこれらの物質でカバーされるように、ウシ血清アルブミン(BSA)、カゼイン、ゼラチン、卵アルブミン、もしくはその

50

塩、界面活性剤、脱脂粉乳などと接触される方法を含む。本発明の免疫学的アッセイおよび免疫学的アッセイキットにおける第2の抗体は、標識物質で修飾されている。第2の抗体は、抗体の1つが、標識物質に、物理吸着、化学結合、もしくはこれらの組合せのような方法を介して吸着または結合することを可能にすることにより、調製される。物理吸着によりそれに結合した標識物質を有する抗体は、公知の方法により調製される。かかる方法の例は、抗体と標識物質とが混合され、バッファーのような溶液において互いに接触させる方法、およびバッファーなどに溶解された抗体が、標識物質に接触することを可能にさせる方法を含む。

【0101】

例えば、標識物質が、金コロイドまたはラテックスであるとき、物理吸着が有効である。金コロイドで標識された抗体は、抗体と金コロイドとをバッファーにおいて混合すること、およびそれらを互いに接触させることにより入手可能である。

10

【0102】

さらに、化学的結合により標識物質で修飾された抗体もまた、公知の方法により調製される。かかる方法の例は、抗体および標識物質が、抗体および標識物質の両方のアミノ基、カルボキシル基、チオール基、アルデヒド基、ヒドロキシル基などが反応するように、グルタルアルデヒド、カルボジイミド、イミドエステル、またはマレイミドのような2価の架橋結合試薬と混合され、互いに接触される方法を含む。例えば、標識物質が、蛍光物質、酵素、または化学発光物質であるとき、化学結合が有効である。

【0103】

20

さらに、標識物質で修飾された抗体の非特異的反応、自発的な凝集などを阻害するための処置が、必要なら、公知の方法により行われる。かかる方法の例は、それに結合した標識物質を有する抗体が、抗体がこれらの物質でカバーされるように、ウシ血清アルブミン(BSA)、カゼイン、ゼラチン、卵アルブミン、もしくはその塩、界面活性剤、脱脂粉乳などと接触される方法を含む。

【0104】

また、酵素結合免疫吸着アッセイが行われるとき、ペルオキシダーゼ(POD)、アルカリホスファターゼ(ALP)、 α -ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコースオキシダーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、アミラーゼなどが、標識物質として使用される。

30

【0105】

また、蛍光イムノアッセイが行われるとき、フルオレセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、置換ローダミンイソチオシアネート、ジクロロトリアジンイソチオシアネート、シアニン、メロシアニンなどが使用される。または、ラジオイムノアッセイが行われるとき、トリチウム、ヨウ素-125、ヨウ素-131などが使用される。

【0106】

また、蛍光イムノアッセイが行われるとき、ルミノール化合物、ルシフェラーゼ化合物、アクリジニウムエステル、ジオキセタン化合物などが使用される。

【0107】

40

また、イムノクロマトグラフィー、免疫比濁法、ラテックス比濁法、およびラテックス凝集アッセイが行われるとき、ポリスチレン、スチレン-スチレンスルホンコポリマー、アクリロニトリル-ブタジエン-スチレンコポリマー、ビニルクロライド-アクリル酸エステルコポリマー、ビニルアセテート-アクリル酸コポリマー、ポリアクロレイン、スチレン-メタクリル酸コポリマー、スチレン-グリシジル(メタ)アクリル酸コポリマー、スチレン-ブタジエンコポリマー、(メタ)アクリル酸ポリマー、アクリル酸ポリマー、ラテックス、ゼラチン、リポソーム、マイクロカプセル、シリカ、アルミナ、カーボンブラック、金属化合物、金属、金属コロイド、セラミック、または磁性材料などの材料で作製された粒子が使用される。

【0108】

50

本発明の免疫学的アッセイにおける担体として、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリビニルトルエン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリビニルクロライド、ナイロン、ポリメタクリル酸、ポリアクリルアミド、ラテックス、リポソーム、ゼラチン、アガロース、セルロース、セファロース、ガラス、金属、セラミック、または磁性材料、マイクロプレート、試験管、スティック、膜、検体片などで作製されたビーズの形態の固体担体を使用される。具体的には、本発明の担体として、光導波路として配置される導波路が使用される。

【0109】

抗分泌因子

抗分泌因子は、身体において天然で生じる、タンパク質のクラスである。ヒト抗分泌因子 A F タンパク質は、脳下垂体から単離されるとき、382 ~ 288 個のアミノ酸を含む、41 kDa のタンパク質である。活性部位は、タンパク質の N 末端に近い領域におけるタンパク質に局在し、特に、配列番号 1 のアミノ酸 1 ~ 163、より具体的には、抗分泌因子 (A F) タンパク質配列上のアミノ酸 35 ~ 50 位に局在する。A F の生物学的効果は、前記共通配列の少なくとも 6 個のアミノ酸、配列番号 2 (A F - 6) を含む断片および/もしくは相同体、またはポリペプチドおよび/もしくはペプチドの機能が変化していないその修飾物により発揮される。

10

【0110】

本発明者らは、抗分泌因子が、全ての細胞に一般的な構成成分のサブユニット、26 S プロテアソーム、より具体的には、19 S / P A 7 0 0 c a p を構成する、タンパク質 S 5 a、および R p n 1 0 と相同であることを示した。本発明において、抗分泌因子 (A F) タンパク質は、同一の機能特性を有する、相同なタンパク質のクラスとして定義される。抗分泌因子はまた、アンジオシジン、トロンボスポンジン - 1 に結合し、がんの進行と関連することが知られている別のタンパク質アイソフォームとも高度に類似する。

20

【0111】

本明細書に記載される、本免疫学的アッセイ、ならびに本免疫学的アッセイキット、ならびに方法は、少なくとも第 1 の抗体および第 2 の抗体を使用し、その 1 つは、A F 1 もしくはインタクトなプロテアソーム、類似の生物学的活性を有する、A F に対する相同体、抗分泌因子 (A F) の誘導体、ペプチド、もしくは断片のようなプロテアソームタンパク質に特異的な抗体から選択される。相同体、誘導体、または断片は、本文脈において、天然に生じる抗分泌因子 (A F) タンパク質のものに対応する、少なくとも 6 個のアミノ酸 (配列番号 2 において示される) を含み、それは、ポリペプチドおよび/もしくはペプチドの必須の機能を変えないことなく、抗分泌因子の生物学的活性を最適化するために 1 つまたはそれ以上のアミノ酸を変化させることにより、さらに修飾される。

30

【0112】

W O 0 0 / 0 3 8 5 3 5 は、抗分泌因子 (A F) タンパク質が豊富にある食品製品を開示し、したがって、それは、本文脈において適当な食品、食糧、および/または栄養補助食品の例である。

【0113】

本発明は、第 1 の抗体および第 2 の抗体を使用した、身体における A F 1 曝露プロテアソーム - C 3 補体形成の存在もしくは不存在、および/または濃度を決定するための免疫学的アッセイ、方法、およびキットを初めて開示し、ここで、第 1 の抗体または第 2 の抗体のいずれかが、A F 1、類似の生物学的活性を有する、A F に対する相同体、抗分泌因子 (A F) の誘導体、ペプチド、または断片に特異的な抗体から選択される。

40

【0114】

開示されるアッセイまたは方法は、哺乳類の身体における補体系 (下方) 制御を含む、哺乳類の身体における炎症のレベルをモニタリングするため、ならびに高レベルの天然の抗分泌因子タンパク質 (N A S P) を含む加工穀類 (S P C) および/または機能性食品のコンプライアンスを検証するためのような、血漿または他の体液中の循環性 26 S プロテアソームのレベルを検出するために使用される。

50

【0115】

一実施形態において、開示される免疫学的アッセイまたは方法を利用して、天然に生じる抗分泌因子が豊富な卵黄として好ましくは提供される、非常に高レベルの天然の抗分泌因子(A F)タンパク質を含む、Salovum(著作権)(NASP)、食品、栄養補助飼料および/または食品のコンプライアンスが検証される。それは、例えば、前記食品、栄養補助飼料および/または食品を消費した対象から採取された試料を試験して、前記食品、栄養補助飼料および/または食品の消費後、前記対象におけるプロテアソーム-補体複合体形成が測定されることが予想される。

【0116】

別の同等に好ましい一実施形態において、開示される免疫学的アッセイまたは方法を利用して、SPC(著作権)のような、加工穀類のコンプライアンスが検証され、それは、食品、ならびに/もしくは抗分泌因子(A F)タンパク質の摂取、形成ならびに/もしくは放出を誘導する固有の食事療法上の使用のための食品の摂取後、対象により、配列番号1(A F)に示される抗分泌因子(A F)タンパク質、ならびに/もしくは均等な活性を有し、配列番号2(A F-6)において示されるアミノ酸配列を含む、その相同体および/もしくは断片、ならびに/または薬学的に活性なその塩の内因的生産を刺激する。それは、例えば、前記食品、栄養補助飼料および/または食品を消費した対象から採取された試料を試験して、前記食品、栄養補助飼料および/または食品の消費後、前記対象におけるプロテアソーム-補体複合体形成が測定されることが予想される。

【0117】

実験セクション

本研究において、AF複合体が、プロテアソームと補体C3の両方からなることが、示される。プロテアソームおよびプロテアソーム-補体C3複合体は、ヒト血液から精製され、ウエスタンブロットおよび質量分析により分析される。プロテアソームサブユニットに特異的な抗体が産生され、2つの新しいイムノアッセイ(ELISA)が開発される。正常血漿中の $0.41 \pm 0.03 \mu\text{g/ml}$ の26Sプロテアソーム濃度を確立する、第1のELISA試験、プロテアソームの補体因子C3への結合を開示する、第2のELISA。後者の試験はAFを測定し、それは、加工穀類の摂取後、約10倍増大される。補体因子HおよびIのレベルの差は見られなかった。AFの誘導は、血漿をアガロースゲルと*in vitro*でインキュベーションすること、形成されたタンパク質ペプチド配列を単離し、特徴付けることを可能にすることにより、模倣される。C3は、プロテアソーム結合の際に、その不活性な形態のC3cに部分的に分割され、それは、AF複合体形成中の抗炎症効果を説明する。結論として、26Sプロテアソームは、正常血液において生じ、補体C3と相互作用し、AF複合体を形成する。

【実施例1】

【0118】

材料および方法

一般的な試薬

AF1に特異的なモノクローナル抗体を作製し、受託番号XYの下、寄託する。プロテアソームLMP2(20S 1i)および20S 6に特異的なモノクローナルマウスIgG抗体を、Enzo Life Science Inc.(www.enzolifesciences.com)から得た。補体因子C3cに特異的なポリクローナル抗体を、Dako(www.dako.com)から購入した。セファロース6BおよびセファクリルS300を、Amersham(GE healthcare)から得た。前腫大したDE52セルローズは、Whatman、番号4057050、Schleicher & Schuell(GE healthcare)からであった。特別加工穀類(SPC)を、AS-Faktor AB、Stockholm、Sweden(www.as-faktor.se)から得た。

【0119】

ヒト血液試料

6人の健常な被検人を、University of GothenburgのBiomedical departmentから採用した。University of Gothenburgの倫理委員会が、研究プロトコルを承認した(Dnr. 037-14、Exp. 2014-02-19)。被検人3人が、1g/体重1kgのSPCを、1日1回、1カ月間消費し、一方残る3人は、対照とした。それぞれの人から、静脈血15~20mlをEDTAバキュテナーチューブ(gbo.com/preanalytic)に引き出した。遠心分離による分離後、血漿を、等量のクエン酸バッファー(0.1Mグルコース、0.03Mクエン酸三ナトリウム、および0.07M塩化ナトリウム、pH6.1)と混合した。それぞれの試料を、アリコート2mlに続いて分け、使用まで-20にて維持した。試料を、4週間より長く凍結保存しなかった。

10

【0120】

アガロースろ過後のAF1アッセイ

従前に記載された通り、AF1を、小さなアガロースカラム上で血漿から親和性精製し、イムノアッセイにより、濃度を決定した(Johansson, E., I. Lonnröth, I. Jonson, S. Lange, および E. Jennische, Development of monoclonal antibodies for detection of Antisecretory Factor activity in human plasma, J Immunol Methods, 2009, 342巻(1~2号): 64~70頁)。簡単に言うと、1:1希釈した血漿試料6ml(上述)を、3mlのセファロース6Bカラムに通し、PBSで2回洗浄し、1M -メチル-グリコシドで続いて溶出した。精製した試料を96ウェルプレートにおいて滴定し、一晚コートし、AF1に特異的な3H8モノクローナルマウス抗体(受託番号DSM ACC3271の下、DSMZに寄託されている、AFモノクローナル抗体(mAb)、ハイブリドーマ細胞培養物2341由来の3H8(=3H8B3))または対照としてPBSにより検出し、アルカリホスファターゼ(AP)に結合した2次抗体で最後に展開した。450nmにおける吸光度の読み取り後、結果を逆力価として示した。3H8抗体(受託番号DSM ACC3271の下、DSMZに寄託されている、AFモノクローナル抗体(mAb)、ハイブリドーマ細胞培養物2341由来の3H8(=3H8B3))は、抗分泌活性に関与するAF配列を認識する(Nicolas, V., および V. Lievin-Le Moal, Antisecretory peptide AF-16 inhibits the Sat toxin-stimulated transcellular and paracellular passages of fluid in cultured human enterocyte-like cells, Infect Immun, 2014, Matson Dzebo, M., A. Reymer, K. Fant, P. Lincoln, B. Norden, および S. Rocha, Enhanced cellular uptake of antisecretory peptide AF-16 through proteoglycan binding, Biochemistry, 2014, 53巻(41号): 6566~73頁)。

20

30

【0121】

プロテアソーム/C3 ELISA

血漿におけるプロテアソーム/C3複合体の検出のため、サンドイッチELISAを行った。1:200希釈したプロテアソームタンパク質AF1に特異的なモノクローナル3H8抗体(受託番号DSM ACC3271の下、DSMZに寄託されている、AFモノクローナル抗体(mAb)、ハイブリドーマ細胞培養物2341由来の3H8(=3H8B3))、または1:2000希釈したLMP2を、96ウェルタイタープレートに一晚コートした。0.2%BSAで、37にて45分間ブロッキング後、血漿試料を、0.2%BSA、0.05%Tween20、PBSに滴定し、1時間振盪した。1:2000希釈のポリクローナルウサギ抗体を、検出抗体として適用した。30分間インキュベーション後、抗ウサギ-AP2次抗体を適用し、さらに30分後、AP基質を加えた。光度

40

50

計において、405nmにおける吸光度を読み取った。

【0122】

循環性プロテアソーム

DeMartino (DeMartino, G.N., Purification of PA700, the 19S regulatory complex of the 26S proteasome, Methods Enzymol, 2005, 398巻: 295~306頁)により記載される通り、ヒト赤血球から、19Sプロテアソームサブユニットを調製した。簡単に言うと、ヒト血液由来の洗浄した赤血球を、20mM トリス-HCl、1mM EDTA、5mMメルカプトエタノールに溶解し、10000×gにて2時間遠心した。溶解物に、1/4容量のDE52セルロースを加え、室温で30分間ゆっくり混合した。セルロースをろ去し、ろ液を40%飽和硫酸アンモニウムにおいて沈殿させた。沈殿物を、バッファーX(20mM トリス-HCl、100mM NaCl、1mM MgCl₂、0.1mM EDTA、0.5mM DTT-20%グリセロール、pH7.6)に溶解後、溶液を、バッファーXで平衡化したセファクリルS-300カラムにてゲルろ過した。上述のシングルELISA(アガロースろ過後のAF1アッセイ)における最大反応性により明らかにした、19Sを含有するタンパク質ピークを、未変性ゲル電気泳動により検証した。

10

【0123】

1カ月間投与した、100μgの4回用量により、精製したサブユニットで、ウサギを免疫し、19Sプロテアソームサブユニットに特異的な抗血清を得た。1:1000希釈した20S 6に特異的な捕獲抗体(Enzo Life science)を、Nunc 96ウェルMaxisorppolyvinylプレート(Sigma-Aldrich)にコートし、1:400希釈したポリクローナル抗19Sを、検出抗体として使用した。26Sプロテアソーム(Enzo Life science)を参照として、ウサギ前免疫血清を対照として使用した。血漿における20Sサブユニットの検出のため、市販のキット(Enzo Life science)を使用した。このキットはまた、20S 6モノクローナルを捕獲抗体として、ポリクローナル20Sを検出抗体としても使用する。

20

【0124】

ウエスタンブロット

従前に記載(Johansson, E., I. Lonnröth, S. Lange, I. Jonson, E. Jennische, およびC. Lonnröth, Molecular cloning and expression of a pituitary gland protein modulating intestinal fluid secretion, J Biol Chem, 1995, 270巻(35号): 20615~20頁)される通り、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)およびウエスタンブロットを行った。1:25000希釈の補体C3cに特異的なポリクローナルウサギ抗体を、検出抗体として使用した。血漿試料を1:10希釈した。

30

【0125】

アガロースインキュベーション

プロテアソーム-C3複合体形成をin vitroで達成するため、GE Healthcare Biosciencesのアガロースセファロス6Bを使用した。アガロースのコンパクトなゲルに、等量のクエン酸バッファー(0.11Mグルコース、0.03Mクエン酸三ナトリウム、0.07M塩化ナトリウム、pH6.1)を加えた。ゲル懸濁液1容量を試験管に加え、1500×gにて10分間遠心分離し、上清を捨て、血漿2容量を加えて、1:3の血漿-ゲル比を得た。血漿-アガロース混合物を、血液ロッカーに37にて4時間置いた。遠心分離により、アガロースをペレット化し、さらなる試験まで-20にて血漿を凍結維持した。

40

【0126】

プロテアソーム-C3複合体の精製

50

上述の通り、血漿をアガロースとインキュベーションし、その後、等量の飽和硫酸アンモニウムで沈殿させた。遠心分離後、沈殿物を結合バッファー（25 mM HEPES、10%グリセロール、5 mM MgCl₂、1 mM ATP、1 mM ジチオスレイトール、pH 7.4）4容量に溶解して、1 mg/mlのタンパク質濃度を得た。Enzo Life Sciencesのプロテアソーム精製キットBML-PW1075Aを使用することにより、プロテアソーム-C3複合体の部分的精製を達成した。簡単に言うと、溶解したタンパク質100 μgを、アガロース結合抗20S 5からなるプロテアソーム結合マトリックスと、一晚、5にてインキュベーションした。結合したプロテアソーム材料を結合バッファーで3回洗浄後、SDS-PAGEゲルローディングバッファー25 μlをマトリックスに加え、結合したタンパク質を、95で10分間溶出した。9 μlをウエスタンブロットゲルに適用し、残りの試料を、後述の質量分析(MS)のためSDS-PAGEゲルに適用した。

10

【0127】

LC-MS/MSおよびタンパク質同定

クーマシー染色したゲル片を切り出し、タンパク質をトリプシンで消化した。簡単に言うと、ゲル片を、50%CH₃CN中の25 mM NH₄HCO₃において3回洗浄し、50%CH₃OH中の25 mM NH₄HCO₃にて1回洗浄した。ゲル片を、真空遠心機にて乾燥させ、10 ng/μlのトリプシン(Promega、Madison、WI、USA)と、25 mM NH₄HCO₃において37で一晩インキュベーションした。75%CH₃CN/2%TFAをまず加えることにより、ペプチドを抽出し、続いて50%CH₃CN/0.2%TFAで抽出した。プールした抽出物を、真空遠心機にて蒸発乾固し、MS分析に先立ち、0.2%HCOOH 18 μlに再構成した。7T ICR magnet(LTQ-FT、Thermo Electron、Bremen、Germany)を装着したハイブリッド線形イオンtrap-FT-ICR質量分析計にて、ナノフローLC-MS/MSを行った。タンパク質同定のため、最小判断基準を、MASCOTにより与えられる95%またはそれ以上のレベルの信頼で一致する少なくとも2つのトリプシンペプチドに設定した。

20

【0128】

補体IおよびHの検出

血漿における補体IおよびH濃度の決定のため、市販のELISAキットを使用した。AssayPro、USA(www.assaypro.com)の補体Iキットは、本発明者らが、範囲0.4~20 μg/mlの補体I濃度を決定することを可能にし;Blue Gene(www.bluegene.cc)の補体Hキットは、範囲5~100 ng/mlのH濃度を決定することを可能にした。

30

【0129】

ウイルス

致死であることが後に判明した致死性脳炎を提示した58歳の男性患者の脳生検から単離した、HSV-1 2762(Bergstromら、1990年)を、ラットの感染のため使用した。ウイルスは、動物モデルにおいて高度に神経毒性であることが示された(Bergstromら、1990年)。脳生検からのウイルスの単離は、ヘルシンキ宣言において表現される原理により行われた、HSEにおける抗ウイルス処置についてのスウェーデンの多施設研究(Skoldenbergrら、1984年)について、universities of Gothenburg、Linkoping、Lund、Umea、およびKarolinska InstituteのUppsalaの倫理委員会により、1981年に承認された。HSV-1株2762のウイルスストックを数の少ない継代から調製した。

40

【0130】

動物

体重250 ± 20 gの雄のスプラグドローラット(SD)ラット(Harlan Laboratories、Boxmeer、The Netherlands)を使用

50

した（感染したラット $n = 49$ 、対照ラット $n = 11$ ）。Animal Experimentsの地域の倫理委員会は、試験プロトコルを承認し、動物実験についてのEC Directive 86/609/EECガイドラインに従い、全ての実験を行った。実験の開始前に、ラットを1週間一般的に適応させ、それらは、ペレット化飼料および水に自由に常にアクセスした。動物の4分の1の温度および空気の換気を、標準的手法に従いモニタリングし；12時間の光サイクルを使用し、空気を1時間当たり17回交換した。

【0131】

鼻腔内注射

従前に記載される通り（Jennischeら、2008年）、 $25 \mu\text{l}$ （与えた総用量 = 1.1×10^4 プラーク形成単位（pfu））の容量のHSV-1での右の鼻孔における鼻腔内滴下後、ラットにおける脳炎感染を達成した。この滴下は、RT Johnson（Johnson、1964年）により記載される接種方法から適合した。ラットが深いイソフルレン（Forane、Baxter、Deerfield、IL）麻酔下にある間に、感染用量を右の鼻孔に常に置いた。感染の4日後に、ラットを屠殺した。倫理的理由のため、全ての動物がそれまで症候性であったので、実験の範囲は6日目のp.i.を越えなかった。

【0132】

結果

血漿中のプロテアソーム濃度

2種の異なるイムノアッセイを使用して、血漿中のプロテアソーム濃度を決定した。20Sサブユニットに特異的な抗体に基づく市販のキットにより、20Sプロテアソームを標準として使用して、正常血漿中 $0.60 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$ の濃度を得た。組み合わせたモノクローナル20Sおよび19S抗体を使用した、本明細書において開示した試験で、対応する値は、 $0.41 \pm 0.03 \mu\text{g/ml}$ であった。これらの試験の両方において、モノクローナル抗20S 6を捕獲抗体として使用した。抗分泌ペプチド配列を認識する、抗AF1抗体（受託番号DSM ACC3271の下、DSMZに寄託されている、AFモノクローナル抗体（mAb）、ハイブリドーマ細胞培養物2341由来の3H8（=3H8B3））を捕獲のため使用するとき、インタクトな26Sプロテアソームへの結合はなかった。

【0133】

加工穀類の摂取後のアガロース分離したAF1濃度の上昇

従前の研究は、AF1、ならびにC3cが、特別加工穀類（SPC）の消費後、アガロースゲルに結合することを示した。6人のボランティア由来のアガロースろ過した血漿の本研究において、このことを確認した。図1aは、対照の人1～3における明らかなAF1値を示さず、一方、人4～6は、2カ月より長くSPCを食した後、有意に高いAF1力価を有した。

【0134】

加工穀類によるAF1-反応性プロテアソーム/補体C3複合体の誘導

血中のプロテアソームと補体因子C3との間の反応が存在するかどうかを試験するために、2種の新しいELISAアッセイを開発し：プロテアソーム成分AF1に特異的なモノクローナル抗体（受託番号DSM ACC3271の下、DSMZに寄託されている、AFモノクローナル抗体（mAb）、ハイブリドーマ細胞培養物2341由来の3H8（=3H8B3））を、捕獲抗体として利用し、一方、C3cに特異的なポリクローナル抗体を検出抗体として使用した。これは、血漿においてプロテアソームとC3との結合を直接測定することを可能にした。図1bにおいて見られる通り、被検人4、5、および6由来の3つの試料は、対照の人1、2、および3由来のものより8～11倍大きい力価であった。その高感度に起因し、血液 $100 \mu\text{l}$ というわずかな試料が、試験を行うのに十分である。

【0135】

アガロースゲルによるプロテアソーム / 補体 C 3 複合体の A F 1 曝露の誘導

血漿プロテアソームおよび因子 C 3 に対するアガロースの影響を試験するために、血漿をアガロースゲルと 4 時間、37℃にてインキュベーションした。アガロースによる、A F 1 曝露プロテアソームおよび C 3 の凝集の実質的な増大を、全 6 人の被検人において観察した (表 1)。ウエスタンブロットにより分析したとき、C 3 の同時分割は明らかであった (図 2、列 5)。バンドを C バンドに加水分解し、これは、C 3 の C 3 c への変換の典型であった。加えて、対照血漿の 2 つを、S P C 試験血漿と比較したとき (図 2、列 1 ~ 4)、ペプチドパターンの差も観察した。S P C 血漿は、C 3 のものを超える分子量の c 領域と a 領域の両方において余分なバンドを有した。

【 0 1 3 6 】

A F 1 曝露プロテアソーム / C 3 複合体の部分的精製

プロテアソーム - C 3 複合体の部分的精製を、マトリックス結合プロテアソーム抗体への親和性により達成した。アガロースにより刺激した、および硫酸アンモニウム沈殿した血漿を、マトリックスに結合し、これを洗浄後、ウエスタンブロットにより、C 3 ならびにプロテアソームを含有することを示した (図 3)。クーマシー染色したゲルバンドを切り出すこと、およびトリプシン消化したバンドを M S / M S において実行することにより、C 3 の含有量を確認し；C 3 の - および - バンドは、ウエスタンブロットにおけるものに対応する位置の最初のバンドとして出現した。

【 0 1 3 7 】

補体 H および I の血液レベル

補体因子 I および H により、C 3 c の形成を達成した。それ故に、これらの補体因子について、6 つの血漿試料においてそれを試験した。表 2 において示す通り、対照対試験血漿におけるこれらの化合物のレベルの差は存在しなかった。

【 0 1 3 8 】

ラットにおける単純ヘルペスウイルス 2 型によるプロテアソーム / 補体複合体の誘導

ラットモデルにおいて、プロテアソーム / 補体因子複合体形成に対する単純ヘルペスウイルス 1 型 (H S V 1) の影響を試験した。それらが神経学的機能障害の症状、すなわち、反復性、常同運動および運動不安定を示し始めたとき、鼻腔内に負荷した 4 日後に、ラットを試験した。多数のプロテアソームモノクローナル抗体を、捕獲抗体として、補体因子 3 および 4 に対する抗体を検出抗体として試験した。図 6 において見られる通り、感染後の血液および髄液において、プロテアソーム / C 3 複合体の有意な上昇を示した。また、H S V 1 感染後、プロテアソーム / C 4 複合体の有意な上昇を示した (図 7)。

【 0 1 3 9 】

しかしながら、A F 1 抗体 (受託番号 D S M A C C 3 2 7 1 の下、D S M Z に寄託されている、A F モノクローナル抗体 (m A b)、ハイブリドーマ細胞培養物 2 3 4 1 由来の 3 H 8 (= 3 H 8 B 3)) は、A F 1 エピトープが、インタクトな 2 6 S プロテアソームにおいてと同様隠れたままである、H S V 1 により誘導される複合体と反応しなかった (示していない)。

【 実施例 2 】

【 0 1 4 0 】

S P C 食後の血漿のプロテオームの変化の調査

目的：抗分泌因子 (A F) は病理学的体液分泌および炎症を阻害する。細菌のエンテロトキシンを負荷後、増大した A F 活性を有する変化した形態の誘導が続いた。A F のこの形態を、「活性な A F」と命名し、特別加工穀類、S P C の摂取後、増大もした。不活性な形態から活性な形態への移行に影響する分子現象は、曖昧なままであった。

【 0 1 4 1 】

この研究の目的は、S P C 食後の血漿のプロテオームの変化を調査することであった。

【 0 1 4 2 】

研究方法および手法：

少なくとも 4 週間の S P C の摂取前および後に、ヒトボランティアから、血漿試料を採

10

20

30

40

50

取した。アガロース精製後の血漿の変化を、2D DIGEおよびLC-MS/MS、続いて、ウエスタンブロットおよびELISAを使用することにより、分析した。SPC食の4日、7日後、および終了の1週間後に、血漿において、上方制御したタンパク質についての時間コースをその後研究した。

【0143】

結果。SPC食の6週後、アガロース精製したヒト血漿において、補体因子C3cのレベルは有意に上方制御された($p = 0.0039$)。C3cレベルの増大は、AF活性のレベルの上昇と関連した。SPC摂取後、アガロース精製した血漿において、制御因子HおよびC4も上方制御された。AF誘導は、4日目において、C3の有意な増大($p = 0.0077$)についてだが、AF活性($p = 0.31$)についてのSPC摂取の4日間と比較して、7日後有意にまず至った($p = 0.0011$)。アガロース精製後、血漿において、上方制御されたC3cのみを検出した。

10

【0144】

結論：補体系の具体的に確認した変化は、刺激に応答した血漿におけるAF活性の増大の背景にある機序に關与するよう見える。

【0145】

本研究は、ヒトアガロース精製した血漿におけるAF活性の増大の背景にある機序における補体系の關与を示唆する、上方制御された発現タンパク質を、SPC刺激に対する応答として同定するための、プロテオミクス分析、2次元蛍光差ゲル電気泳動(2D DIGE)、およびナノフロー液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析(LC-MS/MS)を含む。

20

【0146】

材料および方法

研究の第1部：プロテオミクス分析

血漿-AFの調製

親和性クロマトグラフィーを使用して、血漿からAFを精製した(10)。簡単に言うと、血漿を0.9cmのアガロースカラム(セファロース6B、GE Healthcare Bio-sciences AB)に通し、リン酸緩衝食塩水(PBS)で洗浄した後、アガロースに吸着したAFを、1Mメチル-D-グルコシドで溶出し、分析まで-20で保存した。

30

【0147】

2Dゲル電気泳動

SPC摂取前、および4週間後、3人の個人から引き出したアガロース精製した血漿試料を採取した。その後、等電点電気泳動(IEF)、続いて、2次元(2D)電気泳動で分析した。2D試料溶液における懸濁前に、2D Clean-Up kit(Amersham Biosciences)で試料を精製した。製造元の指示に従い、IPGphor system(Amersham Biosciences)を使用して、IEFを行った。Immobiline乾燥ストリップゲル(7cm pH3~10)を、2%CHAPS(w/v)、0.3%DTT(w/v)、8M尿素、0.5%担体両性電解質溶液(v/v)を含有する溶液125 μ l、および2D試料溶液中の試料血漿100 μ lにおいて一晩水和させた。500Vにて30分間、1000Vにて30分間、および5000Vにて1.5時間、IEFを行った。2D分離に先立ち、平衡バッファー(1.5M トリス-HCLバッファー中の6M尿素、30%グリセロール、2%SDS、1%DTT、および0.001%プロモフェノールブルー、pH8.8)2.5mlにおいて15分間、immobiline乾燥ストリップゲルストリップを浸漬した。10%トリス-グリシンゲル(Invitrogen)において2Dウェルに、immobiline乾燥ストリップゲルストリップを置き、製造元の指示に従い、実施した。SilverQuest(商標)Staining kit(Invitrogen)で、ゲルを染色するか、またはPVDF膜にプロットした。PBS中の1%ウシ血清アルブミン(BSA)で、4にて16時間、膜をブロッキングした。次いで、Dako(Glostrup、

40

50

Denmark)の1次ポリクローナル抗C3c(1/25000希釈)を膜に加え、1.5時間インキュベーションした。アルカリホスファターゼ(AP)コンジュゲートヤギ抗ウサギIgG(Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.)、続いて、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート、および4-ニトロブルーテトラゾリウム(Roche Diagnostics)で、プロットを展開した。

【0148】

タンパク質消化およびペプチド抽出

銀染色したゲル片を切り出し、製造元のプロトコール(SilverQuest(商標) Silver Staining Kit, Invitrogen)に従い、脱染色した。銀脱染色後、Shevchenkoら(20)により記載された、トリプシンでのゲル内タンパク質消化方法を、いくつかのマイナーな改変で適用した。簡単に言うと、ゲル片を、50%CH₃CN中の25mM NH₄HCO₃において3回洗浄し、50%CH₃OH中の25mM NH₄HCO₃にて1回洗浄した。真空遠心機において、ゲル片を乾燥させ、25mM NH₄HCO₃中の10ng/μlトリプシン(Promega, Madison, WI, USA)と37において一晩インキュベーションした。75%CH₃CN/2%TFAを加えることにより、ペプチドをまず抽出し、続いて、50%CH₃CN/0.2%TFAにおいてさらに抽出した。プールした抽出物を、真空遠心機にて蒸発乾固して、MS分析に先立ち、0.2%HCOOH18μlに再構成した。

【0149】

ナノフローLC-MS/MSおよびタンパク質同定

Agilent 1100 binary pump(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)に接続した、HTC-PAL autosampler(CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland)で、3マイクロタイターの試料注射を作製した。プレカラム(45×0.075mm ID)に、ペプチドをトラップさせ、逆相カラム(200×0.050mm ID)にて分離した。3μmのReprosil-Pur C18-AQ粒子と一緒に、両方のカラムを社内でパックした。約100nl/分までの分割により、分析カラムを通じた流れを低減した。ペプチドの分離のため、0.2%COOH中37分の勾配10~50%CH₃CNを使用し、さらに5分間80%Bにおいて保持した。7T ICR magnet(LTQ-FT, Thermo Electron, Bremen, Germany)を装着したハイブリッド線形イオンtrap-FT-ICR質量分析計にて、ナノフローLC-MS/MSを行った。MS/MSモードに自動的にスイッチする、データに依存したモードで、分光計を操作した。FT-ICRにおいて、MS-スペクトルを取得し、一方、LTQ-trapにおいて、MS/MS-スペクトルを取得した。FT-ICRのそれぞれのスキャンのため、衝突により誘導される解離により、線形イオントラップにおいて、6つの最大強度の2倍または3倍荷電したイオンを連続して断片化した。Proteome Discoverer version 1.4(Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)を使用した同定のため、MS生データファイルを使用した。2014年7月にダウンロードした(分類後、20265種の配列を含有する)、Swissprot Database(Swiss Institute of Bioinformatics, Switzerland)を使用した、MASCOT search engine, version 2.3(Matrix Science LTD., London, United Kingdom)で、1回のデータベース検索を行った。検索パラメーターを:Taxonomy human, MS accuracy 5ppm, MS/MS accuracy 0.5Daに設定し、トリプシンによる1つの失敗した切断が、システインの固定されたプロピオンアミド修飾、および可変修飾としてのメチオニンの酸化を可能にした。

【0150】

タンパク質同定のため、最小判断基準を、MASCOTにより与えられる95%または

10

20

30

40

50

それ以上のレベルの信頼で一致する少なくとも2つのトリプシンペプチドに設定した。

【0151】

研究の第2部：補体の立体構造

対象および研究設計

3人の健常ボランティアが、研究の第2部に参加した。University of Gothenburgのヒト倫理委員会が、実験の手法を承認した(Dnr. 037-14)。全てのボランティアは、体重1kgおよび1日当たり1gの用量のSPC(AS-Faktor AB, Stockholm, Sweden)を経口摂取した。3週間の期間、SPC摂取を、12時間毎に2回の給仕に分けた。開始前、4日および7日後に、それぞれのボランティアから、血漿試料を引き出した。SPC食の終了の1週間後、最後の試料を引き出した。1000×gにて5分間遠心分離後、血漿試料を、アルセバークエン酸バッファー(1/2)と混合した。セクション「血漿-AFの調製」において上記した通り、その後、AFを精製した。

10

【0152】

免疫原性AF活性のELISA試験

従前に記載される通り、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)において、血漿中のAFの含有量をアッセイした。Maxisorp microtiter plates(Nunc)を、親和性精製した血漿でコートし、1/2希釈し、その後、1/3連続希釈し、次いで、4にて一晩インキュベーションした。PBS中の0.2%BSAで、45分間、37にてブロッキング後、PBS+0.05%Tween20(PBS-T)でプレートを洗浄した。(PBS+0.05%Tween20+0.2%BSA中1/100希釈した)AFモノクローナル抗体(mAb)、3H8(受託番号DSMZ ACC3271の下、DSMZに寄託されている、AFモノクローナル抗体(mAb)、ハイブリドーマ細胞培養物2341由来の3H8(=3H8B3))を加え、プレートを2時間室温(RT)でインキュベーションした。洗浄後、APコンジュゲートヤギ抗マウス免疫グロブリンIgM(Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.)を、1時間RTで加えた。洗浄後、1mM MgCl₂を含むジエタノールアミンバッファー(pH9.8)中の基質4-ニトロフェニルホスフェート(Sigma-Aldrich Sweden AB)をプレートに加え、405nmにおける吸光度を読み取ることにより、結合した酵素を明らかにした。モノクローナル培養培地をバックグラウンドとして使用し、値を引いて、正味の吸光度を得た。

20

30

【0153】

補体因子のELISA検出

SPC摂取後、補体系に対する効果を研究するために、親和性精製したヒト血漿試料における7つの補体因子のレベルを、セクション「免疫原性AF活性のELISA試験」において記載したものと同一の手法でELISAにより決定した。検出抗体として、本発明者らは、Dako(Glostrup, Denmark)のウサギ抗C3c(1/200希釈した)および抗C4c(1/1000希釈した)を使用していた。マウス抗C2および抗C5(1/200希釈した)、ヤギ抗C1qおよび抗C6(1/200希釈した)、ならびにウサギ抗因子H(1/200希釈した)を、Santa Cruz Biotechnology(Heidelberg, Germany)から購入した。次いで、ヤギ抗ウサギIgG、ヤギ抗マウスIgGまたはロバ抗ヤギのAPコンジュゲート2次抗体(Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.)を適用した(1/10000希釈した)。前免疫血清をバックグラウンドとして使用し、値を引いて、正味の吸光度を得た。

40

【0154】

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)およびウエスタンブロット

SPC摂取の前および後に引き出した血漿試料において、C3cの含有量を決定し、C3cをまた、SDS-PAGE、続いて、ニトロセルロース膜への免疫ブロットにより、

50

血漿のアガロース精製前および後に分析した。続くインキュベーションは、セクション「2Dゲル電気泳動」において上述したウエスタンブロットアッセイについてと同一であった。

【0155】

統計的分析

平均の平均 ± 標準偏差 (SEM) として、データを表す。GraphPad Prism 5.0 software (Graphpad Software, Inc., San Diego, CA) を使用して、SPC 摂取の前および後に試料を比較した。一元 ANOVA および t - 検定を使用することにより、統計的有意を決定した。p 値 0.05 を有意であるとみなした。

10

【0156】

結果

AF の誘導後のアガロース精製した血漿におけるタンパク質の 2D 分析

3 ~ 10 の pH 範囲において、これらの血漿試料において AF 活性の増大をもたらした SPC の摂取の前および 4 週間後に 3 人の個人から採取した精製した血漿試料にて、2D 分離を行った。試料の 2 つの群の間でのタンパク質発現レベルを比較することにより、銀染色したゲル上の別個のスポットが、AF の誘導後、等電点 4.8 および約 43 kDa の分子量の領域で明らかであった (図 8)。

【0157】

MS 分析

ゲルから選択した血漿タンパク質スポットの同定を、2D DIGE、続いて、LC-MS/MS により行い、結果を、表 3 において要約した (図 9)。ケラチンおよびトリプシンのような、明らかな混入したタンパク質の除去後、2 つのタンパク質が、独自性のリストに残っていた。それらは、補体 C3 前駆体 (スコア 1581.20) およびヒートショックプロテイン HSP90-β (スコア 103.18) を含んだ。HSP は、2 つの割り当てたペプチドのみを有するウシ供給源のものであるので、ヒト補体 C3 前駆体は、14 種の固有のペプチドとの、アガロース精製した血漿において最も関連する同一性であり、> 95% 信頼を示している。ペプチドは、1663 全長タンパク質のアミノ酸 1331 から出発してアミノ酸 1599 までの、C3 前駆体配列の C 末端部分における全ての一致するアミノ酸であった。選択したタンパク質スポットは、約 43 kDa および pI 4.8 の領域にあり、分析したタンパク質は、最も好ましくは、C3 の C3c 鎖断片 2 への分割産物である。

20

30

【0158】

ウエスタンブロット分析および ELISA によるプロテオミクス同一性 C3c の検証

銀染色した 2Dゲルから同定したスポットを確認するために、C3c 抗体を使用したウエスタンブロットにより、C3c の発現を分析した。図 10 において示す通り、抗体は、SPC 食後に引き出した、アガロース精製した血漿に反応し、これは、予測 C3c 鎖が C3 から切断されたことを示している、等電点 4.8 および分子量 43 kDa のドットを含む。抗体は、スメアー染色で、等電点 6.8 の C3 の 75 kDa のバンドも一緒に検出し、これは、タンパク質の化学修飾を示している。ヒトのアガロース精製した血漿試料における C3c の上方制御も、ELISA 決定により確認した。図 11 において示す通り、SPC 摂取の 6 週間後に、AF により誘導した試料において、C3c の有意な増大を検出した (p = 0.0039)。

40

【0159】

SPC の摂取後の血漿における AF 活性

研究の第 2 部において、本発明者らは、SPC 食後の結果を継続して分析した。SPC 刺激の効果を評価するために、AF mAb 3H8 (AF モノクローナル抗体 (mAb)、細胞培養物 2341 由来の 3H8 (= 3H8B3) = DSM ACC3271) で、アガロース精製した血漿における AF 活性のレベルを決定した。図 12A において示す通り、対照血漿と比較し、SPC 摂取後の吸光度は、アッセイにおいて首尾よく増大した。

50

活性な A F の血漿レベルにおける有意な増大を、S P C の 7 日後に誘導した ($p = 0 . 0 0 1 1$) 。 A F 活性は、食事の終了の 1 週間後でさえ、継続して有意に増大した ($p = 0 . 0 0 2 3$) 。

【 0 1 6 0 】

C 3 c のおよび他の補体因子についての E L I S A 決定

さらなる補体因子を調査するために、C 3 c に加え、アガロース精製血漿にて E L I S A を行った。C 3 c と一緒に、7 つの補体因子を試験して、S P C の摂取後の補体系への影響を決定した。3 つの因子、C 3 c、C 4 c および因子 H は、A F 誘導後、アガロース精製血漿においてレベルの増大を示した (図 1 2 B、C、D) 。 A F 誘導が、S P C 食の 7 日後有意に達した (図 1 2 A) 一方、補体因子の血漿レベルの有意な増大を、4 日後に既に誘導した (A F についての $p = 0 . 3 1$ と比較して、C 3 c について $p = 0 . 0 0 7 7$ 、C 4 c について $p = 0 . 0 1 1$ 、および因子 H について $p = 0 . 0 0 4 2$) 。 C 3 c の平均値はまた、S P C 終了の 1 週間後、継続して有意に増大した ($p = 0 . 0 4 7 5$) 。

10

【 0 1 6 1 】

試料のいずれかにおける C 1 q、C 2、C 5、または C 6 を試験する E L I S A において、差は見られなかった。

【 0 1 6 2 】

直接の血漿およびアガロース精製血漿におけるウエスタンブロット分析

アガロース精製前および後に、補体因子 C 3 c に対する抗体を使用したウエスタンブロットにより、研究由来の血漿試料を試験した。試料はまた、S P C 摂取の前および後に採取した血漿も含み、これは、A F 活性の増大の決定を伴った。図 1 3、レーン 1 および 2 において示す通り、分離した直接の血漿試料に対する抗 C 3 c 反応において、目に見える差は存在しなかった。いくつかのタンパク質バンドを検出した抗体は、公知の A F 誘導にも関わらず、同一の方法で、補体 C 3 前駆体に起源をもつ。対照的に、S P C 食後採取した試料においてのみ、C 3 c に対する抗体が、アガロース精製血漿にて反応し、これは、C 3 の 2 つの鎖 C 3 c および バンドを検出している (図 1 3、レーン 4) 。

20

【 0 1 6 3 】

考察

内在性 A F の活性化が、エンテロトキシンの腸内曝露に対する天然の応答として生じるか、またはある種の食品の成分、すなわち、S P C の摂取により模倣される。A F の活性化ステップの背後にある分子現象の研究において、それは、プロテオミクスアプローチ ; 2 D D I G E、続いて、上方制御したタンパク質発現の L C - M S / M S による同定を使用した、S P C 摂取後の調査したアガロース精製血漿であった。S P C 食の摂取前および後の、アガロース精製血漿タンパク質の分析は、補体因子 C 3 c 鎖断片 2 として同定した A F により誘導した試料におけるスポットを明らかにした。S P C 後、増大した C 3 c の所定の結果を、E L I S A およびウエスタンブロットにおける特異的抗体反応を示すことにより、血漿試料において確認した。本発明者らは、誘導した A F レベルが、S P C の投与量ならびに摂取の期間と関連することを従前に示した。本研究において、7 つの補体系タンパク質に対する S P C の影響を調査した。アガロースの補体タンパク質 C 3 c、因子 H および C 4 c への結合の有意な増大は、S P C 摂取の 4 日後に既にみられた。A F の活性化の傾向を、4 日後に決定したが、レベルの有意な増大を、S P C 食の 7 日後に検出した。従前の研究は、A F が、食事の 2 週間後に増大したことを示した。差は、S P C 摂取の開始の数日後に採取した試料を欠く、異なる研究設計によるものであった。

30

40

【 0 1 6 4 】

結果は、S P C の摂取が、補体系の因子 C 3 および C 4 を不活性化することを示す。この系におけるいくつかの因子は、自然および適応免疫の重大な成分であり、A F 活性化中の注目すべき炎症反応を結果的に説明する。補体系はまた、代替機能に含まれることも提案され、これは、それが、その炎症性の役割と異なる、多様な生物学的プロセスにおける重要な役割を有することを示している。例えば、正常妊娠は、血漿補体成分の増大と関

50

連する。

【 0 1 6 5 】

C 3 は、C 3 c、C 3 の生理学的下方制御産物への最終形態の脱活性化における連続するタンパク質分解により、活性化断片への巨大な構造上の変化を経験することにより、その活性化を通じて補体系において中心的な役割を果たす(2 3)。

【 0 1 6 6 】

C 3 の C 3 c への分割は、タンパク質分解性補体因子 I を補因子として因子 H と関与させることは、従前に示された。因子 H の早期増大は、この研究において、補体系の下方制御として見られることを示した。この反応は、宿主細胞を損傷から最終的に保護し、これは、無制限の補体活性化から生じる。同時に、C 4 は、因子 I および H により C 4 c に下方制御される。

10

【 0 1 6 7 】

この研究において、アガロースにて最初に親和性精製し、 α -メチルグルコシドで溶出した血漿を分析するとき、A F と一緒の補体 C 3 c を同定した。本発明者らは、S P C 摂取後、直接の血漿におけるウエスタンブロットにより、C 3 c 増大を検出することができなかった。

【 0 1 6 8 】

結論

この研究は、A F の活性化の背後にある機序を記載する、新しい基礎を提供する。S P C 食後の 2 D 分離した血漿は、活性化 A F の増大に先行する、補体 C 3 c の早期上方制御を示した。結論として、補体系における特定の立体構造の変化が、それ故に、A F 活性化中の第 1 のステップである。

20

【 0 1 6 9 】

参考文献

1. WO 97/08202
2. WO 05/030246
3. WO 97/08202
4. WO 97/08202
5. WO 98/21978
6. WO 00/038535
7. WO 05/030246
8. WO 07/126364
9. WO 07/126363
10. WO 07/126365
11. WO 2010/093324
12. Lange et al., 2003; Food-induced antisecretory factor activity is correlated with small bowel length in patients with intestinal resections. *APMIS*. 2003 Oct; 111(10):985-8.
13. Laurenus et al., 2003; Antisecretory factor counteracts secretory diarrhoea of endocrine origin. *Clin Nutr*. 2003 Dec; 22(6):549-52.
14. Jennische et al., 2006; Immunohistochemical staining patterns using epitope-specific antibodies indicate conformation variants of antisecretory factor/S5a in the CNS. *APMIS*. 2006 Jul-Aug; 114(7-8):529-38.
15. Tomko, R.J., Jr. and M. Hochstrasser, Molecular architecture and assembly of the eukaryotic proteasome. *Annu Rev Biochem*, 2013. 82: p. 415-45.
16. Sixt, S.U. and B. Dahlmann, Extracellular, circulating proteasomes and ubiquitin - incidence and relevance. *Biochim Biophys Acta*, 2008. 1782(12): p. 817-23.
17. Johansson, E., I. Lonroth, S. Lange, I. Jonson, E. Jennische, and C. Lonroth, Molecular cloning and expression of a pituitary gland protein modulating in

30

40

50

testinal fluid secretion. J Biol Chem, 1995. 270(35): p. 20615-20.

18. Bjorck, S., I. Bosaeus, E. Ek, E. Jennische, I. Lonroth, E. Johansson, and S. Lange, Food induced stimulation of the antisecretory factor can improve symptoms in human inflammatory bowel disease: a study of a concept. Gut, 2000. 46(6) : p. 824-9.

19. Lange, S. and I. Lonroth, The antisecretory factor: synthesis, anatomical and cellular distribution, and biological action in experimental and clinical studies. Int Rev Cytol, 2001. 210: p. 39-75.

20. Johansson, E., I. Lonroth, I. Jonson, S. Lange, and E. Jennische, Development of monoclonal antibodies for detection of Antisecretory Factor activity in human plasma. J Immunol Methods, 2009. 342(1-2): p. 64-70.

10

21. Johansson, E., M. Al-Olama, H.A. Hansson, S. Lange, and E. Jennische, Diet-induced antisecretory factor prevents intracranial hypertension in a dosage-dependent manner. Br J Nutr, 2013. 109(12): p. 2247-52.

22. Nilsson, S.C., R.B. Sim, S.M. Lea, V. Fremeaux-Bacchi, and A.M. Blom, Complement factor I in health and disease. Mol Immunol, 2011. 48(14): p. 1611-20.

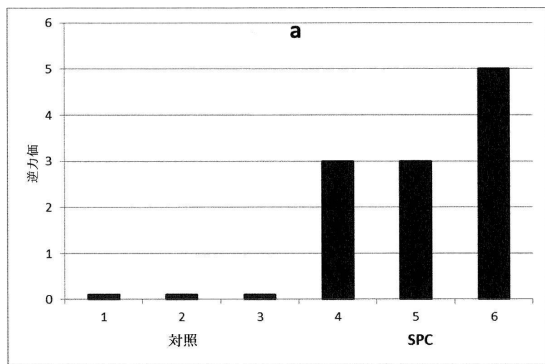
23. Nicolas, V. and V. Lievin-Le Moal, Antisecretory peptide AF-16 inhibits the Sat toxin-stimulated transcellular and paracellular passages of fluid in cultured human enterocyte-like cells. Infect Immun, 2014.

24. Matson Dzebo, M., A. Reymer, K. Fant, P. Lincoln, B. Norden, and S. Rocha, Enhanced cellular uptake of antisecretory peptide AF-16 through proteoglycan binding. Biochemistry, 2014. 53(41): p. 6566-73.

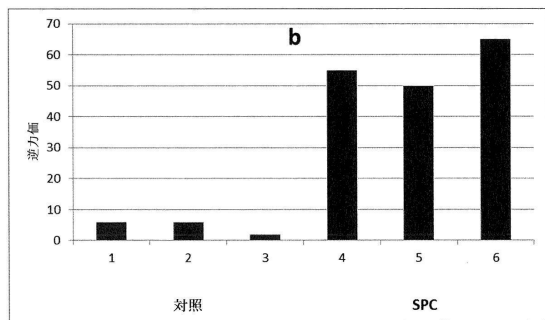
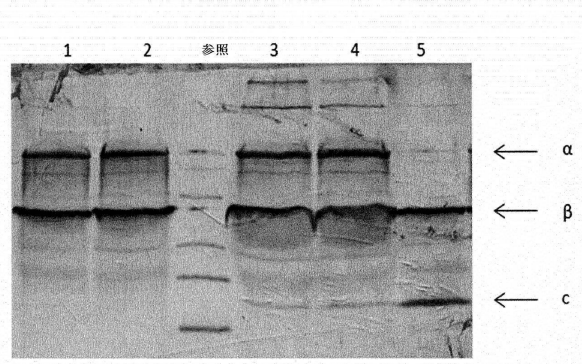
20

25. DeMartino, G.N., Purification of PA700, the 19S regulatory complex of the 26S proteasome. Methods Enzymol, 2005. 398: p. 295-306.

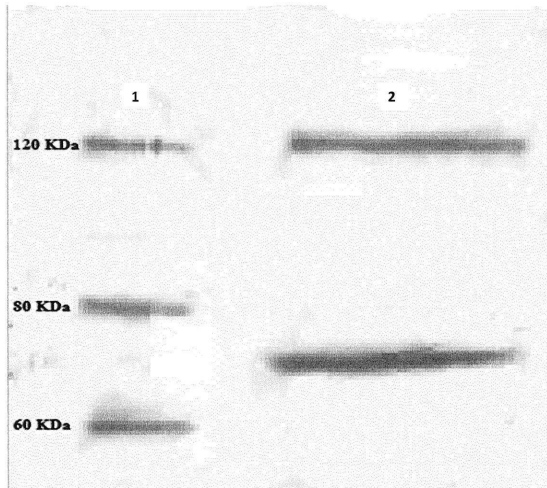
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】

表 1

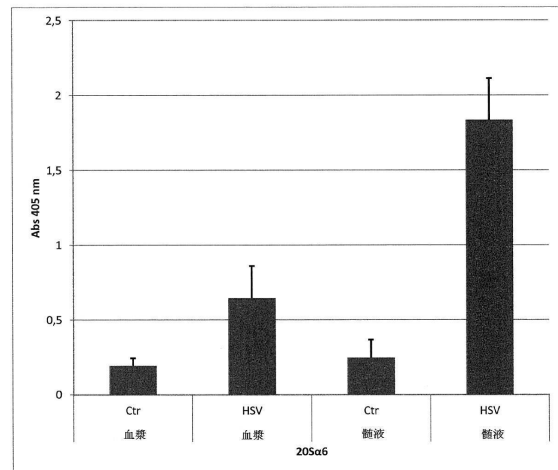
人	-アガロース	+アガロース
1	6	40
2	6	55
3	2	50
4	55	270
5	50	250
6	65	300

【 図 5 】

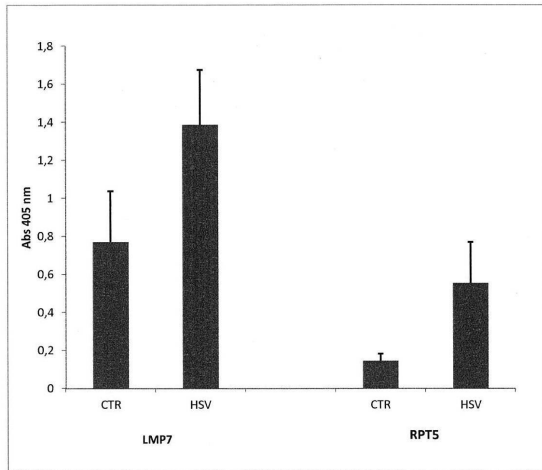
表 2

人	CFI $\mu\text{g/ml}$	CFH ng/ml
1	3.7	7
2	4.4	3
3	3.1	6
4	4.0	8
5	4.1	8
6	4.4	4

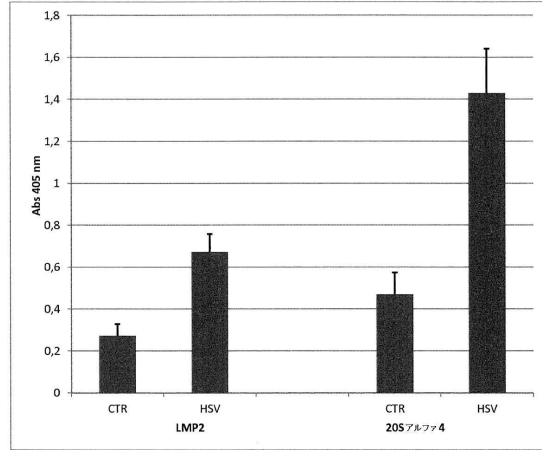
【 図 6 A 】



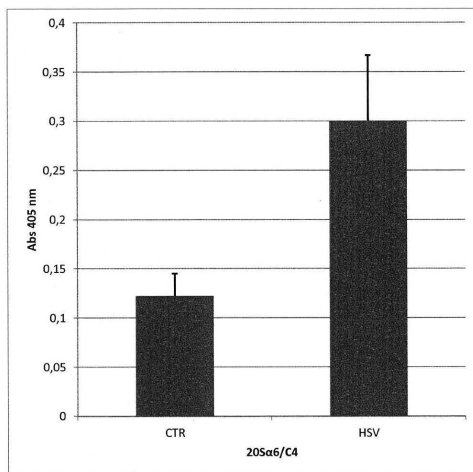
【 図 6 B 】



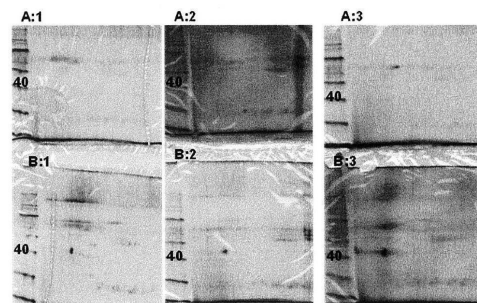
【 図 6 C 】



【 図 7 】



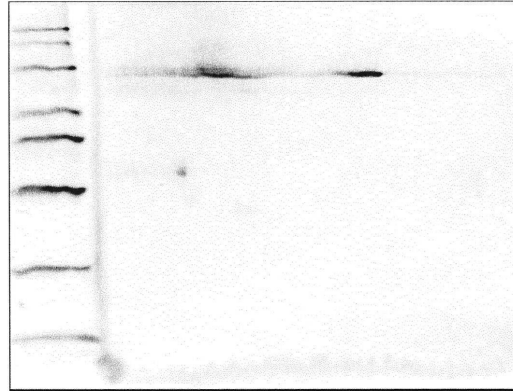
【 図 8 】



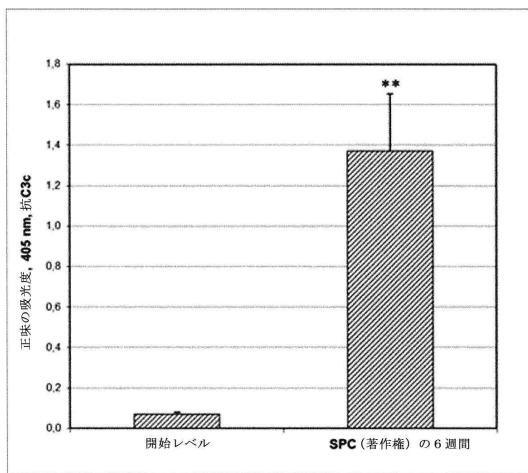
【図 9】

受託番号 (Swissprot)	タンパク質名	スコア	配列カバー度 (%)	指定固有ペプチド	
P01024	補体 C3	1581.20	9.92	14	
配列	イオンスコア	電荷	MH+ [Da]	m/z [Da]	失敗した切断
ENEGFTVTAEGK	75	2	1281.59624	641.30176	0
SEETKENEGFTVTAEGK	74	2	1855.85698	928.43213	1
SGSDEVVQVGGQR	68	2	1289.60735	645.30731	0
ACEPGVDVYVK*	63	2	1314.60344	657.80536	0
VTIKPAPETEK	57	2	1212.68230	606.84479	0
SDDKVTLEER	54	2	1191.58562	596.29645	1
VSHSEDDKLAFAK*	50	3	1421.63742	474.55066	0
EALKLEEK	45	2	959.54003	480.27365	1
GAENCFIQK*	42	2	1326.58232	663.79480	0
VHQYFVWELIQGAVK	41	3	1841.99814	614.67090	0
NTLIIVLDK	41	2	1092.63225	546.81976	0
GQGTLSVWVMYHAK	40	2	1491.76409	746.38568	0
FYHPEKEDGK	37	2	1249.58501	625.29614	1
AKQQLTcNK*	31	2	1091.55156	546.27942	1
TFISPIK	29	2	805.48137	403.24432	0
YISKYELDK	27	2	1158.60430	579.80579	1
FYHPEK	25	2	820.39855	410.70291	0
P08238	ヒートショック プロテイン HSP 90-beta ペプチド	103.18	3.04	2	
配列	イオンスコア	電荷	MH+ [Da]	m/z [Da]	失敗した切断
ELISNASDALDK	61	2	1275.64226	638.32477	0
EDQTEYLEER	53	2	1311.57097	656.28912	0

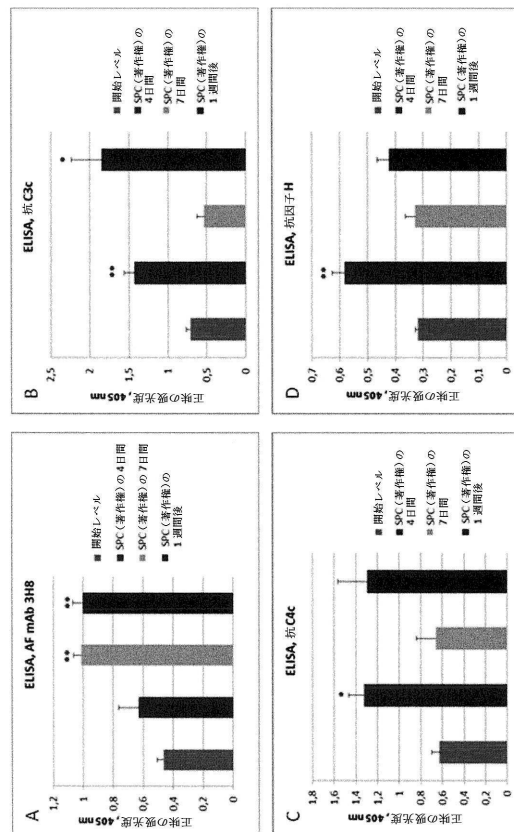
【図 10】



【図 11】




【図 12】



【 14 D 】

【 15 】

特許手続き上の微生物の寄託の国際的
承認に関するプラズマ条約



国際的書式

デパートメント・オブ・インフェクシャス・ディズイーズ
インスティテュート・オブ・バイオメディシン
イエーテボリ、ユニバーシティー
グムド・ド・スガータン10
41346 イェーテボリ
スウェーデン

本書の下部において規定される国際寄託当局
により第10.3条に従い交付される生存証明書

I. 寄託者	II. 微生物の識別
名称: デパートメント・オブ・インフェクシャス・ディズイーズ インスティテュート・オブ・バイオメディシン 住所: イェーテボリ、ユニバーシティー グムド・ド・スガータン10 41346 イェーテボリ スウェーデン	国際寄託当局により付与された受託番号: DSM ACC3271 寄託または受託の日付: 2015-05-12
III. 生存証明	
上記 II の下欄に記された微生物の生存は 2015年5月18日に試験された。 ¹ 試験材料において、前記微生物は <input checked="" type="checkbox"/> 生存 <input type="checkbox"/> もはや生存していない	
IV. 生存試験が行われた条件¹	
V. 国際寄託当局	
名称: ライブニッツ・インスティテュート ディー・エス・エム・ゼット・ビー・ワイ・エム・コレクション・ オフ・ミクロオーガニズム・アンド・セル・ カルチャー 住所: デー-38124 ブラウンスヴィーク インターフェンシュトラーセ166	国際寄託当局または機関のある機関の代表者を 有する人の署名  日付: 2015-05-28

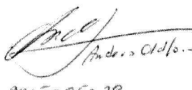
1 原寄託の目的の表示、または新たな寄託もしくは移植がなされた場合、最も受託の通知の日付または移送の日付
2 第 10.2(a) (a) および (b) 条を指す場合、最も最近の生存試験を指す
3 適当な説明は必ず提供される
4 情報が必要され、試験の結果が陰性であるなら、満たす

書式 DSMZ-889 (魚頁) 82/2012

承認および同意の寄託者の宣言

下記の、アンダース オールドフォーズ、デパートメント・パソロジー、インスティテュート・
 オブ・バイオメディシン、ユニバーシティー・オブ・イエーテボリ、P.O.B. 420, S-40530、
 イェーテボリ、スウェーデンが、デパートメント・オブ・インフェクシャス・ディズイーズ、
 インスティテュート・オブ・バイオメディシン、イエーテボリ、ユニバーシティー・
 グムド・ド・スガータン10、41346 イェーテボリ、スウェーデンの名義の下、2015年5月12日に、
 プラズマ条約に署名したものと同一の用語の受託番号 **DSM ACC3271** 生物学材料の下、
 ライブニッツ・インスティテュート ディー・エス・エム・ゼット・ビー・ワイ・エム・コレクション・
 ミクロオカルニスメン・ウント・ツェルカルトゥーレン・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・
 ハフツング、インターフェンシュトラーセ166、デー-38124 ブラウンスヴィーク、ドイツに寄託した。

下記の、寄託者は、ラントメネン・アーエス・ファクトール・アーベリ、ボックス 30192, 104 25
 ストックホルムが、(国際および欧州および米国特許出願番号(代表的な参照番号
P554728PC00/ P554728P00/ P554728U00) における上述の寄託された生物学材料を指すことを
 ここで承認し、上述の特許出願の日付日より、EPC施行規則第33条に従い公的に入手可能となる寄託された
 材料に対する彼の無条件かつ取消可能な同意を与えた。

署名:  Anders Oldfors
 Prefekt
 Institutionen för biomedicin

日付: 2015-05-28

【 配列表 】

000645436000001 . app

フロントページの続き

(72)発明者 イーヴァル・レーンロート
スウェーデン国エス - 4 3 1 6 9 モルンダル・スレートルトリーデン 8

審査官 大瀧 真理

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 0 5 3 1 9 8 (U S , A 1)
EWA JOHANSSON ET AL. , DIET-INDUCED ANTISECRETORY FACTOR PREVENTS INTRACRANIAL HYPERTENSION IN A DOSAGE-DEPENDENT MANNER , BRITISH JOURNAL OF NUTRITION , 2 0 1 2 年 1 1 月 1 6 日 , VOL:109, NO:12, PAGE(S):2247 - 2252
J. EMANUEL RAMOS DE CARVALHO ET AL. , COMPLEMENT FACTOR C3A ALTERS PROTEASOME FUNCTION IN HUMAN RPE CELLS AND IN AN ANIMAL MODEL OF AGE-RELATED RPE DEGENERATION VISION AND OPTHALMOLOGY , INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY & VISUAL SCIENCE , 2 0 1 3 年 1 0 月 , VOL:54, NO:10 , PAGE(S):6489 - 6501

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

专利名称(译)	抗分泌因子复合物测定		
公开(公告)号	JP6454360B2	公开(公告)日	2019-01-16
申请号	JP2016569622	申请日	2015-05-28
[标]申请(专利权)人(译)	兰特门内阿斯-法克托尔公司		
申请(专利权)人(译)	Rantomenen-AESU - Fakatoru , 安倍晋三		
当前申请(专利权)人(译)	Rantomenen-AESU - Fakatoru , 安倍晋三		
[标]发明人	シュテファンランゲ イーヴァルレーンロート		
发明人	シュテファン・ランゲ イーヴァル・レーンロート		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18		
CPC分类号	G01N33/564 C07K16/00 C07K16/18 C12Q1/37 G01N2333/4716 G01N2800/7095		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.R C07K16/18.ZNA		
优先权	1450640 2014-05-28 SE		
其他公开文献	JP2017517733A5 JP2017517733A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了使用第一抗体和第二抗体确定样品(例如体液)中蛋白酶体-补体复合物形成的存在或不存在和/或浓度的方法,一种测定试剂盒,其中第一抗体固定在载体上,第二抗体用标记物质修饰,第一抗体和第二抗体结合蛋白酶体蛋白如AF1或完整蛋白酶体,特异于补体因子C3的抗体,如C3, C3c, C3b, iC3b, 或补体因子C4特异性抗体,如C4, C4b, iC4b或C4c其中使用免疫测定试剂盒。所公开的测定可以应用于血浆或其他体液中的补体因子3或4,例如用于监测哺乳动物体内的炎症和病毒感染水平,包括哺乳动物体内的补体系统下调。用于检测结合循环26 S蛋白酶体的水平,并验证加工谷物(SPC)和/或含有高水平天然抗分泌蛋白(NASP)的功能性食品的依从性。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6454360号 (P6454360)
(45) 発行日 平成31年1月16日(2019. 1. 16)	(24) 登録日 平成30年12月21日(2018. 12. 21)	
(51) Int. Cl. G01N 33/53 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)	F I G01N 33/53 D G01N 33/53 R C07K 16/18 ZNA	
請求項の数 23 (全 40 頁)		
(21) 出願番号 特願2016-569622 (P2016-569622)	(73) 特許権者 508318845 ラントメネン・アーエス・ファクトール・ アーベー スウェーデンS-104 25ストック ホルム、ボックス30192	
(86) (22) 出願日 平成27年5月28日(2015. 5. 28)	(74) 代理人 100127926 弁理士 結田 純次	
(65) 公表番号 特表2017-517733 (P2017-517733A)	(74) 代理人 100140132 弁理士 竹林 則幸	
(43) 公表日 平成29年6月29日(2017. 6. 29)	(72) 発明者 シュテファン・ランゲ スウェーデンエス-411 28 ヨー テポリ、ネードレ・フォーゲルバリスガタ ン9ペー	
(86) 国際出願番号 PCT/EP2015/061899		
(87) 国際公開番号 W02015/181324		
(87) 国際公開日 平成27年12月3日(2015. 12. 3)		
審査請求日 平成29年5月26日(2017. 5. 26)		
(31) 優先権主張番号 1450640-6		
(32) 優先日 平成26年5月28日(2014. 5. 28)		
(33) 優先権主張国 スウェーデン(SE)		
微生物の受託番号 DSMZ DSM ACC3271		
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 抗分泌因子複合体アッセイ		