

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公表特許公報** ( A ) (11)特許出願公表番号

**特表2002 - 539458**

(P2002 - 539458A)

(43)公表日 平成14年11月19日(2002.11.19)

| (51) Int. Cl <sup>7</sup> | 識別記号 | F I           | ターコード* (参考) |
|---------------------------|------|---------------|-------------|
| G 0 1 N 33/53             |      | G 0 1 N 33/53 | W           |
|                           |      |               | D           |
| 33/531                    |      | 33/531        | Z           |

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 40数)

|             |                                 |         |                                                                                 |
|-------------|---------------------------------|---------|---------------------------------------------------------------------------------|
| (21)出願番号    | 特願2000 - 605216(P2000 - 605216) | (71)出願人 | セレックス, インコーポレイテッド<br>アメリカ合衆国 ニュージャージー 0760<br>7, メイウッド, ウェスト パサイック<br>ストリート 230 |
| (86)(22)出願日 | 平成12年3月16日(2000.3.16)           | (72)発明者 | フィッツパトリック, ジュディス<br>アメリカ合衆国 ニュージャージー 0767<br>0, テナフライ, ハイウッド アベニュー<br>236       |
| (85)翻訳文提出日  | 平成13年9月17日(2001.9.17)           | (72)発明者 | レンダ, レジーナ ビー.<br>アメリカ合衆国 ニューヨーク 10977,<br>ウェスレイ ヒルズ, タミー ロード 2<br>7             |
| (86)国際出願番号  | PCT/US00/06810                  | (74)代理人 | 弁理士 山本 秀策                                                                       |
| (87)国際公開番号  | W000/55635                      |         |                                                                                 |
| (87)国際公開日   | 平成12年9月21日(2000.9.21)           |         |                                                                                 |
| (31)優先権主張番号 | 60/124,562                      |         |                                                                                 |
| (32)優先日     | 平成11年3月16日(1999.3.16)           |         |                                                                                 |
| (33)優先権主張国  | 米国(US)                          |         |                                                                                 |

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 唾液中のA P O AおよびA P O B、ならびにそれらの比を検出するための方法およびデバイス

(57)【要約】

唾液中のアポリポタンパク質A - 1およびBのレベル(これは、それぞれ、血清中のH D LおよびL D Lのレベルに関連する)を検出するための方法が開発された。刺激されていない唾液において、A p o A対A p o Bの比は、血清中のH D L対L D Lの比に関連する。アルブミンを使用して、希釈のためのサンプルと正規化し得る。収集部位で実施され得る簡単に迅速な試験との組合せの高度の相関は、心臓疾患の個々の危険度をモニタリングするための費用効果のある患者に優しい手段を提供する。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 唾液をアポリポタンパク質と免疫反応性の抗体と反応させる工程を包含する、アポリポタンパク質を検出するための方法。

【請求項2】 前記アポリポタンパク質が、Apo A、Apo B、Apo C、Apo E、およびそれらの成分からなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記アポリポタンパク質が、Apo A1、およびApo Bからなる群から選択される、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 前記抗体が、検出可能な標識で標識される、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 前記唾液が、収集後3時間未満で試験される、請求項1に記載の方法。

【請求項6】 前記唾液が、ムコ多糖類を除去するために、試験の前に調製される、請求項1に記載の方法。

【請求項7】 前記唾液が刺激後に収集される、請求項1に記載の方法。

【請求項8】 前記唾液中に存在するアルブミンの量を決定する工程をさらに包含する、請求項1に記載の方法。

【請求項9】 前記唾液中に存在するアルブミンの量に対して、前記アポリポタンパク質の量を正規化する工程をさらに包含する、請求項8に記載の方法。

【請求項10】 前記唾液がデバイスに収集され、該デバイスがムコ多糖類を濾去し、そして1つ以上のアポリポタンパク質と免疫反応性の抗体を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項11】 前記アポリポタンパク質が、Apo A1またはApo Bのいずれかである、請求項10に記載の方法。

【請求項12】 唾液サンプル中のアポリポタンパク質の量を決定するためのアッセイデバイスまたはキットであって、唾液の収集のための手段、およびアポリポタンパク質と免疫反応性の抗体を含む、アッセイデバイスまたはキット。

【請求項13】 前記唾液からムコ多糖類を除去するための濾過手段をさらに備える、請求項12に記載のアッセイデバイスまたはキット。

【請求項14】 前記抗体が、Apo A、Apo B、Apo C、Apo E、およびそれらの成分からなる群から選択されるアポリポタンパク質と反応性である、請求項12に記載のアッセイデバイスまたはキット。

【請求項15】 アルブミンと免疫反応性の抗体をさらに含む、請求項12に記載のアッセイデバイスまたはキット。

【請求項16】 前記抗体が固体支持体上に含有されるか、または固体支持体に固定化される、アッセイデバイスまたはキット。

【請求項17】 前記アポリポタンパク質と前記抗体との複合体を検出するための試薬を含む、請求項16に記載のアッセイデバイスまたはキット。

【請求項18】 アポリポタンパク質を検出するためのリランドシステムを備える、アッセイデバイスまたはキット。

【請求項19】 アポリポタンパク質に対する抗体、およびアルブミンに対する抗体を別個の試薬として含む、アッセイデバイスまたはキット。

【請求項20】 唾液中のリポタンパク質またはコレステロールの量、あるいは脂質障害の存在または心臓血管疾患の危険度を定量するための方法であって、該方法が、唾液サンプルを、Apo A、Apo B、Apo C、Apo E、およびそれらの成分からなる群から選択されるアポリポタンパク質と特異的に免疫反応性の抗体と反応させる工程を包含する、方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

(発明の背景)

本発明は一般に、唾液におけるアポリポタンパク質 (apolipoproteins) についてのアッセイの分野にある。

**【0002】**

冠状動脈疾患 (CAD) は、大部分の先進国における罹患率および死亡率の主な原因である。危険性のある個体を同定するための多数のマーカーおよび試験が利用可能であり、その中には、脂質マーカー (例えば、総コレステロールおよび種々の循環タンパク質に結合したコレステロール) についての血液試験がある。このような試験の結果に基づいて、適切な予防的または治療的な処置 (食事の改変および運動を含む) を開始して、より重篤なCADに進行するのを妨げ得るかまたは逆転させ得る。

**【0003】**

血漿リポタンパク質は、合成部位および吸収部位から貯蔵部位および/または利用部位への脂質のキャリアである。リポタンパク質は、トリグリセリドおよびコレステロールエステルをそのコアに、ならびにリン脂質、非エステル化コレステロールおよびアポリポタンパク質の層を表面に有する、球状粒子である。これらは、水和密度に基づいて以下のような5つの主なクラスに分類される: カイロミクロンとして公知の非常に大きなトリグリセリドリッチな粒子 (0.95 g/ml未満)、超低密度リポタンパク質 (VLDL、0.95 g/ml ~ 1.006 g/ml)、中間密度リポタンパク質 (IDL、1.006 g/ml ~ 1.019 g/ml)、低密度リポタンパク質 (LDL、1.019 g/ml ~ 1.063 g/ml) および高密度リポタンパク質 (HDL、1.063 g/ml ~ 1.210 g/ml) (OsborneおよびBrewer, Adv. Prot. Chem. 31: 253-337 (1977); Smith, L.C.ら、Ann. Rev. Biochem., 47: 751-777 (1978))。

**【0004】**

アポリポタンパク質は、以下の3つの主な機能を有するリポタンパク質のタン

パク質成分である：(1)リポタンパク質粒子の安定性維持、(2)リポタンパク質に作用する酵素についての補因子としての作用、および(3)レセプター媒介機構によるリポタンパク質の循環からの除去。4つの群のアポリポタンパク質は、アポリポタンパク質A(Apo A)、アポリポタンパク質B(Apo B)、アポリポタンパク質C(Apo C)およびアポリポタンパク質E(Apo E)である。3つの群A、BおよびCの各々は、2以上の別個のタンパク質からなる。これらは、以下である：Apo Aについては：Apo A-I、Apo A-IIおよびApo A-IV、Apo Bについては：Apo B-100およびApo B-48；そしてApo Cについては：Apo C-I、Apo C-IIおよびApo C-III。Apo Eとしては、いくつかのアイソフォームが挙げられる。リポタンパク質の各々のクラスは、唯一のアポリポタンパク質としてApo B-100を含むLDLを除いて異なった比率の種々のアポリポタンパク質を含む。Apo A-IおよびApo A-IIは、HDLの約90パーセントのタンパク質部分を構成し、他方、Apo CおよびApo Eは、カイロミクロン、VLDL、IDLおよびHDL中に種々の比率で存在する。Apo B-100は、LDL、VLDLおよびIDL中に存在する。Apo B-48は、カイロミクロンおよびいわゆるカイロミクロンレムナントのみに存在する(Kane, J. P., Method. Enzymol. 129: 123-129 (1986))。

#### 【0005】

総血漿または血清コレステロール(C)は、伝統的にCADの主なスクリーニングおよび指標であるが、血清リポタンパク質プロファイル(HDL、LDL、VLDL、リポタンパク質Aを含む)へと、特にLDL/HDLまたは総C/HDL比(これらは、CADの発生率および重篤度とより良好に相関すると示されている)へと近年重みが変わっている。LDL、VLDLおよびVLDLレムナントのアテローム発生可能性とは対照的に、HDLは、CHDと逆に相関し、その結果、低濃度のHDL-Cを有する個体は、CHDの増加した発生率を有する(Gordon, T.ら, Am. J. Med., 62: 707-714 (1977)); Miller, N. E.ら, Lancet, 1: 965-968 (1977)

) ; Miller , G . J . および Miller , N . E . , Lancet , 1 : 16 - 19 ( 1975 ) 。

#### 【0006】

これらのマーカーのスクリーニングおよびモニタリングについての非常に多数の手動および自動の方法が利用可能である。しかし、これらの試験の全ては、注射器によって採血された静脈血またはいくつかの場合には針 ( needle prick ) によって得られた毛細管血のいずれかを必要とする。両方の方法は侵襲性であり、そして多くの個体に対して不快であり、そして ( 好ましくは医者のおフィスにおける ) 訓練を受けたプロの人員によって最良に行われて、誤った結果を最小にする。血液製剤の取り扱いおよび廃棄はまた、感染性因子および病原体からの潜在的危険を含む。

#### 【0007】

従って、侵襲性手順を必要としない、より安全な代替的標本を提供することが非常に望ましい。さらに、理想的な分析方法またはデバイスは、収集点 ( 「 P O C 」 ) 診断について最小のコストで迅速かつ信頼性の高い結果を提供するべきである。

#### 【0008】

血清中に出現する大部分の分析物はまた、唾液にも出現するが、そのレベルは血清レベルのごく一部である。唾液への分析物の輸送は、細胞内輸送 ( 拡散または受動輸送 ) または細胞外輸送 ( 能動輸送 ) によって行われ得る。脂質溶解性である物質は、細胞区画を通しての拡散によって唾液へと入る ( Haekcel , Ann . N . Y . Acad . Sci . 694 , 128 - 142 ( 1993 ) ) 。

#### 【0009】

唾液は、診断液として利用されていない。なぜなら、唾液をアッセイ形態に適応させる際に多くの問題が伴うからである。例えば、十分なサンプルを収集することは困難である : 大部分の試験は、少なくとも 1 ml の唾液の収集を必要とする。なぜなら、濾過および取り扱いの間にかかなりの損失が存在するからである。これは、平均 3 ~ 5 分間の唾液分泌を必要とし、このことを大部分の人は快く行うわけではない。95% の若者についての平均流速は、0.35 ml / 分 ~ 0 .

38ml/分である(K. Diemら(編) Scientific Tables (Ciba-Geigy Pharmaceuticals 1970) 643頁。さらに、アッセイのために唾液サンプルを調製する唾液サンプルの取り扱い、退屈でかつ不愉快の両方である。唾液は一般に、ムコ多糖を除去し、かつ流動および取り扱いを可能にするために濾過しなければならない。利用可能な収集デバイスは、コットンパッドを利用して、口内の唾液を吸収させる。従って、このパッドは、唾液を収集しかつ加工するように作用し、唾液をアッセイのために調製する。次いで、このパッドは、保存剤を含む一定の容量の流体に入れられ、そして分析のために研究室に輸送される。保存液は、(存在した場合)どれだけの量の唾液が収集されそしてこの保存剤に添加されたかを知るのを不可能にして定量を妨げる。このデバイスが研究室に届いたとき、技術者は、遠心分離または濾過のいずれかによってパッドおよびムコ多糖を除去しなければならない。これは、時間がかかりかつ不快な仕事である。少量の唾液サンプルおよび唾液中の低レベルの分析物は通常、唾液サンプルが、自動分析器によって分析できないが、高感度のE l i s aまたはR I A (これらの方法はいずれも労力を要する試験である)においてアッセイしなければならないことを意味する。

#### 【0010】

唾液の多くの研究は、分析物のレベルが分泌腺および収集の方法(例えば、刺激状態の流れ対正常な流れ)で変化することを示している。概説としては、S a l i v a a s a D i a g n o s t i c F l u i d (D. MalmudおよびL. Tobak編、Ann. N. Y. Acad. Sci. 第694D巻(1993))ならびにJ. O. Tenuvuo(編) Human Saliva: Clinical Chemistry and Microbiology (CRC Press Inc. 1989) 第I巻および第II巻を参照のこと。従って、唾液中で報告されている脂質レベルの有意な変動は、大部分が収集方法に起因することが推定される。コレステロールのレベルもまた、血清中で見られるレベルの約1/400から約1/50のレベルまで低い。Bronislawら「Lipids of Saliva and Salivary Concretions」、Human Saliva: Clinical Chemi

stry and Microbiology (CRC Press Inc. 1989) 第II巻、121-145。従って、個々のサンプル中のレベルは、唾液中の脂質の慣用的なアッセイにおける従来の血清アッセイのためには低すぎ、従って、感受性の高いイムノアッセイの使用または大量の唾液のいずれかが必要とされる。J. C. Touchstoneら、「Quantitation of Cholesterol in Biological」、Adv. Thin. Layer Chromatogr., Proc. Bienn. Symp. Meeting Date 1980 (Wiley & Sons 第2版、1982)は、全コレステロールおよび脂質を測定した。さらに、一日の中の時刻に依存しそして日によるレベルの変動(8%未満)が存在し、朝の試料中で最も高いレベルでありそして日中を通してはより低い。このことは、唾液中のコレステロール試験は、一日の同じ時刻に行うべきことを示唆する。

#### 【0011】

唾液を使用することに伴う別の問題は、唾液が口腔微生物叢でひどく汚染されていることである。利用可能な収集デバイスは、細菌の増殖を遅らせる高レベルの防腐剤を提供するが、サンプルが注意深く保存される場合(例えば、凍結による)を除いては、サンプルはしばしば腐敗し、そして実験室の技術者は、しばしば、唾液を加工することを避ける。さらに、高レベルの防腐剤は多くのアッセイに干渉し得る。唾液はまた、唾液起源および細菌起源の両方の多くのタンパク質および酵素を含む。時を経ると、これらの酵素およびタンパク質は、目的の分析物と相互作用し得、そしていくつかの分析物のアッセイを不可能にし得る。従って、原則として、貯蔵されたサンプルは、保存添加物および条件が分析物のために最適化されない限りは、正確な結果を生じることが期待され得ない。

#### 【0012】

文献は、コレステロールが唾液中に存在するが、そのレベルは大きく変化することを報告している。例えば、平均5.6 mg/Lが、B. Larssonら、「Lipids in Human Saliva」、Archs. Oral. Biol. 41(1)、105-110(1996)によって報告され; 平均15 mg/Lが耳下腺および顎下腺の唾液分泌物の両方について、Slomiar

yら、J. Dent. Res. 61(1)、24-27(1983)によって報告され；そして69mg/LがRabinowitzら、Arch. Oral. Biol. 20(7)、403-406(1975)によって報告された。

#### 【0013】

上述のように、LDL:HDL比は、冠状動脈疾患の危険性の確立された予測指標である。最近のNCEPガイドラインは、全コレステロールよりもむしろ比の使用を要請している。受容可能な全コレステロールレベルを有するがLDL:HDLの比が3.5より大きいヒトは、より低い比を有する対照よりも冠状動脈疾患を有することが50%よりありそうであることが報告された。総コレステロールが比に取って代わられるのは時間の問題である。

#### 【0014】

HDLおよびLDLと結合するリポタンパク質についてのイムノアッセイは、これらの2つの画分におけるコレステロールの比の測定と相関することが示された。N. Rifaiら(編) Laboratory Measurement of Lipids, Lipoproteins and Apolipoproteins (AACC Press 1994) 114頁。この結果は、HDL画分およびLDL画分が物理的に分離および測定される方法と相関する(Laboratory Measurement of Lipids, Lipoproteins and Apolipoproteins, 1994, N. RifaiおよびR. Warnick編, AACC Press)。

#### 【0015】

唾液腺コレステロールが会合しているタンパク質は、血清中のタンパク質(すなわち、ApoAIおよびApoBII)と同様であるか否かは知られていない。唾液脂質がリポタンパク質とともに腺により分泌されることは、すべての研究から明らかである(Belmont)(Mandelら、Arch. Oral. Biol. 14(2)、231-233(1969))。Slomianyらもまた、唾液中の脂質がタンパク質と会合していることを実証した。しかし、唾液中の脂質の起源またはそれらの物理的状态についての刊行された文献は存在しない(Larssonら)。従って、初期の文献からは、唾液脂質が唾液腺におい

でデノボ合成されるのか、または血清に由来するのかどうかは明らかではなく；そして、それらが血清由来である場合、唾液リポタンパク質が血清中のLDLおよびHDLを結合するアポタンパクと同じであるか否かは明らかではない。脂質ともまた会合する、他の唾液糖タンパク質が存在する。唾液中の脂質粒子の構造が血清中の脂質粒子の構造と同じか否か、およびアポリポタンパク質のコンホメーションが唾液中で血清中と同じであるか否かは文献からは明らかではない。Rabinowitzは、腺によって分泌される脂質が、リポタンパク質と会合して分泌されることを示唆している。彼は、脂質レベルが刺激を受けた唾液において下がるが、互いに同じ比を保持することを実証した。Larssonは、唾液リポタンパク質画分が、血清リポタンパク質よりもより高い密度であることを報告し、そして唾液脂質は、異なって凝集すると結論付けている。

#### 【0016】

種々の研究は、コレステロールの唾液レベルが血清コレステロールレベルと全体的な相関を示すことを示した(Lochner, A. Dissertation Abstract International (1985) 第46巻、#5B)。高コレステロール血症を有する人物の間に、ポジティブな相関が存在することもまた、観察された。Slomianyら、Arch. Oral. Biol. 27(10)、803-808(1982)およびMurtyら、RCS Med. Sci. 10(5)359(1982)。血清および唾液のコレステロールを相関付ける研究が不十分であることは、コレステロールをアッセイするため、従って血清と唾液とを相関付けるための、利用可能な方法は、感度が低すぎるという事実起因し得る。コレステロールを検出する酵素的方法およびクロマトグラフ的方法は、唾液中で利用可能ではない、高いレベルに依存する。従って、これらの方法は、大量の唾液を必要とし、そして脂質の研究は、一般に、プールしたものに対してなされた。唾液中のコレステロールの測定は、さらに複雑である。なぜなら、唾液は、多量のペルオキシダーゼ(いくつかのコレステロールアッセイの酵素成分)を含むからである。

#### 【0017】

従って、本発明の課題は、CAD、HDL、LDL、および/またはLDL:

HDLの比のマーカ-を検出するための、非侵襲性の、装置を用いない(non-instrumental)、正確な、単純な、かつ費用効果的な方法を提供することである。

【0018】

(発明の要旨)

唾液中のアポリポタンパク質A-1およびBのレベル(これは、それぞれ血清中のHDLおよびLDLのレベルと相関する)を検出するための方法を開発した。刺激されていない唾液中では、Apo Bに対するApo Aの比は、血清中のLDLに対するHDLの比に相関する。刺激された唾液中では、アルブミンに対して正規化されたApo Bのレベルは、血清Apo Bと血清LDLとの両方に相関する。収集の部位において実施され得る単純な迅速な試験との組み合わせにおける高度な相関は、個体の心臓病の危険性をモニターするための、費用効果的な、患者にフレンドリーな手段を提供する。好ましい実施形態において、唾液生成は、ブレスミントまたはすっぱい溶液(例えば、レモン)のような手段により刺激され、そして希釈の効果は、アルブミンを参照して制御される。最も好ましい実施形態においては、アッセイは、米国特許第5,710,009号、同第5,500,375号、および同第5,451,504号に記載されるような、Serex積層したストリップの形式を使用して実施される、免疫アッセイである。これらのストリップは有利である。なぜなら、これらのストリップは、収集およびアッセイのデバイスとして作用し、サンプルがストリップ試験に直接適用され、そして分析手順の一体化した部分として処理されるので、取り扱いを非常に単純化するからである。この方法は、200マイクロリットル未満を必要とし、これは、平均的な人物の口中でいつでも入手可能であるはずである。しかし、さらなる唾液生成が、ブレスミントまたはすっぱい汁(例えば、レモン汁)を使用して得られ得る。POCにおける唾液のアッセイは、サンプルを貯蔵するための防腐剤の必要性を排除し、そして口の微生物叢による汚染の問題を完全に回避する。なぜなら、このアッセイは、唾液収集から10分以内で完了し得るからである。

【0019】

(発明の詳細な説明)

Apo AおよびApo Bの両方が唾液中に存在するが、これらのタンパク質は、唾液酵素もしくは細菌または両方によるリポタンパク質の分解に恐らく起因して、非常に新鮮なサンプル中を除いて、電気泳動によっても免疫アッセイによっても検出可能ではないことが、ここで実証された。このことは、他の研究がなぜこれらのタンパク質を観察しなかったかを説明する；なぜなら、これらの方法は、コレステロールを酵素的な方法により検出し、そしてこのために必要とされる時間で、これらのタンパク質は分解したからである。

【0020】

(I. アポリポタンパク質の検出のための試薬)

抗体は、文献において公知であり、そして市販の供給元およびATCCから入手可能である。

【0021】

(Apo Bに対する抗体)

(Pan Bに対する抗体)

D<sub>6</sub>MAbは、Koren, E.ら、*Biochim. Biophys. Acta*. 876:91~100(1986); Koren, E.ら、*Biochim. Biophys. Acta*. 876:101~107(1986)に記載されるように、ヒト血漿中の全てのApo B含有リポタンパク質(詳細には、Apo B-48およびApo B-100を含む)に等しく結合し、そして高親和性である抗体である：D<sub>6</sub>は、Apo Bのアミノ末端半分に位置するエピートープに結合し、そしてB-48およびB-100の両方を認識する。

【0022】

(Apo B-100に対する抗体)

Apo B-100に対するモノクローナル抗体を産生する従来の様式としては、LDLを用いるマウスの免疫が挙げられる。このアプローチは、都合がよい。なぜなら、このアプローチは、LDLを単離するのが比較的簡単であるからである。しかし、免疫原としてLDLを使用して産生されたモノクローナル抗体は、LDL粒子の脂質の組成におけるバリエーションにより生じる、Apo B-

100のコンホメーションの変化に感受性の傾向がある。例えば、Apo B-100エピトープは、種々の量のトリグリセリドの存在に起因して、多数の抗Apo Bモノクローナル抗体とは、それほど反応性ではない(Keidar, S.ら、Metabolism, 39:281~288(1990); Galeano, N.F.ら、J. Biol. Chem. 269:511~519(1994); Harduin, P.ら、Arterioscl. Thromb., 13:529~535(1993))。

#### 【0023】

Oklahoma Medical Research FoundationによるPCT PCT/US95/08331「Antibodies to Lipoproteins and Apolipoproteins and Methods of Use thereof」は、それらの脂質の組成および/またはコンホメーションにおける潜在的なバリエーションにもかかわらず、LDLの選択的な認識およびLDL粒子との高くかつ不変の反応性を提供する抗体(すなわち、脂質含量により影響されない、安定な、コンホメーションとは無関係のエピトープを認識し、かつ全てのLDL粒子で等しく発現されるが、VLDLおよびカイロミクロンにおいて接近不能である抗体)を記載している。HB<sub>3</sub>cB<sub>3</sub>は、B-100のT2カルボキシ末端領域付近のエピトープに排他的に結合し、そしてB-48を認識しない。HB<sub>3</sub>cB<sub>3</sub>により認識されるエピトープは、VLDLに存在する脂質および/または他のアポリポタンパク質によってコンホメーション的に変化またはマスクされ得る。カイロミクロンは、HB<sub>3</sub>cB<sub>3</sub>によって認識されない。なぜなら、それらは、Apo B-100を欠損するからである。HB<sub>3</sub>cB<sub>3</sub>抗体およびこの抗体から誘導されるLDL結合フラグメントが、LDLに対するその特異性および他のリポタンパク質との交叉反応性の欠落のために、本明細書中に記載される全ての組成物および方法において、LDL特異的結合分子として使用され得る。

#### 【0024】

2つの他のLDL特異的モノクローナル抗体が、Milne, R.ら、J. Biol. Chem. 264:19754~19760(1989);ならびにL

a BelleらによるWO93/18067、およびLa Belle, M.ら、Clin. Chim. Acta、191:153~160(1990)(8A2.1および4B5.6)によって記載されている。

【0025】

(Apo A-Iに対する抗体)

Apo A-Iに対する2つの抗体(これは、高親和性でHDLに結合し、そして任意の他のリポタンパク質密度クラスとの無視し得る反応性を示す)もまた、OMRFによるPCT PCT/US95/08331に記載されている。2つの抗Apo A-Iモノクローナル抗体(AIbD<sub>5</sub>およびAIbE<sub>2</sub>)は、立体的に離れたエピトープに結合する。なぜなら、それらは、脂質除去Apo A-Iおよび精製Apo A-IともインタクトなHDL粒子ともいずれかともそれらの結合において互いに競合しないからである。Apo A-Iに対する両方のモノクローナル抗体は、脂質除去Apo A-IおよびHDLに高親和性で結合し、そしてLDL、VLDL、カイロミクロンおよびApo A-II、C-II I I IおよびEに対する無視し得る結合を示すか、またはそれらに対する結合を示さない。

【0026】

(Apo A-IIに対する抗体)

Apo A-IIに対するモノクローナル抗体Cd B<sub>5</sub>(これは、HDLに高親和性で結合し、そして血漿または血清由来のApo A-IIを含む全てのHDL粒子(LP-A-I:A-II粒子)を除去し得、Apo A-IIを含まないHDL粒子(LP-A-I粒子)をインタクトなままにする)は、Koren, E.ら、Arteriosclerosis, 6:521a(1986); Alaupovic, P.ら、J. Lipid Res., 32:9~19(1991)に記載されている。

【0027】

(Apo C-IIIに対する抗体)

Apo C-IIIに対するMAbであるXbA<sub>3</sub>(これは、VLDL粒子の定量に有用である)は、Koren, E.ら、Atherosclerosis

, 95 : 157 ~ 170 ( 1992 ) により記載されている。

【0028】

( Apo E に対する抗体 )

Apo E に対する2つのモノクローナル抗体は、Koren, E.ら、Atherosclerosis, 95 : 157 ~ 170 ( 1992 ) により記載されている。これらのうちの一方のE f B<sub>1</sub>は、VLDLに付随しているApo E (これは、ヘパリンにより沈殿される)を好ましく結合し、一方、他方(E f D<sub>3</sub>)は、サンプルのヘパリン処理により沈殿しないHDL中のApo Eに優先的に結合する。

【0029】

( II . サンプルの調製 )

好ましい実施形態において、唾液は、収集され、ムコポリサッカリドを除去するために綿または類似の孔サイズのフィルターを通してろ過され、そしてアッセイされるまで4℃に冷やして維持される。好ましくは、このサンプルは、収集後3時間以内にアッセイされる。保存剤およびプロテアーゼまたは他の酵素インヒビターが、このサンプルに添加され得る。

【0030】

( III . サンプルの同時の収集、調製およびアッセイ )

代替の実施形態において、一体化した収集およびアッセイデバイスが、使用され得る。Serex, Inc.によるPCT PCT/US98/16256「Integrated Collection and Assay Device for Saliva and Blood」に記載されるように、このデバイスは、流体コレクター、処理および計測パッドならびに/またはフィルター、および1以上のアッセイストリップを備え得る。流体コレクターは、唾液または血液の収集に適合され得る。アッセイストリップは、現在使用されている任意の型であり得る。ニトロセルロースが、好ましい材料である。好ましくは、アッセイストリップは、米国特許第5,500,375号に記載されるような、積層計量棒である。

【0031】

好ましい実施形態において、このデバイスは、ステム部分および漏斗部分を有するホルダーを備える。1つの実施形態において、ホルダーは、ステム部分とともに積層される、プラスチックの二重シートであり得る。例えば、ホルダーは、ポリエチレンまたは別の透明な可撓性プラスチックから作製され得る。漏斗部分は、ステム部分に下に伸びる側方の封鎖を形成するように、縁上で封鎖される。従って、開口端収集「漏斗」は、ステム部分と流体連絡している漏斗部分に形成される。デバイスの頸部、または漏斗部分とステム部分との接合部は、処理および計測パッドである。このパッドは、好ましくは、サンプルからの口腔片およびムコポリサッカリドをろ過するように働く吸着パッドまたはスポンジである。これは、任意の適切な材料、好ましくは、線維質、最も好ましくは、セルロースまたはセルロース誘導体のような材料から形成され得る。いくつかの実施形態において、この材料は、荷電され得るか、またはフィルターを通して分離または通過をもたらす物質を含み得る。例えば、パッドはまた、緩衝液および試薬（例えば、解離剤または粘膜溶解剤）ならびに必要とされ得る界面活性剤を含み得る。パッドはさらに、アッセイストリップに移されるサンプルの量を計測するように働く。これは、パッドのサイズ、形状、間隙率および組成（サンプル容量の分離および計測の最適化に必要とされるように調整され得る）の選択によって達成される。

#### 【0032】

デバイスは、1以上のアッセイストリップを備える。これらは、サンプル中の複数の検体の測定の場合には、同じ材料でも異なる材料でもよい。アッセイストリップは、パッドからステム部分に伸びている。アッセイストリップは、パッドと流体連絡している膜を支持するキャリアを備える。アッセイストリップは、任意のクロマトグラフィーアッセイストリップであり得るが、好ましくは、米国特許第5,500,375号および同第5,710,009号に記載されるように設計される。最も好ましい実施形態において、膜は、処理または計測パッドに隣接するサンプル適用領域を備えるニトロセルロースストリップである。この膜はさらに、例えば、可動域上に固定された、移動可能な標識された試薬を有する可動域を備える。この膜はまた、1以上の捕捉域を備える。3つは、例えば、アッ

セイの設計に依存して、未反応の検体または標識された検体を捕捉するための種々の試薬を含む。この好ましい実施形態において、この膜はさらに、1以上の捕捉域と同じであり得る、1以上の検出域を備える。検出域に重なるホルダーの区画は、好ましくは、アッセイの結果が読み取られ得るように透明である。

【0033】

(IV. 他のイムノアッセイ)

唾液中のアポリポタンパク質は、任意の多数の異なるアッセイ (ELISA および自動化免疫濁度測定アッセイ、ならびに従来の技術を使用して作製された計量棒を含む) を使用して測定され得る。

【0034】

(ELISA)

ELISAにおいて、サンプルは、マイクロタイタープレートにおける別々のウェルに配置され、そしてこのウェルの壁に吸着させられる。次いで、このウェルは、抗原により結合されないウェルの壁の領域を覆うために、ブロッキング剤 (例えば、ウシ血清アルブミンまたは脱脂乳タンパク質) で処理される。次いで、抗体が、適切な緩衝液において、1以上の濃度でこのウェルに添加され、そしてマイクロタイタープレートは、抗体が各々のウェルの壁に吸着された抗原を結合することを可能にする適切な条件下でインキュベートされる。次いで、ウェル中の抗原 (すなわち、Apo A1、Apo B など) に結合した抗体の存在が、ウェル中のアポリポタンパク質に結合した抗体を結合する、標準的な酵素結合体化抗 - 抗体を使用して検出され得る。次いで、ウェル (その中で、抗体が抗原に結合している) は、抗 - 抗体に結合体化した酵素に発色基質を添加すること、および光学デバイス (例えば、ELISAプレートリーダー) によって検出される発色によって同定される。

【0035】

他の検出系 (例えば、ビオチン - ストレプトアビジン系) もまた、使用され得る。この系において、1つの抗体 (アポリポタンパク質と免疫反応性の抗体、または特定の抗体と免疫反応性の抗体のいずれか) が、ビオチン化される。非ビオチン化抗体は、アポリポタンパク質またはリポタンパク質抗原でコーティングさ

れたウェルとインキュベートされる。コーティングされた抗原に結合したビオチン化抗体の量は、ストレプトアビジン - ペルオキシダーゼ結合体および発色基質を使用して決定される。

#### 【0036】

あるいは、抗体は、イムノアッセイでの使用についての任意の多くの蛍光化合物（例えば、フルオレセインイソチオシアネート、ユーロピウム、ルシファーイエロー、ローダミンBイソチオシアネート）を使用して標識され得る（Wood, P.: Principles and Practice of Immunoassay, Stockton Press, New York, 365~392頁(1991)）。抗体 - 抗原複合体の分離についての公知の技術とともに、これらの蛍光団が、アポリポタンパク質を定量するために使用され得る。同じものが、化学発光イムノアッセイに適用され、この場合、抗体またはアポリポタンパク質は、イソルミノールまたはアクリジニウムエステルで標識され得る（Krodel, E.: Bioluminescence and Chemiluminescence: Current Status, John Wiley and Sons Inc. New York, 107~110頁(1991); Weeks, I.: Clin. Chem. 29: 1480~1483(1983)）。ラジオイムノアッセイ（Kashyap, M. L.: J. Clin. Invest. 60: 171~180(1977)）は、抗体が放射性同位体（例えば、 $^{125}\text{I}$ ）での標識後に使用され得る別の技術である。これらのイムノアッセイのいくつかは、適切な機器（例えば、蛍光イムノアッセイについては、IMx™（Abbott, Irving, TX）、および化学発光イムノアッセイについては、Ciba Corning ACS 180™（Ciba Corning, Medfield, MA））の使用によって容易に自動化され得る。

#### 【0037】

##### （免疫沈降）

免疫沈降は、複合体混合物中の少量のタンパク質を、その抗体との相互作用によって同定する別の手段である。存在する抗原の量は、光学的検出手段（例えば

、分光光度計)を使用して、溶液の濁り度における変化によって決定され得るか、またはその沈降物を単離し、そして抗体上の標識の検出(代表的には、ELISAを使用して)、蛍光標識の測定、または放射標識の測定によって測定され得る。抗体が抗原を沈降させない場合、沈降は、第2の抗-抗体または同じ抗原と免疫反応性の第2の抗体を使用して増強され得る。

#### 【0038】

例えば、LDLについての免疫濁度(immunoturbidimetric)アッセイにおいて、好ましくは、LDLを排他的に沈降させ得る単一のモノクローナル抗体を使用する。単一のモノクローナル抗体は、一般に、それらが免疫反応性を示す抗原を沈降させない。従って、同じ抗原と免疫反応性である2以上のモノクローナル抗体を使用して、抗原を沈降させ得る。LDLの定量のために、LDLに特異的な2つのモノクローナル抗体を使用する。有用な抗体としては、Korenら、Biochemistry 26、2734-2740(1987)によって記載される、WbA53aC1-A6のような別の抗体と組み合わせたHB3cB3が挙げられる。これは、他の血漿リポタンパク質(例えば、VLDLおよびHDL)に影響することなく、LDLの免疫沈降を生じる。

#### 【0039】

さらに、上記のような、その特定のタンパク質への互いの結合に干渉しない、2つの異なるモノクローナル抗体が利用可能であるか、またはMAbおよびポリクローナル抗体が、その特定のタンパク質に利用可能であり、かつそのMAbを、そのポリクローナル抗体の前にその特定のタンパク質を結合させるか、のいずれかの条件で、上記のサンドイッチ法を使用して、特定のサンプル中の目的の任意の血液タンパク質を検出し得る。

#### 【0040】

上記のように、抗LDLモノクローナル抗体(例えば、HB3cB3)が、抗体-抗原沈降技術および酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)における、LDL-コレステロールの定量に有用である。例えば、沈降方法において、抗LDL MAbを、ヒト血清またはヒト血漿に添加し、そしてLDLに結合させる。次いで、抗-LDL MAbに結合されたLDLの免疫複合体を、過量のプロテ

インAまたは抗マウスIgGポリクローナル抗体中に混合させることによって、沈降させる。この複合体の沈降は、その混合物を遠心分離し、次いで上清を捨てることによって増強される。次いで、そのLDLを含む沈降物を洗浄し、そしてPBS中の8M尿素に溶解させるか、または界面活性剤（例えば、Triton X-100およびコール酸（Sigma, St. Louis, Mo））で処理する。この後、コレステロールについての酵素アッセイ（Sigma, St. Louis, MO）を使用して、LDL-コレステロールを決定する。

#### 【0041】

抗体は、本明細書中に記載のアッセイにおける使用のために、固相材料に結合され得る。種々の型の吸着材料（例えば、ニトロセルロース、Immobilon™、ポリフッ化ビニリデン（全て、BioRad, Hercules, CA製））が、抗リポタンパク質抗体を結合するための固相材料として使用され得る。他の固相材料（ポリスチレン、ポリプロピレンまたは他の合成ポリマー材料から作製された、樹脂およびウェルプレートまたは他の材料を含む）もまた、使用され得る。リポタンパク質濃度をアッセイするための好ましい実施形態において、これらの材料の小片またはストリップを、患者サンプルにおける使用のために、HDL、LDL、他のリポタンパク質またはアポリポタンパク質の特異的エピトープに対する、1以上の抗体またはその機能的フラグメントでコートする。このようなストリップを、本明細書中で「ディップスティック」という。ディップスティックもまた、固体支持材料（例えば、プラスチック）のより大きいストリップの一端に装着され、このストリップは、溶液またはサンプル中にディップスティックを浸漬するためのハンドルとして機能し得る。このプラスチックハンドルはまた、複数のディップスティックが、共通の支持体に装着され得るように、繋ぎ部分（tether）として機能し得る。このようなマルチストリップ設計は、複数のリポタンパク質および/またはアポリポタンパク質を同時に試験するための構成において、特に有用である。

#### 【0042】

種々のサイズのディップスティックが可能であり、代表的には、0.5 cm x 0.5 cmの全体の寸法を有し、そして0.5 cm x 5 cmの全体の寸法を有す

る、より大きい支持ストリップに装着され得る、固相材料の小片である。このような寸法は、100 $\mu$ l程度の少ないサンプル中のリポタンパク質またはアポリポタンパク質の正確な決定を可能にする。

#### 【0043】

本発明は、以下の非限定的な実施例を参照することによって、より理解される。

#### 【0044】

(実施例1：唾液中のアポリポタンパク質の存在の実証)

(A. ポリアクリルアミドゲル電気泳動)

(サンプル調製)

新鮮な唾液サンプルを試験管に収集し、そして30分以内に分析するか、または0.1%アジ化ナトリウムと共に4で一晚維持した。血清サンプルを、分子量マーカーとして使用した；これらは凍結保存し、そして分析前に融解させた。ヒト血漿由来のリポタンパク質、HDLおよびLDL、ならびにアポリポタンパク質、ApoAIおよびApoBは、Calbiochem, La Jolla, CA製であった。電気泳動の前に、全てのサンプルを、2.5%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)で処理し、そして沸騰水浴中で5分間インキュベートした。上記の処理の別の変形において、このインキュベーション混合物はまた、1%ジチオトレイトール(DTT)を含んだ。プロモフェノールブルー指示薬を、電気泳動前に添加した。

#### 【0045】

(電気泳動)

電気泳動を、Phast System(Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)を用いて、製造業者のプロトコルおよび材料を使用して行った。このpH4~15勾配のポリアクリルアミドゲルおよび緩衝系は、0.55%SDSと共に、0.2M Tris緩衝液、pH8.1からなつた。前処理したサンプルをゲルにアプライし、そしてゲルを、Pharmaciaによって提供されたプロトコルに従う、自動分離に供した。電気泳動の完了後、ゲルを、クマシーブリリアントブルーR-350で染色し、次いで脱色およ

び分析した。

【0046】

(結果)

非還元サンプルの電気泳動の結果は、以下のとおりである：HDLサンプルおよびApoAIサンプルは、単一のバンドとして移動した。プロモフェノールブルーマーカーを参照して測定した、相対移動度(Rf)は、各サンプルについて0.94であった。LDLサンプルについてのRfは、0.24であり、ApoBサンプルについては、0.25であった。血清サンプルは、HDLに関する領域で3つのバンド(Rfは、0.97；0.94；および0.88であった)およびLDLに関する領域で1つのバンド(Rf = 0.24)を示した。唾液サンプルは、HDLに関する領域で2つのバンド(Rfは、0.94および0.91であった)およびLDLに関する領域で1つのバンド(Rf = 0.24(1つの場合において、Rf = 0.22))を示した。

【0047】

DTT還元サンプルについての電気泳動は、各々についてRf = 0.85を有する単一のバンドとして、HDLおよびApoAIを示した。LDLは、2つの場b b度(Rf 0.26および0.22)として現れ、そしてApoBは、単一のバンド(Rf = 0.26)であった。血清サンプルは、HDLに関する領域で2つのバンド(Rf 0.82および0.79)を示し、LDL領域には明確なバンドは示されなかった。唾液サンプルは、HDLに関する領域で単一のバンド(Rf 0.82(各唾液サンプルについて))を示し、LDL領域には明確なバンドは示されなかった。

【0048】

タンパク質バンドは、新鮮な唾液サンプルを分析した場合にのみ、ゲル上に現れた。

【0049】

(B. ウェスタンブロッティング)

(タンパク質ブロッティング)

タンパク質ブロッティングを、本質的に、Phast System™ De

velopment Technique File 220に従って行った：ニトロセルロース(Phast Systemユニットと共に供給される)を、 $1 \times \text{PBS}$ で予め湿らせた。電気泳動の終了時に、このニトロセルロースを、勾配ゲルの上に置き、そして温度を、 $70^\circ\text{C}$ に上昇させて、そして拡散媒介転写を、 $20 \sim 30$ 分間行った。

#### 【0050】

ニトロセルロースを、RTで1時間、振盪しながらインキュベートし、その後洗浄緩衝液(WB、 $1 \times \text{PBS}$ 、 $0.05\%$  TWEEN(登録商標)20)中で5分間洗浄した。次いで、このプロットを、 $10\text{mg/ml}$  BSA、 $1 \times \text{PBS}$ 中、 $1:1000$ 希釈のマウス抗アポリポタンパク質B(モノクローナルW<sub>a</sub>B<sub>2</sub>bD<sub>6</sub>、脂質含量に非依存的にApoBと反応性、Dr. Eugen Korren, Oklahoma Medical Reserach Foundation, Oklahoma City, OKより供与された)と共に、 $30 \sim 60$ 分間、振盪しながらインキュベートした。WB中で5分間の洗浄後、このゲルを、 $1:500,000$ 希釈の西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)ヤギ抗マウス結合体(Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA)と共に振盪しながら、室温(RT)で $30 \sim 60$ 分間インキュベートし、その後6回洗浄した。このプロットを、製造業者の説明書どおりに、化学発光性発色試薬SUPER SIGNAL BLAST™(Pierce; Rockford, IL)中に5分間浸し、透明なラミネート中に配置し、BIOMAX™ MR-2フィルム(Kodak; Rocheste, NY)に10秒間露光し、そしてKODAK™現像液および定着液を用いて発色させた。

#### 【0051】

##### (結果)

非常に高分子量の、モノクローナル抗アポリポタンパク質Bで染色された材料を、精製アポリポタンパク質Bおよび精製LDLの両方について観測した。これらのサンプルの各々は、約 $60\text{kd}$ 部位で弱いバンドを示した。唾液において、優勢な染色が、約 $60\text{kd}$  mwでみられた。アポリポタンパク質Bを唾液サンプルに添加し、電気泳動の前に室温にて1時間インキュベートする場合、高分子

量バンドの量における減少および約60 k d m wでの免疫反応性材料における明確な増加が、観測された。これは、A p o Bが唾液酵素によって分解されることを示す。

【0052】

血清サンプルは、抗A p o Bで反応させた3つのバンドを生じた。これらのバンドは、精製LDLにおいてもみられる、非常に高分子量における二重バンド、ならびに約60 k dおよび45 k d m w画分である。精製LDLは、非常に高分子量のバンドのみを示した。A p o A 1は、30 k d血清形態で唾液中に存在した。抗体と免疫反応性のA p o Bは、約60 k d形態で存在した：LDLまたはA p o Bを唾液に添加し、そしてインキュベートした場合、この同じ約60 k dの免疫反応性形態が生成された。これは唾液酵素によって分解されることを示す。

【0053】

ウエスタンブロットにより唾液中で測定されたA p o A 1およびA p o Bのレベルは、血清中でみられる量の約1 / 50に対応した。

【0054】

(実施例2：A p o A : A p o B唾液レベルとA p o A : A p o B血清レベルとの相関)

(サンプル収集)

唾液：刺激されたおよび刺激されていない唾液を収集し、そしてこれを分析した。唾液の流れを、個体にレモンまたはスーパーミントのいずれかを吸引することを頼むことにより刺激した。刺激された唾液を、刺激されている、唾液の収集の5分後にこの個体を刺激することにより収集した。唾液サンプルを、血清セパレーターを通して即座に濾過し、次いで氷水浴中で冷却した。唾液サンプルを収集の3時間以内にアッセイした。

【0055】

刺激された唾液は、優れた相関を提供した。スーパーミントは、優れた結果を示し、そして唾液ドナーに対してより受容可能であった。

【0056】

血清：血清を12個の絶食被験体から収集し、すぐに凍結し、試験のすぐ前に解凍した。

【0057】

(血清脂質の分析)

血清サンプルをRoche Cobas Mira自動化学分析器(ソフトウェアバージョン8735; Roche Diagnostic System, Nutley, NJ)で血清脂質について分析した。Roche Apo A-1およびApo B試薬ならびにアポリタンパク質標準物を使用して、血清および唾液サンプルの両方においてApo A-1およびBの決定についての校正曲線を設定した。Rocheコレステロール試薬およびキャリブレータ血清を使用して、総コレステロールのレベルを決定した。Roche Unimate HDLダイレクトHDLコレステロールキャリブレータおよびHDLダイレクトキャリブレータを使用して、HDLコレステロールのレベルを決定した。Rocheトリグリセリド試薬(トリグリセリドの1/5である)およびキャリブレータを使用して、VLDLコレステロールのレベルを決定した。LDLコレステロールを、総コレステロールからの、VLDLおよびHDLコレステロールの決定した和の差として決定した。

【0058】

アッセイの各々について、アッセイの精度を、実験値とLiquichekおよびLymphochekコントロールレベルIおよびII(Bio-Rad; Hercules, CA)ならびにCardiolipidおよびApolipoproteinコントロールレベルIおよびII(Sigma Diagnostics; St. Louis, MO)についての公開値との比較によってモニターした。アッセイ精度を、Roche試薬を用いて、この同じサンプルの平均%CVを連日決定することにより評価し、さらにリポタンパク質のElisa免疫アッセイによってApo A1およびApo Bについてアッセイした。Elisaを用いるRoche血清アッセイの相関を使用して、このアッセイの相関を実証した。

【0059】

(唾液中のApo A - 1およびBについてのELISA)

マイクロタイタープレートを、RTにて一晩コートし、Intracell, Issaquah, WAからのApo A - 1またはBを、1ウェルあたり100  $\mu$ lを添加した。ウェルをRTにて1% BSA/PBSを用いて2時間ブロックした。10  $\mu$ lの唾液サンプルを、90  $\mu$ lの、1:30,000希釈のウサギポリクローナル抗Apo A - 1 (E. Koren, San Franciscoにより提供された抗体) または1:25,000希釈のヤギポリクローナル抗Apo B (やはりE. Koren, OMRFにより提供される) のいずれかを用いてRTにて15分間インキュベートした。RTでの30分のインキュベーションの後、プレートを0.1% BSA/PBSを用いて2回洗浄した。100  $\mu$ lの、HRPヤギ抗ウサギ (Apo A - 1決定) またはHRPウサギ抗ヤギ (Apo B決定) (Jackson ImmunoResearch) を、RTにて30分にわたって振りながら添加した。これに続いて、BSA/PBSを用いて2回洗浄し、続いて150  $\mu$ lの3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMB) を15分にわたって振りながら添加した。比色分析反応を、2Nの硫酸を用いて止め、そしてプレートを450 nmにてTiter tek Plate Readerにより読み出し、最終吸光度を決定した。吸光度の読み出し値を、異なる希釈の血清サンプルプールから構成される、Apo A - 1およびBについての較正曲線を参照することにより、mg/dLのApo A - 1およびBに変換した。希釈されていないサンプルプールについてのApo A - 1およびBの値を、Roche自動分析器アッセイから決定した。

【0060】

(アルブミンについてのELISA)

マイクロタイタープレートを、1ウェルあたり100  $\mu$ lのヒト血清アルブミン (2  $\mu$ g/ml) (Sigma A1151, St. Louis, MO) で室温 (RT) にて一晩コーティングした。ウェルを、室温 (RT) にて2時間、1% BSA/PBSでブロックした。1:10の唾液10  $\mu$ lおよび1:100の10  $\mu$ lを、90  $\mu$ lのヤギ抗ヒトアルブミンA1:100Kと共に室温にて15分間インキュベートし、次いで、プレートに移した。室温での30分間のイン

キュベーションの後、0.1% BSA / PBSを用いてプレートを2回洗浄した。100  $\mu$ lのHRPウサギ抗ヤギ ( Jackson ImmunoResearch ) を、室温で30分間振盪しながら添加した。これに次いで、BSA / PBSを用いて2回洗浄し、次いで、150  $\mu$ lの3, 3', 5, 5' テトラメチル - ベンジジン ( TMB ) を振盪しながら15分間添加した。比色反応を2N硫酸で停止し、そしてTiter tek Plate Readerにおいて450 nmでプレートを読み取り、最終吸光度を決定した。吸光度の示度を、種々の希釈のSigma Human血清アルブミンから作成された較正曲線を参照することによって、mg / dLのアルブミンに変換した。

#### 【0061】

##### (結果)

血清および唾液のサンプル中のリポタンパク質は、図1に示されるように、抗アポリポタンパク質抗体結合について、プレート上にコーティングされたりポタンパク質と競合した。サンプル中のリポタンパク質の量が増加するにつれて、より少ない抗体がプレートに結合し、そしてシグナルの減少が観察された。7つの唾液サンプルが、測定されたりポタンパク質の異なるレベルを示した。唾液サンプル中でELISAによって測定されたApo A1のレベルは、予期されたApo A1の血清レベルの10%未満であった。唾液サンプル中でELISAによって測定されたApo Bのレベルは、Apo Bの血清レベルの1%未満であった。

#### 【0062】

Apo AおよびApo Bについて、市販のRocheアッセイを使用して血清サンプル中で測定された値と、ELISAを使用して血清サンプル中で測定された値との間の相関を表1に示す。RocheアッセイによってApo A1およびApo Bについて血清サンプル中で測定された値と、ELISAによって測定された血清LDLおよびHDLについて血清サンプル中で測定された値との間の相関を表2に示す。

#### 【0063】

ELISAによって測定された唾液Apo B / A1と血清Apo B / A1

との間の相関を表3に示す。刺激した唾液サンプルでは、Apo Bと同じ様式でアルブミンを分泌した。結果として、アルブミンは、唾液サンプルの希釈度を補正するために使用され得る。唾液におけるApo Bレベルおよびアルブミンを参照して希釈度について正規化されたApo Bレベルは、血清Apo BおよびLDLのレベルと高度に相関する。

#### 【0064】

刺激された唾液を用いて得られたApo A : Apo Bの比についての相関係数は、刺激されていない唾液における相関係数ほど高くはなく、発現された場合、Apo A / Apo Bにおいて刺激された唾液は、刺激されていない唾液ほど良好には相関しなかった。Apo Aリポタンパク質レベルは、mg / dLとして表現されるか、または唾液アルブミンに対して正規化されるか(図1aおよび1b)に関わらず、Apo Bレベルと高度に $r = 0.95$ および $0.92$ で相関する。対照的に、これらの同じサンプルについての血清Apo A : Bのレベルは、 $0.04$ 未満の $r$ を有した。従って、刺激された唾液および(刺激されていない)唾液のフローの間、Apo B分泌は、図2aおよび2bに示されるように、Apo A-1の量に関連して増加し、血清Apo B / Apo Aの比( $0.36 \sim 1.4$ の範囲である)と対照的に、Apo Aの3~4倍のオーダーの量のApo Bである。従って、血清において観測されるよりもずっと高いApo B : Apo Aの比が存在することが明かである。これは、Apo Bの唾液における選択的により高い分泌を反映するか、または部分的にフラグメント化されたApo BがインタクトなBタンパク質よりも免疫反応性であることを反映するアーチファクトであり得る。

#### 【0065】

#### 【表1】

表1. Apo AおよびApo Bに対する血清ELISAとRoche血清アッセイとの相関(r)

|               | ELISA         | ELISA        | ELISA           |
|---------------|---------------|--------------|-----------------|
| <u>Roche値</u> | <u>Apo A1</u> | <u>Apo B</u> | <u>Apo B/A1</u> |
| Apo A1        | 0.81          |              |                 |
| Apo B         |               | 0.94         |                 |
| Apo B/A1      |               |              | 0.93            |

表2. ELISAにより測定される血清LDLおよびIDLとRoche血清Apo A1およびApo Bとの相関(r)

|          | <u>LDL</u> | <u>IDL</u> | <u>LDL/IDL</u> |
|----------|------------|------------|----------------|
| Apo A1   |            | 0.95       |                |
| Apo B    | 0.98       |            |                |
| Apo B/A1 |            |            | 0.99           |

表3. ELISAによって測定される血清Apo B/A1と唾液Apo B/A1との相関(r)

| <u>唾液</u>   | 血清              | 血清           | 血清         |
|-------------|-----------------|--------------|------------|
|             | <u>Apo B/A1</u> | <u>Apo B</u> | <u>LDL</u> |
| Apo B/A1    | 0.75            |              |            |
| Apo B/アルブミン |                 | 0.88         | 0.82       |

(実施例3: 競合的形式のイムノクロマトグラフィーストリップにおけるApo BおよびApo A-1の唾液レベルの検出)

(イムノクロマトグラフィーストリップの調製)

5ミクロンのニトロセルロース膜(Millipore、Burlington、Mass.)を、Calbiochem、La Jolla、CAからのヒトHDLまたはLDLを用いて、2mg/mlの濃度で、3マイクロリットル/3mm幅のストリップの量で、Camag Linomat IV(CAMAG

、Switzerland)を使用してコーティングした。金粒子を、モノクローナルLpalHB4(American Type Culture Collection、Rockville、MD)を有する抗Apo A1を用いて、またはWaB2bD6(Koren博士、OMRF)を有する抗Apo Bを用いてコーティングした。

#### 【0066】

##### (サンプルの調製)

アッセイするために、血清サンプルを、PBS中に1:2000、1:600、1:100、1:75、1:25および1:1050に希釈した。50マイクロリットルのサンプルを、5マイクロリットルの金結合体および5マイクロリットルの5%BSA(Sigma、St.Louis、MI)を含む試験チューブにピペットした。サンプルをボルテックスし、ストリップをチューブに挿入した。流体をストリップの端に移した後、ストリップをチューブから除き、乾燥させ、バンドの強度を、Graytag D19C/D196 remission Densitometer(Greytag、Switzerland)を使用して測定した。

#### 【0067】

##### (結果)

図3aおよび図3bは、色強度が1:2000希釈の血清および1:100希釈のApo Bによって強く阻害されることを示した。結合について良好な用量依存性阻害が存在した。唾液が平均1:50の量のApo A1および少なくともその量のApo Bを有するので、この結果は、唾液タンパク質中のApo A1およびApo Bのアッセイが定量的なイムノクロマトグラフィー検出ができ、米国特許第5,451,504号、同第5,500,375号、および同第5,710,000号に記載されるSerexリランド(reiland)形式に適用され得ることを示す。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

図1は、コントロールとして様々な希釈(1x、1:10、1:100)の血

清およびApo A1を使用して、HDLの存在に関してELISAによりアッセイした唾液サンプルの吸光度のグラフである。

【図2】

図2は、コントロールとして様々な希釈(1x、1:10、1:100)の血清およびApo Bを使用して、LDLの存在に関してELISAによりアッセイした唾液サンプルの吸光度のグラフである。

【図2a】

図2aは、レモンで刺激した唾液中の、Apo A1(mg/dl)に対するApo B(mg/dl)のグラフである。

【図2b】

図2bは、レモンで刺激した唾液中の、1mgのアルブミンあたりのApo A1に対するApo B(mg/dl)のグラフである。

【図3a】

図3aは、1:100、1:75、1:25および1:10の希釈における血清中のLDLに関するストリップ免疫アッセイにおける、色密度のグラフである。

【図3b】

図3bは、1:1,200、1:600、1:100および1:10の希釈における血清中のHDLに関するストリップ免疫アッセイにおける、色密度のグラフである。

【図4a】

図4aは、血清中の、Apo Aに対するApo Bの比の相関のグラフである。

【図4b】

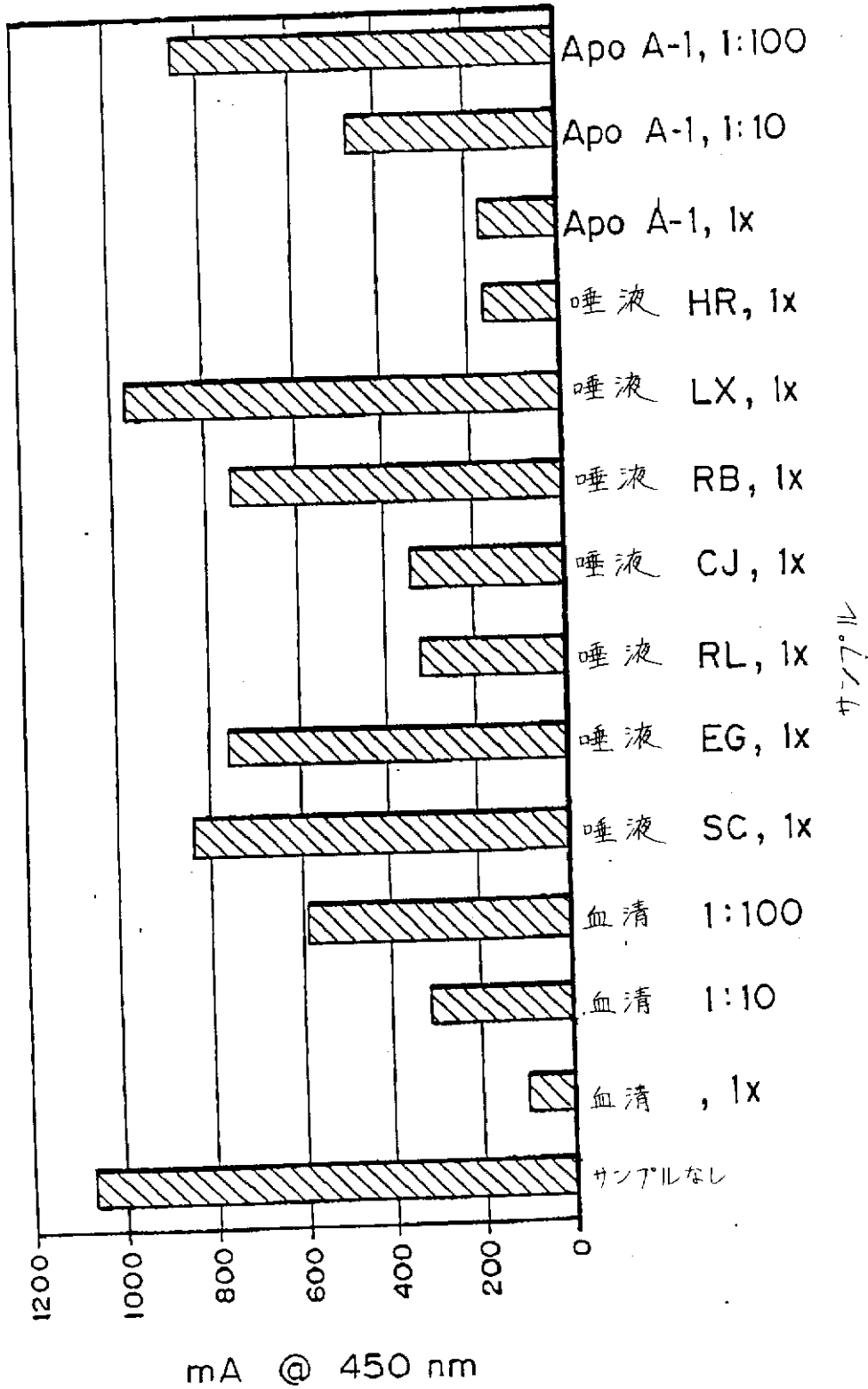
図4bは、Rocheの市販のCobas Miraアッセイと比較した、本明細書中に記載のELISAにより測定した血清中のApo Bの比の相関のグラフである。

【図4c】

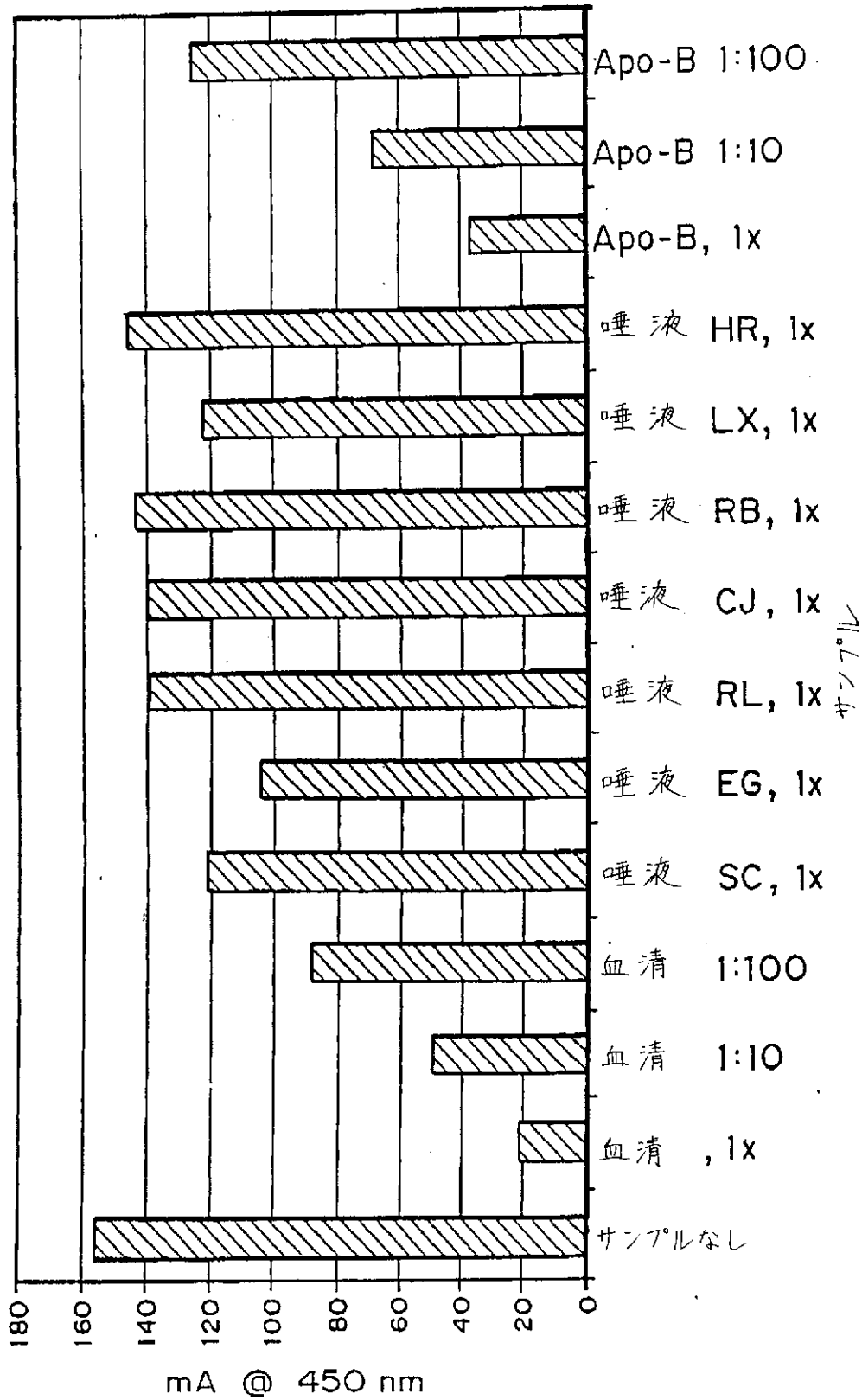
図4cは、レモンで刺激した唾液中の、Apo Aに対するApo Bの比の

相関のグラフである。

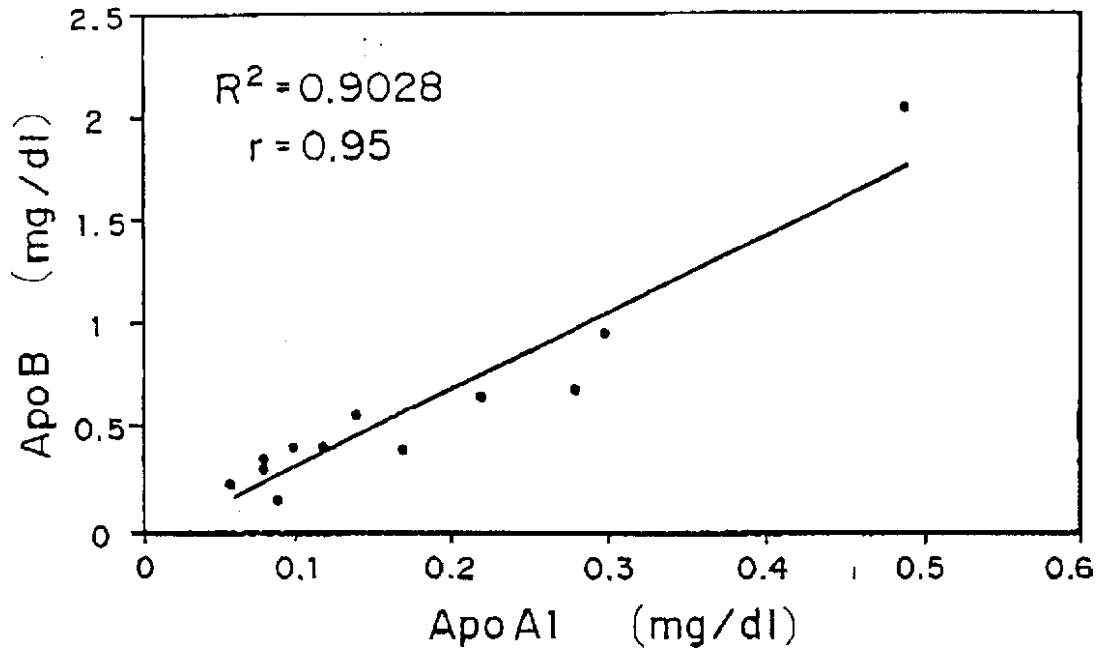
【図1】



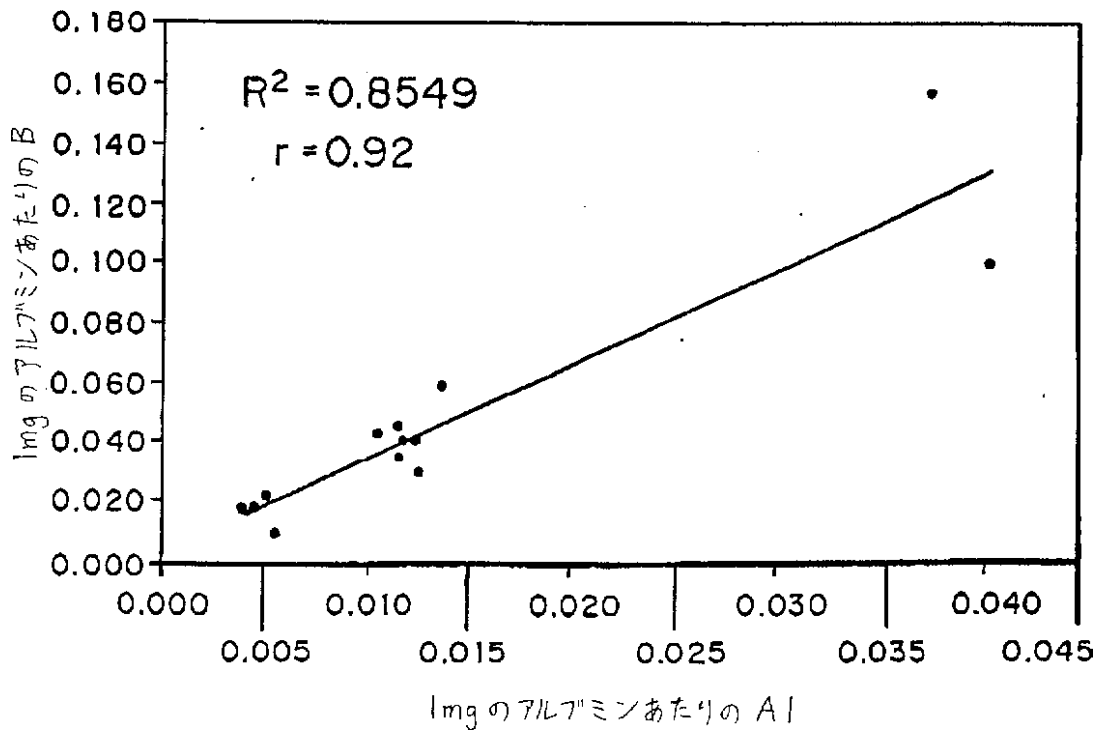
【図2】



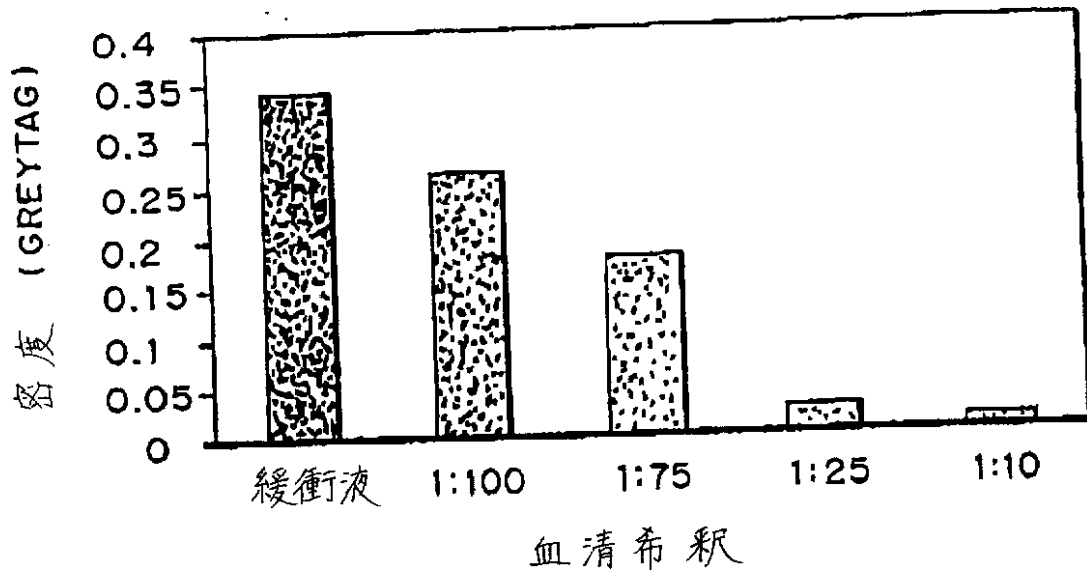
【図2 a】



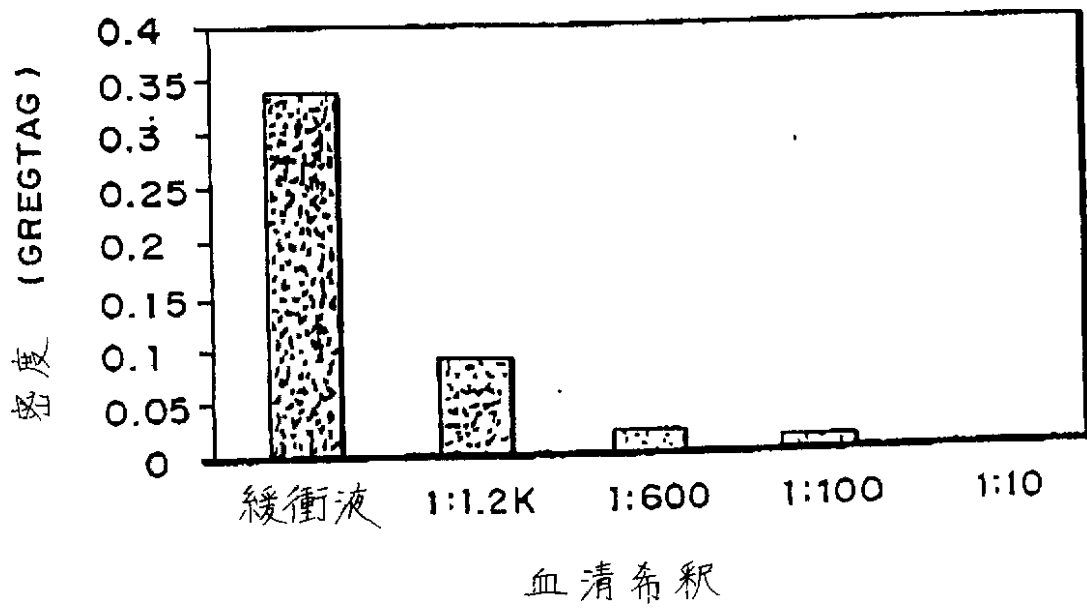
【図2 b】



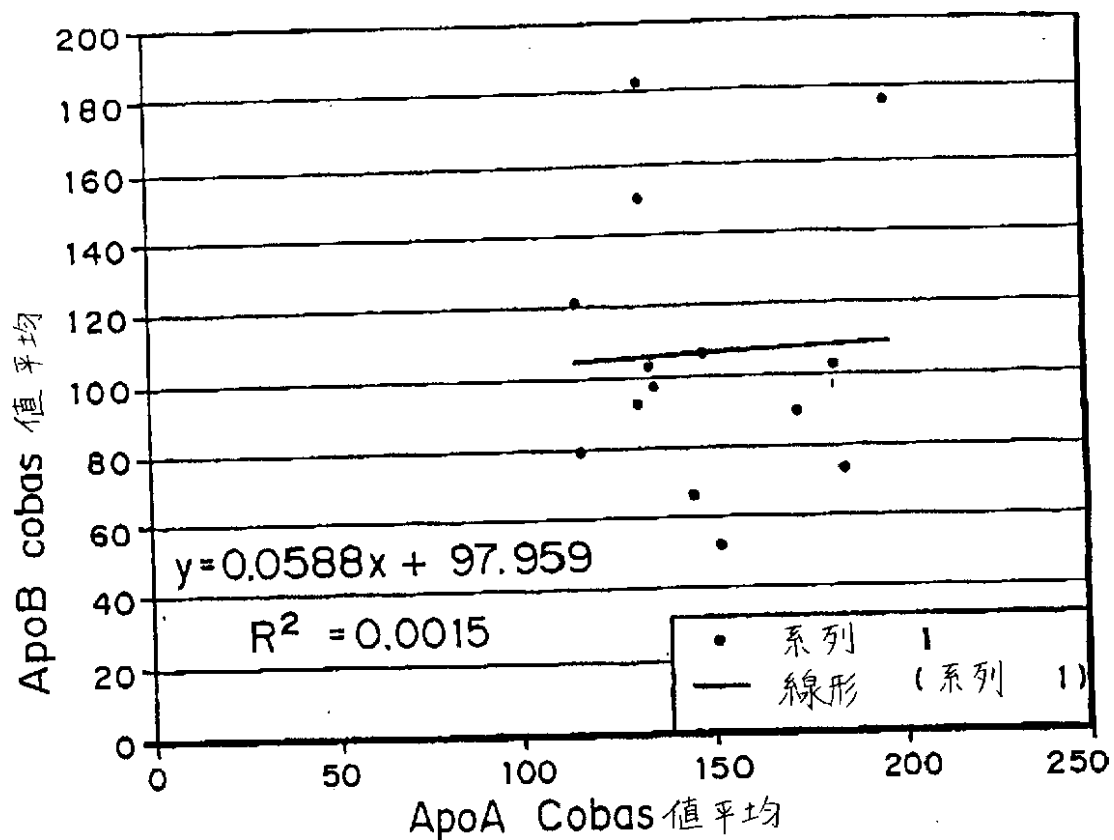
【图3 a】



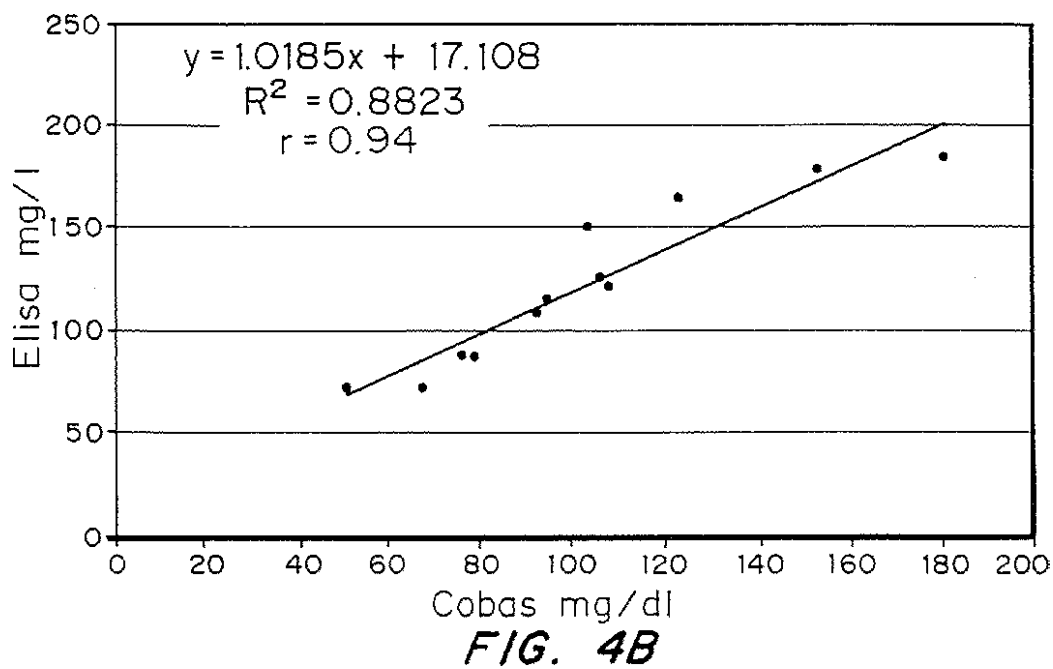
【图3 b】



【圖4A】



【圖4B】



【図4C】

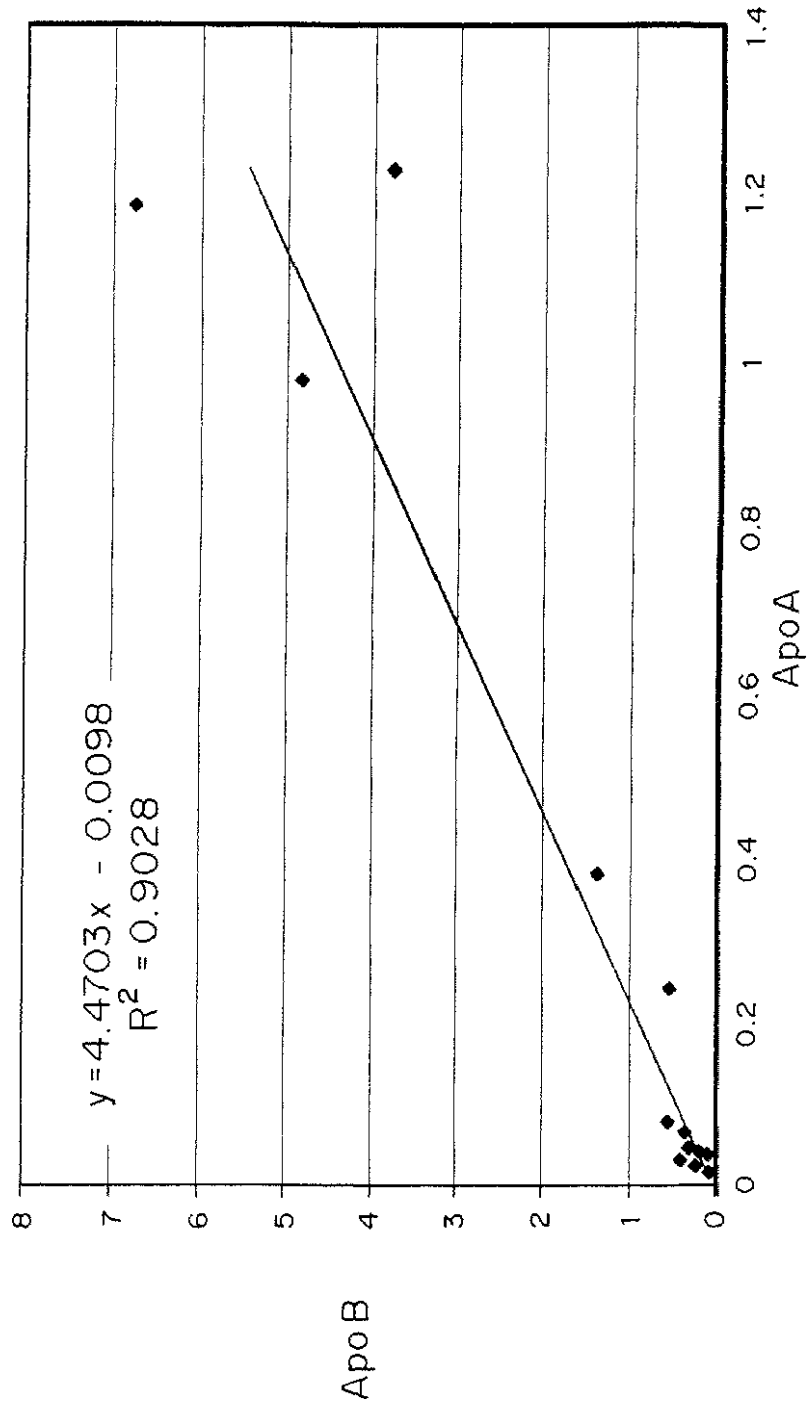


FIG. 4C

## 【國際調查報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                   | International Application No<br>PCT/US 00/06810                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER<br>IPC 7 G01N33/92                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| B. FIELDS SEARCHED<br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>IPC 7 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)<br>EPO-Internal, WPI Data, PAJ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Category *                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                | Relevant to claim No.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | WO 94 19690 A (CARDIOVASCULAR DIAGNOSTICS INC) 1 September 1994 (1994-09-01)<br>claim 60<br>page 5, line 18 - line 24<br>page 7, line 6 - line 11 | 1-4, 12,<br>14, 20                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| P, X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | WO 99 36784 A (ABBOTT LAB)<br>22 July 1999 (1999-07-22)<br><br>claim 1<br>page 19 - page 24                                                       | 1, 2, 4,<br>12, 14,<br>16, 17                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| P, X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | WO 99 36785 A (ABBOTT LAB)<br>22 July 1999 (1999-07-22)<br>page 1, line 13 - line 14<br>page 7, line 2                                            | 1-4, 12,<br>14, 20                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                   | <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| * Special categories of cited documents:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>*E* earlier document but published on or after the international filing date<br>*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)<br>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>*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<br>*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<br>*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.<br>*&* document member of the same patent family |
| Date of the actual completion of the international search<br><br>11 August 2000                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                   | Date of mailing of the international search report<br><br>21/08/2000                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Name and mailing address of the ISA<br>European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax: (+31-70) 340-3016                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                   | Authorized officer<br><br>Hoekstra, S                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int: Jonal Application No  
PCT/US 00/06810

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|----------------------------------------|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 9419690 A                           | 01-09-1994       | AU 689768 B             | 09-04-1998       |
|                                        |                  | AU 6173494 A            | 14-09-1994       |
|                                        |                  | CA 2156174 A            | 01-09-1994       |
|                                        |                  | EP 0685069 A            | 06-12-1995       |
|                                        |                  | IL 108699 A             | 10-06-1997       |
|                                        |                  | JP 8507148 T            | 30-07-1996       |
|                                        |                  | US 5601991 A            | 11-02-1997       |
|                                        |                  | US 5677133 A            | 14-10-1997       |
| WO 9936784 A                           | 22-07-1999       | NONE                    |                  |
| WO 9936785 A                           | 22-07-1999       | NONE                    |                  |

## フロントページの続き

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

(72)発明者 ジョーンズ, クリストファー エル.  
アメリカ合衆国 ニュージャージー  
07457 - 0303, リバーデイル, ピー.  
オー. ボックス 303

|                |                                                                       |         |            |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 检测唾液中APOA和APOB的方法和装置及其比例                                              |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2002539458A</a>                                         | 公开(公告)日 | 2002-11-19 |
| 申请号            | JP2000605216                                                          | 申请日     | 2000-03-16 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 塞莱克斯公司                                                                |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 仙丽施公司                                                                 |         |            |
| [标]发明人         | フィッツパトリックジュディス<br>レンダレジーナビー<br>ジョーンズクリストファーエル                         |         |            |
| 发明人            | フィッツパトリック, ジュディス<br>レンダ, レジーナビー.<br>ジョーンズ, クリストファー エル.                |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/53 G01N33/531 G01N33/92                                        |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/92 G01N2333/775 G01N2800/044 Y10S435/81 Y10S436/808 Y10T436/25 |         |            |
| FI分类号          | G01N33/53.W G01N33/53.D G01N33/531.Z                                  |         |            |
| 优先权            | 60/124562 1999-03-16 US                                               |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>                                             |         |            |

摘要(译)

开发了一种检测唾液中载脂蛋白A-1和B水平的方法，它们分别与血清中的HDL和LDL水平相关。在未刺激的唾液中，血清中Apo A与Apo B的比例与HDL与LDL的比例有关。白蛋白可用于将样品稀释后归一化。高度的相关性与可以在采集地点进行的简单快速的测试相结合，提供了一种经济高效，对患者友好的方法，可用于监测个人患心脏病的风险。

图 1

