

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-503533

(P2005-503533A)

(43) 公表日 平成17年2月3日(2005.2.3)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68	GO 1 N 33/68	2 G O 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 P 19/10	4 B O 6 3
A 6 1 P 19/10	C 1 2 Q 1/02	4 C O 8 4
C 1 2 Q 1/02	GO 1 N 33/53	
GO 1 N 33/53	A 6 1 K 37/02	D

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 97 頁)

(21) 出願番号	特願2002-558025 (P2002-558025)	(71) 出願人	501240752
(86) (22) 出願日	平成14年1月17日 (2002.1.17)		ケンブリッジ サイエントフィック, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成15年7月22日 (2003.7.22)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2 1 3 8, ケンブリッジ, フォウセツ ストリート 1 8 0
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/001566	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開番号	W02002/057795		弁理士 山本 秀策
(87) 国際公開日	平成14年7月25日 (2002.7.25)	(74) 代理人	100062409
(31) 優先権主張番号	60/263, 109		弁理士 安村 高明
(32) 優先日	平成13年1月19日 (2001.1.19)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	60/304, 887		
(32) 優先日	平成13年7月12日 (2001.7.12)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 骨粗鬆症の診断方法および処置方法

## (57) 【要約】

哺乳動物における骨粗鬆症検出法が本明細書において開示される。この方法は、a) 骨関連組織または骨関連細胞のサンプルを入手する工程；および b) 細菌、細菌が産生した因子、および H S P からなる群より選択される少なくとも一つのマーカーの濃度を測定する工程、を包含する。この方法は、一定時間にわたるかまたは標準濃度に対して、同じ個体に由来する、第一のアッセイの濃度と、第二またはそれよりあとのアッセイの濃度とを比較する工程をさらに包含し得る。このマーカーは、細菌、シャペロン分子または産生される細菌であり得る。この方法は、たとえば、少なくとも約 1 2 時間の期間にわたり第一のアッセイおよび第二のアッセイを包含する。H S P の濃度は、イムノアッセイを用いて測定され得る。このアッセイでは、H S P をコードするヌクレオチド分子を用いる。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

哺乳動物において骨粗鬆症を検出する方法であって、

a) 骨関連組織または骨関連細胞のサンプルを入手する工程；および

b) 感染性因子、感染性因子が産生した因子、および熱ショックタンパク質 (HSP) からなる群より選択される少なくとも 1 つのマーカーの濃度を測定する工程、

を包含する、方法。

## 【請求項 2】

一定時間にわたるかまたは標準濃度に対して、同じ個体に由来する、第一のアッセイの濃度と、第二またはそれよりあとのアッセイの濃度とを比較する工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

10

## 【請求項 3】

前記骨関連組織または骨関連細胞は、前記哺乳動物被検体における HSP 応答を誘導しない条件下で得られる、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記 HSP は、HSP 70、HSP 60、HSP 90、gp96、cpn10、cpn20、ユビキチンおよび cpn30 からなる群より選択される、請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記第一のアッセイと第二のアッセイとの間の期間は、少なくとも約 12 時間である、請求項 2 に記載の方法。

20

## 【請求項 6】

前記サンプルは、骨細胞または体液を含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記 HSP は HSP 60 である、請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記 HSP は HSP 70 である、請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記 HSP はユビキチンである、請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記 HSP の濃度は、免疫アッセイを用いて測定される、請求項 3 に記載の方法。

30

## 【請求項 11】

前記 HSP の濃度は、HSP をコードするヌクレオチド分子についてのアッセイを用いて測定される、請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記病原体は、細菌、ウイルス、原生動物、寄生生物および真菌からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記病原体は、細菌が産生する因子、ウイルスが産生する因子、原生動物が産生する因子、寄生生物が産生する因子、および真菌が産生する因子からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

40

## 【請求項 14】

前記細菌は、Staphylococcus aureus、Porphyromonas gingivallis、Eikenella corrodens、Actinobacillus actinomycetemcomitans、Prevotella intermedia、Campylobacter rectus、Staphylococcus epidermidis、Salmonella spp.、Escherichia coli、Neisseria gonorrhoea、Neisseria meningitidis、Mycobacterial tuberculosis、Haemophilus influenzae、Pasteurella multocida、B. bronchiseptica、および Fusobacterium

50

n u c l e a t u mからなる群より選択される、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記病原体は、内毒素、L P S、ガブスタチンおよび皮膚壊死性毒素 ( D N T ) からなる群より選択される、細菌が産生する因子である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記因子は、ガブスタチンおよび皮膚壊死性毒素からなる群より選択される、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記因子は、ガブスタチンである、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記因子は、皮膚壊死性毒素である、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記細菌は、S t a p h y l o c o c u s a u r e u s、A c t i n o b a c i l l u s a c t i n o m y c e t e m c o m i t a n s、B o r d e t e l l a b r o n c h i s e p t i c a、および F u s o b a c e r i u m n u c l e a t u mからなる群より選択される、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 0】

感染性因子、感染性因子が産生する因子、または骨疾患によって生じる骨粗鬆症を処置または予防する方法であって、哺乳動物被検体に対して、治療有効量の処方物を投与する工程であって、該処方物は、H S P 抗原性処方物および感染性因子抗原性処方物からなる群より選択される、工程を包含する、方法。

【請求項 2 1】

前記骨疾患は、ウイルス、細菌、真菌、原生動物および寄生生物からなる群より選択される骨感染性因子によって誘導される、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記 H S P は、抗原性材料と複合体化されているか、またはアジュバントと組み合わせて処方されている、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記抗原性材料は、ペプチドまたはタンパク質であって、該ペプチドまたは該タンパク質は、骨疾患を誘導する、ウイルス、細菌、真菌、原生動物または寄生生物の抗原決定基を有する、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記抗原性材料は、免疫不全ウイルス I 型 ( H I V - I )、ヒト免疫不全ウイルス II 型 ( H I V - I I )、A 型肝炎、B 型肝炎、C 型肝炎、インフルエンザ、V a r i c e l l a、アデノウイルス、I 型単純ヘルペス ( H S V - I )、II 型単純ヘルペス ( H S V - I I )、牛痘、ライノウイルス、エコウイルス、ロタウイルス、RSウイルス、パピローマウイルス、パポパウイルス、サイトメガロウイルス、エキノウイルス、アルボウイルス、フンタウイルス、コクサッキーウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルスおよびポリオウイルスからなる群より選択されるウイルスの抗原決定基を含む、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記 H S P は、H S P 6 0、H S P 7 0、H S P 9 0、g p 9 6、c p n 1 0、c p n 2 0、ユビキチン、c p n 3 0 およびその組み合わせからなる群より選択される、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記骨粗鬆症は、オステオペニアである、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記骨粗鬆症は、細菌または細菌が産生する因子によって生じる、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 8】

10

20

30

40

50

請求項 1 ~ 19 に記載の方法において使用するためのキット。

【請求項 29】

請求項 20 ~ 27 に記載の方法において使用するための患者に投与するための薬学的に受容可能な組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本願発明は、概して、骨の喪失の診断方法に関する。より具体的には、本願発明は、細菌または哺乳動物分子シャペロンに基づく、骨の喪失の体液性マーカーの同定に関する。

10

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

骨粗鬆症は、骨のぜい弱性、ならびに股関節部、棘、および手首の骨折の罹患率の上昇をもたらす、骨重量の減少および骨組織の微小構築の変質によって特徴付けられる全身性の疾患である。オステオペニアは、X線撮影における減少した骨ミネラル含量という現象として規定されているが、オステオペニアという語は、より適切には、減少した骨重量から骨折および虚弱質への連続における段階をいう。X線撮影によってオステオペニアの診断がなされるまでに、顕著かつ不可逆的な骨の喪失が、すでに生じている。オステオペニアの最も一般的な原因は、骨粗鬆症であり、他の原因としては、骨軟化症、および上皮小体機能亢進症の骨減少が挙げられる。

20

【0003】

合衆国において、50歳を超える年齢の女性のおよそ4人に1人が、骨粗鬆症を有する。骨粗鬆症骨折の全体としての有病率は、閉経期の女性において劇的に上昇する。骨の喪失は、閉経期の開始後の最初の10年の間、より急激であり、その後は、より緩やかな減少となる(Nordin, et al., 「How can we prevent osteoporosis?」 in Osteoporosis, Christiansen, et al., (eds). Copenhagen, Norhaven A/S, 1204-1210 (1987))。高齢になるに従って、骨折の発生が増加する。股関節部の骨折の頻度は、年齢に従って、特に70歳より高齢の場合、指数関数的に増加する。このことは、白人女性において、より一般的に見られる。80歳まで生存した女性の約32%が、股関節部の骨折を有する(Gallagher, et al., Clin. Orthop. 150:163-171 (1980); Melton, et al., Am. J. Epidemiol. 129:1000-1011 (1989))。股関節部骨折についての女性のリスクは、胸部癌、子宮癌、および卵巣癌のリスクの合計と同じであり、股関節部骨折で死亡するリスクは、胸部癌の死亡率と同じである(Elffors, Aging (Milano) 10:191-204 (1998))。椎骨の骨折の有病率は、高齢の女性および/または減少した骨重量を有する女性において、42%である(Melton et al., 1989)。女性において、閉経の開始と最初に関連する椎骨の骨折の迅速な増加の後に、年齢

30

40

【0004】

男性の場合、骨粗鬆症の発生頻度は女性よりも低い。なぜならば、男性の場合、骨の喪失は、より遅く開始し、そしてより緩やかに進行するからであり、また、迅速なホルモン変化および付随して生じる迅速な骨の喪失の時期がないからである。骨の形態およびリモデリングにおける差異もまた、男性における低い骨折の割合に寄与する。しかし、過去数年、特に、合衆国国立骨粗鬆症基金(US National Osteoporosis Foundation)によると、70歳を超える男性の数が、1993年と2050年の間で2倍になるという推定を考慮して、男性の骨粗鬆症の問題が重要な公衆衛生の問題として認識されてきている。

50

## 【0005】

50歳を超える男性のおよそ8人のうち1人が、骨粗鬆症を有する。現在、合衆国内において、200万人を超える男性が、骨粗鬆症に罹患し、別の300万人が、この疾患のリスクを有する。毎年、男性の股関節部骨折は、股関節部骨折全体の3分の1であり、そして、男性の股関節部骨折患者の3分の1が1年以内に死亡する。股関節部骨折の頻度は、年齢に従って、特に70歳を超えると、指数関数的に増加し、80歳まで生存した男性の17%が、股関節部の骨折を有する(Gallagher, et al., (1980); Melton, et al., (1989))。股関節部骨折に加え、男性はまた、骨粗鬆症に起因する、棘、手首、および他の骨の、疼痛性骨折および消耗性骨折を有する。

10

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0006】

骨粗鬆症によって生じる損傷は、重篤であり、時として致死性であるが、骨粗鬆症の場合、血液または尿についての厳密な臨床化学試験で異常なものはない。現在使用されている技術は、一般的には、生化学的マーカー、X線撮像、および骨ミネラル密度(BMD)の測定である。これらの技術の使用は、費用、または正確性の理由のいずれかにより、限定されている。

## 【0007】

本発明の目的は、骨格系における、環境ストレスおよび骨感染ストレスの評価のための効果的な手段を提供することにある。

20

## 【0008】

さらに、本発明の目的は、骨格系における負の影響を有する感染性疾患を、処置および/または予防する手段を提供することにある。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0009】

## (発明の要旨)

哺乳動物において骨粗鬆症を検出する方法が、開発された。この方法は、以下の工程を包含する、a)骨関連組織または細胞のサンプルを得る工程;および、b)細菌、細菌の産生した因子、または熱ショックタンパク質(HSP)の1つである少なくとも1つのマーカーの濃度を測定する工程。この方法はさらに、同一の個体から、ある時間にわたってか、または標準濃度に対して、第1のアッセイの濃度を第2またはそれより多いアッセイの濃度と比較する工程を、包含する。マーカーは、HSP例えば、HSP70、HSP60、HSP90、gp96、cpn10、cpn20、ユビキチンまたはcpn30であり得る。マーカーはまた、細菌、例えば、Staphylococcus aureus、Porphyromonas gingivallis、Eikenella corrodens、Actinobacillus actinomycetemcomitans、Prevotella intermedia、Campylobacter rectus、Staphylococcus epidermidis、Salmonella spp.、Escherichia Coli、Neisseria gonorrhoea、Neisseria meningitis、Mycobacterial tuberculosis、Haemophilus influenzae、Pasteurella multocida、B. bronchiseptica、またはFusobacterium nucleatumであり得る。マーカーは、細菌の産生した因子、例えば、内毒素-LPS、ガプスタチン(gapstatin)、および皮膚壊死性毒素(DNT)であり得る。アッセイ間の時間を、例えば、少なくとも約12時間の期間に延長し得る。1つの実施形態において、HSPの濃度は、免疫アッセイを用いて測定する。別の実施形態において、HSPの濃度は、HSPをコードするヌクレオチド分子についてのアッセイを使用して測定される。

30

40

## 【0010】

50

骨粗鬆症を処置または予防する方法が、開発された。HSP抗原性処方物または細菌抗原性処方物のいずれかである、治療的に有効な処方物の量。1つの実施形態において、骨粗鬆症は、骨の感染性因子、例えば、ウイルス、細菌、真菌、原生動物、または寄生虫によって誘導される骨疾患によって生じる。HSPは、HSP60、HSP70、HSP90、gp96、cpn10、cpn20、ユビキチンまたはcpn30、あるいはこれらの組み合わせであり得る。HSPはさらに、抗原性物質との複合体とされ得るか、またはアジュバントと組み合わせて処方され得る。抗原性物質は、骨疾患を誘導する、ウイルス、細菌、真菌、原生動物、または寄生虫の抗原決定基を有するペプチドまたはタンパク質であり得る。

#### 【0011】

本明細書に開示される方法は、本明細書に開示される方法に従って形成されたキットを使用して実施され得る。

#### 【0012】

(発明の詳細な説明)

(I. 定義)

用語、分子シャペロンは、タンパク質のアセンブリおよびリアセンブリ、ならびにタンパク質の膜貫通輸送(例えば、細胞質からミトコンドリアへ)に関与する、多数の関連性のないタンパク質を記載する。これらタンパク質のいくつかを、熱ショックタンパク質(HSP)、またはストレスタンパク質という。代表的なHSPとしては、HSP70、HSP70、gp96、およびHSP100が挙げられる。これらHSPは、異なる種類のシャペロン機能をなしとげる。例えば、細胞の細胞質、核、ミトコンドリア、または小胞体に局在するHSP70は(Lindquist, S., et al., 1988, Ann. Rev. Genetics 22:631-677)、免疫系の細胞に対する抗原の提示に関与し、そしてまた、正常細胞内でのタンパク質の輸送、フォールディング、およびアセンブリに関与する。サイトゾルに局在するHSP70は、同様の活性に関与する。小胞体に存在するGP96もまた、抗原提示に関与する(Srivastava, P. K., et al., 1991, Curr. Topics in Microbiology & Immun. 167:109-123)。

#### 【0013】

HSPは、原核生物細胞および真核生物細胞の両方にとって、細胞内におけるタンパク質のフォールディング(アンフォールディング)、アセンブリ、および輸送の間のシャペロン機能のために必須である。定義によると、HSP発現は、ストレス(例えば、損傷組織または炎症組織におけるストレス)を受ける細胞において、増大する。温度の上昇、低酸素、照射、感染、および毒性化合物に対する曝露のように多様な状態は全て、増加したHSP発現を生じ得る。

#### 【0014】

ストレスに対する曝露に際して、3つの異なる事象は、細胞内の代謝活性の迅速な変化を生じる:(1)HSP mRNAの転写の増加が生じ、次に、mRNAは細胞質へ優先的に輸送される、(2)ほとんどの他のmRNAの転写が抑制される、そして(3)リボゾームの正常な翻訳活性が破壊され、その結果HSPが優先的に翻訳される。これらの事象の全体としての結果は、細胞が迅速にHSP合成を開始し、そして他のペプチドの合成を抑圧するということである。新たなペプチドもRNA合成も、熱ショックペプチド遺伝子の翻訳の活性化には必要ない。このことは、予め存在する因子(例えば、ウイルス因子、または細菌因子)が関与し得ることを示す。細胞の型、細胞分化の状態、ストレスの型、およびストレスの持続および強度は、特定の型のHSPの量および質に影響し得る。

#### 【0015】

HSPファミリー内において、個々のメンバーは、独特の配列相同性の程度を有する。HSP60について、ヒトタンパク質は、マイコバクテリアホモログと50%の配列同一性を有し、さらに20%の保存的置換を有する。このことのために、ヒト分子内のいくつか

10

20

30

40

50

の領域が、細菌タンパク質と完全に同一である。その高い保存性の程度にも関わらず、HSPは、非常に免疫原性である。HSPが自己免疫を誘導する可能性が、広範に研究された。しかし、自己免疫の誘導は、ほとんどの実験系において報告されなかった。むしろ、多くの実験的な自己免疫疾患のモデルにおいて、疾患のその後の誘導に対する耐性の発生が、共通の特徴である。

#### 【0016】

近年、HSPは、構成的な分子であることが明らかになっている。多数のHSPは、周知のタンパク質であり、ユビキチン、免疫抑制剤結合プロテインおよびP-糖タンパク質が挙げられる。HSPは、それらの炎症への関与に一致する、細胞および組織の挙動を誘導すると報告されている。HSP70および*E. coli* groELは、膜における細孔を誘導し、従って、細菌によって産生される広範な種々のリジンおよび溶血素と類似の作用を有し得る。現在、種々の細菌由来のHSPが、ヒトおよびマウスの細胞の、ある種の炎症誘発性サイトカインの放出を誘導し得るといふ、多数の報告が存在する。

10

#### 【0017】

努力は、HSPを利用する方法を開発することに向けられている。例えば、HSP濃度を測定することによって、致死量以下のレベルの汚染物質への哺乳動物の長期間の曝露を評価する方法が、報告されている。例えば、米国特許第5,780,246号；米国特許第5,232,866号（どちらもSanderら）を参照のこと。癌のような疾患を予防するための、HSPを用いるワクチン接種の組成物および方法が、開発されている。例えば、米国特許第5,830,464号；同第5,948,646号；および同第6,030,618号（全てSrivastava）を参照のこと。

20

#### 【0018】

「抗原性分子」とは、本明細書中で使用される場合、HSPがインビボで（例えば、感染した細胞中で）内因的に会合されるペプチド、ならびに外因性抗原/免疫原（すなわち、インビボではHSPが複合体形成しない）または抗原フラグメント/免疫原フラグメント、およびこれらの誘導体をいう。

#### 【0019】

「特異的にハイブリダイズする」とは、本明細書中で使用される場合、選択された数の塩基対ミスマッチがハイブリダイゼーションを生じないストリンジェンシーな条件で、HSPについて遺伝子から転写されたmRNAとハイブリダイズするヌクレオチド分子をいう。当業者は、種々のハイブリダイゼーションアッセイ方式に対するストリンジェンシーな条件を、温度、イオン濃度およびpHの集合に依存して、理解する。一般に、最適なRNA:RNAハイブリダイゼーションについては、温度は塩濃度に逆比例し；pHは約6.9から約7.4（例えば、15ヌクレオチド配列（15マー）について）の範囲内に維持されるべきである。RNA:DNAハイブリダイゼーションについては、類似のアッセイ条件が適用されるが、一般に、RNA:RNAハイブリダイゼーションより低い温度（より高い塩濃度に付随する）が使用される。

30

#### 【0020】

SDS-PAGEは、タンパク質分析のための通常的手段である。ドデシル硫酸ナトリウムは、電場においてタンパク質が、いずれの分離マトリックスも存在せずに、同じ速度で移動するように、タンパク質を一定の電荷対質量の比で負の電荷でコーティングする、界面活性剤である。しかし、荷電したタンパク質が多孔性のポリアクリルアミドゲル上にロードされ、そして電場が印加される場合、より小さなタンパク質は、大きなタンパク質（これは、ゲルを通過して移動する際に、より大きい抵抗を受ける）より速く、このゲルを通過してアノード（+）へと移動し得る。ゲルを現像するために使用され得る、異なる型の染料（例えば、クーマシーブルーおよび銀染料）が存在する。多くの場合において、SDS-PAGEは定性的な手段であり、サンプル中のタンパク質の大まかな量および大きさは、問題のバンドを、分子量ラダーのバンドと直接比較することによって、判断され得る。

40

#### 【0021】

Agilent Bioanalyzer<sup>TM</sup>は、ガラス、石英、またはプラスチックの

50

チップ上に作製されたマイクロチャンネルネットワークを有する小型の化学チップを使用する、微量全分析システム (p-TAS) である。代表的なチャンネルは、およそ50ミクロンの幅および10ミクロンの深さである。Agilent Bioanalyzer<sup>TM</sup> Protein 200 Assayは、大きさおよびサンプル中の濃度によって、タンパク質をより効率的に特徴付けるために開発された。この微小流体システムは、SDS-PAGEといくらか類似して機能するが、大規模な分析方法より優れた多くの利点を与える。Bioanalyzer<sup>TM</sup> についてのProtein 200 Assayのいくつかの利点としては、小さなサンプル容量、データ/サンプルのより高いスループット、減少した資源消費および廃棄物生成、ならびに多段階プロセスの自動化が挙げられる。

#### 【0022】

Protein 200 Assayにおいて、タンパク質は、B-メルカプトエタノールで変性され、そして蛍光標識される。さらに、SDS-PAGEにおいてと同様に、これらのタンパク質は、一定の電荷対質量の比で、SDSでコーティングされる。戦略的に配置された電極は、流体を移動させ、そして異なる大きさのタンパク質を分離し得る、界面動電力を発生させる。分子は、タンパク質上の電荷の量によって分離される。より大きい、より負に荷電したタンパク質は、カソードに向かって移動する。標識されたタンパク質分子がチャンネルにおける特定の点を通り過ぎて移動するにつれて、これらの蛍光が、レーザービームによって検出される。Protein 200 Assayの感度は、サンプル緩衝液における塩濃度によって影響を受けることが既知である。なぜなら、より高い濃度において、より少量のタンパク質が、分離チャンネルに注入されるからである。

#### 【0023】

##### (II. 骨粗鬆症のための診断技術)

血液または尿に対する正確な臨床化学試験はいずれも、骨粗鬆症においては異常ではないが、生化学的マーカー、X線撮影法、および骨鉱物の密度 (BMD) の測定は、骨粗鬆症を診断する際に役立つ。骨の質量密度試験は、骨粗鬆症を診察するために使用され、そしてX線フィルムは、他の骨または関節炎の状態を除外するために使用される。細い骨は、X線フィルム上で検出され得るが、骨密度試験は、より正確である。

#### 【0024】

##### (A. 骨デンシトメトリー)

骨格の骨質量を評価するための方法の開発におけるかなりの進歩により、現在、骨粗鬆症を非侵襲的に容易に検出することが可能である。一般に、骨粗鬆症は、最小の外傷を伴って起こる骨折の後に、X線フィルム上での付随的な知見として、または骨デンシトメトリー (これはまた、骨密度走査として公知である) によるBMDの測定によって、検出され得る。骨密度走査は、骨の状態の即時の断片であると、多くの人に考えられている。これらの走査 (集合的にBMD試験として公知) は、脊椎、股関節部、手根、手、踵、または全身において、骨質量の量を検出し、そしてその密度を評価する。いくつかの研究は、任意の解剖学的部位における骨鉱物含有量に関する情報が、一般には、骨折の危険性を予測するために等しく価値があることを示したが (Blackら、J. Bone Miner Res. 7: 633-638 (1992); Meltonら、J. Bone Miner Res. 8: 1227-1233 (1993))、他の研究は、目的の特定の部位において得られた測定値が、その部位における骨折の予測のための最も重要な情報を提供し得ることを示唆した (Cummingsら、Lancet 341: 72-75 (1993))。骨の鉱物密度試験は、最も感受性であり、そして骨粗鬆症に対する特定の試験は、骨折の危険性を予測する際に必須である。

#### 【0025】

BMDを非侵襲的に測定するための、いくつかの技術が利用可能である。今日のX線に基づく測定システムの全ては、正確であり、そして極端に低い有効放射線量を送達する。放射線核種システムより優れたX線システムの主な利点は、安全な、短縮された試験時間、より大きな正確さ、および高分解能に限定された精密さ、ならびに供給源の崩壊の補正に起因する誤差の除去である。今日広範に使用されている種々の骨走査技術としては、単一

10

20

30

40

50

x線吸光光度法、二重エネルギーx線吸光光度法(DEXA)、定量的コンピュータ連動断層撮影、末梢定量的コンピュータ連動断層撮影、放射線吸光光度法、定量的超音波、単純な光子吸光光度法、および二重光子吸光光度法が挙げられる。これらの開発は、この目的での平面のx線撮影法の固有の欠点を克服する必要性によって、推進された。単一および二重の光子吸光光度法は、依然として利用可能であるが、これらのより古い技術は、これらの最新の対応物である単一x線吸光光度法およびDEXAによって、急速に取って代わられている。

#### 【0026】

いくつかの利用可能な技術のうちの、DEXAは、BMDを測定するために最も広範に使用される技術になっている。これは、その低い放射線、利用可能性、複数の部位を評価する能力、および使用の容易さに起因する(Genantら、Am J Med. 91(補遺5B); 49S-53S(1991))。二重エネルギーx線吸光光度法は、軟部組織の組成(赤身および脂肪の質量)および腰椎、股関節、および前腕の骨質量または骨密度、ならびに全身のBMDを、二重光子吸光光度法より大きな精度で、より速い走査時間で測定し得る(Consensus Development Center:「Prophylaxis and treatment of osteoporosis」Am J Med. 90:107-101(1991))。スクリーニング手順と同様に、DEXAは、その比較的高い取り付け費用によって制限される。この技術の正確さは、全ての骨格部位の測定について完全には証明されていない。

10

#### 【0027】

標準的な骨鉱物の報告は、目的の領域における骨鉱物含有量(ヒドロキシアパタイトのグラム量)として表され、そして面積密度(1平方センチメートルあたりのグラム数)に変換された、測定値からなる。さらに、正常値は、性別および人種に従って提供され、そして年齢に従ってプロットされる。人口統計学的データ(臨床的指標ならびに患者の年齢、性別、人種、体重および身長を含む)もまた、考慮される。標準的な骨鉱物の報告を解釈するためには、目的の領域が選択されなければならない。個体を比較するためには、測定部位が一定であるべきである。なぜなら、骨鉱物含有量は、異なる骨の間で、そして同じ骨の異なる領域の間で変動するからである。これらの結果は、標準的な値と比較され、そして標準的な値の標準曲線が、両方の性およびいくつかの人種の個体に対して提供される。正常な若い個体または対応年齢の個体についての平均値との、測定値の比較は、骨折の危険性の評価を可能にする。

20

30

#### 【0028】

世界保健機関は、最近、明白な定義、および骨デンシトメトリーの結果の解釈の際に臨床医を補助することを試みた。その報告によれば、骨鉱物含有量についての標準値は、同じ年齢および性別のヤングアダルトについての平均値の、1の標準偏差(SD)以内(すなわち、tスコアが-1を超える)である。骨粗鬆症は、骨鉱物含有量の値が1SDを超えるが、ヤングアダルトについての平均の2.5SD以下(すなわち、tスコアが-1未満でありかつ-2.5より大きい)場合に、存在するとみなされる。骨粗鬆症は、その値が、ヤングアダルトについての平均骨鉱物含有量の2.5SDより低い値(すなわち、tスコアが-2.5未満)の場合に存在するとみなされる(Kanisら、1994)。

重篤な骨粗鬆症は、骨鉱物含有量についての値がヤングアダルトについての平均の2.5SDより低く、そしていわゆる脆弱性骨折(わずかな外傷の結果として起こるので、骨粗鬆症に関連すると仮定される)が少なくとも1つ存在する場合に存在するとみなされる。一般に、tスコアは、低い骨質量または骨粗鬆症の診断のために、使用される。

40

#### 【0029】

医師は、患者の骨粗鬆症についての危険因子の存在または不在に基づいて患者の骨折の危険性を減少させるために治療を開始する。治療は、危険因子のない場合、-2未満の骨鉱物密度tスコアを有する女性において、および他の危険因子が存在する場合、-1.5未満のtスコアを有する女性において、骨折の危険性を減少させるために開始される。

#### 【0030】

50

## B. 骨ターンオーバーの生化学マーカー

骨ターンオーバーのマーカーの組み合わせは、骨粗鬆症の臨床試験において種々の方法で使用され得る。増大する証拠は、閉経後の骨損失の割合が生化学マーカーにより決定され得、これにより閉経直後の1つの生化学的評価が、骨量測定と組み合わせ、高い骨ターンオーバーを有し、従って高い割合の骨損失を受けるとされる女性を同定するために使用され得ることを示唆する。骨粗鬆症患者において、マーカーは、低い骨ターンオーバーを有する患者において使用されるのとは異なる治療上の戦略の恩恵を受け得る、高い骨ターンオーバーを有する患者のサブグループを同定するために使用され得る。最終的に、マーカーは、それらの効果および作用機構をモニターするために、新規な治療剤の臨床試験において使用され得る (Consensus Development Center 1991)。

## 【0031】

オステオカルシンは、骨芽細胞(これは、骨形成細胞である)により分泌される骨特異的タンパク質であり、そしてその血清レベルは、骨形成の割合の感度の高いマーカーである。骨形成の他のマーカーとしては、全体のおよび骨特異的なアルカリホスファターゼおよび血清1型コラーゲンプロペプチドの血清レベルが挙げられる。ピリジノリンおよびデオキシピリジノリンは、破骨細胞の骨吸収の過程における1型コラーゲンの分解の間に血液中および尿中に放出されるコラーゲン架橋物である (Delmes 「Clinical use of biochemical markers of bone remodeling in osteoporosis」、Osteoporosis, Christiansenら(編)、Copenhagen, Osteopress, 450~458頁、1990)。ピリジノリン(例えば、ヒドロキシリジルピリジノリンおよびリジルピリジノリン)の尿分泌は、尿中ヒドロキシプロリンのような従来のマーカーよりも、骨吸収のより感度の高く、かつ特異的なマーカーであることが示されている (Uebelhartら、Bone Mineral, 8, 87-96(1990))。血漿中酒石酸耐性酸性ホスファターゼは、骨吸収の別のマーカーである (Delmes, (1990))。

## 【0032】

## C. X線写真所見

骨中カルシウム含有量の減少は、従来のX線写真において確実に観察される30%を超える。長骨または椎骨体の皮質においてX線写真で明らかな薄層化が、留意され得る。普通のX線写真は、骨密度の実証は、X線写真技術に強く依存するので、骨粗鬆症の診断において大体不正確である。

## 【0033】

## III. 骨粗鬆症に対する細菌またはウイルスマーカーの同定

## A. 骨粗鬆症に対する細菌マーカー

## 細菌感染および骨病理

骨病理に關与する範囲の細菌が存在する。これらの疾患に取り組むための鍵となる問いは、いかにして細菌が病理を刺激するかということ、およびいかにしてそれらが凍結した場所において骨に入り込むかということである。四肢および身体中心部の骨格の感染においては、回答は、骨マトリックス成分に対する細菌発現レセプター中にあり得る。例えば、Staphylococcus aureusは、おそらく骨において血液運搬生物を捕捉する役割を有する、フィブロネクチン (Rajaraら、Infect. Immun., 58:2593-2598(1990)); ラミニン (Motaら、Infect. Immun., 56, 1580-1584(1988))、コラーゲン (Pattiら、Infect. Immun., 62:152-161(1994))、および骨シアロ糖タンパク質 (Rydenら、Eur. J. Biochem., 184:331-336(1989)) に対するレセプターを含有する。細菌は、歯周組織に侵入しないので、受け入れられたパラダイムは、局所病理が、可溶性細菌ビルレンス因子の放出に起因すること (Wilson, Sci. Prog., 78:19-34(1995)) およびこれが、全ての骨感染に

おける一般的な機構であり得るということである。

【0034】

【表1】

表 1. 病理学的骨再形成に関する細菌

疾患	生物
歯周病 (Schlugerら, 1990)	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> <i>Porphyromonas gingivallis</i> <i>Eikenella corrodens</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Prevotella inter-media</i> <i>Campylobacter rectus.</i>
骨髄炎 (Jaffe, 1972; Schmid, 1993)	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Salmonella spp.</i> <i>Escherichia coli, など</i>
細菌関節炎 (Ho, 1993; Livnehら, 1983)	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Neisseria gonorrhoea</i> <i>Neisseria meningitis</i> <i>Mycobacterial tuberculosis</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Pasteurella multocida, など</i>
感染金属移植片 (Ross, 1991)	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>

10

20

いかにして細菌が病理的骨損失を引き起こすかということに関して、3つの可能性が存在する：(a)細菌が、遊離の酸およびプロテアーゼによって骨の非細胞成分を直接破壊する、(b)細菌が、骨の分解を刺激する細胞プロセスを促進する、または(c)細菌が骨マトリックスの合成を阻害する。(b)および(c)の機構は、細菌により放出された成分の直接の効果、または宿主因子(例えば、次いで骨細胞に作用するサイトカインまたはプロスタグランジン)の誘導の結果のいずれかであり得る。虫歯の病理に関係する機構は、骨格骨病理においては主要でない機構でしかないと思われる。

30

【0035】

骨形成を阻害する細菌およびそれらの産物の能力

インビトロでの骨吸収の刺激に加えて、内毒素-LPSもまた、骨中コラーゲンおよび非コラーゲン(noncolлагенous)タンパク質の合成を阻害することが報告されている(Millarら、Infect. Immun., 57, 302-306(1986))。多数の報告は、歯苔または培養中の歯周症性細菌(periodontopathic bacteria)の抽出物が骨マトリックス合成を阻害し得ることを示唆している(Hoppsら、Periodontal disease: pathogens and host immune response. Hamadaら編、(Quintessence Publishing Co., Ltd., Tokyo)307-320頁(1991); Multanenら、J. Clin. Periodontol. 12: 729-739(1985))。口腔細菌由来の表面関連タンパク質もまた、骨マトリックス合成を阻害し得る(Meghjiら、J. Periodontol. 63: 736-742(1992))。

40

【0036】

特定の歯周症性細菌は、一般的な抗増殖活性を有する因子を生産する(Helgeland

50

dおよびNordby, 1993; Kamen 1981; Kataokara, 1993; Larjava, 1987; Meghji, Arch. Oral Biol., 37: 637-644 (1992); Saito, 1993; Shenker, 1991)。これらは、おそらく、骨芽細胞増殖を阻害する際に役割を果たし得、従って、骨再形成を損ない得る。これらの種々の生物学的活性はまだ精製されておらず、特徴付けられてもいない。ヒト骨芽細胞様細胞株に対して最も活性である *Actinomycetemcomitans* 由来の抗増殖タンパク質は、骨に対するいくらかの特異性を示唆する。この8kDaタンパク質(White, 1995)「ガプスタチン(gapstatin)」と称されるは、直接的にDNA合成を阻害しないが、細胞周期のG2期で細胞をブロックすることにより、細胞周期進行を阻害する。同期化された細胞集団の速度論研究は、ガプスタチンがS期で細胞にのみ作用することを示している。この分子は、サイクリンBI(細胞がG2から有糸分裂への移行を行うために必要とされたタンパク質)の合成を阻害することにより作用し得る。骨再形成およびマトリックス合成は、骨芽細胞および破骨細胞の継続した生産を必要とするので、ガプスタチンの作用は、新規な骨マトリックス形成を阻害し得る。このような影響は、骨破壊を刺激する分子(例えば、cnp60)と共同で起こる場合、特に有害である。ガプスタチンは、破骨細胞の形成を阻害し得る可能性がある。

#### 【0037】

*Bordetella bronchiseptica* は、ブタ萎縮性鼻炎における鼻甲介萎縮の原因となる145kDa皮膚壊死性毒素(DNT)を生産する(Ackerman, 1991; Dunan, 1966)。組織学的には、*B. bronchiseptica* により誘導される病変は、損なわれた骨芽細胞機能を示唆する(Silveira, 1982)。培養骨に対するDNTの影響の1つの報告が存在するが、その影響は、特に著しいわけではなかった(Kiman, 1987)。しかし、マウス骨芽細胞細胞株MC3T3-E1に添加された場合、それは、細胞構造に変化を引き起こし、アルカリホスファターゼおよびコラーゲンの両方を生産する骨芽細胞の能力(これは、インビボで複製される場合に骨再形成に重大に影響し得る作用である)を強く阻害した(50%阻害濃度、100pg/ml)(Horiguchi, 1991)。DNTがMC3T3-E1細胞へのトリチウム化チミジン取り込みの強力な刺激因子であり、50%有効用量が約1ng/mlであることが近年報告されている。この標識の取り込みにも関わらず、培養物中のMC3T3-E1細胞の数は増加しなかった。DNTへの曝露の主な結果は、多核骨芽細胞の出現であった。別の細胞周期阻害タンパク質は、歯周症性細菌 *Fusobacterium nucleatum* から近年単離されてきた。このタンパク質は、細胞周期の中期G期(mid-G)でヒトTリンパ球をブロックする(ShenkeおよびDatar, 1995)。それは、骨吸収を刺激すると期待される。

#### 【0038】

細菌が哺乳動物細胞周期に干渉し得る範囲のタンパク質を生産することが、現在明らかになってきているところである。これらのタンパク質の活性が新規な細菌ビルレンス機構を表すことが示唆され得る。骨再形成における骨細胞系譜の増殖および成熟の重要性は、おそらく、これまでに発見された細菌細胞周期調節タンパク質が骨病理を誘導するか、または骨マトリックス損失を包含する疾患に関与する細菌に主に由来し得る理由である。

#### 【0039】

B. 骨粗鬆症に対する分子シャペロンマーカー  
熱ショックタンパク質(hsp)としてもまた公知の分子シャペロンは、タンパク質の細胞内フォールディング(アンフォールディング)、アセンブリ、および転位の間それらのシャペロン機能を通じて原核細胞生物および真核細胞生物に必須である。構造的に関連したhspの4つの主要なファミリーが、それらの分子量に基づいて区別される: Hsp90、Hsp70、Hsp60、および低分子Hsp。定義により、Hsp発現は、ストレスを受ける細胞(例えば、損傷組織または炎症組織中の細胞)において上昇される。温度の上昇、低酸素、照射、感染、および毒性化学物質への曝露と同様に多様な条件が全て

、増大されたH s p発現を生じ得る。H s pファミリーの中で、個々のメンバーが、独特の配列相同性の程度を有する。H s p 60については、ヒトタンパク質は、ミコバクテリウムホモログと50%の配列同一性を有し、さらなる20%の保存的置換を有し、これにより、ヒト分子中のいくつかの領域が細菌タンパク質に完全に同一であるようになる。

【0040】

最も研究されている分子シャペロンは、c p n 10およびc p n 60（それらのサブユニットの分子量に由来する）として公知の2つの相互作用するオリゴマータンパク質からなる、シャペロニン（c p n s）である。c p n sは、タンパク質折り畳みがc p n 60オリゴマーのキャビティー内に存在し、プロセスがヘプタマーc p n 10を必要として、ヘプタマー構造を形成する。対照的に、分子シャペロンのH s p 70ファミリーは、モノマーとして作用する。H s p 90ファミリーは、ストレスの無い真核生物細胞における最も豊富なタンパク質のうちの一つであり、そしてこの2量体タンパク質は、多数の細胞内タンパク質（最も顕著には、ステロイドレセプター）と相互作用する。多数の低分子量分子シャペロンもまた存在する（Wilsonら、J . P e r i o d o n t a l . R e s . 20 : 484 - 491 (1985)）。多数の他のあまり十分には特徴付けられていない分子シャペロンが公知である。H s p 47は、コラーゲン分子シャペロンであるとして公知である（Laemmli、1970）。特定の分子シャペロンc p n 60、H s p 70およびH s p 104は、アデノシン三リン酸に結合し、そしてアデノシン三リン酸を加水分解する。

10

【0041】

哺乳動物被験体のH S Pを単離し、さらに分析するために、組織または細胞は、一般的に、H S Pレベルを上昇させない条件下でサンプリングされる。組織または細胞のサンプリング、H S P単離および測定、ならびにH S P複合体の形成の方法は、S a n d e r s に対する、米国特許第5,232,833号および同第5,780,246号（これらは、本明細書中において参考として援用される）によって記載される。

20

【0042】

（代表的年齢のグループ由来のヒト骨サンプルの収集および骨密度測定に関するサンプルプールの特徴付け）

代表的な骨サンプルを、許可を受けた骨バンクから入手し得る。次いで、サンプルプールを、骨密度の測定に基づくデータベースを作製するために特徴付ける。多くの骨密度技術が、骨折の危険性を評価するために臨床的有用性を示している。現在、骨密度の測定について利用可能な20より多くの異なるデバイスが存在する。いくつかのデバイスは、汎用性（すなわち、測定され得る骨格部位の数）、応答をモニターする能力、費用、有用性、および使用の容易さの点で利点を提供する（表2）。現在、これらの臨床的要件の全てに理想的に取り組む単一のデバイスは、存在しない。

30

【0043】

【表2】

表2—骨デンストメトリー技術の比較

方法 <sup>a</sup>	臨床的有用性	汎用性	使用の容易性	利用可能性	費用	放射線量
SXA	+	-	+	+	+	+
DXA	++	++	+	+	-	+
pDXA	+	-	+	+	+	+
QCT	++	-	-	+	-	-
pQCT	+	-	+	-	-	+
QUS	+	-	+	+	+	++

40

<sup>a</sup> S X A、シングルX線吸光光度計；D X A、デュアルX線吸光光度計；p D X A、ペリフェラル（p e r i p h e r a l）デュアルX線吸光光度計；Q C T、定量コンピューター断層撮影；p Q C T、ペリフェラル定量コンピューター断層撮影；Q U S、定量超音波

50

診断法。

【0044】

(C. WHOに従う、骨粗鬆症の確認)

臨床的に有用な骨塩密度(BMD)測定について、これらは、確立された規範的なデータと比較して表現される必要がある。すべてのBMD生産業者は、この目的のために規範的なデータベースを提供する。これらのデータベースは、異なる年齢および人種の多くのグループの男性および女性の両方の骨密度測定から導かれる。比較は、同じ年齢、性別、および人種の健康な個体についての年齢の一致した正常値および若い正常値からの割合またはこのような正常値からの標準偏差の数として表現される。

【0045】

割合のスコアは、年齢の一致した正常なBMD(AMN)または若く正常なBMD(YN)のいずれかに関して、以下の等式を使用して、決定される：

年齢一致についての割合 =

$$[1 + (BMD - AMN / AMN)] \times 100\% \text{ (Harrisら、Bone Miner. 17: 87-95 (1992))}$$

若く正常についての割合 =

$$[1 + (BMD - YN / YN)] \times 100\% \text{ (Faulknerら、J. Bone Miner Res. 11 (補遺): S96 (1996))}$$

【0046】

代表的に、デンシトメトリー分析ソフトウェアは、これらの割合の値を計算し得る。標準偏差(SD)スコアはまた、通常、デンシトメトリーソフトウェアによって提供される。年齢一致のSDスコアは、通常、「Zスコア」と呼ばれ、一方、若く正常の標準偏差スコアは、「Tスコア」と標識されている。しかし、異なるデンシトメトリーシステムは、これらのパラメーターについて異なる名称を有し得る。

【0047】

年齢一致またはZスコアは、同じ年齢、性別および人種(AMN)の差についての患者のBMDと正常なBMDとの間の差を、正常な集団のSDによって割ったものとして計算される。これは、以下の式を使用して、デンシトメトリーシステムによって計算される：

$$Z = (BMD - AMD) / SD$$

若く正常またはTスコアは、BMDの差が、YN骨密度で表現されることを除いて、類似の様式で規定される：

$$T = (BMD - YN) / SD$$

骨粗鬆症の診断について、WHOは、任意の骨格部におけるBMD測定に基づいて、骨粗鬆症の評価についての以下の基準を規定している。

【0048】

1. 正常：BMDが、YNよりも1SD以下で、下である(Tスコア - 1)。

【0049】

2. 低い骨質量(オステオペニア)：BMDが、YNよりも1~2.5SDだけ下である(Tスコア < -1および > -2.5)。

【0050】

3. 骨粗鬆症：BMDが、YNよりも2.5SD以上で、下である(Tスコア - 2.5)。

【0051】

4. 重症の骨粗鬆症：BMDが、若く正常よりも2.5SD以上で、下であり(T - 2.5)、1箇所以上の脆弱性の骨折の存在がある。

【0052】

(骨サンプルにおける、種々の細菌シャペロンおよび哺乳動物シャペロンの存在を同定するためのサンプル分析)

(骨サンプルからのシャペロン分子の抽出)

全ての骨サンプル(BS)は、滅菌生理食塩水において収集され得、遠心分離され得、手

10

20

30

40

50

短に生理食塩水において洗浄され得、そして凍結乾燥され得る。シャペロン分子は、例えば、Wilsonら、(1985)によって記載されるような穏やかな生理食塩水抽出によって、種々の細菌から取り出される。簡単に述べると、骨サンプルは、滅菌生理食塩水において懸濁され、4 で1時間穏やかに攪拌する。次いで、細片を遠心分離のような手段によって取り除き、そして可溶性の成分を蒸留水に対して広範囲に透析し、そして凍結乾燥する。BSのタンパク質含有量は、Lowryら、J. Biol. Chem. 193 : 265 - 275 (1951)によって記載されるような方法によって決定され得、炭水化物含有量は、Duboisら、Anal. Chem. 28 : 350 - 356 (1956)に記載されるような方法によって決定され得、そして核酸含有量は、260 / 280における吸収によって実行する。LPS含有量は、製造業者の指示に従って、Pyrogen 10  
nt、Byk-Mallinckrodt、London, UKによって市販されるような、市販の色素原性Limulusアメーバ様細胞溶解物アッセイを使用して測定され得る。

#### 【0053】

(SDS-PAGE)

BSの成分は、例えば、Laemmliら、Nature (Lond.) 227 : 680 - 685 (1970)によって記載されるような方法に従って、12%ゲルを使用して、SDS-PAGEによって分析され得る。当業者は、他の適切な方法を認識する。サンプルは、サンプル緩衝液を用いて、1 : 1のような適切な程度まで希釈され得、そして充填の前に、5分間のような期間、煮沸され得る。ゲルは、例えば、MiniProtean 20  
IIシステム(Bio Rad Laboratories)を使用して実行され得、そして例えば、クマシーブリリアントブルー(Sigma Immunochemicals)を用いて染色され得る。分子量マーカーは、Dalton標準(Sigma Immunochemicals)または当業者が認識し得る任意の他の標準に基づき得る。ゲルはまた、タンパク質の存在および炭水化物の存在の両方を検出するために、市販のキット(例えば、Gelcode(C)マーク銀染色キット; Pierce, Rockford, IL)によって市販されるようなキット)を使用して、銀染色され得る。

#### 【0054】

(2次元PAGE)

2次元PAGEゲルを、O'Farrellら、J. Biol. Chem. 250 : 40 30  
07 - 4021 (1975)によって記載されるような方法を使用して実行し得る。ゲルは、例えば、MiniProtean<sup>T M</sup> IIシステムを使用して実行され得、そして例えば、上記のような類似の分子量マーカーと共に、例えば、クマシーブルーを用いて染色され得る。第1次元(等電点電気泳動)は、1 ~ 14、好ましくは、3 ~ 10のpH範囲にわたり得る。第2次元の分離は、例えば、12%SDS-PAGEゲルを使用する、分子量分離によって実行され得る。

#### 【0055】

(免疫プロット法)

1次元SDS-PAGEまたは2次元SDS-PAGEで分離されたサンプルを、一晚、Millipore Corp.、Bedford, MAによって市販されるヒンモピロン(hnmobilon)P 40  
ポリビニルジフルオリド膜のような膜上にエレクトロプロット(electroblot)され得る(Laemmli、1970)。膜を、例えば、0.1% Triton X-100(Sigma Immunochemicals)(PBS-T)を含むPBSを用いて洗浄し得、そして2% FCS(ブロッキング緩衝液)(SeraLab)を含むPBS-Tを用いてブロックし得る。次いで、ブロックされた膜を、1時間のような期間、試験抗体(ブロッキング緩衝液中)を伴ってインキュベートし得、そして緩衝液(例えば、PBS-T)を用いて洗浄し得る。結合した試験抗体(抗マウス)IgGを、例えば、PBS-T 2% FCS中で、1 : 1, 000において、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG(鎖特異的)(Sigma Immunochemicals)を使用して、検出し得る。最終の洗浄の後に、プロットを、150 50

mM NaCl (BDI-I) および 0.05% 過酸化水素 (Sigma Immunochemicals) を含む、50mM Tris (Sigma Immunochemicals) (pH 7.6) 中で、1mg/ml の 3,3-プライム (prime) - ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド (Sigma Immunochemicals) のような溶液を用いて発色させ得る。各反応を、蒸留水を用いて広範囲にリンスすることによって終了させ得る。

【0056】

(タンパク質精製)

粗製のBSは、カラムクロマトグラフィーを用いて分画され得る(例えば、Q-Sepharose<sup>TM</sup> アニオン交換カラム(50cm x 1.6cm)で4での分画)。このカラムは、20mM Tris-HCl (pH 8.5) (緩衝液A) のような溶液中で平衡化され得る。このBS(一般に100~400mg)は、同じ緩衝液中でロードされ得る。このカラムは、溶液(例えば、500mlの緩衝液A)を用いて洗浄され得、次いで、例えば、1,000mlの緩衝液A中で0~2Mの直線勾配のNaClを用いて溶出され得る。画分は、収集され得、その吸光度が、280nmで観察され得る。溶骨性シャペロンタンパク質の位置が、活性アッセイ(例えば、SDS-PAGE、およびウェスタンブロット分析)の組合せによって測定され得る。溶骨性活性を含む画分を、例えば、脱イオン水に対して透析して、塩を除去し、そして凍結乾燥し得る。最も高い特異的活性およびSDS-PAGE上の最も少ない数のタンパク質のバンドを有する画分が、さらに第2のカラム(例えば、アニオン交換カラム)で室温で分画され得る。

10

20

【0057】

画分の純度が、SDS-PAGEによってか、または当業者によって認識され得る別の手段を用いて、可視的に再度評価され得、そして100pgの最も純粋な画分が、10mMのKClおよび10mMのMgCl<sub>2</sub>を含む50mMのTris (pH 7.6) (緩衝液C)に対して透析され得る。このサンプルは、例えば、5mlのATP-Sepharose<sup>TM</sup> (Sigma Immunochemicals)カラムで流され得る。このカラムは、緩衝液Cを用いて洗浄され得、そして結合したタンパク質はまた、緩衝液C中の5mMのATP (Sigma Immunochemicals)で溶出され得る。タンパク質は、SDS-PAGEによって位置づけられ得、銀染色キット (Sigma Immunochemicals)を用いて可視化され得る。ゲルろ過は、ATP-アフィニティクロマトグラフィーのような方法によって単離される溶骨性シャペロンタンパク質の分子量範囲を測定するために用いられ得る。これは、精製されたタンパク質を、緩衝液(例えば、0.1Mのリン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.7))中でカラム(例えば、Bio-Sil TSK250 (Bio Rad Laboratories)カラム)に流し、そして205nmと280nmとの間の範囲における波長で、収集された画分の吸光度を測定することによって、成し遂げられ得る。

30

【0058】

(臨床的結果の計量値に対するデータ分析および相関関係)

実験的な知見および臨床的な骨密度測定値およびQ-CT測定値が、例えば、数値のコードシステムを用いる標準的な関係型コンピュータデータベースを用いて実証され得る。1つの実施形態において、コンピュータプログラムSPSS/PC+9.0 (SPSS Inc., 44N. Michigan Ave., Chicago, IL 60611)が、編集されたデータの統計学的分析に使用される。未加工データの記述統計学が、度数分布表を用いて実行され得る。正規分布が、正規性にあてはめること、および正規確率プロットを得ることによって測定され得、ここで、階数化された観測残差(平均からの偏差)は、y軸上の正規分布の標準化された値に対してx軸上にプロットされる。次いで、観測残差が直線上に位置する場合、正規分布が示され得る。平均値間の有意差は、従属サンプルおよび独立サンプルについてのT-検定ならびに一元ANOVA分散分析を用いて評価され得る。多変量変数を用いたANOVAからの統計学的に有意なF-検定の場合、寄与平均値が、不均等なサンプルサイズについてのTukey HSD検定を用いるポストホ

40

50

ック ( p o s t - h o c ) 比較によって区別され得る。後者の2つの検定は、種々のシャペロン分子の出現率、ならびに患者の年齢および性別、および他の付随する病状に従う骨減少性骨サンプルの存在を測定し得る。従って、オステオペニアと相関する主なシャペロン分子が同定され得る。

【0059】

オステオペニア、年齢、性別、他の寄与因子、およびシャペロン分子の存在の間の関係が、例えば、多元度数分布表を作成することによってクロス集計法を用いて確立され得る。これらの変数のそれぞれの可能な組合せについて、これらの表は、区画度数(すなわち、この特定の組合せを有する患者集団における場合の数)を作成する。さらに、このようなクロス集計法は、これらの関係のテストの信頼性を評価することを可能にする。故に、オステオペニアの存在、年齢、性別、他の寄与因子(例えば、病状)は、分類的な変数である。多元度数分布表の変数間の多数の連立関係および相互関係は、対数線形方程式に基づいて試験され得、これは、含まれる変数が無関係である場合、期待される区画分布の算出を可能にする。これは、例えば、反復比例適合方法を用いて実行され得る。従って、期待度数からの観測値の有意な偏差は、特異的シャペロン分子とオステオペニアとの間の統計学的に有意な関係を反映し得る。期待度数からの観測値の偏差の有意検定が、P e a r s o n <sup>2</sup> 検定を介して実行され得る。残差度数は、観測度数から期待度数を引き算することによって計算され得る。何の関係も存在しない場合、全ての残差度数が、類似の大きさの正の数および負の数からなり、そして度数分布表の区画にわたって一様に分布されることが期待される。それ故、残差のプロットは、シャペロン分子の存在とオステオペニアとの間の相関関係を評価する別の手段として使用される。この研究において実行される全ての統計学的試験において、危険率(例えば、 $p < 0.05$ の1つ)が、選択され得る。当業者は、適切な危険率を選択し得る。

10

20

【0060】

( I V . 細菌および/または分子シャペロンマーカを用いた骨粗鬆症の診断 )  
本明細書中で開示される骨粗鬆症を診断する方法は、一般に以下を含む: 1) 哺乳動物の被験体の組織または細胞をサンプリングする工程、2) マーカーのレベルを測定する工程、および3) マーカーのレベルが、コントロール群のメンバーにおけるマーカーの標準レベルよりも高い場合、骨粗鬆症を有するとして哺乳動物の被験体を診断する工程。この方法は、必要に応じて、マーカーを単離する工程を含み得る。コントロール群は、因子(例えば、地理的位置、性別および/または年齢)に従って選択される。あるいは、同じ哺乳動物の被験体における2回以上のマーカーの測定がなされ、そして数時間(例えば6時間)、数日(例えば10日間)から数ヶ月または数年までの範囲の過程の間で比較される。後の測定またはアッセイのマーカーのレベルが、先の測定またはアッセイにおけるマーカーのレベルよりも高い場合、その哺乳動物の被験体は、骨粗鬆症を有すると指摘される。所望される場合、時々、骨粗鬆症を診断する2つの方法が、組合せで用いられ得る。

30

【0061】

好ましくは、哺乳動物の被験体は、ヒトである。最も好ましくは、哺乳動物の被験体は、閉経後の女性である。

【0062】

マーカーは、細菌、細菌の生成した因子、またはシャペロン分子のいずれかであり得る。1つの実施形態において、マーカーは細菌である。代表的な細菌マーカーは、以下である: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*、*Porphyromonas gingivallis*、*Eikenella corrodens*、*Fusobacterium nucleatum*、*Prevotella inter-media*、*Campylobacter rectus*、*Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus epidermidis*、*Salmonella spp.*、*Escherichia coli*、*Neisseria gonorrhoea*、*Neisseria meningitidis*、*Mycobacterial tuberculosis*、*Haemophilus influ*

40

50

enzae、Pasteurella multocida。

【0063】

別の実施形態において、マーカーは、シャペロン分子であり得る。代表的なシャペロン分子マーカーは：HSP70、HSP70、gp96、cpn10およびcpn20単独または組合せである。好ましくは、マーカーはヒトHSPである。

【0064】

なお別の実施形態において、マーカーは、細菌が生成した因子（例えば、内毒素-LPS、ガプスタチン(gapstatin)、または皮膚壊死性毒素(DNT))であり得る。

【0065】

(V. 骨粗鬆症を処置または予防する方法)

(A. HSP試薬の調製および精製)

HSPタンパク質およびそれぞれのペプチド複合体の調製および精製は、当該分野における知識内である。この複合体は、選択された組換え宿主細胞由来のHSP、および病気の骨細胞および組織細胞のcDNAから発現される抗原性ペプチドを有する細胞内で生成される複合体であり得；従って、この複合体の抗原性ペプチドは、このような骨細胞において見出される抗原性ペプチドの代表である。一般に、HSP複合体を調製する方法は、1つ以上の個体から病気の骨細胞または他の組織細胞を得る工程（例えば、単離する工程）、細胞からRNAを調製する工程、RNAからcDNAを作製する工程、cDNAを宿主細胞中に導入する工程、病気の骨細胞由来cDNAが発現されるように宿主細胞を培養する工程、および宿主細胞からHSP-ペプチド複合体を精製する工程を含む。

【0066】

本明細書中で「病気の骨cDNA」といわれる病気の骨細胞RNAまたは組織細胞RNAから調製されるcDNAは、発現のための宿主細胞中に導入される前に、必要に応じて増幅される。このcDNAは、発現の前に複製の目的のためのクローニングベクター中に、必要に応じて挿入される。cDNAは、発現ベクター中に挿入されるか、または染色体内に統合され、インビトロで適切な宿主細胞においてコードされるタンパク質を発現する目的のための調節エレメント（例えば、プロモーター）に作動可能に連結される。このcDNAは、宿主細胞中に導入され、ここでcDNAは宿主細胞によって発現され、これによって、細胞内でHSPおよびペプチドの非共有結合の複合体を生成する。組換え宿主細胞は、大量の免疫原性複合体の生成のために大量に培養され得る。病気の骨cDNAライブラリーは、将来の使用のために（例えば、凍結乾燥または凍結によって）保存され得るか、または免疫原性複合体に対する需要の増加に対処するために適切な宿主細胞中でのクローニングベクターにおける複製によって拡大され得る。

【0067】

病変した骨組織のcDNAを発現する宿主細胞から調製される免疫原性組成物は、ペプチド（特に、RNAが本来誘導される病変した骨細胞由来のペプチド）に非共有結合される宿主細胞のHSPの複合体を含む。このような複合体は、患者中の病変した骨細胞に対する、治療的または予防的に有効な免疫応答を誘導し得る。好ましくは、患者は、cDNAを作製するために使用される病変した骨細胞が得られた被験体である。あるいは、病変した骨細胞は、患者とは異なるが病変した同一の組織型の骨組織を有する1以上の被験体由来であり得る。

【0068】

必要に応じて、病変した骨組織のcDNAを発現するための宿主細胞はまた、1つ以上のHSP遺伝子を組換え的に共発現するように遺伝子操作され得、その結果、増加量のHSPに非共有結合された免疫原性ペプチドを含む複合体が生成され得る。

【0069】

HSPタンパク質、それらの各々のペプチド複合体の調製および精製、ならびに抗原性成分/免疫原性成分の単離は、Srivastavaに対する米国特許第5,830,464号；同第5,948,646号および同第6,030,618号（「the Sriv

10

20

30

40

50

a s t a v a 特許」)において開示される。S r i v a s t a v a 特許はまた、H S P - 抗原性分子複合体のインビトロ生成、およびH S P - ペプチド複合体の免疫原性の決定のための適切な手順を記載した。S r i v a s t a v a 特許は、本明細書中に参考として援用される。

#### 【0070】

好ましい実施形態において、H S P - 抗原性分子複合体は、個人に対して自系である；すなわち、この複合体は、その個人自身の感染細胞のいずれかから単離される（例えば、好ましくは、患者の感染組織から調製される）。あるいは、この複合体はインビトロで生成される（例えば、ここでは、外因性抗原性分子との複合体が所望される）。あるいは、H S P および / または 抗原性分子は、個人からもしくは他人から単離され得るか、または、クローニングしたH S P（本来は個人または他人由来）を使用する組換え生成法によって作製され得る。H S P との複合体化において使用するための外因性抗原、ならびにそのフラグメントおよび誘導體（ペプチドおよび非ペプチドの両方）は、当該分野で公知の外因性抗原、ならびに、抗体もしくは主要組織適合分子（M H C 分子）に結合する能力（抗原性）、または免疫応答を生じる能力（免疫原性）による当該分野で公知の標準的イムノアッセイによって容易に同定される外因性抗原から選択され得る。H S P と抗原性分子との複合体は、患者の感染組織から単離され得るか、またはインビトロで生成され得る（このインビトロでの生成は、外因性抗原が抗原性分子として使用される実施形態において必要である）。患者に投与されるH S P - 抗原性分子複合体は、患者に投与されるA P C に感作するために使用されるH S P - 抗原性分子複合体と同一であり得るか、または異なり得る。特定の実施形態（ここで、A P C および複合体は同時に投与される）において、A P C および精製したH S P - 抗原性分子複合体は、投与のために、単一の組成物中または異なる組成物中に存在し得る。

10

20

#### 【0071】

使用され得るH S Pとしては以下が挙げられるが、これらに限定されない：H S P 7 0、H S P 7 0、g p 9 6、c p n 1 0 および c p n 2 0（単独または組合せで）。好ましくは、H S P はヒトH S Pである。H S P は患者に対して同種異系であり得るが、好ましい実施形態において、H S P は、このH S P が投与される患者に対して自系（この患者由来）である。H S P および / または 抗原性分子は、天然の供給源から精製され得るか、化学的に合成され得るか、または組換え的に生成され得る。

30

#### 【0072】

本明細書中で開示される免疫原性H S P - ペプチド複合体としては、哺乳動物において免疫応答を誘導し得るH S P およびペプチドを含む、任意の複合体が挙げられ得る。このペプチドは、好ましくは、H S P に非共有結合される。好ましい複合体としては、以下が挙げられ得るがこれらに限定されない：H S P 6 0 - ペプチド複合体、H S P 7 0 - ペプチド複合体およびH S P - 7 0 ペプチド複合体。例えば、真核生物細胞の小胞体中に存在し、そして細胞質H S P 7 0に関連するg p 9 6と呼ばれるH S P は、g p 9 6 - ペプチド複合体を含む有効なワクチンを生成するために、使用され得る。

#### 【0073】

抗原性分子に非共有結合されたH S P を含む組成物は、複合体化された抗原性分子に対する（H S P に対してではない）効果的な特異的免疫応答を誘導するために投与され得る。H S P - 抗原性分子複合体は、好ましくは、全タンパク質（m g）の少なくとも70%、80%または90%まで精製される。別の実施形態において、H S P - 抗原性分子複合体は、ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってアッセイした場合に見掛け上均質となるまで、精製される。

40

#### 【0074】

H S P またはM H C 抗原と内因的に複合体化された免疫原性ペプチドまたは抗原性ペプチドは、骨疾患を処置および / または予防するための抗原性分子として使用され得る。例えば、以下が挙げられるがこれらに限定されない、異なるウイルスタンパク質に対する細胞障害T細胞応答を刺激するこのようなペプチドが、調製され得る：免疫不全ウイルスI型

50

(H I V - I ) のタンパク質、ヒト免疫不全ウイルス I I 型 ( H I V - I I ) のタンパク質、A 型肝炎のタンパク質、B 型肝炎のタンパク質、C 型肝炎のタンパク質、インフルエンザのタンパク質、水痘のタンパク質、アデノウイルスのタンパク質、単純ヘルペス I 型 ( H S V - I ) のタンパク質、単純ヘルペス I I 型 ( H S V - I I ) のタンパク質、牛疫のタンパク質、ライノウイルスのタンパク質、エコーウイルスのタンパク質、ロタウイルスのタンパク質、RSウイルスのタンパク質、パピローマウイルスのタンパク質、パポバウイルスのタンパク質、サイトメガロウイルスのタンパク質、エキノウイルスのタンパク質、アルボウイルスのタンパク質、ハンタウイルス ( h u n t a v i r u s ) のタンパク質、コクサッキーウイルスのタンパク質、ムンプスウイルスのタンパク質、麻疹ウイルスのタンパク質、風疹ウイルスのタンパク質およびポリオウイルスのタンパク質。

10

## 【0075】

別の実施形態において、使用される H S P - 抗原性分子複合体は、細胞中でインピボで生成される複合体である。あるいは、インピボで抗原性分子を H S P に複合体化することによって、この抗原性分子を使用することを所望するような実施形態において、H S P は、このように使用するために、A T P の存在下または低 p H 下で、内因性 H S P - ペプチド複合体から精製され得る (または、化学合成され得るか、もしくは組換え的に生成され得る)。H S P およびそれらの各々の複合体の精製のための手順は、S r i v a s t a v a 特許中に記載される。本明細書中に記載されるプロトコルは、任意の真核生物細胞 (例えば、組織、単離された細胞、または、予め選択した細胞内病原体で感染させた不死化真核生物細胞株) から H S P - ペプチド複合体、または単独の H S P を単離するために使用され得る。

20

## 【0076】

( B . 外因性抗原性分子 )

外因性抗原または抗原性タンパク質は、H S P と複合体化するための抗原分子として使用するために、当該分野に公知の抗原分子から選択され得るか、または、抗体または M H C 分子と結合し得る (抗原性) か、もしくは免疫応答を生成し得る (免疫原性) イムノアッセイによって決定され得る。抗体への結合を検出することによって免疫原性または抗原性を決定するために、当該分野で公知の種々のイムノアッセイが使用され得、このイムノアッセイとしては以下の技術を使用する競合および非競合アッセイ系が挙げられるが、これらに限定されない: 放射性イムノアッセイ、E L I S A (酵素結合免疫吸着アッセイ)、

「サンドイッチ」イムノアッセイ、イムノラジオメトリックアッセイ、ゲル内沈降反応、免疫拡散アッセイ、インピボイムノアッセイ (例えば、コロイド状の金標識、酵素標識または放射性同位体標識を使用する)、ウェスタンブロット、免疫沈降反応、凝集アッセイ (例えば、ゲル凝集アッセイ、赤血球凝集アッセイ)、補体結合アッセイ、免疫蛍光アッセイ、プロテイン A アッセイおよび免疫電気泳動アッセイなど。1つの実施形態において、抗体結合は、一次抗体上の標識を検出することによって、検出される。別の実施形態において、この一次抗体は、二次抗体の一次抗体への結合、または試薬の一次抗体への結合を検出することによって、検出される。さらなる実施形態において、この二次抗体が標識される。イムノアッセイにおける結合を検出するための多くの手段が、当該分野で公知であり、そして、使用されることが想定される。免疫原性を検出するための1つの実施形態において、T細胞媒介応答は、標準的方法 (例えば、インピボ細胞障害 ( c y t o x i c i t y ) アッセイ、またはインピボ遅延過敏症アッセイ) によって、アッセイされ得る。

30

40

## 【0077】

抗原性分子として使用される潜在的に有効な抗原またはその誘導体はまた、例えば、以下のような種々の基準によって同定され得る: 病原体の感染力の中和における抗原の関与 (ここで、このような病原体による感染を処置することまたは予防することが所望される) (N o r r b y , 1 9 8 5 , S u m m a r y , i n V a c c i n e s 8 5 , L e r n e r ら (編)、C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y , C o l d S p r i n g H a r b o r , N . Y . , 3 8 8 ~ 3 8 9 頁)、型特異性もしくは群

50

特異性、患者の抗血清または免疫細胞による認識、および/あるいは抗原に対して特異的な抗血清または免疫細胞の防御効果の立証。さらに、病原体によって生じる疾患を処置または予防することが所望される場合、抗原のコードされるエピトープは、好ましくは、時間が経っても、同一の病原体の異なる単離株の間でも、低度の抗原性の変異を示すか、または全く示さない。好ましくは、骨組織のウイルス感染によって生じる骨粗鬆症を処置または予防することが所望される場合、上記で議論されたように、既知のウイルスのエピトープを含む分子が使用される。好ましくは、骨組織の細菌感染によって生じる骨粗鬆症を処置または予防することが所望される場合、上記で議論したように、既知の細菌のエピトープを含む分子が使用される。骨組織の原生生物感染によって生じる骨粗鬆症を処置または予防することが所望される場合、既知の原生生物のエピトープを含む分子が使用される。例えば、このような抗原性エピトープは、以下が挙げられるがこれらに限定されない原生生物から調製され得る；リーシュマニア属、コクジディア (kokzidi o a) 属、およびトリパノソーマ属。骨組織の寄生虫感染によって生じる骨粗鬆症を処置または予防することが所望される場合、公知の寄生虫のエピトープを含む分子が使用される。例えば、このような抗原性エピトープとしては、クラミジアおよびリッケチアが挙げられるがこれらに限定されない寄生虫由来であり得る。

10

【0078】

(C. 骨粗鬆症を処置する方法)

シャペロン分子マーカを用いて診断され得る骨の感性的疾患により引き起こされる骨粗鬆症は、上記に記載されるように、ウイルス、細菌、真菌、原生動物および寄生生物を含むがこれらに限定されない骨感染性因子によって引き起こされ得る。本明細書中に開示される骨粗鬆症を処置する方法は、一般的に、骨粗鬆症を引き起こしている感染性因子を処置するために有効な薬物組成物を哺乳動物被験体に投与することを包含する。この薬物組成物は、一般的に、薬物、ならびに必要なに応じて、薬物送達キャリアおよび/または1つ以上の生体適合性賦形剤を含有する。例示的な薬物送達キャリアは、リポソーム、天然もしくは生分解性合成ポリマー(例えば、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリヒドロキシアルカノエート)から形成されたマイクロ粒子またはナノ粒子、天然のかまたは化学的に改変されたデンプン、キトサンおよびタンパク質(例えば、ゼラチン)である。骨粗鬆症のためのマーカが、HSPのようなシャペロン分子である場合、この薬物組成物は、別の分子と共にHSPから形成される1つ以上の複合体を含み得る。

20

30

【0079】

治療的試薬は、本質的に、GMP標準に従って精製および調製される診断試薬と同一であり得る。投与の様式としては、皮下、筋肉内、静脈内、腹腔内、皮内または粘膜が挙げられるが、これらに限定されない。

【0080】

本明細書中に開示される治療的レジメンおよび薬学的組成物は、免疫細胞に影響するサイトカインIFN-、IFN-、IL-2、IL-4、IL-6、TNF、もしくは他のサイトカインを含むが、これらに限定されない、付加的な免疫応答増強薬または生物学的応答修飾因子と共に使用され得る。HSPおよび抗原性分子の複合体は、これらのサイトカインの1つ以上との共に組合わせ治療において投与される。

40

【0081】

薬物溶解度および吸収位置は、治療的薬剤の投与の経路を選択する際に考慮されるべき因子である。1つの実施形態において、HSP-抗原性分子複合体は、任意の所望される投与経路を用いて投与され得る。皮内投与または粘膜投与の利点としては、それぞれ低用量および迅速な吸収の使用が挙げられる。皮下投与または筋肉内投与の利点としては、それぞれいくつかの不溶性懸濁液および油状懸濁液に対する適合性が挙げられる。粘膜経路の投与は、経口、直腸および経鼻の投与を含むがこれらに限定されない。粘膜投与のための調製物は、以下に記載されるような種々の処方物において適切である。

【0082】

この複合体が、水溶性である場合、この複合体は、適切な緩衝液(例えば、リン酸緩衝化

50

生理食塩水または他の生理学的に適合性の溶液（好ましくは滅菌）中で処方され得る。代替的に、得られた複合体が、水性溶媒中に乏しい可溶性を有する場合、この複合体は、非イオン性界面活性剤（例えば、Tween、またはポリエチレングリコール）を用いて処方され得る。従って、化合物およびそれらの生理学的に受容可能な溶媒化合物は、吸入もしくはガス注入（いずれも口もしくは鼻を通じて）による投与、または経口、頬、非経口、もしくは直腸の投与に対して処方され得る。

【0083】

経口投与について、薬学的調製物は、液体の形態（例えば、溶液、シロップもしくは懸濁液）であり得るか、または使用前に水もしくは他の適切なビヒクルを用いる再構成のための薬物製品として与えられ得る。このような液体調製物は、懸濁剤（例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導體または硬化食用脂）；乳化剤（例えば、レシチンまたはアカシア）；非水性ビヒクル（例えば、扁桃油、油性エステル、または分別された植物油）；および防腐剤（例えば、p-ヒドロキシ安息香酸メチルもしくはp-ヒドロキシ安息香酸プロピルまたはソルビン酸）のような薬学的に受容可能な添加物と共に、慣用的な手段によって調製され得る。薬学的組成物は、結合剤（例えば、ゼラチン化前（pregelatinize）のトウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース）；充填剤（例えば、ラクトース、微結晶性セルロースまたはリン酸水素カルシウム）；潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、滑石またはシリカ）；崩壊剤（例えば、ジャガイモデンプンまたはデンプングリコール酸ナトリウム）；または湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウム）のような薬学的に受容可能な賦形剤と共に慣用的な手段によって調製される、例えば、錠剤またはカプセルの形態をとり得る。この錠剤は、当該分野において周知の方法によって被膜され得る。

10

20

【0084】

経口投与のための調製物は、活性化合物の制御された放出を与えるように適切に処方され得る。

【0085】

頬の投与について、組成物は、慣用的な様式で処方される錠剤または舐剤の形態をとり得る。

【0086】

この化合物は、注射による（例えば、ボラス注射または連続注入による）非経口の投与のために処方され得る。注射のための処方物は、添加される防腐剤と共に、単位投薬形態（例えば、アンプル中または多用量容器中）で与えられ得る。この組成物は、油性または水性のビヒクル中で懸濁液、溶液もしくは乳濁液のような形態をとり得、そして懸濁剤、安定剤および/または分散剤のような処方剤（formulatory agent）を含有し得る。代替的に、活性成分は、使用前に、適切なビヒクル（例えば、無菌の発熱物質のない水）を用いる構成のための粉末形態であり得る。

30

【0087】

この化合物はまた、例えば、カカオ脂または他のグリセリドのような慣用的な坐薬基剤（base）を含有する、坐剤または蓄積（retention）浣腸のような直腸の組成物で処方され得る。

40

【0088】

すでに記載される処方物に加えて、この化合物はまた、貯留（depot）調製物として処方され得る。このような長く作用する処方物は、移植（例えば、皮下または筋肉内）によってかまたは筋肉内注射によって投与され得る。従って、例えば、この化合物は、適切な高分子材料もしくは疎水性材料（例えば、受容可能な油中の乳濁液として）またはイオン交換樹脂と共に、あるいはやや可溶性の誘導體として（例えば、やや可溶性の塩として）処方され得る。リポソームおよび乳濁液は、親水性薬物についての送達ビヒクルまたはキャリアの周知の例である。

【0089】

吸入による投与について、使用のための化合物は、慣用的に、適切な推進薬（例えば、ジ

50

クロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適切な気体)の使用と共に、加圧されたパックまたは噴霧器からのエアロゾルスプレー呈示の形態で送達され得る。加圧されたエアロゾルの場合、投薬単位は、定量を送達するバルブを提供することで決定され得る。吸入器または注入器での使用のための、例えば、ゼラチンのカプセルおよび薬包は、化合物の粉末混合物および適切な粉末基剤(例えば、ラクトースまたはデンプン)を含有して処方され得る。

【0090】

(D. 細菌またはHSPにより誘導される骨粗鬆症に対する耐性)

細菌性感染または骨疾患により引き起こされる骨粗鬆症は、免疫原性組成物を哺乳動物被験体に対して投与して免疫することによって処置され得る。1つの実施形態において、免疫原性組成物は、弱毒化されたかまたは改変された感染性因子を含有し得る。別の実施形態において、免疫原性組成物は、HSPを含有し得る。HSPによる骨疾患に対する免疫は、十分に実証される。例えば、ラットアジュバント関節炎(AA)において、耐性は、不完全フロイントアジュバント(IFA)におけるマイコバクテリアのHSP60を用いる免疫により誘導され得た。同様の所見が、マイコバクテリアならびに*Escherichia coli*のHSP70およびHSP10で得られ、そしてマイコバクテリアのHSP60を用いるDNAワクチン接種もまた、防御性であった。Bardwell, J. C. A.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 848-852 (1984); Greenberg, S. G., J. Neuroscience, 5: 1239-45。マイコバクテリアまたはヒトのHSP60のいずれかを発現する組換えワクシニアウイルスを用いる免疫は、疾患の誘導後に投与された場合であっても、AAを抑制することが見出された。マイコバクテリアのHSP60について、経口投与はまた、ラットAAを阻害することが示され;この場合、*Mycobacterium tuberculosis* (Mt)由来のマイコバクテリア抗原を誘発する疾患に対する増殖性の応答を抑制したトランスホーミング増殖因子(TGF-)産生細胞の誘導についての証拠が存在し、従って疾患耐性の潜在的な機構を暗示する(Irby, R. B.ら)。

10

20

【0091】

【表3】

表3. 自己免疫疾患モデルにおけるHSPおよび防御\*

モデル	動物 <sup>a</sup>	HSP	投与経路	効果
アジュバント関節炎	R	MtHSP 60, HSP 70, HSP10	皮下	予防
連鎖球菌性細胞壁関節炎	R	MtHSP 60	皮下	予防
アブリジン関節炎	R	MtHSP 60, HSP 70	皮下	予防
アジュバント関節炎	R	MtHSP 60	ワクシニア	処置
アジュバント関節炎	R	HvzmHSP 60	ワクシニア	処置
アジュバント関節炎	R	MtHSP 60	経口	予防
アジュバント関節炎	R	MtHSP 60	裸のDNA	予防
NOD糖尿病	M	MtHSP 60	皮下	予防
NOD糖尿病	M	HumHSP 60 ペプチド	皮下	予防、処置
プリスタン関節炎	M	MtHSP 60	皮下	予防
コラーゲン関節炎	M	MtHSP 60	皮下	予防
コラーゲン関節炎	R	MtHSP 70	皮下	部分的な予防
エルジニア関節炎	R	Mtsp 60	皮下	予防
EAE	R	MtHSP 60 ペプチド	皮下	予防

10

20

30

HSP 60を用いる予備免疫は、連鎖球菌細胞壁誘導性関節炎 - 8、ならびに重要なことには、非微生物的に誘導されるモデル（例えば、アブリジン（avridine） - 9（合成非免疫原性の類脂質性アミン）またはプリスタン誘導性関節炎、およびコラーゲン誘導性関節炎）のような、他の関節炎モデルにおいて自己免疫に対する耐性を誘導することが見出されている。同様に、ラットにおける実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）および非肥満性糖尿病（NOD）マウスにおける糖尿病の発生は、HSP 60を用いる事前免疫により阻害されることが見出されている。従って、HSPに対する免疫学的曝露は、種々の形態の誘導性または自発性の自己免疫に対する耐性をもたらし得る。

## 【0092】

種々のモデルに基づく報告は、集合的に、HSP 60により誘導される自己免疫に対する耐性は、実際の自己免疫疾患の要因に無関係に作用し、そして抑制効果は、ストレス（炎症）でアップレギュレーションされた自己HSPに対して応答する抗炎症性T細胞の誘導に起因することを示す。炎症した関節における自己HSP 60のアップレギュレーションされた発現は、実験モデルおよびヒトの両方で示されている。HSP 60媒介性の防御が、NOD糖尿病で実証され、そして自己HSPのアップレギュレーションされた発現が、炎症した島で生じ、従って自己HSPに特異的な抗炎症性T細胞がまた、このモデルにおいて、同様の疾患抑制活性を生成し得るようである。明らかに、このような抑制活性は、CD4<sup>+</sup> Tヘルパー1（Th1）媒介性の慢性関節炎症およびインスリン産生T細胞の一次（primarily）CD8<sup>+</sup> T細胞媒介性の破壊と同様に多様な条件で有効で

40

50

ある。従って、自己HSP分子の認識は、自己寛容の樹立または維持に寄与する、重要な免疫学的ストラテジーであり得る。同じことは、感染により引き起こされる炎症の場合にあてはまり、HSPに対するT細胞応答が、それらの起源に無関係に、炎症性応答の制御およびダウンモジュレーション(down modulation)に作用することを論理的に結論し得る。

#### 【0093】

(関節炎患者におけるHSPに対する免疫応答)

HSPに関する免疫反応性は、広範囲にわたって研究されている。例えば、若年性関節リウマチ(JRA)の小児におけるHSP60に対するT細胞の増殖性応答をモニタリングする場合、応答は、疾患の進行性(多関節または全身性)の形態の患者ではなく、疾患の自発的に軽減する少関節(oligoarticular)の形態(OA-JRA)の患者において排他的に存在することが見出された。このような応答は、これらが回復の進行(すなわち、疾患の抑制)と一致することを示唆する変動パターンを示した。これらの患者におけるT細胞の分析は、Th2型応答を示す、HSP60を用いる活性化の際に、インターロイキン4(IL-4)およびTGF- $\beta$ の産生ならびにCD30の過剰発現を示した。さらに、そのようなHSP60感受性患者の滑膜におけるIL-4およびIL-10についてのアップレギュレーションされたmRNAレベルが、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)によって観察された。

10

#### 【0094】

そのようなHSP60反応性T細胞の大部分は、ミコバクテリアHSP60分子に対してだけでなく、特に、ヒトHSP60に対しても応答することが見出された。疾患の自己軽減形態におけるそのようなTh2型細胞の存在によって、ヒトにおけるこれらのT細胞の保護性が示唆される。成人の慢性関節リウマチ(RA)患者でのHSPに対する免疫反応性について種々の研究が報告されている。体液性応答およびT細胞媒介性応答の両方が観察されているが、HSPに対する免疫応答は、RAにおいて一般的かつ優勢な特徴ではないようであり；確かに、その疾患の、進行した形態または進行性の形態では見いだされないようである。しかし、初期の報告において、自己HSP60交差反応性T細胞応答を示すRA患者が、疾患の迅速な軽減過程を有することが明確に記録された。成人RA患者におけるHSPに対するT細胞増殖性応答の最近の研究によって、ヒトHSP60に対する応答は、インビトロでIL-4を添加することで惹起されたことが明らかにされた。この応答が、ミコバクテリアHSP60に対する応答に関して観察されなかったことから、OA-JRAにおける所見と一致して、ヒト(自己)分子の認識によって、調節性の表現型を有するT細胞が、優先的に刺激されるようである。RA患者由来のヒトHSP60特異的T細胞株を、自己末梢血単核細胞に添加した同時培養実験によって、これらのT細胞の調節的性質が確認された。なぜならRA患者由来の単核細胞において、腫瘍壊死因子産出を阻害することが見出されたからである。

20

30

#### 【0095】

HSPは、調節性T細胞応答に対する標的である。HSPは、HSPを重篤な免疫状態にするようである独特の特徴(特に、そのストレス依存性差次的発現)を有する。HSP60の強い構成的発現が、胸腺髄質上皮中に示されたが、自己HSPに対する末梢T細胞応答は、豊富である。従って、自己HSP特異的T細胞は、おそらく、ポジティブに選択され、その後ネガティブな選択から逃れるが、このことは、T細胞のレセプターが自己HSP分子に対して低い親和性を有することを示唆する。末梢において、HSP60のような、HSPの構成的発現のレベルは低く、これらの自己抗原に対する末梢寛容は、他の、より豊富に入手可能な自己タンパク質に対する末梢寛容よりも嚴重でないようである。炎症性ストレスの条件下において、HSP合成は、大雑把にアップレギュレートされ、危険な、または潜在的に有害性の炎症性状態をモニターおよび制御する標的を免疫系に提供する。

40

#### 【0096】

HSPの特徴的な性質のいくつかは、重要である。第1に、進化上の保存のその独特の程

50

度は、免疫細胞による微生物HSPおよび自己HSPの、立証された交差認識に関する分子的基礎を提供する。第2に、微生物HSPは、高度に免疫原性であり、そして健康な個体は、自己HSP反応性T細胞を有する。第3に、任意の細胞型のHSPは、体内のいたるところにおいて、即座のアップレギュレーションによって、ストレスに対して応答する。これらの特徴のいくつかは、天然にある他のタンパク質について個々に当てはまり得るが、この3つの特徴の組合せは、HSPに特有である。

【0097】

(HSP反応性T細胞による調節に導く機構)

多くの可能な機構は、炎症部位での、自己HSP反応性T細胞の、調節性の表現型に寄与し得る。そのような機構は、免疫系における自己HSP反応性T細胞の持続および安全な封じ込めを担う末梢寛容機構に、関連することが提唱される。第1に、末梢組織における、低いレベルの自己HSP発現のせいで、自己HSP特異的T細胞は、自己HSP分子を単に無視するという可能性がある。感染の際または腸粘膜において、微生物HSPに対して曝された後にのみ、保存された微生物HSPエピトープに対して交差特異性を有するこれらのT細胞は、刺激および増幅される。これらの自己免疫炎症において、自己HSP発現は、アップレギュレートされ、局所的に反応するT細胞は、自己HSPエピトープとの低い親和性で相互作用に携わる。このことは、これらの細胞におけるダウンレギュレーション性のIL-4、IL-10、TGF- $\beta$  (Th2)の表現型を導き、バイスタンダー(bystander)調節を引き起こす。

10

【0098】

第2に、末梢中の本職でない(nonprofessional)抗原提示細胞(APC)すなわち非活性化APCによる自己HSPエピトープの低レベル発現、または「寛容化」腸環境中の、保存された微生物HSPのエピトープは、通常の下条件下において、T細胞によって、連続的に認識されることが可能性がある。この認識は、そのようなT細胞を調節性表現型またはアネルギーの方に、向かわせ得る。本職のAPC上に過剰発現されたHSPの認識の後に、炎症部位でのこれらの細胞の次の関与は、その細胞の調節活性を増進し得る。最近、本職の(professional)APCの非存在下で抗原を使用して生成されたアネルギー性T細胞が、アネルギー性細胞によって認識される抗原が、培養物中に存在する場合、APC存在下で他のT細胞の増殖応答に対するバイスタンダー抑制を発揮したことが実証された。HSPの場合、このことは、休止HSP特異的T細胞が、その調節活性を、HSPが一時的に過剰発現される炎症部位へ集束することを意味し得る。感染の間、そのようなアネルギー性レギュレーターは、保存されていない微生物HSPエピトープに対して、および末梢の他のところでは「サイレンシングされない」T細胞によって認識される、他の微生物のエピトープに対して(活発に)反応するT細胞の優勢な頻度によって、過剰に見積もられている。

20

30

【0099】

第3の可能性は、自己HSPエピトープがAPLとして、T細胞によって認識されるか、または「完全なアゴニスト」の微生物HSPエピトープの「部分的アゴニスト」の密接に関連する改変体であることである。APLは、T細胞を完全に活性化しないが、調節性サイトカインの産生のような、特定のエフェクター機能を誘発する能力を有する。これは、HSPの場合に、有益な戦略であり得る。なぜなら、腸の中、または感染の間、完全なアゴニストの微生物HSPエピトープに対して曝すことは、自己HSPまたはAPL指向性(調節性)レパートリーを拡大するからである。自己免疫炎症の間、アップレギュレートされた自己HSPは、HSP反応性細胞において、調節性の表現型を誘導するAPLとして働く。APLは、概して、予測できず、かつ多様な効果を有し得るが、このモデルにおいて、APL様自己HSPが、胸腺のポジティブな選択に関与し、APLとの低親和性の相互作用のみを有するT細胞を生成すると仮定されている事実は、APLのこの特定の型に対する(調節的な)方向性を与え得る。

40

【0100】

(分子シャペロンによる骨再吸収の刺激)

50

細菌の分子シャペロンの1つのクラスであるシャペロニン、骨再吸収の強力な誘導体であることが、最近発見された(Nairら、Calcif Tissue Int 64(3):214-8(1999))。シャペロニンの骨溶解性活性が、このタンパク質のクラスに特有であるかどうか、またはこの活性が、一般的に分子シャペロンの共通の特徴であるかどうかという疑問に取り組むために、多くの細菌分子シャペロンおよび哺乳動物分子シャペロンが、マウス頭蓋冠骨再吸収アッセイで活性に対して試験された。全てのE. coliの分子シャペロン(groEL、groES、およびdnaK)が、活性であることが見出されている。groELの骨溶解性活性が、インドメタシンおよびインターロイキン-1レセプターアンタゴニスト(IL-1ra)天然のアンタゴニストによって阻害されたが、腫瘍壊死因子(TNF)の中和または5-リポキシゲナーゼの阻害による影響を受けなかった。分子量27kDa、47kDa、70kDa、および90kDaの哺乳動物分子シャペロンもまた試験され、47kDaタンパク質の例外を有するが、マウス頭蓋冠アッセイにおいて、全て活性を示した。従って、分子シャペロンは、骨外植片培養物において細胞のプロセスを調整し、石灰化したマトリクスの再吸収が生じる能力を有するようである。

10

## 【0101】

本明細書中に開示されるHSP複合体を使用する骨疾患の処置方法は、養子免疫療法を含む。HSP複合体は、抗原提示細胞(「APC」)および/またはマクロファージ細胞の感作に使用され得る。マクロファージおよび/またはAPCを感作するためにHsp複合体を使用する方法は、Srivastavaへの米国特許第5,985,270号によって記載されている。従って、本明細書中に開示される養子免疫療法は、参考として本明細書中で完全に援用される。APCは、当該分野において公知のこれらの抗原提示細胞から選択され得る。この抗原提示細胞には、マクロファージ、樹状細胞、Bリンパ球およびそれらの組合せが挙げられる(がこれらに限定されず)、好ましくはマクロファージである。HSP複合体感作APCは、HSP抗原分子複合体の投与と、同時または前もしくは後に投与され得る。本明細書中に開示される養子免疫療法は、HSP抗原分子複合体と共に、インビトロでインキュベーションすることによって、抗原提示細胞の活性化を可能にする。好ましくは、インビボでの細胞の使用の前に、インビトロでの骨感染性因子に対する反応性の測定を行う。このインビトロでの上昇に続いて、クローン選択および/またはクローンの拡大を行い、そして患者の投与は、有用な治療的/予防的戦略を構成する。

20

30

## 【0102】

骨粗鬆症を処置および/または予防する方法は、骨粗鬆症の処置および/または予防が所望される個体において、有効量の抗細菌組成物またはHSP複合体を含む組成物をその哺乳動物の被験体に投与することによって、免疫応答を誘発することを含む。HSP複合体は、本質的に、本明細書中に開示される養子免疫療法と組合わせた投与の任意の従来の様式を使用して、抗原分子に非共有結合的に結合するHSPである。投与の様式としては、皮下様式、筋内様式、静脈内様式、腹腔内様式、心房内様式、粘膜様式が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0103】

(治療的投薬量)

薬物用量は、1平方メートルの体表面積あたりのミリグラム数で提供される。なぜなら、体重ではなくこの方法が、特定の代謝機能および排泄機能と良い相関を達成するからである(Shirkey, H.C., 1965, JAMA 193:443)。さらに、体表面積は、成人および小人においての、ならびに以下の表1に示される異なる動物種においての、薬物投薬量に対する共通の特徴として使用され得る(Freireich, E.J.ら、1966, Cancer Chemotherap. Rep. 50:219-244)。

40

## 【0104】

【表4】

表 4. 種々の種に対する代表的な表面積対体重比 (km)<sup>1</sup>

種	体重 (kg)	表面積 (m <sup>2</sup> )	km 因子
マウス	0.02	0.0066	3.0
ラット	0.15	0.025	5.9
サル	3.0	0.24	12
イヌ	8.0	0.40	20
ヒト、小人	20	0.80	25
成人	60	1.6	37

10

例：mg 当量 / m<sup>2</sup> 用量として、任意の所定の種において、mg / kg 用量を表すために、用量に適切な km 因子を掛ける。成人のヒトにおいて、100 mg / kg は、100 mg / kg × 37 kg / m<sup>2</sup> = 3700 mg / m<sup>2</sup> と等価である<sup>1</sup>。Freireichら、1966, Cancer Chemotherap. Rep. 50: 219-244。

## 【0105】

投与について使用された HSP および抗原分子の精製された複合体の投薬量は、好ましくは上記で記載した従来技術法により推定された投薬量よりさらに少ない。例えば、本明細書中で開示された方法の好ましい実施形態に従い、HSP70 抗原性分子複合体および / または gp96 抗原性分子複合体の量は、皮下に投与され、この量は、ヒト患者に対して約 10 μg ~ 約 600 μg の範囲内であり、さらに好ましいヒトの投薬量は、25 g のマウスにおいて使用されたもの（すなわち、10 ~ 100 μg の範囲内）と同じである。本明細書中で開示された方法により提供されるヒト患者における HSP90 ペプチド複合体についての好ましい投薬量は、約 50 ~ 5,000 μg の範囲内であり、さらに好ましい投薬量は 100 μg である。あるいは、特定の実施形態において、HSP70 抗原性分子複合体および gp96 抗原性分子複合体の量は、ヒト患者に対して約 0.1 μg ~ 約 60 μg の範囲内であり、皮内または粘膜に投与される。他の特定の実施形態において、HSP70 抗原性分子複合体および gp96 抗原性分子複合体の治療的に有効な量は、10 μg 未満であり（例えば、0.1 ~ 9 μg の範囲内）；好ましいヒトの投薬量は、25 g のマウスにおいて使用された投薬量（例えば、0.5 ~ 2.0 μg の範囲内）と実質的に等しいかまたはこの投薬量より少ない。ヒト患者に対する皮内投与または粘膜投与のための HSP70 抗原性分子複合体についての好ましい投薬量は、約 5 ~ 500 μg の範囲内である。特定の実施形態において、HSP70 抗原性分子複合体の治療的に有効な量は、50 μg 未満であり（例えば、5 ~ 49 μg の範囲内）；好ましい投薬量は、5 ~ 40 μg の範囲内である。

20

30

## 【0106】

ひとつの実施形態において、この投薬量は一日おきに合計 5 回の注射で投与される。好ましい実施形態において、上記の投薬量は、約 4 週 ~ 6 週の期間に、週 1 回投与され、そして投与の様式は、好ましくは各投与によって変更される。好ましい例において、投与の各部位は、順次変えられる。したがって、例示であって制限されない方法により、1 回目の注射は左腕、2 回目は右腕、3 回目は左腹部、4 回目は右腹部、5 回目は左大腿、6 回目は右大腿などで皮内に投与され得る。同じ部位には、1 回以上の注射の間隔後に繰り返され得る。また、分割注射も与えられ得る。したがって、例えば、半分の用量を、1 つの部位に、そして同日に別の半分を別の部位に投与し得る。

40

## 【0107】

4 ~ 6 週間後、さらなる注射は、好ましくは 1 ヶ月の期間にわたって、2 週間間隔で投与される。その後の注射は、月 1 回投与され得る。その後の注射のペースは、患者の臨床的な進行および免疫療法に対する応答性に依存して変更され得る。あるいは、投与の様式は、順次変えられる（例えば、毎週の投与を、皮内または粘膜に順番に投与する）。

## 【0108】

HSP - 抗原性分子複合体の投与についての上記レジメンは、HSP - 抗原性分子複合体

50

感作 A P C の投与前、投与の間、投与後に生じ得る。例えば、治療の様式は、順次変えられ得る（例えば、H S P - 抗原性分子複合体は、一度に投与され得、そして H S P - 抗原性分子複合体感作 A P C をこの次に投与しうる。あるいは、H S P - 抗原性分子複合体は、H S P - 抗原性分子複合体感作 A P C と同時に投与され得る。好ましくは、A P C および複合体は、互いに 1 週間以内に患者に投与される。

【 0 1 0 9 】

本明細書中で開示された組成物のキットは、抗原分子に非共有結合的に結合された H S P の複合体および薬学的に受容可能なキャリアを含む薬学的組成物を第 1 の容器中に；ならびに抗原提示細胞を第 2 の容器中に含む。H S P - 抗原分子複合体は、上記で記載されるような投与のために薬学的調製物に処方され得る。組成物は、示された骨感染症疾患の処置のために調製され、パッケージされ、そして標識された適合性薬学的キャリアで処方された化合物を含みうる。あるいは、薬学的組成物は、適切な骨感染症疾患の処置のために処方され得る。

10

【 0 1 1 0 】

この組成物は、必要に応じて、活性成分を含む 1 つ以上の単位投薬形態を含み得る 1 パックまたはディスペンサーデバイスで存在し得る。このパックは、例えば金属箔またはプラスチック箔（例えば、プリスターパック）を含み得る。このパックまたはディスペンサーデバイスは、投与についての説明書が添付され得る。

【 0 1 1 1 】

本明細書中で開示された治療レジメンを実行するためのキットもまた、提供される。このようなキットは、薬学的に受容可能な形態における H S P - 抗原性分子複合体（好ましくは精製された）の治療的または予防的な有効量を第 1 のひとつ以上の容器中に；ならびに感作された A P C（好ましくは精製された）を第 2 の容器中に含む。キットのバイアル中の H S P - 抗原性分子複合体は、薬学的に受容可能な溶液（例えば、滅菌した生理食塩水、ブドウ糖溶液、または緩衝液の組み合わせ）、または他の薬学的に受容可能な滅菌した液体の形態であり得る。あるいは、複合体は、凍結乾燥されるかまたは乾燥され得る；この場合、キットは、必要に応じて、注射の目的のための溶液を形成する複合体を再構成するための、薬学的に受容可能な溶液（例えば、生理食塩水、ブドウ糖溶液など）（好ましくは滅菌した）の容器中にさらに含まれる。

20

【 0 1 1 2 】

別の実施形態において、本明細書中で開示されたキットは、複合体を注射するための針またはシリンジ（好ましくは、滅菌した形態でパッケージされる）、および/またはパッケージされたアルコールパッドをさらに含む。必要に応じて、臨床医または患者による、H S P - 抗原性分子複合体の投与のために説明書が含まれ得る。

30

【 0 1 1 3 】

方法および組成物およびこれらの使用は、以下の非限定な例によりよく理解され得る。

【実施例】

【 0 1 1 4 】

（実施例 1）

（実験）

健康な被験体および易感染性の被験体から得られたサンプルの両方を、秤量し、そして 50 m l フアルコンチューブに移した。リン酸緩衝食塩水（P B S）を、骨のサンプルに添加し、0.4 + 0.2 の重量（g）：容積（m l）の比率を得た。サンプルを、攪拌し、そして「T i s s u e T e a r e r」を使用して回転設定 1（4 5 0 0 ~ 8 0 0 0 r p m）で 1 分間、およびさらに 1 分間回転設定 3（1 2 , 0 0 0 ~ 1 7 , 0 0 0 r p m）で部分的に粉碎する。抽出効率を増加するために、骨サンプルを、4 で 9 日間フアルコンチューブ内に貯蔵した。1 m l の各サンプルをエッペンドルフチューブに移す時に、脂質および大きな細片を回避した。任意の細片を、1 5 , 0 0 0 r p m で 1 0 分間サンプルを遠心分離することにより一掃した。

40

【 0 1 1 5 】

50

このサンプルを初めにSDS-PAGE、次いでAgilent 2100 BioanalyzerによるProtein 200 Assayを使用して分析した。良好な結果を生成しないいくつかのサンプル(上部のマーカーを欠失することによりしばしば示される)を、脱塩し、そしてBioanalyzerで再度分析した。サンプルを、YM-3 Centriconチューブを使用して、4200×gで約1.5時間回転することにより脱塩した。Centriconフィルターを、反対にし、そして1000×gで3分間、回転した。このサンプルを、22mMトリスを用いてこれらの元の容積に再構成した。

#### 【0116】

(結果)

SDS-PAGEを、コントロールの健康体の患者由来の骨抽出物について行った。公知のタンパク質のラダーに対するサンプルのスラブゲル電気泳動法は、良好な分離を示唆した。次いで、Protein 200 Assayを、一連の抽出物を用いて、Bioanalyzerと共に使用した。この結果は、易感染性の患者からえたサンプルについて、45~65kDaの範囲内でバンドのより強い存在を示す。塩の存在がアッセイを妨げることは公知であり、しかもこの研究で使用された抽出物は、リン酸緩衝生理食塩水溶液内で生産されていることに起因して、追加実験を、可能性のある塩問題を解消するように設計した。第一に、濾過工程を、サンプルから塩を取り除くために加えた。さらに、抽出を、PBSの代わりに脱イオン水を用いて行った。この変更により改良された分離を生じ、上部マーカーは、いくつかのサンプルにおいて見えるようになった。

#### 【0117】

この研究は、骨抽出におけるタンパク質を同定するための2つの方法を提供した：従来のSDS-PAGEゲル電気泳動およびProtein 200 Chip Assay。後者の技術は、前者よりもさらに感度が高く、そしてこれは低レベルで生産されたタンパク質を検出することにおいて利点があり得る。このデータは、易感染性の骨サンプルと45~65kDa領域における電気泳動のバンドの間に関連があることを示す。

#### 【0118】

(免疫プロット法)

1次元または2次元のSDS-PAGEにより分離されたサンプルは、Immobilon P、ポリビニルジフルオライド膜(Millipore Corp., Bedford, MA.)上に一晚電気プロットされる(Laemmli, 1970)。膜を、0.1% Triton X-100(Sigma Immunochemicals)を含むPBS(PBS-T)を用いて洗浄し、そして2% FCS(SeraLab)を含むPBS-T(ブロッキング緩衝液)を用いてブロッキングする。次いで、ブロッキングした膜を、1時間、試験抗体(ブロッキング緩衝液中)と共にインキュベートし、そしてPBS-Tを用いて洗浄する。PBS-T 2% FCS中で1:1,000での試験抗体(抗マウス)IgG(鎖特異的)(Sigma Immunochemicals)が結合されている。最終洗浄後、プロットを、150mM NaCl(BDI-I)および0.05% 過酸化水素(Sigma Immunochemicals)を含む、pH7.6の50mMトリス(Sigma Immunochemicals)中で、1mg/mlの3,3プライム-ジアミノベンジジン テトラヒドロクロライド(Sigma Immunochemicals)溶液を用いて発色する。各反応は、蒸留水を用いて完全にリンスすることにより、終結される。

#### 【0119】

(タンパク質精製)

粗製BSを、Q-セファローズ陰イオン交換カラム(50cm×1.6cm)により4で画分する。このカラムを、20mMトリス塩酸、pH8.5(緩衝液A)で平衡化し、そしてBS(一般的に100400mg)を、同じ緩衝液でロードする。このカラムを、500mlの緩衝液Aを用いて洗浄し、次いで緩衝液A中で、0~1M NaClの1,000ml線形勾配を用いて溶出する。10mlの画分を、回収し、そして280nmに

10

20

30

40

50

おける吸光度を、モニタリングする。溶骨性シャペロンタンパク質の局在を、活性アッセイ、SDS-PAGE、およびウェスタンブロット分析の組み合わせにより決定する。溶骨性活性を含む画分を、脱イオン水に対して透析し、塩を取り除き、そして凍結乾燥する。次いで、最も高い比活性かつSDS-PAGEによる最も少ない数のタンパク質バンドを有する画分を、第2の陰イオン交換カラムにより室温で、さらに画分する。

#### 【0120】

画分の純度は、再び、SDS-PAGEによって視覚的に評価され、もっともきれいな画分100pgを、50mMのTris緩衝液pH7.6(10mM MgCl<sub>2</sub>を含む; 緩衝液C)に対して透析した。このサンプルを、5mlのATP-Sepharose (Sigma Immunochemicals)カラムに対して流す。このカラムを、10カラム容量の緩衝液Cで洗い、そして結合したタンパク質を5カラム容量の緩衝液C中の5mMのATP(Sigma Immunochemicals)で溶出する。タンパク質は、SDS-PAGEによって位置決定され、そして銀染色キット(Sigma Immunochemicals)を用いて視覚化される。ゲルろ過を用いて、ATPアフィニティークロマトグラフィーによって単離された骨分解性シャペロンタンパク質の分子量範囲を決定する。このことは、0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH6.7中でBio-Sil TSK250(Bio Rad Laboratories)カラムにおいて精製されたタンパク質を流し、そして205/280nmで吸光度を測定することによって行う。

10

#### 【0121】

(特定の目的#3: データ分析および臨床結果変数との相関付け)  
実験上の知見および臨床上の骨密度ならびにQ-CT測定値を、数量コードシステムを用いて、コンピュータの標準化されたリレーショナルデータベースを用いて文書化する。コンピュータプログラムSPSS/PC+9.0(SPSS Inc., 44 N. Michigan Ave., Chicago, IL 60611)をコンパイルされたデータの統計学的分析のために用いる。生データの記述統計学を、頻度表の使用によって行う。正規分布を、正規性への適合および正規確率プロットを入手することによって決定する。ここで、ランク付けされた観察された残差(平均からの偏差)をy軸上の正規分布の標準化された値に対してx軸上にプロットする。正規分布は、観察された残差が直線上に載るかどうかが示す。平均同士の間のある有意な差異を、従属および独立のサンプルについてのt検定ならびに分散の一方方向ANOVAの使用によって評価した。他変数を用いたANOVAからの統計学的に有意なF検定の場合、寄与手段を、不均一なサンプルサイズについてのTukey HSD検定を用いた事後(post-hoc)比較によって差別化する。この後者の2つの検定の使用によって、患者の年齢および性別ならびに随伴する医学的状態に従って種々のシャペロン分子の生起およびオステオペニア骨サンプルの存在を決定することができる。本質的には、この検定によって、本発明者らはオステオペニアに相関付けられる優勢なシャペロン分子を同定することができる。

20

30

#### 【0122】

クロス表生成法を用いて、オステオペニア、年齢、性別、他の寄与因子およびシャペロン分子の存在の間の関係を、多方向頻度表を精製することによって測定する。これらの変数の各々の可能な組み合わせについて、これらの表は、セル頻度(すなわち、この特定の組み合わせを有した患者集団における症例数)を生じる。さらに、クロス表生成法によって、検定の信頼性(換言すれば、これらの関係の統計学的な有意性)を評価することができる。従って、オステオペニアの存在、年齢、性別、他の寄与因子(たとえば、医療状態)は、カテゴリーの変数である。多方向頻度表の変数の間の多数の同時の関係および相互作用を、対数線形方程式に基づいて試験する。これによって、関与する変数が無関係であった場合に予測されるセル頻度の計算が可能になる。これは、相互作用比例適合手順を用いて行う。従って、予測される頻度から観察される有意な偏差は、特定のシャペロン分子とオステオペニアとの間の統計学的に有意な関係を反映する。予測される頻度から観察される有意な偏差検定は、ピアソン二乗検定によって行う。残差頻度は、観察された

40

50

頻度から予測された頻度を減じることによって算出する。関係が存在しない場合、すべての残差頻度は、類似する程度の正および負の値からなると予測され、そして頻度表のセルにわたり均一に分布していることが予測される。従って、残差のプロットは、シャペロン分子の存在とオステオペニアとの間の相関を評価する別の手段として使用される。この研究において用いたすべての統計学的検定において、 $p < 0.05$ の有意レベルを選択する。

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
25 July 2002 (25.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/057795 A2

- (51) International Patent Classification: G01N 33/68
- (21) International Application Number: PCT/US02/01566
- (22) International Filing Date: 17 January 2002 (17.01.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
60/263,100 19 January 2001 (19.01.2001) US  
60/304,887 12 July 2001 (12.07.2001) US
- (71) Applicant: CAMBRIDGE SCIENTIFIC, INC.  
[US/US]; 180 Fawcett Street, Cambridge, MA 02138 (US).
- (72) Inventors: LEWANDROWSKI, Kai-Uwe; 423 Washington Street #6, Brookline, MA 02146 (US); TRANTOLO, Debra, J.; 28 Radford Road, Princeton, MA 01541 (US).
- (74) Agents: PABST, Patrea, L. et al.; Holland & Knight LLP, Suite 2000, One Atlantic Center, 1201 West Peachtree Street, Atlanta, GA 30309-3400 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LI, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, HT, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- Published:**  
without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: METHODS OF DIAGNOSIS AND TREATMENT OF OSTEOPOROSIS

**(57) Abstract:** A method of detecting osteoporosis in a mammalian is disclosed herein which includes: a) obtaining a sample of a bone related tissue or cells; and b) measuring the concentration of at least a marker which is either bacteria, bacteria produced factors, or HSPs. The method may further include comparing the concentration with concentrations from the same individual over a period of time or against a standard concentration. The marker may be a bacteria, a chaperone molecule, or a bacteria produced. The method may include a first assay and a second assay over a period for example of at least about 12 hours. The concentration of HSP can be measured using an immunoassay. The assay may use a nucleotide molecule encoding HSP. Also provided herein is a method of treating or preventing osteoporosis caused by a bone disease which includes administering to a mammalian subject a therapeutically effective amount of a formulation which is either an HSP antigenic formulation or a bacterial antigenic formulation. The osteoporosis can be caused by a bone disease induced by bone infectious agents such as viruses, bacteria, fungi, protozoa and parasites. The HSP can be further complexed with an antigenic material or formulated in combination with an adjuvant. The antigenic material can be a peptide or a protein having an antigenic determinant of a virus, bacteria, fungi, protozoa or parasite that induces a bone disease. The antigenic material includes an antigenic determinant of a virus. Further, the methods disclosed herein can be practiced using a kit formed according to the methods disclosed herein.

WO 02/057795 A2

**METHODS OF DIAGNOSIS AND TREATMENT OF  
OSTEOPOROSIS**

**Field of the Invention**

5       The present application generally relates to methods for  
diagnosing bone loss. More specifically, the present application  
relates to identifying humoral markers for bone loss on the basis of  
bacterial or mammalian molecular chaperones.

**Background of the Invention**

10       Osteoporosis is a systemic disorder characterized by  
decreased bone mass and microarchitectural deterioration of bone  
tissue leading to bone fragility and increased susceptibility to  
fractures of hip, spine, and wrist. Osteopenia has been defined as  
the appearance of decreased bone mineral content on radiography,  
15       but the term more appropriately refers to a phase in the  
continuum from decreased bone mass to fractures and infirmity.  
By the time the diagnosis of osteopenia is made radiographically,  
significant and irreversible bone loss has already occurred. The  
most common cause of osteopenia is osteoporosis; other causes  
20       include osteomalacia and the bone disease of  
hyperparathyroidism.

      In the United States, roughly 1 in 4 women over the age  
of 50 has osteoporosis. The overall prevalence of osteoporotic  
fractures rises dramatically in menopausal women. Bone loss is  
25       more abrupt for the first decade after the onset of menopause,  
followed by more gradual loss thereafter (Nordin, et al., "How  
can we prevent osteoporosis?" in Osteoporosis, Christiansen, et  
al., (eds). Copenhagen, Norhaven A/S, 1204-1210 (1987)). With  
increasing age, fracture incidence increases. The frequency of  
30       hip fractures increases exponentially with age, particularly  
after age 70, and is more commonly seen in white women.

WO 02/057795

PCT/US02/01566

About 32% of women who live to age 80 have hip fractures (Gallagher, et al., Clin. Orthop. 150:163-171 (1980); Melton, et al., Am. J. Epidemiol. 129:1000-1011 (1989)). A woman's risk of a hip fracture equals the combined risk of breast, uterine, and ovarian cancer, and the risk of dying of hip fracture is equal to breast cancer mortality (Elffors, Aging (Milano) 10:191-204 (1998)). The prevalence of vertebral fractures is 42% in women of advanced age and/or who have decreased bone mass (Melton et al., 1989). In women, a rapid rise of vertebral fractures, which is initially associated with the onset of menopause, is followed by an increase in the frequency of wrist and hip fractures due to age-related bone loss.

Osteoporosis develops less often in men than women because bone loss starts later and progresses more slowly in men, and there is no period of rapid hormonal change and accompanying rapid bone loss. Differences in bone geometry and remodeling also contribute to the lower rate of fractures in men. However, in the past few years, the problem of osteoporosis in men has become recognized as an important public health issue, particularly in light of estimates that the number of men older than 70 will double between 1993 and 2050 according to the US National Osteoporosis Foundation.

Roughly 1 in 8 men over the age of 50 years has osteoporosis. Presently, more than 2 million men in the United States are affected by osteoporosis, and another 3 million are at risk for this disease. Each year, men have one third of all hip fractures that occur, and one third of these men will not survive more than a year. The frequency of hip fracture increases exponentially with age, particularly after age 70, and 17% of men who live to age 80 have hip fractures (Gallagher et al., 1980; Melton et al., 1989). In addition to hip fracture, men also have

WO 02/057795

PCT/US02/01566

painful and debilitating fractures of the spine, wrist, and other bones due to osteoporosis.

While the damages caused by osteoporosis are severe and are sometimes fatal, no exact clinical chemical tests on blood or urine are abnormal in osteoporosis. Currently used techniques are generally biochemical markers, radiography, and measurement of bone mineral density (BMD). The use of these techniques is limited either by cost or by accuracy reasons.

It is an object of the present invention to provide an effective means for evaluation of environmental and bone infectious stresses on the skeletal system.

It is a further object of the present invention to provide a means for treating and/or preventing infectious disorders having a negative impact on the skeletal system.

#### Summary of the Invention

A method of detecting osteoporosis in a mammal has been developed. The method includes the steps of a) obtaining a sample of a bone related tissue or cells; and b) measuring the concentration of at least a marker which is one of bacteria, bacteria produced factors, or heat shock proteins (HSPs). The method may further include comparing the concentration of a first assay with concentrations of a second or more assays from the same individual over a period of time or against a standard concentration. The marker can an HSP such as HSP 70, HSP 60, HSP 90, gp 96, cpn10, cpn20, ubiquitin or cpn 30. The marker can also be a bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Porphyromonas gingivallis*, *Eikenella corrodens*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitis*, *Mycobacterial tuberculosis*, *Haemophilus influenzae*, *Pasteurella multocida*, *B.*

WO 02/057795

PCT/US02/01566

*bronchiseptica*, or *Fusobacterium nucleatum*. The marker may be a bacteria produced factor such as endotoxin-LPS, gapstatin, and dermonecrotic toxin (DNT). The time between assays may extend over a period, for example, of at least about 12 hours. In one embodiment, the concentration of HSP is measured using an immunoassay. In another embodiment, the concentration of HSP is measured using an assay for a nucleotide molecule encoding HSP.

A method of treating or preventing osteoporosis has been developed. A therapeutically effective amount of a formulation which is either an HSP antigenic formulation or a bacterial antigenic formulation. In one embodiment, the osteoporosis is caused by a bone disease induced by bone infectious agents such as viruses, bacteria, fungi, protozoa or parasites. The HSP can be HSP 60, HSP 70, HSP 90, gp 96, cpn 10, cpn 20, ubiquitin, or cpn 30, or combinations thereof. The HSP can be further complexed with an antigenic material or formulated in combination with an adjuvant. The antigenic material can be a peptide or a protein having an antigenic determinant of a virus, bacteria, fungi, protozoa or parasite that induces a bone disease.

The methods disclosed herein can be practiced using a kit formed according to the methods disclosed herein.

#### Detailed Description of the Invention

##### I. Definitions

The term molecular chaperone describes a number of unrelated proteins that are involved in the assembly and reassembly of proteins and in the transmembrane transport of proteins, for example, from the cytoplasm into the mitochondria. Some of these proteins are referred to as heat shock proteins ("HSPs") or stress proteins. Representative HSPs include HSP 70, HSP 70, gp 96, and HSP 100. These HSPs accomplish different

WO 02/057795

PCT/US02/01566

kinds of chaperonin functions. For example, HSP 70, located in the cell cytoplasm, nucleus, mitochondria, or endoplasmic reticulum, (Lindquist, S., et al., 1988, *Ann. Rev. Genetics* 22:631-677) is involved in the presentation of antigens to the cells of the immune system, and is also involved in the transfer, folding and assembly of proteins in normal cells. HSP 70 located in the cytosol is involved in similar activities. GP 96 present in the endoplasmic reticulum is also involved in antigen presentation (Srivastava, P. K., et al., 1991, *Curr. Topics in Microbiology & Immun.* 167:109-123).

HSPs are essential to both prokaryotic and eukaryotic cells for chaperone function during the intracellular (un)folding, assembly and translocation of proteins. By definition, HSP expression is elevated in cells undergoing stress, such as those in damaged or inflamed tissue. Conditions as diverse as a rise in temperature, hypoxia, irradiation, infection and exposure to toxic chemicals can all result in increased HSP expression.

Upon exposure to a stressor, three distinct events result in a rapid change in metabolic activities within the cell: (1) there is increased transcription of HSP mRNAs which are then preferentially translocated to a cytoplasm, (2) the transcription of most other mRNAs is suppressed; and (3) the normal translational activities of the ribosomes are disrupted so that HSPs are preferentially translated. The overall result of these events is that the cell rapidly begins synthesizing HSPs and represses the synthesis of other peptides. No new peptides or RNA synthesis is necessary to activate the translation of the heat shock peptide genes, indicating that preexisting factors, such as viral or bacterial agents, may be involved. Cell type, state of cell differentiation, type of stressor, and the duration and intensity of stress can affect the quantity and quality of a particular type of HSP.

WO 02/057795

PCT/US02/01566

Within the HSP families, individual members have a unique degree of sequence homology. For HSP 60, the human protein has 50% sequence identity with the mycobacterial homologue, with a further 20% conservative substitutions, causing several areas in the human molecule to be fully identical to the bacterial protein. Despite their high degree of conservation, HSPs are very immunogenic. The potential of HSPs for inducing autoimmunity has been broadly investigated. However, induction of autoimmunity was not reported in most experimental systems. Rather, in many models of experimental autoimmune diseases, development of resistance to subsequent induction of a disease is a common feature.

In recent years, it has become clear that HSPs are constitutive molecules. A number of HSPs are well known proteins, including ubiquitin, immunosuppressant-binding proteins and P-glycoprotein. HSPs have been reported to induce cell and tissue behavior consonant with their involvement in inflammation. HSP 70 and *E. coli* groEL induce pores in membranes and thus may have similar actions to a wide variety of lysins and haemolysins produced by bacteria. There are now a number of reports that HSPs from various bacteria can induce human or murine cells to release a range of pro-inflammatory cytokines.

Efforts have been directed to develop ways to make use of HSPs. For example, methods of evaluating chronic exposure of a mammal to sublethal levels of pollutants by measuring HSP concentrations have been reported. See, for example, U.S. Patent No. 5,780,246; U.S. Patent No. 5,232,833, both to Sanders, et al. Compositions and methods of vaccinating with HSPs to prevent diseases such as cancers have been developed. See, for example,

WO 02/057795

PCT/US02/01566

U.S. Patent Nos. 5,830,464; 5,948,646; and 6,030,618, all to Srivastava.

An "antigenic molecule" as used herein refers to peptides with which the HSPs are endogenously associated *in vivo* (e.g., in infected cells) as well as exogenous antigens/immunogens (i.e., with which the HSPs are not complexed *in vivo*) or antigenic/immunogenic fragments and derivatives thereof.

"Specifically hybridize" as used herein refers to nucleotide molecules which hybridize with the mRNA transcribed from the gene for the HSP at a stringency condition wherein selected number of base-pair mismatches results in nonhybridization. One skilled in the art will recognize the stringency conditions for various hybridization assay formulas depend upon the constellation of temperature, ionic concentration and pH. Generally, for optimal RNA:RNA hybridization, the temperature is inversely related to the salt concentration; the pH should be held in the range of from about 6.9 to about 7.4, e.g., for 15 nucleotide sequences (15-mer). For RNA:DNA hybridizations, similar assay conditions apply but lower temperatures (accompanied by higher salt concentrations) are generally employed than for RNA:RNA hybridizations.

SDS-PAGE is a common tool for protein analysis. Sodium dodecyl sulfate is a detergent that coats proteins with negative charges at a constant charge-to-mass ratio such that in an electric field the proteins would travel at the same velocity in the absence of any separation matrix. However, when the charged proteins are loaded onto a porous polyacrylamide gel and an electric field is applied, the smaller proteins are able to travel faster through the gel to the anode (+) than larger proteins, which encounter more resistance traveling through the gel. There are different types of stains that can be used to develop the gel, such as Coomassie blue

WO 02/057795

PCT/US02/01566

and Silver stain. In many cases SDS-PAGE is a qualitative tool, in which the rough quantities and sizes of proteins in a sample can be gauged by direct comparison of the band in question to bands of a molecular weight ladder.

5 The Agilent Bioanalyzer™ is a micro-total analysis system (p-TAS) that uses miniaturized chemical chips with microchannel networks fabricated on glass, quartz, or plastic chips. A typical channel is roughly 50 microns wide and 10 microns deep. The Agilent Bioanalyzer™ Protein 200 Assay was developed to more  
10 efficiently characterize proteins by size and concentration in a sample. This microfluidic system functions somewhat analogously to SDS-PAGE, but confers many benefits over the macro-scale analytical method. Some advantages of the Protein 200 Assay for the Bioanalyzer™ include small sample volumes, higher  
15 throughputs of data/sample, reduced resource consumption and waste production, and automation of multi-step processes.

In the Protein 200 Assay, proteins are denatured with B-mercaptoethanol and fluorescence labeled. In addition, as in SDS-PAGE, the proteins are coated with SDS at a constant charge-to-  
20 mass ratio. Strategically located electrodes create electrokinetic forces capable of moving fluids and separating different sized proteins. The molecules are separated by the amount of charge on the protein. Larger, more negatively charged proteins travel toward the cathode. As labeled protein molecules migrate past a  
25 certain point in the channel, their fluorescence is detected by a laser beam. The sensitivity of the Protein 200 Assay is known to be affected by salt concentrations in the sample buffer because at higher concentrations smaller amounts of protein are injected into the separation channel.

30 **II. Diagnostic Techniques for Osteoporosis**

WO 02/057795

PCT/US02/01566

No exact clinical chemical tests on blood or urine are abnormal in osteoporosis, but biochemical markers, radiography, and measurement of bone mineral density (BMD) are helpful in diagnosing osteoporosis. Bone mass density testing is used to  
5 diagnose osteoporosis, and x-ray films are used to rule out other bone or arthritic conditions. Thin bones may be detected on an x-ray film, but bone density testing is more accurate.

#### A. Bone Densitometry

Considerable progress in the development of methods for  
10 assessing skeletal bone mass now makes it possible to detect osteoporosis noninvasively and early. Generally, osteoporosis may be detected after fractures that occur with minimal trauma, as an incidental finding on an x-ray film, or by measurement of BMD by bone densitometry, which is also known as bone density scans.  
15 Bone density scans are considered by many as an instant snapshot of bone status. These scans, known collectively as BMD tests, are used to detect the amounts of bone mass in the spine, hip, wrist, hand, heel, or the entire body and to evaluate its density. Some studies have indicated that information regarding bone-mineral  
20 content at any anatomic site is equally valuable for predicting the risk of fracture in general (Black, et al., J. Bone Miner Res. 7:633-638 (1992); Melton, et al., J. Bone Miner Res, 8, 1227-1233 (1993)), but other studies have suggested that measurements obtained at a particular site of interest may provide the most important  
25 information for the prediction of fracture at that site (Cummings, et al., Lancet 341:72-75 (1993)). Bone mineral density tests are the most sensitive and specific tests for osteopenia are essential in predicting the risk of fracture.

Several techniques are available to measure BMD non-  
30 invasively. All of today's x-ray based measurement systems are precise and deliver extremely low, effective radiation doses. The

WO 02/057795

PCT/US02/01566

main advantages of an x-ray system over a radionuclide system are safe, shortened examination time, greater accuracy and precision limited to high resolution, and removal of errors due to source decay correction. The variety of bone scan techniques that are widely used today include single x-ray absorptiometry, dual energy x-ray absorptiometry (DEXA), quantitative computed tomography, peripheral quantitative computed tomography, radiographic absorptiometry, quantitative ultrasound, simple photon absorptiometry, and dual photon absorptiometry. Their development has been driven by the need to overcome the inherent shortcomings of plain radiography for this purpose. Although single and dual photon absorptiometry are still available, these older techniques are rapidly being replaced by single x-ray absorptiometry and DEXA, their modern counterparts.

Of the several techniques available, DEXA has become the most widely used technique for measuring BMD because of its low radiation, availability, capacity to evaluate multiple sites, and ease of use (Genant, et al, Am J. Med. 91(suppl5B):49S-53S (1991)). Dual energy x-ray absorptiometry can measure soft-tissue composition (lean and fat mass) and bone mass or bone density at the lumbar spine, hip, and forearm, as well as total-body BMD, with greater precision and faster scanning times than the dual-photon absorptiometry (Consensus Development Center: "Prophylaxis and treatment of osteoporosis" in Am J Med. 90:107-101(1991)). As a screening procedure, DEXA is limited by its relatively high equipment cost. The accuracy of this technique has not been fully documented for measuring of all skeletal sites.

A standard bone mineral report consists of measurements expressed as bone mineral content (the amount of hydroxyapatite, in grams) and converted to area density (grams per square centimeter) within the region of interest. In addition, normal

WO 02/057795

PCT/US02/01566

values are provided according to sex and race and are plotted according to age. Demographic data, including the clinical indications and the patient's age, sex, race, weight, and height, are also considered. To interpret a standard bone mineral report, a region of interest must be selected. To compare individuals, the sites of measurement should be constant because the bone mineral content varies between different bones and between different regions of the same bone. The results are compared with normative values, and standard curves of normative values are provided for individuals of both sexes and several races. Comparison of measured values with mean values for normal young or age-matched individuals permits an assessment of the risk of fracture.

The World Health Organization recently attempted to clarify definitions and to assist clinicians in their interpretation of bone densitometry results. According to that report, a normal value for bone mineral content is within 1 standard deviation (SD) of the mean value for young adults of the same age and sex (that is, the t score is more than -1). Osteopenia is considered to be present when the value for bone mineral content is more than 1 SD but not more than 2.5 SDS below the mean for young adults (that is, the t score is less than -1 and more than -2.5). Osteoporosis is considered to be present when the value is more than 2.5 SDS below the mean bone mineral content for young adults (that is, the t score is less than -2.5) (Kanis et al., 1994). Severe osteoporosis is considered to be present when the value for bone mineral content is more than 2.5 SDS below the mean for young adults and there is at least one so-called fragility fracture (assumed to be associated with osteoporosis because it occurred as a result of slight trauma). Generally, the t score is used for the diagnosis of low bone mass or osteoporosis.

WO 02/057795

PCT/US02/01566

Physicians should initiate therapy to reduce the patient's risk of fracture on the basis of the presence or absence of risk factors for osteoporosis. Therapy should be initiated to reduce the risk of fracture in women who have a bone mineral density t score of less than -2 in the absence of risk factors and in those who have a t score of less than -1.5 if other risk factors are present.

#### **B. Biochemical Markers of Bone Turnover**

A combination of markers of bone turnover can be used in a variety of ways in the clinical investigation of osteoporosis. Growing evidence suggests that the rate of postmenopausal bone loss may be determined by biochemical markers, such that a single biochemical assessment shortly after menopause, in conjunction with a bone mass measurement, may be used to identify women with high bone turnover and who are therefore likely to sustain a high rate of bone loss. In osteoporotic patients, markers may be used to identify the subgroup of patients with high bone turnover who may benefit from a different therapeutic strategy from that used in patients with low bone turnover. Finally, markers can be used in the clinical investigation of new therapeutic agents to monitor their effect and mechanism of action (Consensus Development Center 1991).

Osteocalcin is a bone-specific protein secreted by osteoblasts, the bone-forming cells, and its serum level is a sensitive marker of the rate of bone formation. Other markers of bone formation include serum levels of total and bone-specific alkaline phosphatase and serum type 1 collagen propeptide. Pyridinoline and deoxypyridinoline are collagen cross-links that are released into the blood and urine during the degeneration of type 1 collagen in the process of osteoclastic bone resorption (Delmes "Clinical use of biochemical markers of bone remodeling in osteoporosis," in Osteoporosis Christiansen, et al., (eds). Copenhagen, Osteopress,

WO 02/057795

PCT/US02/01566

pp 450-458 1990). Urinary excretion of pyridinoline such as hydroxylysylpyridinoline and lysylpyridinoline has been shown to be a more sensitive and specific marker of bone resorption than conventional markers such as urinary hydroxyproline (Uebelhart, et al., Bone Mineral, 8, 87-96 (1990)). Plasma tartrate-resistant acid phosphatase is another marker of bone resorption (Delmes, (1990)).

### C. Radiographic Findings

A reduction in bone calcium content must exceed 30% to be observed with certainty on conventional radiographs.

Radiographically evident thinning of the cortices of long bones or vertebral bodies may be noted. Plain radiographs are generally inaccurate in the diagnosis of osteoporosis as the demonstration of bone density is strongly dependent on radiographic technique.

### III. Identification of Bacterial or Viral Markers for Osteoporosis

#### A. Bacterial Markers for Osteoporosis

##### *Bacterial Infections and Bone Pathology*

There is a range of bacteria involved in bone pathology. The key question to be addressed in these diseases is how the bacteria stimulate pathology and how they get into bone in the first place. In infections of the appendicular and axial skeleton, the answer may lie in bacteria expressing receptors for bone matrix components. For example, *Staphylococcus aureus* contains receptors for fibronectin (Raja, et al., Infect. Immun., 58:2593-2598 (1990); laminin (Mota, et al., Infect. Immun., 56:1580-1584 (1988)), collagen (Patti, et al., Infect. Immun. 62:152-161 (1994)), and bone sialoglycoprotein (Ryden, et al., Eur. J Biochem. 184:331-336 (1989)) that presumably serve to trap blood-borne organisms in bone. As bacteria do not invade the periodontal tissues, the accepted paradigm is that local pathology is due to the release of

WO 02/057795

PCT/US02/01566

soluble bacterial virulence factors (Wilson, Sci. Prog. 78:19-34 (1995)) and that this could be a general mechanism in all bone infections.

Table 1. Bacteria Involved in Pathological Bone Remodeling

Disease	Organism
Periodontitis (Schluger et al., 1990)	<i>Actinobacillus</i> <i>actinomycetemcomitans</i> <i>Porphyromonas</i> <i>gingivallis</i> <i>Eikenella corrodens</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Prevotella inter-media</i> <i>Campylobacter rectus.</i>
Osteomyelitis (Jaffe, 1972; Schmid, 1993)	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i> <i>Salmonella spp.</i> <i>Escherichia coli, etc.</i>
Bacterial arthritis (Ho, 1993; Livneh et al., 1983)	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Neisseria gonorrhoea</i> <i>Neisseria meningitis</i> <i>Mycobacterial tuberculosis</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Pasteurella multocida, etc.</i>
Infected metal implants (Ross, 1991)	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i>

5

Three possibilities exist of how bacteria cause pathological bone loss: (a) bacteria directly destroy the noncellular components of bone by liberating acid and proteases, (b) bacteria promote cellular processes that stimulate the degradation of bone, or (c) bacteria inhibit the synthesis of bone matrix. Mechanisms (b) and (c) may be either a direct effect of components released by bacteria or a consequence of the induction of host factors, for example, cytokines or prostaglandins that then act on bone cells. Mechanisms implicated in the pathology of dental caries are likely to be only a minor mechanism in skeletal bone pathology.

15

WO 02/057795

PCT/US02/01566

*The Capacity of Bacteria and their Products to Inhibit Bone Formation*

In addition to stimulating *in vitro* bone resorption, endotoxin-LPS has also been reported to inhibit bone collagen and noncollagenous protein synthesis (Millar, et al., Infect. Immun., 57:302-306 (1986)). A number of reports have suggested that extracts of dental plaque or of cultured periodontopathic bacteria can inhibit bone matrix synthesis (Hopps, et al., Periodontal disease: pathogens and host immune response. Hamada, et al., eds., (Quintessence Publishing Co., Ltd., Tokyo) pp. 307-320 (1991); Multanen, et al., J. Clin. Periodontol. 1:729-739 (1985)). Surface-associated proteins from oral bacteria are also able to inhibit bone matrix synthesis (Meghji, et al., J. Periodontol. 63:736-742 (1992)).

Certain periodontopathic bacteria produce factors that have general antiproliferative activity (Helgeland and Nordby, 1993; Kamen 1981; Kataoka et al., 1993; Larjava et al., 1987; Meghji, et al., Arch. Oral Biol., 37:637-644 (1992); Saito et al., 1993; Shenker et al., 1991). These could possibly play a role in inhibiting osteoblast proliferation and thus impair bone remodeling. These various biological activities have not been purified or characterized. An antiproliferative protein from *A. actinomycetemcomitans* that is most active against human osteoblast-like cell lines suggests some specificity for bone. This 8-kDa protein (White et al., 1995), "termed gapstatin," does not inhibit DNA synthesis directly but inhibits cell cycle progression by blocking cells in the G2 phase of the cell cycle. Kinetic studies of synchronized cell populations reveal that gapstatin acts only on cells in S phase. This molecule may act by inhibiting the synthesis of cyclin B1, a protein required to ensure that cells make the transition from G2 to mitosis. As bone remodeling and matrix

WO 02/057795

PCT/US02/01566

synthesis require the continued production of osteoblasts and osteoclasts, the action of gapstatin could inhibit new bone matrix formation. Such an effect would be particularly damaging if it were to occur in concert with molecules stimulating bone breakdown, such as cpn60. It is possible that gapstatin could inhibit the formation of osteoclasts.

*Bordetella bronchiseptica* produces a 145 kDa dermonecrotic toxin (DNT) that is responsible for turbinate atrophy in swine atrophic rhinitis (Ackerman et al., 1991; Dunan et al., 1966). Histologically, the lesions induced by *B. bronchiseptica* suggest impaired osteoblastic function (Silveira et al., 1982). There is one report of the effect of DNT on cultured bone, and its effects were not particularly striking (Kiman et al., 1987). However, when added to the murine osteoblastic cell line MC3T3-E1, it caused changes in cellular architecture and potently inhibited (50% inhibitory concentration, 100 pg/ml) the osteoblasts' capacity to produce both alkaline phosphatase and collagen (Horiguchi et al., 1991), an action that could seriously affect bone remodeling if replicated *in vivo*. It has recently been reported that DNT is a potent stimulator of tritiated thymidine incorporation into MC3T3-E1 cells with a 50% effective dose of approximately 1 ng/ml. In spite of this incorporation of label, the numbers of MC3T3-E1 cells in culture did not increase. The major consequence of exposure to DNT was the appearance of multinucleated osteoblasts. Another cell cycle-inhibitory protein has recently been isolated from the periodontopathic bacterium *Fusobacterium nucleatum*. This protein blocks human T lymphocytes in the mid-G<sub>1</sub> phase of the cell cycle (Shenke and Datar, 1995). It is expected to stimulate bone resorption.

It is now becoming clear that bacteria produce a range of proteins that are able to interfere with the mammalian cell cycle.

WO 02/057795

PCT/US02/01566

One can suggest that the activity of these proteins represents a new bacterial virulence mechanism. The importance of the proliferation and maturation of bone cell lineages in bone remodeling is presumably the reason that the bacterial cell cycle modulatory proteins discovered to date induce bone pathology or come predominantly from bacteria implicated in diseases involving bone matrix loss.

#### B. Molecular Chaperone Markers for Osteoporosis

Molecular chaperones, also known as heat shock proteins (hsp), are essential to prokaryotic and eukaryotic cellular organisms through their chaperone function during the intracellular (un)folding, assembly and translocation of proteins. Four main families of structurally related hsps are distinguished based on their molecular weights: Hsp90, Hsp70, Hsp60 and small Hsps. By definition, Hsp expression is elevated in cells undergoing stress, such as those in damaged or inflamed tissue. Conditions as diverse as a rise in temperature, hypoxia, irradiation, infection and exposure to toxic chemicals can all result in increased Hsp expression. Within the Hsp families, individual members have a unique degree of sequence homology. For Hsp60, the human protein has 50% sequence identity with the mycobacterial homologue, with a further 20% conservative substitutions, causing several areas in the human molecule to be fully identical to the bacterial protein.

The best studied molecular chaperones are the chaperonins (cpns) which consist of two interacting oligomeric proteins known as cpn10 and cpn60 (from the molecular masses of their subunits). The cpns form heptameric structures with protein folding occurring within the cavity of the cpn60 oligomer, a process requiring heptameric cpn10. In contrast, the Hsp70 family of molecular chaperones act as monomers. The Hsp90 family is one of

WO 02/057795

PCT/US02/01566

the most abundant proteins in unstressed eukaryotic cells and this dimeric protein interacts with a large number of intracellular proteins, most notably the steroid receptors. There are also a number of lower molecular mass molecular chaperones (Wilson, et al., J. Periodontal. Res. 20:484-491 (1985)). A number of other less well characterized molecular chaperones are known. Hsp47 is known to be a collagen molecular chaperone (Laemmli, 1970). Certain of the molecular chaperones cpn60, Hsp70, and Hsp104, bind and hydrolyze adenosine triphosphate.

To isolate and further analyze HSP of a mammalian subject, tissues or cells are generally sampled under conditions which do not elevate HSP levels. The method of tissue or cell sampling, HSP isolation and measurement, and formation of HSP complexes are described by U.S. Patent Nos. 5,232,833 and 5,780,246 to Sanders, incorporated herein by reference.

*Collection of human bone samples from representative age groups and characterization of the sample pool with respect to measuring bone density*

Representative bone samples can be obtained from a qualified bone bank. The sample pool is then characterized to generate a database based on measurements of bone density. Many bone density techniques have shown clinical utility for assessing fracture risk. Presently, there are more than 20 different devices available for measurement of bone density. Some devices offer advantages in terms of versatility (i. e., the number of skeletal sites that can be measured), ability to monitor response, cost, availability, and ease of use (Table 2). Currently, no single device exists that ideally addresses all of these clinical requirements.

WO 02/057795

PCT/US02/01566

Table 2 - Comparison of Bone Densitometry Techniques

Method <sup>a</sup>	Clinical utility	Versatility	Ease of use	Availability	Cost	Radiation dose
SXA	+	-	+	+	+	+
DXA	++	++	+	+	-	+
pDXA	+	-	+	+	+	+
QCT	++	-	-	+	-	-
pQCT	+	-	+	-	-	+
QUS	+	-	+	+	+	++

<sup>a</sup>SXA, single X-ray absorptiometry; DXA, dual X-ray absorptiometry; pDXA, peripheral dual X-ray absorptiometry; QCT, quantitative computed tomography; pQCT, peripheral quantitative computed tomography; QUS, quantitative ultrasonography.

### C. Confirmation of Osteoporosis According to the WHO

For bone mineral density (BMD) measurements to be clinically useful, they need to be expressed in comparison to established normative data. All BMD manufacturers provide normative databases for this purpose. These databases are derived from bone density measurements of large groups of both men and women of different ages and races. Comparisons are expressed as percentage of or as the number of standard deviations from the age-matched and young normal values for healthy individuals of the same age, sex, and race.

Percentage scores are determined with respect to either the age-matched normal BMD (AMN) or the young normal BMD (YN) using the following equations:

WO 02/057795

PCT/US02/01566

Percent of age matched =  
 $[1 + (\text{BMD} - \text{AMN}/\text{AMN})] \times 100\%$  (Harris, et al., Bone Miner. 17:87-95 (1992))

Percent of young normal =  
 5  $[1 + (\text{BMD} - \text{YN}/\text{YN})] \times 100\%$  (Faulkner, et al., J. Bone Miner Res. 11(Suppl 1):S96 (1996))

Typically, the densitometry analysis software can calculate these percentage values. The standard deviation (SD) scores are also usually provided by the densitometry software. The age-  
 10 matched SD score is commonly referred to as the "Z-score," whereas the young normal standard deviation score has been labeled the "T-score." However, different densitometry systems may have different names for these parameters.

The age-matched or Z-score is calculated as the difference  
 15 between the patient's BMD and the normal BMD for those of the same age, sex, and race (AMN), divided by the SD of the normal population. This is calculated by the densitometry system using the following equation:

$$Z = (\text{BMD} - \text{AMN})/\text{SD}$$

20 The young normal or T-score is defined in a similar fashion, except the BMD difference is expressed in terms of the YN bone density:

$$T = (\text{BMD} - \text{YN})/\text{SD}$$

For the diagnosis of osteoporosis, the WHO has defined the following  
 25 criteria for the assessment of osteoporosis based on a BMD measurement at any skeletal site.

1. Normal: A BMD not more than 1 SD below YN (T-score  $\geq -1$ ).
  2. Low bone mass (osteopenia): A BMD between 1 and 2.5 SD below YN (T-score  $< -1$  and  $> -2.5$ ).
  3. Osteoporosis: A BMD 2.5 or more SD below YN (T-score  $\leq -2.5$ ).
- 30

WO 02/057795

PCT/US02/01566

4. Severe osteoporosis: A BMD 2.5 or more SD below young normal (T =/-2.5) and the presence of one or more fragility fractures.

*Sample analysis to identify presence of various bacterial and mammalian chaperons in bone samples.*

5 Extraction of Chaperone Molecules from Bone Samples

All bone samples (BS) can be harvested in sterile saline, centrifuged, washed briefly in saline, and lyophilized. Chaperone molecules are removed from the various bacteria by, for example, by gentle saline extraction as described by Wilson et al., (1985). Briefly, 10 bone samples are suspended in sterile saline and stirred gently at 4°C for 1 h. The debris is then removed by a means such as centrifugation and the soluble components are dialyzed extensively against distilled water and lyophilized. The protein content of the BS can be determined by a method such as described by Lowry, et al., J. Biol. Chem. 193:265-15 275 (1951), the carbohydrate content can be determined by a method such as described by Dubois, et al., Anal. Chem. 28:350-356 (1956), and the nucleic acid content by absorption at 260/280 nm. The LPS content can be measured using a commercial chromogenic Limulus amoebocyte lysate assay, such as one marketed by Pyrogen, Byk-Mallinckrodt, 20 London, UK, according to the manufacturer's instructions.

SDS-PAGE

The components of the BS can be analyzed by for example SDS-PAGE using 12% gels according to a method such as one described by Laemmli, et al., Nature (Lond.) 227:680-685 (1970). One of ordinary 25 skill in the art will recognize other suitable methods. Samples can be diluted to an appropriate extent such as 1:1 with sample buffer and boiled for a period such as 5 min. before loading. Gels can be run using for example a MiniProtean II system (Bio Rad Laboratories) and stained with for example Coomassie brilliant blue (Sigma 30 Immunochemicals). The molecular weight markers can be based on Dalton standards (Sigma Immunochemicals) or any other standards

WO 02/057795

PCT/US02/01566

which one of ordinary skill in the art can recognize. Gels can also be silver stained using a commercial kit such as one marketed by Gelcode<sup>®</sup> mark silver stain kit; Pierce, Rockford, IL, to detect both the presence of protein and carbohydrate.

5            Two-dimensional PAGE

Two-dimensional PAGE gels can be run using a method such as one described by O'Farrell, et al., J. Biol. Chem. 250:4007-4021 (1975). Gels can be run using for example a MiniProtean<sup>™</sup> II system and stained with, for example, Coomassie blue, with similar molecular weight markers as above. The first dimension, isoelectric focusing, can be over a pH range of 1-14, preferably 3-10. Second dimension separation can be carried out by, for example, molecular mass separation using a 12%SDS-PAGE gel.

10           Immunoblotting

15           Samples separated on one-or two-dimensional SDS-PAGE can be electroblotted onto membranes such as Immobilon P polyvinylidene difluoride membranes marketed by Millipore Corp., Bedford, MA overnight (Laemmli, 1970). Membranes can be washed with, for example, PBS containing 0.1% Triton X-100 (Sigma Immunochemicals)(PBS-T) and blocked with PBS-T containing 2% FCS (blocking buffer) (SeraLab).  
20           Blocked membranes can then be incubated with the test antibody (in blocking buffer) for a period such as 1 h and washed with buffer, for example, PBS-T. Bound test-antibody (anti-mouse) IgG can be detected using for example peroxidase labeled goat anti-mouse IgG (gamma-chain specific) (Sigma Immunochemicals) at 1:1,000 in PBS-T2% FCS. After a final wash, the blots can be developed with a solution such as 1 mg/ml 3,3 prime-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma Immunochemicals) in 50 mM Tris (Sigma Immunochemicals), pH 7.6, containing 150 mM NaCl (BDI-I) and 0.05% hydrogen peroxide (Sigma  
30           Immunochemicals). Each reaction can be terminated by extensive rinsing with distilled water.

WO 02/057795

PCT/US02/01566

Protein purification

Crude BS can be fractionated using column chromatography such as fractionation at 4°C on a Q-Sepharose™ anion exchange column (50 cm times 1.6 cm). The column can be equilibrated in a solution such as 20 mM Tris-HCl, pH 8.5 (buffer A). The BS (generally 100-400 mg) can be loaded on in the same buffer. The column can be washed with a solution such as 500 ml of buffer A and then eluted with for example 1,000 ml linear gradient of 0-2 M NaCl in buffer A. Fractions can be collected, whose absorbance can be monitored at 280 nm. The location of the osteolytic chaperone protein can be determined by a combination of activity assay, for example, SDS-PAGE, and the Western blot analysis. Fractions containing osteolytic activity can be dialyzed against for example deionized water to remove salt and lyophilized. The fraction with the highest specific activity and the least number of protein bands on SDS-PAGE can then be further fractionated at room temperature on a second column such as an anion exchange column.

The purity of the fractions can again be assessed, visually by SDS-PAGE or using another means recognizable by one of ordinary skill in the art, and 100 µg of the cleanest fraction can be dialyzed against 50 mM of Tris but&, pH 7.6, containing 10 mM KCl and 10 mM MgCl<sub>2</sub> (buffer C). This sample can be run on for example a 5-ml ATP-Sepharose™ (Sigma Immunochemicals) column. The column can be washed with buffer C and bound protein eluted in 5 mM ATP (Sigma Immunochemicals), also in buffer C. Protein can be located by SDS-PAGE and visualized using a silver stain kit (Sigma Immunochemicals). Gel filtration can be used to determine the molecular mass range of the osteolytic chaperone protein isolated by a method such as ATP-affinity chromatography. This can be achieved by running the purified protein on a column such

WO 02/057795

PCT/US02/01566

as Bio-Sil TSK250 (Bio Rad Laboratories) column in a buffer such as 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 6.7, and measuring the absorption of the collected fractions at a wavelength in the range between 205 and 280 nm.

5            *Data analysis and correlation to clinical outcome variables*

The experimental findings and clinical bone densitometry and Q-CT measurements can be documented using, for example, a standardized relational computer database using a numerical code system. In one embodiment, the computer program SPSS/PC+9.0 (SPSS Inc., 44 N. Michigan Ave., Chicago, IL 60611) is used for statistical analysis of the compiled data. Descriptive statistics of the raw data can be carried out using frequency tables. Normal distribution can be determined by fitting to normality and by obtaining normal probability plots, where the ranked observed residuals (deviation from the mean) are plotted on the x-axis against the standardized values of the normal distribution on the y-axis. Normal distribution can then be indicated if the observed residuals fall onto the straight line. Significant differences between means can be evaluated using a *T-test* for dependent and independent samples and *one-way ANOVA* analysis of variance. In case of a statistically significant *F-Test* from an *ANOVA* using multivariate variables, the contributing means can be differentiated by post-hoc comparison using a *Tukey HSD* test for unequal samples sizes. The latter two tests can determine the occurrence of the various Chaperone Molecules and the presence of an osteopenic bone sample according to a patient's age and gender and other concomitant medical conditions. The predominant chaperone molecule correlating with osteopenia can thus be identified.

30            The relationships between osteopenia, age, gender, other contributing factors, and the presence of chaperone molecules can

WO 02/057795

PCT/US02/01566

be established using, for example, a cross tabulation method by generating multiple-way frequency tables. For each possible combination of these variables, these tables yield a cell frequency, i.e. the number of cases in the patient population that had this particular combination. In addition, such a cross tabulation method allows to evaluate the reliability of the test of these relationships. Hence, the presence of osteopenia, age, gender, other contributing factors such as medical conditions are categorical variables. Multiple simultaneous relations and interactions between the variables of the multipleway frequency table can be examined on the basis of log-linear equations, which allow computation of the cell frequencies that would have been expected if the variables involved were unrelated. This can be performed using for example an iterative proportional fitting procedure. Thus, significant deviations of the observed from the expected frequencies can reflect a statistically significant relationship between a specific chaperone molecule and osteopenia. Significance testing of deviations of the observed from the expected frequencies can be performed via a *Pearson Chi-square* test. The residual frequencies can be calculated by subtracting the expected frequencies from the observed frequencies. If no relationship exists, all residual frequencies are expected to consist of positive and negative values of similar magnitude and to be evenly distributed across the cells of the frequency table. Plotting the residuals is therefore used as another means of assessing correlations between the presence of chaperone molecules with osteopenia. In all statistical tests employed in this study, a significance level such as one of  $p < 0.05$  can be chosen. One of ordinary skill in the art can choose a proper significance level.

#### IV. Diagnosing Osteoporosis using Bacterial and/or Molecular Chaperon Markers

The method of diagnosing osteoporosis disclosed herein generally includes 1) sampling the tissue or cells of a mammalian subject, 2) measuring the level of a marker and 3) designating the mammalian subject as having osteoporosis if the level of the marker is higher than a standard level of the marker in a member of a control group. The method may optionally include a step of isolating the marker. The control group is selected according to factors such as geographical location, gender and/or age.

Alternatively, two or more measurements of the marker in the same mammalian subject are made and compared during a course ranging from several hours for example 6 hours, several days for example 10 days, to several months or several years. If the level of the marker of the latter measurement or assay is higher than the level of the marker in the previous measurement or assay, the mammalian subject is designated as having osteoporosis. Sometimes, when desirable, the two method of diagnosing osteoporosis can be used in combination.

Preferably, the mammalian subject is a human being. Most preferably, the mammalian subject is a postmenopausal female.

The marker can be either a bacteria, a bacteria produced factor, or a chaperon molecule. In one embodiment, the marker is a bacteria. Representative bacterial markers are: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivallis*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella inter-media*, *Campylobacter rectus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitis*, *Mycobacterial tuberculosis*, *Haemophilus influenzae*, *Pasteurella multocida*.

WO 02/057795

PCT/US02/01566

In another embodiment, the marker can be a chaperon molecule. Representative chaperon molecular markers are: HSP 70, HSP 70, gp 96, cpn10, and cpn20, alone or in combination. Preferably, the marker is a human HSP.

5 In still another embodiment, the marker can be a bacteria produced factor such as endotoxin-LPS, gapstatin, or dermonecrotic toxin (DNT).

#### V. Methods of Treating or Preventing Osteoporosis

##### A. Preparation and Purification of HSP Reagents

10 Preparation and purification of HSP proteins and their respective peptide complexes are within the knowledge in the art. The complexes can be intracellularly produced complexes having HSPs from a selected recombinant host cell and antigenic peptides expressed from cDNAs of a diseased bone or tissue cell; the  
15 antigenic peptides of the complex are thus representative of antigenic peptides found in such bone cell. Generally, the methods of preparing HSP complexes include the steps of obtaining (e.g., isolating) diseased bone or other tissue cells from one or more  
20 individuals, preparing RNA from the cells, making cDNA from the RNA, introducing the cDNA into host cells, culturing the host cells so that the diseased bone cell-derived cDNAs are expressed, and purifying HSPs-peptide complexes from the host cells.

The cDNA prepared from disease bone or tissue cell RNA, herein referred to as "diseased bone cDNA", is optionally amplified  
25 prior to introduction into a host cell for expression. The cDNAs are optionally inserted into a cloning vector for replication purposes prior to expression. The cDNAs are inserted into an expression vector or intrachromosomally integrated, operatively  
30 linked to regulatory element(s) such as a promoter, for purposes of expressing the encoded proteins in suitable host cells in vitro. The cDNAs are introduced into host cells where they are expressed by

WO 02/057795

PCT/US02/01566

the host cells, thereby producing intracellularly noncovalent complexes of HSPs and peptides. The recombinant host cells can be cultured on a large scale for production of large amounts of the immunogenic complexes. The diseased bone cDNA library can be stored for future use (e.g., by lyophilization or freezing), or expanded by replication in a cloning vector in suitable host cells to meet increased demand for the immunogenic complexes.

The immunogenic compositions prepared from the host cells expressing the diseased bone cDNAs comprise complexes of HSPs of the host cell noncovalently associated with peptides, *inter alia*, those derived from the diseased bone cells from which the RNA was originally derived. Such complexes can induce an immune response in a patient against the diseased bone cells that is therapeutically or prophylactically efficacious. Preferably, the patient is the subject from whom the diseased bone cells used to make cDNA were obtained. Alternatively, the diseased bone cells can be from one or more subjects different from the patient but having diseased bone of the same tissue type.

Optionally, host cells for expression of the diseased bone cDNAs can also be genetically engineered to coexpress recombinantly one or more HSP genes so that increased amounts of complexes comprising immunogenic peptides noncovalently associated with a HSP can be produced.

The preparation and purification of HSP proteins, their respective peptide complexes, and isolation of antigenic/immunogenic components are disclosed in U.S. Patent No. 5,830,464; 5,948,646; and 6,030,618 to Srivastava ("the Srivastava patents"). The Srivastava patents also described the *in vitro* production of HSP-antigenic molecule complexes and the proper procedure for determination of immunogenicity of HSP-

WO 02/057795

PCT/US02/01566

peptide complexes. The Srivastava patents are incorporated by reference herein.

In a preferred embodiment, the HSP-antigenic molecule complex is autologous to the individual; that is, the complex is isolated from either the infected cells of the individual himself (e.g., preferably prepared from infected tissues of the patient). Alternatively, the complex is produced *in vitro* (e.g., wherein a complex with an exogenous antigenic molecule is desired). Alternatively, the HSP and/or the antigenic molecule can be isolated from the individual or from others or made by recombinant production methods using a cloned HSP originally derived from the individual or from others. Exogenous antigens and fragments and derivatives (both peptide and non-peptide) thereof for use in complexing with HSPs, can be selected from among those known in the art, as well as those readily identified by standard immunoassays known in the art by the ability to bind antibody or major histocompatibility molecules (MHC molecules) (antigenicity) or generate immune response (immunogenicity). Complexes of HSPs and antigenic molecules can be isolated from infected tissue of a patient, or can be produced *in vitro* (as is necessary in the embodiment in which an exogenous antigen is used as the antigenic molecule). The HSP-antigenic molecule complex that is administered to the patient can be the same or different from the HSP-antigenic molecule complex used to sensitize the APC that are administered to the patient. In a specific embodiment wherein the APC and complexes are administered concurrently, the APC and purified HSP-antigenic molecule complexes can be present in a single composition, or different compositions, for administration.

HSPs that can be used include but are not limited to, HSP 70, HSP 70, gp 96, cpn10, and cpn20, alone or in combination.

WO 02/057795

PCT/US02/01566

Preferably, the HSPs are human HSPs. Although the HSPs can be allogeneic to the patient, in a preferred embodiment, the HSPs are autologous to (derived from) the patient to whom they are administered. The HSPs and/or antigenic molecules can be  
5 purified from natural sources, chemically synthesized, or recombinantly produced.

The immunogenic HSP-peptide complexes disclosed herein may include any complex containing an HSP and a peptide that is capable of inducing an immune response in a mammal. The  
10 peptides are preferably noncovalently associated with the HSP. Preferred complexes may include, but are not limited to, HSP 60-peptide, HSP 70-peptide and HSP 70-peptide complexes. For example, an HSP called gp 96 which is present in the endoplasmic reticulum of eukaryotic cells and is related to the cytoplasmic HSP  
15 70s can be used to generate an effective vaccine containing a gp 96-peptide complex.

The compositions comprising HSP noncovalently bound to antigenic molecules can be administered to elicit an effective specific immune response to the complexed antigenic molecules  
20 (and not to the HSP). The HSP-antigenic molecule complexes are preferably purified to at least 70%, 80% or 90% of the total mg protein. In another embodiment, the HSP-antigenic molecule complexes are purified to apparent homogeneity, as assayed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.

Immunogenic or antigenic peptides that are endogenously complexed to HSPs or MHC antigens can be used as antigenic molecules for treating and/or preventing bone diseases. For example, such peptides may be prepared that stimulate cytotoxic T cell responses against different viral proteins including, but not  
30 limited to, proteins of immunodeficiency virus type I (HIV-I), human immunodeficiency virus type II (HIV-II), hepatitis type A,

WO 02/057795

PCT/US02/01566

hepatitis type B, hepatitis type C, influenza, Varicella, adenovirus, herpes simplex type I (HSV-I), herpes simplex type II (HSV-II), rinderpest, rhinovirus, echovirus, rotavirus, respiratory syncytial virus, papilloma virus, papova virus, cytomegalovirus, echinovirus, 5 arbovirus, huntavirus, coxsackie virus, mumps virus, measles virus, rubella virus and polio virus.

In another embodiment the HSP-antigenic molecule complex to be used is a complex that is produced *in vivo* in cells. Alternatively, in an embodiment wherein one wishes to use 10 antigenic molecules by complexing them to HSPs *in vitro*, HSPs can be purified for such use from the endogenous HSP-peptide complexes in the presence of ATP or low pH (or chemically synthesized or recombinantly produced). The procedures for purification of HSPs and their respective complexes are described 15 in the Srivastava patents. The protocols described herein may be used to isolate HSP-peptide complexes, or the HSPs alone, from any eukaryotic cells for example, tissues, isolated cells, or immortalized eukaryote cell lines infected with a preselected intracellular pathogen.

#### 20 B. Exogenous Antigenic Molecules

Exogenous antigens or antigenic portions can be selected for use as antigenic molecules, for complexing to HSPs, from among those known in the art or determined by immunoassay to be able to bind to antibody or MHC molecules (antigenicity) or generate 25 immune response (immunogenicity). To determine immunogenicity or antigenicity by detecting binding to antibody, various immunoassays known in the art can be used, including but not limited to competitive and non-competitive assay systems using techniques such as radioimmunoassays, ELISA (enzyme linked 30 immunosorbent assay), "sandwich" immunoassays, immunoradiometric assays, gel diffusion precipitin reactions,

WO 02/057795

PCT/US02/01566

immunodiffusion assays, *in vivo* immunoassays (using colloidal gold, enzyme or radioisotope labels, for example), western blots, immunoprecipitation reactions, agglutination assays (e.g., gel agglutination assays, hemagglutination assays), complement  
5 fixation assays, immunofluorescence assays, protein A assays, and immunoelectrophoresis assays, etc. In one embodiment, antibody binding is detected by detecting a label on the primary antibody. In another embodiment, the primary antibody is detected by detecting binding of a secondary antibody or reagent to the  
10 primary antibody. In a further embodiment, the secondary antibody is labelled. Many means are known in the art for detecting binding in an immunoassay and are envisioned for use. In one embodiment for detecting immunogenicity, T cell-mediated responses can be assayed by standard methods, e.g., *in vitro*  
15 cytotoxicity assays or *in vivo* delayed-type hypersensitivity assays.

Potentially useful antigens or derivatives thereof for use as antigenic molecules can also be identified by various criteria, such as the antigen's involvement in neutralization of a pathogen's infectivity (wherein it is desired to treat or prevent infection by  
20 such a pathogen) (Norrby, 1985, Summary, in Vaccines 85, Lerner, et al. (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., pp. 388-389), type or group specificity, recognition by patients' antisera or immune cells, and/or the demonstration of protective effects of antisera or immune cells specific for the  
25 antigen. In addition, where it is desired to treat or prevent a disease caused by pathogen, the antigen's encoded epitope should preferably display a small or no degree of antigenic variation in time or amongst different isolates of the same pathogen. Preferably, where it is desired to treat or prevent osteoporosis  
30 caused by viral infections of bone, molecules comprising epitopes of known viruses are used, as discussed above. Preferably, where it

WO 02/057795

PCT/US02/01566

is desired to treat or prevent osteoporosis caused by bacterial infections of bone, molecules comprising epitopes of known bacteria are used, as discussed above. Where it is desired to treat or prevent osteoporosis caused by protozoal infections of bone, molecules comprising epitopes of known protozoa are used. For example, such antigenic epitopes may be prepared from protozoa including, but not limited to, leishmania, kokzidioa, and trypanosoma. Where it is desired to treat or prevent osteoporosis caused by parasitic infections of bone, molecules comprising epitopes of known parasites are used. For example, such antigenic epitopes may be from parasites including, but not limited to, chlamydia and rickettsia.

#### C. Method of Treating Osteoporosis

Osteoporosis caused by infectious diseases of bone that can be diagnosed using a chaperon molecule marker can be caused by bone infectious agents including, but not limited to, viruses, bacteria, fungi, protozoa and parasites, as discussed above. The method of treating osteoporosis disclosed herein generally includes administering to a mammalian subject a drug composition effective to treat the infectious agent causing the osteoporosis. The drug composition generally contains a drug and optionally a drug delivery carrier and/or one or more biocompatible excipients. Exemplary drug delivery carriers are liposomes, micro or nanoparticles formed of natural or biodegradable synthetic polymers such as polylactic acid, polyglycolic acid, polyhydroxyalkanoates, natural or chemically modified starches, chitosan, and proteins such as gelatin. In the case wherein the marker for osteoporosis is a chaperon molecule such as a HSP, the drug composition can include one or more complexes formed of the HSP with another molecule.

WO 02/057795

PCT/US02/01566

The therapeutic reagents can be essentially the same as the diagnostic reagents, purified and prepared according to GMP standards. Modes of administration include but are not limited to subcutaneously, intramuscularly, intravenously, intraperitoneally, intradermally or mucosally.

The therapeutic regimens and pharmaceutical compositions disclosed herein may be used with additional immune response enhancers or biological response modifiers including, but not limited to, the cytokines IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6, TNF, or other cytokine affecting immune cells. The complexes of the HSP and antigenic molecule are administered in combination therapy with one or more of these cytokines.

Drug solubility and the site of absorption are factors which should be considered when choosing the route of administration of a therapeutic agent. In an embodiment, HSP-antigenic molecule complexes may be administered using any desired route of administration. Advantages of intradermal or mucosal administration include use of lower doses and rapid absorption, respectively. Advantages of subcutaneous or intramuscular administration include suitability for some insoluble suspensions and oily suspensions, respectively. Mucosal routes of administration include, but are not limited to, oral, rectal and nasal administration. Preparations for mucosal administrations are suitable in various formulations as described below.

If the complex is water-soluble, then it may be formulated in an appropriate buffer, for example, phosphate buffered saline or other physiologically compatible solutions, preferably sterile. Alternatively, if the resulting complex has poor solubility in aqueous solvents, then it may be formulated with a non-ionic surfactant such as Tween, or polyethylene glycol. Thus, the compounds and their physiologically acceptable solvates may be

WO 02/057795

PCT/US02/01566

formulated for administration by inhalation or insufflation (either through the mouth or the nose) or oral, buccal, parenteral, or rectal administration.

For oral administration, the pharmaceutical preparation  
5 may be in liquid form, for example, solutions, syrups or suspensions, or may be presented as a drug product for reconstitution with water or other suitable vehicle before use. Such liquid preparations may be prepared by conventional means with pharmaceutically acceptable additives such as suspending  
10 agents (e.g., sorbitol syrup, cellulose derivatives or hydrogenated edible fats); emulsifying agents (e.g., lecithin or acacia); non-aqueous vehicles (e.g., almond oil, oily esters, or fractionated vegetable oils); and preservatives (e.g., methyl or propyl-p-hydroxybenzoates or sorbic acid). The pharmaceutical  
15 compositions may take the form of, for example, tablets or capsules prepared by conventional means with pharmaceutically acceptable excipients such as binding agents (e.g., pregelatinized maize starch, polyvinyl pyrrolidone or hydroxypropyl methylcellulose); fillers (e.g., lactose, microcrystalline cellulose or calcium hydrogen  
20 phosphate); lubricants (e.g., magnesium stearate, talc or silica); disintegrants (e.g., potato starch or sodium starch glycolate); or wetting agents (e.g., sodium lauryl sulphate). The tablets may be coated by methods well-known in the art.

Preparations for oral administration may be suitably  
25 formulated to give controlled release of the active compound.

For buccal administration, the compositions may take the form of tablets or lozenges formulated in conventional manner.

The compounds may be formulated for parenteral administration by injection, e.g., by bolus injection or continuous  
30 infusion. Formulations for injection may be presented in unit dosage form, e.g., in ampoules or in multi-dose containers, with an

WO 02/057795

PCT/US02/01566

added preservative. The compositions may take such forms as suspensions, solutions or emulsions in oily or aqueous vehicles, and may contain formulatory agents such as suspending, stabilizing and/or dispersing agents. Alternatively, the active ingredient may be in powder form for constitution with a suitable vehicle, e.g., sterile pyrogen-free water, before use.

The compounds may also be formulated in rectal compositions such as suppositories or retention enemas, e.g., containing conventional suppository bases such as cocoa butter or other glycerides.

In addition to the formulations described previously, the compounds may also be formulated as a depot preparation. Such long acting formulations may be administered by implantation (for example, subcutaneously or intramuscularly) or by intramuscular injection. Thus, for example, the compounds may be formulated with suitable polymeric or hydrophobic materials (for example, as an emulsion in an acceptable oil) or ion exchange resins, or as sparingly soluble derivatives, for example, as a sparingly soluble salt. Liposomes and emulsions are well known examples of delivery vehicles or carriers for hydrophilic drugs.

For administration by inhalation, the compounds for use can be conveniently delivered in the form of an aerosol spray presentation from pressurized packs or a nebulizer, with the use of a suitable propellant, e.g., dichlorodifluoromethane, trichlorofluoromethane, dichlorotetrafluoroethane, carbon dioxide or other suitable gas. In the case of a pressurized aerosol the dosage unit may be determined by providing a valve to deliver a metered amount. Capsules and cartridges of, e.g., gelatin for use in an inhaler or insufflator may be formulated containing a powder mix of the compound and a suitable powder base such as lactose or starch.

WO 02/057795

PCT/US02/01566

**D. Resistance To Osteoporosis Induced by Bacteria or HSPs**

Osteoporosis caused by bacterial infection or bone diseases can be treated by immunizing by administering to a mammalian subject an immunogenic composition. In one embodiment, the immunogenic composition may comprise an attenuated or modified infectious agent. In another embodiment, the immunogenic composition may include a HSP. Immunization to bone diseases by HSPs are well documented. For example, in rat adjuvant arthritis (AA), resistance could be induced by immunization with mycobacterial HSP 60 in incomplete Freund's adjuvant (IFA). Similar findings were obtained with mycobacterial and *Escherichia coli* HSP 70 and HSP10, and DNA vaccination with mycobacterial HSP 60 was also protective. Bardwell, J. C. A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:848-852 (1984); Greenberg, S.G., J. Neuroscience, 5:1239-45. Immunization with a recombinant vaccinia virus expressing either mycobacterial or human HSP 60 was found to suppress AA, even when administered after disease induction. For mycobacterial HSP 60, oral administration was also shown to inhibit rat AA; in this case, there was evidence for the induction of transforming growth factor (TGF-beta)-producing cells that suppressed proliferative responses to the disease eliciting mycobacterial antigen from *Mycobacterium tuberculosis* (Mt), thus pointing to a potential mechanism of disease resistance. Irby, R. B. et al.

WO 02/057795

PCT/US02/01566

Table 3. HSPs and protection in autoimmune disease models\*

Model	Animal <sup>a</sup>	HSPs	Route	Effect
Adjuvant arthritis	R	MtHSP 60, HSP 70, HSP10	Subcutaneous	Prevention
Streptococcal cell wall arthritis	R	MtHSP 60	Subcutaneous	Prevention
Avridine arthritis	R	MtHSP 60, HSP 70	Subcutaneous	Prevention
Adjuvant arthritis	R	MtHSP 60	Vaccinia	Treatment
Adjuvant arthritis	R	HumHSP 60	Vaccinia	Treatment
Adjuvant arthritis	R	MtHSP 60	Oral	Prevention
Adjuvant arthritis	R	MIHSP 60	Naked DNA	Prevention
NOD diabetes	M	MtHSP 60	Subcutaneous	Prevention
NOD diabetes	M	HumHSP 60 peptide	Subcutaneous	Prevention treatment
Pristane arthritis	M	MtHSP 60	Subcutaneous	Prevention
Collagen arthritis	M	MtHSP 60	Subcutaneous	Prevention
Collagen arthritis	R	MtHSP 70	Subcutaneous	Partial prevention
Yersinia arthritis	R	Mtap 60	Subcutaneous	Prevention
EAE	R	MtHSP 60 peptide	Subcutaneous	Prevention

Preimmunization using HSP 60 has been found to induce resistance to autoimmunity in other arthritis models, such as streptococcal cell-wall-induced arthritis-8 and, importantly, nonmicrobially induced models such as avridine-9 (a synthetic nonimmunogenic lipoidal amine) or pristane-induced arthritis, as well as collagen-induced arthritis. Similarly, development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in rats and diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice has been found to be inhibited by prior immunization with HSP 60. Therefore, immunologic exposure to HSPs could lead to resistance against various forms of induced or spontaneous autoimmunity.

WO 02/057795

PCT/US02/01566

The reports on the basis of the various models collectively indicate that resistance to autoimmunity induced by HSP 60 operates irrespective of the actual autoimmune disease trigger and that the suppressive effect is due to the induction of anti-inflammatory T cells responding to stress- (inflammation) upregulated self-HSP. The upregulated expression of self-HSP 60 in the inflamed joints has been shown both in the experimental models and in humans. HSP 60-mediated protection is documented in NOD diabetes, and upregulated expression of self-HSP occurs in inflamed islets, thus it seems that self-HSP-specific anti-inflammatory T cells can also generate similar disease-suppressive activity in this model. Apparently, such suppressive activity is effective in conditions as diverse as CD4<sup>+</sup> T helper 1 (Th1)-mediated chronic joint inflammation and the primarily CD8<sup>+</sup> T-cell-mediated destruction of insulin-producing T-cells. As such, recognition of self-HSP molecules can be an important immunological strategy that contributes to establishment or maintenance of self-tolerance. The same can be true in the case of inflammation caused by infection, allowing one to logically conclude that the T-cell response to HSPs operates in the control and downmodulation of inflammatory responses, irrespective of their origin.

*Immune Responses to HSPs in Arthritis Patients*

Immune reactivity toward HSPs has been extensively investigated. For example, when monitoring T-cell proliferative responses to HSP 60 in children with juvenile rheumatoid arthritis (JRA), responses were found to be present exclusively in patients with spontaneously remitting oligoarticular forms (OA-JRA) of the disease but not in patients with progressive (polyarticular or systemic) forms of the disease. Such responses showed a pattern of fluctuation that suggested they coincided with development of

WO 02/057795

PCT/US02/01566

remission, i.e. with disease suppression. Analysis of the T cells in these patients revealed the production of interleukin 4 (IL-4) and TGF-beta and overexpression of CD30 upon activation with HSP 60, indicating a Th2-type response. Furthermore, upregulated mRNA levels for IL-4 and IL-10 in the synovium of such HSP 60-responsive patients were observed by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR).

The majority of such HSP 60-reactive T cells has been found to respond not only to the mycobacterial HSP 60 molecule but especially to the human HSP 60. The presence of such Th2-type cells in the self-remitting forms of the disease suggests the protective nature of these T cells in humans. Various studies have reported on immune reactivity towards HSPs in adult rheumatoid arthritis (RA) patients. Although both humoral and T-cell-mediated responses have been observed, it does not seem that immune responses to HSPs are a general and dominating feature in RA; certainly not in advanced or progressive forms of the disease. However, in an earlier report, it was clearly documented that an RA patient who developed a self-HSP 60 crossreactive T-cell response had a rapidly remitting course of disease. A recent study of T-cell proliferative responses to HSPs in adult RA patients revealed that responses to human HSP 60 were raised upon adding IL-4 *in vitro*. As this was not observed for responses to mycobacterial HSP 60, it seems that, in agreement with the findings in OA-JRA, recognition of the human (self) molecules preferentially triggers T cells with a regulatory phenotype. Co-culture experiments, in which human HSP 60-specific T-cell lines from RA patients were added to autologous peripheral blood mononuclear cells, have confirmed the regulatory nature of these T cells, as they were found to inhibit tumour necrosis factor alpha production in mononuclear cells derived from RA patients.

WO 02/057795

PCT/US02/01566

HSPs are targets for regulatory T-cell responses. HSPs have unique characteristics which seem to give HSPs a critical immunological status, especially their stress-dependent differential expression. Although strong constitutive expression of HSP 60 has been shown in the thymic medullary epithelium, peripheral T-cell responses to self-HSP are abundant. Thus, self-HSP-specific T cells are probably positively selected and subsequently escape from negative selection, suggesting their receptor has a low affinity for the self-HSP molecule. In the periphery, the level of constitutive expression of HSPs, such as HSP 60, is low and peripheral tolerance for these self-antigens is likely to be less tight than for other, more abundantly available, self-proteins. Under conditions of inflammatory stress, HSP synthesis is grossly upregulated, providing the immune system with a target through which to monitor and control dangerous or potentially deleterious inflammatory conditions.

Several of the characteristic features of HSPs are important. First, their unique degree of evolutionary conservation provides the molecular basis for the demonstrated crossrecognition of microbial and self-HSP by immune cells. Second, microbial HSPs are highly immunogenic and healthy individuals have self-HSP-reactive T cells. Third, HSPs in any cell type, everywhere in the body, respond to a stress by immediate upregulation. Although some of these features may individually be true for other proteins in nature, the combination of the three features are unique for HSPs.

*Mechanisms leading to regulation by HSP-reactive T cells.*

A number of possible mechanisms may contribute to the regulatory phenotype of self-HSP-reactive T cells at sites of inflammation. Such mechanisms are proposed to be related to the peripheral tolerance mechanisms that are responsible for the

WO 02/057795

PCT/US02/01566

5 persistence and safe containment of self-HSP-reactive T cells in  
the immune system. First, it is possible that owing to low levels of  
self-HSP expression in peripheral tissues, self-HSP-specific T cells  
will simply ignore self-HSP molecules. Only after exposure to  
10 microbial HSP, in infection or at the gut mucosa, will these T cells  
with cross-specificity for conserved microbial HSP epitopes be  
stimulated and expanded. In the case of autoimmune  
inflammation, self-HSP expression is upregulated and locally  
responding T cells will be engaged in low-affinity interactions with  
15 self-HSP epitopes. This will lead to a downregulatory IL-4, IL-10,  
TGF-beta (Th2) phenotype in these cells, producing bystander  
regulation.

Second, it is possible that the low-level expression of self-  
HSP epitopes by nonprofessional antigen-presenting cells (APCs)  
15 or nonactivated APCs in the periphery, or the conserved microbial  
HSP epitopes in the 'tolerizing' gut environment, is continuously  
noted by T cells under normal conditions. This recognition could  
skew such T cells towards a regulatory phenotype or anergy.  
Subsequent involvement of these cells at the site of inflammation  
20 may promote their regulatory activity, following recognition of  
overexpressed HSPs on professional APCs. Recently, it has been  
demonstrated that anergic T cells, generated with antigen in the  
absence of professional APCs, exerted bystander suppression on  
the proliferative responses of other T cells in the presence of APC,  
25 provided the antigen recognized by the anergic cell was present in  
the culture. In the case of HSPs, this could mean that quiescent  
HSP-specific T cells focus their regulatory activity to sites of  
inflammation where HSPs become temporarily overexpressed.  
During infection, the activity of such anergic regulators would be  
30 outweighed by a dominant frequency of T cells responding  
(vigorously) to nonconserved microbial HSP epitopes, as well as

WO 02/057795

PCT/US02/01566

other microbial epitopes recognized by T cells that are not 'silenced' elsewhere in the periphery.

A third possibility is that self-HSP epitopes are perceived by T cells as APLs or closely related 'partial agonistic' variants of 'full agonist' microbial HSP epitopes. APLs do not fully activate T cells but do have the capacity to trigger certain effector functions such as the production of regulatory cytokines. This could be a profitable strategy in the case of HSPs, since exposure to full agonist microbial HSP epitopes in the gut or during infection would expand the self-HSP or APL-oriented (regulatory) repertoire. During autoimmune inflammation, upregulated self-HSP would serve as the APL inducing a regulatory phenotype in HSP-reactive cells. Although APLs in general may have unpredictable and diverse effects, the fact that in this model the APL-like self-HSP is supposed to be involved in thymic positive selection, generating T cells that have only low affinity interaction with the APL, may give direction (regulatory) to this specific type of APL.

*Stimulation of Bone Resorption by Molecular Chaperones*

One class of bacterial molecular chaperone, the chaperonins, were recently discovered to be potent inducers of bone resorption (Nair, et al., *Calcif Tissue Int* 64(3):214-8 (1999)). To address the question of whether the osteolytic activity of the chaperonins is unique to this protein class, or is a common attribute of molecular chaperones generally, a number of bacterial and mammalian molecular chaperones have been examined for activity in the murine calvarial bone resorption assay. All the *E. coli* molecular chaperones (groEL, groES, and dnaK) have been found to be active. The osteolytic activity of groEL was inhibited by indomethacin and the natural antagonist of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) but was unaffected by neutralization of tumor

WO 02/057795

PCT/US02/01566

necrosis factor (TNF) or inhibition of 5-lipoxygenase. Mammalian molecular chaperones of molecular mass 27, 47, 70, and 90 kDa were also tested and, with the exception of the 47 kDa protein, all showed activity in the murine calvarial assay. Molecular chaperones appear, therefore, to have the capacity to modulate the cellular processes in bone explant cultures, resulting in resorption of the calcified matrix.

The methods of treating bone diseases using HSP complexes disclosed herein also encompass adoptive immunotherapy. The HSP complexes can be used to sensitize antigen presenting cells ("APC") and/or macrophage cells. The methods of using Hsp complexes to sensitize macrophage and/or APC have been described by U.S. Patent No. 5,985,270 to Srivastava. The method of adoptive immunotherapy as disclosed therein is thus fully incorporated herein by reference. The APC can be selected from among those antigen presenting cells known in the art, including but not limited to macrophages, dendritic cells, B lymphocytes, and a combination thereof, and are preferably macrophages. The HSP complex-sensitized APC may be administered concurrently or before or after administration of the HSP-antigenic molecule complexes. Adoptive immunotherapy disclosed herein allows activation of antigen presenting cells by incubation *in vitro* with HSP-antigenic molecule complexes. Preferably, prior to use of the cells *in vivo*, measurement of reactivity against the bone infectious agent *in vitro* is done. This *in vitro* boost followed by clonal selection and/or expansion, and patient administration constitutes a useful therapeutic/prophylactic strategy.

The methods of treating and/or preventing osteoporosis include eliciting an immune response in an individual in whom the treatment or prevention of osteoporosis is desired by administering to the mammalian subject a composition which includes an

WO 02/057795

PCT/US02/01566

effective amount of an anti-bacteria composition or a HSP complex. The HSP complex is essentially an HSP noncovalently bound to an antigenic molecule using any convenient mode of administration in combination with the adoptive immunotherapy methods disclosed herein. Modes of administration include but are not limited to subcutaneously, intramuscularly, intravenously, intraperitoneally, intradermally or mucosally.

#### Therapeutic Dosages

Drug doses are provided in milligrams per square meter of body surface area because this method rather than body weight achieves a good correlation to certain metabolic and excretory functions (Shirkey, H. C., 1965, JAMA 193:443). Moreover, body surface area can be used as a common denominator for drug dosage in adults and children as well as in different animal species as indicated below in Table 1 (Freireich, E. J., et al., 1966, Cancer Chemotherap. Rep. 50:219-244).

Table 4. Representative Surface Area to Weight Ratios (km) for Various Species<sup>1</sup>

Species	Body Weight (kg)	Surface Area (Sq m)	km Factor
Mouse	0.02	0.0066	3.0
Rat	0.15	0.025	5.9
Monkey	3.0	0.24	12
Dog	8.0	0.40	20
Human, Child	20	0.80	25
Adult	60	1.6	37

<sup>1</sup> Example: To express a mg/kg dose in any given species as the equivalent mg/sq m dose, multiply the dose by the appropriate km factor. In an adult human, 100 mg/kg is equivalent to 100 mg/kg x 37 kg/sq m = 3700 mg/sq m<sup>2</sup> Freireich, et al., 1966, Cancer Chemotherap. Rep. 50: 219-244.

Dosages of the purified complexes of HSPs and antigenic molecules used for administration are preferably much smaller than the dosages estimated by the prior art methods described above. For example, according to a preferred embodiment of the

WO 02/057795

PCT/US02/01566

methods disclosed herein, an amount of HSP 70- and/or gp 96-antigenic molecule complexes is administered subcutaneously that is in the range of about 10 micrograms to about 600 micrograms for a human patient, the more preferred human dosage being the same as used in a 25 g mouse, i.e., in the range of 10-100 micrograms. The preferred dosage for HSP-90 peptide complexes in a human patient provided by the methods disclosed herein is in the range of about 50 to 5,000 micrograms, the more preferred dosage being 100 micrograms. Alternatively, in a specific embodiment, an amount of HSP 70- and/or gp 96-antigenic molecule complexes is administered intradermally or mucosally that is in the range of about 0.1 micrograms to about 60 micrograms for a human patient. In another specific embodiment, the therapeutically effective amount of HSP 70- and/or gp 96-antigenic molecule complexes is less than 10 micrograms, e.g., in the range of 0.1 to 9 micrograms; the preferred human dosage being substantially equivalent to or smaller than the dosage used in a 25 g mouse, e.g., in the range of 0.5 to 2.0 micrograms. The preferred dosage for HSP 70-antigenic molecule complexes for intradermal or mucosal administration to a human patient is in the range of about 5 to 500 micrograms. In a specific embodiment, the therapeutically effective amount of HSP 70-antigenic molecule complexes is less than 50 micrograms, e.g., in the range of 5 to 49 micrograms; the preferred dosage being in the range of 5 to 40 micrograms.

In one embodiment, the dosages are administered every other day for a total of five injections. In a preferred embodiment, the doses red above are given once weekly for a period of about 4 to 6 weeks, and the mode of administration is preferably varied with each administration. In a preferred example, each site of administration is varied sequentially. Thus, by way of example

WO 02/057795

PCT/US02/01566

and not limitation, the first injection may be given intradermally on the left arm, the second on the right arm, the third on the left belly, the fourth on the right belly, the fifth on the left thigh, the sixth on the right thigh, etc. The same site may be repeated after a gap of one or more injections. Also, split injections may be given. Thus, for example, half the dose may be given in one site and the other half in another site on the same day.

After 4-6 weeks, further injections are preferably given at two-week intervals over a period of time of one month. Later injections may be given monthly. The pace of later injections may be modified, depending upon the patient's clinical progress and responsiveness to the immunotherapy. Alternatively, the mode of administration is sequentially varied, e.g., weekly administrations are given in sequence intradermally or mucosally.

The above regimens for administration of HSP-antigenic molecule complexes may occur before, during or after administration of the HSP-antigenic molecule complex-sensitized APC. For example, the mode of therapy can be sequentially varied, e.g., HSP-antigenic molecule complexes may be administered at one time and HSP-antigenic molecule-sensitized APC another time. Alternatively, HSP-antigenic molecule complexes may be administered concurrently with HSP-antigenic molecule-sensitized APC. Preferably, the APC and complexes are administered to the patient within 1 week of each other.

Kits of the compositions disclosed herein include in a first container a pharmaceutical composition comprising a complex of a HSP noncovalently bound to an antigenic molecule and a pharmaceutically acceptable carrier; and in a second container antigen presenting cells. HSP-antigenic molecule complexes may be formulated into pharmaceutical preparations for administration as described above. Compositions may include a compound

WO 02/057795

PCT/US02/01566

formulated in a compatible pharmaceutical carrier prepared, packaged, and labeled for treatment of the indicated bone infectious disease. Alternatively, pharmaceutical compositions may be formulated for treatment of appropriate bone infectious diseases.

5 The compositions may, if desired, be presented in a pack or dispenser device which may contain one or more unit dosage forms containing the active ingredient. The pack may for example comprise metal or plastic foil, such as a blister pack. The pack or  
10 dispenser device may be accompanied by instructions for administration.

Kits for carrying out the therapeutic regimens disclosed herein are also provided. Such kits comprise in a first one or more containers therapeutically or prophylactically effective amounts of  
15 the HSP-antigenic molecule complexes, preferably purified, in pharmaceutically acceptable form; and in a second container the sensitized APC, preferably purified. The HSP-antigenic molecule complex in a vial of a kit may be in the form of a pharmaceutically acceptable solution, e.g., in combination with sterile saline,  
20 dextrose solution, or buffered solution, or other pharmaceutically acceptable sterile fluid. Alternatively, the complex may be lyophilized or desiccated; in this instance, the kit optionally further comprises in a container a pharmaceutically acceptable solution (e.g., saline, dextrose solution, etc.), preferably sterile, to  
25 reconstitute the complex to form a solution for injection purposes.

In another embodiment, a kit disclosed herein further comprises a needle or syringe, preferably packaged in sterile form, for injecting the complex, and/or a packaged alcohol pad. Instructions are optionally included for administration of HSP-  
30 antigenic molecule complexes by a clinician or by the patient.

WO 02/057795

PCT/US02/01566

The methods and the compositions and the use thereof are better understood by the following non-limiting examples.

**Example 1.****Experimental**

5 Bone samples obtained from healthy and compromised subjects were weighed and transferred to 50 ml Falcon tubes. Phosphate buffer saline (PBS) were added to the bone samples to obtain a weight (g) to volume (ml) ratio of 0.4+0.2. Samples were agitated and partially ground using the "Tissue Tearer" at rotor  
10 setting 1 (4500-8000 rpm) for 1 minute and rotor setting 3 (12,000-17,000 rpm) for another minute. To increase extraction efficiency, the bone samples were stored in Falcon tubes for 9 days at 4°C. Lipids and large debris were avoided as 1 ml of each sample are transferred to an Eppendorf tube. Any debris were cleared out by  
15 centrifuging the samples at 15,000 rpm for 10 minutes.

The samples were analyzed using first SDS-PAGE, then the Protein 200 Assay on the Agilent 2100 Bioanalyzer. Some samples that did not produce satisfactory results (often indicated by a missing upper marker) were desalted and rerun on the  
20 Bioanalyzer. Samples were desalted by using YM-3 Centricon tubes spun at 4200x g for approximately 1.5 hours. The Centricon filters were inverted and spun at 1000x g for 3 minutes. The samples were reconstituted to their original volume with 22 mM Tris.

**Results**

25 A SDS-PAGE was conducted on bone extracts from a control healthy patient. Slab gel electrophoresis of samples against a ladder of known proteins suggested good separation. The Protein 200 assay was then used with the Bioanalyzer with a series of  
30 extracts. The results show the stronger presence of bands in the 45-65 kDa range for samples obtained from compromised patients.

WO 02/057795

PCT/US02/01566

Because the presence of salts is known to interfere with the assay and that the extracts used in this study were produced in phosphate buffer saline solution, a follow-up experiment was designed to address the potential salt problem. First, a filtration step was added to remove salts from the samples. Furthermore, extraction was conducted with deionized water, instead of with PBS. The changes yielded an improved separation, and the upper marker became visible in some of the samples.

This study provided two methods for identifying proteins in bone extracts: the traditional SDS-PAGE gel electrophoresis and the Protein 200 Chip Assay. The latter technique is more sensitive than the former and this could be beneficial in detecting proteins produced at low levels. The data indicates there is an association between compromised bone sampler and electrophoretic bands in the 45-65 kDa region.

#### *Immunoblotting*

Samples separated on one-or two-dimensional SDS-PAGE will be electroblotted onto Immobilon P, polyvinylidene difluoride membranes (Millipore Corp., Bedford, MA) overnight (Laemmli, 1970). Membranes will be washed with PBS containing 0.1% Triton X-100 (Sigma Immunochemicals) (PBS-T) and blocked with PBS-T containing 2% FCS (blocking buffer) (SeraLab). Blocked membranes will then be incubated with the test antibody (in blocking buffer) for 1 hr. and washed with PBS-T. Bound test-antibody (anti-mouse) IgG (gamma-chain specific) (Sigma Immunochemicals) at 1: 1,000 in PBS-T 2% FCS. After a final wash the blots will be developed with a solution of 1 mg/ml 3,3 prime-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma Immunochemicals) in 50 mM Tris (Sigma Immunochemicals), pH 7.6, containing 150 mM NaCl (BDI-I) and 0.05% hydrogen

WO 02/057795

PCT/US02/01566

peroxide (Sigma Immunochemicals). Each reaction will be terminated by extensive rinsing with distilled water.

*Protein purification*

Crude BS will be fractionated at 4° C on a Q-Sepharose anion exchange column (50 cm times 1.6 cm). The column will be equilibrated in 20 mM Tris-HCl, pH 8.5 (buffer A), and the BS (generally 100400 mg) will be loaded on in the same buffer. The column will be washed with 500 ml of buffer A and then eluted with a 1,000-ml linear gradient of 0-1 M NaCl in buffer A. Ten-ml fractions will be collected, and the absorbance at 280 nm will be monitored. The location of the osteolytic chaperone protein will be determined by a combination of activity assay, SDS-PAGE, and the Western blot analysis. Fractions containing osteolytic activity will be dialyzed against deionized water to remove salt and lyophilized. The fraction with the highest specific activity and the least number of protein bands on SDS-PAGE will then be further fractionated at room temperature on a second anion exchange column.

The purity of the fractions will again be assessed visually by SDS-PAGE and 100 µg of the cleanest fraction will be dialyzed against 50 mM of Tris buffer, pH 7.6 containing 10 mM MgCl<sub>2</sub> (buffer C). This sample will be run on a 5-ml ATP-Sepharose (Sigma Immunochemicals) column. The column will be washed with 10 column volumes of butter C and bound protein eluted in 5 column volumes of 5mM ATP (Sigma Immunochemicals), also in buffer C. Protein will be located by SDS-PAGE and visualized using a silver stain kit (Sigma Immunochemicals). Gel filtration will be used to determine the molecular mass range of the osteolytic chaperone protein isolated by ATP-affinity chromatography. This will be done by running the purified protein on a Bio-Sil TSK250 (Bio Rad Laboratories) column in 0.1 M

WO 02/057795

PCT/US02/01566

sodium phosphate buffer, pH 6.7, and measuring absorption at 205/280 nm.

*Specific Aim #3: Data analysis and correlation to clinical outcome variables*

5 The experimental findings and clinical bone densitometry and Q-CT measurements will be documented with the use of a standardized relational computer database using a numerical code system. The computer program SPSS/PC+9.0 (SPSS Inc., 44 N. Michigan Ave., Chicago, IL 60611) will be used for statistical  
10 analysis of the compiled data. Descriptive statistics of the raw data will be done with the use of frequency tables. Normal distribution will be determined by fitting to normality and by obtaining normal probability plots, where the ranked observed residuals (deviation from the mean) are plotted on the x-axis  
15 against the standardized values of the normal distribution on the y-axis. Normal distribution is indicated if the observed residuals fall onto the straight line. Significant differences between means were evaluated with the use of a *T-test* for dependent and independent samples, and *one-way* ANOVA analysis of variance.  
20 In case of a statistically significant F-Test from an ANOVA using multivariate variables, the contributing means will be differentiated by post-hoc comparison using a *Tukey HSD* test for unequal sample sizes. The use of the latter two tests will allow to determine the occurrence of the various Chaperone Molecules and  
25 the presence of an osteopenic bone sample according to the patients age and gender and other concomitant medical conditions. In essence, this test will allow us to identify the predominant chaperone molecule correlating with osteopenia.

A cross tabulation method will be used to measure the  
30 relationships between osteopenia, age, gender, other contributing factors, and the presence of chaperone molecules by generating multiple-way frequency tables. For each possible combination of

WO 02/057795

PCT/US02/01566

these variables, these tables yield a cell frequency, i.e., the number of cases in the patient population that had this particular combination. In addition, the cross tabulation method will allow to evaluate the reliability of the test, in other words, the statistical significance of these relationships. Hence, the presence of

5 osteopenia, age, gender, other contributing factors such as medical conditions are categorical variables. Multiple simultaneous relations and interactions between the variables of the multipleway frequency table will be examined on the basis of log-

10 linear equations, which allow computation of the cell frequencies that would have been expected if the variables involved were unrelated. This will be done with the use of an interactive proportional fitting procedure. Thus, significant deviations of the observed from the expected frequencies will reflect a statistically

15 significant relationship between a specific chaperone molecule and osteopenia. Significance testing of deviations of the observed from the expected frequencies will be done via a *Pearson Chi-square* test. The residual frequencies will be calculated by subtracting the expected frequencies from the observed frequencies. If no

20 relationship exists, all residual frequencies are expected to consist of positive and negative values of similar magnitude and to be evenly distributed across the cells of the frequency table. Plotting the residuals is therefore used as another means of assessing correlations between the presence of chaperone molecules with

25 osteopenia. In all statistical tests employed in this study, a significance level of  $p < 0.05$  will be chosen.

We claim:

1. A method of detecting osteoporosis in a mammalian comprising:
  - a) obtaining a sample of a bone related tissue or cells; and
  - b) measuring the concentration of at least one marker selected from the group consisting of infectious agents, infectious agent produced factors, and heat shock proteins (HSPs).
2. The method of claim 1 further comprising comparing the concentration of a first assay with concentrations of a second or more assays from the same individual over a period of time or against a standard concentration.
3. The method of claim 1 wherein the bone related tissue or cells are obtained under conditions that do not induce a HSP response in the mammalian subject.
4. The method of claim 3 wherein the HSP is selected from the group consisting of HSP 70, HSP 60, HSP 90, gp 96, cpn10, cpn20, ubiquitin, and cpn 80.
5. The method of claim 2 wherein the time period between the first assay and the second assay is at least about 12 hours.
6. The method of claim 1 wherein the sample comprises bone cells or body fluid.
7. The method of claim 3 wherein the HSP is HSP 60.
8. The method of claim 3 wherein the HSP is HSP 70.
9. The method of claim 3 wherein the HSP is ubiquitin.
10. The method of claim 3 wherein the concentration of HSP is measured using an immunoassay.
11. The method of claim 3 wherein the concentration of HSP is measured using an assay for a nucleotide molecule encoding HSP.
12. The method of claim 1 wherein the pathogen is selected from the group consisting of bacteria, viruses, protozoa, parasites and fungi.

13. The method of claim 1 wherein the pathogen is selected from the group consisting of bacterial produced factors, viral produced factors, protozoal produced factors, parasitic produced factors and fungal produced factors.
14. The method of claim 12 wherein the bacteria is selected from the group consisting of *Staphylococcus aureus*, *Porphyromonas gingivallis*, *Eikenella corrodens*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitis*, *Mycobacterial tuberculosis*, *Haemophilus influenzae*, *Pasteurella multocida*, *B. bronchiseptica*, and *Fusobacterium nucleatum*.
15. The method of claim 1 wherein the pathogen is a bacteria produced factor selected from the group consisting of endotoxin-LPS, gapstatin, and dermonecrotic toxin (DNT).
16. The method of claim 15 wherein the factor is selected from the group consisting of gapstatin and dermonecrotic toxin.
17. The method of claim 15 wherein the factor is gapstatin.
18. The method of claim 15 wherein the factor is dermonecrotic toxin.
19. The method of claim 14 wherein the bacteria is selected from the group consisting of *Staphylococcus aureus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bordetella bronchiseptica*, and *Fusobacterium nucleatum*.
20. A method of treating or preventing osteoporosis caused by an infectious agent, an infectious agent produced factor, or a bone disease comprising administering to a mammalian subject a therapeutically effective amount of a formulation selected from the group consisting of an HSP antigenic formulation and an infectious agent antigenic formulation.

WO 02/057795

PCT/US02/01566

21. The method of claim 20 wherein the bone disease is induced by bone infectious agents selected from the group consisting of viruses, bacteria, fungi, protozoa and parasites.
22. The method of claim 20 wherein the HSP is complexed with an antigenic material or formulated in combination with an adjuvant.
23. The method of claim 20 wherein the antigenic material is a peptide or a protein having an antigenic determinant of a virus, bacteria, fungi, protozoa or parasite that induces a bone disease.
24. The method of claim 21 wherein the antigenic material includes an antigenic determinant of a virus selected from the group consisting of immunodeficiency virus type I (HIV-I), human immunodeficiency virus type II (HIV-II), hepatitis type A, hepatitis type B, hepatitis type C, influenza, Varicella, adenovirus, herpes simplex type I (HSV-I), herpes simplex type II (HSV-II), rinderpest, rhinovirus, echovirus, rotavirus, respiratory syncytial virus, papilloma virus, papova virus, cytomegalovirus, echinovirus, arbovirus, huntavirus, coxsackie virus, mumps virus, measles virus, rubella virus and polio virus.
25. The method of claim 20 wherein the HSP is selected from the group consisting of HSP 60, HSP 70, HSP 90, gp 96, cpn 10, cpn 20, ubiquitin, cpn 30, and combinations thereof.
26. The method of claim 20 wherein the osteoporosis is osteopenia.
27. The method of claim 20 wherein the osteoporosis is caused by a bacteria or a bacteria produced factor.
28. A kit for use in the method of claims 1-19.
29. A pharmaceutically acceptable composition for administration to a patient for use in the method of claims 20-27.

## 【国際公開パンフレット(コレクション)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
25 July 2002 (25.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/057795 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 33/68, C12Q 1/68, G01N 33/569, A61P 19/00
- (21) International Application Number: PCT/US02/01566
- (22) International Filing Date: 17 January 2002 (17.01.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
60/263,109 19 January 2001 (19.01.2001) US  
60/304,887 12 July 2001 (12.07.2001) US
- (71) Applicant: CAMBRIDGE SCIENTIFIC, INC.  
[US/US]; 180 Fawcett Street, Cambridge, MA 02138 (US).
- (72) Inventors: LEWANDROWSKI, Kai-Uwe; 423 Washington Street #6, Brookline, MA 02146 (US); TRANTOLO, Debra, J.; 28 Radford Road, Princeton, MA 01541 (US).
- (74) Agents: PABST, Patrea, L. et al.; Holland & Knight LLP, Suite 2000, One Atlantic Center, 1201 West Peachtree Street, Atlanta, GA 30309-3400 (US).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KL, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
— with international search report  
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- (88) Date of publication of the international search report: 14 August 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

WO 02/057795 A3

(54) Title: METHODS OF DIAGNOSIS AND TREATMENT OF OSTEOPOROSIS

(57) Abstract: A method of detecting osteoporosis in a mammalian is disclosed herein which includes: a) obtaining a sample of a bone related tissue or cells; and b) measuring the concentration of at least a marker which is either bacteria, bacteria produced factors, or HSPs. The method may further include comparing the concentration with concentrations from the same individual over a period of time or against a standard concentration. The marker may be a bacteria, a chaperone molecule, or a bacteria produced. The method may include a first assay and a second assay over a period for example of at least about 12 hours. The concentration of HSP can be measured using an immunoassay. The assay may use a nucleotide molecule encoding HSP. Also provided herein is a method of treating or preventing osteoporosis caused by a bone disease which includes administering to a mammalian subject a therapeutically effective amount of a formulation which is either an HSP antigenic formulation or a bacterial antigenic formulation.

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 02/01566
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 C1201/68 G01N33/569 A61P19/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C120		
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) BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 232 833 A (STRESSGEN BIOTECHNOLOGIES CORPORATION) 3 August 1993 (1993-08-03) cited in the application column 8, line 14 - line 41 column 14, line 20 - line 60 column 16 -column 18 ---	28
X	US 5 830 464 A (FORDHAM UNIVERSITY) 3 November 1998 (1998-11-03) cited in the application column 5, line 64 -column 6, line 19 column 10, line 53 -column 11, line 9 column 16, line 59 -column 18, line 15 column 22, line 64 -column 25, line 23 --- -/--	29
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but called to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 January 2003	Date of mailing of the international search report 25.06.03	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P. B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Thumb, W	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internal Application No PCT/US 02/01566
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indicator, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>stimulate bone resorption."            NAIR S P ET AL: "Molecular chaperones            stimulate bone resorption."            CALCIFIED TISSUE INTERNATIONAL,            vol. 64, no. 3, March 1999 (1999-03),            pages 214-218, XP002228943            ISSN: 0171-967X            cited in the application            the whole document            ---</p>	1-11, 20, 22, 24-26, 28, 29
Y	<p>REDDI KRISANAVANE ET AL: "The Escherichia            coli Chaperonin 60 (groEL) is a potent            stimulator of osteoclast formation."            JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH,            vol. 13, no. 8, August 1998 (1998-08),            pages 1260-1266, XP009004848            ISSN: 0884-0431            the whole document            ---</p>	1-11, 20, 22, 24-26, 28, 29
A	<p>EP 0 557 663 A (CENTRE DE RECHERCHES EN            RHUMATOLOGIE)            1 September 1993 (1993-09-01)            abstract            page 1, line 1-24            page 2, line 7 - line 23            ---</p>	1-29
A	<p>WO 00 13024 A (MEDVET SCIENCE PTY LTD.)            9 March 2000 (2000-03-09)            abstract            page 3, line 22 -page 4, line 32            claims 1-16            ---</p>	1-29
A	<p>WO 00 22437 A (HYBRITECH INCORPORATED)            20 April 2000 (2000-04-20)            abstract            page 1, line 12 - line 22            page 2, line 32 -page 4, line 26            -----</p>	1-29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US 02/01566
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
<p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 1-27 because they relate to subject-matter not required to be searched by this Authority, namely: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210</p>	
<p>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</p>	
<p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
see additional sheet	
<p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.</p>	
<p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.</p>	
<p>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</p>	
<p>4. <input checked="" type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims, it is covered by claims Nos.: 1-11, 20, 22, 24-26, 28, 29 (all partial)</p>	
<p><b>Remark on Protest</b></p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

International Application No. PCT/US 02 01566

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

Continuation of Box I.1

Although claim(s) 1-19 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body ("...obtaining a sample of bone related tissue or cells..."), the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claims 20-27 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

-----  
Continuation of Box I.1

Claims Nos.: 1-27

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy (Claims 20-27)

Rule 39.1(iv) PCT - Diagnostic method practised on the human or animal body (Claims 1-19)

International Application No. PCT/US 02 01566

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-11, 20, 22, 24-26, 28, 29 (all partially)

A method of detecting osteoporosis in a mammalian comprising the step of measuring the concentration of a marker, wherein the marker is a heat shock protein (HSP). A method of treating or preventing osteoporosis comprising administering an effective amount of a formulation comprising an HSP antigenic formulation to a subject. Kit and formulation for performing the afore-mentioned methods.

2. Claims: 1-3, 5, 6, 12, 14, 19-21, 23, 24, 26-29 (all partially)

A method of detecting osteoporosis in a mammalian comprising the step of measuring the concentration of a marker, wherein the marker is an infectious agent. A method of treating or preventing osteoporosis comprising administering an effective amount of a formulation comprising an infectious agent antigenic formulation to a subject. Kit and formulation for performing the afore-mentioned methods.

3. Claims: 1-3, 5, 6, 13, 15-18, 20, 21, 27-29 (all partially)

A method of detecting osteoporosis in a mammalian comprising the step of measuring the concentration of a marker, wherein the marker is an infectious agent produced factor. A method of treating or preventing osteoporosis comprising administering an effective amount of a formulation comprising an infectious agent produced factor antigenic formulation to a subject. Kit and formulation for performing the afore-mentioned methods.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				Internat	Application No			
Invention on patent family members				PCT/US 02/01566				
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date				
US 5232833	A	03-08-1993	AU 4228489 A	02-04-1990				
			CA 1335558 A1	16-05-1995				
			WO 9002947 A1	22-03-1990				
			US 5780246 A	14-07-1998				
			US 5807690 A	15-09-1998				
			US 5464750 A	07-11-1995				
US 5830464	A	03-11-1998	AU 742986 B2	17-01-2002				
			AU 6056498 A	26-08-1998				
			EP 1001807 A1	24-05-2000				
			JP 2001511183 T	07-08-2001				
			WO 9834642 A1	13-08-1998				
			US 6322790 B1	27-11-2001				
EP 0557663	A	01-09-1993	EP 0557663 A1	01-09-1993				
			AT 152525 T	15-05-1997				
			DE 69219451 D1	05-06-1997				
			DE 69219451 T2	23-10-1997				
			ES 2103906 T3	01-10-1997				
			JP 3053503 B2	19-06-2000				
			JP 6078788 A	22-03-1994				
			US 6004765 A	21-12-1999				
			WO 0013024	A	09-03-2000	AU 5720999 A	21-03-2000	
						WO 0013024 A1	09-03-2000	
WO 0022437	A	20-04-2000	JP 2002527752 T	27-08-2002				
			WO 0022437 A1	20-04-2000				

## フロントページの続き

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, 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, MZ, 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 レワンドロウスキ, カイ - ウウェ  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02146, ブルックライン, ワシントン ストリート  
423 ナンバー6

(72) 発明者 トラントロ, デブラ ジェイ.  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01541, プリンストン, ラドフォード ロード 2  
8

F ターム(参考) 2G045 AA29 BB20 BB51 CB01 CB17 DA36 FB03 FB05 JA01  
4B063 QA19 QQ02 QQ03 QQ79 QR48 QS33  
4C084 AA01 AA02 BA41 CA17 NA14 ZA972

专利名称(译)	诊断和治疗骨质疏松症的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005503533A</a>	公开(公告)日	2005-02-03
申请号	JP2002558025	申请日	2002-01-17
[标]申请(专利权)人(译)	剑桥科学公司		
申请(专利权)人(译)	剑桥科学公司		
[标]发明人	レワンドロウスキカイウウエ トランドロデブラジェイ		
发明人	レワンドロウスキ, カイ-ウウエ トランドロ, デブラ ジェイ.		
IPC分类号	A61K38/00 A61K38/16 A61P19/00 A61P19/10 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/569 G01N33/68		
CPC分类号	A61K38/16 A61P19/00 A61P19/10 C12Q1/6883 C12Q2600/156 G01N33/5005 G01N33/5091 G01N33/569 G01N33/68 G01N33/6893 G01N2800/108 Y02A50/465 Y02A50/473 Y02A50/481		
FI分类号	G01N33/68 A61P19/10 C12Q1/02 G01N33/53.D A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA29 2G045/BB20 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/JA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QS33 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/BA41 4C084/CA17 4C084/NA14 4C084/ZA972		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/263109 2001-01-19 US 60/304887 2001-07-12 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本文公开了一种用于检测哺乳动物的骨质疏松症的方法。该方法包括：  
a) 获得骨相关组织或骨相关细胞的样品；b) 测量选自细菌，细菌产生的因子和HSP的至少一种标记物的浓度。该方法可以进一步包括在一段时间或标准浓度下将来自相同个体的第一种测定的浓度与第二次或后续测定的浓度进行比较的步骤。该标记可以是细菌，分子伴侣分子或产生的细菌。该方法包括，例如，在至少约12小时的时间段内的第一次测定和第二次测定。可以使用免疫测定来测量HSP的浓度。

疾患	生物
歯周病 (Schluger ろ , 1990)	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> <i>Porphyromonas gingivallis</i> <i>Eikenella corrodens</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Prevotella inter-media</i> <i>Campylobacter rectus.</i>
骨髓炎 (Jaffe, 1972; Schmid, 1993)	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Salmonella spp.</i> <i>Escherichia coli, など</i>
細菌關節炎 (Ho, 1993; Livneh ろ , 1983)	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Neisseria gonorrhoea</i> <i>Neisseria meningitis</i> <i>Mycobacterial tuberculosis</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Pasteurella multocida, など</i>
感染金屬移植片 (Ross, 1991)	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>