

(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2012-508865  
(P2012-508865A)

(43) 公表日 平成24年4月12日(2012.4.12)

(51) Int.Cl.

**GO1N 33/53** (2006.01)  
**GO1N 37/00** (2006.01)  
**C07K 7/04** (2006.01)  
**C07K 14/47** (2006.01)

F 1

GO1N 33/53  
GO1N 37/00  
C07K 7/04  
C07K 14/47

ZNAN  
102テーマコード (参考)  
4H045

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 60 頁)

(21) 出願番号 特願2011-535211 (P2011-535211)  
(86) (22) 出願日 平成21年11月12日 (2009.11.12)  
(85) 翻訳文提出日 平成23年6月22日 (2011.6.22)  
(86) 國際出願番号 PCT/IL2009/001066  
(87) 國際公開番号 WO2010/055510  
(87) 國際公開日 平成22年5月20日 (2010.5.20)  
(31) 優先権主張番号 61/113,645  
(32) 優先日 平成20年11月12日 (2008.11.12)  
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 503202608  
イエダ リサーチ アンド ディベロプメント カンパニー リミテッド  
イスラエル 76100 リホボット、  
ピオー ボックス 95、 アット ザ  
ウェイマン インスティテュート オブ  
サイエンス  
(71) 出願人 511113486  
ザ ブライアム アンド ウィメンズ ホスピタル、 インコーポレイテッド  
アメリカ合衆国、 マサチューセッツ州 02115、 ボストン、 エイチアイエム  
730, 77 アベニュー ルイス パス  
ツール

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】多発性硬化症の診断

## (57) 【要約】

本発明は、被験体において多発性硬化症(MS)を診断するための方法およびキットに関する。特に、本発明は被験体において、再発寛解型MS(RRMS)、二次性進行型MS(SPPMS)、一次性進行型MS(PPMS)ならびにパターンIおよびパターンII MS病変から選択されるMS病変の病理学的サブタイプから選択されるMSのサブタイプを診断するための方法およびキットに関する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

被験体において多発性硬化症（M S）のサブタイプを診断する方法であって、前記被験体から獲得された試料中の抗体の、表1～4に列挙される抗原からなる群より選択される複数の抗原に対する反応性を決定すること、これにより、前記試料の前記複数の抗原に対する反応性パターンを決定すること、前記試料の反応性パターンを対照反応性パターンと比較することを含み、前記M Sのサブタイプは、下記からなる群より選択される、方法：

(i) 再発寛解型多発性硬化症（R R M S）（前記複数の抗原が、表1に列挙される抗原からなる群より選択される）、

(i i) 一次性進行型多発性硬化症（P P M S）（前記複数の抗原が、表2に列挙される抗原からなる群より選択される）、

(i i i) 二次性進行型多発性硬化症（S P M S）（前記複数の抗原が、表3に列挙される抗原からなる群より選択される）、ならびに

(i v) パターンI 病変およびパターンII 病変から選択されるM Sの病理学的サブタイプ（前記複数の抗原が、表4に列挙される抗原からなる群より選択される）。

**【請求項 2】**

前記被験体から獲得された前記試料の反応性パターンと対照試料の反応性パターンとの有意差は、前記被験体が前記M Sのサブタイプを患うことを示す、請求項1に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記差は学習およびパターン認識アルゴリズムを使用して計算される、請求項2に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記複数の抗原は表1に列挙される抗原から選択され、前記対照反応性パターンは健康な被験体から獲得される、被験体において再発寛解型多発性硬化症（R R M S）を診断するための請求項1に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記複数の抗原は、表1に列挙される前記抗原の少なくとも5つの異なる抗原を含む、請求項4に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記複数の抗原は、表1に列挙される前記抗原を全て含む、請求項4に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記複数の抗原は、約130以下の抗原を含む、請求項4に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記複数の抗原は表2に列挙される前記抗原から選択され、前記対照反応性パターンは健康な被験体から獲得される、被験体において一次性進行型多発性硬化症（P P M S）を診断するための請求項1に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記複数の抗原は、表2に列挙される前記抗原の少なくとも5つの異なる抗原を含む、請求項8に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記複数の抗原は、表2に列挙される前記抗原を全て含む、請求項8に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記複数の抗原は、約100以下の抗原を含む、請求項8に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記複数の抗原は表3に列挙される前記抗原から選択され、前記対照反応性パターンはR R M S 被験体から獲得される、被験体において二次性進行型多発性硬化症（S P M S）を診断するための請求項1に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記複数の抗原は、表3に列挙される前記抗原の少なくとも5つの異なる抗原を含む、

10

20

30

40

50

請求項 1 2 に記載の方法。

**【請求項 1 4】**

前記複数の抗原は、表 3 に列挙される前記抗原を全て含む、請求項 1 2 に記載の方法。

**【請求項 1 5】**

前記複数の抗原は、約 100 以下の抗原を含む、請求項 1 2 に記載の方法。

**【請求項 1 6】**

前記複数の抗原は表 4 に列挙される前記抗原から選択され、前記対照反応性パターンはパターン I I 病変を有する被験体から獲得される、MS を有する被験体においてパターン I 病変を診断するための請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 1 7】**

前記複数の抗原は表 4 に列挙される前記抗原から選択され、前記対照反応性パターンはパターン I 病変を有する被験体から獲得される、MS を有する被験体においてパターン I 病変を診断するための請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 1 8】**

前記対照は、少なくとも 1 つの個体由来の試料、一組の個体由来の対照試料のパネル、および対照個体由来の保存データセットからなる群より選択される、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 1 9】**

前記試料は血清試料である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 2 0】**

前記試料中の抗体の反応性を決定する前に、前記試料を 1 : 10 に希釈することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 2 1】**

前記複数の抗原は抗原アレイの形態で使用される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 2 2】**

( i ) 表 1 に列挙される前記抗原からなる群より選択される R RMS を診断するための複数の抗原、

( i i ) 表 2 に列挙される前記抗原からなる群より選択される R RMS を診断するための複数の抗原、

( i i i ) 表 3 に列挙される前記抗原からなる群より選択される S P M S を診断するための複数の抗原、および / または

( i v ) 表 4 に列挙される前記抗原からなる群より選択される、MS を有する被験体においてパターン I 病変とパターン I I 病変の間で区別するための複数の抗原、を含む、MS のサブタイプを診断するためのキット。

**【請求項 2 3】**

表 1 に列挙される前記抗原からなる群より選択される複数の抗原を含む、R RMS を診断するための請求項 2 2 に記載のキット。

**【請求項 2 4】**

表 1 に列挙される前記抗原を全て含む、請求項 2 3 に記載のキット。

**【請求項 2 5】**

前記複数の抗原は、表 1 に列挙される前記抗原の、少なくとも 5 、少なくとも 10 または少なくとも 15 の異なる抗原を含む、請求項 2 3 に記載のキット。

**【請求項 2 6】**

表 2 に列挙される前記抗原からなる群より選択される複数の抗原を含む、P P M S を診断するための請求項 2 2 に記載のキット。

**【請求項 2 7】**

表 2 に列挙される前記抗原を全て含む、請求項 2 6 に記載のキット。

**【請求項 2 8】**

前記複数の抗原は、表 2 に列挙される前記抗原の、少なくとも 5 、少なくとも 10 または少なくとも 15 の異なる抗原を含む、請求項 2 6 に記載のキット。

10

20

30

40

50

**【請求項 2 9】**

表 3 に列挙される前記抗原からなる群より選択される複数の抗原を含む、S P M S を診断するための請求項 2 2 に記載のキット。

**【請求項 3 0】**

表 3 に列挙される前記抗原を全て含む、請求項 2 9 に記載のキット。

**【請求項 3 1】**

前記複数の抗原は、表 3 に列挙される前記抗原の、少なくとも 5、少なくとも 10 または少なくとも 15 の異なる抗原を含む、請求項 2 9 に記載のキット。

**【請求項 3 2】**

表 4 に列挙される前記抗原からなる群より選択される複数の抗原を含む、M S を有する被験体においてパターン I 病変とパターン II 病変の間で区別するための請求項 2 2 に記載のキット。 10

**【請求項 3 3】**

抗原アレイの形態である、請求項 2 2 記載のキット。

**【請求項 3 4】**

試料中の抗体の、前記複数の抗原に対する反応性を決定するための手段をさらに含む、請求項 2 2 記載のキット。

**【請求項 3 5】**

異なる試料中の抗体の前記複数の抗原に対する反応性パターンを比較するための手段をさらに含む、請求項 2 2 記載のキット。 20

**【請求項 3 6】**

反応性パターンを比較するための前記手段は、学習およびパターン認識アナライザーを含む請求項 3 5 記載のキット。

**【請求項 3 7】**

表 1 に列挙される抗原プローブを含む抗原プローブセット。

**【請求項 3 8】**

表 2 に列挙される抗原プローブを含む抗原プローブセット。

**【請求項 3 9】**

表 3 に列挙される抗原プローブを含む抗原プローブセット。

**【請求項 4 0】**

表 4 に列挙される抗原プローブを含む抗原プローブセット。 30

**【請求項 4 1】**

請求項 3 7 ~ 4 0 のいずれか一項記載の抗原プローブセットを含む製造物品。

**【請求項 4 2】**

M S のサブタイプを診断するための診断組成物を調製するための抗原プローブセットの使用であって、前記抗原プローブセットは表 1 ~ 4 の 1 つに列挙される抗原からなる群より選択される複数の抗原を含み、前記 M S のサブタイプは、

( i ) R R M S ( 前記複数の抗原が、表 1 に列挙される前記抗原からなる群より選択される )、

( i i ) P P M S ( 前記複数の抗原が、表 2 に列挙される前記抗原からなる群より選択される )、

( i i i ) S P M S ( 前記複数の抗原が、表 3 に列挙される前記抗原からなる群より選択される )、ならびに

( i v ) パターン I 病変およびパターン II 病変から選択される M S の病理学的サブタイプ ( 前記複数の抗原が、表 4 に列挙される前記抗原からなる群より選択される ) からなる群より選択される、使用。

**【請求項 4 3】**

前記診断組成物は、試料中の抗体の反応性を決定し、よって前記複数の抗原に対する前記試料の反応性パターンを決定するために使用され、前記試料の前記反応性パターンと対照試料の反応性パターンとの有意差は、M S のサブタイプを示す、請求項 4 2 記載の使用

10

20

30

40

50

。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、被験体において多発性硬化症（MS）を診断するための方法およびキットに関する。特に、本発明は被験体においてMSのサブタイプを診断するための方法およびキットに関し、サブタイプは、再発寛解型MS（RRMS）、二次性進行型MS（SPMS）、一次性進行型MS（PPMS）ならびにパターンIおよびパターンII MS病変から選択されるMS病変の病理学的サブタイプから選択される。10

【背景技術】

【0002】

多発性硬化症（MS）は、推定される自己免疫性病因の中枢神経系（CNS）の慢性炎症性疾患である。MSは、進行性神経機能障害に至る脳および脊髄内の局所性病変（plaques）により特徴づけられる。MSの病因はわかっていないが、遺伝的要因および環境要因の組み合わせの結果であると考えられている。現在のところ、MSを診断するための特異的な試験は存在せず、診断は、被験体の臨床的病歴の認識にかかっている。診断は、脳および脊髄のMRI、脳脊髄液の分析、ならびに視覚および体性感覚路の誘発電位研究によりサポートすることができる。さらに、同様の症状を伴う全身性または感染性病因は排除されなければならない。多発性硬化症は予測不能に進行し、退行し得るが、いくつかの症状のパターンがある。約85～90%の患者が再発寛解型（RRMS）過程で始まり、40%が最終的には進行性（二次性進行型MS、SPMS）となり、10%で、MSは一次性進行型過程（PPMS）を表す。異なるMSサブタイプは、疾患の過去の過程（例えば、神経減少の予測不能な再発、寛解および進行）により特徴づけられる。臨床的観点から、異なる疾患過程を有する患者は、異なる治療応答を示す。例えば、再発寛解型MSを有する患者は、進行性疾患過程を有する患者よりも免疫調節療法に応答し易い（Bitsch and Bruck, CNS Drugs, 2002;16(6):405-18）。このように、MSサブタイプを特徴づけることは、予後だけでなく、治療決定のために重要である。20

【0003】

MSは、臨床症状および進行速度においてだけでなく、療法に対するその応答および病理組織学的所見において不均一である（Lucchinetti et al., 2000, Ann Neurol 47, 707-17）。活動性脱髓パターンは、ある所定のMS患者から検査した多発性病変間で同一であるが、患者間で不均一であり、病原不均一が示唆される。パターンIはT細胞/マクロファージ媒介脱髓により特徴づけられる。パターンIIは、抗体/補体関連脱髓により特徴づけられる。パターンIIIは、遠位オリゴデンドログリオパチーにより規定され、パターンIVは、プラーカ周囲白質におけるオリゴデンドロサイト変性により特徴づけられ、今まで、パターンIVは、剖検例においてのみ同定されている。パターンIおよびII病変は、MS病変の病理学的特徴であり、古典的自己免疫機構の結果であると考えられる典型的な静脈周囲分布および鋭い境界を示す（Lucchinetti, et al., 2004, Ann Neurol 56, 308）。インビボでMSを視覚化するためにMRIが一般に使用される。しかしながら、MS病変を研究するためのMRIの使用は限られており、というのも、病変の病理学的組成についての情報を提供することができないからである。臨床学的観点から、パターンIIを有するが、パターンIを有さない患者は、プラスマフェレーシスに応答することが報告されている（Keegan et al., 2005, Lancet 366, 579-82）。このように、プラスマフェレーシスを用いた治療に応答する患者を同定する必要がある。40

【0004】

多発性硬化症（MS）の初期の正確な診断を容易にするためのガイドラインとして、McDonald基準が2001年に導入され、2005年に改訂された（Polman et al., 2006, Ann Neurol.;59(4):727-8）。診断分類は、a) MSを有する、b) MSを有しない

50

、またはc) MSを有する可能性があるに要約される。基準の利点としては、単一症状発症後、または一次性進行型過程の状況のいずれかにおいて、MSの決定的な診断が可能であることが挙げられる。しかしながら、診断分類スキームおよびMRI基準は複雑で退屈なままであり、この複雑さが毎日の実行における使用を制限する。さらに、これらの基準の特異性はかなり低く、他の診断を排除する際の臨床的判断の重要性が強調される。さらに、研究から、標準MS疾患修飾医薬は、これらの診断基準をまだ満たしていない患者に利益をもたらすことができる事が観察された。最後に、McDonald基準は、MS診断に必要な時間を実質的に減少させたが、依然として、MSの可能性があると診断された個体、または最終的にPPMSの診断を受けるものに対しては制限されている。

## 【0005】

10

MSはT細胞媒介疾患と考えられ、いくつかの証拠がその疾患におけるB細胞の役割を支持する(Arbelos et al., 2000, Ann Neurol. 47,

694-706)。B細胞は、それらの抗体およびサイトカイン分泌により、または病原性T細胞を活性化するための抗原提示細胞(APC)として作用することにより、MS進行に寄与する可能性がある。B細胞は、それらが産生する抗体により認識される抗原を処理および提示するのに著しくより効率的である。このように、直鎖BおよびT細胞エピトープは、MSのヒトおよび実験モデルにおいて自己免疫応答により標的されるCNS抗原中に共存する。(Meinl et al., 2006, Ann Neurol. 59, 880-92; Wucherpfennig et al., 1997, J Clin Invest. 100, 1114-22)。

20

## 【0006】

免疫系バイオマーカー

先天および獲得アームの両方における免疫系は、生物学的健康維持系の型として考えることができる。生理学的観点では、免疫系を含む細胞および分子は、炎症を管理するよう に作用すると考えられる(Cohen, 2000, Academic Press, London)。炎症は古典的には、治癒に至る損傷により活性化される集合的過程として規定される。免疫系は、炎症を開始し管理する様式によって、創傷を治癒し、病原体を含み、結合組織の構造を構築し、血管を増殖(新生)または破壊し、ある臓器の再生を誘発し、老化細胞および回復不能なDNA損傷を有する細胞のアポトーシスを活性化し、異常分子の蓄積を分解し、廃棄物を処分し、他の生命活動を実行することにより身体を維持する(Cohen, 2000)。これらの様々な炎症の発現は、新生物、環境傷害および感染、代謝産物、廃棄物および他の中毒の蓄積、ならびに容赦ないエントロピーの進行によるその苛酷な発生後の分解に応答して、生物の完全性を維持する。

30

## 【0007】

MS患者における脳脊髄液(CSF)抗体が、ミエリン自己抗原に対する応答として生成される可能性が、詳細に調査されている。いくつかのCNS抗原と反応する抗体が記載されており、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG)、オリゴデンドロサイト-特異タンパク質(OSP)、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)、プロテオリピドタンパク質(PLP)、ミエリン関連糖タンパク質、2',3'-環状ヌクレオチド3'ホスホジエステラーゼ(CNPase)およびab-クリスタリンに対するものが挙げられる。分析すると、これらの抗体のサブクラスは炎症促進性免疫応答と相關した。これらの自己抗体の多くは、血液中でも検出されている(Lalive et al., 2006, Proc Natl Acad Sci US. 103, 2280-5)。さらに、非ミエリン自己抗原(Annunziata et al., 1999, J Neurol Sci. 168, 32-6; Barned et al., 1995, Neurology. 45, 384-5; Colaco et al., 1987, Clin Exp Immunol. 68, 313-9; Roussel et al., 2000, J Autoimmun. 14,

40

259-65; Spadaro et al., 1999, Mult

Scler. 5, 121-5)および病原体(Cepok et al., 2005, J Clin Invest. 115, 1352-60)と反応するより高い力値の抗体もまたMS患者において見出されている。

50

## 【0008】

M Sにおいて抗体が果たす役割は、依然として、さらなる分類を待っている。M O Gにおける立体構造エピトープTに対する抗体が、M S病変から精製されており、C N S細胞の生理機能を変化させることが示されている(Lalive et al., 2006)。したがって、米国特許出願公開第2005/0009096号はM Sの診断または予後のためにミエリン/M O G構成要素の特異エピトープに対する自己抗体の検出または定量を使用する方法を提供する。

#### 【0009】

C N S抗原中の直鎖エピトープと反応する抗体もまた、M S病変から単離されており(Dalakas, 2006, Pharmacol Ther. 112, 57-70; Genain et al., 1999, Nat Med. 5, 170-5)、それらはまたM S病理において直接的な役割を果たすことが示唆される。さらに、M S患者から単離されたM B Pに対する抗体は、直接的なタンパク質分解活性を有することが示されている(Ponmarenko et al., 2006, Proc Natl Acad Sci US. 103, 281-6)。米国特許出願公開第2003/0092089号は、M B P自己抗体をM B P自己抗体検出するためのアッセイ法、または同時に、M Sおよび関連疾患と関連する他のバイオマーカーの測定に関連する。

10

#### 【0010】

バイオマーカーは、特定の疾患状態に関連する解剖学的、生理学的、生化学的または分子バラメータである。M Sバイオマーカーに対する検索は、炎症過程の一般的な活性の指標に焦点が当てられている。いくつかのバイオマーカーは炎症過程それ自体ではなく、その結果、例えば神経変性および軸索損失を追跡することを目的とする。このように、神経フィラメント軽鎖、タウおよび14-3-3タンパク質のレベル変化がM S患者における軸索損失と相關することが記載されている。

20

#### 【0011】

M Sは臓器特異的自己免疫障害であると考えられるので、免疫バイオマーカーは、疾患活動度およびその療法に対する応答を反映する可能性がある。いくつかの大規模プロトコミクス研究は、M S患者における未だわかっていない自己免疫攻撃の標的を同定することを目的とし、C S Fおよび血清中の抗体のキャラクタリゼーションを試みていた(Lefranc et al., 2004, J Immunol 172, 669-78)。さらに、特異抗体がM Sにおけるバイオマーカーとして調べられており、C S Fおよび/または血清中のミエリン抗原に対するいくつかの上方制御された抗体が同定された。しかしながら、これらのバイオマーカーは、M S患者の大半に対し一般化可能ではなく、または、独立した研究では確認できなかった(Rinaldi and Gallo, 2005, Neurology Sci. 26, S215-7; Lim et al., 2005, Mult Scler. 11, 492-4)。

30

糖尿病(Quintana et al., 2004, Proc Natl Acad Sci, 14615-21)および全身性エリテマトーデス(Li et al., 2005, J Clin Invest. 115, 3428-39)などの他の自己免疫疾患において観察されるものと同様に、単一のバイオマーカーが決定的なものではなく、むしろ、フィンガープリントを形成するいくつかのバイオマーカーのパターンが要求されるであろう。

40

#### 【0012】

##### 抗原チップ

抗原マイクロアレイは、免疫応答のハイスループットキャラクタリゼーションのために新たに開発された手段であり(Robinson et al., 2002, Nat Med 8, 295-301)、ワクチン接種および自己免疫疾患における免疫応答を分析するために使用されている(Robinson et al., 2002; Robinson et al., 2003, Nat Biotechnol. 21, 1033-9; Quintana et al., 2004; Kanter et al., 2006, Nat Med 12, 138-43)。健康および疾患のマウス(Quintana et al., 2004; Quintana et al., 2001, J Autoimmun 17, 191-7)およびヒト(Merbl et al., 2007, J Clin

50

Invest 117, 712-8; Quintana et al., 2003, J Autoimmun 21, 65-75)の自己免疫レパートリーの以前の分析において示されるように、複数の反応性のパターンが単一の抗原 - 抗体関係よりも明らかであり得ること(Quintana et al., 2006, Lupus 15, 428-30)が仮定されている。このように、自己抗体レパートリーは、疾患の原因への両方の新規見識を提供し、疾患過程の免疫バイオマーカー(Cohen, 2007, Nat Rev Immunol. 7, 569-74)として機能する可能性を有する。

#### 【0013】

全身性エリテマトーデス、関節リウマチおよび視神経脊髄炎における血清自己抗体を特徴づけるために抗原マイクロアレイが使用されている。しかしながら、血清中でいずれかの規則性を有する、MSにおける高親和性特異抗体は報告されていない(Meinl et al., 2006, Ann Neurol. 59, 880-92; O'Connor et al., 2007, Nat Med 12, 12; Zhou et al., 2006, Proc Natl Acad Sci US.

10  
103, 19057-62)。血清中の自己抗体とは対照的に、Kanterおよびその仲間はマイクロアレイを使用して、CSF中の脂質(Kanter et al., 2006)およびB-クリスタリン(Ousman et al., 2007, Nature. 448, 474-9)反応性抗体を検出した。著しく、B-クリスタリンに対する抗体は、親和性が低く、1:20希釈で検出可能であった(Ousman et al., 2007)。

#### 【0014】

本発明の発明者らの幾人かへのPCT公開第WO 02/08755号は、疾患の診断または治療のモニタリングが必要な患者被験体由来の血清の決定されていない免疫グロブリンと反応する予め規定された抗原をクラスタリングし、これにより同定するための方法、システムおよび製造物品に関する。公開'755号は、様々な疾患に苦しむ被験体由来の血清の免疫グロブリンと反応する抗原を同定するための抗原アレイの使用を開示する。複数の抗原の抗原サブセットをクラスタリングする工程であって、前記抗原サブセットは、免疫系の障害を有し、疾患に苦しむ複数の患者由来の複数の抗体と反応する工程、および被験体の抗体を得られたクラスターと会合または解離させる工程を含む、診断方法、およびこれらの方において有用なシステムが、さらに開示される。WO 02/08755号は、他の自己免疫疾患の中でMSの診断において有用な方法を開示するが、MSの異なるサブタイプを診断し、またはMSの進行をモニタする開示はない。

#### 【0015】

本発明の発明者らの幾人かへの米国特許出願公開第2005/0260770号は、抗原アレイシステムおよびその診断的使用を開示する。出願は、抗原プローブセットの各抗原プローブに特異的に結合する被験体の免疫グロブリンの能力を決定することを含む、被験体における免疫疾患、特にI型糖尿病、またはその素因の診断方法を提供する。抗原プローブセットは、細胞/組織構造分子の少なくとも一部、熱ショックタンパク質の少なくとも一部、免疫系分子の少なくとも一部、ホモポリマポリペプチドの少なくとも一部、ホルモンの少なくとも一部、代謝酵素の少なくとも一部、微生物抗原の少なくとも一部、軟体動物抗原の少なくとも一部、核酸の少なくとも一部、植物抗原の少なくとも一部、血漿分子の少なくとも一部、および組織抗原の少なくとも一部からなる群より選択される複数の抗原プローブを含み、被験体の免疫グロブリンの結合能力は、免疫疾患またはその素因を示す。しかしながら、先行技術のいずれも、MSを診断するため、特にMSの異なるサブタイプを識別する、疾患進行を予測またはモニタするための特異的で、信頼でき、正確で識別力のあるアッセイ法を提供することができる抗原アレイを開示していない。そのような識別力のあるアッセイ法は、各患者に対し十分な治療アプローチを調整するのに非常に有益であろう。

#### 【0016】

PCT公開第WO 07/137410号は、MS、MSの異なる形態または別の脱髓障害を診断するための方法に関する。特にWO 07/137410号は、それらの分子

10

20

30

40

50

量により同定される、臨床的に診断されたMSまたは他の神経障害と正常な患者の間で異なる存在量または強度を有することがわかっている特定の代謝産物に関する。それにもかかわらず、WO 07/137410号はMSの異なるサブタイプにおいて特有のシグネチャーパターンを同定するための、さらに、MSを有する患者と、他の神経障害に苦しむ患者との間で区別するための、抗体反応性パターンの試験の使用を開示せず、言及もしていない。

#### 【0017】

このように、依然として、被験体におけるMSの診断、特にMSのサブタイプの診断に有用な改善された診断方法およびキットが必要である。

10

#### 【発明の概要】

#### 【0018】

本発明は被験体において多発性硬化症(MS)を診断するための方法およびキット、そのような診断を実施するための抗原プローブアレイ、ならびにそのようなアレイを作成するための抗原プローブセットを提供する。特に、本発明は、被験体においてMSのサブタイプを診断するための方法およびキットを提供し、ここで、MSのサブタイプは、再発寛解型MS(RRMS)、二次性進行型MS(SPPMS)、一次性進行型MS(PPMS)ならびにパターンIおよびパターンII MS病変から選択されるMS病変の病理学的サブタイプから選択される。

#### 【0019】

本発明は、抗原アレイを用いてMS患者の抗体反応性を試験した場合に得られる予想外の結果に一部基づいている。分析から、自己抗体反応性の特有のシグネチャーパターンが同定された。以下、特有の自己抗体シグネチャーパターンは、中枢神経系(CNS)抗原、熱ショックタンパク質(HSP)および脂質抗原に対する反応性に基づき、MSのサブタイプ、すなわち、再発寛解型MS(RRMS)、二次性進行型MS(SPPMS)、および一次性進行型MS(PPMS)を特徴づけることが初めて開示される。際だったことには、特有の自己抗体シグネチャーパターンは、MSサブタイプを他の神経または自己免疫誘発疾患、例えばアルツハイマー病(AD)、副腎白質ジストロフィー(ALD)およびエリテマトーデスから識別した。特有の自己抗体シグネチャーパターンは、脂質およびCNS由来のペプチドに対する反応性に基づき、MS病変の異なる免疫病理学的パターンを特徴づけ、よって、初めて、MSクラスおよび段階をサブタイプ化するためのバイオマーカーに基づきアッセイ法を提供することがさらに開示される。

20

#### 【0020】

このように、本発明はMSのサブタイプを診断するための方法およびキットに関する。本発明の原理によれば、キットは、本明細書では抗原プローブセットとも呼ばれる複数の抗原を含む。複数の抗原を含むこれらの抗原プローブセットは、MSを有する被験体の血清と特異的に反応する。本発明の原理によれば、複数の抗原は、抗原アレイの形態で有利に使用され得る。いくつかの実施形態によれば、抗原アレイは、抗原チップの形態で都合よく配列される。

30

#### 【0021】

本発明は、MSのサブタイプに関連する抗原のクラスターを同定し、試験血清対照血清を用いて観察される反応性を規定する。それだけでMSを有する被験体またはMSのサブタイプを十分に診断するのに十分な単一の抗原は同定されなかつたが、本明細書において下記表1~4で詳述されるように、これらの抗原の特定の組み合わせが、各抗原単独の場合よりも、患者と対照被験体とを区別するのに著しくより正確であり、信頼できた。下記で詳述されるように、表1はSEQ ID NO:7、14、23-83および98-100、SEQ ID NO:4-6、10および12由来のフラグメント、ならびに非ペプチド部分ラクトセレブロシドを含む。下記で詳述されるように、表2はSEQ ID NO:7、8、13、16、22、29、42、51、60、67-71、84、85および101、SEQ ID NO:4-6、9、10、12および20由来のフラグメント、ならびに非ペプチド部分S.ミネソタ(minnesota)LPS、大腸菌(E

40

50

.coli) LPS およびコンドロイチン 4 - 硫酸を含む。下記で詳述されるように、表 3 は SEQ ID NO : 6、7、19、21、25、26、28、29、31、32、35 - 38、40 - 42、44、48、53、55、56、64、70、73、75、85 - 96、100、102 および 103、SEQ ID NO : 4 - 6、10、12 および 15 由来のフラグメント、ならびに非ペプチド部分アシアロガングリオシド - GM2、カルジオリビンおよびコレステロールを含む。下記で詳述されるように、表 4 は SEQ ID NO : 17、29、43、85 および 97、SEQ ID NO : 5 および 12 由来のフラグメント、ならびに非ペプチド部分 : 15 - ケトコレスタン、15 - ヒドロキシコレスタン、ガングリオシド - GM4、15 - ケトコレステン、テトラシアロガングリオシド - GQ1B、脳 L - リゾホスファチジルセリンおよびラクトシルセラミドを含む。

表 1 - PRMS および健康な対照 (HC) を区別する抗原

【表1】

抗原	型	配列 / SEQ ID NO:
MBP 31-50	ペプチド	SEQ ID NO: 6由来
HSP70 481-500	ペプチド	ANGILNVTATDKSTGKANKI (SEQ ID NO: 23)
PLP 65-84	ペプチド	SEQ ID NO: 12由来
GFAP	タンパク質	SEQ ID NO: 14
HSP70 511-530	ペプチド	KEEIERMVQEAEKYKAEDDEV (SEQ ID NO: 24)
MBP 41-60	ペプチド	SEQ ID NO: 6由来
HSP60 286-305	ペプチド	LVLNRLKVGLQVVAVKAPGF (SEQ ID NO: 25)
HSP60 496-515	ペプチド	QSSSEVGYDAMAGDFVNME (SEQ ID NO: 26)
HSP70 151-170	ペプチド	NDSQRQATKDAGVIAGLNVL (SEQ ID NO: 27)
HSP60 526-545	ペプチド	RTALLDAAGVASLLTAEVV (SEQ ID NO: 28)
MBP 11-30	ペプチド	SEQ ID NO: 6由来
OSP 61-80	ペプチド	GLYHCKPLVDILILPGYVQA (SEQ ID NO: 29)
HSP70 31-50	ペプチド	NDQGNRTTPSYVAFTDTERL (SEQ ID NO: 30)
CNP 286-305	ペプチド	ISALFVTPKTGARVELSEG (SEQ ID NO: 31)
HSP60 255-275	ペプチド	QSIVPALEIANAHRKPLVIIA (SEQ ID NO: 32)
HSP60 106-125	ペプチド	NEEAGDGTATATVLARSIAK (SEQ ID NO: 33)
OSP 31-50	ペプチド	VVTCGYTIPTCRKLDELGSK (SEQ ID NO: 34)
P2 61-80	ペプチド	SEQ ID NO: 10由来
MBP 84-94	ペプチド	SEQ ID NO: 6由来
HSP60 376-395	ペプチド	EQLDVTTSEYEKEKLNERLA (SEQ ID NO: 35)
HSP70 286-305	ペプチド	SLFEGIDFYTSITRARFEEL (SEQ ID NO: 36)
HSP60 136-155	ペプチド	NPVEIRRGVMLAVDAVIAEL (SEQ ID NO: 37)
HSP70 136-155	ペプチド	GYPVTNAVITVPAYFNDSQR (SEQ ID NO: 38)
P2 46-65	ペプチド	SEQ ID NO: 10由来
OSP 136-155	ペプチド	VATIWFPVCAHRETTIVSFG (SEQ ID NO: 39)
P2 1-20	ペプチド	SEQ ID NO: 10由来
MOG 91-110	ペプチド	SEQ ID NO: 5由来
HSP60 361-380	ペプチド	KGDKAQIEKRIQEIIIEQLDV (SEQ ID NO: 40)
HSP70 451-470	ペプチド	KDNNLLGRFELSGIPPAPGV (SEQ ID NO: 41)
HSP70 210-229	ペプチド	TIDDGIFEVKATAGDTHLGG (SEQ ID NO: 42)
HSP60 240-259	ペプチド	QDAYVLLSEKKISSIQSIVP (SEQ ID NO: 43)

10

20

30

40

HSP60 271-290	ペプチド	LVIIAEDVDGEALSTLVLNR (SEQ ID NO: 44)
OSP 76-95	ペプチド	GYVQACRALMIAASVGLPA (SEQ ID NO: 45)
PLP 178-191	ペプチド	SEQ ID NO: 12 由来
CNP 271-290	ペプチド	QDVLKKSYSKAFTLTISALF (SEQ ID NO: 46)
P2 76-95	ペプチド	SEQ ID NO: 10 由来
HSP70 631-640	ペプチド	GSGPTIEEV (SEQ ID NO: 47)
PLP 248-259	ペプチド	SEQ ID NO: 12 由来
HSP60 195-214	ペプチド	RKGVITVKDGTLNDELEII (SEQ ID NO: 48)
CNP 61-80	ペプチド	SGKSTLARVIVDKYRDGTM (SEQ ID NO: 49)
MOG 196-215	ペプチド	SEQ ID NO: 5 由来
HSP60 46-65	ペプチド	LLADAVAVTMGPKGRTVIIE (SEQ ID NO: 50)
HSP70 195-214	ペプチド	LIFDLGGGTDFVSILTIDDG (SEQ ID NO: 51)
HSP70 436-455	ペプチド	PGVLIQVYEGERAMTKDNNL (SEQ ID NO: 52)
HSP60 166-185	ペプチド	EEIAQVATISANGDKEIGNI (SEQ ID NO: 53)
MBP 104-123	ペプチド	SEQ ID NO: 6 由来
MBP 71-92	ペプチド	SEQ ID NO: 6 由来
PLP 180-199	ペプチド	SEQ ID NO: 12 由来
HSP70 255-275	ペプチド	NKRAVRLRTACERAKRTLS (SEQ ID NO: 54)
MOBP 166-185	ペプチド	SEQ ID NO: 4 由来
CNP 240-259	ペプチド	YFGKRPPGVHLCTTKFCDYG (SEQ ID NO: 55)
HSP60 16-35	ペプチド	RVLAPHLTRAYAKDVKFGAD (SEQ ID NO: 56)
HSP60 301-320	ペプチド	KAPGFGDNRKNQLKDMAIAT (SEQ ID NO: 57)
MOBP 151-170	ペプチド	SEQ ID NO: 4 由来
CNP 91-110	ペプチド	GARGAFSEYYKRLDEDLAAY (SEQ ID NO: 58)
HSP70 106-125	ペプチド	SYKGETKAFYPEEISSMVLT (SEQ ID NO: 59)
CNP 406-421	ペプチド	TQGSRKGGALQSCTII (SEQ ID NO: 60)
HSP60 421-440	ペプチド	VTDALNATRAAVEEGIVLGG (SEQ ID NO: 61)
HSP60 61-80	ペプチド	TVIIEQSWGSPKVTKDGVTV (SEQ ID NO: 62)
AB10-20	ペプチド	YEVHHQKLVFF (SEQ ID NO: 98)
HSP60 511-530	ペプチド	VNMVEKGIIDPTKVRTALL (SEQ ID NO: 63)
LACTOCEREBROSIDES	脂質	PubChem Substance ID: 24892591
HSP70 406-425	ペプチド	AGGVMATALIKRNSTIPTKQT (SEQ ID NO: 64)

10

20

30

40

MOG 76-95	ペプチド	SEQ ID NO: 5 由来	
HSP70 316-335	ペプチド	PVEKALRDAKLDKAQIHDLV (SEQ ID NO: 65)	10
HSP60 225-244	ペプチド	SPYFINTSKGQKCEFQDAYV (SEQ ID NO: 66)	
HSP60 76-95	ペプチド	DGVTVAKSIDLKDKNIGA (SEQ ID NO: 67)	
MOG 106-125	ペプチド	SEQ ID NO: 5 由来	
HSP70 466-485	ペプチド	PAPGVPQIEVTFIDANGIL (SEQ ID NO: 68)	
CNP 1-20	ペプチド	MNRGFSRKSHTFLPKIFFRK (SEQ ID NO: 69)	
HSP70 166-185	ペプチド	GLNVLRIINEPTAAAIAYGL (SEQ ID NO: 70)	
HSP70 121-140	ペプチド	SMVLTKMKEIAEAYLGYPVT (SEQ ID NO: 71)	
AB1-42	ペプチド	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVIA (SEQ ID NO: 99)	
MBP 89-101	ペプチド	SEQ ID NO: 6 由来	
CNP 301-320	ペプチド	ELSEQQQLQLWPSDVKLSPT (SEQ ID NO: 72)	
HSP70 1-20	ペプチド	MAKAAAVGIDLGTTYSVGW (SEQ ID NO: 73)	20
MBP 51-70	ペプチド	SEQ ID NO: 6 由来	
HSP70 496-515	ペプチド	KANKITITNDKGRLSKEEIE (SEQ ID NO: 74)	
CNP 16-35	ペプチド	IFFRKMSSSGAKDKPELQFP (SEQ ID NO: 75)	
CNP 76-95	ペプチド	DGTMVSA DAY KIT PGARGA (SEQ ID NO: 76)	
PLP 10-29	ペプチド	SEQ ID NO: 12 由来	
PLP 190-209	ペプチド	SEQ ID NO: 12 由来	
HSP60 346-365	ペプチド	GEVIVTKDDAMLLKGKGDKA (SEQ ID NO: 77)	30
HSP60 151-170	ペプチド	VIAELKKQSKPVTTPEEIAQ (SEQ ID NO: 78)	
HSP70 376-395	ペプチド	QAAILMGDKSENVQDLLLD (SEQ ID NO: 79)	
ウシMBP	タンパク質	SEQ ID NO: 7	
HSP70 556-575	ペプチド	GLKGKISEADKKVLDKCQE (SEQ ID NO: 80)	
CNP 391-410	ペプチド	RAIFTGYYGKGKPVPTQGSR (SEQ ID NO: 81)	
MOG 211-230	ペプチド	SEQ ID NO: 5 由来	
PLP 220-249	ペプチド	SEQ ID NO: 12 由来	40
HSP70 616-635	ペプチド	PGPGGFAGQGPKGSGSGPT (SEQ ID NO: 82)	
AB1-12	ペプチド	DAEFRHDSGYEV (SEQ ID NO: 100)	
HSP60 556-573	ペプチド	PGMGAMGGMGGMGGGMF (SEQ ID NO: 83)	
PLP 250-269	ペプチド	SEQ ID NO: 12 由来	

表 2 - P P M S および健康な対照 ( H C ) を区別する抗原

【表2】

抗原	型	配列/ SEQ ID NO:
PLP 215-232	ペプチド	SEQ ID NO: 12由来
mMBP	ペプチド	SEQ ID NO: 8
HSP70 195-214	ペプチド	LIFDLGGTDFDVSILTIDG (SEQ ID NO: 51)
smLPS (サルモネラ・ミネソタ LPS)	脂質+ サッカリド	
HSP70 210-229	ペプチド	TIDDGIFEVKATAGDTHLGG (SEQ ID NO: 42)
コンドロイチン4-硫酸	サッカリド	
HSP70 166-185	ペプチド	GLNVLRRIINEPTAAAIAYGL (SEQ ID NO: 70)
ウシMBP	タンパク質	SEQ ID NO: 7
PLP 137-150	ペプチド	SEQ ID NO: 12由来
MOG 46-65	ペプチド	SEQ ID NO: 5由来
CNP 406-421	ペプチド	TQGSRKGGALQSCTII (SEQ ID NO: 60)
P2 31-50	ペプチド	SEQ ID NO: 10由来
CNP 1-20	ペプチド	MNRGFSRKSHTFLPKIFFRK (SEQ ID NO: 69)
MOG 16-35	ペプチド	SEQ ID NO: 5由来
P2 76-95	ペプチド	SEQ ID NO: 10由来
神経フィラメント 68kDa	ペプチド	SEQ ID NO: 16
アミロイド $\beta$ (AB)	タンパク質	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVIAT (SEQ ID NO: 13)
HSP70 466-485	ペプチド	PAPGVHQIEVTFDIDANGIL (SEQ ID NO: 68)
AB 1-40	ペプチド	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV (SEQ ID NO: 101)
PLP 161-180	ペプチド	SEQ ID NO: 12由来
PLP 40-59	ペプチド	SEQ ID NO: 12由来
PLP 137-150	ペプチド	SEQ ID NO: 12由来
HSP60 76-95	ペプチド	DGVTVAKSIDLKDKYKNIGA (SEQ ID NO: 67)
MOG 151-170	ペプチド	SEQ ID NO: 5由来
P2 1-20	ペプチド	SEQ ID NO: 10由来
OSP 61-80	ペプチド	GLYHCKPLVDILILPGYVQA (SEQ ID NO: 29)
分泌APP $\alpha$	ペプチド	SEQ ID NO: 20由来
PLP 178-191	ペプチド	SEQ ID NO: 12由来

10

20

30

40

gpMBP	タンパク質	SEQ ID NO: 9由来
HSP70 16-35	ペプチド	SCVGVFQHGKVEIIANDQGN (SEQ ID NO: 84)
MBP 104-123	ペプチド	SEQ ID NO: 6 由来
SOD	タンパク質	SEQ ID NO: 22
ecLPS ( <i>E. Coli</i> LPS)	脂質+ サツ カリド	
HSP70 121-140	ペプチド	SMVLTKMKEIAEAYLGYPVT (SEQ ID NO: 71)
MOBP 61-80	ペプチド	SEQ ID NO: 4 由来
OSP 1-20	ペプチド	MVATCLQVVGFTSFVGWIG (SEQ ID NO: 85)

10

表 3 - S P M S および P R M S を区別する抗原

【表3】

抗原	型	配列/ SEQ ID NO:
MOG 61-80	ペプチド	SEQ ID NO: 5 由来
HSP60 376-395	ペプチド	EQLDVTTSEYEKEKLNERLA (SEQ ID NO: 35)
MOG 31-50	ペプチド	SEQ ID NO: 5 由来
CNP 361-380	タンパク質	GEEVGELSRGKLYSLGNRW (SEQ ID NO: 86)
アミロイド $\beta$ 1-23	ペプチド	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAED (SEQ ID NO: 102)
CNP 346-365	ペプチド	LDLLEILRQEKGGSRGEEVG (SEQ ID NO: 87)
HSP60 496-515	ペプチド	QSSSEVGYDAMAGDFVNVMVE (SEQ ID NO: 26)
OSP 1-20	ペプチド	MVATCLQVVGFTSFVGWIG (SEQ ID NO: 85)
HSP60 511-530	ペプチド	VNMVEKGIIDPTKVVRTALL (SEQ ID NO: 63)
OSP 61-80	ペプチド	GLYHCKPLVDILILPGYVQA (SEQ ID NO: 29)
HSP60 286-305	ペプチド	LVLNRLKVGLQVVAVKAPGF (SEQ ID NO: 25)
CNP 240-259	ペプチド	YFGKRPPGVHLCTTKFCDYG (SEQ ID NO: 55)
HSP70 601-620	ペプチド	VCNPIISGLYQGAGGPGPGG (SEQ ID NO: 88)
HSP60 210-229	ペプチド	ELEIIEGMKFDRGYISPYFI (SEQ ID NO: 89)
HSP60 451-470	ペプチド	LDSLTPANEDQKIGIEIIKR (SEQ ID NO: 90)
MOBP 166-185	ペプチド	SEQ ID NO: 4 由来
HSP60 166-185	ペプチド	EEIAQVATISANGDKEIGNI (SEQ ID NO: 53)
MBP 138-147	ペプチド	SEQ ID NO: 6 由来
CNP 195-214	ペプチド	KKSSETLRKAGQVFLEELGN (SEQ ID NO: 91)
MBP 1-20	ペプチド	SEQ ID NO: 6 由来
HSP60 526-545	ペプチド	RTALLDAAGVASLLTAEVV (SEQ ID NO: 28)
P2 1-20	ペプチド	SEQ ID NO: 10 由来
HSP70 286-305	ペプチド	SLFEGIDFYTSITRARFEEL (SEQ ID NO: 36)
MBP 155-178	ペプチド	SEQ ID NO: 6 由来
P2 46-65	ペプチド	SEQ ID NO: 10 由来
HSP60 195-214	ペプチド	RKGVITVKDGKTLNDELEII (SEQ ID NO: 48)
P2 31-50	ペプチド	SEQ ID NO: 10 由来
HSP60 271-290	ペプチド	LVIIAEDVDGEALSTLVLNR (SEQ ID NO: 44)
HSP60 136-155	ペプチド	NPVEIRRGVMLAVDAVIAEL (SEQ ID NO: 37)
CNP 286-305	ペプチド	ISALFVTPKTTGARVELSEG (SEQ ID NO: 31)
HSP70 210-229	ペプチド	TIDDGIFEVKATAGDTHLGG (SEQ ID NO: 42)

10

20

30

40

HSP70 136-155	ペプチド	GYPVTNAVITVPAYFNDSQR (SEQ ID NO: 38)
PLP 150-163	ペプチド	SEQ ID NO: 12 由来
HSP70 166-185	ペプチド	GLNVLRRIINEPTAAIAYGL (SEQ ID NO: 70)
HSP60 255-275	ペプチド	QSIVPALEIANAHRKPLVIIA (SEQ ID NO: 32)
HSP60 16-35	ペプチド	RVLAPHLTRAYAKDVKFGAD (SEQ ID NO: 56)
ウシMBP	タンパク質	SEQ ID NO: 7
CNP 181-199	ペプチド	LEKDFLPLYFGWFLTKKSSE (SEQ ID NO: 92)
CNP 121-140	ペプチド	LDDTNHERERLEQLFEMADQ (SEQ ID NO: 93)
アシアロガングリオシ ド-GM2	脂質	
アミロイド $\beta$ 1-12	ペプチド	DAEFRHDSGYEV (SEQ ID NO: 100)
OSP 121-140	ペプチド	QLAGVLLILLALCALVATIW (SEQ ID NO: 94)
分泌APP $\beta$	タンパク質	SEQ ID NO: 21
カルジオリビン	脂質	
HSP70 406-425	ペプチド	AGGVMTALIKRNSTIPTKQT (SEQ ID NO: 64)
HSP60 361-380	ペプチド	KGDKAQIEKRIQEIIEQLDV (SEQ ID NO: 40)
アミロイド $\beta$ 17-40	ペプチド	LVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV (SEQ ID NO: 103)
コレステロール	脂質	PubChem Substance ID: 24893094
アミロイド $\beta$ 1-42	ペプチド	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVIA (SEQ ID NO: 73)
PLP 80-99	ペプチド	derived from SEQ ID NO: 12
PLP 65-84	ペプチド	derived from SEQ ID NO: 12
PLP 40-59	ペプチド	derived from SEQ ID NO: 12
PLP 1-19	ペプチド	derived from SEQ ID NO: 12
PLP 151-173	ペプチド	derived from SEQ ID NO: 12
HSP70 421-440	ペプチド	PTKQTQIFTTYSQNPGVLI (SEQ ID NO: 95)
huMBP	タンパク質	SEQ ID NO: 6
MOBP 16-35	ペプチド	SEQ ID NO: 4 由来
CNP 16-35	ペプチド	IFFRKMSSSGAKDKPELQFP (SEQ ID NO: 75)
RBP	タンパク質	SEQ ID NO: 19
HSP70 331-350	ペプチド	IHDVLVGGSTRIPKVQKLL (SEQ ID NO: 96)
MBP 113-132	ペプチド	SEQ ID NO: 6 由来

10

20

30

40

$\beta$ クリスタリン	タンパク質	SEQ ID NO: 15 由来
PLP 178-191	ペプチド	SEQ ID NO: 12 由来

表 4 - 病変パターン I およびパターン II を区別する抗原

【表 4】

抗原	型	配列/ SEQ ID NO:
15-ケトコレスタン	脂質	
15 $\alpha$ -ヒドロキシコレステン	脂質	
ガングリオシド-GM4	脂質	
15-ケトコレステン	脂質	
テトラシアロガングリオシド-GQ1B	脂質	
脳L- $\alpha$ -リゾホスファチジルセリン	脂質	
ラクトシルセラミド	脂質	
160 kDa. 神経フィラメント	ペプチド	SEQ ID NO: 17
HSP60 240-259	ペプチド	QDAYVLLSEKKISSIQSIVP (SEQ ID NO: 43)
OSP 166-185	ペプチド	VLCLVGGCVILCCAGDAQAF (SEQ ID NO: 97)
MOG 196-215	ペプチド	SEQ ID NO: 5 由来
OSP 61-80	ペプチド	GLYHCKPLVDILILPGYVQA (SEQ ID NO: 29)
OSP 1-20	ペプチド	MVATCLQVVGFTSFVGVWIG (SEQ ID NO: 85)
PLP 215-232	ペプチド	SEQ ID NO: 12 由来

表 5 - 表 1 ~ 4 で列挙されるタンパク質のアクセッション番号およびSEQ ID NO

10

20

30

【表5】

タンパク質(略称)	タンパク質	アクセシション番号	SEQ ID NO:
HSP60	60 kDa 热ショックタンパク質	GI:41399285	SEQ ID NO:1
HSP70	70 kDa 热ショックタンパク質	GI:38327039	SEQ ID NO:2
CNP	2', 3'-環状ヌクレオチド 3'-ホスホジエステラーゼ	GI:94721261	SEQ ID NO:3
MOBP	ミエリン関連オリゴデンドロサイト塩基性タンパク質	GI:1408050	SEQ ID NO:4
MOG	ミエリン/オリゴデンドロサイト糖タンパク質	GI:56788381	SEQ ID NO:5
MBP/ huMBP	ヒトミエリン塩基性タンパク質	GI:68509930	SEQ ID NO:6
ウシMBP	ウシミエリン塩基性タンパク質	GI:74268137	SEQ ID NO:7
mMBP	マウスミエリン塩基性タンパク質	GI:6754658	SEQ ID NO:8
gpMBP	モルモットミエリン塩基性タンパク質	GI:3309629	SEQ ID NO:9
P2	ミエリンタンパク質2	GI:4505909	SEQ ID NO:10
OSP	オリゴデンドロサイト-特異タンパク質	GI:3283415	SEQ ID NO:11
PLP	プロテオリピドタンパク質	GI:41349499	SEQ ID NO:12
GFAP	グリア線維酸性タンパク質	GI:4503979	SEQ ID NO:14
βクリスタリン		GI:12056461	SEQ ID NO:15
神経フィラメント 68kDa		GI:105990539	SEQ ID NO:16
神経フィラメント 160kDa		GI:157738649	SEQ ID NO:17
アミロイド β		GI:41406057	SEQ ID NO:18
RBP	レチノール結合タンパク質4、血漿前駆体	GI:55743122	SEQ ID NO:19
APP α	アミロイド β タンパク質 前駆体アイソフォームb	GI:4502167	SEQ ID NO:20
APP β	アミロイド β タンパク質 前駆体アイソフォームa	GI:41406055	SEQ ID NO:21
SOD	スーパーオキシドジムスターぜ 1	GI:4507149	SEQ ID NO:22

【0022】

第1の態様によれば、本発明は被験体において多発性硬化症(MS)のサブタイプを診断する方法を提供し、方法は、被験体から獲得された試料中の抗体の、表1~4に列挙される抗原からなる群より選択される複数の抗原に対する反応性を決定すること、これにより、試料の複数の抗原に対する反応性パターンを決定すること、前記試料の反応性パター

10

20

30

40

50

ンを対照反応性パターンと比較することを含み、MSのサブタイプは、下記からなる群より選択される：

(i) 再発寛解型多発性硬化症 (RRMS) (前記複数の抗原が、表1に列挙される抗原からなる群より選択される)、

(ii) 一次性進行型多発性硬化症 (PPMS) (前記複数の抗原が、表2に列挙される抗原からなる群より選択される)、

(iii) 二次性進行型多発性硬化症 (SPMS) (前記複数の抗原が、表3に列挙される抗原からなる群より選択される)、

(iv) パターンI病変およびパターンII病変により特徴づけられるMSから選択されるMSの病理学的サブタイプ (前記複数の抗原が、表4に列挙される抗原からなる群より選択される)。

10

#### 【0023】

この態様のある実施形態によれば、被験体から獲得された前記試料の反応性パターンと対照試料の反応性パターンとの有意差は、被験体がMSのサブタイプを患うことを示す。

#### 【0024】

本明細書では、「複数の抗原」に対する「試料中の抗体の反応性」は、試料中の各抗体の、複数の抗原から選択される特定の抗原に対する免疫反応性を示す。抗体の抗原に対する免疫反応性、すなわち、その特異的に抗原に結合する能力は、試料中の抗体の量を決定するために使用され得る。このように、試料の反応性パターンは、試料中の試験抗体の各1つのレベルを反映する。

20

#### 【0025】

典型的には、試料中の抗体の複数の抗原に対する反応性の決定は、イムノアッセイを使用して実施される。有利なことに、複数の抗原が、抗原アレイの形態で使用され得る。

#### 【0026】

異なる実施形態において、反応性パターン間での「有意差」は、統計学的に有意な差、または他の実施形態では、当業者により認識される有意な差を示す。有利なことに、本発明の方法は、対照被験体の反応性パターンとMSのサブタイプを有する患者の反応性パターンとの間で区別するために、学習およびパターン認識アナライザー、クラスタリングアルゴリズムなどを使用し得る。そのようなものとして、この用語は特異的に、例えば、試験試料中の抗体の複数の抗原に対する反応性を決定し、得られた反応性パターンを陰性および陽性対照試料（例えば、それぞれ、MSのサブタイプを患っていない対照被験体または試験されるMSサブタイプを患う患者から獲得される試料）の反応性パターンと、そのようなアルゴリズムおよび/またはアナライザーを用いて比較することにより測定される差を含む。ある実施形態によれば、対照試料はMSの別のサブタイプを患う患者から獲得される（すなわち、試料は、SPMSに対して試験することができ、対照試料はPRMS患者から獲得される）。差は、試験試料の反応性パターンを、そのような様式で得られる予め決められた分類規則と比較することにより測定され得る。

30

#### 【0027】

このように、別の実施形態では、試験試料の反応性パターンと対照試料の反応性パターンとの有意差（差は、学習およびパターン認識アルゴリズムを用いて計算される）は、被験体がMSのサブタイプを患うことを示す。例えば、アルゴリズムは、限定はされないが、統計アルゴリズムを含む監視または非監視分類器を含むことができ、例えば、主成分分析 (PCA)、部分最小二乗法 (PLS)、多重線形回帰 (MLR)、主成分回帰 (PCR)、識別関数分析 (DFA)、例えば線形識別関数 (LDA)、およびクラスター分析、例えば最近接、人工神経ネットワーク、結合二方向クラスタリングアルゴリズム、多層パーセプトロン (MLP)、一般化回帰神経ネットワーク (GRNN)、ファジー推論システム (FIS)、自己組織化マップ (SOM)、遺伝的アルゴリズム (GAS)、神経ファジーシステム (NFS)、適応共鳴理論 (ART) が挙げられるが、それらに限定されない。

40

#### 【0028】

50

本発明の方法のある実施形態によれば、対照は、少なくとも1つの個体由来の試料、一組の個体由来の対照試料のパネル、および対照個体由来の保存データセットからなる群より選択される。

#### 【0029】

さらなる実施形態によれば、試料は血清試料である。別の実施形態によれば、試料は脳脊髄液（CSF）である。他の特定の実施形態では、試験試料および対照試料はIgGおよび/またはIgM抗体を含み得る。他の実施形態では、本発明の方法およびキットの表1～4は、IgGおよびIgM抗体の反応性を決定するために特定の抗原の二つ組を含む（例えば、表2におけるPLP 215-232、ウシMBPおよびCNP 1-20ならびに表3におけるPLP 1-19、OSP 121-14およびCNP 240-259）。別の実施形態では、1つの抗体の特定の抗原（複数の抗原由来）に対する反応性は、上方制御される。別の実施形態では、1つの抗体の特定の抗原に対する反応性は、下方制御される。10

#### 【0030】

いくつかの実施形態によれば、方法は、試料中の抗体の反応性を決定する前に、試料を例えば1:10以上に希釈することをさらに含む。

#### 【0031】

他の実施形態によれば、複数の抗原が抗原アレイの形態で使用される。いくつかの実施形態によれば、抗原アレイは抗原チップの形態で配列される。

#### 【0032】

ある実施形態によれば、MSのサブタイプは再発寛解型多発性硬化症（RRMS）であり、複数の抗原は表1から選択される。この特定の実施形態によれば、対照反応性パターンは、健康な患者または健康な患者由来の保存データセットから獲得される。特定の実施形態によれば、複数の抗原は、表1に列挙される抗原の少なくとも5、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35、少なくとも40、少なくとも45、少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90の異なる抗原を含む。別の実施形態によれば、複数の抗原は表1に列挙される抗原を全て含む。好ましくは、診断と患者の病状との間で信頼できる、正確な相関を提供するのに必要とされる抗原セットは、100以下、好ましくは115以下、より好ましくは130以下、最も好ましくは150以下の抗原から構成される。別の実施形態では、複数の抗原は表1で列挙される抗原から構成される。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。20

#### 【0033】

ある実施形態によれば、MSのサブタイプは一次性進行型多発性硬化症（PPMS）であり、複数の抗原は表2から選択される。この特定の実施形態によれば、対照反応性パターンは、健康な患者または健康な患者由来の保存データセットから獲得される。特定の実施形態によれば、複数の抗原は、表2に列挙される抗原の少なくとも5、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35の異なる抗原を含む。別の実施形態によれば、複数の抗原は表2に列挙される抗原を全て含む。好ましくは、診断と患者の病状との間で信頼できる、正確な相関を提供するのに必要とされる抗原セットは、50以下、好ましくは70以下、より好ましくは80以下、最も好ましくは100以下の抗原から構成される。別の実施形態では、複数の抗原は表2で列挙される抗原から構成される。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。30

#### 【0034】

ある実施形態によれば、MSのサブタイプは二次性進行型多発性硬化症（SPMS）であり、複数の抗原は表3から選択される。この特定の実施形態によれば、対照反応性パターンは、RRMSを患う少なくとも1つの個体由来の試料、RRMSを患う一組の個体由来の対照試料のパネル、およびRRMSを患う対照個体由来の保存データセットからなる群より選択される。特定の実施形態によれば、複数の抗原は、表3に列挙される抗原の少40

10

20

30

40

50

なくとも 5、少なくとも 10、少なくとも 15、少なくとも 20、少なくとも 25、少なくとも 30、少なくとも 35、少なくとも 40、少なくとも 45、少なくとも 50、少なくとも 55、少なくとも 60 の異なる抗原を含む。別の実施形態によれば、複数の抗原は表 3 に列挙される抗原を全て含む。好ましくは、診断と患者の病状との間で信頼できる、正確な相関を提供するのに必要とされる抗原セットは、80 以下、好ましくは 90 以下、最も好ましくは 100 以下の抗原から構成される。別の実施形態では、複数の抗原は表 3 で列挙される抗原から構成される。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

#### 【 0 0 3 5 】

いくつかの実施形態によれば、MS のサブタイプはパターン I MS 病変およびパターン II MS 病変から選択される MS の病理学的パターンであり、複数の抗原は表 4 から選択される。1つの実施形態によれば、本発明は、MS を有する被験体においてパターン I を診断するための方法を提供し、対照反応性パターンはパターン II 病変を有する患者から獲得される。別の実施形態によれば、本発明は、MS を有する被験体においてパターン II を診断するための方法を提供し、対照反応性パターンはパターン I 病変を有する患者から獲得される。別の実施形態によれば、本発明は、MS を患う被験体において、病変パターン I を有する被験体と病変パターン II を有する被験体間で識別するための方法を提供する。特定の実施形態によれば、複数の抗原は、表 4 に列挙される抗原の少なくとも 4、少なくとも 6、少なくとも 8、少なくとも 10、少なくとも 12 の異なる抗原を含む。別の実施形態によれば、複数の抗原は表 4 に列挙される抗原を全て含む。好ましくは、診断と患者の病状との間で信頼できる、正確な相関を提供するのに必要とされる抗原セットは、20 以下、好ましくは 30 以下、最も好ましくは 50 以下の抗原から構成される。別の実施形態では、複数の抗原は表 4 で列挙される 14 の抗原から構成される。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

#### 【 0 0 3 6 】

ある実施形態によれば、本発明は被験体において MS のサブタイプを診断するための方法を提供し、方法は、

( a ) 被験体から獲得された試料中の抗体の、表 1 に列挙される抗原からなる群より選択される複数の抗原に対する反応性を決定し、これにより、試料の複数の抗原に対する反応性パターンを決定し、前記試料の反応性パターンを健康な被験体から獲得された対照反応性パターンと比較すること、

( b ) 被験体から獲得された試料中の抗体の、表 2 に列挙される抗原からなる群より選択される複数の抗原に対する反応性を決定し、これにより、試料の複数の抗原に対する反応性パターンを決定し、前記試料の反応性パターンを健康な被験体から獲得された対照反応性パターンと比較すること、

( c ) 被験体から獲得された試料中の抗体の、表 3 に列挙される抗原からなる群より選択される複数の抗原に対する反応性を決定し、これにより、試料の複数の抗原に対する反応性パターンを決定し、前記試料の反応性パターンを、RRMS を患う被験体から獲得された対照反応性パターンと比較すること、

( d ) 被験体から獲得された試料中の抗体の、表 4 に列挙される抗原からなる群より選択される複数の抗原に対する反応性を決定し、これにより、試料の複数の抗原に対する反応性パターンを決定し、前記試料の反応性パターンを、パターン I 病変を有する被験体から獲得された対照反応性パターンと、および / またはパターン II 病変を有する被験体から獲得された対照反応性パターンと比較すること、  
を含み、ここで、

( i ) ( a ) の反応性パターンと前記対照反応性パターンとの有意差は、被験体が RRMS を患うことを示し、

( ii ) ( b ) の反応性パターンと前記対照反応性パターンとの有意差は、被験体が PMS を患うことを示し、

( iii ) ( c ) の反応性パターンと前記対照反応性パターンとの有意差は、被験体が SPMs を患うことを示し、

10

20

30

40

50

( i v ) ( d ) の反応性パターンとパターン I 病変を有する被験体から獲得された対照反応性パターンとの有意差は、被験体がパターン II 病変を患うことを示し、( d ) の反応性パターンとパターン II 病変を有する被験体から獲得された対照反応性パターンとの有意差は、被験体がパターン I 病変を患うことを示す。

#### 【 0 0 3 7 】

いくつかの実施形態によれば、表 1 および表 2 に対する対照反応性パターンは、健康な対照被験体または健康な対照被験体由来の保存データセットから獲得される。別の実施形態によれば、表 3 に対する対照反応性パターンは、R R M S を患う被験体または R R M S を患う被験体由来の保存データセットから獲得される。

#### 【 0 0 3 8 】

別の態様によれば、本発明は、

( i ) 表 1 に列挙される抗原からなる群より選択される R R M S を診断するための複数の抗原、

( i i ) 表 2 に列挙される抗原からなる群より選択される P P M S を診断するための複数の抗原、

( i i i ) 表 3 に列挙される抗原からなる群より選択される S P M S を診断するための複数の抗原、

( i v ) 表 4 に列挙される抗原からなる群より選択される、M S を有する被験体においてパターン I 病変とパターン II 病変の間で区別するための複数の抗原、  
を含む、M S のサブタイプを診断するためのキットを提供する。

#### 【 0 0 3 9 】

ある実施形態によれば、本発明は、表 1 に列挙される抗原からなる群より選択される複数の抗原を含む、R R M S を診断するためのキットを提供する。特定の実施形態によれば、複数の抗原は、表 1 に列挙される抗原の少なくとも 5 、少なくとも 10 、少なくとも 15 、少なくとも 20 、少なくとも 25 、少なくとも 30 、少なくとも 35 、少なくとも 40 、少なくとも 45 、少なくとも 50 、少なくとも 55 、少なくとも 60 、少なくとも 65 、少なくとも 70 、少なくとも 75 、少なくとも 80 、少なくとも 85 、少なくとも 90 の異なる抗原を含む。別の実施形態によれば、複数の抗原は表 1 に列挙される抗原を全て含む。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

#### 【 0 0 4 0 】

ある実施形態によれば、本発明は、表 2 に列挙される抗原からなる群より選択される複数の抗原を含む、P P M S を診断するためのキットを提供する。特定の実施形態によれば、複数の抗原は、表 2 に列挙される抗原の少なくとも 5 、少なくとも 10 、少なくとも 15 、少なくとも 20 、少なくとも 25 、少なくとも 30 、少なくとも 35 の異なる抗原を含む。別の実施形態によれば、複数の抗原は表 2 に列挙される抗原を全て含む。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

#### 【 0 0 4 1 】

ある実施形態によれば、本発明は、表 3 に列挙される抗原からなる群より選択される複数の抗原を含む、S P M S を診断するためのキットを提供する。特定の実施形態によれば、複数の抗原は、表 3 に列挙される抗原の少なくとも 5 、少なくとも 10 、少なくとも 15 、少なくとも 20 、少なくとも 25 、少なくとも 30 、少なくとも 35 、少なくとも 40 、少なくとも 45 、少なくとも 50 、少なくとも 55 、少なくとも 60 の異なる抗原を含む。別の実施形態によれば、複数の抗原は表 3 に列挙される抗原を全て含む。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

#### 【 0 0 4 2 】

ある実施形態によれば、本発明は、表 4 に列挙される抗原からなる群より選択される複数の抗原を含む、M S を有する被験体においてパターン I 病変とパターン II 病変の間で区別するためのキットを提供する。特定の実施形態によれば、複数の抗原は、表 4 に列挙される抗原の少なくとも 4 、少なくとも 6 、少なくとも 8 、少なくとも 10 、少なくとも 12 の異なる抗原を含む。別の実施形態によれば、複数の抗原は表 4 に列挙される抗原を

10

20

30

40

50

全て含む。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

**【0043】**

他の実施形態では、キットは、試料中の抗体の複数の抗原に対する反応性を決定するための手段をさらに含み得る。例えば、キットは、本発明の抗原プローブへの抗体の特異結合を測定するために使用され得る、試薬、検出可能な標識および／または容器を含み得る。特定の実施形態では、前記キットは抗原アレイの形態である。他の実施形態では、前記キットは、陰性／陽性対照試料をさらに含み得る。例えば、陰性対照試料は、少なくとも1つの健康な個体またはMSの別のサブタイプを有することが同定された少なくとも1つの個体由来の試料を含み得る（例えば、RRMSを患う少なくとも1の個体から獲得された試料は、キットが試験試料中のSPMSを診断する手段のためのものである間、陰性対照として使用される）。陽性対照は、診断されるMSのサブタイプを患う少なくとも1の個体由来の試料を含み得る。他の非制限的な例は、一組の健康な個体のまたは疾患個体由来の対照試料のパネル、または対照個体由来の保存データセットである。

10

**【0044】**

他の実施形態では、キットは、複数の抗原に対する、異なる試料中の抗体の反応性パターンを比較するための手段を含む。特定の実施形態では、反応性パターンを比較するための手段は、学習およびパターン認識アナライザーを含む（例えば、本明細書で詳述される学習およびパターン認識アルゴリズムを使用する）。

20

**【0045】**

他の実施形態によれば、本発明の方法およびキットは、MS進行をモニタリングするために有用である。

20

**【0046】**

別の態様によれば、本発明は表1に列挙される抗原プローブを含む抗原プローブセットを提供する。ある実施形態によれば、抗原プローブセットは、本明細書で詳述されるように、表1に列挙される抗原のサブセットを含む。

30

**【0047】**

別の態様によれば、本発明は表2に列挙される抗原プローブを含む抗原プローブセットを提供する。ある実施形態によれば、抗原プローブセットは、本明細書で詳述されるように、表2に列挙される抗原のサブセットを含む。

**【0048】**

別の態様によれば、本発明は表3に列挙される抗原プローブを含む抗原プローブセットを提供する。ある実施形態によれば、抗原プローブセットは、本明細書で詳述されるように、表3に列挙される抗原のサブセットを含む。

30

**【0049】**

別の態様によれば、本発明は表4に列挙される抗原プローブを含む抗原プローブセットを提供する。ある実施形態によれば、抗原プローブセットは、本明細書で詳述されるように、表4に列挙される抗原のサブセットを含む。

**【0050】**

別の態様によれば、本発明は本発明の抗原プローブセットを含む製造物品を提供する。

40

**【0051】**

別の態様によれば、本発明はMSのサブタイプを診断するための診断組成物を調製するための抗原プローブセットの使用を提供し、抗原プローブセットは表1～4の1つに列挙される抗原からなる群より選択される複数の抗原を含み、MSのサブタイプは、

(i) RRMS（前記複数の抗原が、表1に列挙される抗原からなる群より選択される）、

(ii) PPMS（前記複数の抗原が、表2に列挙される抗原からなる群より選択される）、

(iii) SPMS（前記複数の抗原が、表3に列挙される抗原からなる群より選択される）、ならびに

(iv) パターンI病変およびパターンII病変から選択されるMSの病理学的サブタ

50

イブ（前記複数の抗原が、表4に列挙される抗原からなる群より選択される）からなる群より選択される。

#### 【0052】

1つの実施形態では、診断組成物は、試料中の抗体の反応性を決定する、よって前記複数の抗原に対する試料の反応性パターンを決定するのに有用であり、前記試料の反応性パターンと対照試料の反応性パターンとの有意差は、MSのサブタイプを示す。

#### 【0053】

本発明の他の目的、特徴および利点は、下記説明および図面から明らかになるであろう。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0054】

【図1A - 1C】抗原マイクロアレイの性能を示す図である。RRMSおよび健康な対照(HC)血清試料を抗原マイクロアレイ上で、異なる濃度でハイブリダイズさせ、マイクロアレイ上にスポット(散在)させたCNS、HSPまたは脂質抗原に対する平均IgG(図1A)およびIgM(図1B)反応性を測定した。結果は、各希釈でのCNS、HSPまたは脂質抗原に対するIgGおよびIgM反応性の平均+SEMとして表される。同じ希釈で試験したHC試料と比較した場合、<sup>\*</sup>P<0.05、<sup>\*\*</sup>P<0.01および<sup>\*\*\*</sup>P<0.001(二元配置ANOVA)。図1Cは、異なる濃度のPLP261-277またはHSP601-20でプレインキュベートさせたRRMS血清(1:10希釈)を示し、PLP261-277に対するIgG反応性を抗原マイクロアレイ上で測定した。競合相手なしでプレインキュベートさせた試料と比較した場合の<sup>\*\*</sup>P<0.01および<sup>\*\*\*</sup>P<0.001(一元配置ANOVA)。

【図2A - 2H】RRMS、PPMSおよびSPMSにおける血清抗体反応性を示す図である。図2Aおよび2Bは、RRMS(図2A)またはPPMS(図2B)をHCから区別する抗体反応性を示す。各列が患者を表すヒートマップはRRMS(図2A)、PPMS(図2A)またはHC(図2Aおよび図2B)試料に対応するかどうかを示すように底部で色分けされ、各行は、左に見られる比色分析スケールにより抗原に対する正規化された抗体反応性(下記実施例2および3で詳述)を示す。図2C~2Dは、RRMSおよびPPMSにおける抗原特異性を示す。RRMSおよびPPMSにおける区別抗体の特異性は、HCに対しMSにおいて上方または下方制御されることが見出されている(それぞれ、図2Cおよび2D)CNS、HSPまたは脂質抗原の相対寄与(区別抗原の総数に対する%)として示される。図2EはSPMSおよびRRMS試料における抗体反応性を図示するヒートマップを示す。図2Fおよび2Gは、RRMSに対しSPMSにおいて上方または下方制御されることが見出されている(それぞれ、図2Fおよび2G)CNS、HSPまたは脂質抗原の相対寄与(区別抗原の総数に対する%)として示されるSPMSにおける抗原特異性を示す。図2Hは、RRMS、SPMSおよびPPMSと関連する免疫特徴をまとめた図である。

【図3】脳病理と関連する抗体反応性を示す。各列が患者を表し、パターンIまたはパターンII試料に対応するかどうかを示すように底部で色分けされたヒートマップは、左に見られる比色分析スケールにより抗原に対する正規化された抗体反応性を示す。このヒートマップを構築するために使用される抗体反応性は下記実施例5で列挙される。

【図4A - 4D】酸化コレステロール誘導体のEAЕへの投与の効果を示す。図4Aは、酸化コレステロール誘導体のEAЕへの投与はEAЕを悪化させることを示す。図4B~BDは、MOG<sub>35-55</sub>、MOG<sub>35-55</sub>+oxCholまたはMOG<sub>35-55</sub>+oxChol+AIQマウスの細胞浸潤物(図4B)、脱髓(図4C)および脊髄上の軸索喪失(図4D)の定量を示す。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0055】

本発明は被験体において多発性硬化症(MS)を診断する方法、そのような診断を実施するための抗原プローブアレイの使用を提供し、そのようなアレイを生成させるための特

10

20

30

40

50

定の抗原プローブセットを同定する。いくつかの実施形態によれば、本発明は、MSを早期診断し、その進行をモニタするための自己抗体に基づくバイオマーカー試験に関する。特に、本発明の方法およびキットは、被験体においてMSの型（すなわち、RRMS、SPMSまたはPPMS）を識別することができる。さらに、本発明の方法およびキットは、MS患者において、病変パターンを、特に病変パターンIと病変パターンIIの間で識別することができる。

#### 【0056】

本明細書において下記で例示されるように、自己抗体の抗原 - マイクロアレイ分析は、MSの異なる臨床形態および病理学的サブタイプと関連する血清およびCSF自己抗体シグネチャーを同定することができ、シグネチャーは、単一の自己抗体反応性ではなく、集合的な自己抗体パターンに基づいていた。これらの情報パターンは、ミエリン分子およびHSPのペプチド、タンパク質および脂質に結合した自己抗体から現れた。さらに、情報パターンはHCにおいて見られるものに対する自己抗体反応性の減少および増加を含んだ。

10

#### 【0057】

さらに、特有の抗体パターンはMS病理の異なるパターンと関連した。パターンIIM-S病理はHSP60、OSP、MOGおよびPLPペプチドエピトープに対するIgG抗体の増加と関連し、 Ganglioside、LactosylceramideおよびL-a-Lizosphingialcerineに対する抗体反応性の増加はパターンIと関係した。LactosylceramideおよびL-a-Lizosphingialcerineに対する抗体はMS患者およびEAEMausのCSFにおいて記載されている(Kanter et al., 2006)。パターンI血清試料はまた、酸化コレステロール誘導体(15-ケトコレステン、15-ケトコレスタンおよび15a-ヒドロキシコレステン)に対する抗体を含んだ。7-ケトコレステロール、コレステロールの関連酸化誘導体のレベルの増加が、MS患者のCSFにおいて見出されている。とりわけ、7-ケトコレステロールおよびgangliosideは、それぞれ、PARPおよびトル様受容体4依存経路によりミクログリア細胞を活性化する。

20

#### 【0058】

本明細書で示される研究の重大な所見は、MS患者のCSFおよび血清中の抗体レパートリーが明確に区別できたことであった。これらの結果は、MS被験体のCSFにおける免疫応答の区分と一致した。CSF中の抗体はMSにおいて広く調査してきたが、本明細書で記載される特有の抗体免疫シグネチャーは以前に記載されていない。

30

#### 【0059】

初期研究は、特有の特徴が療法および疾患進行に対する応答と関係づけられ得ることを示唆する。例えば、RRMS患者の約50%がSPMSとなり、この転換は免疫および神経変性メカニズムにおける変化と関係する。本明細書において下記で示されるように、抗原アレイを用いたSPMSの研究は、RRMSおよびPPMS患者の両方の特徴を共有する抗体シグネチャーを明らかにし、抗原アレイが疾患パターンにおけるこの変化をモニタするのに有用であることを示唆する。さらに、これらの抗体パターンが疾患過程の初期に確立される場合、それらは少量の血清中で測定することができるので、MS罹患率に対する早期診断およびスクリーニングのために有用である。このように、本明細書で提示される所見は、血清マイクロアレイ抗体パターンは、MSをモニタする、例えば、疾患の予後を決定する、かつ疾患の免疫病理学的メカニズムを特徴づけるために新たな道を提供することを証明する。

40

#### 【0060】

##### 抗原プローブおよび抗原プローブセット

さらなる実施形態によれば、本発明は、本明細書で詳述されるように、MSの診断のために有用な抗原プローブおよび抗原プローブセットを提供する。

#### 【0061】

本発明の原理によれば、本発明は、本明細書において、抗原プローブセットとも呼ばれる複数の抗原をさらに提供する。複数の抗原を含むこれらの抗原プローブセットは、MS

50

を有する被験体の血清と特異的に反応する。本発明の原理によれば、複数の抗原は、抗原アレイの形態で有利に使用され得る。いくつかの実施形態によれば、抗原アレイは都合よく、抗原チップの形態で配列される。

#### 【0062】

本明細書では「プローブ」は構成要素に特異的結合することができる任意の化合物を意味する。1つの態様によれば、本発明は表1に列挙される抗原プローブを含む抗原プローブセットを提供する。ある実施形態によれば、抗原プローブセットは表1に列挙される抗原のサブセットを含む。ある実施形態によれば、本発明の抗原プローブセットは、RRMSの診断のために、本明細書で詳述されるように、表1から選択される複数の抗原を含む。好ましくは、複数の抗原は、表1に列挙される抗原のセットを含む。さらに他の実施形態では、抗原プローブセットは、そのサブセット、例えば、それぞれ表1で特定されるリストから選択される少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90の異なる抗原を含み、またはそれらから構成され、各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。そのようなサブセットは、診断アッセイの最適感度および/または特異性が得られるように選択され得る。他の実施形態では、プローブセットは最大115、他の実施形態では最大130または150までの異なる抗原を含む。他の実施形態では、表1で特定される抗原からなるプローブセットは、RRMS患者と、RRMSを患っていない健康な個体間で区別するのに十分である。そのようなプローブセットはRRMSを有する被験体を確実に同定するために十分であると考えられ、ある実施形態では、本発明の抗原プローブセットは、より多くの抗原、例えば約130以上の抗原を含む抗原アレイの形態で都合よく使用され得ることに注意すべきである。  
10

#### 【0063】

別の態様によれば、本発明は表2に列挙される抗原プローブを含む抗原プローブセットを提供する。ある実施形態によれば、抗原プローブセットは表2に列挙される抗原のサブセットを含む。他の実施形態によれば、本発明の抗原プローブセットは、PPMSの診断のために、本明細書で詳述されるように、表2から選択される複数の抗原を含む。好ましくは、複数の抗原は、表2に列挙される抗原のセットを含む。さらに他の実施形態では、抗原プローブセットは、そのサブセット、例えば、それぞれ表2で特定されるリストから選択される少なくとも5、10、15、20、25、30、35の異なる抗原を含み、またはそれらから構成され、各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。そのようなサブセットは、診断アッセイの最適感度および/または特異性が得られるように選択され得る。他の実施形態では、プローブセットは最大50、他の実施形態では最大70または100までの異なる抗原を含む。他の実施形態では、表2で特定される抗原からなるプローブセットは、PPMS患者と、PPMSを患っていない健康な個体間で区別するのに十分である。そのようなプローブセットはPPMSを有する被験体を確実に同定するために十分であると考えられ、ある実施形態では、本発明の抗原プローブセットは、より多くの抗原、例えば約100以上の抗原を含む抗原アレイの形態で都合よく使用され得ることに注意すべきである。  
20

#### 【0064】

別の態様によれば、本発明は表3に列挙される抗原プローブを含む抗原プローブセットを提供する。ある実施形態によれば、抗原プローブセットは表3に列挙される抗原のサブセットを含む。ある実施形態によれば、本発明の抗原プローブセットは、SPMSの診断のために、本明細書で詳述されるように、表3から選択される複数の抗原を含む。好ましくは、複数の抗原は、表3に列挙される抗原のセットを含む。さらに他の実施形態では、抗原プローブセットは、そのサブセット、例えば、それぞれ表3で特定されるリストから選択される少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60の異なる抗原を含み、またはそれらから構成され、各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。そのようなサブセットは、診断アッセイの最適感度および/または特異性が得られるように選択され得る。他の実施形態では、プローブセットは最大80、他の  
30  
40

10

20

30

40

50

実施形態では最大 100 または 150 までの異なる抗原を含む。他の実施形態では、表 3 で特定される抗原からなるプローブセットは、S P M S 患者と、R R M S 患者の間で区別するのに十分である。そのようなプローブセットは S P M S を有する被験体を確実に同定するために十分であると考えられ、ある実施形態では、本発明の抗原プローブセットは、より多くの抗原、例えば約 130 以上の抗原を含む抗原アレイの形態で都合よく使用され得ることに注意すべきである。

#### 【 0 0 6 5 】

別の様によれば、本発明は表 4 に列挙される抗原プローブを含む抗原プローブセットを提供する。ある実施形態によれば、抗原プローブセットは表 4 に列挙される抗原のサブセットを含む。ある実施形態によれば、本発明の抗原プローブセットは、パターン I およびパターン I I M S 病変間で識別するために、本明細書で詳述されるように、表 4 から選択される複数の抗原を含む。好ましくは、複数の抗原は、表 4 に列挙される 14 の抗原のセットを含む。さらに他の実施形態では、抗原プローブセットは、そのサブセット、例えば、それぞれ表 4 で特定されるリストから選択される 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 の異なる抗原を含み、またはそれらから構成され、各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。そのようなサブセットは、診断アッセイの最適感度および/または特異性が得られるように選択され得る。他の実施形態では、プローブセットは最大 20、他の実施形態では最大 30 または 50 までの異なる抗原を含む。他の実施形態では、表 4 で特定される 14 の抗原からなるプローブセットは、パターン I またはパターン I I M S 病変を有する患者の間で区別するのに十分である。そのようなプローブセットは M S パターンを確実に同定するために十分であると考えられ、ある実施形態では、本発明の抗原プローブセットは、より多くの抗原、例えば約 50 以上の抗原を含む抗原アレイの形態で都合よく使用され得ることに注意すべきである。

10

20

30

40

#### 【 0 0 6 6 】

本発明のアッセイにおいて使用される抗原プローブは、当技術分野でよく知られた方法を用いて精製または合成され得る。例えば、抗原タンパク質またはペプチドは、既知の組換えまたは合成方法を用いて生成させることができ、例えば、固相（例えば、B o c または f - M o c 化学）および液相合成法 (Stewart and Young, 1963; Meienhofer, 1973; Schroder and Lupke, 1965; Sambrook et al., 2001) が挙げられるが、それらに限定されない。当業者は本発明の抗原プローブを得る、または合成するのに要求される専門知識を有するであろう。抗原プローブのいくつかはまた、本明細書において下記で詳述されているように、例えば、Sigma (St. Louis, MO, USA)、Abnova (Taipei City, Taiwan)、Mareya LLC (Pleasant Gap, PA, USA)、Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA)、Calbiochem (San Diego, CA, USA)、Chemicon (Temecula, CA, USA)、GeneTex (San Antonio, TX, USA)、Novus Biologicals (Littleton, CO, USA)、Assay Designs (Ann Arbor, MI, USA)、ProSci Inc. (Poway, CA, USA)、EMD Biosciences (San Diego, CA, USA)、Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)、HyTest (Turku, Finland)、Meridian Life Science (Memphis, TN USA) および Biodesign International (Sacramento, CA, USA) から市販されている。

50

#### 【 0 0 6 7 】

本発明は表 1 ~ 4 で説明されているアミノ酸配列を有する抗原プローブ、ならびにそのホモログ、フラグメントおよび誘導体を、これらのホモログ、フラグメントおよび誘導体がこれらの抗原プローブと免疫学的に交差反応性である限り、使用することに注意すべきである。本明細書では「免疫学的に交差反応性」という用語は、同じ抗体が特異的に結合する同じ 2 つ以上の抗原を示す。本明細書では「ホモログ」という用語は、抗原のアミノ

50

酸配列と少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85% または少なくとも 90% 同一であるペプチドを示す。公差反応性は、多くのイムノアッセイ技術のいずれか、例えば、競合アッセイ（試験抗原の、その既知の抗原に対する抗体の結合を競合的に阻害する能力を測定する）により決定することができる。

#### 【0068】

ペプチドという用語は典型的には、最大約 50 アミノ酸残基までの長さのポリペプチドを示す。特定の実施形態によれば、本発明の抗原ペプチドは 10 ~ 50 アミノ酸長とすることができます、典型的には、約 10 ~ 30 または約 15 ~ 25 アミノ酸長である。

#### 【0069】

その用語は、天然ペプチド（分解生成物、合成的に合成されたペプチド、または組換えペプチドのいずれか）、ペプチド模倣物（典型的には、合成的に合成されたペプチド）、ペプチド類似体ペプトイドおよびセミペプトイドを含み、例えば、ペプチドを体内でより安定にする、または細胞内によりよく浸透することができるようになる修飾を有し得る。そのような修飾としては、N-末端修飾、C-末端修飾、ペプチド結合修飾、例えば限定されないが CH<sub>2</sub>-NH、CH<sub>2</sub>-S、CH<sub>2</sub>-S=O、O=C-NH、CH<sub>2</sub>-O、CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>、S=C-NH、CH=CH、および CF=CH、主鎖修飾および残基修飾が挙げられるが、それらに限定されない。

#### 【0070】

末端カルボン酸を、カルボキシアミドとして、還元された末端アルコールとして、または任意の薬学的に許容される塩として、例えば、ナトリウム、カリウム、リチウムまたはカルシウム塩を含む金属塩として、あるいは有機塩基との塩として、または硫酸、塩酸もしくはリン酸を含む鉱酸または有機酸、例えば酢酸もしくはマレイン酸との塩として有する本発明の抗原が使用され得る。

#### 【0071】

官能性誘導体は、前記ペプチドのアミノ酸側鎖ならびに / またはカルボキシリルおよび / もしくはアミノ部分への化学修飾からなる。そのような誘導体化分子としては、例えば、自由なアミノ基が誘導体化されアミン塩酸塩、p-トルエンスルホニル基、カルボベンゾキシ基、t-ブチルオキシカルボニル基、クロロアセチル基またはホルミル基を形成する分子が挙げられる。自由カルボキシリル基は、誘導体化され、塩、メチルおよびエチルエステルまたは他の型のエステルまたはヒドロジドを形成し得る。自由ヒドロキシリル基は誘導体化され O-アシルまたは O-アルキル誘導体を形成し得る。ヒスチジンのイミダゾール窒素は誘導体化され、N-imid-ベンジルヒスチジンを形成し得る。化学誘導体として、それらのポリペプチドもまた含まれ、それらは 20 の標準アミノ酸残基の 1 つ以上の天然のまたは修飾されたアミノ酸誘導体を含む。例えば、プロリンの代わりに 4-ヒドロキシプロリンに置換されてもよく、リシンの代わりに 5-ヒドロキシリシンに置換されてもよく、ヒスチジンの代わりに 3-メチルヒスチジンに置換されてもよく、セリンの代わりにホモセリンに置換されてもよく、リシンの代わりにオルニチンに置換されてもよい。

#### 【0072】

本明細書で記載されるアミノ酸残基は、別記されない限り、「L」異性体である。しかしながら、ペプチドが実質的に所望の抗体特異性を保持する限り、任意の L-アミノ酸残基の代わりに「D」異性体中の残基に置換させることができる。

#### 【0073】

好適な類似体は、現在標準のペプチド合成法および装置または組換え法により容易に合成され得る。そのような類似体は全て本質的に、それらのアミノ酸配列に関しては本発明の抗原に基づいているが、1 つ以上のアミノ酸残基の欠失、置換または付加を有するであろう。アミノ酸残基が置換される場合、想定されるそのような保存的置換は、ポリペプチドの構造または抗原性を有意に変化させないものである。例えば、塩基性アミノ酸は他の塩基性アミノ酸で置換され、酸性アミノ酸は酸性アミノ酸で置換され、中性アミノ酸は中性アミノ酸で置換される。上記で詳述される保存的置換を含む類似体の他に、非保存的アミノ酸置換を含む類似体が、これらの類似体が本発明のペプチドと免疫学的に交差反応性

10

20

30

40

50

である限り、さらに企図される。

【0074】

他の様態では、これらのペプチドをコードする核酸、これらの核酸を含むベクターおよびそれらを含む宿主細胞が提供される。これらの核酸、ベクターおよび宿主細胞は、当技術分野において知られている組換え法により容易に生成される(例えば、Sambrook et al., 2001を参照されたい)。例えば、本発明の抗原をコードする単離された核酸配列は、その天然源から、全体の(すなわち、完全)遺伝子またはその一部として獲得することができる。核酸分子はまた、組換えDNA技術(例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅、クローニング)または化学合成を用いて生成させることができる。核酸配列は天然核酸配列およびそのホモログを含み、例えば、天然の対立遺伝子変異型および、修飾が本質的に核酸分子の、本発明の機能性ペプチドをコードする能力を妨害しないようにヌクレオチドが挿入され、欠失され、置換されおよび/または反転された修飾核酸配列が挙げられるが、それらに限定されない。

【0075】

本発明のアッセイにおいて使用される脂質抗原は、当技術分野においてよく知られた方法を用いて精製または合成され得る(例えば、Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes, 4.sup.th Ed. (2002; Vance D E and Vance, J E, editors; Elsevier, Amsterdam, Boston); Enzymes in Lipid Modification (2000; Bornsheuer, U T, editor; Wiley-VCH, Weinheim, N.Y.); Lipid Synthesis and Manufacture (1999; Gunstone, F D, editor; Sheffield Academic Press, Sheffield, England; CRC Press, Boca Raton, Fla.); Lipid Biochemistry, 5.sup.th Ed (2002; Gurr, M I, Harwood, J L, and Frayn, K N, editors; Blackwell Science, Oxford, Malden, Mass)を参照されたい。別の実施形態では、本発明のアッセイにおいて使用される脂質抗原は、本明細書において下記で詳述されるように商業的に購入され得る。

【0076】

診断方法

いくつかの実施形態によれば、本発明はMS、特にRRMS、PPMSおよびSPMSを検出するのに有用な診断方法を提供する。別の実施形態では、本発明はMS脱髓パターン、特にパターンIおよびパターンII MS病変を区別するのに有用な診断方法を提供する。

【0077】

いくつかの実施形態によれば、本発明の方法は、試験被験体から獲得された試料中の抗体の、表1～表4に列挙される抗原からなる群より選択される複数の抗原に対する反応性を決定し、これにより試料の複数の抗原への反応性パターンを決定し、前記試料の反応性パターンを対照反応性パターンと比較することにより実施される。1つの実施形態では、前記試料の反応性パターンと対照試料の反応性パターンとの有意差は、被験体がMSを患うことを示す。1つの実施形態によれば、抗原はRRMSの診断に対しては表1から選択され、対照反応性パターンは健康な患者から獲得される。別の実施形態によれば、抗原はPPMSの診断に対しては表2から選択され、対照反応性パターンは健康な患者から獲得される。別の実施形態によれば、抗原はSPMSの診断に対しては表3から選択され、対照反応性パターンはR R M Sを患う患者から獲得される。別の実施形態によれば、抗原はパターンIとパターンII MS病変の間の区別に対しては表4から選択される(すなわち、試料はパターンI MSに対して試験され、対照反応性パターンはパターンII MS病変を有する患者から獲得され、または試料はパターンII MSに対して試験され、対照反応性パターンはパターンI MS病変を有する患者から獲得される)。特定の実施形態によれば、抗原は表1～表4のいずれか一つに列挙される抗原からなる群より選択され、前記試料の前記反応性パターンは被験体におけるMSの段階を示し、ここで、(i)表1から選択される複数の抗原に対する試料の反応性パターンと対照反応性パターンとの有意差は被験体がRRMSを有することを示し、(ii)表2から選択される複数の抗原

に対する試料の反応性パターンと対照反応性パターンとの有意差は被験体がPPMSを有することを示し、(i i i)表3から選択される複数の抗原に対する試料の反応性パターンとの対照反応性パターンとの有意差は被験体がSPMSを有することを示し、(i v)表4から選択される複数の抗原に対する試料の反応性パターンと対照反応性パターンとの有意差は被験体がパターンIまたはパターンII MS病変を有することを示す。

#### 【0078】

本明細書では、「複数の抗原」に対する「試料中の抗体の反応性」は、試料中の各抗体の複数の抗原から選択される特定の抗原に対する免疫反応性を示す。抗体の抗原に対する免疫反応性、すなわち、抗原に特異的に結合するその能力は、試料中の抗体の量を決定するのに使用され得る。試料中の試験された抗体のそれぞれの計算されたレベルは、選択的に、試料のこれらの抗原に対する反応性パターンと呼ばれる。例えば、下記実施例では、各抗原の反応性が計算され、各スポット(抗原)のスケーリングされた平均対数強度として表された。

10

#### 【0079】

他の実施形態では、方法は、被験体から獲得された試料中、表1～4で列挙された抗原からなる群より選択される複数の抗原に向けられる抗体のレベルを決定することを含み、被験体から獲得された試料中の抗体のレベルと対照群における抗体レベルとの統計学的に有意な差は、被験体がMSのサブタイプを患うことを示し、MSのサブタイプは、(i)RRMS(前記複数の抗原が、表1に列挙される抗原からなる群より選択される)、(i i)PPMS(前記複数の抗原が、表2に列挙される抗原からなる群より選択される)、(i i i)SPMS(前記複数の抗原が、表3に列挙される抗原からなる群より選択される)、ならびに(i v)パターンI病変およびパターンII病変から選択されるMSの病理学的サブタイプ(前記複数の抗原が、表4に列挙される抗原からなる群より選択される)からなる群より選択される。

20

#### 【0080】

本明細書では、抗原に「向けられた」抗体は、抗原に特異的に結合することができる抗体である。複数の抗原に向けられる抗体のレベルの決定は、試料中の各抗体のレベルの測定を含み、各抗体は表1～4に列挙される抗原のうちの1つの特定の抗原に向けられる。この工程は、典型的には、本明細書で詳述されるようにイムノアッセイを用いて実施される。

30

#### 【0081】

他の実施形態では、方法は、被験体から獲得された試料中の複数の抗体のレベルを決定することを含み、各抗体は、表1～4で列挙される抗原からなる群より選択される抗原に向けられ、被験体から獲得された試料中の抗体のレベルと抗体の対照レベルとの有意差は、被験体が(i)RRMS(前記抗原が、表1に列挙される抗原から選択される)、(i i)PPMS(前記抗原が、表2に列挙される抗原からなる群より選択される)、(i i i)SPMS(前記抗原が、表3に列挙される抗原から選択される)、ならびに(i v)パターンI病変およびパターンII病変から選択されるMSの病理学的サブタイプ(前記抗原が、表4に列挙される抗原からなる群より選択される)からなる群より選択されるMSのサブタイプを患うことを示す。

40

#### 【0082】

他の実施形態では、前記複数の抗原に対する前記試料中の抗体の反応性(および試料中の試験された抗体の各々のレベル)を決定することは、

試料を、特定の抗原抗体複合体が形成され得るような条件下で、前記複数の抗原を含む抗原プローブセットと接触させること、および

各抗原プローブに対して形成された抗原抗体複合体の量を提供することを含む方法により実施される。抗原抗体複合体の量は、試料中の試験された抗体のレベル(または抗原との試料の反応性)を示す。

#### 【0083】

ある実施形態によれば、本発明は被験体におけるMSの識別診断のための方法を提供し

50

、方法は、

( a ) 被験体から獲得された試料中の抗体の、表 1 に列挙される抗原からなる群から選択される複数の抗原に対する反応性を決定し、これにより、試料の複数の抗原に対する反応性パターンを決定し、前記試料の反応性パターンを健康な被験体から獲得された対照反応性パターンと比較すること、

( b ) 被験体から獲得された試料中の抗体の、表 2 に列挙される抗原からなる群から選択される複数の抗原に対する反応性を決定し、これにより、試料の複数の抗原に対する反応性パターンを決定し、前記試料の反応性パターンを健康な被験体から獲得された対照反応性パターンと比較すること、

( c ) 被験体から獲得された試料中の抗体の、表 3 に列挙される抗原からなる群から選択される複数の抗原に対する反応性を決定し、これにより、試料の複数の抗原に対する反応性パターンを決定し、前記試料の反応性パターンを、R R M S を患う被験体から獲得された対照反応性パターンと比較すること、

( d ) 被験体から獲得された試料中の抗体の、表 4 に列挙される抗原からなる群から選択される複数の抗原に対する反応性を決定し、これにより、試料の複数の抗原に対する反応性パターンを決定し、前記試料の反応性パターンを、パターン I 病変を有する被験体から獲得された対照反応性パターンと、および / またはパターン II 病変を有する被験体から獲得された対照反応性パターンと比較すること、

を含み、ここで、

( i ) ( a ) の反応性パターンと前記対照反応性パターンとの有意差は、被験体が R R M S を患うことを示し、

( i i ) ( b ) の反応性パターンと前記対照反応性パターンとの有意差は、被験体が P P M S を患うことを示し、

( i i i ) ( c ) の反応性パターンと前記対照反応性パターンとの有意差は、被験体が S P M S を患うことを示し、

( i v ) ( d ) の反応性パターンとパターン I 病変を有する被験体から獲得された対照反応性パターンとの有意差は、被験体がパターン II 病変を患うことを示し、( d ) の反応性パターンとパターン II 病変を有する被験体から獲得された対照反応性パターンとの有意差は、被験体がパターン I 病変を患うことを示す。

【 0 0 8 4 】

いくつかの実施形態によれば、表 1 および表 2 に対する対照反応性パターンは、健康な対照被験体、または健康な対照被験体由来の保存データセットから獲得される。別の実施形態によれば、表 3 に対する対照反応性パターンは、R R M S を患う被験体、またはR R M S を患う被験体由来の保存データセットから獲得される。別の実施形態によれば、本発明の方法およびキットの対照反応性パターンは他の自己免疫または変性疾患（例えば、S L E 、A L D および A D ）を患う患者から獲得される。別の実施形態によれば、疾患進行をモニタするために、試料の反応性パターンは同じ被験体から以前獲得された対照反応性パターン（例えば、保存データセットとして維持されたもの）と比較される。対照試料および被験体から獲得された試料の抗体レパートリーは同じコンパートメントから獲得される（例えば、血清対照試料の抗体レパートリーは被験体の血清から獲得された試料の抗体レパートリーと比較される）ことが理解されるべきである。

【 0 0 8 5 】

別の実施形態では、診断の必要な被験体において M S のサブタイプ（すなわち、R R M S 、P P M S 、S P M S 、病変パターン I および病変パターン II ）を診断する方法であって、

a ) 被験体から抗体含有生物試料（例えば、血清）を獲得すること、  
b ) 試料を、抗原抗体複合体が形成され得るような条件下で、本明細書の表 1 ~ 表 4 で特定される複数の抗原（またはその免疫フラグメント、類似体、誘導体および塩）を含む抗原プローブセットと接触させること、および

c ) 前記試料の抗体の、抗原プローブセットの複数の抗原に特異的に結合する能力を決

10

20

30

40

50

定すること

を含み、前記能力と対照試料（例えば、MSを有しない被験体から獲得される試料）の能力との有意差は、被験体がMSサブタイプを患うこと示す、方法が提供される。

**【0086】**

別の実施形態によれば、本発明は被験体において再発寛解型多発性硬化症（RRMS）を診断する方法を提供し、方法は、被験体から獲得された試料中の抗体の、表1に列挙される抗原からなる群より選択される複数の抗原に対する反応性を決定し、これにより、試料の複数の抗原に対する反応性パターンを決定し、前記試料の反応性パターンを対照反応性パターン（例えば、健康な対照から獲得された試料）と比較することを含み、被験体から獲得された前記試料の反応性パターンと対照試料の反応性パターンとの有意差は、被験体がRRMSを患うこと示す。10

**【0087】**

別の実施形態によれば、本発明は被験体において一次性進行型多発性硬化症（PPMS）を診断する方法を提供し、方法は、被験体から獲得された試料中の抗体の、表2に列挙される抗原からなる群より選択される複数の抗原に対する反応性を決定し、これにより、試料の複数の抗原に対する反応性パターンを決定し、前記試料の反応性パターンを対照反応性パターン（例えば、健康な対照から獲得された試料）と比較することを含み、被験体から獲得された前記試料の反応性パターンと対照試料の反応性パターンとの有意差は、被験体がPPMSを患うこと示す。20

**【0088】**

別の実施形態によれば、本発明は被験体において二次性進行型多発性硬化症（SPMS）を診断する方法を提供し、方法は、被験体から獲得された試料中の抗体の、表3に列挙される抗原からなる群より選択される複数の抗原に対する反応性を決定し、これにより、試料の複数の抗原に対する反応性パターンを決定し、前記試料の反応性パターンを対照反応性パターン（例えば、RRMSを患う患者から獲得された試料）と比較することを含み、被験体から獲得された前記試料の反応性パターンと対照試料の反応性パターンとの有意差は、被験体がSPMSを患うこと示す。30

**【0089】**

別の実施形態によれば、本発明はMSを有する被験体において病変パターンIを有する被験体と病変パターンIIを有する被験体の間で区別する（すなわち、識別する）方法を提供し、方法は、被験体から獲得された試料中の抗体の、表4に列挙される抗原からなる群より選択される複数の抗原に対する反応性を決定し、これにより、試料の複数の抗原に対する反応性パターンを決定し、前記試料の反応性パターンを対照反応性パターンと比較することを含む。ある実施形態によれば、15-ケトコレスタン、15a-ヒドロキシコレステン、ガングリオシド-GM4、テトラシアロガングリオシド-GQ1B、脳L-リゾホスファチジルセリン、ラクトシルセラミドまたは160kDa神経フィラメントからなる群より選択される複数の抗原に対する抗体の反応性の差（例えば、増加）は、被験体がパターンI病変を有すること示し、HSP60、MOG、OSPおよびPLPペプチドエピトープからなる群より選択される複数の抗原に対する抗体の反応性の差（例えば、増加）は、被験体がパターンII病変を有すること示す。別の実施形態では、病変パターンIを有する被験体と病変パターンIIを有する被験体の間で区別するための抗体は、IgMおよび/またはIgG抗体から選択される。特定の実施形態では、表4に列挙される抗原と反応する抗体は、IgM抗体である160kDa神経フィラメントと反応する抗体を除き、全てIgG抗体である。40

**【0090】**

ある実施形態では、試験試料および対照試料はIgMおよび/またはIgG抗体を含み得る。別の実施形態では、表1～4に列挙される複数の抗原に由来する特定の抗原に対する少なくとも1つの抗体の反応性が上方制御される。別の実施形態では、特定の抗原に対する少なくとも1つの抗体の反応性が下方制御される。

**【0091】**

10

20

30

40

50

特定の実施形態によれば、健康な患者から R R M S を識別するための反応性パターンは、94の抗体の反応性からなる。1つの実施形態によれば、前記反応性パターンは90の上方制御された反応性と4の下方制御された反応性からなる。別の実施形態では、被験体から獲得された試料中の抗体は Ig G 抗体であり、抗体は MBP 31 - 50、HSP70 481 - 500、PLP 65 - 84 および GFAP からなる群より選択される抗原と反応する。別の実施形態では、被験体から獲得された試料中の抗体は Ig M 抗体であり、抗体は HSP70 511 - 530、MBP 41 - 60、HSP60 286 - 305、HSP60 496 - 515、HSP70 151 - 170、HSP60 526 - 545、MBP 84 - 94、OSP 61 - 80、HSP70 31 - 50、CNP 286 - 305、HSP60 255 - 275、HSP60 106 - 125、OSP 31 - 50、P2 61 - 80、MBP 11 - 30、HSP60 376 - 395、HSP70 286 - 305、HSP60 136 - 155、HSP70 136 - 155、P2 46 - 65、OSP 136 - 155、P2 1 - 20、MOG 91 - 110、HSP60 361 - 380、HSP70 451 - 470、HSP70 210 - 229、HSP60 240 - 259、HSP60 271 - 290、OSP 76 - 95、PLP 178 - 191、CNP 271 - 290、P2 76 - 95、HSP70 631 - 640、PLP 248 - 259、HSP60 195 - 214、CNP 61 - 80、MOG 196 - 215、HSP60 46 - 65、HSP70 195 - 214、HSP70 436 - 455、HSP60 166 - 185、MBP 104 - 123、MBP 71 - 92、PLP 180 - 199、HSP70 255 - 275、MBP 166 - 185、CNP 240 - 259、HSP60 16 - 35、HSP60 301 - 320、MOBP 151 - 170、CNP 91 - 110、HSP70 106 - 125、CNP 406 - 421、HSP60 421 - 40、HSP60 61 - 80、アミロイド 10 - 20、HSP60 511 - 530、Lactocerebroside、HSP70 406 - 425、MOG 76 - 95、HSP70 316 - 335、HSP60 225 - 244、HSP60 76 - 95、MOG 106 - 125、HSP70 466 - 485、CNP 1 - 21、HSP70 166 - 185、HSP70 121 - 140、アミロイド 1 - 42、MBP 89 - 101、CNP 301 - 320、HSP70 1 - 20、MBP 51 - 70、HSP70 496 - 515、CNP 16 - 35、CNP 76 - 95、PLP 10 - 29、PLP 190 - 209、HSP60 346 - 365、HSP60 151 - 170、HSP70 376 - 395、ウシMBP、HSP70 556 - 575、CNP 391 - 410、MOG 211 - 230、PLP 220 - 249、HSP70 616 - 635、アミロイド 1 - 12、HSP60 556 - 573、および PLP 250 - 269 からなる群より選択される抗原と反応する。

#### 【0092】

さらなる実施形態によれば、表1で列挙される複数の抗原から選択される特定の抗原、またはそのサブセットに対する少なくとも1つの抗体の反応性は上方制御され、ここで、抗原は、HSP70 511 - 530、MBP 41 - 60、HSP60 286 - 305、HSP60 496 - 515、HSP70 151 - 170、HSP60 526 - 545、MBP 84 - 94、OSP 61 - 80、HSP70 31 - 50、CNP 286 - 305、HSP60 255 - 275、HSP60 106 - 125、OSP 31 - 50、P2 61 - 80、MBP 11 - 30、HSP60 376 - 395、HSP70 286 - 305、HSP60 136 - 155、HSP70 136 - 155、P2 46 - 65、OSP 136 - 155、P2 1 - 20、MOG 91 - 110、HSP60 361 - 380、HSP70 451 - 470、HSP70 210 - 229、HSP60 240 - 259、HSP60 271 - 290、OSP 76 - 95、PLP 178 - 191、CNP 271 - 290、P2 76 - 95、HSP70 631 - 640、PLP 248 - 259、HSP60 195 - 214、CNP 61 - 80、MOG 196 - 215、HSP60 46 - 65、HSP70 195 - 214、HSP70 436 - 455、HSP60 166 - 185、MBP 104 - 123、MBP 71 - 92、PLP 180 - 199、HSP70 255 - 275、MBP 166 - 185、CNP 240 - 259、HSP60 16 - 35、HSP60 301 - 320、MOBP 151 - 170、CNP 91 - 110、HSP70 106 - 125、CNP 406 - 421、HSP60 421 - 40、HSP60 61 - 80、アミロイド 10 - 20、HSP60 511 - 530、Lactocerebroside、HSP70 406 - 425、MOG 76 - 95、HSP70 316 - 335、HSP60 225 - 244、HSP60 76 - 95、MOG 106 - 125、HSP70 466 - 485、CNP 1 - 21、HSP70 166 - 185、HSP70 121 - 140、アミロイド 1 - 42、MBP 89 - 101、CNP 301 - 320、HSP70 1 - 20、MBP 51 - 70、HSP70 496 - 515、CNP 16 - 35、CNP 76 - 95、PLP 10 - 29、PLP 190 - 209、HSP60 346 - 365、HSP60 151 - 170、HSP70 376 - 395、ウシMBP、HSP70 556 - 575、CNP 391 - 410、MOG 211 - 230、PLP 220 - 249、HSP70 616 - 635、アミロイド 1 - 12、HSP60 556 - 573、および PLP 250 - 269 からなる群より選択される抗原と反応する。

4、HSP70 436-455、HSP60 166-185、MBP 104-12  
 3、MBP 71-92、PLP 180-199、HSP70 255-275、MO  
 BP 166-185、CNP 240-259、HSP60 16-35、HSP60  
 301-320、MOBP 151-170、CNP 91-110、HSP70 1  
 06-125、CNP 406-421、HSP60 421-40、HSP60 61  
 -80、アミロイド 10-20、HSP60 511-530、ラクトセレブロシド  
 、HSP70 406-425、MOG 76-95、HSP70 316-335、H  
 SP60 225-244、HSP60 76-95、MOG 106-125、HSP  
 70 466-485、CNP 1-21、HSP70 166-185、HSP70  
 121-140、アミロイド 1-42、MBP 89-101、CNP 301-3  
 20、HSP70 1-20、MBP 51-70、HSP70 496-515、CN  
 P 16-35、CNP 76-95、PLP 10-29、PLP 190-209、  
 HSP60 346-365、HSP60 151-170、HSP70 376-39  
 5、ウシMBP、HSP70 556-575、CNP 391-410、MOG 2  
 11-230、PLP 220-249、HSP70 616-635、アミロイド  
 1-12、HSP60 556-573およびPLP 250-26から選択される。他の  
 実施形態によれば、表1で列挙される複数の抗原から選択される特定の抗原、またはその  
 サブセットに対する少なくとも1つの抗体の反応性は下方制御され、ここで、抗原は、  
 MBP 31-50、HSP70 481-500、PLP 65-84およびGFAP  
 から選択される。  
20

## 【0093】

特定の実施形態によれば、健康な患者からPPMSを識別するための反応性パターンは  
 、39の抗体反応性からなる。別の実施形態では、被験体から獲得された試料中の抗体は  
 、IgG抗体であり、ここで、抗体は、PLP 215-232、HSP70 195-  
 214、HSP70 166-185、ウシMBP、PLP 137-150、MOG  
 46-65、CNP 406-421、P2 31-50、CNP 1-20、MOG  
 16-35、P2 76-95、HSP70 466-485、HSP60 76-95  
 、MOG 151-170、P2 1-20、OSP 61-80、PLP 178-1  
 91、HSP70 16-35、HSP70 121-140、およびOSP 1-20  
 からなる群より選択される抗原と反応する。別の実施形態では被験体から獲得された試料  
 中の抗体は、IgM抗体であり、ここで、抗体は、PLP 215-232、mMBP、  
 sMLPS、HSP70 210-229、コンドロイチン4-硫酸、ウシMBP、神経  
 フィラメント 68kDa、アミロイド、AB 1-40、PLP 161-180、  
 PLP 40-59、PLP 137-150、分泌されたAPP、gpMBP、MB  
 P 104-123、SOD、CNP 1-20、eCLPSおよびMOBP 61-8  
 0からなる群より選択される抗原と反応する。  
30

## 【0094】

さらなる実施形態によれば、表2で列挙される複数の抗原から選択される特定の抗原、  
 またはそのサブセットに対する少なくとも1つの抗体の反応性は上方制御され、ここで、  
 抗原は、アミロイド、HSP70 466-485、AB 1-40、PLP 161  
 -180、PLP 40-59、PLP 137-150、HSP60 76-95、M  
 OG 151-170、P2 1-20、OSP 61-80、分泌されたAPP、P  
 LP 178-191、gpMBP、HSP70 16-35、MBP 104-123  
 、SOD、CNP 1-20、eCLPS、HSP70 121-140、MOBP 6  
 1-80およびOSP 1-20から選択される。他の実施形態によれば、表2で列挙さ  
 れる複数の抗原から選択される特定の抗原、またはそのサブセットに対する少なくとも1  
 つの抗体の反応性は下方制御され、ここで、抗原は、PLP 215-232、PLP  
 215-232、mMBP、HSP70 195-214、sMLPS、HSP70 2  
 10-229、コンドロイチン4-硫酸、HSP70 166-185、ウシMBP、P  
 LP 137-150、MOG 46-65、CNP 406-421、P2 31-5  
40  
50

0、CNP 1 - 20、MOG 16 - 35、P2 76 - 95および神経フィラメント  
68kDaから選択される。

### 【0095】

特定の実施形態によれば、健康な患者から S P M S を識別するための反応性パターンは、66の抗体反応性からなる。別の実施形態では、被験体から獲得された試料中の抗体は、IgM抗体であり、ここで、抗体は、MOG 61 - 80、HSP60 376 - 395、MOG 31 - 50、CNP 361 - 380、アミロイド 1 - 23、CNP 346 - 365、HSP60 496 - 515、OSP 1 - 20、HSP60 511 - 530、OSP 61 - 80、HSP60 286 - 305、CNP 240 - 259、HSP70 601 - 620、HSP60 210 - 229、HSP60 451 - 470、MOBP 166 - 185、HSP60 166 - 185、MBP 138 - 147、CNP 195 - 214、MBP 1 - 20、HSP60 526 - 545、P2 1 - 20、HSP70 286 - 305、MBP 155 - 178、P2 46 - 65、HSP60 195 - 214、P2 31 - 50、HSP60 271 - 290、HSP60 136 - 155、CNP 286 - 305、HSP70 210 - 229、HSP70 136 - 155、PLP 150 - 163、HSP70 166 - 185、HSP60 255 - 275、HSP60 16 - 35、ウシMBP、CNP 181 - 199、CNP 121 - 140、アシアロガングリオシド-GM2、アミロイド 1 - 12、OSP 121 - 140、分泌されたAPP、カルジオリピン、HSP70 406 - 425、およびIgM-PLP 1 - 19からなる群より選択される抗原と反応する。  
10 別の実施形態では、被験体から獲得された試料中の抗体は、IgG抗体であり、ここで、抗体は、HSP60 361 - 380、アミロイド 17 - 40、コレステロール、アミロイド 1 - 42、PLP 80 - 99、PLP 65 - 84、PLP 40 - 59、PLP 1 - 19、PLP 151 - 173、HSP70 421 - 440、huMBP、MOBP 16 - 35、CNP 16 - 35、RBP、HSP70 331 - 350、OSP 121 - 140、MBP 113 - 132、クリスタリン、CNP 240 - 259、およびPLP 178 - 191からなる群より選択される抗原と反応する。  
20 【0096】

さらなる実施形態によれば、表3で列挙される複数の抗原から選択される特定の抗原、またはそのサブセットに対する少なくとも1つの抗体の反応性は上方制御され、ここで、抗原は、アミロイド 17 - 40、コレステロール、アミロイド 1 - 42、PLP 80 - 99、PLP 65 - 84、PLP 40 - 59、PLP 1 - 19、PLP 151 - 173、HSP70 421 - 440、huMBP、MOBP 16 - 35、CNP 16 - 35、RBP、HSP70 331 - 350、OSP 121 - 140、MBP 113 - 132、クリスタリン、CNP 240 - 259およびPLP 178 - 191から選択される。他の実施形態によれば、表3で列挙される複数の抗原から選択される特定の抗原、またはそのサブセットに対する少なくとも1つの抗体の反応性は下方制御され、ここで、抗原は、MOG 61 - 80、HSP60 376 - 395、MOG 31 - 50、CNP 361 - 380、アミロイド 1 - 23、CNP 346 - 365、HSP60 496 - 515、OSP 1 - 20、HSP60 511 - 530、OSP 61 - 80、HSP60 286 - 305、CNP 240 - 259、HSP70 601 - 620、HSP60 210 - 229、HSP60 451 - 470、MOBP 166 - 185、HSP60 166 - 185、MBP 1 - 20、HSP60 526 - 545、P2 1 - 20、HSP70 286 - 305、MBP 155 - 178、P2 46 - 65、HSP60 195 - 214、P2 31 - 50、HSP60 271 - 290、HSP60 136 - 155、CNP 286 - 305、HSP70 210 - 229、HSP70 136 - 155、PLP 150 - 163、HSP70 166 - 185、ウシMBP、CNP 181 - 199、CNP 121 - 140、アシアロガングリオシド-GM2、アミロイド 40

30

40

50

50

1 - 1 2、O S P 1 2 1 - 1 4 0、分泌されたA P P、カルジオリピン、H S P 7 0  
4 0 6 - 4 2 5 およびH S P 6 0 3 6 1 - 3 8 0 から選択される。

#### 【0097】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、本明細書で詳述されるように、M S のサブタイプに対する特異的なバイオマーカーとして抗体の情報提供パターンを情報提供するよう に特徴づけるための抗原マイクロアレイシステムを採用する。

#### 【0098】

##### 抗体、試料およびイムノアッセイ

抗体、または免疫グロブリンはジスルフィド結合により共に結合された2つの重鎖および2つの軽鎖を含み、各軽鎖は個々の重鎖に結合され、Y字形状の構造となる。各重鎖は一端に可変ドメイン(V H)、続いて多くの定常ドメイン(C H)を有する。各軽鎖は、一端に可変ドメイン(V L)、その他端に定常ドメイン(C L)を有し、軽鎖可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列され、軽鎖定常ドメインは重鎖の第1の定常ドメイン(C H 1)と整列されている。軽鎖および重鎖の各対の可変ドメインは抗原結合部位を形成する。

10

#### 【0099】

重鎖のアイソタイプ(γ、δ、ε、またはμ)は、免疫グロブリンクラス(それぞれ、Ig G、Ig A、Ig D、Ig E または Ig M)を決定する。軽鎖は全ての抗体クラスで見られる2つのアイソタイプ(カッパ またはラムダ)のいずれかである。

20

#### 【0100】

「抗体("antibody"または"antibodies")」という用語が使用される場合、これは、無傷の抗体、例えばポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体(mAb s)、ならびにそれらのタンパク質分解フラグメント、例えばF ab またはF(ab')<sub>2</sub>フラグメントを含むことが理解されるべきである。さらに、キメラ抗体、組換えおよび改変抗体、ならびにそれらのフラグメントは本発明の範囲内に(例えば、本明細書で詳述されるように、イムノアッセイ試薬として)含まれる。

#### 【0101】

軽鎖および重鎖の両方の全てまたは本質的に全ての可変領域を含む例示的な機能的抗体フラグメントは下記の通り規定される:

30

(i) F v、2つの鎖として発現された軽鎖の可変領域と重鎖の可変領域からなる遺伝子改変されたフラグメントとして規定される、

(ii) 単鎖F v(「sc F v」)、好適なポリペプチドリンクにより結合された、軽鎖の可変領域と重鎖の可変領域を含む遺伝子改変された単鎖分子、

(iii) F ab、全抗体をパパイン酵素を用いて処理し、無傷の軽鎖と重鎖のF d フラグメントを得ることにより獲得された、抗体分子の一価抗原結合部分を含む抗体分子のフラグメントであり、F d フラグメントはその可変ドメインおよびC H 1 ドメインからなる、

40

(iv) F ab'、全抗体を、ペプシン酵素を用いて処理し、続いて還元することにより得られた、抗体分子の一価抗原結合部分を含む抗体分子のフラグメント(2つのF ab' フラグメントが1抗体分子につき得られる)、

(v) F(ab')<sub>2</sub>、全抗体を、ペプシン酵素を用いて処理することにより得られた、抗体分子の一価抗原結合部分を含む抗体分子のフラグメント(2つのジスルフィド結合により共に保持されるF ab' フラグメントの二量体)。

#### 【0102】

本明細書では「抗原」という用語は、抗体が結合できる分子または分子の一部である。抗原は典型的には、その抗原のエピトープに結合することができる抗体を動物に産生させ るように誘発することができる。抗原は1つ以上のエピトープを有し得る。上記で言及される特異反応は、抗原が、高い選択性的な様式で、その対応する抗体と反応し、他の抗原により誘発され得る多くの他の抗体とは反応しないことを示すことを意味する。「抗原ペプチド」は抗体に特異的に結合することができるペプチドである。

50

## 【0103】

別の実施形態では、抗体の、特異的に抗原プローブに結合する能力の検出は、特定の抗原 - 抗体複合体形成を定量することにより実施され得る。本明細書では「特異的に結合する」という用語は、抗体の抗原プローブへの結合が関係のない分子の存在により競合的に阻害されないことを意味する。

## 【0104】

ある実施形態では、本発明の方法は、本発明のペプチドの、被験体から単離された Ig G アイソタイプの抗体または、他の実施形態では、Ig M または Ig E アイソタイプの抗体に特異的に結合する能力を決定することにより、実施される。

## 【0105】

被験体から好適な抗体含有生物試料を獲得するための方法は、十分当業者の能力の範囲内である。典型的には、好適な試料は全血およびそれから誘導される生成物、例えば血漿および血清を含む。他の実施形態では、他の抗体含有試料、例えば、CSF、尿および唾液試料が使用され得る。試験被験体から血清試料を獲得する非制限的例が、下記実施例セクションにおいて提示される。

10

## 【0106】

本発明によれば、対象ペプチドと共に任意の好適なイムノアッセイを使用することができる。そのような技術は、当業者によく知られており、多くの標準免疫学マニュアルおよびテキストにおいて記載されている。ある好ましい実施形態では、抗原プローブに特異的に結合する抗体の能力の決定は、抗原プローブアレイに基づく方法を用いて実施される。好ましくは、アレイは被験体の好適に希釈された血清（例えば 1 : 10 希釈）と共にインキュベートされ、血清に含まれる抗体と固定された抗原プローブとの間の特異的結合が可能になり、結合していない血清がアレイから洗い流され、洗浄されたアレイが所望のアイソタイプの抗体の検出可能な標識結合リガンドと共にインキュベートされ、結合していない標識がアレイから洗い流され、各抗原プローブに結合された標識のレベルが測定される。

20

## 【0107】

いくつかの態様によれば、本発明の方法は、本発明の発明者等の幾人かに対する WO 02 / 08755 号および U.S. 2005 / 0260770 号で開示される抗原アレイを用いて実施することができる。WO 02 / 08755 号は、疾患の診断または治療のモニタリングが必要な患者被験体由来の血清の未定免疫グロブリンと反応する予め規定された抗原をクラスタリングし、よって同定するためのシステムおよび製造物品に関する。さらに、複数の抗原のうちの抗原のサブセットをクラスタリングし、前記抗原のサブセットは複数の患者由来の複数の抗体と反応し、被験体の抗体を得られたクラスターと会合または解離させる工程を含む診断方法、およびこれらの方法において有用なシステムが開示される。本発明の発明者等の幾人かに対する米国特許出願公開第 2005 / 0260770 号は、抗原アレイシステムおよびその診断的使用を開示する。出願は、被験体の免疫グロブリンの、抗原プローブセットの各抗原プローブに特異的に結合する能力を決定することを含む、免疫疾患、特に I 型糖尿病、またはその素因を被験体において診断する方法を提供する。前記開示の教示は、本明細書で完全に明記されるかのうように、その全体が組み込まれる。

30

## 【0108】

他の実施形態では、様々な他のイムノアッセイを使用することができ、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、マルチプレックスビーズを用いたフローサイトメトリー（例えば LumineX により製造されたシステム）、表面プラズモン共鳴（SPR）、エリプソメトリー、ならびに、例えば、レーザ走査、光検出、光電子増倍管を介する光子検出、デジタルカメラに基づくシステムまたはビデオシステムを用いた撮影法、放射線計測、蛍光検出、電子、磁気検出および抗原抗体結合の定量的測定を可能にする任意の他のシステムが挙げられるが、それらに限定されない。

40

## 【0109】

50

本発明の方法に好適なアレイを調製するための様々な方法が開発されている。最新式の方法は抗原プローブを含む明確な溶液を、平面支持体、典型的にはガラス支持体、例えば顕微鏡スライドの表面上の密集した特異的なアドレス可能な位置に適用または「スポット」するために、ロボット装置を使用することを含み、これはその後に、好適な熱および/または化学処理により処理され、支持体表面に抗原プローブが付着される。都合よく、ガラス表面は化学処理により最初に活性化され、表面上にエポキシ基などの反応性基の層が残り、これは自由アミンまたはチオール基を含む任意の分子と共有結合により結合する。好適な支持体としては、ケイ素、ニトロセルロース、紙、セルロース支持体などが挙げられ得る。

## 【0110】

10

好ましくは、アレイの特定のアドレス可能な位置に付着された本発明の各抗原プローブ、または抗原プローブの明確なサブセットは、統計学的にロバストなデータの発生を可能にするために、独立して、アレイの少なくとも2、より好ましくは少なくとも3つの別個の特定のアドレス可能な位置に付着される。

## 【0111】

本発明の抗原プローブの他に、アレイは、有利に対照抗原プローブまたは他の標準化学薬品を含み得る。そのような対照抗原プローブは正規化対照プローブを含み得る。正規化対照プローブから得られた信号は、結合条件、標識強度、「読み取り」効率および所定の結合抗体 - プローブリガンド相互作用の信号を変動させ得る他の因子における変化に対して対照を提供する。例えば、抗原プローブアレイの全ての他の抗原プローブから読み取られた信号、例えば蛍光強度は、正規化対照プローブからの信号（例えば、蛍光強度）により除算され、これにより、測定値が正規化される。正規化対照プローブは、抗原プローブアレイ上の様々なアドレス可能な位置に結合させることができ、抗体 - リガンドプローブ効率の空間変動に対して制御される。好ましくは、正規化対照プローブは周縁効果に対して制御するためにアレイの角または縁に、ならびにアレイの中央に配置される。

20

## 【0112】

標識された抗体リガンドは、抗体リガンドの様々な好適な型のいずれかを有し得る。好ましくは、抗体リガンドは、使用される被験体の抗体のFc部分に特異的に結合することができる抗体である。例えば、被験体の抗体がIgMアイソタイプである場合、抗体リガンドは好ましくは被験体のIgM抗体のFc領域に特異的に結合することができる抗体である。

30

## 【0113】

被験体の抗体のリガンドは、様々な型の検出可能な標識のいずれかとコンジュゲートさせることができる。好ましくは、標識はフルオロフォア、最も好ましくはCy3である。また、フルオロフォアは様々なフルオロフォア、例えば、Cy5、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、フィコエリトリン（PE）、ローダミン、テキサスレッドなどのいずれかとすることができます。特異的なアイソタイプの抗体に対し特異的な好適なフルオロフォアコンジュゲート抗体が広く市場供給者から入手可能であり、それらの製造方法は十分確立されている。

40

## 【0114】

被験体の抗体は、適用および目的によって、様々な様式のいずれかで、それらの抗原プローブ結合能力の分析のために単離され得る。被験体の抗体は、血液血清もしくは血漿またはその希釈物（例えば、1:10希釈）の形態で好適に、かつ都合よく存在し得るが、抗体は抗原プローブに特異的に結合する能力に対して試験される前に任意の所望の程度の精製に供せられ得る。本発明の方法は、被験体の全抗体、または抗体可変領域を含む被験体の抗体フラグメントを用いて実施することができる。

## 【0115】

## データ分析

有利なことに、本発明の方法は、MSのサブタイプを有する被験体の反応性パターンを対照被験体と区別するために、学習およびパターン認識アナライザ、クラスタリングア

50

ルゴリズムなどを使用し得る。例えば、方法は、複数の抗原に対する試験試料中の抗体の反応性を決定すること、得られたパターンを陰性および陽性对照試料の反応性パターンと、そのようなアルゴリズムおよび／またはアナライザーを使用して比較することを含む。

#### 【0116】

ある実施形態では、予め決められたカットオフに対して（例えば、多くの予め決められたカットオフに対して）試験試料中で定量された各抗体の量を比較するために、1つ以上のアルゴリズムまたはコンピュータプログラムが使用され得る。また、ヒトにより必要な工程を手動で実施するための1つ以上の命令を提供することができる。

#### 【0117】

パターン分析を決定および比較するためのアルゴリズムとしては、主成分分析、フィッシャー線形分析、神経ネットワークアルゴリズム、遺伝的アルゴリズム、ファジー論理パターン認識などが挙げられるが、それらに限定されない。分析が完了した後、得られた情報は、例えば、ディスプレイ上に表示され、ホストコンピュータに伝送され、またはその後の検索のために記憶装置に保存され得る。

#### 【0118】

アルゴリズムの多くは神経ネットワークに基づくアルゴリズムである。神経ネットワークは、入力層、処理層および出力層を有する。神経ネットワークにおける情報は、処理層全体に分配される。処理層はノードへの相互接続によりニューロンを刺激するノードから作成される。データ集合物中の潜在するパターンを明らかにする統計学的分析と同様に、神経ネットワークは、予め決められた基準に基づき、データ集合物において一貫したパターンを位置づける。

#### 【0119】

好適なパターン認識アルゴリズムとしては、主成分分析（PCA）、フィッシャー線形判別分析（FLDA）、クラス類似のソフト独立モデリング（soft independent modeling of class analogy）（SIMCA）、K-近傍法（KNN）、神経ネットワーク、遺伝的アルゴリズム、ファジー論理、および他のパターン認識アルゴリズムが挙げられるが、それらに限定されない。いくつかの実施形態では、フィッシャー線形判別分析（FLDA）および正準判別分析（CDA）ならびにそれらの組み合わせが、出力シグネチャとデータベースから入手可能なデータを比較するために使用される。

#### 【0120】

他の実施形態では、主成分分析が使用される。主成分分析（PCA）は多くの相関変数をより少数の無相関変数に変換する数学技術を含む。より少数の無相関変数は主成分として知られている。第1の主成分または固有ベクトルが可能な限り大きなデータ中の変動性の一因となり、続けて起こる各成分が可能な限り大きな残りの変動性の一因となる。PCAの主目的は、データセットの次元を減少させ、新たな潜在変数を同定することである。

#### 【0121】

主成分分析は、階層的に2つ以上の共分散行列の構造を比較する。例えば、1つの行列は、行列の各要素に单一の定数を掛けることを除き、もう一方と同一である。このように、行列は互い比例する。より特定的には、行列は同一の固有ベクトル（または主成分）を共有するが、それらの固有値は定数だけ異なっている。行列間の別の関係は、それらが共通する主成分を共有するが、それらの固有値は異なっていることである。主成分分析で使用される数学技術は固有分析(eigenanalysis)と呼ばれる。最も大きな固有値と関連する固有ベクトルは第1の主成分と同じ方向を有する。第2に大きな固有値と関連する固有ベクトルは、第2の主成分の方向を決定する。固有値の和は正方行列のトレースに等しく、固有ベクトルの最大数はこの行列の行の数に等しい。

#### 【0122】

別の実施形態では、アルゴリズムは分類器である。1つの型の分類器は、アルゴリズムを、トレーニングセット由来のデータを用いて「トレーニング」することにより作成され、その性能は試験セットデータを用いて評価される。本発明と共に使用される分類器の例

10

20

30

40

50

は、判別分析、決定木解析、受信者動作曲線またはスプリットアンドスコア分析である。

【0123】

「決定木」という用語は、分類のために使用されるフローチャート様木構造を有する分類器を示す。決定木は、データセットのサブセットへの繰り返しスプリットから構成される。各スプリットは1つの変数に適用される簡単な規則から構成され、例えば、「「変数1」の値が「しきい値1」よりも大きい場合、左に行き、そうでなければ、右へ行く」。したがって、与えられた特徴空間が長方形セットに分割され、各長方形は1つのクラスに割り当てられる。

【0124】

「試験セット」または「未知」または「確認セット」という用語は、トレーニングセットに含まれるそれらのエントリーからなる有効な全データセットのサブセットを示す。試験データは分類器性能を評価するために適用される。

10

【0125】

「トレーニングセット」または「既知のセット」または「参照セット」という用語は、個々の有効な全データセットのサブセットを示す。このサブセットは典型的にはランダムに選択され、分類器構築目的のためだけに使用される。

【0126】

有利なことに、MSの一形態（例えば、サブタイプ）を有する患者と対照個体（例えば、健康な個体またはMSの別の形態を患う個体）の間の区別は、多次元空間で実施される。例えば、本明細書の表1で列挙される抗原からなる抗原アレイを用いて実施される診断試験は、94次元で実施される。都合よく、そのような分析は空間を、下記で例示されるように、患者特有の領域および対照個体のためのものに分割することにより実施される。

20

【0127】

下記実施例は、本発明のいくつかの実施形態をより完全に説明するために提示される。しかしながら、これらの実施例は、いかなる意味でも本発明の広い範囲を制限するものと解釈してはならない。

【0128】

実施例

手順

E L I S A

30

抗原（タンパク質に対してはリン酸緩衝生理食塩水中1mg/ml、脂質に対してはエタノール中5mg/ml）を、96ウェルMaxisorp E L I S Aプレート(Nalge Nunc, Rochester, NY)中でコートさせ、E L I S Aを記載されるように実施した(Quintana et al., J Autoimmun 21, 65-75, 2003)。

【0129】

抗原マイクロアレイチップ

PBS中で希釈した抗原を384ウェルプレート中、0.1~1mg/mlの濃度で配置した。直径0.2mmの固体スポットティングピンを有するロボットMicroGridアレイヤー(BioRobotics, Cambridge, U.K.)を使用し、抗原をArrayIt SuperEpoxyマイクロアレイ基材スライド(TeleChem, Sunnyvale, CA)上にスポットさせた。各抗原を3または4回スポットさせた。スポットさせたマイクロアレイを4で保存した。

40

【0130】

チップをPBSで洗浄し、1時間37で、1%BSAを用いてブロックし、2時間37で、湿潤環境中カバースリップ下で、ブロッキング緩衝液中試験血清の1:10希釈物と共にインキュベートした。その後、アレイを洗浄し、45分間、37で、ヤギ抗ヒトIgG Cy3コンジュゲート抗体およびCy5にコンジュゲートさせたヤギ抗ヒトIgMの1:500希釈混合物（どちらも、Jackson ImmunoResearch, West Grove, PAから購入）と共にインキュベートした。アレイをSc

50

an Array 4000Xスキャナ (GSI Lumionics, Billerica, Massachusetts, USA) を用いて走査し、IgMおよびIgG結果を別々に記録した。結果を TIFF ファイルとして記録した。

#### 【0131】

##### 画像およびデータ処理

TIFF ファイル中の各スポットおよび局所背景を構成する画素を、ヒストグラム分割を用いて同定した。各スポットおよびその局所背景の強度を、対応する画素強度の平均として計算した。抗原を含むスポットはいずれも飽和を示さなかった。技術的に欠陥のあるスポットを、目視検査により同定し、データセットから除去した。各スポットに対し、局所背景強度をスポット強度から減算した。負の強度を有するスポットはデータセットから除去した。

10

#### 【0132】

強度の対数ベース 2 変換により、全ての強度レベルで適度に一定な変動性が得られた。各抗原の対数強度は、各スライド上の複製の対数強度の平均として計算した。各アレイ上の複製間の変動性の計数は 10 % 未満であった。アレイ間の強度の全体の差を除去するために、アレイ上の全ての抗原の平均対数強度のメジアンを減算することにより各アレイ上の各抗原の平均対数強度をスケーリングした。抗原のスケーリングした平均対数強度は、抗原の反応性を示した。

#### 【0133】

生データを、GeneSpring ソフトウェア (Silicon Genetics, Redwood City, CA) を用いて正規化し分析した。抗原反応性は、マイクロアレイ上のその抗原の複製への結合の平均強度により規定した。データを、ノンパラメトリック Wilcoxon-Mann-Whitney 試験により、Benjamini-Hochberg 法を使用し、0.05 (RRMS および PPMS 試料の分析) または 0.2 (免疫病理学的パターン I および II 試料の分析) のフォールスディスカバリートを用いて分析し、有意性を決定した。トレーニングセットにおけるリープワンアウト交差検定分析 (LOOCV) および試験セットに対する試料の分類を、トレーニングセット上で差別的であると同定される抗体反応性に基づき試料を分類するサポートベクターマシンを用いて実施した。

20

#### 【0134】

##### 患者および血清試料

血清試料を臨床的寛解中の未処置 RRMS、PPMS 患者または HC から Partners MS センターで収集した。患者は他の自己免疫障害を示さなかった。生検診断による CNS 炎症性脱髓疾患有する 62 人の患者を、780 の元のコホートから、MS 病変プロジェクト (MSLP) に属する中枢神経系炎症性脱髓疾患 (CNSIDD) 生検症例であると同定した。MSLP データベースは、詳述された病理学的、臨床的、画像および血清学的材料を有する生検診断による CNSIDD 症例の特有の集合物からなる (NMSRG 3184-B-3-02)。活動脱髓病変は、前に公表された基準 (Lucchetti et al., 2000) に基づきパターン I または II のいずれかに分類された。血清および対面神経学的評価は、経過観察時の全ての包含される患者について獲得した。対の CSF および血清試料を大学病院、医科大学、セビラ大学で、くも膜下腔内 IgG 分泌および IgG オリゴクローナルバンドが確認された RRMS 患者から収集した。患者の臨床的特徴、病理学的コホートおよび健康な対照を本明細書において、下記の表 6 で列挙する。対照試料は年齢、性別および民族性について一対適合させた。

30

40

表 6 : 患者および健康な対照 (HC) の特徴

【表6】

群	N	性別 (F/M)	年齢	疾患期間	EDSS
RRMS(USA)	39	31/8	42(22-58)	13.0(6.0-27.0)	1.5(0.0-3.5)
RRMS(スペイン人コホート)	51	33/17	44(20-55)	2.3(0.0-24.0)	1.3(0.0-3.5)
SPMS	30	23/7	50(31-64)	8(2.0-27.0)	6.0.(1.5-8.5)
PPMS	37	20/17	55(34-73)	4.5(0.0-25.0)	6.0.(1.5-9.5)
パターンI	15	10/5	42(20-70)	4.1(1.4-16.1)	3(0.0-7.0)
パターンII	53	25/28	44(20-71)	3.3(0.6-37.8)	2(0.0-8.0)
HC	30	18/12	51(20-72)	NA	NA

## 【0135】

本明細書では、「EDSS」はKurtzke拡大機能障害スケール(EDSS)を示し、当技術分野において、多発性硬化症における機能障害を定量化するための方法として知られている。EDSSは8つの機能系(すなわち、錐体路、小脳、脳幹、感覚、腸および膀胱、視覚、大脳、および他の系)における機能障害を定量化し、これにより神経内科医は各系において機能系スコアを割り当てることができる。EDSSステップ1.0~4.5は、完全に歩行可能なMSを有するヒトを示す。EDSSステップ5.0~9.5は歩行運動の障害により規定される。

## 【0136】

アルツハイマー病患者由来の血清およびCSF試料が、神経疾患センター、プリガムアンドウイメンズ病院、ハーバード大学医学部(the Center for Neurological Diseases, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School), Boston, MAのDenis Selkoe博士から提供された。SLE患者由来の血清試料は、リウマチ/免疫学部、プリガムアンドウイメンズ病院(the Department of Rheumatology / Immunology, Brigham and Women's Hospital), Boston, MAのPeter H. Schur博士から提供された。

## 【0137】

試料は下記のように収集した：血液試料は滅菌試験管中に収集し、試験管を室温で30分間放置することにより凝血させた。次に、試験管を2000gで15分間遠心分離させた。液相を新しい試験管に移し、アリコートに分割させ、-20℃以下で保存した。

## 【0138】

## 抗原

ペプチドをハーバード大学医学部の生物化学および分子薬理学部のバイオポリマー施設(the Biopolymers Facility of the Department of Biological Chemistry and Molecular Pharmacology of Harvard Medical School)(HMS)で合成した。組換えタンパク質および脂質をSigma(St. Louis, MO, USA)、Abnova(Taipei City, Taiwan)、Matreya LLC(Pleasant Gap, PA, USA)、Avanti Polar Lipids(Alabaster, AL, USA)、Calbiochem(San Diego, CA, USA)、Chemicon(Temecula, CA, USA)、Genetex(San Antonio, TX, USA)、No

10

20

30

40

50

vus Biologicals (Littleton, CO, USA)、Assay Designs (Ann Arbor, MI, USA)、ProSci Inc. (Poway, CA, USA)、EMD Biosciences (San Diego, CA, USA)、Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)、HyTest (Turku, Finland)、Meridian Life Science (Memphis, TN USA) および Biodesign International (Saco, ME, USA) から購入した。

【0139】

抗原マイクロアレイの構築に使用される抗原は下記の通りとした：熱ショックタンパク質 27 kDa (HSP27)、HSP32、HSP40、HSP47、HSP60、結核菌 HSP65、HSP70、結核菌 HSP71、HSP90 および GroEL (全て Stressgen から購入)；アミノ酸 106-125、1-20、121-140、136-155、151-170、16-35、166-185、181-199、195-214、210-229、225-244、240-259、255-275、271-290、286-305、301-320、31-50、316-335、331-350、346-365、361-380、376-395、391-410、406-425、421-440、436-455、451-470、466-485、46-65、481-500、496-515、511-530、526-545、541-560、556-573、61-80、76-95 および 91-110 からなる HSP60 ペプチド (全て Biopolymers Facility、HMS で合成)；アミノ酸 106-125、1-20、121-140、136-155、151-170、16-35、166-185、181-199、195-214、210-229、225-244、240-259、255-275、271-290、286-305、301-320、31-50、316-335、331-350、346-365、361-380、376-395、391-410、406-425、421-440、436-455、451-470、466-485、46-65、481-500、496-515、511-530、526-545、541-560、556-575、571-590、586-605、601-620、616-635、61-80、631-640、76-95 および 91-110 からなる HSP70 ペプチド (全て Biopolymers Facility、HMS で合成)。

【0140】

アミノ酸 106-125、1-20、121-140、136-155、151-170、16-35、166-185、181-200、195-215、211-230、226-245、241-260、256-275、271-290、286-305、301-320、31-50、316-335、331-350、346-365、361-380、376-395、391-410、406-421、46-65、61-80、76-95 および 91-110 (すべて Biopolymers Facility、HMS で合成) からなる CNS タンパク質 2'、3' - 環状ヌクレオチド 3' - ホスホジエステラーゼペプチド (CNP)；アセチルコリンエ斯特ラーゼ、ADAM-10、クリスタリン、ウシミエリン塩基性タンパク質、脳抽出物 I、脳抽出物 II、脳抽出物 III、モルモットミエリン塩基性タンパク質、ヒトミエリン塩基性タンパク質 (全て Sigma Aldrich から購入)；クリスタリン (Stressgen から購入)；グリアフィラメント酸性タンパク質 (GFAP) (Research Diagnostic Scientific から購入)；アミノ酸 106-125、1-20、121-140、136-155、151-170、16-35、166-185、181-200、31-50、46-65、61-80、76-95 および 91-110 からなる ミエリン関連オリゴデンドロサイト 塩基性タンパク質 (MOBP) ペプチド (全て Biopolymers Facility、HMS で合成)；アミノ酸 106-125、1-20、121-140、136-155、151-170、16-35、166-185、181-200、196-215、211-230、226-247、31-50、35-55、46-65、

10

20

30

40

50

61 - 80、76 - 95 および 91 - 110 からなるミエリン / オリゴデンドロサイト糖タンパク質 (MOG) ペプチド (全て Biopolymers Facility, HMS で合成) ; マウスミエリン塩基性タンパク質 (mMBP) およびミエリン関連糖タンパク質 (Sigma Aldrich から購入) ; アミノ酸 104 - 123, 11 - 30, 113 - 132, 1 - 20, 121 - 138, 124 - 142, 138 - 147, 141 - 161, 143 - 168, 155 - 178, 26 - 35, 31 - 50, 41 - 60, 51 - 70, 61 - 80, 71 - 92, 84 - 94, 89 - 101 および 93 - 112 からなるミエリン塩基性タンパク質 (MBP) ペプチド (全て Biopolymers Facility, HMS で合成) ; アミノ酸 106 - 125, 1 - 20, 121 - 132, 16 - 35, 31 - 50, 46 - 65, 61 - 80, 76 - 95 および 91 - 110 からなるミエリンタンパク質 2 (P2) ペプチド (Biopolymers Facility, HMS で合成) ; 神経フィラメント 160 kd、神経フィラメント 200 kd、神経フィラメント 68 kd (全て Chemicon から購入) ; 神経エノラーゼ (Calbiochem から購入) ; ニカストリン (Genetex から購入) ; NMDA 受容体 (Novus Biologicals から購入) ; NOGO (Sigma Aldrich から購入) ; アミノ酸 106 - 125, 1 - 20, 121 - 140, 136 - 155, 151 - 170, 16 - 35, 166 - 185, 181 - 199, 195 - 217, 31 - 50, 46 - 65, 61 - 80, 76 - 95 および 91 - 110 からなるオリゴデンドロサイト特異タンパク質 (OSP) ペプチド (全て Biopolymers Facility, HMS で合成) ; プロテオリピドタンパク質 (Abnova) ; アミノ酸 100 - 119, 10 - 29, 110 - 129, 1 - 19, 125 - 141, 137 - 150, 137 - 154, 150 - 163, 151 - 173, 158 - 166, 161 - 180, 178 - 191, 180 - 199, 190 - 209, 20 - 39, 205 - 220, 215 - 232, 220 - 239, 220 - 249, 248 - 259, 250 - 269, 265 - 277, 35 - 50, 40 - 59, 50 - 69, 65 - 84, 80 - 99 および 91 - 110 からなるプロテオリピドタンパク質ペプチド (全て Biopolymers Facility, HMS で合成) ; レチノール結合タンパク質、スーパーオキシドジムスター、シヌクレイン、シヌクレイン (Sigma Aldrich) ; および S100 タンパク質 (Assay Designs)。

## 【0141】

組織抗原 (ProSci Inc. から購入) : 扁桃体、扁桃体 AD、脳ライセート、脳組織膜、小脳脚、脳髓膜、脳梁、脳梁 AD、間脳、胎児脳、前頭葉、前頭葉 AD、海馬、海馬 AD、島、後頭葉、後頭葉 AD、嗅部、視神經、頭頂葉、頭頂葉 AD、橋、橋 AD、中止後回、中止後回 AD、中止前回、中止前回 AD、脊髄、側頭葉、側頭葉 AD、視床および視床 AD.

## 【0142】

AD 関連抗原: アミロイド (AB)、AB10 - 20、AB1 - 12、AB12 - 28、AB1 - 23、AB1 - 38、AB17 - 40、AB25 - 35、AB34 - 42、アミロイド b r i タンパク質前駆体 227、アミロイド DAN タンパク質、フラグメント 1 - 34、アミロイド前駆体タンパク質、アミロイドタンパク質非 AB 成分、分泌されたアミロイド前駆体タンパク質 (SAP) ベータ、タウアイソフォーム変異体 0N3R、タウアイソフォーム変異体 1N3R、タウアイソフォーム変異体 0N4R、タウアイソフォーム変異体 2N3R、タウホスホ Ser 412、タウホスホ Ser 441 およびタウホスホ Thr 181 (全て Sigma Aldrich から購入) およびタウタンパク質ヒト (EMD Biosciences から購入)。

## 【0143】

脂質抗原: 1 パルミトイール - 2 - (5' オキソ - バレオイル) - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、15a - ヒドロキシコレステン、15 - ケトコレスタン、15 - ケトコレステン、1 - パルミトイール - 2 - (9' オキソ - ノナノイル) - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、1 - パルミトイール - 2 - アゼラオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン

10

20

30

40

50

、 1 - パルミトイル - 2 - グルタロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン、 5 - コレスタン - 3 , 15 - ジオール、 脳セラミド、 脳 D - エリスロスフィンゴシン、 脳リゾホスファチジルエタノールアミン、 脳 L - - リゾホスファチジルセリン、 脳 L - - ホスファチジルコリン、 脳 L - - ホスファチジル - エタノールアミン、 脳 L - - ホスファチジルセリン、 脳極性脂質抽出物、 脳スフィンゴミエリン、 脳スルファチド、 脳総脂質抽出物、 ガングリオテトラオシルセラミドアシアロ - GM 1 、 総脳ガングリオシドおよび総セレブロシド（全て Avanti Polar Lipids から購入）； 9 ( S ) - H O D E 、 ( ± ) 9 - H O D E 、 イソプロスタン F 2 I ( Cayman Chemical ) ； アシアロガングリオシド - GM 1 、 アシアロガングリオシド - GM 2 、 カルジオリビン、 セラミド、 セラミド 1 - リン酸、 コステロール、 ジシアロガングリオシド - GD 1 B 、 ジシアロガングリオシド - GD 2 、 ジシアロガングリオシド GD 1 a 、 ガラクトセレブロシド、 ガングリオシド混合物、 HDL 、 ヘキサコサン酸（ 26 ）、 ヒドロキシ脂肪酸セラミド、 ラクトセレブロシド、 LDL 、 脂質 A 、 ジホスホリル、 サルモネラ菌由来、 大腸菌由来のリボ多糖、 緑膿菌由来のリボ多糖、 サルモネラ菌由来のリボ多糖、 モノシアロガングリオシド GM 1 、 モノシアロガングリオシド GM 2 、 N - ヘキサノイル - D - スフィンゴシン、 非ヒドロキシ脂肪酸セラミド、 ホスファチジルイノシトール - 4 リン酸、 スクアレン、 スルファチド、 テトラコサン酸（ 24 ）、 TNPAL ガラクトセレブロシドおよびトリシアロガングリオシド - GT 1 B ( Sigma Aldrich ) ； ジシアロガングリオシド GD 3 およびトリシアロガングリオシド GT 1 a ( HyTest ) ； フコシル - GM 1 、 ガングリオシド - GM 4 、 ラクトシルセラミド、 リゾ - GM 1 およびテトラシアロガングリオシド - GQ 1 B ( Calbiochem ) ； ならびにモノシアロガングリオシド GM 3 （全て Meridian から購入）。

10

20

30

#### 【 0144 】

##### 実施例 1

MS における特異的なマイクロアレイ自己抗体を検出するための条件

抗原マイクロアレイを、 MS と関連する疑いのある CNS 抗原、他の神経変性疾患と関連する疑いのある CNS 抗原および熱ショックタンパク質 (HSP) を含む 362 のミエリンおよび炎症関連抗原（本明細書において上記で列挙）を用いて抗原マイクロアレイを構築した。抗原を前に記載されたロボットアレイヤー (Quintana et al., 2004) を用いてエポキシガラススライド上にスポットさせた。

#### 【 0145 】

抗原マイクロアレイ技術の感度を、標準 E L I S A のそれと、 CNS 、 HSP および脂質抗原に対する市販のモノクローナルおよびポリクローナル抗体を用いて比較した。抗原マイクロアレイは、 E L I S A 法を用いて検出された反応性に比べ 1 ~ 2 対数大きい、 10 g<sub>10</sub> 希釈での抗原反応性を検出した（表 7 ）。このように、抗原マイクロアレイは標準 E L I S A アッセイよりも高感度であると考えられる。

表 7 - E L I S A との抗原マイクロアレイの比較

【表7】

希釈	HSP60-1		HSP60-2		HSP60-3	
	アレイ	ELISA	アレイ	ELISA	アレイ	ELISA
1:100	最大	1.98	最大	1.77	45,693	1.64
1:1,000	最大	1.24	最大	1.29	23,731	0.73
1:10,000	48,930	0.64	39,837	0.83	5,375	0.29
1:100,000	31,513	0	3,489	0.17	1,858	0
1:1,000,000	2,380	0	742	0	0	0
1:10,000,000	0	0	0	0	0	0
MBP		PLP		GM4		
希釈	アレイ	ELISA	アレイ	ELISA	アレイ	ELISA
	最大	1.51	最大	2.31	最大	3.13
1:100	46,314	1.09	最大	1.16	29,857	1.61
1:1,000	26,384	0.75	42,084	0.53	16,749	0.5
1:10,000	14,423	0.31	12,294	0.3	7,313	0
1:1,000,000	6,916	0	6,837	0	1,598	0
1:10,000,000	1,810	0	1,332	0	0	0

## 【0146】

どの血清希釈物が、MSにおいて免疫シグネチャーを調べるのに最適であるかを決定するために、健康な対照(HC)およびRRMS被験体の反応性を、IgGおよびIgM抗体の両方に対し、1:10、1:100および1:1000の希釈で分析した。図1Aに示されるように、MSでは、CNS抗原、脂質および熱ショックタンパク質(HSP)に対する平均IgG抗体反応性が、1:100および1:000(最小反応性が観察された)に比べ1:10で最も高くなった( $P < 0.0001$ 、二元配置ANOVA)。平均IgG反応性はまた、HCにおいて1:10希釈で最も高かった( $P < 0.0001$ 、二元配置ANOVA)が、この反応性はMS被験体において明らかになったものより低く(それぞれ、CNS抗原、脂質および熱ショックタンパク質に対し、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.001$ および $P < 0.05$ 、二元配置ANOVA)、実際、1:100および1:100の希釈では、HCと比較したMSのIgG反応性の大きさには差はなかった。対照におけるIgM反応性は、MS被験体においてよりも高くはない場合、同じ高さであった(図1B)。これは、健康なヒトはミエリン抗原および熱ショックタンパク質に対するIgM自己抗体を有して生まれるという観察と一致する(Merbl et al., 2007, J Clin Invest 117, 712-8)。MS被験体は1:10希釈で著しく上昇した血清IgG自己抗体を示したので、抗原マイクロアレイとの血清抗体パターンをこの希釈を用いて調査した。

## 【0147】

1:10希釈で検出された反応性が特異的であることを確立するために、阻害実験を実施し、抗原アレイ上のPLP<sub>261-277</sub>に対する反応性は血清の過剰の未結合PLP<sub>261-277</sub>とのブレインキュベーションにより阻害され得るが、対照ペプチド、HSP<sub>601-20</sub>を用いるとそうではないことを証明した(図1C)。

## 【0148】

10

20

30

40

50

## 実施例 2

抗体パターン分析は R R M S に対する免疫シグネチャーを同定する

R R M S における特有抗体シグネチャーが同定されるかについて調べるために、R R M S を有する 38 の患者および 30 の健康な対照 (H C) 被験体における抗体レパートリーを研究した。試料をトレーニングセット (24 R R M S および 20 対照) およびランダムに選択した試験セット (14 R R M S および 10 対照) に割り当てた。トレーニングセットを使用して、R R M S を対照試料から区別することができる抗体反応性のパターンが同定され得るかどうかを決定した。そのようなパターンが見られた場合、それらをその後、試験セット上で確認した。トレーニングセットを、Wilcoxon-Mann-Whitney 試験を用いて分析し、フォールスディスカバリートークは、Benjamini-Hochberg の方法を用いて制御した (Cohen, I. R., 2007, Nat Rev Immunol. 7, 569-74)。患者および H C の臨床特徴は表 6 に列挙される。

## 【0149】

図 2 A のヒートマップに示されるように、H C から R R M S を識別する反応性のパターン ( $P < 0.0001$ 、Fisher 抽出試験) が同定された。図 2 A で示されるヒートマップに含まれる抗体反応性は本明細書で列挙される (ヒートマップと同じ順で、すなわち上部から底部) : IgG\_MB P 31 - 50, IgG\_HSP70 481 - 500, IgG\_PL P 65 - 84, IgG\_GFAP, IgM\_HSP70 511 - 530, IgM\_MB P 41 - 60, IgM\_HSP60 286 - 305, IgM\_HSP60 496 - 515, IgM\_HSP70 151 - 170, IgM\_HSP60 526 - 545, IgM\_MB P 84 - 94, IgM\_OSP 61 - 80, IgM\_HSP70 31 - 50, IgM\_CNP 286 - 305, IgM\_HSP60 255 - 275, IgM\_HSP60 106 - 125, IgM\_OSP 31 - 50, IgM\_P2 61 - 80, IgM\_MB P 11 - 30, IgM\_HSP60 376 - 395, IgM\_HSP70 286 - 305, IgM\_HSP60 136 - 155, IgM\_HSP70 136 - 155, IgM\_P2 46 - 65, IgM\_OSP 136 - 155, IgM\_P2 1 - 20, IgM\_MO G 91 - 110, IgM\_HSP60 361 - 380, IgM\_HSP70 451 - 470, IgM\_HSP70 210 - 229, IgM\_HSP60 240 - 259, IgM\_HSP60 271 - 290, IgM\_OSP 76 - 95, IgM\_PL P 178 - 191, IgM\_CNP 271 - 290, IgM\_P2 76 - 95, IgM\_HSP70 631 - 640, IgM\_PL P 248 - 259, IgM\_HSP60 195 - 214, IgM\_CNP 61 - 80, IgM\_MO G 196 - 215, IgM\_HSP60 46 - 65, IgM\_HSP70 195 - 214, IgM\_HSP70 436 - 455, IgM\_HSP60 166 - 185, IgM\_MB P 104 - 123, IgM\_MB P 71 - 92, IgM\_PL P 180 - 199, IgM\_HSP70 255 - 275, IgM\_MO B P 166 - 185, IgM\_CNP 240 - 259, IgM\_HSP60 16 - 35, IgM\_HSP60 301 - 320, IgM\_MO B P 151 - 170, IgM\_CNP 91 - 110, IgM\_HSP70 106 - 125, IgM\_CNP 406 - 421, IgM\_HSP60 421 - 40, IgM\_HSP60 61 - 80, IgM\_アミロイド 10 - 20, IgM\_HSP60 511 - 530, IgM\_ラクトセレブロシド, IgM\_HSP70 406 - 425, IgM\_MO G 76 - 95, IgM\_HSP70 316 - 335, IgM\_HSP60 225 - 244, IgM\_HSP60 76 - 95, IgM\_MO G 106 - 125, IgM\_HSP70 466 - 485, IgM\_CNP 1 - 21, IgM\_HSP70 166 - 185, IgM\_HSP70 121 - 140, IgM\_アミロイド 1 - 42, IgM\_MB P 89 - 101, IgM\_CNP 301 - 320, IgM\_HSP70 1 - 20, IgM\_MB P 51 - 70, IgM\_HSP70 496 - 515, IgM\_CNP 16 - 35, IgM\_CNP 76 - 95, IgM\_PL P 10 - 29, IgM\_PL P 190 - 209, IgM\_HSP60 346 - 365, IgM\_HSP60 50

151 - 170、IgM\_HSP70 376 - 395、IgM\_ウシMBP、IgM\_HSP70 556 - 575、IgM\_CNP 391 - 410、IgM\_MOG 211 - 230、IgM\_PLP 220 - 249、IgM\_HSP70 616 - 635、IgM\_アミロイド 1 - 12、IgM\_HSP60 556 - 573、およびIgM\_PLP 250 - 269。

#### 【0150】

このパターンは、94の抗体反応性から構成された。94の反応性のうち、MS対対照(HC)では、90は上方制御され、4が下方制御された。このように、RRMSは特定の自己反応性の獲得または損失の両方と関連する。上方制御される反応性うち、50%がCNS抗原のペプチドに結合するIgM抗体であり、49%が熱ショックタンパク質のペプチドに結合するIgM抗体であった。MS対対照を識別する能力は、1:100または1:1000希釈で見られなかった。10

#### 【0151】

図2Aに示される区別パターンを確認するために、リープワンアウト交差検定分析(LOOCV)をトレーニングセットにおいて実施し(Stekel, D., 2003, Microarray Bioinformatics, Cambridge University Press, Cambridge)、その後、試験セットに対して確認した。トレーニングセットにおけるLOOCVでは、トレーニングセットにおいて真(正)および偽(不正)分類の数が計算され、成功率、陽性的中率(PPV)、陰性的中率(NPV)が評価された。LOOCVは、0.75の陽性的中率(PPV)(抗原マイクロアレイ反応性によりRRMSとして同定されたRRMS患者の割合として規定される)および0.90の陰性的中率(NPV)(抗原マイクロアレイ反応性によりHCとして同定されたHCの割合として規定される)を明らかにし、成功率は0.83( $P < 0.0001$ )であった。最も厳密な確認は、トレーニングセットにおいて同定されたパターンを、それらが試験セットにおいてHCからMS被験体を差別することができるかどうかを決定するために、試験することである。重大なことに、トレーニングセットにおいて同定されたパターンは試料の試験セットを0.85のPPV、0.80のNPV、および0.83の成功率で分類することができた( $P = 0.004$ 、Fisher抽出試験)。20

#### 【0152】

これらの所見をさらに確認するために、スペインのセビリア大学(the University of Seville, Spain)から獲得した51の未処置RRMSを分析し、RRMSが、別の施設および地理的領域由来の試料の独立したコホートを使用して、HCから識別できるかどうかを決定した。同定されたパターンはこの独立したコホートにおいて、0.69の成功率、0.73のPPV、0.58のNPVでRRMSをHCから区別することができた( $P = 0.01$ 、Fisher抽出試験)。30

#### 【0153】

MSにおいて検出されたパターンに対する特異性対照として、全身性エリテマトーデス(SLE)、副腎白質ジストロフィー(ALD)およびアルツハイマー病(AD)を有する患者由来の血清を調べた。SLEは広範囲の自己抗原に対する循環抗体により特徴づけられる慢性自己免疫疾患である。ALDは、非常に長鎖の脂肪酸の蓄積により特徴づけられる変性障害であり、MSと特徴を共有するCNS神経炎症性過程である。ADは自己免疫疾患とは考えられないが、-アミロイド誘導ペプチドに対する免疫応答が報告されている。重大なことに、抗原マイクロアレイ上で検出された抗体パターンは、RRMSをSLE、ALDおよびAD試料から区別した( $P < 0.0001$ 、Fisher抽出試験)。40

#### 【0154】

#### 実施例3

自己抗体パターン分析はPPMSに対する免疫シグネチャーを同定する

PPMSはRRMSとは異なる臨床経過を有し、PPMSにはRRMSとは異なる疾患メカニズムが関与する可能性があることが示唆されている(Miller & Leary, ,2007, Lancet

10

20

30

40

50

Neurol. 6, 903-12)。トレーニングセットにおける24のPPMSおよび25の年齢(および性別)が一致したHC、ならびに試料の試験セットにおける13のPPMSおよび12の対照について研究した。

#### 【0155】

図2Bで示されるヒートマップに含まれる抗体反応性は本明細書で列挙される(ヒートマップと同じ順で、すなわち上部から底部): IgM\_PLP\_215-232、IgG\_PLP\_215-232、IgM\_mMBP、IgG\_HSP70\_195-214、IgM\_smLPS、IgM\_HSP70\_210-229、IgM\_コンドロイチン4-硫酸、IgG\_HSP70\_166-185、IgG\_ウシMBP、IgM\_ウシMBP、IgG\_PLP\_137-150、IgG\_MOG\_46-65、IgG\_CNP\_406-421、IgG\_P2\_31-50、IgG\_CNP\_1-20、IgG\_MOG\_16-35、IgG\_P2\_76-95、IgM\_神経フィラメント\_68kDa、IgM\_アミロイド、IgG\_HSP70\_466-485、IgM\_AB\_1-40、IgM\_PLP\_161-180、IgM\_PLP\_40-59、IgM\_PLP\_137-150、IgG\_HSP60\_76-95、IgG\_MOG\_151-170、IgG\_P2\_1-20、IgG OSP\_61-80、IgM 分泌されたAPP\_、IgG\_PLP\_178-191、IgM\_gpMBP、IgG\_HSP70\_16-35、IgM\_MBP\_104-123、IgM\_SOD、IgM\_CNP\_1-20、IgM\_eCLPS、IgG\_HSP70\_121-140、IgM\_MOBP\_61-80、およびIgG OSP\_1-20。

10  
20

#### 【0156】

ヒートマップ(図2B)は、有意性試験を通過し、PPMSとHCをトレーニングセット( $P < 0.0001$ 、Fisher抽出試験)と試験セット( $P < 0.01$ 、Fisher抽出試験)の両方で区別することができる抗体反応性を示す。学習セットに対するLOOCVは、86%の全体効率、 $PPV = 0.87$ および $NPV = 0.85$ を明らかにした。試験セットに対する効率は72%であり、 $PPV = 0.79$ および $NPV = 0.75$ であった。RRMSのように、抗原マイクロアレイは、1:10希釈で、PPMSを対照被験体から区別することができたが、1:100または1:1000の希釈ではできなかった。さらに、RRMSのように、抗原マイクロアレイ分析は、PPMSと他の疾患(SELE、ALD、AD、 $P < 0.001$ 、Fisher抽出試験)を区別した。

30

#### 【0157】

PPMSにおける区別反応性はIgG(51%)およびIgM(49%)であり、主にCNS抗原に対して向けられた(図2B~2D)。PPMS免疫シグネチャーにおけるCNS抗原はRRMSシグネチャーにおけるものとは異なった。RRMS CNSシグネチャーはCNS<sup>1</sup>と称せられ、PPMS CNSシグネチャーはCNS<sup>2</sup>と称された(図2Hおよび表8)。RRMSとPPMSのさらなる比較から、PPMSでは観察されなかつた、RRMSにおけるHSP60またはHSP70に対する顕著な反応性が明らかになつた(図2A~2D)。さらに、PPMSにおける区別反応性の46%は、HCに比べPPMSにおいて減少した抗体から構成され、一方、RRMSでは、区別抗体の4%しかHCに比べ減少しなかつた(図2B~2Dおよび表8および9)。HCと比較してPPMSを区別する反応性とRRMSを区別する反応性の間にはわずかな重なりしかなかつた。この所見は、異なる免疫過程がこれらのMSの2つの形態で起こるという見解(Miller & Leary, 2007)と適合した。

40

#### 【0158】

##### 実施例4

抗体パターン分析はSPMSに対する免疫シグネチャーを同定する

RRMS患者の約50%が進行性となる(SPMs)。SPMsへの移行に関連するメカニズムについては合意はないが、いくつかの研究から、炎症応答の性質の変化および神経変性過程の出現はMSに二次性進行期において起こることが示唆される。HSPに対する反応性の増加およびCNS抗原に対する反応性の特有のパターン(CNS<sup>1</sup>)からなる

50

R R M S における自己抗体シグネチャーを同定し、37R R M S 対30S P M S 試料における抗体反応性を比較することによりS P M S に関連する抗体シグネチャーを研究した(図2E)。

### 【0159】

図2Eに示されるヒートマップに含まれる抗体反応性は本明細書で列挙される(ヒートマップと同じ順で、すなわち上部から底部): IgM\_MOG\_61-80、IgM\_HSP60\_376-395、IgM\_MOG\_31-50、IgM\_CNP\_361-380、IgM\_アミロイド\_1-23、IgM\_CNP\_346-365、IgM\_HSP60\_496-515、IgM\_OSP\_1-20、IgM\_HSP60\_511-530、IgM\_OSP\_61-80、IgM\_HSP60\_286-305、IgM\_CNP\_240-259、IgM\_HSP70\_601-620、IgM\_HSP60\_210-229、IgM\_HSP60\_451-470、IgM\_MOBP\_166-185、IgM\_HSP60\_166-185、IgM\_MB\_P\_138-147、IgM\_CNP\_195-214、IgM\_MB\_P\_1-20、IgM\_HSP60\_526-545、IgM\_P2\_1-20、IgM\_HSP70\_286-305、IgM\_MB\_P\_155-178、IgM\_P2\_46-65、IgM\_HSP60\_195-214、IgM\_P2\_31-50、IgM\_HSP60\_271-290、IgM\_HSP60\_136-155、IgM\_CNP\_286-305、IgM\_HSP70\_210-229、IgM\_HSP70\_136-155、IgM\_PLP\_150-163、IgM\_HSP70\_166-185、IgM\_HSP60\_255-275、IgM\_HS\_P60\_16-35、IgM\_ウシMBP、IgM\_CNP\_181-199、IgM\_CNP\_121-140、IgM\_アシアロガングリオシド-GM2、IgM\_アミロイド\_1-12、IgM\_OSP\_121-140、IgM\_分泌されたAPP、IgM\_カルジオリピン、IgM\_HSP70\_406-425、IgG\_HSP60\_361-380、IgG\_アミロイド\_17-40、IgG\_コレステロール、IgG\_アミロイド\_1-42、IgG\_PLP\_80-99、IgG\_PLP\_65-84、IgG\_PLP\_40-59、IgG\_PLP\_1-19、IgM\_PLP\_1-19、IgG\_PLP\_151-173、IgG\_HSP70\_421-440、IgG\_huMBP、IgG\_MOBP\_16-35、IgG\_CNP\_16-35、IgG\_RB\_P、IgG\_HSP70\_331-350、IgG\_OSP\_121-140、IgG\_MB\_P\_113-132、IgG\_クリスタリン、IgG\_CNP\_240-259、およびIgG\_PLP\_178-191。

### 【0160】

結果から、71%の成功率( $P = 0.0073$ )でS P M S はR R M S から区別することができる事が示される。S P M S はR R M S において見られたHSP60およびHSP70へのIgM抗体の減少により特徴づけられた(図2Eならびに表8および9)。このように、S P M S およびP P M S はどちらもHSPに対してほんのわずかの反応性しか有しないという点で類似する。S P M S におけるC N S 反応性試験から、R R M S では上方制御されたC N S IgM抗体の減少、およびC N S 反応性IgG抗体の増加が明らかになった。S P M S に対するC N S シグネチャーはR R M S およびP P M S の両方と異なり、C N S<sup>3</sup>と称された(図2E~2H、表8)。

表8: R R M S 、P P M S およびS P M S におけるC N S 抗原に対する反応性

10

20

30

40

【表8】

	IgM				IgG		
抗原	RRMS (CNS1)	PPMS (CNS2)	SPMS (CNS3)		RRMS (CNS1)	PPMS (CNS2)	SPMS (CNS3)
IgM_βアミロイド		s				t	
IgM_βアミロイド 1-12	s		t			t	
IgM_βアミロイド 1-23			t				
IgM_βアミロイド 10-20	s						
IgM_βアミロイド 12-28							
IgG_βアミロイド 17-40			s				
IgM_βアミロイド 1-42	s		s				
IgM_βアミロイド 1-40		s					
IgG_βクリスタリン			s				
IgM_ウシMBP	s	t					
IgM_CNP 1-20	s	s					
IgM_CNP 16-35	s		s				
IgM_CNP 61-80	s						
IgM_CNP 76-95	s						
IgM_CNP 91-110	s						
IgM_CNP 121-140			t				
IgM_CNP 181-199			t				
IgM_CNP 195-214			t				
IgM_CNP 240-259	s		t				
IgM_CNP 271-290	s						
IgM_CNP 286-305	s		t				
IgM_CNP 301-320	s						
IgM_CNP 346-365			t				
IgM_CNP 361-380			t				
IgM_CNP 376-395							
IgM_CNP 391-410	s						
IgM_CNP 406-421	s						
IgM_神経filaメント 68kDa			t				
IgM_gpMBP			s				
IgM_ウシMBP			t				
IgM_mMBP		t					
IgM_MBp 1-20			t				
IgM_MBp 11-30	s						
IgM_MBp 41-60	s						
IgM_MBp 51-70	s						
IgM_MBp 71-92	s						
IgM_MBp 84-94	s						
IgM_MBp 89-101	s						
IgM_MBp 104-123	s	s					
IgM_MBp 138-147				t			
IgM_MBp 155-178				t			
IgM_MOBP 61-80			s				
IgM_MOBP 151-170	s						
IgM_MOBP 166-185	s			t			
IgM_MOG 31-50				t			
IgM_MOG 61-80				t			
IgM_MOG 106-125	s						
IgM_MOG 196-215	s						
IgM_MOG 211-230	s						
IgM_MOG 76-95	s						

10

20

30

40

表9 - R R M S 、 S P M S および P P M S における H S P に対する反応性

【表9】

抗原	RRMS	PPMS	RRMS 対SPMS	
IgM_HSP60 16-35	s		t	
IgM_HSP60 46-65	s			
IgM_HSP60 106-125	s			
IgM_HSP60 136-155	s		t	
IgM_HSP60 151-170	s			
IgM_HSP60 166-185	s		t	
IgM_HSP60 195-214	s		t	
IgM_HSP60 210-229			t	10
IgM_HSP60 225-244	s			
IgM_HSP60 240-259	s			
IgM_HSP60 255-275	s		t	
IgM_HSP60 271-290	s		t	
IgM_HSP60 286-305	s		t	
IgM_HSP60 301-320	s			
IgM_HSP60 346-365	s			
IgM_HSP60 361-380	s			
IgM_HSP60 376-395	s		t	
IgM_HSP60 421-440	s			
IgM_HSP60 451-470			t	
IgM_HSP60 496-515	s		t	20
IgM_HSP60 511-530	s		t	
IgM_HSP60 526-545	s		t	
IgM_HSP60 556-573	s			
IgM_HSP60 61-80	s			
IgM_HSP60 76-95	s	s		
IgM_HSP70 1-20	s			
IgM_HSP70 31-50	s			
IgM_HSP70 106-125	s			
IgM_HSP70 121-140	s	s	t	
IgM_HSP70 136-155	s			
IgM_HSP70 151-170	s			
IgM_HSP70 166-185	s	t	t	30
IgM_HSP70 195-214	s	t		
IgM_HSP70 210-229	s	t	t	
IgM_HSP70 255-275	s		t	
IgM_HSP70 286-305	s			
IgM_HSP70 316-335	s			
IgM_HSP70 376-395	s			
IgM_HSP70 406-425	s		t	
IgM_HSP70 436-455	s			
IgM_HSP70 451-470	s			
IgM_HSP70 466-485	s	s		
IgM_HSP70 496-515	s			
IgM_HSP70 511-530	s			
IgM_HSP70 556-575	s			40

## 【0161】

C N P および H S P に対する抗体反応性における有意の変化の検出は、表 8 および 9 において黒マスとして示され、一方、H C ( R R M S および P P M S では ) または R R M S ( S P M S では ) に対し、「 s 」は上方制御を示し、「 t 」は下方制御を示す。

## 【0162】

## 実施例 5

自己抗体パターンは M S の病理学的サブタイプを識別する

Lucchinetti、Bruck および Lassmann は M S の 4 つの免疫病理学的パターンを規定した (Lucchinetti et al., 2000;

Lucchinetti et al., 2004)。調査を 15 のパターン I 被験体および 30 のパターン II

被験体由来の脳生検時に採取した血清に対して実施した。

#### 【0163】

図3に示されるヒートマップに含まれる抗体反応性は本明細書で列挙される(ヒートマップと同じ順で、すなわち上部から底部)：IgG\_15-ケトコレスタン、IgG\_15a-ヒドロキシコレステン、IgG\_ガングリオシド-GM4、IgG\_15-ケトコレステン、IgG\_テトラシアロガングリオシド-GQ1B、IgG\_脳L-リゾホスファチジルセリン、IgG\_ラクトシルセラミド、IgM\_160kDa. 神経フィラメント、IgG\_HSP60 240-259、IgG OSP 166-185、IgG MOG 196-215、IgG OSP 61-80、IgG OSP 1-20、およびIgG PLP 215-232。図3に示されるように、自己抗体パターンは、パターンIをパターンIIから区別することができた( $P = 0.0082$ 、Fisher抽出試験)。この所見を確認するために、23の新しいパターンII試料とランダムに混合された上記分析のために使用される15のパターンIを含む盲検セットの試料に対して分析を実施した。この確認試験では、パターンIはパターンIIから識別された( $P = 0.0017$ 、Fisher抽出試験)。学習セットに対するLOOCVから、成功率0.78、PPV=0.78およびNPV=0.67が明らかになり、試験セットに対する成功率は0.78であり、PPV=0.82およびNPV=0.73となった。

10

#### 【0164】

パターンIをパターンIIから識別する免疫シグネチャーは、脂質、HSPおよびCN抗原に対する13のIgGおよび1のIgM反応性から構成された(図3)。パターンII被験体はHSP60、MOG、OSPおよびPLPペプチドエピトープに対するIgG反応性の増加を示した。特に、パターンI被験体における上方制御された反応性は7の脂質に対するIgG抗体であり、これらの脂質のうちの3つはコレステロールの酸化誘導体であった(15-ケトコレステン、15-ケトコレスタンおよび15a-ヒドロキシコレステン)。

20

#### 【0165】

##### 実施例6

コレステロール誘導体は実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を悪化させる

コレステロールの酸化誘導体、7-ケトコレステロールは、ポリアDPリポースポリメラーゼ-1酵素(PARP)依存性経路を介してミクログリア細胞を活性化することによりMS病理の一因となることが仮定されている。酸化コレステロール誘導体(oxChol)に対する自己抗体と疾患病理の間の関係を調査するために、実施例5で見られる脂質の効果をEAE、MSの免疫モデルについて試験した。

30

#### 【0166】

EAEを、MOG35-55を有するC57BL/6マウスで誘発し、15-ケトコレステン、15-ケトコレスタンおよび15a-ヒドロキシコレステンをEAE誘発後0、4、7および10日に投与した(10 $\mu$ g/マウス)。AIQを毎日腹腔内投与した(60 $\mu$ g/マウス)。これらのマウスにおけるEAEの経過を平均EAEスコア+s.e.m.として示す(MOG<sub>35-55</sub>n=22、MOG<sub>35-55</sub>+oxCholn=24、MOG<sub>35-55</sub>+oxChol+AIQn=18)。

40

#### 【0167】

脊髄を19日に採取し、ヘマトキシシリンおよびエオシン、ルクソールファーストブルーまたは銀染色を用いて染色し、それぞれ、細胞浸潤物、脱髓および軸索損失を定量した。各列は少なくとも8切片の分析から得られた平均±SEMを表す。oxCholの投与は、臨床上測定されるようにEAEを増加させ(図4A、 $P < 0.0001$ 、二元配置ANOVA)、炎症性浸潤(図4B、 $P < 0.05$ 、一元配置ANOVA)、脱髓(図4C、 $P < 0.01$ 、一元配置ANOVA)および軸索損失(図4D、 $P < 0.001$ 、一元配置ANOVA)を増強させ、これらの効果はAIQを用いた処置により阻害された( $P < 0.001$ 、一元ANOVA)。

#### 【0168】

50

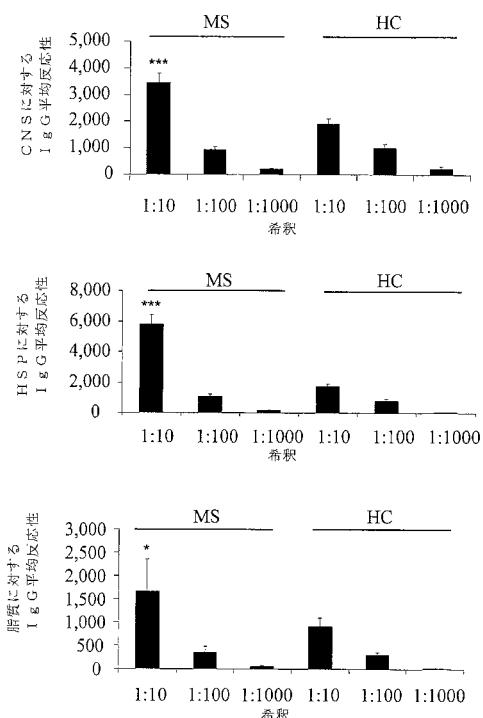
さらに、EAEに対する $\text{o}_x\text{Chol}$ の効果がPARPにより媒介されたかどうかを決定するためにさらなる調査を実施した。PARP阻害剤、5-アミノイソキノリノン(AIQ)を用いると、AIQは、臨床的に( $P < 0.0001$ 、二元配置ANOVA)および病理組織学的に( $P < 0.001$ 、一元配置ANOVA)、 $\text{o}_x\text{Chol}$ により引き起こされたEAEの悪化を抑制した(図4A~D)が、サイトカイン(IFN- $\alpha$ およびIL-17)または増殖により測定されるMOG<sub>35-55</sub>に対するT細胞応答に影響しなかつたことが見出された。さらに、 $\text{o}_x\text{Chol}$ -処置マウス由来の血清の移行はEAEを増強しなかつた。統合すると、これらの結果から、 $\text{o}_x\text{Chol}$ のEAEへの効果は $\text{o}_x\text{Chol}$ のPARPを介した効果によるものであり、抗脂質抗体の誘発またはMOG<sub>35-55</sub>に対する適応T細胞応答への影響によるものではないことが示唆される。

10

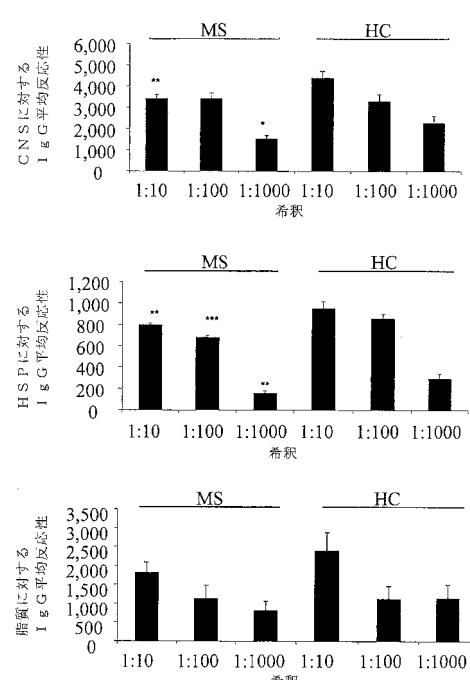
## 【0169】

特定の実施形態の前記説明は本発明の一般的性質を完全に明らかにしており、現在の知識を適用することにより、他のものは、現在の知識を適用することにより、様々な用途、例えば特定の実施形態に対し、必要のない実験なしで、一般概念から逸脱せずに、容易に改変および/または適合させることができ、そのため、そのような適合および改変は、開示された実施形態の等価物の意味および範囲内に含まれるよう意図されている。本明細書で使用される表現または専門用語は、説明目的のためであり、制限するものではないことが理解されるべきである。様々な開示された機能を実施するための手段、材料および工程は、本発明から逸脱せずに様々な別形態をとることができる。

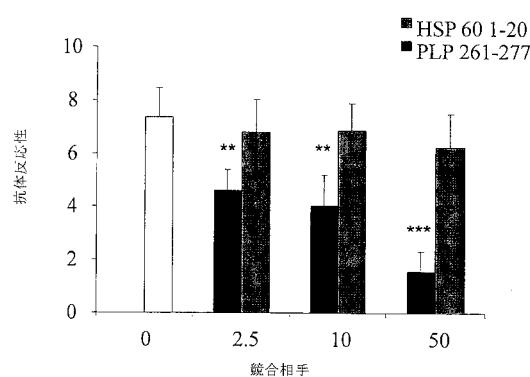
【図1A】



【図1B】



【図 1 C】

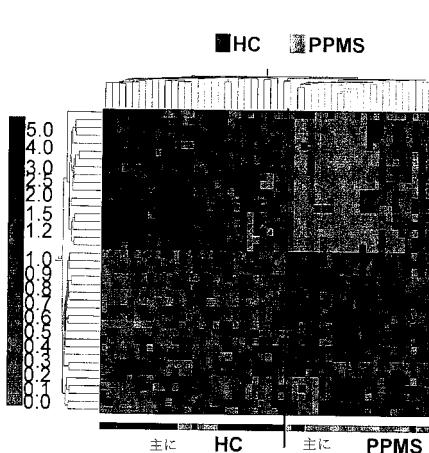


【図 2 A】

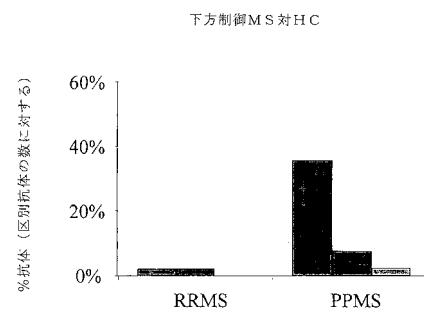


Figure 2A

【図 2 B】

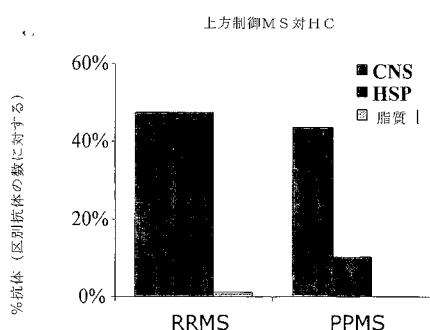


【図 2 D】



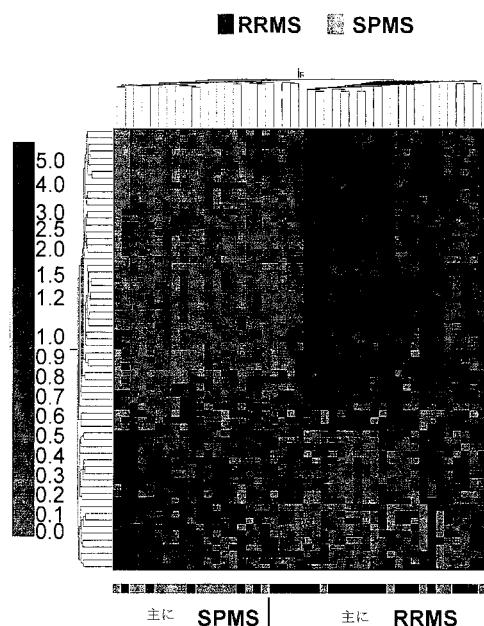
下方制御 MS 対 HC

【図 2 C】

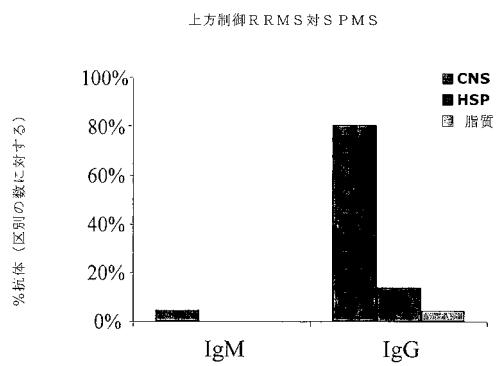


上方制御 MS 対 HC

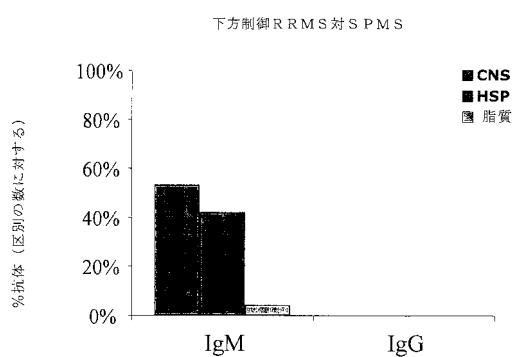
【図 2 E】



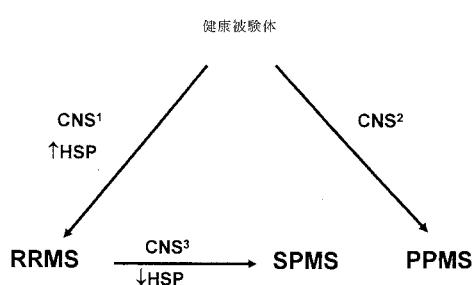
【図 2 F】



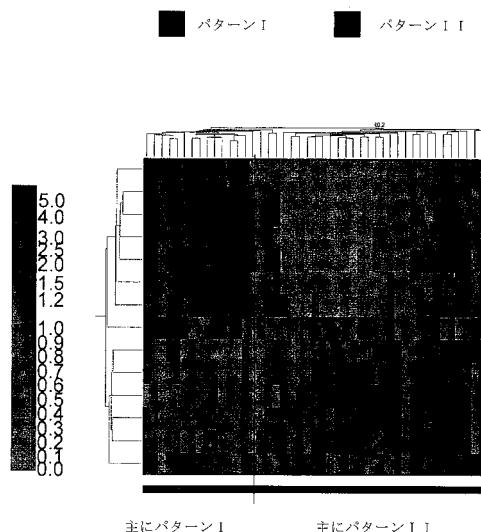
【図 2 G】



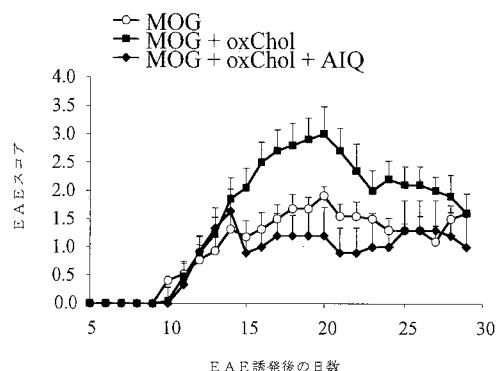
【図 2 H】



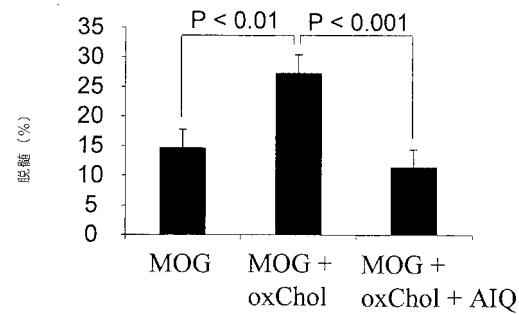
【図 3】



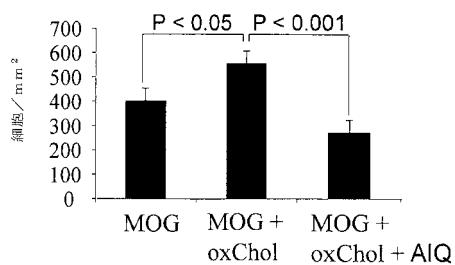
【図4 A】



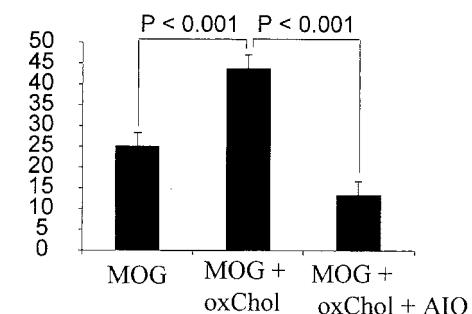
【図4 C】



【図4 B】



【図4 D】



【配列表】

2012508865000001.xml

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IL 09/01066												
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - G01N 33/53; G01N 33/00; C07K 16/00 (2010.01) USPC - 435/7.1; 435/7.92; 530/387.9 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> <small>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)</small> <small>USPC: 435/7.1; 435/7.92; 530/387.9</small>														
<small>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</small> <small>USPC: 436/501; 436/86; 436/94; 435/7.9 (text search)</small>														
<small>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)</small> <small>PubWEST (PGPB, USPT, EPAB, JPAB); Google Scholar: Multiple Sclerosis (MS) (subtypes: RRMS, SPMS, PPMS); MS subtype diagnosis, autoantibody, autoantigen, biomarker, antigen array, molecular signature or profile, specific antigens: HSP70, HSP60, MBP, MOG, MOBP, SOD, PLP, P2, CNP. GenCore 6.3: SEQ ID NOs: 6, 23</small>														
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>														
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
A	US 2006/0089302 A1 (ABULAFIA-LAPID et al.) 27 April 2006 (27.04.2006) para [0054]-[0055], [0071], SEQ ID NOs: 2, 3, 9-12, 14-15, 20, 32-33, 35, 41	1-43												
A	LUCCINNETTI et al. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. Ann Neurol June 2000, 47(6):707-717; abstract	1-21, 42, 43												
X,P	QUINTANA et al. Antigen microarrays identify unique serum autoantibody signatures in clinical and pathologic subtypes of multiple sclerosis. Proc Nat Acad Sci ePub 21 November 2008, 105:18889-18894; pg 18890-18891 fig 1A,B,E; Supplementary tables S4, S5, S8 and S9	1-43												
A	WO 2006/117689 A2 (DOTAN et al.) 9 November 2006 (09.11.2006)	1-43												
A,P	LORENZ et al. Probing the epitope signatures of IgG antibodies in human serum from patients with autoimmune disease. Methods Mol Biol 20 April 2009, 524:247-258	1-43												
A	US 2005/0009096 A1 (GENAIN et al.) 13 January 2005 (13.01.2005)	1-43												
A	US 2007/0020691 A1 (KANTER et al.) 25 January 2007 (25.01.2007)	1-43												
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>														
<table border="0"> <tr> <td>* Special categories of cited documents:</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"&amp;" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family	"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	
* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention													
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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													
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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													
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family													
"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														
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report													
15 June 2010 (15.06.2010)	01 JUL 2010													
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young <small>PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774</small>													

---

フロントページの続き

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

(74)代理人 100114775

弁理士 高岡 亮一

(74)代理人 100121511

弁理士 小田 直

(72)発明者 ウェイナー, ハワード, エル.

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 02445, ブルックリン, 72 コルボルン クレッセント

(72)発明者 コーエン, イラン, アール.

イスラエル国, 76354 リホボット, 11 ハンキン ストリート

(72)発明者 クウインタナ, フランシスコ, ジェイ.

アルゼンチン共和国, 1640 ブエノス アイレス, マチネス, 1340 イタリア

F ターム(参考) 4H045 AA11 AA20 AA30 BA16 BA17 BA18 BA19 CA11 CA40 DA86

EA50 FA20