

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 6 部門第 1 区分

【発行日】平成 26 年 5 月 29 日 (2014.5.29)

【公表番号】特表 2013-529292 (P2013-529292A)

【公表日】平成 25 年 7 月 18 日 (2013.7.18)

【年通号数】公開・登録公報 2013-038

【出願番号】特願 2013-504084 (P2013-504084)

【国際特許分類】

G 0 1 N 33/564 (2006.01)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

G 0 1 N 37/00 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

A 6 1 K 39/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 P 27/02 (2006.01)

A 6 1 P 27/06 (2006.01)

C 1 2 N 5/071 (2010.01)

【F I】

G 0 1 N 33/564 Z

G 0 1 N 33/53 N

G 0 1 N 37/00 1 0 2

C 1 2 Q 1/02

A 6 1 K 39/00 H

A 6 1 K 39/395 D

A 6 1 P 27/02

A 6 1 P 27/06

C 1 2 N 5/00 2 0 2 A

【手続補正書】

【提出日】平成 26 年 4 月 9 日 (2014.4.9)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 少なくとも 1 つの少なくとも部分的に精製された眼の抗原を含む少なくとも 1 つのサンプルを与えるステップと、

(b) ステップ a) において与えられた前記眼の抗原サンプルの少なくとも 1 つと体液を反応させるステップと、

(c) 少なくとも 1 つの眼の抗原サンプルについて自己免疫反応性値を決定するよう前記体液における自己抗体と前記眼の抗原サンプルの少なくとも 1 つとの間の前記ステップ b) の反応を検出および / または定量化するステップと、

(d) 少なくとも 1 つの眼の抗原サンプルについて緑内障スコアを決定するよう、測定された自己免疫反応性値を緑内障患者および / または健康な人から得られた標準データと比較するステップと、

(e) 任意で、前記少なくとも 1 つの緑内障スコアの評価により診断結果を決定するステップとを含む、緑内障の診断方法であって、

ステップ a ) において、少なくとも 1 つの部分的に精製された眼の抗原を含む少なくとも 2 つのサンプル、または少なくとも 2 つの部分的に精製された眼の抗原を含む少なくとも 1 つのサンプルが与えられ、

任意で、ステップ a ) ~ e ) の少なくとも 1 つにおいて、前記眼の抗原サンプルの少なくとも 1 つまたは少なくとも 1 つの眼の抗原に対する前記自己免疫反応性の前記診断結果への寄与を調整するよう重み付け係数が割り当てられる、緑内障の診断方法。

【請求項 2】

少なくとも 1 つの重み付け係数が、ステップ ( c )、( d )、( e ) の少なくとも 1 つの間に適用されるアルゴリズムにより前記眼の抗原サンプルの少なくとも 1 つに割り当てられ、および / または

少なくとも 1 つの重み付け係数が前記体液との反応のために与えられた個々の眼の抗原の量を重み付けすることによって導入されるか、または前記反応のために与えられた体液の量が重み付けされる、請求項 1 に記載の緑内障の診断方法。

【請求項 3】

前記眼の抗原の少なくとも 1 つのサンプルは、

アクチン、アルブミン、 - 1 - アンチトリプシン、アネキシン I - I V、アネキシン V、 - 2 - アドレナリン受容体、脳由来神経栄養因子 ( B D N F )、カルレティキュリン、カルジオリピン、 - A - クリスタリン、 - B - クリスタリン、 - L - クリスタリン、 - S - クリスタリン、 - クリスタリン、DNA トポイソメラーゼ 1、フィブロネクチン、 - フォドリン ( = スペクトリン )、グリア線維酸性タンパク質 ( G F A P )、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ、熱ショックタンパク質 H S P 1 0 ( = シャペロニン )、H S P 2 7、H S P 6 0、H S P 7 0、インスリン、j o - 1、リゾチーム、ミエリン結合タンパク質 ( M B P )、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 ( M O G )、ミオグロビン、ニューロン特異エノラーゼ ( N S E )、ニューロトロフィン 3、ニューロトロフィン 4、ニューロトロフィン 5、パーオキシドジスムターゼ、3 - ホスホセリン、プレアルブミン、プロテインキナーゼ C 阻害剤、プロテインキナーゼ C、スーパーオキシドジスムターゼ、 - シヌクレイン、 - シヌクレイン、チレオグロブリン、トランスフェリン、トランスチレチン、トポイソメラーゼ阻害剤、ユビキチン、血管内皮細胞増殖因子 ( V E G F )、ビメンチンといった 4 8 個の少なくとも部分的に精製された眼の抗原の群 1 のうちの少なくとも 2 つの抗原を含む、請求項 1 または 2 に記載の緑内障の診断方法。

【請求項 4】

前記眼の抗原サンプルの少なくとも 1 つのサンプルは、

アクチン、 - 1 - アンチトリプシン、アネキシン V、 - A - クリスタリン、 - B - クリスタリン、 - L - クリスタリン、 - S - クリスタリン、 - クリスタリン、 - フォドリン ( = スペクトリン )、グリア線維酸性タンパク質 ( G F A P )、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ、H S P 2 7、H S P 6 0、H S P 7 0、j o - 1、ミエリン結合タンパク質 ( M B P )、ニューロン特異エノラーゼ ( N S E )、プロテインキナーゼ C 阻害剤、スーパーオキシドジスムターゼ、トランスフェリン、トランスチレチン、ユビキチン、血管内皮細胞増殖因子 ( V E G F )、ビメンチンといった 2 4 個の眼の抗原の群 A から選択される少なくとも 2 つの抗原を含むか、または

前記眼の抗原の少なくとも 1 つのサンプルは、群 A および / またはアネキシン I - I V、 - 2 - アドレナリン受容体、カルレティキュリン、熱ショックタンパク質 H S P 1 0 ( = シャペロニン )、インスリン、パーオキシドジスムターゼ、プロテインキナーゼ C、 - シヌクレイン、 - シヌクレインといった 9 個の追加の眼の抗原の群 B のいずれかから選択される少なくとも 2 つの抗原を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の緑内障の診断方法。

【請求項 5】

前記少なくとも部分的に精製された眼の抗原の少なくとも 1 つのサンプルは、

アルブミン、 - 1 - アンチトリプシン、アネキシン I - I V、アネキシン V、脳由来

神経栄養因子 (BDNF)、カルレティキュリン、カルジオリピン、- L - クリスタリン、  
- S - クリスタリン、  
- クリスタリン、DNAトポイソメラーゼ1、フィブロネクチン、熱ショックタンパク質HSP10 (=シャペロニン)、インスリン、j o - 1、  
リゾチーム、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (MOG)、ミオグロビン、ニューロトロフィン3、ニューロトロフィン4、ニューロトロフィン5、パーオキシドジスムターゼ、3 - ホスホセリン、プレアルブミン、プロテインキナーゼC阻害剤、プロテインキナーゼC、スーパーオキシドジスムターゼ、  
- シヌクレイン、チレオグロブリン、トランスフェリン、トランスチレチン、トポイソメラーゼ阻害剤、ユビキチン、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) といった3 4 個の眼の抗原の群2のうち少なくとも1つの眼の抗原を含む、請求項1または2に記載の緑内障の診断方法。

【請求項6】

前記少なくとも部分的に精製された眼の抗原の少なくとも1つのサンプルは、  
アルブミン、  
- 1 - アンチトリプシン、アネキシンI - IV、アネキシンV、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、カルレティキュリン、カルジオリピン、  
- L - クリスタリン、  
- S - クリスタリン、  
- クリスタリン、DNAトポイソメラーゼ1、フィブロネクチン、熱ショックタンパク質HSP10 (=シャペロニン)、インスリン、j o - 1、  
リゾチーム、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (MOG)、ミオグロビン、ニューロトロフィン3、ニューロトロフィン4、ニューロトロフィン5、パーオキシドジスムターゼ、3 - ホスホセリン、プレアルブミン、プロテインキナーゼC阻害剤、プロテインキナーゼC、スーパーオキシドジスムターゼ、  
- シヌクレイン、チレオグロブリン、トランスフェリン、トポイソメラーゼ阻害剤、ユビキチンの眼の抗原のうち少なくとも1つの眼の抗原を含む、請求項1または2に記載の緑内障の診断方法。

【請求項7】

前記少なくとも部分的に精製された眼の抗原の少なくとも1つのサンプルは、  
- 1 - アンチトリプシン、アネキシンI - IV、アネキシンV、カルレティキュリン、  
- L - クリスタリン、  
- S - クリスタリン、  
- クリスタリン、熱ショックタンパク質HSP10 (=シャペロニン)、インスリン、j o - 1、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (MOG)、パーオキシドジスムターゼ、プレアルブミン、プロテインキナーゼC阻害剤、プロテインキナーゼC、スーパーオキシドジスムターゼ、  
- シヌクレイン、トランスフェリン、トランスチレチン、ユビキチンの眼の抗原のうち少なくとも1つの眼の抗原を含む、請求項1または2に記載の緑内障の診断方法。

【請求項8】

前記部分的に精製された眼の抗原の少なくとも2つのサンプルが、抗原担持要素の上に担持され、および

特に、体液が、マイクロアレイチップ上で、ラテラルフローテストストリップ上で、マイクロ流体チップ上で、または他の流体のもしくはビーズベースのアッセイで、抗原と反応し、および

特に、10よりも少ない眼の抗原が、抗原担持要素の上に担持され、および

特に、体液が涙であり、および/または体液が、収集され、乾燥され、任意で保存され、その後、ステップb)における使用のために戻される、  
請求項1～6のいずれかに記載の緑内障の診断方法。

【請求項9】

請求項1～8のいずれか1項に記載の緑内障の診断方法のための抗原担持要素であって、少なくとも1つの少なくとも部分的に精製された眼の抗原の少なくとも1つのサンプルを担持する、抗原担持要素。

【請求項10】

少なくとも部分的に精製された眼の抗原の少なくとも1つのサンプルが、請求項5～7のいずれか1つに記載の抗原から選択される少なくとも1つの抗原を含む、抗原担持要素

【請求項11】

抗原ゾーンと体液のための受取ゾーンとを含む、請求項9または10に記載の抗原担持要素であって、

特に、前記受取ゾーンは、涙または他の体液を収集するための吸収材料を含み、任意で患者に直接的に接触するように設計される、抗原担持要素。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の診断方法のための、および / または請求項 9 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の抗原担持要素を含む、緑内障の診断のためのキット。

【請求項 13】

緑内障の診断のための、請求項 5 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の眼の抗原、当該眼の抗原の 1 つ以上の任意の組み合わせ、またはこれら抗原に特異的な抗体のいずれか、または特に緑内障の診断のための、担持要素上のこれらの抗原または抗体のいずれか。

【請求項 14】

治療処置における、特に緑内障の治療における使用のための、請求項 5 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の眼の抗原、当該眼の抗原の 1 つ以上の任意の組み合わせ、またはこれらの抗原のいずれかに特異な抗体のいずれか。

【請求項 15】

医療処置または緑内障の治療のための組成物における使用のための、請求項 5 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の眼の抗原、当該眼の抗原の 1 つ以上の任意の組み合わせ、またはこれらの抗原のいずれかに特異な抗体のいずれか。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0093

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0093】

【図 1】接触印刷 (A) とピエゾベースのスポット配置技術 (B) とによって生成される抗ヒト IgG / A / M の折り返されるスポットの図である。

【図 2 A】研究用マイクロアレイ上の眼の抗原について項目化された変動係数 (CV) の図である。

【図 2 B】研究用マイクロアレイ上の異なる抗原について項目化された標準偏差 (SD) の図である。

【図 3】4 つの異なる抗原についての異なるデータ処理から得られるデータの比較の図である。生データ (A)、AUC データ (B)、および Z スコアデータ (C) がリスト化される。

【図 4】対照の人 (CTRL) および原発性開放隅角緑内障 (POAG) 患者の血清 (A) および眼房水 (B) とともにインキュベートされた 20 の抗原についての平均化された抗原強度のプロファイルの図である。

【図 5】健康な対照の人 (CTRL) および緑内障患者 (POAG) についての抗ヒト IgG / A / M に関する箱ひげ図である。

【図 6】図 6 A および図 6 B は血清および眼房水の抗体反応性の散布図である。図 6 C は見込みのある血清サンプルについての受信者動作特性を示す。

【図 7】対照群および POAG サンプルについての血清および眼房水の免疫反応性値の個人間の比較の図である。

【図 8】GO アノテーションによる生物学的機能分析により、血清サンプルにおける研究対象群同士の間の有意差を示す、眼の抗原についての超幾何学的モデルによる計算によっていくつかの大きな比率を占める項目が明らかになった図である。

【図 9】緑内障患者の典型的な抗体パターンの図である。

【図 10】マイクロアレイデータの週ごとの再現性の図である。

【図 11】緑内障の第 2 の診断方法の好ましい実施形態のためのセットアップの、実施例 1 ~ 3 のために用いられた簡易な概略図を与える図である。神経網膜の神経節細胞が実験

プレートに配置された。健康な人または P O A G（原発性開放隅角緑内障）、N T G（正常眼圧緑内障）、もしくは O H T（高眼圧症）を患う患者からの 10% の血清を含む培地に加えられ、細胞は標準圧力または 15000 パスカルの上昇された圧力のいずれかで 48 時間 37℃ にてインキュベートされた。細胞は溶解され、タンパク質はアセトン沈殿により分離された。タンパク質プロファイルは S E L D I - T O F 質量分析を用いて測定され、次いで統計的に分析された。

【図 1 2 a】測定されたタンパク質プロファイルの分画を示す図である。合計タンパク質プロファイルは約 400 の異なるタンパク質クラスタを数えた。示された分画では、x 軸はダルトンで分子量を示し、y 軸は細胞におけるタンパク質の発現レベルの強度を示した。S E L D I - T O F 質量分析によって測定された、タンパク質クラスタの非常に複雑な合計タンパク質プロファイルは、3078 ダルトン (Da) ~ 183222 Da の範囲にあった。ここで示される分画は、4943 Da ~ 21934 Da の範囲にあり、細胞におけるタンパク質の複雑性の概略を与える。

【図 1 2 b】プロファイルの単なる視覚分析によって差を識別する困難さを明らかにするいくつかの単一測定を示す図である。サンプルプロファイルは、上昇された圧力が存在する状態または存在しない状態で健康な血清または P O A G 血清で処理された細胞に由来する。X 軸はタンパク質の分子量をダルトンで示し、Y 軸は細胞における測定されたタンパク質の強度を示す。プロファイルは数百のタンパク質を示すので視覚的にそれらを検査することによってだけでは実験群同士の間の差を分析することはできなかった。

【図 1 3】分子量が 9192 ダルトン、12390 ダルトン、および 12314 ダルトンである計算されたバイオマーカのいくつかの変動性プロットを示す図である。x 軸は細胞の異なる処理群を示す。y 軸は S E L D I - T O F 質量分析によって測定されるタンパク質の強度を示す。プロットにおける各三角形は特定の群の 1 つのサンプルを示す。変動性プロットは、これらの 3 つのバイオマーカのタンパク質発現が、P O A G 血清とともにインキュベートされた細胞において、健康な血清とともにインキュベートされた細胞と比較して変化（増加または減少）されることを示す。

【図 1 4】分散分析を示すグラフの図である。図 1 4 a は、健康な人または P O A G 患者の血清および環境の圧力または上昇された圧力を用いた場合の、細胞のタンパク質プロファイルに対する細胞のさまざまな処理の影響を示す。明らかに血清タイプは、タンパク質プロファイルに対して 59.1% の非常に大きな影響を有し、上昇された圧力が組み合わされた場合にはそこにはさらに 14% が加えられ得る（組合せ 1 + 2）。圧力自体は、細胞のタンパク質プロファイルに対して 11.6% の影響を有する。図 1 4 b は、1 つの選択された特定のバイオマーカ、すなわち 9192 のバイオマーカに対して異なる処理の変動の影響を示すグラフの図である。この影響は非常に類似している。

【図 1 5 a】50.5% を有するタンパク質プロファイルに対する P O A G 血清における抗体の存在の影響を計算する分散分析 (ANOVA) を示す図である。P O A G 血清または健康な対照からの血清を意味する血清タイプが 13.4% の付加的な影響を有した。

【図 1 5 b】対照血清とともにインキュベートされた細胞に対する、抗体が存在するまたは存在しない状態での P O A G 血清とともにインキュベートされた細胞の全体のタンパク質プロファイルの比較をマハラノビス距離が示す図である。ポイントゼロからの増加する距離が、健康な血清とともにインキュベートされた細胞のタンパク質プロファイルと比較して P O A G 患者の血清とともにインキュベートされた細胞のタンパク質プロファイルにおいて増加する差を示す。P O A G 血清とともにインキュベートされた細胞のタンパク質プロファイルは、約 55 のマハラノビス距離に示されるように、約 20 のマハラノビス距離によって示される抗体が取り除かれた (P O A G - 抗体) P O A G 血清とともにインキュベートされた細胞のタンパク質プロファイルよりも、対照血清とともにインキュベートされたタンパク質プロファイルと有意により大きく異なる。

【図 1 6 a】圧力が存在するまたは存在しない状態で健康な血清、P O A G 血清、または N T G 血清とともにインキュベートされた細胞からの測定されたタンパク質プロファイルの分画を示す図である。X 軸はタンパク質の分子量をダルトンで示し、Y 軸は細胞におけ

るタンパク質の測定された強度を示す。P O A G 血清と比較して、細胞はN T G 血清に対して異なって反応することは明らかである。

【図 1 6 b】9 2 0 7 ダルトンのバイオマーカを示す図である。x 軸は実験群を示し、y 軸はサンプルにおけるタンパク質の測定された強度を示す。緑内障群は、緑内障血清、したがって P O A G 血清または N T G 血清とともにインキュベートされたすべての細胞を含む。緑内障血清とともにインキュベートされた細胞において 9 2 0 7 ダルトンのバイオマーカがアップレギュレートされることは明らかである。

【図 1 7】緑内障血清、すなわち P O A G 血清または N T G 血清とともにインキュベートされた細胞の測定されたタンパク質プロファイルに基づき計算された受信者動作特性 ( R O C ) 曲線を示す図である。感度が 8 8 % であり特異度が 9 0 % にて、非緑内障血清からの緑内障血清の区別を示す。当該テストの正確さについてのパラメータである曲線下面積は  $r : 0.92$  である。

【図 1 8】異なる濃度の 1 4 - 3 - 3 抗体と 1 . 5  $\mu$  M のスタウロスポリン ( s t a ) のストレスとを用いるインキュベーションの後の R G C 5 細胞の生存度を示す図である。X 軸は実験群を示し、Y 軸はパーセントで細胞の生存度を示す。対照細胞 ( ダークグレーのバー ) は、細胞ストレスも抗体もなしでインキュベートされる。スタウロスポリンとともにインキュベートされた細胞は、1 6 . 1 % の生存度の損失を示す。スタウロスポリンとともにインキュベートされ、1 4 - 3 - 3 抗体とともにプレインキュベートされた細胞は、スタウロスポリンとともにインキュベートした細胞と比較して、1 1 . 6 % までの生存度の有意 (  $p < 0.05$  ) から非常に有意 (  $p < 0.01$  ) な増加を示す ( 抗体濃度 0 . 5  $\mu$  g / m l ) 。

【図 1 9】異なる濃度の - シヌクレイン抗体と 5 0  $\mu$  M の  $H_2O_2$  であるストレスとを用いたインキュベーション ( 1 h ) の後の R G C 5 細胞の生存度を示す図である。X 軸は実験群を示し、Y 軸はパーセントで細胞の生存度を示す。対照細胞は、細胞ストレスも抗体もなしでインキュベートされた。  $H_2O_2$  とともにインキュベートされた細胞は、1 7 . 9 % の生存度の損失を示す。  $H_2O_2$  とともにインキュベートされ、 - シヌクレイン抗体とともにプレインキュベートされた細胞は、  $H_2O_2$  とともにインキュベートした細胞と比較して、1 5 . 3 % までの生存度の有意 (  $p < 0.05$  ) から非常に有意 (  $p < 0.01$  ) な増加を示す ( 抗体濃度 0 . 0 5  $\mu$  g / m l ) 。

【図 2 0】異なる濃度の G F A P 抗体と 5 0  $\mu$  M  $H_2O_2$  であるストレスとを用いたインキュベーション ( 1 h ) の後の R G C 5 細胞の生存度を示す図である。X 軸は、実験群を示し、Y 軸はパーセントで細胞の生存度を示す。対照細胞は、細胞ストレスも抗体もなしでインキュベートされた。  $H_2O_2$  とともにインキュベートされた細胞は 7 . 4 % の生存度の損失を示し、  $H_2O_2$  とともにインキュベートされ、G F A P 抗体とともにプレインキュベートされた細胞は、  $H_2O_2$  とともにインキュベートされた細胞と比較して、9 . 8 % までの生存度の有意 (  $p < 0.05$  ) な増加を示す ( 抗体濃度 0 . 5  $\mu$  g / m l ) 。

#### 【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 1 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 1 4】

図 3 : 4 つの異なる抗原について異なるデータ処理から得られたデータの比較。生データ ( A ) 、A U C データ ( B ) 、および Z スコアデータ ( C ) がリスト化されている。

#### 【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 2 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 2 2】

図 7：血清および眼房水免疫反応性の個人間の比較。X 軸に抗原がリスト化される。Y 軸は、測定された Z スコア値を示す。ゼロ線の上のバーは、眼房水におけるより高い免疫反応性を示し、ゼロ線の下は、血清におけるより高い強度を示す。対照群および P O A G サンプルについての結果が示される。全体として、ほんのわずかな抗原が 100% (= 2 倍の増加) より大きな免疫反応性の差異を示すことが観察され得る。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0123

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0123】

血清サンプルからの免疫反応性と、対応する眼房水サンプルからの免疫反応性との個人間の比較により、ほんのいくつかの有意差が明らかになった。CTRL 被験者に関して、対応する眼房水サンプルと比較して、有意なより高いレベルの血清抗体反応性（たとえば MBP、HSP60、GFAP）が観察でき、また有意により高い眼房水の免疫反応性（たとえば - 1 - アンチトリプシン）も観察できた。しかしながら全体では、テストされた抗原の 80% より多くが、対照被験者の血清および眼房水においてほとんど同様の免疫反応性を示した。さらに、POAG 患者は、血清と眼房水との間にいくつかの有意差を示した。たとえば、アルブミンおよび - 1 - アンチトリプシンは、血清サンプルにおいてより高い免疫反応性を示した。後者の場合、これは、眼房水において - 1 - アンチトリプシンについてより高い免疫反応性を示した対照サンプルと対照的である。緑内障群からの眼房水サンプルも、対応する血清サンプルと比較すると、いくつかのより高い抗体反応性を示した（たとえばフィブロネクチン、トランスチレチン）。しかしながら対照群と同様に、緑内障群においては、血清免疫反応性と眼房水免疫反応性との間にはいくつかの有意差が現れただけであり、テストされた抗原の 80% より多くがほとんど一致する抗体パターンを示した。