

【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、 D N A トポイソメラーゼ 1 、フィプロネクチン、 - 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(B D N F)、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、D N A 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H S P 1 0 (= 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(M O G) 、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(V E G F) 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 - I V 、アネキシン V 、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、- L - クリスタリン、- S - クリスタリン、- クリスタリン、D N A 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H S P 1 0 (= 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(M O G) 、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 - I V 、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H S P 1 0 (= 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(M O G) 、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、1 0 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2A】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2B】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6Aおよび図6Bは血清および眼房水の抗体反応性の散布図である。図6C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つい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POAG（原発性開放隅角緑内障）、NTG（正常眼圧緑内障）、もしくはOHT（高眼圧症）を患う患者からの10%の血清を含む培地が加えられ、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SELDI-TOF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12a】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。SELDI-TOF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)～183222Daの範囲にあった。ここで示される分画は、4943Da～21934Da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12b】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POAG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13】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SELDI-TOF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、POAG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14】分散分析を示すグラフの図である。図14aは、健康な人またはPOAG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14b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15a】50.5%を有するタンパク質プロファイルに対するPOAG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。POAG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15b】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POAG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POAG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。POAG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(POAG-抗体)POAG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16a】圧力が存在するまたは存在しない状態で健康な血清、POAG血清、またはNTG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

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

【図16b】9207ダルトンのバイオマーカーを示す図である。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POAG血清またはNTG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9207ダルトンのバイオマーカーがアップレギュレートされることは明らかである。

【図17】緑内障血清、すなわちPOAG血清またはNTG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(ROC)曲線を示す図である。感度が88%であり特異度が90%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18】異なる濃度の14-3-3抗体と1.5μMのスタウロスボリン(sta)のストレスとを用いるインキュベーションの後のRGC5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。スタウロスボリンとともにインキュベートされた細胞は、16.1%の生存度の損失を示す。スタウロスボリンとともにインキュベートされ、14-3-3抗体とともにプレインキュベートされた細胞は、スタウロスボリンとともにインキュベートした細胞と比較して、11.6%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0.5μg/ml)。

【図19】異なる濃度の-シヌクレイン抗体と50μMのH₂O₂であるストレスとを用いたインキュベーション(1h)の後のRGC5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。H₂O₂とともにインキュベートされた細胞は、17.9%の生存度の損失を示す。H₂O₂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、H₂O₂とともにインキュベートした細胞と比較して、15.3%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0.05μg/ml)。

【図20】異なる濃度のGFP抗体と50μMH₂O₂であるストレスとを用いたインキュベーション(1h)の後のRGC5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。H₂O₂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、H₂O₂とともにインキュベートされ、GFP抗体とともにプレインキュベートされた細胞は、H₂O₂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0.5μg/ml)。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0114

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0114】

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)、AUC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】0122

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0122】

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、ゼロ線の下のバーは、血清におけるより高い強度を示す。対照群およびPOAG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。CTR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、GFP)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。