

(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2012-502279

(P2012-502279A)

(43) 公表日 平成24年1月26日(2012.1.26)

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

F1

G01N 33/53

N

テーマコード(参考)

審査請求有 予備審査請求有 (全20頁)

(21) 出願番号 特願2011-526230 (P2011-526230)
 (86) (22) 出願日 平成21年9月4日(2009.9.4)
 (85) 翻訳文提出日 平成23年3月3日(2011.3.3)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2009/056044
 (87) 国際公開番号 W02010/028248
 (87) 国際公開日 平成22年3月11日(2010.3.11)
 (31) 優先権主張番号 61/094,167
 (32) 優先日 平成20年9月4日(2008.9.4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507149383
 レドックスーリアクティブ リエイジェン
 ツ リミテッド ライアビリティー カン
 パニー
 アメリカ合衆国、46107 インディア
 ナ州、ビーチ グローブ、アルバニー ス
 トリート 1600、セント フランシス
 ホスピタル センター (番地なし)
 (74) 代理人 100098464
 弁理士 河村 洵
 (74) 代理人 100149630
 弁理士 藤森 洋介
 (74) 代理人 100154449
 弁理士 谷 征史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルツハイマー病の診断、モニタリングおよび/または病期診断のための、バイオマーカー、キットおよび方法

(57) 【要約】

本発明は、酸化還元 - 反応性自己抗体を含む、アルツハイマー病の診断、モニタリングおよび/または病期診断のためのバイオマーカーおよびキットを対象とする。本発明はまた、それを用いて血液検査を実施することを含むアルツハイマー病の診断、モニタリングおよび/または病期診断のための方法を対象とする。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アルツハイマー病の診断、モニタリングおよび/または病期診断のための方法であって、酸化還元 - 反応性自己抗体に関する血液検査を実施することを含む方法。

【請求項 2】

前記自己抗体が、I g G、I g M、I g A、I g E および I g D の少なくとも 1 つである請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記自己抗体がリン脂質に結合する自己抗体である請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

前記リン脂質が、ホスファチジルセリン、カルジオリピン、ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルコリンの少なくとも 1 つである請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

前記血液検査が抗リン脂質自己抗体を検出することができるアッセイを含む請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

前記自己抗体が、I g G、I g M、I g A、I g E および I g D の少なくとも 1 つである請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

前記自己抗体が、ホスファチジルセリン、カルジオリピン、ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルコリンの少なくとも 1 つに結合する請求項 5 記載の方法。

【請求項 8】

アルツハイマー病の診断、モニタリングおよび/または病期診断のためのバイオマーカーであって、酸化還元 - 反応性自己抗体を含むバイオマーカー。

【請求項 9】

前記自己抗体が、I g G、I g M、I g A、I g E および I g D の少なくとも 1 つである請求項 8 記載のバイオマーカー。

【請求項 10】

前記自己抗体がリン脂質に結合する自己抗体である請求項 8 記載のバイオマーカー。

【請求項 11】

前記リン脂質が、ホスファチジルセリン、カルジオリピン、ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルコリンの少なくとも 1 つである請求項 8 記載のバイオマーカー。

【請求項 12】

アルツハイマー病の診断、モニタリングおよび/または病期診断のためのキットであって、抗リン脂質自己抗体を検出することができるアッセイを含むキット。

【請求項 13】

前記自己抗体が、I g G、I g M、I g A、I g E および I g D の少なくとも 1 つである請求項 12 記載のキット。

【請求項 14】

前記自己抗体が、ホスファチジルセリン、カルジオリピン、ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルコリンの少なくとも 1 つに結合する請求項 12 記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アルツハイマー病の診断、モニタリングおよび/または病期診断のための方法であって、酸化還元 - 反応性自己抗体に関する血液検査を含む方法に関する。さらに、本発明は、アルツハイマー病の診断、モニタリングおよび/または病期診断のためのバイオマーカーおよびキットにも関する。

【背景技術】

10

20

30

40

50

【 0 0 0 2 】

アルツハイマー専門の研究センターのほかでは、アルツハイマー病（A D）の診断は、ほとんどが二次的原因（secondary causes）および他の型の認知症の排除アプローチを伴うものである。患者の認知／記憶能力の口頭検査は、アルツハイマー病評価スケール - 認知（A D A S - cog）評価基準（Pena-Casanova. 臨床診療におけるアルツハイマー病評価スケール - 認知（Alzheimer's disease assessment scale-cognitive in clinical practice.）、Int Psychogeriatr 1997; 9:105-114）およびミニメンタルステート試験（M M S E）（Tombaugh TN, McIntyre NJ. ミニメンタルステート試験：包括的レビュー（The mini-mental state examination: A comprehensive review.）、J Am Geriatr Soc 1992; 40:922-935）を用いて一般に使用されている。しかしながら、これらの検査は主観が避けられない部分を含み、使用の際、施行および記録できるのは、たとえば、精神分析医、10
 医者、および看護師などの資格のある医療専門家のみである。残念なことに、最も前線のかかりつけ医はこれらの検査を行う時間がない。あるいは、他の型の認知症からアルツハイマー病（A D）を判別するために血液検査も使用することができる。

【 0 0 0 3 】

アルツハイマー専門の研究センターでさえ、高性能で時間のかかる検査や、病歴、認知欠陥パターン（たとえば、いかにして進行したかの過程）、短期記憶問題、単語の発見と判断にもとづきアルツハイマー病（A D）を正確に診断できる特別に訓練を受けた専門家を利用することができるのは、ほんの数センターのみである。これらのパラメータを用いるA Dの診断は、98%感度および88%特異度を満足するかおよび／またはそれを上回る（Lopez OL, Becker JT, Klunk W, Saxton, Hamilton RL, Kaufer DI, Sweet RA, Meltzer CC, Wisniewski S, Kamboh MI, DeKosky ST. 過去20年にわたる推定アルツハイマー病の評価および診断研究（Research evaluation and diagnosis of probable Alzheimer's disease over the last two decades）: I. 2000; 55: 1854-1862）。これらの評価はさらに拡大され、認知に影響する併発状態を考慮することにより明確化されている（Lopez OL, Becker JT, Klunk W, Saxton, Hamilton RL, Kaufer DI, Sweet RA, Meltzer CC, Wisniewski S, Kamboh MI, DeKosky ST. 過去20年にわたる推定アルツハイマー病の評価および診断研究（Research evaluation and diagnosis of probable Alzheimer's disease over the last two decades）: II. 2000; 55: 1863-1869）。20

【 0 0 0 4 】

したがって、より良いバイオマーカーの必要性は重要である。1998年のアルツハイマー病の分子および生化学マーカーに関するワーキンググループのコンセンサスレポートによれば、理想的なバイオマーカーは、他の型の認知症や神経変性プロセスを除外するため、80%より高い感度および特異度を有するべきであるとされる。さらに、理想的なバイオマーカーは、確実で、再現性があり、非侵襲的で、実施が容易でかつ安価であるべきである（アルツハイマー病の分子および生化学マーカーに関するワーキンググループのコンセンサスレポート、アルツハイマー協会ロナルドおよびナンシー・レーガン研究所および国立老化研究所ワーキンググループ、Neurobiol Aging 1998; 19:109-116）。30

【 0 0 0 5 】

これまでに、3つのバイオマーカーの候補が、非侵襲要件は無視しているが、これらの要件にほぼ近いとして提案されている。これらのバイオマーカーは、脳脊髄液（C S F）に見られるもので、総タウタンパク質、アミロイド - タンパク質（A₄₂）およびリン酸化タウタンパク質である（Formichi P, Bartisti C, Radi E, Federico A、アルツハイマー病の診断のための脳脊髄液タウ、A₄₂、およびリン酸化タウタンパク質（Cerebrospinal fluid tau A₄₂, and phosphorylated tau protein for the diagnosis of Alzheimer's disease.）、J Cell Physiol 2006; 208:39-46）。40

【 0 0 0 6 】

アルツハイマー病の早期発見における使用の可能性に関する、血液中の種々の型のA₄₂タンパク質のレベルを測定するために設計された新しいキットアッセイの最近の評価により、2007年の夏以来研究に使用可能となった（INNO-BIA 血漿A₄₂型（INNO-BIA plas 50

ma A forms)、イノジェネティクス (Innogenetics)、ヘント (ベルギー)。この検査は、通常アルツハイマー病に先立つ軽度認知障害 (MCI) の発症の素因を有する患者において A_{42} / A_{40} 比が低いことを定めている。この観察結果は、ヒトおよびマウスモデルの両方において、 A_{42} が脳内で凝集し沈着するので CSF および血漿 A_{42} レベルの減少が見られるという知見に係る (Graff-Radford NR, Crook JE, Lucas J, Boeve BF, Knopman DS, Lvnik RJ, Smith GE, Younkin LH, Petersen RC, Younkin SG、軽度認知障害およびアルツハイマー病の差し迫った危険の増加と低血漿 A_{42} / A_{40} 比との関係 (Association of low plasma Abeta42/Abeta40 ratios with increase imminent risk for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease.)、Arch Neurol 2007; 64: 3543-362)。残念ながら、末梢 A_{42} 測定は、血清リポタンパク質や Fc-結合タンパク質などの交絡的存在や、血清中の A_{42} の低濃度といったことにより矛盾した報告を受けている (Kawarabayashi T, Shoji M、アルツハイマー病の血漿バイオマーカー (Plasma biomarkers of Alzheimer's disease.)、Curr Opin Psych 2008; 21:260-267)。さらに、 A_{42} 血清レベルは、腎機能 (Bailey P、アルツハイマー病の生物学的マーカー (Biological markers in Alzheimer's disease.)、Can J Neurol Sci 2007; 34:S72-S76; および Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Dekosky ST, BarbergerGateau P, Cummings J, Delacourte A, Galasko D, Gauthier S, Jicha G, Meguro K, O'Brien J, Pasquier F, Robert P, Rossor M, Saloway S, Stern Y, Visser PJ, Scheltens P、アルツハイマー病の診断のための調査基準: 改定 NINCDS-ADRDA 基準 (Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: Revising the NINCDS-ADRDA criteria.)、Lancet Neurol 2007; 6:734-746) および医薬 (Jellinger KA, Janetzky B, Attems J, Kienzl E. アルツハイマー病の早期診断用バイオマーカー: 「アルツハイマー関連遺伝子」 - 新規な血液バイオマーカー (Biomarkers for early diagnosis of Alzheimer's disease: 'Alzheimer's ASSociated gene' - a new blood biomarker.)、J Cell Mol Med 2008; 12:1094-1117) により影響を受ける。要するに、主要なバイオマーカーとしての血漿 A_{42} 検査の未来には疑問が残る。

10

20

30

40

50

【0007】

アルツハイマー病の診断のための複合血漿分子検査が、Rayらにより説明されている (Rayら、血漿シグナル伝達タンパク質に基づく臨床アルツハイマー診断の分類と予測 (Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins.)、Nature Med 2007; 11:1359-1362)、この方法では、120個のシグナル伝達タンパク質のうち18個が、90%の正確度でアルツハイマー病の予測「マーカー」であることが分かった。しかしながら、これら18個のシグナル伝達タンパク質マイクロアレイタンパク質の統計学的解釈は煩雑であり、簡単で安価な検査に容易には変換できない。これら18個の同定されたマーカーも、免疫応答の関与を巻き込む。

【0008】

したがって、アルツハイマー病などの神経変性疾患を診断、モニタリングおよび/または病期診断するための、迅速で、より正確で、より安価な普遍的に受け入れられるバイオマーカーが必要である。

【0009】

本発明者は、この分野のサービスや治療にかなり大きなプラスの影響を及ぼすアルツハイマー病のバイオマーカー検査を見出した。アルツハイマー病 (AD) は、進行性脳障害の1つであり、人物記憶や学習能力、推論能力、判断能力、意思疎通能力および日常生活活動能力が徐々に損なわれる。ADが進行すると、個人は、不安、不信感または興奮などの人格や態度の変化や、妄想または幻覚なども経験し得る。ADは、非常に異なる速度で進行する。ADに罹ったヒトは、診断から平均4~6年で亡くなるが、疾患の持続期間は、3~20年まで多様である。さらに、ADは、この国においてより多くの人々を急速に襲っている疾患である。現在、500万人より多くのアルツハイマー病患者が合衆国に暮らしている。この数の内訳は、65歳超が490万人、早期発症型ADである65歳以下が20万~50万人の間、および他の認知症である。ADの人の20~40%の人々のみ

が診断されており、12.50万(12.5MM)から2500万(25MM)人の未診断人口が放置されていると見積もられている。加えて、年に約50万人のアメリカ人がADを発症すると予測され、2050年までに1年に100万アメリカ人以上にも増加する。

【0010】

ADに侵された人々の数の増加を考えると、この疾患のための診断用バイオマーカの必要性は、特に、本発明以前にヒトがアルツハイマー病であるということを実証する単一の検査はなかったという事実により大きなものである。専門家は、熟練した医者が現在ADを90%より高い正確度で診断できると見積もるが、死後解剖が実施されるまで確実ではない。疾患の進行のモニタリングは、主に認知低下を測定することに焦点が当てられている。疾患の基礎的状态は、本発明以前にそれをなすために実行可能な方法は現在ないのでモニターされていないままである。

10

【0011】

アルツハイマー病は治療できないため、安価で迅速、そして正確な診断が非常に必要とされている。

【発明の概要】

【0012】

本発明の様々な側面および実施態様は、アルツハイマー病などの神経変性疾患または神経学的障害を診断、モニタリングおよび/または病期診断するためのバイオマーカとして使用される酸化還元-反応性抗リン脂質抗体に関する。アルツハイマー病などの神経変性疾患または神経学的障害は、酸化還元-反応性自己抗体(R-RAA)に関する血液検査を行うことにより診断することができ、該検査は、入手可能な診断ツールよりも迅速でより安価でより正確である。

20

【0013】

本発明は、アルツハイマー病の診断、モニタリングおよび/または病期診断のための方法であって、酸化還元-反応性自己抗体に関する血液検査を実施することを含む方法に関する。自己抗体はIgG、IgM、IgA、IgEおよびIgDの少なくとも1つである。自己抗体はまた、リン脂質に結合する自己抗体であってよく、リン脂質はホスファチジルセリン、カルジオリピン、ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルコリンの少なくとも1つである。

【0014】

本発明の方法はまた、抗リン脂質自己抗体を検出することができるアッセイを含む。アッセイは、イムノアッセイなどの抗リン脂質自己抗体を検出できる本技術分野において公知の任意のアッセイであり得るが、イムノアッセイに限定されるものではない。イムノアッセイのいくつかの例としては、ラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素イムノアッセイ(EIA)、フローサイトメトリー、およびウェスタンブロットなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明のアッセイが検出できる自己抗体には、IgG、IgM、IgA、IgEおよびIgDの少なくとも1つが含まれる。本発明のアッセイが検出できる自己抗体は、少なくとも1つのリン脂質に結合することができる。リン脂質は、ホスファチジルセリン、カルジオリピン、ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルコリンであり得るが、これらに限定されるものではない。

30

40

【0015】

本発明はまた、アルツハイマー病の診断、モニタリングおよび/または病期診断のためのバイオマーカであって、酸化還元-反応性自己抗体を含むバイオマーカに関する。自己抗体は、IgG、IgM、IgA、IgEおよびIgDの少なくとも1つである。自己抗体はリン脂質に結合する自己抗体である。リン脂質は、ホスファチジルセリン、カルジオリピン、ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルコリンの少なくとも1つであり得るが、これらに限定されるものではない。

【0016】

加えて、本発明は、アルツハイマー病の診断、モニタリングおよび/または病期診断のためのキットであって、抗リン脂質自己抗体を検出することができるアッセイを含むキッ

50

トに関する。自己抗体は I g G、I g M、I g A、I g E および I g D の少なくとも 1 つである。自己抗体はリン脂質に結合する自己抗体である。リン脂質は、ホスファチジルセリン、カルジオリピン、ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルコリンの少なくとも 1 つであり得るが、これらに限定されるものではない。アッセイは、イムノアッセイなどの抗リン脂質自己抗体を検出できる本技術分野において公知の任意のアッセイであり得るが、イムノアッセイに限定されるものではない。イムノアッセイのいくつかの例としては、ラジオイムノアッセイ (R I A)、酵素イムノアッセイ (E I A)、フローサイトメトリー、およびウェスタンブロットなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明のアッセイが検出できる自己抗体には、I g G、I g M、I g A、I g E および I g D の少なくとも 1 つが含まれる。本発明のアッセイが検出できる自己抗体は、少なくとも 1 つのリン脂質に結合することができる。リン脂質は、ホスファチジルセリン、カルジオリピン、ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルコリンであり得るが、これらに限定されるものではない。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0017】

本発明のより良い理解は、添付の図面に関連して読む場合、以下の実施態様の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかとなり、すべては本発明の開示の一部を形成する。以下に記載および説明された開示は、本発明の実施態様を開示することに焦点をおいているが、同時にそれらが説明および例示のみの目的であり、本発明がそれらに限定されないことは明確に理解されるべきである。本発明の精神および範囲は、添付の特許請求の範囲の用語によってのみ制限される。次に図面の簡単な説明を示す。

【0018】

【図1】感度 94% および特異度 100% を有するアルツハイマー病血清試料対正常血清試料の間の区分を説明する分類および回帰ツリー (C A R T) 分析を示す。

【図2】表1の分析による有意データの別の統計学的表現 (alternative statistical expression of the significant data) を説明する垂直散布箱ヒゲ図 (Vertical Scatter Box Plots) を示す。中央値は、箱の内部の線により特定される。箱の長さは、チューキーのヒンジから計算される四分位数範囲 (I Q R) を表す。箱の端は、第1四分位および第3四分位値である。箱の端から 3 I Q R ' s よりも大きい値がアスタリスク (*) で表示される。1.5 I Q R ' s よりも大きい値が異常値 (o) として標識される。

【発明を実施するための形態】

【0019】

本発明より前には、アルツハイマー病などの神経変性疾患を診断、モニタリングおよび/または病期診断するための万人に受け入れられる包括的なバイオマーカーは存在しない。神経変性疾患、たとえばアルツハイマー病、パーキンソン病、A L S および多発性硬化症は、中枢神経系 (C N S) における酸化ストレスの増加と関連付けられ、結果としてタンパク質、脂質および D N A の酸化をもたらす。脳血管疾患の患者における神経学的障害などの他の神経学的障害もまた、中枢神経系 (C N S) における酸化ストレスの増加と関連付けられ、結果としてタンパク質、脂質および D N A の酸化をもたらす。

【0020】

本発明より前には、アルツハイマー病患者の血液中に抗カルジオリピン (a C L) 以外の抗リン脂質 (a P L) 自己抗体の存在に基づく報告を公表している研究はほとんどない。また、本発明より前には、年齢を適合させた正常個体と比較した神経変性疾患の患者における酸化還元 - 反応性自己抗体 (R - R A A) の血清における存在を記載した入手可能な報告はない。

【0021】

血液中に存在する自己抗体の新しいファミリーは、酸化 - 還元 (レドックス) 反応の後、自己抗原を認識することができる (McIntyre JA, Wagenknecht DR, Faulk WP. 酸化還元反応により脱マスクされる自己抗体 (Autoantibodies unmasked by redox reactions.), J Autoimmun 2005; 24:311-317、その全体が参考資料として本明細書に組み込まれる

。)。酸化環境なしでこれらの「マスクされた」R - R A Aは従来のアッセイにおいて検出することはできず、その結果本技術分野において既知である自然のおよび隠された自己抗体からそれらを区別することができる (Cabiedesら、正常ヒト血清中の隠れた抗リン脂質抗体は免疫複合体として循環し、その抗原は熱、酸、過剰モルブファ-またはホスホリパーゼ処理により除去することができる (Hidden antiphospholipid antibodies in normal human sera circulate as immune complexes whose antigen can be removed by heat, acid, hypermolar buffers or phospholipase treatments.)、Eur J Immunol 1998; 7:2108-2114; Lorberら、隠された自己抗体 (Hidden autoantibodies.)、Clin Rev Allergy Immunol 2000; 1:51-58; およびTomerら、自然自己抗体の意義 (The significance of natural autoantibodies.)、Immunol Invest 1988; 5:389-424.)。 10

【 0 0 2 2 】

本発明者は、アルツハイマー病患者の中樞神経系 (C N S) において、タンパク質、脂質およびD N Aの酸化を引き起こす酸化ストレスの異常な増加があることに気付いた。本発明者は、酸化還元 - 反応性自己抗体 (R - R A A) ファミリーのメンバーである抗リン脂質 (a P L) 自己抗体が、剖検により確認されたアルツハイマー病の患者の脳脊髄液において有意に減少しているかまたは存在しないことを発見した (McIntyre JA, Chapman J, Shavit E, Hamilton RL, Dekosky ST. アルツハイマー病患者の脳脊髄液における酸化還元 - 反応性自己抗体 : 予備的研究 (Redox-reactive autoantibodies in Alzheimer's patient's cerebrospinal fluids: Preliminary studies.)、Autoimmunity 2007; 40:390-396)。死後のA D脳における、C N Sでの酸化誘導性損傷の周知の上昇および酸化還元反応性金属の異常な富化により、本発明者はA D患者の血液中のR - R A Aが、正常なa P Lレベルからの逸脱を示すことを発見した。 20

【 0 0 2 3 】

本発明より前には、アルツハイマー病患者の血液中にa C L以外のa P Lの存在に基づく報告を発表している研究はない。また、本発明より前には、アルツハイマー病の患者由来の血液中のR - R A Aの存在および/またはレベルを記載した報告は存在しない。

【 0 0 2 4 】

本発明者は、酸化が、正常すなわち健全な個体由来の血液および他の体液中の抗体を「脱マスクし」、自己免疫疾患に関連する自己抗体を露出させるということを見出した。反対に、自己免疫疾患の個体由来の自己抗体の酸化も自己抗体の再マスク化を引き起こし、ひいては検出できなくなる。これらの変換は酸化 - 還元反応に依存し、酸化還元 - 反応性自己抗体 (R - R A A) と指定される自己抗体の新しいファミリーを定義する。 30

【 0 0 2 5 】

R - R A Aは、試験された健全な個体の血中、脳脊髄液 (C S F) および母乳において初めて同定されたことが指摘される。G、MおよびAアイソタイプのR - R A Aがこれまで試験したすべての動物 (ウマ、イヌ、ラット、マウスそしてニワトリについてはI g Y) に存在し、全ての脊椎動物においても同様に見出される。研究は、正常個体由来のC S Fは、I g Gに限定されており、一方母乳は主にI g Aであるということを示している。血液は、3つのアイソタイプG、MおよびAの全てを含む。(McIntyre JA, Faulk WP、酸化還元 - 反応性自己抗体 : 生化学、特徴付け、および特異性 (Redox-reactive autoantibodies: Biochemistry, characterization, and specificities.)、Clin Rev Allergy Immunol 2009; 37:49-54、その全体が参考資料として本明細書に組み込まれる。) 40

【 0 0 2 6 】

本発明者は、16人のA D患者由来の血清試料を、年齢を適合させたボランティア血液バンクドナー由来の17の血清試料と比較した。各血清をヘミン酸化前後に4つの抗リン脂質自己抗体 (a P L) 特異性についてイン - ハウス (in-house) 酵素免疫測定法 (E L I S A) を用いて検査した。A D集団と正常集団との抗ホスファチジルエタノールアミン (a P E) 活性の比較は、高い有意差を明らかにした。A D血清試料と正常血清試料との判別解析 (discriminate analysis) は、88%の感度と94%の特異度を示した。分類および回帰ツリー (C A R T) 分析では、A D血清試料対正常血清試料の感度94%およ 50

び特異度 100% の差別化を明らかにした。

【0027】

本発明者によるこの研究は、R - R A A に関する血液検査がアルツハイマー病などの神経学的障害診断のための包括的検査基準 (inclusive laboratory criterion) として使用できるということを示した初めてのものである。本発明者は、R - R A A に関する血液検査が、神経変性疾患の診断、モニタリングおよび / または病期診断に有用であるということを見出した。

【0028】

本発明は、神経変性疾患または神経学的障害の診断、モニタリングおよび / または病期診断のためのバイオマーカーとして使用される酸化還元 - 反応性抗リン脂質抗体に関する。本発明はまた、神経変性疾患または神経学的障害の診断、モニタリングおよび / または病期診断のためのキットであって、抗リン脂質自己抗体を検出することができるアッセイを含むキットに関する。

【0029】

本発明は、酸化還元 - 反応性自己抗体に関する血液検査を実施する工程を含む神経学的障害の診断、モニタリングおよび / または病期診断のための方法を対象とする。自己抗体は、リン脂質に結合する自己抗体であり得る。リン脂質は、ホスファチジルセリン、カルジオリピン、ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルコリンであり得るが、これらに限定されるものではない。神経学的障害には、この技術分野において既知の全ての神経学的障害が含まれ、たとえば、C N S における酸化ストレスのレベルの増大に関連する、パーキンソン病、アルツハイマー病、多発性硬化症 (M S) などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。神経学的疾患には、脳血管疾患の患者における神経学的障害が含まれるが、それらに限定されるものではない。神経学的障害、たとえばアルツハイマー病の様々な病期は、同定された酸化還元 - 反応性自己抗体の量により本発明の方法を用いて決定することができる。後期においては、酸化還元 - 反応性自己抗体はほとんど存在しない。終期近くでは、酸化還元 - 反応性自己抗体が検出されないこともある。本発明はまた、神経学的障害を有する患者をモニタリングすることもできる。

【0030】

本発明の方法はまた、抗リン脂質自己抗体を検出することができるアッセイを含む。そのアッセイは、イムノアッセイなどの抗リン脂質自己抗体を検出できる本技術分野において公知の任意のアッセイであり得るが、イムノアッセイに限定されるものではない。イムノアッセイのいくつかの例としては、ラジオイムノアッセイ (R I A)、酵素イムノアッセイ (E I A)、フローサイトメトリー、およびウェスタンブロットなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明のアッセイが検出できる自己抗体には、I g G、I g M、I g A、I g E および I g D の少なくとも 1 つが含まれる。本発明のアッセイが検出できる自己抗体は、少なくとも 1 つのリン脂質に結合することができる。リン脂質は、ホスファチジルセリン、カルジオリピン、ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルコリンであり得るが、これらに限定されるものではない。

【0031】

本発明の 1 つの実施態様は、酸化還元 - 反応性自己抗体 (R - R A A) に関する血液検査を実施することによる、アルツハイマー病の診断、モニタリングおよび / または病期診断のための方法を対象とする。自己抗体は、リン脂質に結合する自己抗体であり得る。リン脂質はホスファチジルセリン、カルジオリピン、ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルコリンであり得るが、これらに限定されるものではない。本発明の方法は、また抗リン脂質自己抗体を検出することができるアッセイを含む。アッセイは、イムノアッセイなどの抗リン脂質自己抗体を検出できる本技術分野において公知の任意のアッセイであり得るが、イムノアッセイに限定されるものではない。イムノアッセイのいくつかの例としては、ラジオイムノアッセイ (R I A)、酵素イムノアッセイ (E I A)、フローサイトメトリー、およびウェスタンブロットなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明のアッセイが検出できる自己抗体には、I g G、I g M、I g A

10

20

30

40

50

、 I g E および I g D の少なくとも 1 つが含まれる。本発明のアッセイが検出できる自己抗体は、少なくとも 1 つのリン脂質に結合することができる。リン脂質は、ホスファチジルセリン、カルジオリピン、ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルコリンであり得るが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 3 2 】

本発明の別の実施態様は、酸化還元 - 反応性自己抗体 (R - R A A) に関する血液検査を実施することによる、脳血管疾患患者における神経学的障害の診断、モニタリングおよび / または病期診断のための方法を対象とする。自己抗体は、リン脂質に結合する自己抗体であり得る。リン脂質はホスファチジルセリン、カルジオリピン、ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルコリンであり得るが、これらに限定されるものではない。本発明の方法はまた、抗リン脂質自己抗体を検出することができるアッセイを含む。アッセイは、イムノアッセイなどの抗リン脂質自己抗体を検出できる本技術分野において公知の任意のアッセイであり得るが、イムノアッセイに限定されるものではない。イムノアッセイのいくつかの例としては、ラジオイムノアッセイ (R I A) 、酵素イムノアッセイ (E I A) 、フローサイトメトリー、およびウェスタンブロットなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明のアッセイが検出できる自己抗体には、 I g G 、 I g M 、 I g A 、 I g E および I g D の少なくとも 1 つが含まれる。本発明のアッセイが検出できる自己抗体は、少なくとも 1 つのリン脂質に結合することができる。リン脂質は、ホスファチジルセリン、カルジオリピン、ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルコリンであり得るが、これらに限定されるものではない。

10

20

【 0 0 3 3 】

本発明はまた、 (1) ウシ血清アルブミン含有水性緩衝液を含む第 1 の希釈剤および (2) 成体ウシ血漿含有水性緩衝液を含む第 2 の希釈剤を含む酵素免疫測定法を含む神経学的障害の診断、モニタリングおよび / または病期診断のための血液検査法であって、ウシ血清アルブミン含有緩衝液が、血漿タンパク質結合因子と無関係である抗リン脂質自己抗体を検出し、そして成体ウシ血漿含有緩衝液が血漿タンパク質結合因子に依存する抗リン脂質自己抗体を検出する方法を対象とする。リン脂質はホスファチジルセリン、カルジオリピン、ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルコリンであり得る。神経学的障害には、 C N S における酸化ストレスのレベルの増大に関連する、パーキンソン病、アルツハイマー病、多発性硬化症 (M S) など、ならびに脳血管疾患の患者における神経学的障害が挙げられるが、これらに限定されるものではない。また、アルツハイマー病などの神経学的障害の様々な病期は、同定された酸化還元 - 反応性自己抗体の量により本発明の方法を用いて決定することができる。後期においては、酸化還元 - 反応性自己抗体はほとんど存在しない。より終期近くでは、酸化還元 - 反応性自己抗体が検出されないこともある。

30

【 0 0 3 4 】

本発明の別の実施態様は、 (1) ウシ血清アルブミン含有水性緩衝液を含む第 1 の希釈剤および (2) 成体ウシ血漿含有水性緩衝液を含む第 2 の希釈剤を含む酵素免疫測定法を含むアルツハイマー病の診断、モニタリングおよび / または病期診断のための血液検査法であって、ウシ血清アルブミン含有緩衝液が、血漿タンパク質結合因子と無関係である抗リン脂質自己抗体を検出し、そして成体ウシ血漿含有緩衝液が血漿タンパク質結合因子に依存する抗リン脂質自己抗体を検出する方法を対象とする。リン脂質はホスファチジルセリン、カルジオリピン、ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルコリンであり得る。

40

【 0 0 3 5 】

本発明は、抗リン脂質自己抗体を検出することができるアッセイを含む神経学的障害を診断、モニタリング、および / または病期診断するためのキットに関する。神経学的障害には、 C N S における酸化ストレスのレベルの増大に関連する、パーキンソン病、アルツハイマー病、多発性硬化症 (M S) など、ならびに脳血管疾患の患者における神経学的障害が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

50

【0036】

さらに、本発明は、抗リン脂質自己抗体を検出することができるアッセイを含むアルツハイマー病を診断、モニタリング、および/または病期診断するためのキットに関する。自己抗体はI g G、I g M、I g A、I g EおよびI g Dの少なくとも1つである。自己抗体はリン脂質に結合する自己抗体である。リン脂質は、ホスファチジルセリン、カルジオオリピン、ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルコリンであり得るが、これらに限定されるものではない。アッセイは、イムノアッセイなどの抗リン脂質自己抗体を検出できる本技術分野において公知の任意のアッセイであり得るが、イムノアッセイに限定されるものではない。イムノアッセイのいくつかの例としては、ラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素イムノアッセイ(EIA)、フローサイトメトリー、およびウェスタンブロットなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明のアッセイが検出できる自己抗体には、I g G、I g M、I g A、I g EおよびI g Dの少なくとも1つが含まれる。本発明のアッセイが検出できる自己抗体は、少なくとも1つのリン脂質に結合することができる。リン脂質は、ホスファチジルセリン、カルジオオリピン、ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルコリンであり得るが、これらに限定されるものではない。

10

【0037】

加えて、本発明は、酸化還元 - 反応性自己抗体を含む神経学的障害を診断、モニタリング、および/または病期診断するためのバイオマーカーに関する。自己抗体はリン脂質に結合する自己抗体である。リン脂質は、ホスファチジルセリン、カルジオオリピン、ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルコリンであり得るが、これらに限定されるものではない。神経学的障害には、CNSにおける酸化ストレスのレベルの増大に関連する、パーキンソン病、アルツハイマー病、多発性硬化症(MS)などのこの分野において公知の神経学的障害が挙げられるが、これらに限定されるものではない。神経学的疾患には、脳血管疾患の患者における神経学的障害が含まれるが、それらに限定されるものではない。

20

【0038】

本発明のもう1つの実施態様は、酸化還元 - 反応性自己抗体(R - RAA)を含むアルツハイマー病の診断、モニタリング、および/または病期診断のためのバイオマーカーを対象とする。また、自己抗体は、リン脂質に結合する自己抗体であり得、リン脂質は、ホスファチジルセリン、カルジオオリピン、ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルコリンであり得るが、これらに限定されるものではない。

30

【0039】

本発明のバイオマーカーは、一旦それらが酸化 - 還元(レドックス)反応により「脱マスクされる」と自己免疫抗体(自己組織を攻撃する抗体)として作用する能力を有する個体中の特定の抗体を検出する。本発明の技術の医学的適用は、多数の疾患の診断および治療に革命をもたらす能力を有する。本発明の技術を通して、酸化還元 - 反応性自己抗体(R - RAA)は、アルツハイマー病やある種の癌などの特定の疾患を検査するためのバイオマーカーとして使用することができ、病期を決定する可能性もある。本発明のバイオマーカーは、臨床試験中の有力な治療および薬剤適用のモニタリングおよび認証のための機会を提供する。

40

【0040】

本発明者は、アルツハイマー病の患者が、年齢を適合させた推定健常個体と比較した場合、髄液および血液の両方において酸化還元 - 反応性自己抗体の損失を示すことを証明した。本質的に、これらの自己抗体は、アルツハイマー病患者において有意に減少および/または枯渇しているようであり、自己抗体の枯渇の程度は、各患者のアルツハイマー病の重症度および進行度の定義付けを助ける可能性がある。

【0041】

酸化還元 - 反応性自己抗体(R - RAA)の発見は、本発明者が細菌および/またはウイルス粒子を注射したマウスにおいて抗リン脂質自己抗体(aPL)が発見された実験を

50

知ったことに由来する。本発明者は、通常血液凝固異常と関連する a P L の同定のための臨床検査を行った。本発明者は、数人の敗血症（重度の細菌感染）患者由来の培養瓶中の血液試料を検査し、a P L が存在することを見出した。しかしながら、本発明者は、非敗血症患者由来の対照血液試料が培養瓶中に入れられた場合には、たとえこれらの非敗血症患者が細菌に感染していなかった場合でも a P L 陽性に変換することを発見した。その後の多数の検査の後、本発明者は、a P L は、血液培養瓶の成分により生産されたと結論付けた。本発明者は、生理的酸化剤であるヘミン、ならびに過マンガン酸カリウムなどの他の酸化剤または起電力（E M F）が、敗血症および非敗血症個体の血液試料において a P L の脱マスク化を担っていたことを見出した。さらなる実験により、本発明者は、酸化が、まさに a P L のみならず多くの他の自己抗体も同様にマスクも脱マスクもできるということ

10

【0042】

本発明者は、自己抗体の新しいファミリーが、それらが酸化 - 還元反応を受けると生み出されることを証明し、それらを酸化還元 - 反応性自己抗体（R - R A A）と名付けた。

【0043】

本発明者はまた、体内における特定の抗体が、一旦それらが酸化 - 還元（レドックス）反応により「脱マスクされる」と自己免疫抗体（自己組織を攻撃する抗体）として作用することができることを証明した。これらの抗体は、それらの自然の状態では自己抗体反応性は示さない。しかしながら、実験室において、これらの抗体は、ヘミンなどの酸化剤に電子を取られる酸化還元反応を受けることができる。これが起こるとその抗体は「脱マスクされ」、インビトロで自己免疫疾患と関連する自己抗体として振舞う。この反応は同様に、自己免疫疾患の個体由来の自己抗体は「マスクされ」、もはや診断的研究検査において検出されないように逆方向にもできる。

20

【0044】

本発明の酸化還元 - 反応性自己抗体は、自己免疫疾患を超えて多くの医学分野において同様に利用されることができる。本発明者は、酸化還元 - 反応性自己抗体がアルツハイマー病などの他の神経変性疾患の理解、診断および治療の改善を可能とするためのバイオマーカーとして作動できることを示すデータを有する。アルツハイマー病（A D）のヒトにおける脳内の変化は、何らかの目立った兆候や症状があらわれる 10 ~ 30 年前に開始し得る。結果として、A D は、疾患経過が開始して何年も後まで診断されないこともある。本発明のバイオマーカーおよび方法は、初期の段階でその疾患を同定することができる。本発明者は、正常なヒト脳髄液（C S F）において、酸化還元 - 反応性自己抗体が酸化還元

30

【0045】

本発明者は、A D 患者の脳において老人斑および神経原線維変化を引き起こすことが知られている酸化反応が、酸化還元 - 反応性自己抗体の脱マスク化においても役割を果たし、ついでそれらに脳組織に結合するかまたは標的化させることができるということを見出した。したがって、自己抗体は、酸化により脳組織に結合しているので、それらはその組織を変性させ、したがってそれらはもはや C S F 内には見出されず、それらは酸化還元

40

【0046】

本発明は、各患者の A D の重症度および進行度を決定することができる。同様に、本発明は、A D 患者における血液中の酸化還元 - 反応性自己抗体の減少を証明するデータを有し、それにより、アルツハイマー病を診断するための侵襲性の低い検査を提供する機会を生み出す。

【実施例】

【0047】

実施例 1

50

血液試料

Eunoe, Inc (ブレザントン、CA) から購入した 16 人のアルツハイマー病 (AD) 患者由来の血液 (血清) 試料と、ザ セントラル インディアナ リージョナル ブロッド センター (the Central Indiana Regional Blood Center) (インディアナポリス、IN) から購入した 17 人の正常年齢適合ボランティア血液ドナー血清試料を研究に使用した。AD 血清試料は、平均年齢 75 歳 (62 ~ 85 歳の範囲) の女性 11 人および男性 5 人から採取された。ボランティア血液ドナーは、平均年齢 72 歳 (65 ~ 84 歳の範囲) の女性および男性で構成された。全ての試料が符号化され、個体の年齢および静脈切開の日付が付されたが、個人情報 は試料に付されなかった。

【0048】

a P L E L I S A

酸化前後の血清 a P L の検出は、2 つの検査希釈剤、すなわち T R I S 緩衝生理食塩水 (T B S) に 1 % ウシ血清アルブミン (B S A) を含有するものと、T B S に 10 % 成体ウシ血漿 (A B P) を含有するものを使用するイン - ハウス酵素免疫測定法 (E L I S A) を使用して評価した (McIntyre JA, Wagenknecht DR, Waxman DW. ボランティア血液ドナーにおける抗リン脂質抗体 (a P L) の頻度と特異性 (Frequency and specificities of antiphospholipid antibodies (aPL) in volunteer blood donors.)、Immunobiology 2003; 207:59-63、その全体が参考資料として本明細書に組み込まれる)。B S A 希釈剤が、血漿タンパク質結合因子と無関係である a P L を検出し、一方 A B P 希釈剤がリン脂質への血漿タンパク質の結合に依存する a P L を検出する。評価した 4 つの a P L 特異性は、ホスファチジルセリン (P S)、カルジオリピン (C L)、ホスファチジルエタノールアミン (P E) およびホスファチジルコリン (P C) であった。I g G、I g M および I g A アイソタイプが評価された。全体で、アルツハイマー病の患者の試料は、24 の独立した検査において正常な年齢を適合させた血清と比較された。

【0049】

酸化還元最適化

酸化剤 (ヘミン) の最終濃度に対して正常血清の最適な希釈をまずチェッカーボード分析法により測定した。血清の 1 / 10 希釈が、希釈された血清 1 . 0 m l につきヘミン 2 2 μ l (23 m M) を添加し、36 で振とうインキュベーターで一晩インキュベートした後 a P L の最適な脱マスクを示した。血清の希釈は、抗酸化剤として作用することができる血清中の多数の成分を無効とするために必要とされる。

【0050】

統計

ノンパラメトリックなマン - ホイットニー (Mann-Whitney) の U 検定が、2 つの試料が同じ分布に帰属するかどうかを評価するために使用された。S P S S バージョン 16 (シカゴ、イリノイ州) がこの分析に使用された。練習として、サルフォードシステムズ (Salford Systems)、サンディエゴ、カリフォルニア (Steinberg D, Colla P. CART: ツリー構造ノンパラメトリックデータ分析 (Tree-structure non-parametric data analysis.)、サンディエゴ、CA: サルフォードシステムズ; 1995) により開発され、ブレイン (Breinan's) のオリジナルアルゴリズム (Breinanら、分類および回帰ツリー、パシフィックグループ、CA: ワズワース出版社 (Wadsworth Publishing Co.) ; 1984) に基づく、分類および回帰ツリーとして知られる機械学習ソフトウェア、C A R T バージョン 6 . 0 が試料患者を分類するための帰納的デシジョンツリーを作成するために使用した。帰納的決定は、決定ノードおよびある分類が指定される葉 (すなわちターミナルノード) により表される一連のルールである。

【0051】

学習プロセスは、不純度関数に従い最も判別的な変数を選択しデータを区分化すること、およびこの区分化を帰納的にノードが終結するのに十分なほど純粋とみなされるまで繰り返すこと、そしてついで重複フィッティングを避けるために得られる完成ツリーを刈り取ることから構成される。分類のために別の技術、フィッシャーの線形判別法 (Fisher's

10

20

30

40

50

linear discriminate analysis) も研究された。フィッシャーの線形判別 (Fisher RA. 分類学的問題における多重測定値の使用 (The use of multiple measurements in taxonomic problems)、Ann Eugen 1936; 7:179-188) は、線形分類器として使用される得られる組合せにより対象 (AD および正常がここ) の 2 つまたはそれ以上の分類を最も良く分けるような特徴の線形結合を見出すための統計に使用される方法である。本発明者は、現段階ではこれらの判別技術由来のモデルはいずれも試料内 (in-sample) モデルのみであるということに気が付いた。

【 0 0 5 2 】

結果

配位鉄を含むヘモグロビン - 様分子 (ヘミン) の天然に存在する生理学的濃度が、希釈血清試料を酸化するために使用された。ヘミンは、抗体の超可変抗原結合部位、すなわち相補性決定領域 (CDR) に見られる芳香族アミノ酸 (チロシン、トリプトファン) を選択的に強化できるので、酸化還元反応に参与することができる (McIntyre JA, Faulk WP、酸化還元 - 反応性自己抗体 : 生化学、特徴付け、および特異性、Clin Rev Allergy Immunol 2009; 37:49-54、その全体が参考資料として本明細書に組み込まれる。)。ヘミンに曝しながら血清試料を一晚インキュベートすることにより、R - R A A の脱マスクが引き起こされる。未処理正常血清対 AD 血清に関する a P L 検査の結果と、ヘミン処理した正常血清対 AD 血清に関する結果を以下の表 1 に示す。

【 0 0 5 3 】

【表 1】

ヘミンによる酸化前後の抗リン脂質自己抗体活性に関するアルツハイマー対正常の年齢を適合させた血清のELISA試験

	未処理血清		ヘミン処理血清		p-値		
	AD平均 (SD)	正常平均 (SD)	AD平均 (SD)	正常平均 (SD)			
IgG PS	BSA	0.025(0.09)	0.023(0.055)	0.230(0.137)	0.444	0.058	
	ABP	0.019(0.036)	0.034(0.116)	0.560(0.171)	0.670(0.179)	0.929	0.058
IgG CL	BSA	0.158(0.247)	0.152(0.148)	0.274(0.156)	0.285(0.132)	0.683	0.845
	ABP	0.062(0.083)	0.100(0.143)	0.636(0.093)	0.650(0.139)	0.127	0.444
IgG PE	BSA	0.027(0.028)	0.070(0.037)	0.183(0.053)	0.305(0.085)	<=0.001*	<=0.001*
	ABP	0.135(0.142)	0.099(0.064)	0.942(0.934)	0.969(0.141)	0.709	0.191
IgG PC	BSA	0.062(0.046)	0.109(0.061)	0.640(0.148)	0.776(0.131)	0.005	0.009*
	ABP	0.058(0.054)	0.062(0.059)	0.398(0.109)	0.390(0.100)	0.709	0.790
IgA PS	BSA	0.016(0.013)	0.006(0.008)	0.147(0.093)	0.151(0.107)	0.014	0.873
	ABP	0.027(0.045)	0.007(0.008)	0.418(0.248)	0.286(0.118)	0.037	0.146
IgA CL	BSA	0.064(0.189)	0.007(0.007)	0.107(0.147)	0.151(0.107)	0.309	0.657
	ABP	0.023(0.045)	0.006(0.008)	0.311(0.093)	0.286(0.118)	0.929	0.136
IgA PE	BSA	0.030(0.021)	0.059(0.030)	0.100(0.035)	0.134(0.063)	0.008	0.217
	ABP	0.037(0.034)	0.027(0.038)	0.582(0.162)	0.567(0.217)	0.118	0.845
IgA PC	BSA	0.040(0.022)	0.040(0.025)	0.183(0.085)	0.179(0.082)	0.709	0.958
	ABP	0.014(0.015)	0.013(0.005)	0.075(0.040)	0.061(0.024)	0.657	0.362
IgM PS	BSA	0.005(0.010)	0.008(0.024)	0.009(0.009)	0.019(0.018)	0.683	0.081
	ABP	0.006(0.008)	0.004(0.014)	0.072(0.054)	0.122(0.074)	0.102	0.028
IgM CL	BSA	0.007(0.019)	0.008(0.018)	0.020(0.017)	0.032(0.039)	0.606	0.557
	ABP	0.009(0.019)	0.015(0.020)	0.159(0.092)	0.243(0.146)	0.657	0.053
IgM PE	BSA	0.009(0.018)	0.011(0.020)	0.030(0.041)	0.046(0.034)	0.581	0.019
	ABP	0.029(0.059)	0.026(0.034)	0.233(0.104)	0.483(0.307)	0.510	0.003*
IgM PC	BSA	0.015(0.019)	0.026(0.032)	0.063(0.040)	0.097(0.060)	0.068	0.068
	ABP	0.020(0.018)	0.020(0.017)	0.032(0.019)	0.056(0.036)	0.817	0.045

p-値はマン-ホイットニーU検定、正確な有意差[2*1-側検定(2*1-tailed test)]を使用、タイ(ties)について補正なし。
 *は、aPL特異性に関する平均ELISA OD値が、750人の正常な血液ボランティアの検査後に決定され確立されたカットオフ値を上回ることを示す。

【0054】

表1に示すように、AD血清試料と正常血清試料との間になされた48の比較のうち、11で統計的有意差(p < 0.05)が見られた。検出された11の差のうち9つにおいて、aPL ELISA値に対する平均吸光度(OD)測定値は、AD患者の血清で共通してより低かった。11OD値のうち2つは、AD群において高かったが、これらはADと正常との間の未処理試料比較において観察された。平均値の多くは、このアッセイに対して確立された陽性/陰性カットオフ値以下であったので、これらの分散の関連性は明確ではなかった。

【0055】

対照的に、ヘミン処理群におけるAD血清試料と正常血清試料との間の6つのaPL平

均値のうちの3つは、これらのaPL特異性に対して確立された陽性/陰性閾値を上回っていた。これら3つの予測因子のうちの2つはBSA緩衝液中のIgG aPEおよびABP緩衝液中のIgM aPEであった。これらのaPL特異性に対して観察された平均OD値は、統計学的CART(分類および回帰ツリー)分析にかけられ、これら33個体におけるaPLレベルのコンピューターによる差は、アルツハイマー群対正常血液ドナー群の予測層別化に対して84%の感度および100%の特異度のレベルに達した(図1)。CART分析から派生する単純な規則に基づく分類は、つぎのとおりである。0.28より大きいヘミン処理IgG PE BSAのOD値、あるいは0.13より小さいヘミン処理IgM PE ABPのOD値と組み合わせられた0.28より小さいヘミン処理IgG PE BSAのOD値が非AD患者を示す。用いられた2番目の統計学的アプローチは、フィッシャーの線形判別法であり、特異度94%、感度88%と算出された。AD患者と正常患者とを分類するためのフィッシャーの判別関数は、

$$X = 11.362 (\text{ヘミン処理 IgG PE BSA OD 値}) \\ + 0.652 (\text{ヘミン処理 IgG PC BSA OD 値}) \\ + 2.211 (\text{ヘミン処理 IgM PE ABP OD 値}) \\ - 4.051$$

であり、正の値が正常患者に帰着し、負の値がAD患者に帰着する。判別群の重心は、それぞれ0.984および-1.046である。

【0056】

表1の分析から得られる有意データの別の数学的表現を垂直箱ヒゲ図として図2に示す。分散箱ヒゲ図は、正常個体対AD患者の間のR-RAAの相対的差異を観察するための素早い視覚的参照をもたらす。

【0057】

実施例2

表2は以下に、未処理の正常血清対AD血清およびヘミン処理した正常血清対AD血清に対するPL検査の結果を説明する。PL検査は、実施例1に挙げたように行った。これらのデータは、検査に対する試料外(out-of-sample)分析を表す。

【0058】

10

20

【表 2】

表 2

IgM_PE10% により分類			新しい
試料 ID	IgG_PE 1% 平均	IgM_PE 10% 平均	指定
202255	0.037	0.054	I
202653	0.055	0.054	I
207543	0.042	0.055	I
211230	0.247	0.060	N
202170	0.294	0.080	N
207570	0.169	0.082	I
207505	0.089	0.091	AD
202679	0.118	0.100	I
207382	0.247	0.118	N
207400	0.184	0.121	N
207004	0.153	0.157	N
202680	0.081	0.188	AD
207508	0.114	0.206	AD
207436	0.127	0.218	AD
207539	0.222	0.267	N
207512	0.160	0.290	I
202317	0.130	0.309	AD
202735	0.144	0.633	AD
新しい ad	0.114029422	0.274217793	
新しい I	0.096901997	0.105736213	
新しい n	0.224389547	0.133746586	

10

20

AD = アルツハイマー

N = 正常

I = MCI (軽度認識障害)

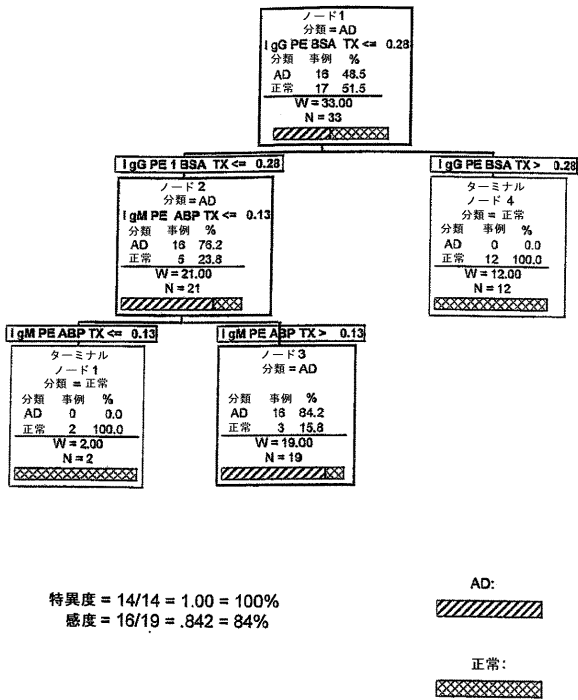
【0059】

上述の説明および実施例の目的は、本発明のいくつかの態様を説明することであり、何らかの制限を暗示するものではない。当業者にとって、本発明のキットおよび方法に様々な修飾および改変が本発明の精神または範囲を逸脱することなく行われ得ることは明らかであろう。本明細書中に引用された全ての刊行物は、その全体が参考文献として組み込まれる。

30

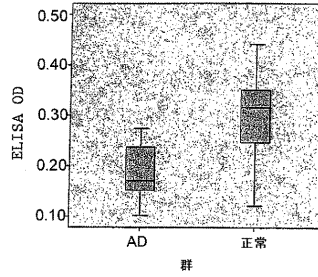
【 図 1 】

分類および回帰ツリー (CART) 分析

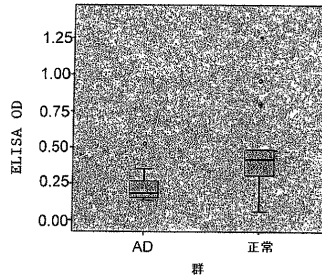


【 図 2 】

BSA中のIgG aPE (ヘミン処理)



ABP中のIgM aPE (ヘミン処理)



【 手続補正書 】

【 提出日 】平成22年7月6日 (2010.7.6)

【 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 】

アルツハイマー病の診断、モニタリングおよび/または病期診断のための方法であって、酸化還元 - 反応性自己抗体に関する血液検査を実施することを含む方法。

【 請求項 2 】

前記自己抗体が、IgG、IgM、IgA、IgEおよびIgDの少なくとも1つである請求項1記載の方法。

【 請求項 3 】

前記自己抗体がリン脂質に結合する自己抗体である請求項1記載の方法。

【 請求項 4 】

前記リン脂質が、ホスファチジルセリン、カルジオリピン、ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルコリンの少なくとも1つである請求項3記載の方法。

【 請求項 5 】

前記血液検査が抗リン脂質自己抗体を検出することができるアッセイを含む請求項1記載の方法。

【 請求項 6 】

前記自己抗体が、IgG、IgM、IgA、IgEおよびIgDの少なくとも1つである請求項5記載の方法。

【請求項 7】

前記自己抗体が、ホスファチジルセリン、カルジオリピン、ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルコリンの少なくとも1つに結合する請求項5記載の方法。

【請求項 8】

アルツハイマー病を診断、モニタリングおよび/または病期診断するための血液検査を実施するためのバイオマーカーであって、酸化還元-反応性自己抗体を含むバイオマーカー。

【請求項 9】

前記自己抗体が、I g G、I g M、I g A、I g EおよびI g Dの少なくとも1つである請求項8記載のバイオマーカー。

【請求項 10】

前記自己抗体がリン脂質に結合する自己抗体である請求項8記載のバイオマーカー。

【請求項 11】

前記リン脂質が、ホスファチジルセリン、カルジオリピン、ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルコリンの少なくとも1つである請求項8記載のバイオマーカー。

【請求項 12】

アルツハイマー病の診断、モニタリングおよび/または病期診断のためのキットであって、抗リン脂質自己抗体を検出することができるアッセイを含むキット。

【請求項 13】

前記自己抗体が、I g G、I g M、I g A、I g EおよびI g Dの少なくとも1つである請求項12記載のキット。

【請求項 14】

前記自己抗体が、ホスファチジルセリン、カルジオリピン、ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルコリンの少なくとも1つに結合する請求項12記載のキット。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 08/56044
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - G01N 33/53; G01N 33/92 (2009.01) USPC - 435/7.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC - 435/7.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 435/326 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(DB=PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB; PLUR=YES; OP=ADJ), Google Scholar(John A. MCINTYRE Alzheimer's, John A. MCINTYRE autoantibodies, Alzheimer's autoantibodies redox blood)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2006/0141541 A1 (MCINTYRE), 29 June 2006 (29.06.2006); para [0021], [0027]-[0028], [0040]	B-11
Y	US 2005/0260681 A1 (MCINTYRE), 24 November 2005 (24.11.2005); para [0008], [0018], [0023], [0063], [0065], [0070]; Table 2	1-7, 12-14
Y	US 2005/0260681 A1 (MCINTYRE), 24 November 2005 (24.11.2005); para [0008], [0018], [0023], [0063], [0065], [0070]; Table 2	1-7, 12-14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "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) "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 "I" 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 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 October 2009 (22.10.2009)		Date of mailing of the international search report 02 NOV 2009
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 PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

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, SK, 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, 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

(72)発明者 マッキンタイア、ジョン エー
アメリカ合衆国、46220-4006 インディアナ州、インディアナポリス、オータム レーン 6135

专利名称(译)	用于诊断，监测和/或分期阿尔茨海默病的生物标志物，试剂盒和方法		
公开(公告)号	JP2012502279A	公开(公告)日	2012-01-26
申请号	JP2011526230	申请日	2009-09-04
[标]申请(专利权)人(译)	氧化还原反应制剂有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	氧化还原 - 反应Riejentsu有限责任公司		
[标]发明人	マッキンタイアジョンエー		
发明人	マッキンタイア、ジョン エー		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6896 G01N2800/2821		
FI分类号	G01N33/53.N		
优先权	61/094167 2008-09-04 US		
其他公开文献	JP5249420B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于诊断，监测和/或分期阿尔茨海默氏病的生物标志物和试剂盒，其包含氧化还原反应性自身抗体。本发明还涉及诊断，监测和/或分期阿尔茨海默病的方法，该方法包括使用该方法进行血液测试。

ヘミニルによる酸化還元反応性自身抗体をターゲットとするELISA法によるアルツハイマー病の診断性能の比較

抗体	未処理血液		ヘミニル処理血液			
	AD/PS (SD)	P-値	AD/PS (SD)	P-値		
6G7S	BSA 0.023(0.009)	0.021(0.055)	0.444	0.200(0.157)	0.310(0.157)	0.083
	ADP 0.070(0.026)	0.054(0.116)	0.029	0.260(0.171)	0.070(0.179)	0.028
7G1L	BSA 0.170(0.247)	0.123(0.146)	0.083	0.270(0.156)	0.283(0.153)	0.085
	ADP 0.062(0.065)	0.100(0.143)	0.127	0.450(0.095)	0.630(0.139)	0.044
8G7E	BSA 0.027(0.028)	0.070(0.053)	<0.001	0.183(0.053)	0.333(0.085)	<0.001*
	ADP 0.133(0.142)	0.090(0.064)	0.759	0.520(0.054)	0.696(0.141)	0.071
9G7C	BSA 0.002(0.046)	0.190(0.061)	0.002	0.490(0.148)	0.770(0.151)	0.009*
	ADP 0.000(0.049)	0.023(0.059)	0.759	0.390(0.109)	0.290(0.100)	0.790
10A7S	BSA 0.016(0.033)	0.090(0.086)	0.014	0.170(0.097)	0.110(0.097)	0.073
	ADP 0.027(0.045)	0.072(0.069)	0.037	0.480(0.130)	0.280(0.110)	0.146
11A7L	BSA 0.060(0.109)	0.070(0.070)	0.259	0.100(0.147)	0.150(0.107)	0.057
	ADP 0.023(0.045)	0.066(0.088)	0.059	0.310(0.095)	0.280(0.110)	0.156
12A7E	BSA 0.010(0.021)	0.050(0.050)	0.008	0.100(0.055)	0.110(0.063)	0.037
	ADP 0.027(0.054)	0.027(0.038)	0.118	0.820(0.162)	0.550(0.217)	0.065
13A7C	BSA 0.046(0.022)	0.040(0.025)	0.759	0.180(0.085)	0.170(0.082)	0.098
	ADP 0.014(0.015)	0.033(0.065)	0.657	0.070(0.049)	0.080(0.051)	0.362
14A7S	BSA 0.016(0.010)	0.080(0.015)	0.083	0.000(0.079)	0.010(0.018)	0.001
	ADP 0.000(0.009)	0.040(0.013)	0.666	0.020(0.017)	0.020(0.017)	0.037
15A7L	BSA 0.070(0.019)	0.060(0.013)	0.102	0.070(0.050)	0.120(0.074)	0.038
16A7E	BSA 0.000(0.019)	0.015(0.010)	0.057	0.150(0.092)	0.220(0.146)	0.035
	ADP 0.000(0.016)	0.010(0.010)	0.851	0.010(0.041)	0.040(0.051)	0.019
17A7C	BSA 0.028(0.009)	0.026(0.014)	0.510	0.230(0.104)	0.450(0.107)	0.007*
	ADP 0.010(0.019)	0.026(0.053)	0.068	0.020(0.010)	0.070(0.060)	0.068
18A7C	BSA 0.000(0.018)	0.020(0.017)	0.017	0.020(0.019)	0.050(0.050)	0.045

* p値はマニトール還元法、5%の重碳酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)を用いた。AD/PSは未処理血液、ADPはヘミニル処理血液を示す。AD/PSは未処理血液、ADPはヘミニル処理血液を示す。AD/PSは未処理血液、ADPはヘミニル処理血液を示す。AD/PSは未処理血液、ADPはヘミニル処理血液を示す。