

(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2009-526219

(P2009-526219A)

(43) 公表日 平成21年7月16日(2009.7.16)

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

F1

G01N 33/53

テーマコード (参考)

N

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁)

(21) 出願番号 特願2008-553886 (P2008-553886)
 (86) (22) 出願日 平成19年2月6日 (2007.2.6)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年9月24日 (2008.9.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/IL2007/000156
 (87) 国際公開番号 W02007/091254
 (87) 国際公開日 平成19年8月16日 (2007.8.16)
 (31) 優先権主張番号 60/765,220
 (32) 優先日 平成18年2月6日 (2006.2.6)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507342353
 ラバポート ファミリー インスティテュ
 ート フォー リサーチ イン ザ メデ
 イカル サイエンスーズ
 イスラエル, 31096 ハイファ,
 ピー. オー. ボックス 9697, エ
 フロン ストリート
 (71) 出願人 508238233
 ラムバム メディカル センター リサー
 チ ファンド
 イスラエル, 31096 ハイファ,
 バット ガリム
 (74) 代理人 100103816
 弁理士 風早 信昭

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T1DMを診断するための方法及びキット

(57) 【要約】

必要性のある対象におけるI型糖尿病(T1DM)を診断する方法が提供される。前記方法は、対象の生物学的サンプル中の抗CCL3抗体の存在及び/又はレベルを決定することを含み、予め決定された閾値より上の前記存在又はレベルはT1DMの指標であり、それにより対象におけるT1DMを診断する。また、T1DMを診断するためのキット及び抗糖尿病治療を監視する方法も提供される。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

必要性のある対象における I 型糖尿病 (T 1 D M) を診断する方法であって、前記方法は、対象の生物学的サンプル中の抗 C C L 3 抗体の存在及び / 又はレベルを決定することを含み、予め決定された閾値より上の前記存在又はレベルは T 1 D M の指標であり、それにより対象における T 1 D M を診断することを特徴とする方法。

【請求項 2】

T 1 D M を診断するためのキットであって、包装材料、及び対象の生物学的サンプル中の抗 C C L 3 抗体を決定するための少なくとも一つの試薬を含むことを特徴とするキット。

10

【請求項 3】

必要性のある対象における抗糖尿病治療を監視する方法であって、前記方法は、

(a) 対象を抗糖尿病治療にさらすこと ; そして

(b) 対象の生物学的サンプル中の抗 C C L 3 抗体の存在及び / 又はレベルを決定すること

を含み、ステップ (a) の後の前記生物学的サンプル中の抗 C C L 3 抗体のレベルの変化は治療効力の指標であることを特徴とする方法。

【請求項 4】

ステップ (b) が、ステップ (a) の後に、及び所望によりステップ (a) の前に行われることを特徴とする、請求項 3 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記抗糖尿病治療が、インスリン、グルカゴン、グルコース、ピグアニド、クロム、ヤクヨウニンジン、マグネシウム及びバナジウムからなる群から選択される医薬を含むことを特徴とする、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

前記抗糖尿病治療が、膵臓移植、小島細胞移植及び生活様式の管理からなる群から選択されることを特徴とする、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7】

前記抗 C C L 3 抗体の存在及び / 又はレベルを決定することが生体外で行われることを特徴とする、請求項 1 , 2 又は 3 のいずれかに記載の方法又はキット。

30

【請求項 8】

T 1 D M が、成人における潜在的自己免疫糖尿病 (L A D A) を含むことを特徴とする、請求項 1 , 2 又は 3 のいずれかに記載の方法又はキット。

【請求項 9】

前記抗 C C L 3 抗体の存在及び / 又はレベルを決定することが、T 1 D M 糖尿病状態に対して特異的な自己抗体の顕在化に先立って行われることを特徴とする、請求項 1 , 2 又は 3 のいずれかに記載の方法又はキット。

【請求項 10】

T 1 D M 糖尿病状態に対して特異的な自己抗体の存在又はレベルを決定することをさらに含むことを特徴とする、請求項 1 又は 3 に記載の方法。

40

【請求項 11】

T 1 D M 糖尿病状態に対して特異的な自己抗体の存在又はレベルを決定するための少なくとも一つの試薬をさらに含むことを特徴とする、請求項 2 に記載のキット。

【請求項 12】

前記 T 1 D M 糖尿病状態に対して特異的な自己抗体が、グルタミン酸デカルボキシラーゼ (G A D)、小島細胞抗原 (I C A) 5 1 2 / I A - 2、及びインスリンからなる群から選択される抗原に対して特異的であることを特徴とする、請求項 9 , 10 又は 11 のいずれかに記載の方法又はキット。

【請求項 13】

前記閾値が、 $\log_2 A b$ 10 ~ 15 の抗 C C L 3 力価を含むことを特徴とする、請

50

求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

$\log_2 Ab$ 10 ~ 15 の抗 CCL3 力価は T1DM の指標であるという説明をさらに含むことを特徴とする、請求項 2 に記載のキット。

【請求項 15】

前記決定することが ELISA によって行われることを特徴とする、請求項 1, 2 又は 3 のいずれかに記載の方法又はキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、T1DM を診断するための新規の方法及びキットに関する。

【背景技術】

【0002】

糖尿病は、インスリン分泌の欠陥、又はインスリン作用の欠陥、又はこれらの両者から生じる高血糖（グルコース）レベルによって特徴付けられる一群の慢性的な代謝疾患である。もし治療されずに放置されると、糖尿病は、腎不全、心臓病、脳卒中及び失明を含む深刻な合併症を生じることがある。約 1500 万人のアメリカ人（人口の約 8%）が糖尿病を有する。経済的な見通しから、1997 年の糖尿病の総年間経済費用は、アメリカにおいて 980 億ドルであると見積られた。

【0003】

I 型糖尿病（T1DM）は、若年型糖尿病又はインスリン依存性糖尿病とも称され、幼年期又は青年期に発症し、最も一般的には 8 ~ 12 才で見出される。アメリカでは、診断された糖尿病の約 5 ~ 10% が T1DM である。

【0004】

T1DM は、膵臓のランゲルハンス島におけるインスリン分泌細胞の器官特異的な自己免疫破壊の結果であり、これは身体によってインスリンが生産されない状態に導く。T1DM は、T 細胞によって媒介される多要因的な自己免疫疾患であり、そこでは CD4⁺ 及び CD8⁺ T 細胞の両方、並びにマクロファージが細胞の破壊のために必要であるということが明らかになっている。前炎症性媒介因子及び接着分子は、これらの自己反応性白血球が膵臓のランゲルハンス島に侵入して蓄積されるように指向することに参与している。

【0005】

T1DM の特殊なサブグループは、成人における潜在的自己免疫糖尿病 [LADA; 成年期の遅延発症の自己免疫糖尿病、「遅い発症の I 型」糖尿病、又は「1.5 型（I 型及び半分）」糖尿病とも称される] に言及される。この医学的状態は、I 型糖尿病と同様の小島自己抗体に関連しているが、その遅延した発症のため、しばしば II 型糖尿病（T2DM）と誤診される。

【0006】

初期段階では、LADA は通常、非肥満 II 型糖尿病の表現型を示す（患者はやせているか又は正常な体重である）。不幸なことに、その生理学的表示において、LADA は若年型（I 型）糖尿病により良く似ており、代謝不全、遺伝、及び自己免疫特徴についてインスリン依存性糖尿病と共通する。

【0007】

T1DM の現在の診断は、グルタミン酸デカルボキシラーゼ（GAD）、小島細胞抗原（ICA）512 / IA-2、及びインスリンに対する自己抗体の検出に基づいている。不幸なことに、これらのテストは、すべての T1DM 患者をカバーするには感度が十分でない。疾患の発症時には、抗 GAD, IA-2A 及び抗インスリン（IAA）抗体を組合せて使用することにより 85% より高い感度を得られる。抗 GAD 単独の感度は 70 ~ 80% であり、IA-2A は 50 ~ 70% であり、抗インスリン（IAA）は 30 ~ 50% であり、研究間の集団差異を反映する範囲の変動を有する（Clive et al.

10

20

30

40

50

, Autoimmunity reviews, 5:424-428, 2006; Polly et al., Diabetes Care, 24:398, 2001); 従って、現在のテストは、十分な診断精度及び信頼性を提供しない。

【0008】

さらに、糖尿病の診断の後、患者はインスリン又はICA512に対して顕著な抗体力価を示さず、限られた数の患者のみがGADに対して抗体力価を示す。従って、成人における自己免疫糖尿病の診断は、容易でなく、通常、患者を経口低血糖薬で治療することに失敗した後に(糖尿病の診断の数年後に)考慮される。この場合、少ない割合の患者のみが抗GAD抗体の陽性力価を有するであろう。

【0009】

上述の通り、LADA患者は、診断時の彼らの年齢、及び自己抗体生産及びCペプチドレベル(これは、膵臓によって生産されるインスリンレベルの指標を与える)を含む現在利用可能な診断ツールに基づいて、I型糖尿病であるとしばしば誤診されている。かかる誤診はしばしば、誤った治療計画(発症時の経口インスリンの代わりにスルホニルウレア又は他の糖尿病薬)に導く。LADA患者は経口糖尿病薬及び生活様式の変化に応答するかもしれないが、彼らの細胞は破壊され続けられており、LADA患者は密に監視されるべきであるということに注意すべきである。従って、正しい治療を提供するために(LADAを含む)I型糖尿病を正確に診断することができることは極めて重要である。

【0010】

ケモカインは、自己免疫疾患を媒介する前炎症性タンパク質である。この役割は、これらのタンパク質を効果的な治療標的にする。ケモカインCCL2(MCP-1), CCL3(MIP-1)及びCCL4(MIP-1)は、マウスの実験モデルにおいてT1DM中に炎症を起こした膵臓で発現されることが見出されている[Cameron, M. J. et al., J Immunol 165:1102(2000)]。

【0011】

加えて、CCL3及びCCL4は、高レベルのT1DM特異的自己抗体(ICA, GAD及びIA-2自己抗体)を発現した、T1DM進行の危険(家族歴)がある個体において上方制御されていることが見出された[Hanifi-Moghaddam, et al., Diabetic Medicine 231:56(2006)]。重要なことに、CCL3に対する自己抗体の存在は、以前の研究では決定されておらず、それは、潜在的な診断ツールとして示唆されていない。

【0012】

従って、上述の制限を有さないT1DM糖尿病を診断するための方法及びキットを有することに対する幅広く認識された要求があり、また、かかる方法及びキットを有することは大いに有利であるだろう。

【発明の開示】

【0013】

本発明の一つの側面によれば、必要性のある対象におけるI型糖尿病(T1DM)を診断する方法であって、前記方法は、対象の生物学的サンプル中の抗CCL3抗体の存在及び/又はレベルを決定することを含み、予め決定された閾値より上の前記存在又はレベルはT1DMの指標であり、それにより対象におけるT1DMを診断することを特徴とする方法が提供される。

【0014】

本発明の別の側面によれば、T1DMを診断するためのキットであって、包装材料、及び対象の生物学的サンプル中の抗CCL3抗体を決定するための少なくとも一つの試薬を含むことを特徴とするキットが提供される。

【0015】

本発明のさらに別の側面によれば、必要性のある対象における抗糖尿病治療を監視する方法であって、前記方法は、対象を抗糖尿病治療にさらすこと;そして対象の生物学的サンプル中の抗CCL3抗体の存在及び/又はレベルを決定することを含み、対象を抗糖尿

10

20

30

40

50

病治療にさらした後の前記生物学的サンプル中の抗 C C L 3 抗体のレベルの変化は治療効力の指標であることを特徴とする方法が提供される。

【 0 0 1 6 】

以下に記述される本発明の好ましいさらなる特徴によれば、抗 C C L 3 抗体の存在及び / 又はレベルを決定することは、対象を抗糖尿病治療にさらすステップの後に、及び所望によりかかるステップの前に行われる。

【 0 0 1 7 】

以下に記述される本発明の好ましいなおさらなる特徴によれば、前記抗糖尿病治療は、インスリン、グルカゴン、グルコース、ピグアニド、クロム、ヤクヨウニンジン、マグネシウム及びバナジウムからなる群から選択される医薬を含む。

10

【 0 0 1 8 】

以下に記述される本発明の好ましいなおさらなる特徴によれば、前記抗糖尿病治療は、膵臓移植、小島細胞移植及び生活様式の管理からなる群から選択される。

【 0 0 1 9 】

以下に記述される本発明の好ましいなおさらなる特徴によれば、前記抗 C C L 3 抗体の存在及び / 又はレベルを決定することは生体外で行われる。

【 0 0 2 0 】

以下に記述される本発明の好ましいなおさらなる特徴によれば、T 1 D M は、成人における潜在的自己免疫糖尿病 (L A D A) を含む。

【 0 0 2 1 】

以下に記述される本発明の好ましいなおさらなる特徴によれば、前記抗 C C L 3 抗体の存在及び / 又はレベルを決定することは、T 1 D M 糖尿病状態に対して特異的な自己抗体の顕在化に先立って行われる。

20

【 0 0 2 2 】

以下に記述される本発明の好ましいなおさらなる特徴によれば、方法は、T 1 D M 糖尿病状態に対して特異的な自己抗体の存在又はレベルを決定することをさらに含む。

【 0 0 2 3 】

以下に記述される本発明の好ましいなおさらなる特徴によれば、キットは、T 1 D M 糖尿病状態に対して特異的な自己抗体の存在又はレベルを決定するための少なくとも一つの試薬をさらに含む。

30

【 0 0 2 4 】

以下に記述される本発明の好ましいなおさらなる特徴によれば、前記 T 1 D M 糖尿病状態に対して特異的な自己抗体は、グルタミン酸デカルボキシラーゼ (G A D)、小島細胞抗原 (I C A) 5 1 2 / I A - 2、及びインスリンからなる群から選択される抗原に対して特異的である。

【 0 0 2 5 】

以下に記述される本発明の好ましいなおさらなる特徴によれば、前記閾値は、 $\log_2 A b$ 10 ~ 15 の抗 C C L 3 力価を含む。

【 0 0 2 6 】

以下に記述される本発明の好ましいなおさらなる特徴によれば、キットは、 $\log_2 A b$ 10 ~ 15 の抗 C C L 3 力価は T 1 D M の指標であるという説明をさらに含む。

40

【 0 0 2 7 】

以下に記述される本発明の好ましいなおさらなる特徴によれば、前記抗 C C L 3 抗体の存在及び / 又はレベルを決定することは E L I S A によって行われる。

【 0 0 2 8 】

本発明は、T 1 D M を診断するための新規な方法及びキットを提供することによって、現在知られている形態の欠点に対処することに成功している。

【 0 0 2 9 】

別途定義されない限り、本明細書中で使用されるすべての技術的用語および科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。

50

本明細書中に記載される方法および材料と類似または同等である方法および材料を本発明の実施または試験において使用することができるが、好適な方法および材料が下記に記載される。矛盾する場合には、定義を含めて、本特許明細書が優先する。加えて、材料、方法および実施例は例示にすぎず、限定であることは意図されない。

【0030】

図面の簡単な記述

本明細書では本発明を単に例示し図面を参照して説明する。特に詳細に図面を参照して、示されている詳細が例示として本発明の好ましい実施態様を例示考察することだけを目的としており、本発明の原理や概念の側面の最も有用でかつ容易に理解される説明であると考えられるものを提供するために提示していることを強調するものである。この点について、本発明を基本的に理解するのに必要である以上に詳細に本発明の構造の詳細は示さないが、図面について行う説明によって本発明のいくつもの形態を実施する方法は当業者には明らかになるであろう。

10

【0031】

図中、図1は、(診断の一週間以内に) T1DMであると新たに診断された10人の対象における自己抗体力価を示す棒グラフである。各患者について、棒は、左から右へ、IP-10, CXCL8 (IL-8), CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1) 及びCCL4 (MCP-1) についての自己抗体力価を示す。10人の対象のうち9人におけるCCL3に対する高度かつ選択的な自己免疫応答に注目されたい。

20

【0032】

図2は、新しく発症した糖尿病を有する対象(n=30)、前糖尿病対象(n=20)、延長されたT1DM(n=38)及び正常なコントロール(n=20)における陽性CCL3自己抗体力価を示す対象の割合を表す棒グラフである。

【0033】

図3は、新しく発症した糖尿病を有する30人の対象における、T1DM関連自己抗体: 抗インスリン(CIAA)、抗ICA、抗GAD、三つの診断マーカーすべてと抗CCL3の組合せについての陽性自己抗体力価を示す対象の割合を表す棒グラフである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0034】

本発明は、T1DMを診断するための方法及びキットに関する。

30

【0035】

本発明の原理および作用が、図面および付随する説明を参照してより十分に理解されることができる。

【0036】

本発明の少なくとも1つの実施形態を詳しく説明する前に、本発明は、その適用において、下記の説明において示される細部、または、実施例によって例示される細部に限定されないことを理解しなければならない。本発明は他の実施形態が可能であり、または、様々な方法で実施または実行される。また、本明細書中で用いられる表現法および用語法は記述のためであって、限定であると見なしてはならないことを理解しなければならない。

40

【0037】

I型糖尿病(T1DM)は、膵臓のランゲルハンス島におけるインスリン分泌細胞の器官特異的な自己免疫破壊の結果であり、これは身体によってインスリンが生産されない状態に導く。細胞の破壊は、疾患の徴候が表れる何年も前に開始する。臨床上の発症時には、10%の全細胞のみが残っていると推定されている。従って、疾患が最終的に診断されたとき、臨床上の細胞の枯渇及びインスリン依存はすでに生じているかもしれない。

【0038】

成人における潜在的自己免疫糖尿病(LADA)は、T1DMのサブグループであり、II型糖尿病(T2DM)の特徴であるその遅い発症のために、非肥満II型糖尿病であるとししばしば誤診される。LADA患者は典型的に、古典的なT1DMより良く保存され

50

た細胞機能を呈するが、診断から3年以内に細胞機能の顕著な損失を通常経験し、これは最終的にインスリン依存を生じる。LADA患者はT2DMに対する治療（経口低血糖糖尿病医薬及び生活様式の変更）に対して応答するかもしれないが、彼らの細胞は破壊されつづけており、従って、治療はしばしば経口治療の迅速な拡大及びインスリンの初期使用を必要とする。しかし、連続した細胞の破壊は、これらの患者を健康状態の悪化にさらし、これは寿命をおびやかす状態に導きうる。LADAを初期に同定するためのスクリーニングツールの使用は、血糖の制御を改善し、望ましくない合併症を防止するであろう。

【0039】

もし治療されずに放置されると、糖尿病は、腎不全、心臓病、脳卒中及び失明を含む深刻な合併症を生じることがある。従って、T1DMを正確にかつ初期に同定する方法は、徴候が表れて疾患が進行する前にT1DMを診断するために必要である。

【0040】

現在の抗体に基づいたT1DM診断方法（例えばGAD, ICA 512 / IA-2及びインスリン）は、すべてのT1DM患者をカバーできるほど十分感度が高くない。

【0041】

CCL3は、マウスの実験モデルにおいてT1DM中に炎症を起こした膵臓において発現される他のケモカインと共に見出されたケモカインである[Cameron, M. J. et al., J Immunol 165:1102(2000)]。同様の結果は、ヒトの研究でも得られている[Hanifi-Moghaddam, et al., Diabetic Medicine 231:56(2006)]。

【0042】

本発明を実施に移している際に、本発明者らは、T1DMであると診断された患者において一般的に、及び5年以上のT1DMの持続を有する患者において特に、抗CCL3自己抗体が顕在化していることを見出した。

【0043】

以下の実施例の欄で示されるように、本発明者らは、初期に診断されたT1DM対象は、もっぱらCCL3に対する自己抗体応答を発展したが、他の炎症媒介因子に対しては自己抗体応答を発展しなかったことを示している（実施例の欄の実施例1）。また、本発明者らは、抗CCL3自己抗体は90%の対象に存在しており（実施例の欄の実施例2）、これは従来使用されている自己抗体（抗ICA, GAD及びCIAA自己抗体 - そこでは試験された93%の対象が陽性であった）の組合された呈示について見出されているのと同じ割合である。加えて、本発明者らは、抗CCL3自己抗体が、前糖尿病患者（例えば、陽性の自己抗体を有するT1DMを有する患者の一親等の親類）並びに診断から5年以内の患者において高い割合で存在することを示している（実施例の欄の実施例2）。

【0044】

全体として、今回の発見は、重度の疾患徴候の発症の充分前にT1DMを診断するために活用されることができ、その感度は、現在使用されている三つの抗体に基づく検出アッセイのすべての組合された感度を置換できるようなものである。

【0045】

従って、本発明の一つの側面によれば、必要性のある対象におけるI型糖尿病（T1DM）を診断する方法が提供される。前記方法は、対象の生物学的サンプル中の抗CCL3抗体の存在及び/又はレベルを決定することを含み、予め決定された閾値より上の前記存在又はレベルはT1DMの指標であり、それにより対象におけるT1DMを診断する。

【0046】

本明細書で使用されるように、用語「T1DM」は、インスリン生産の減少又は完全な不存在によって特徴付けられる糖尿病に言及する。T1DMは、「幼年期」、「若年型」又は「インスリン依存性」糖尿病としても言及される。異常病態生理学は、自己免疫によって媒介されることもあり、又は自己免疫に依存しないこともある。後者は、ビタミンD3、膵臓細胞を特異的に破壊する化学物質及び医薬（例えば、N-3-ピリジルメチル-

10

20

30

40

50

N - p - ニトロフェニルウレア及びストレプトゾコシン)、及び外傷、膵臓炎及び腫瘍を含む他の膵臓の問題にさらすことを含みうる。本発明によるT1DMは、幼年期の初期及び成年期に(例えば25才以上の個体)発症するものでありうる。これらの疾患は、非インスリン依存性段階を伴って表れうる。従って、本発明によるT1DMは、成人における潜在的自己免疫糖尿病(LADA)及び若年期の成熟発症糖尿病(MODY)をも含む。

【0047】

本明細書で使用されるように、語句「必要のある対象」は、T1DMの危険のある哺乳動物、好ましくはヒト対象(例えば、遺伝的素因のある対象、T1DMの医学的及び/又は家族歴がある対象、医薬、化学物質又は病原体を含むT1DMにさらされたことがある対象)、及び/又はT1DMの疑いのある臨床上の徴候(例えば頻尿、煩渴多飲症、体重減少、及び血糖値が200mg/dl以上又は絶食8時間後の血糖値が ≥ 126 mg/dl)を示す対象に言及する。対象は、抗糖尿病薬を受けていても受けていなくてもよい。追加的に又は代替的に、必要のある対象は、ルーチン検査を受ける健康なヒト対象であることができる。

10

【0048】

本明細書で使用されるように、用語「診断する」は、疾患又は炎症性疾患としての徴候を分類し、かかる疾患の重篤度を決定し、疾患の進行を監視し、疾患の結果及び/又は回復の見込みを予測することに言及する。

【0049】

上述の通り、本発明のこの側面の方法は、対象から得られた生物学的サンプル中の抗CCL3抗体の存在又はレベルを決定することによって行われる。

20

【0050】

本明細書で使用されるように、用語「CCL3」(本明細書では、マクロファージ炎症性タンパク質1(MIP-1)としても言及される)は、多形核白血球の動員及び活性化における急性炎症状態に典型的に関与する、GenBankアクセッションNo. NP_002974のC-Cケモカインに言及する。

【0051】

本明細書で使用されるように、語句「抗CCL3抗体」は、CCL3のいかなるエピートにも結合するいかなる自己抗体(自体)に言及する。本発明の自己抗体は、いかなるクラスのものであることができる(例えば、IgG(サブクラス1-4)、IgM、IgA(サブクラス1-2)、IgD、及びIgE)。注目すべきことに、IgMにまさるIgG抗体集団がマウスにおける疾患進行に関連して見出されている[Hutchings et al., Diabetes, 46, 5:779-784(1997)]。また、I型糖尿病への進行についての最高のリスクは、高力価のIA-2A及びIAA, IgG2, IgG3、及び/又はIgG4サブクラス、及びIA-2関連分子IA-2に対する抗体に関連していることが見出されている[Achenbach et al., DIABETES, 53:384-92(2004)]。

30

【0052】

本発明の一実施態様によれば、本発明の自己抗体は、(対象から取り出された)生体外生物学的サンプルにおいて、又は生体内検出によって検出されることができる。

40

【0053】

本明細書で使用されるように、語句「生物学的サンプル」は、対象から由来する細胞、組織、又は体液の抗体を含有するサンプルに言及する。サンプル中に存在する抗体は典型的に、細胞質膜結合区画(例えば小胞体及びゴルジ装置)内に、及び(抗体分子を合成する)Bリンパ球の表面上に、及び抗体分子を結合するための特異的な受容体を発現する、単核食細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、及びマスト細胞の如き免疫エフェクター細胞の表面上に見出される。抗体は、血液の血漿(即ち、流体成分)及び組織の間質体液中にも存在する。抗体は、特定の種類の抗体分子が特異的に移送される、粘液、滑液、精液及び乳の如き分泌体液中にも見出されることができる。

50

【0054】

抗体を含有する生物学的サンプルの一般例は、以下のものを含むが、これらに限定されない：膵臓組織、消化管組織の如き組織サンプル、及び/又は血液、血清、血漿、リンパ液、胆汁、尿、唾液、痰、滑液、精液、涙、髄液、気管支肺胞液、腹水液、及び膿の如き生物学的体液。

【0055】

対象から生物学的サンプルを得るための手順（即ち、生検）は、当該技術分野では周知である。かかる手順は、血液採取、関節液生検、髄液生検、及びリンパ節生検を含むが、これらに限定されない。組織を得るための又は体液生検のためのこれらの及び他の手順は、<http://www.healthatoz.com/healthatoz/Atoz/search.asp>に詳述されている。

10

【0056】

好ましくは、糖尿病患者では、サンプルはインスリン治療の開始前に又はインスリン治療の開始から7日以内に採取される。可能なら、血清の如き生物学的サンプルは小分けにされてさらなる分析まで - 80 で冷凍保存される。

【0057】

上述の通り、本発明のこの側面の方法は、対象の生物学的サンプル中の抗CCCL3抗体の存在又はレベルを決定することによって行われ、予め決定された閾値（即ち、健康な個体から得られた生物学的サンプル中のレベル）より上の抗CCCL3抗体のレベルの存在は、T1DMの指標である。

【0058】

抗CCCL3抗体の存在又はレベルを検定するために選択される特定のアッセイプロトコールは重要でなく、上述の予め決定された閾値レベルの自己抗体を検出するために十分に感度の高いアッセイであることしか必要でない。細胞破壊のごく初期段階のごく低レベルの自己抗体が存在しうことは理解されるであろう。従って、（例えば健康なサンプルの）陰性背景又はコントロールレベルより上のいかなる自己抗体の存在も、前糖尿病状態の診断になるであろう。

20

【0059】

本発明の好ましい実施態様によれば、10～15の抗CCCL3 \log_2 Ab力価を含む予め決められた閾値がT1DMの指標である。

【0060】

使用された手順とは無関係に、いったん生物学的サンプルが得られると、生物学的サンプル中のCCCL3に対する抗体分子の力価（数）が決定される。

30

【0061】

抗体力価は、ELISA（直接的又は間接的）、及び固定された抗原を使用するドットプロットの如き、当該技術分野では周知の技術によって決定されることができ（例えば、Abbas, Lichtman及びPoberの「Cellular and Molecular Immunology」, W.B. Saunders International Edition 1994, p. 56 - 59を参照されたい）。特に、抗原（即ち、いかなるCCCL3エピトープ又はその模倣体）は固体支持体上に固定されることが好ましい。抗体の非特異的な結合を回避するため、固体支持体は、非抗原性タンパク質でも被覆されることが好ましい。ペプチドは典型的に、水性媒体からの吸着によって固体支持体（マトリックス）上に固定されるが、当業者に周知の、タンパク質及びペプチドに適用可能な固定方法の他の様式も使用されることができ。

40

【0062】

本明細書で使用されるように、語句「固体支持体」は、関心のある試薬（例えばCCCL3エピトープ）が付着できる非水性マトリックスに言及する。固体支持体の例は、ガラス（例えば、制御された多孔質ガラス）、多糖類（例えばアガロース）、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコール及びシリコンから部分的に又は全体的に形成される固体支持体を含むが、これらに限定されない。特定の実施態様では、文脈に応じて、固体支持体は、ポリスチレン又はポリ塩化ビニル製の管、プレート、アッセイ又はマイ

50

クロカ価プレートのウェルを含むことができる。他の実施態様では、それは精製カラム（例えばアフィニティークロマトグラフィーカラム）である。この用語は、米国特許第4275149号に記述されるような離散粒子の不連続固体支持体も含む。かかる材料は、水不溶性であり、架橋されたデキストラン（例えば、SEPHADEX（商標）、Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, N.J.）、アガロース、直径約1 μ m～約5mmのポリスチレンビーズ、ポリ塩化ビニル、架橋されたポリアクリルアミド、シート、ストリップ又はパドルの如きナイロンセルロース又はナイロンベースのウェブを含む。

【0063】

CCL3エピトープは、アミドもしくはエステル結合を介した共有結合又は吸着の如き技術によって固体支持体に共有結合又は非共有結合されることができる。CCL3タンパク質が固体支持体に付着された後、固体支持体は、支持体表面へのタンパク質の非特異的吸着を低減させるためにブロッカー（例えば動物タンパク質）で後被覆されることができる。

10

【0064】

抗体を含有する生物学的サンプルは、粗サンプル又は免疫グロブリン精製されたサンプル（例えば、硫酸アンモニウムで沈殿された画分及び/又はクロマトグラフィーで単離された画分）であることができる。

【0065】

固体支持体は、抗体（もし存在するならば）が抗原によって捕獲されるように生物学的サンプルにさらされる。典型的には、固体支持体上の抗原は、自己抗体の全量が結合できるように過剰に存在するであろう。次に、血清サンプルから固体支持体を取り出すことによって、捕獲された自己抗体は、非特異的に結合したサンプル成分から取り除かれることができる。

20

【0066】

免疫複合体の検出は、スタフィロコッカスのプロテインAの如き標識化された抗体結合分子を添加することによって行われることができる。検出可能な標識は、検出可能な信号を直接的に又は間接的に生成することができるいかなる標識であることもできる。例えば、検出可能な標識は、放射性同位元素、蛍光又は化学発光化合物、又はタグ（上述されたものであって、標識化された抗体が結合できるようなもの）であることができる。

30

【0067】

従って、標識は、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、グルコースオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなどの酵素であることができる。酵素の選択は、生物学的サンプルの起源にかなり依存するであろう。例えば、血液細胞中には高レベルのペルオキシダーゼが存在し、これは非特異的な信号を生じうる。しかし、ブロッキング処理（例えば、ペルオキシダーゼについてはメタノール中の0.3% H₂O₂溶液での）を使用することができる。

【0068】

主要な指標群がHRP又はグルコースオキシダーゼの如き酵素である場合、免疫複合体が形成されたことを示すためには追加の試薬が必要である。HRPのためのかかる追加の試薬は、過酸化水素及びジアミノベンジ딘の如き酸化染色前駆体である。グルコースオキシダーゼのための追加の有用な試薬は、2,2-アジノ-ジ-(3-エチル-ベンズチアゾリン-G-スルホン酸)（ABTS）である。

40

【0069】

放射性標識も本発明に従って使用されることができる。例示的な放射性標識試薬は、¹²⁵Iの如き線を放出する放射性元素である。タンパク質標識化の方法は、当該技術分野で周知であり、Galfré et al., Meth. Enzymol., 73: 3-46 (1981)によって詳述されている。活性化された官能基を通してタンパク質をコンジュゲート化又は結合する技術も利用可能である。例えば、Aurameas et al., Scand. J. Immunol., 8(7): 7-23 (1978); Rod

50

well et al., *Biotech.*, 3: 889 - 894 (1984); 及び米国特許第4493795号を参照されたい。上述の手順によって標識化されたペプチドは、本発明によって上述のように意図される生体内検出のためにも使用されることができる。

【0070】

抗CCL3抗体は、競合的結合アッセイ、直接的及び間接的サンドウィッチアッセイ、及び免疫沈降アッセイの如きいかなる公知のアッセイ方法によっても検出されることができる [Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147 - 158 (CRC Press, Inc., 1987)]。

10

【0071】

特に好ましいのは、上述されそして米国特許第3791932号、第3839153号、第3850752号、第3879262号、及び第4034074号に詳述されている感受性酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) 方法である。かかるELISAアッセイは、自己抗体の極めて低力価の測定を与えることができる。

【0072】

別の典型的な実施態様は、上述のようにして調製された固体支持体を使用して行われる放射性免疫アッセイ (RIA) を含む。固体支持体は、固定された抗原への結合について競合することができる放射性標識された自己抗体の存在下で生物学的サンプルにさらされる。このようにして、固体相に結合された放射性標識の量は、生物学的サンプル中に最初に存在する自己抗体の量に反比例するであろう。固体支持体の分離後、非特異的に結合した放射性標識は洗浄によって除去され、固体支持体に結合した放射性標識の量が決定される。結合した放射性標識の量は、サンプル中に最初に存在する自己抗体の量に関連されることができる。

20

【0073】

以下の実施例の欄の実施例2に示されるように、抗CCL3自己抗体は、前糖尿病の対象の血清中に存在することが見出されている。CCL3に対する自己抗体の存在は、前糖尿病患者の血清中に存在する他の自己抗原に対する自己抗体の量と重複することが見出されている。従って、本発明は、診断精度を改良するために、本発明の教示と組合せて、抗CCL3抗体 (例えば、GAD, ICA及びインスリンに対する自己抗体の少なくとも一つ) の存在又はレベルを決定することも意図する。

30

【0074】

従って、一実施態様によれば、上述の抗CCL3の存在又はレベルを決定することは、T1DM疾患状態に対して特異的な自己抗体の存在又はレベルを決定することをさらに含む。特に、別の実施態様によれば、検出は、グルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD)、小島細胞抗原 (ICA) 512 / IA-2、及びインスリンからなる群から選択される抗原に対して特異的である自己抗体に対するものであることができる。

【0075】

従って、本発明の別の実施態様によれば、抗CCL3抗体の存在及び/又はレベルを決定することは、T1DM糖尿病状態に対して特異的な自己抗体の顕在化に先立って行われる。

40

【0076】

好ましくは、ICAは、ヒト血液群Oドナー膵臓の凍結切片を使用した間接的免疫蛍光によって測定される [Vandewalle CL et al *Diabetologia* 36: 1155 - 1162, (1993) に記述されるようにして]。抗インスリンIAA, GADA及びIA-2Aは、トレーサーとしてそれぞれ¹²⁵I標識化インスリン、³⁵S標識化GAD65、及び³⁵S標識化IA-2細胞内ドメイン (IA-2 ic) を使用した液相放射性結合アッセイによって決定される [Decochez K, et al., *Diabetes Care* 23: 838 - 844, (2000)]。

【0077】

50

T1DM糖尿病状態に対して特異的な他の自己抗体は抗CCl3と共に検出されることが理解されるであろう。これらは、以下の表に最も一般的に使用される自己抗体と共に掲載されるエピトープに対する自己抗体を含むが、これらに限定されない。患者の血清中のこれらの自己抗体を検出するために好適な他の自己抗体及び方法及び組成物は、以下の表1及びDevendra et al., Brit Med J 328(7442):750-754(2004)に詳述されている。

【0078】

表 1

	感度	コメント	参考文献
インスリン	49-92 %	幼い子供で高レベル	Palmer, J. P. et al (1983) Science 222:1337-1339
GAD (グルタミン酸 デカルボキシラーゼ)	70-80 %	高感度 成人発症 1 A 型	Clive et al., Autoimmunity reviews, 5:424-428, 2006; WO 92/04632
GAD 38	17 %	前糖尿病対象、抗GAD 陰性対象に存在	米国特許第 6960448 号
ICA512/IA-2	74 %	チロシンホスファターゼ 様分子	Rabin et al., Diabetes, Feb;41(2):183-6 (1992).
IA-2 β /ホグリン	61 %	チロシンホスファターゼ 様分子	Doi et al., PNAS 24; 103(4): 885-890 (2006)
eカルボキシペプチダーゼH	10 %	まれ	Castano, L. et al. J. Clin. Endocr. Metab. 73:1197- 1201(1991)
GLIMA38 (グリコ小島 細胞膜関連)	14-38 %	低診断感度	Winnock et al., Diabetes Care, 24(7):1181-6(2001)
GM2-1	?	ガングリオシド糖脂質	Dotta, F., et al. (1992) Endocrinology 130:37-42
GT3	?	糖脂質	Gillard, B. K., et al. (1989) Journal Immunol. Methods 142:3826-3832
PM-1 (69 kD ICA タンパク質)	?		米国特許第 6930181 号
ICA69	?	低感度のウエスタンブロッ ットアッセイ	Gaedigk R, et al., Genomics 1996;38:382-391
ICA12 / SOX13	<20 %	糖尿病関連。T 2 DM から T 1 DM を有用に区別 しない。	Park Y, et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 1005: 253-258 (2003); Bruce, S et al., Diab 20(3)198 (2003)

10

20

30

40

50

【 0 0 7 9 】

本発明の方法は、必要性のある対象における抗糖尿病治療を監視するために使用されることができる。

【 0 0 8 0 】

これは、対象を抗糖尿病治療にさらすこと；そして対象の生物学的サンプル中の抗 C C

L3抗体の存在及び/又はレベルを(上述のようにして)決定することによって行われることができ、抗糖尿病治療の後の前記生物学的サンプル中の抗CCL3抗体のレベルの変化は治療効力の指標である。

【0081】

抗CCL3抗体を決定することは、治療の影響を評価するために抗糖尿病治療の後に、及び抗糖尿病治療に先立って行われることができる。

【0082】

本発明のこの側面に従って使用されることができる抗糖尿病治療の例は、以下のものを含むがこれらに限定されない:注射(例えば注射器又は高空気圧ジェット注射器を使用したもの)、点滴、吸入(例えばBellary and Brnett, *Diab Vase Dis Res. Dec*; 3(3): 179-85, 2006によるような、又はDiabetes Forecast(58(1): RG16, RGl 9-22, RG24-6, 2005に記載されるような外部インスリンポンプによるもの)によるようなインスリン投与。インスリン投与のための他の経路は、例えば消化抵抗性の丸薬、皮膚パッチ、鼻腔内又は口腔内スプレー(Lassmann - Vague and Racc ah, *Diabetes Metab.* 32: 513-22, (2006)にさらに記載されるようなもの)を含む。追加的に、ある場合には、T2DMを治療するために与えられるピグアニド(例えばメトホルミン)がT1DMを治療するのに有用である。

【0083】

重篤な症例(例えば、腎不全又はインスリンに対する無反応)では、T1DM対象は膵臓移植によって治療される。移植は、器官生存率を増大させるために腎臓移植と同時に行われることができる。代替的に、対象の具体的な状態及び外科医の推奨に従って移植は、腎臓移植の後に、又は膵臓移植だけが行われることができる[Morris et al., *S D J Med.* 57(7): 269-72, (2004)にさらに記載される]。他の代替的な移植戦略は、器官全体ではなく小島細胞の移植(Bertuzzi et al., *Curr MoI Med. Jun*; 6(4): 369-74, 2006)、又は培養された膵臓/細胞の移植(Vinik et al., *Med Gen Med.* 6: 12, 2004にさらに記載される)であることができる。

【0084】

糖尿病を治療するための他の非慣習的な療法は、鍼、生物学的フィードバック、及びクロム、ヤクヨウニンジン、マグネシウム及びバナジウムの投与を含むが、これらに限定されない。

【0085】

追加的に、及び上述の治療と共に、T1DMは、砂糖摂取を釣り合わせるための食事の変化及びグルコースレベルを制御するための運動の変化によって治療されることができる。これは、血液グルコースレベルの監視と共に、T1DMの効果を低下させるのに役立つ。

【0086】

上述の試薬のいずれもキットに含まれることができる。

【0087】

従って、本発明の別の側面によれば、T1DMを診断するためのキットであって、包装材料、及び対象の生物学的サンプル中の抗CCL3抗体を決定するための少なくとも一つの試薬を含むことを特徴とするキットが提供される。

【0088】

従って、例えば、抗体及び/又は化学薬品は、好適な緩衝液及び保存剤と共に一つ以上の容器に包装され、診断のために使用されることができる。

【0089】

好ましくは、容器はラベルを含む。好適な容器は、例えば瓶、バイアル、注射器及び試験管を含む。容器は、ガラスやプラスチックの如き様々な材料から形成されることができる。

10

20

30

40

50

【0090】

追加的に、安定化剤、緩衝液、ブロッカーなどの他の添加剤も添加されることができる。

【0091】

キットは、テストされる対象が、T1DMに罹患しているか又はT1DMの危険があるかどうかを決定するための説明も含む。

【0092】

従って、例えば血液をスクリーニングするためのキットは、以下の成分を好ましくは別個の容器中に含むことができる：

- (a) CCL3エピトープペプチドで被覆された固体支持体；
- (b) 血清又は血漿サンプルのための希釈剤、例えば正常なヤギ血清又は血漿；
- (c) 標識化された抗(ヒトIgG)抗体、例えば約1%ヤギ血清又は血漿を含む、緩衝化された水溶液中のヤギ抗(ヒトIgG)抗体；
- (d) 陽性コントロール、例えばCCL3タンパク質に対する抗体を含む血清；及び/又は
- (e) 陰性コントロール、例えばCCL3タンパク質に対する抗体を含まない血清。

10

【0093】

もし標識が酵素であるなら、キットの追加成分は酵素のための基質であることができる。

【0094】

本明細書で使用されるように、用語「約」は±10%に言及する。

20

【0095】

本発明のさらなる目的、利点および新規な特徴が、限定であることが意図されない下記の実施例を検討したとき、当業者には明らかになる。加えて、本明細書中上記に描かれるような、また、下記の請求項の節において特許請求されるような本発明の様々な実施形態および態様のそれぞれは、実験的裏付けが下記の実施例において見出される。

【実施例】

【0096】

次に下記の実施例が参照されるが、下記の実施例は、上記の説明と一緒に、本発明を非限定様式で例示する。

30

【0097】

本願で使用される用語と、本発明で利用される実験方法には、分子生化学、微生物学および組み換えDNAの技法が広く含まれている。これらの技法は文献に詳細に説明されている。例えば以下の諸文献を参照されたい：「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」Sambrook他(1989)；Ausubel, R.M. 編「Current Protocols in Molecular Biology」I~III巻(1994)、Ausubel他著；「Current Protocols in Molecular Biology」John Wiley and Sons, 米国メリーランド州バルチモア(1989)；Perbal著「A Practical Guide to Molecular Cloning」John Wiley & Sons, 米国ニューヨーク(1988)；Watson他、「Recombinant DNA」Scientific American Books, 米国ニューヨーク；Birren他編「Genome Analysis: A Laboratory Manual Series」1~4巻、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 米国ニューヨーク(1998)；米国特許の4666828号、4683202号、4801531号、5192659号および5272057号に記載される方法；Cellis, J.E. 編「Cell Biology: A Laboratory Handbook」I~III巻(1994)；Coligan, J.E. 編「Current Protocols in Immunology」I~III巻(1994)；Stites他編「Basic and C

40

50

linical Immunology」(第8版)、Appleton & Lange、米国コネティカット州ノーウォーク(1994); MishellとShiigi編「Selected Methods in Cellular Immunology」、W. H. Freeman and Co.、米国ニューヨーク(1980); また利用可能な免疫検定法は、例えば以下の特許と科学文献に広範囲にわたって記載されている: 米国特許の3791932号、3839153号、3850752号、3850578号、3853987号、3867517号、3879262号、3901654号、3935074号、3984533号、3996345号、4034074号、4098876号、4879219号、5011771号および5281521号; Gait, M. J. 編「Oligonucleotide Synthesis」(1984); Hames, B. D. およびHiggins S. J. 編「Nucleic Acid Hybridization」(1985); Hames, B. D. およびHiggins S. J. 編「Transcription and Translation」(1984); Freshney, R. I. 編「Animal Cell Culture」(1986); 「Immobilized Cells and Enzymes」IRL Press(1986); 「A Practical Guide to Molecular Cloning」Perbal, B. 著(1984)および「Methods in Enzymology」1~317巻、Academic Press; 「PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications」、Academic Press、米国カリフォルニア州サンディエゴ(1990); Marshak他、「Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual」、CSHL Press、(1996); なおこれらの文献類は、あたかも本願に完全に記載されているように援用するものである。その外の一般的な文献は、本明細書を通じて提供される。それらの文献に記載の方法は当業技術界で周知であると考えられ、読者の便宜のために提供される。それらの文献に含まれるすべての情報は本願に援用するものである。

【0098】

実施例1

診断直後のT1DM対象の血清における抗CCL3自己抗体の検出

自己抗体力価は、初期に診断されたT1DMを有する対象における炎症性媒介因子について決定された。CCL3に対する高い自己抗体力価が示された。

【0099】

材料及び実験手順

実験計画 - 自己抗体応答は、T1DMと診断された10人の対象で決定された(I型糖尿病センター、Rambam, Haifa、イスラエル)。特に、以下のケモカインに対する自己抗体が分析された: CCL2(MCP-1), CCL3(MIP-1)及びCCL4(MIP-1)。これらのケモカインは、マウスの実験モデルでT1DM中に炎症した膵臓で発現されることが見出された[Cameron MJ et al., J Immunol 165:1102(2000)]。追加的に、ヒトでもつばら発現されるケモカインであって炎症性自己免疫疾患と関連している可能性があるケモカインであるケモカインIL-8(CXCL8)に対する自己抗体[Palacios, I et al., Clin Exp Immunol 111:588(1998)]が分析された。炎症性自己免疫疾患と関連している可能性がある追加の媒介因子の自己抗体力価は、同様に試験された: ケモカインRANTES(CCL5), MIG(CXCL9), ITAC(CXCL11)及びIP-10(CXCL10); 炎症性サイトカインIL-15及びIL-1及びTNFファミリーメンバーCD40L, FASL及びTRAIL。

【0100】

自己抗体の検出 - ELISAプレート(NUNC, Rofkilbe、デンマーク)は、10ng/ウェルのヒトCCL3(R & D, Minneapolis、米国)で被

覆され、200 μ l の1% BSA / PBS ブロッキング緩衝液で室温で1時間インキュベートされた。血清サンプルは、上述のブロッキング緩衝液での連続した ($\times 2$) 希釈に供され、ELISA プレートに添加され (100 μ l / ウェル)、一晚インキュベートされ、PBS / Tween 20 (0.05%) で4回洗浄された。その後、50 μ l のヤギ抗 h Ig G - HRP (Jackson, Pennsylvania、米国) が1% BSA / PBS に (製造者のプロトコールに従って) 1時間添加され、PBS / Tween 20 (0.05%) で4回洗浄された。次に、基質溶液 (TMB, DAKO, CA、米国) がウェルあたり50 μ l 添加された。反応は、50 μ l の H_2SO_4 (1M) を添加することによって、青色の出現で停止された。ODは630 nm にセットされた参照フィルターを使用して450 nm で決定された。

10

【0101】

結果

初期に診断された T1DM 対象では、高い自己抗体力価が CCL3 に対して見出された - 図1に示されるように、診断直後 (診断から1週間以内) に、10人の初期に診断された T1DM 対象のうち9人が CCL3 に対する選択的な自己抗体応答を発展させたが、他の炎症性媒介因子のいずれに対しても自己抗体応答は見出されなかった。コントロールの対象は、CCL3 を含むいずれの媒介因子に対しても顕著な抗体力価を発展させなかった。

【0102】

実施例 2

延長された及び初期に診断された T1DM 対象における陽性 CCL3 自己抗体応答の検出

20

【0103】

材料及び実験手順

実験計画 - 血液サンプル中の抗 CCL3 自己抗体の存在は、四つの異なる群で決定された: 新たに診断された T1DM 対象 (診断から1週間以内; $n = 30$); 延長された T1DM (診断から5年以上; $n = 38$); 健康な対象 (コントロール; $n = 20$); 及び前糖尿病対象 (陽性自己抗体を有する T1DM 対象の一親等; $n = 20$)。すべての患者について、I型糖尿病関連自己抗体; 抗インスリン (CIAA), ICA 及び GAD に対する力価も決定された。

30

【0104】

自己抗体の検出 - 自己抗体の検出は、実施例1で記述された方法と同様の方法で行われた。

【0105】

結果

初期に診断された及び延長された前糖尿病対象における CCL3 に対する自己抗体応答 - 図2に示されるように、T1DM であると診断された直後の対象の90% (27 / 30) は、CCL3 に対する陽性の自己免疫応答を有することが見出された。高い割合の陽性免疫応答は、前糖尿病対象及び延長された T1DM 対象でも同様に証明され、そこではそれぞれ 19 / 20 (95%) 及び 27 / 38 (71%) が自己抗体応答を提示した。図2において見られるように、CCL3 に対する陽性自己抗体力価は、もっぱら T1DM 対象についてのものであり、健康なコントロールの 1 / 20 (5%) のみがこの抗体について陽性であった。

40

【0106】

他の T1DM 関連自己抗体と比較した CCL3 に対する自己抗体応答 - T1DM を決定するための従来の診断ツールと比較すると、結果は、図3に表されるように、CCL3 自己抗体は90%の対象 (27 / 30) で陽性であったが、他の I型糖尿病関連自己抗体; 抗インスリン (CIAA)、抗 GAD 及び ICA 抗体は、それぞれ対象の70%、60% 及び 63% で陽性であった (三つの糖尿病関連自己抗体の少なくとも一つが検出された30人の対象のうち28人)。従って、CCL3 に対する自己抗体は、従来のツールより

50

ずっと高感度で三つの従来ツールを一緒にしたより高感度の単一の診断ツールである。

【0107】

総合的に、本結果は、CCL3に対する陽性自己抗体力価は、現在使用されている三つの従来あまり感度が高くない診断ツールを置換することができる単一の高感度バイオマーカーであることを実証する。CCL3に対する抗体力価は、糖尿病の診断の数年後でも陽性でありつづける。このことは、本発明で見出されたマーカーが、(LADAを含む)成人I型糖尿病とII型糖尿病とを区別する、長年必要とされてきた目的のための新規かつ効果的な診断ツールであることをさらに実証する。

【0108】

明確にするため別個の実施態様で説明されている本発明の特定の特徴は単一の実施態様に組み合わせて提供することもできることは分かるであろう。逆に、簡潔にするため単一の実施態様で説明されている本発明の各種の特徴は別個にまたは適切なサブコンビネーションで提供することもできる。

10

【0109】

本発明はその特定の実施態様によって説明してきたが、多くの別法、変更および変形があることは当業者には明らかであることは明白である。従って、本発明は、本願の請求項の精神と広い範囲の中に入るこのような別法、変更および変形すべてを包含するものである。本願で挙げた刊行物、特許、特許願およびGenBankアクセション番号はすべて、個々の刊行物、特許、特許願またはGenBankアクセション番号が各々あたかも具体的にかつ個々に引用提示されているのと同程度に、全体を本明細書に援用するものである。さらに、本願で引用または確認したことは本発明の先行技術として利用できるという自白とみなすべきではない。

20

【図面の簡単な説明】

【0110】

【図1】(診断の一週間以内に)T1DMであると新たに診断された10人の対象における自己抗体力価を示す棒グラフである。

【図2】新しく発症した糖尿病を有する対象(n=30)、前糖尿病対象(n=20)、延長されたT1DM(n=38)及び正常なコントロール(n=20)における陽性CCL3自己抗体力価を示す対象の割合を表す棒グラフである。

【図3】新しく発症した糖尿病を有する30人の対象における、T1DM関連自己抗体:抗インスリン(CIAA)、抗ICA、抗GAD、三つの診断マーカーすべてと抗CCL3の組合せについての陽性自己抗体力価を示す対象の割合を表す棒グラフである。

30

【 図 1 】

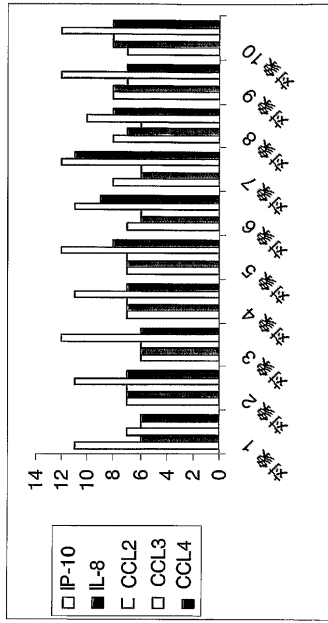


Fig. 1

【 図 2 】

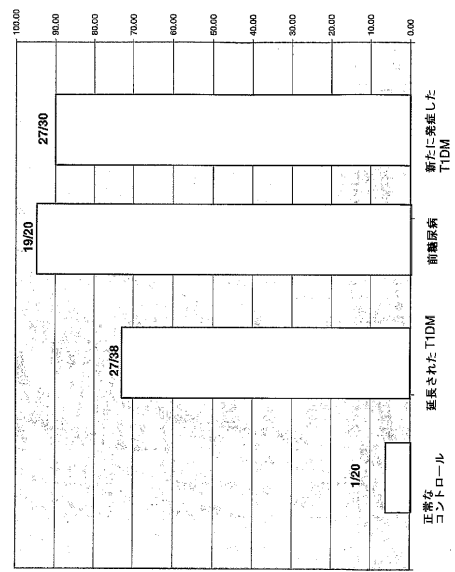


Fig.2

【 図 3 】

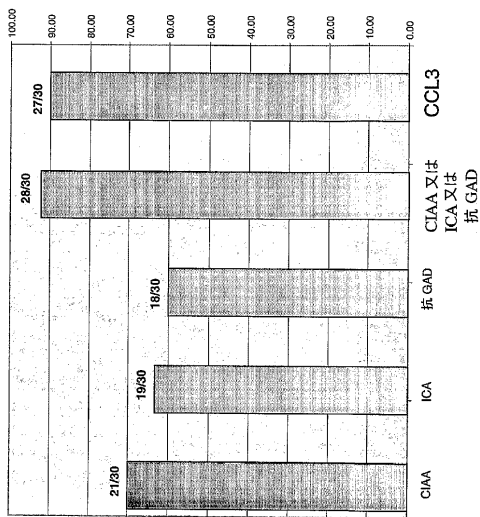


Fig.3

【手続補正書】

【提出日】平成20年10月7日(2008.10.7)

【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】

必要性のある対象におけるI型糖尿病(T1DM)を診断する方法であって、前記方法は、対象の生物学的サンプル中の抗CC L3抗体の存在及び/又はレベルを生体外で決定することを含み、予め決定された閾値より上の前記存在又はレベルはT1DMの指標であり、それにより対象におけるT1DMを診断することを特徴とする方法。

【請求項2】

T1DMを診断するためのキットであって、包装材料、及び対象の生物学的サンプル中の抗CC L3抗体を決定するための少なくとも一つの試薬を含むことを特徴とするキット。

【請求項3】

対象の生物学的サンプル中の抗CC L3抗体の存在及び/又はレベルを決定するための少なくとも一つの試薬、及び抗糖尿病治療を含む、T1DMを監視するためのキット。

【請求項4】

前記抗糖尿病治療が、インスリン、グルカゴン、グルコース、ピグアニド、クロム、ヤクヨウニンジン、マグネシウム及びパナジウムからなる群から選択される医薬を含むことを特徴とする、請求項3に記載のキット。

【請求項5】

前記抗糖尿病治療が、膵臓移植、小島細胞移植及び生活様式の管理からなる群から選択されることを特徴とする、請求項3に記載のキット。

【請求項6】

T1DMが、成人における潜在的自己免疫糖尿病(LADA)を含むことを特徴とする、請求項1, 2又は3のいずれかに記載の方法又はキット。

【請求項7】

前記抗CC L3抗体の存在及び/又はレベルを決定することが、T1DM糖尿病状態に対して特異的な自己抗体の顕在化に先立って行われることを特徴とする、請求項1, 2又は3のいずれかに記載の方法又はキット。

【請求項8】

T1DM糖尿病状態に対して特異的な自己抗体の存在又はレベルを決定することをさらに含むことを特徴とする、請求項1又は3に記載の方法又はキット。

【請求項9】

T1DM糖尿病状態に対して特異的な自己抗体の存在又はレベルを決定するための少なくとも一つの試薬をさらに含むことを特徴とする、請求項2又は3に記載のキット。

【請求項10】

前記T1DM糖尿病状態に対して特異的な自己抗体が、グルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)、小島細胞抗原(IC A)512/IA-2、及びインスリンからなる群から選択される抗原に対して特異的であることを特徴とする、請求項7, 8又は9のいずれかに記載の方法又はキット。

【請求項11】

前記閾値が、 $\log_2 Ab$ 10~15の抗CC L3力価を含むことを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項12】

$\log_2 Ab$ 10~15の抗CC L3力価はT1DMの指標であるという説明をさら

に含むことを特徴とする、請求項 2 に記載のキット。

【請求項 1 3】

前記決定することが E L I S A によって行われることを特徴とする、請求項 1 , 2 又は 3 のいずれかに記載の方法又はキット。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IL2007/000156

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68		
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) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ANONYMOUS: "Recombinant Human CCL3/MIP-1?" INTERNET ARTICLE, [Online] 4 May 2005 (2005-05-04), XP002433423 Retrieved from the Internet: URL: http://www.rndsystems.com/pdf/270-1d_cf.pdf	2
Y	the whole document	15
Y	US 5 407 802 A (EISENBARTH GEORGE S [US] ET AL) 18 April 1995 (1995-04-18)	15
A	column 4, line 60 - line 62	1-14
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority 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 *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 *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. *G* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 31 May 2007		Date of mailing of the international search report 20/06/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Lindberg, Pia

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IL2007/000156

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>CAMERON M J ET AL: "Differential expression of CC chemokines and the CCR5 receptor in the pancreas is associated with progression to type I diabetes" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, vol. 165, no. 2, 15 July 2000 (2000-07-15), pages 1102-1110, XP002278898 ISSN: 0022-1767 *the whole document, especially page 1103, right-hand side, line 73 - page 1106, right-hand side, line 13*</p>	1-15
A	<p>HANIFI-MOGHADDAM, P., ET AL: "Altered chemokine levels in individuals at risk of Type 1 diabetes mellitus" DIABETIC MEDICINE, vol. 23, 2006, pages 156-163, XP002433424 *abstract, page 160, left-hand column, line 1 - page 161, right-hand column, line 53*</p>	1-15
A	<p>LOHMANN T ET AL: "Reduced expression of Th1-associated chemokine receptors on peripheral blood lymphocytes at diagnosis of type 1 diabetes" DIABETES, NEW YORK, NY, US, vol. 51, no. 8, August 2002 (2002-08), pages 2474-2480, XP002278899 ISSN: 0012-1797 abstract</p>	1-15
A	<p>VERGE, CF., ET AL: "Prediction of type 1 diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies" DIABETES, vol. 45, no. 7, 1996, pages 926-933, XP009083722 abstract</p>	1-15
A	<p>GOTTLIEB P A ET AL: "DIAGNOSIS AND TREATMENT OF PRE INSULIN DEPENDENT DIABETES" ANNUAL REVIEW OF MEDICINE : SELECTED TOPICS IN THE CLINICAL SCIENCES, ANNUAL REVIEWS INC., PALO ALTO, CA, US, vol. 49, February 1998 (1998-02), pages 391-405, XP009083521 ISSN: 0066-4219 page 394, line 28 - page 397, line 32</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IL2007/000156

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>HANIFI-MOGHADDAM, P., ET AL: "An Association of Autoantibody Status and serum Cytokine Levels in Type 1 Diabetes" DIABETES, vol. 52, May 2003 (2003-05), pages 1137-1142, XP002433426 *abstract, page 1137, right-hand column - page 1138, left-hand column* abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/IL2007/000156**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 3-10, 12 and 15 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IL2007/000156

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5407802	A	NONE	

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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, LV, LY, MA, MD, 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, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100120927

弁理士 浅野 典子

(72)発明者 カリン, ナサン

イスラエル, 34677 ハイファ, キャスパリ ストリート 9

(72)発明者 シェハデー, ナイム

イスラエル, 24908 クファー - ヤッシフ, ピー . オー . ボックス 175

(72)発明者 ウィルドバーム, ギジ

イスラエル, 29036 キリヤト ヤム, マイロン ストリート 3

专利名称(译)	用于诊断T1DM的方法和试剂盒		
公开(公告)号	JP2009526219A	公开(公告)日	2009-07-16
申请号	JP2008553886	申请日	2007-02-06
[标]申请(专利权)人(译)	拉姆巴姆医学中心研究基金		
申请(专利权)人(译)	拉帕波特研究所的家庭研究在医学科学 Ramubamu医学中心研究基金		
[标]发明人	カリンナサン シェハデーナウム ウィルドバームギジ		
发明人	カリン, ナサン シェハデー, ナウム ウィルドバーム, ギジ		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/564 G01N2800/042		
FI分类号	G01N33/53.N		
代理人(译)	Kazehaya信明 浅野纪子		
优先权	60/765220 2006-02-06 US		
其他公开文献	JP2009526219A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

它们提供一种诊断有需要的受试者的I型糖尿病 (T1DM) 的方法。它所述方法包括确定所述受试者的生物样品中抗CCL3抗体的存在和/或水平, 存在或水平超过预定阈值是指示T1DM, 从而定位诊断T1DM英寸此外, 还提供了用于监测试剂盒和抗糖尿病治疗T1DM的诊断方法。技术领域

	感度	コメント	参考文献
インスリン	49-92 %	幼い子供で高レベル	Palmer, J. P. et al. (1983) Science 222:1337-1339
GAD (グルタミン酸 デカルボキシラーゼ)	70-80 %	高感度 成人発症 1 A型	Clive et al., Autoimmunity reviews, 5:424-428, 2006; WO 92/04632
GAD 38	17 %	前糖尿病対象、抗GAD 陰性対象に存在	米国特許第 6960448 号
ICA512/IA-2	74 %	チロシンホスファターゼ 様分子	Rabin et al., Diabetes, Feb;41(2):183-6 (1992).
IA-2β/ホグリン	61 %	チロシンホスファターゼ 様分子	Doi et al., PNAS 24; 103(4): 885-890 (2006)
eカルボキシペプチダーゼH	10 %	まれ	Castano, L. et al. J. Clin. Endocr. Metab. 73:1197- 1201(1991)
GLIM(A38 (グリコ小島 細胞膜関連)	14-38 %	低診断感度	Winnock et al., Diabetes Care, 24(7):1181-6(2001)
GM2-1	?	カングリオシド糖脂質	Dotta, F., et al. (1992) Endocrinology 130:37-42
GF3	?	糖脂質	Gillard, B. K., et al. (1989) Journal Immunol. Methods 142:3826-3832
PM-1 (69 kD ICA タンパク質)	?		米国特許第 6930181 号
ICA69	?	低感度のウエスタンブロッ ットアッセイ	Gnedig R, et al., Genomics 1996;38:382-391
ICA12 / SOX13	<20 %	糖尿病関連、T1DMから T2DMを有用に区別 しない。	Park Y, et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 1005:253-258 (2003); Bruce, S et al., Diab 20(3)198 (2003)