

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-48265
(P2016-48265A)

(43) 公開日 平成28年4月7日(2016.4.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/564 (2006.01)	GO 1 N 33/564 Z	4 B 0 6 3
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 37/00 1 0 2	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 37/00 1 0 1	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 1	
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	

審査請求 有 請求項の数 20 O L (全 63 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-253808 (P2015-253808)
 (22) 出願日 平成27年12月25日 (2015.12.25)
 (62) 分割の表示 特願2013-504084 (P2013-504084)
 の分割
 原出願日 平成23年4月13日 (2011.4.13)
 (31) 優先権主張番号 61/342, 363
 (32) 優先日 平成22年4月13日 (2010.4.13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 512264828
 エムーラブ・アクチェンゲゼルシャフト
 M-LAB AG
 スイス、8006 チューリッヒ、プフル
 ークシュトラーセ、1、ミヒェル・ポーラ
 方
 (74) 代理人 110001195
 特許業務法人深見特許事務所
 (72) 発明者 グルース、フランツ
 ドイツ、48691 プレーデン、ツア・
 ヒューネンブルク、2
 (72) 発明者 ベーム、ニルス
 ドイツ、55218 インゲルハイム、ク
 ルプファルツシュトラーセ、22

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 緑内障の診断方法

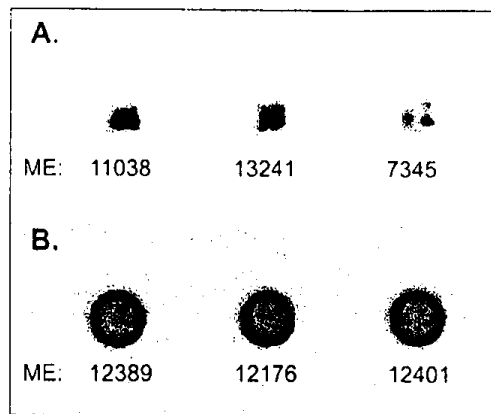
(57) 【要約】

【課題】 体液の分析によって眼内圧の上昇とは独立して緑内障を検出する、代替的かつ向上され、かつ信頼できる診断方法を提供すること。

【解決手段】 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つのサンプルに対する、体液における自己免疫反応性の分析に基づく緑内障の第1の診断方法であって、個々の抗原に対する当該自己免疫反応性は、診断結果を決定するよう、測定され、緑内障スコアに変換される方法。

【選択図】 図1

Figure 1:



【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。

【請求項 2】

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る、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

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、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

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 つに割り当てられる、請求項 3 に記載の緑内障の診断方法。

【請求項 5】

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 3 または 4 に記載の緑内障の診断方法。

【請求項 6】

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 - IV、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 (BDNF)、カルレチキュリン、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 (GFAP)、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 HSP 10 (= シャペロニン)、HSP 27、HSP 60、HSP 70、インスリン、j o - 1、リゾチーム、ミエリン結合タンパク質 (MBP)、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、ニューロン特異エノラーゼ (NSE)、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 (VEGF)、ピメンチンといった 48 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 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の緑内障の診断方法。

【請求項 7】

前記眼の抗原サンプルの少なくとも 1 つのサンプルは、

10

20

30

40

50

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 (GFAP)、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ、HSP 27、HSP 60、HSP 70、j o - 1、ミエリン結合タンパク質 (MBP)、ニューロン特異エノラーゼ (NSE)、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 (VEGF)、ビメンチンといった 24 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、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の緑内障の診断方法。

【請求項 8】

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 - IV、 - 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 HSP 10 (= 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 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の緑内障の診断方法。

【請求項 9】

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、 - 2 - アドレナリン受容体、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 HSP 10 (= 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、 - 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 36 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 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の緑内障の診断方法。

【請求項 10】

前記眼の抗原サンプルの少なくとも 1 つのサンプルは、10 個未満の眼の抗原を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記部分的に精製された眼の抗原サンプルの少なくとも 1 つのサンプルは、マイクロレイチップ、ラテラルフローテストストリップ、またはマイクロ流体チップである抗原担持要素の上に担持される、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記体液は、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 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記体液は涙である、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 13 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 15】

前記少なくとも 1 つの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、群 1 から選択される抗原を含む、請求項 14 に記載の抗原担持要素。

【請求項 16】

10

20

30

40

50

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、群2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17】

前記少なくとも部分的に精製された抗原の少なくとも1つのサンプルは、群Aまたは群AおよびBから選択される抗原を含む、請求項14または15に記載の抗原担持要素。

【請求項18】

重み付けされた量の個々の抗原が前記抗原担持要素上に存在する、請求項14～17のいずれか1項に記載の抗原担持要素。

【請求項19】

抗原ゾーンと、体液のための受取ゾーンとを含む、請求項14～18のいずれか1項に記載の抗原担持要素。

【請求項20】

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む、請求項19に記載の抗原担持要素。

【請求項21】

前記受取ゾーンは、患者に直接的に接触するように設計される、請求項19または20に記載の抗原担持要素。

【請求項22】

請求項1～13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14～21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23】

涙の収集のための吸収紙のような体液を収集する補助剤、ならびに/または診断結果を計算および/もしくは提示するソフトウェアコンポーネント、ならびに/または前記体液における自己抗体が抗原担持要素上に存在する抗原の選択されたものと反応する際に前記体液サンプルを処理するための、もしくは添加される反応物をさらに含む、請求項22に記載の緑内障の診断のためのキット。

【請求項24】

測定された前記体液は、抗原担持要素の受取ゾーンに収集され、前記体液は、その自己免疫反応性の分析のために前記抗原担持要素上の抗原担持ゾーンへと移送されるか、または前記体液は吸着材料から前記抗原担持要素へ直接的に流れるまたは拡散する、請求項1～13のいずれか1項に記載の緑内障の診断方法。

【請求項25】

請求項1～13または24のいずれか1項に記載の緑内障の診断方法での使用のために、請求項13～20に記載の抗原担持要素のいずれかに体液を適用するために、または請求項21または22に記載のキットとの使用のために、生体から体液サンプルを収集する方法。

【請求項26】

緑内障を初期段階で検出するか、異なる形態の緑内障を特定するか、または病気の進行もしくは医療処置の効果を監視する迅速な試験のための、請求項1～13もしくは24のいずれか1項に記載の緑内障の診断方法の使用、請求項14～21のいずれか1項に記載の抗原担持要素の使用、または請求項22もしくは23に記載のキットの使用。

【請求項27】

緑内障の監視のための、請求項1～13または24のいずれか1項に記載の緑内障の診断方法におけるか、請求項14～21のいずれか1項に記載の抗原担持基材上におけるか、請求項22もしくは23に記載のキットにおける以下の群1の眼の抗原のいずれかの使用、または当該眼の抗原の1つ以上の任意の組合せのいずれかの使用。

【請求項28】

緑内障の診断方法における使用、または緑内障の診断方法における使用のための抗原担持要素上における使用のための、群2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、または群2の抗原の眼の抗原のいずれかに特異である抗体のいずれか。

10

20

30

40

50

【請求項 29】

治療処置での使用のための、群 2 の以下の眼の抗原、当該眼の抗原の 1 つ以上の任意の組み合わせ、または群 2 の抗原の眼の抗原のいずれかに特異である抗体のいずれか。

【請求項 30】

緑内障の治療処置での使用のための、群 2 の以下の眼の抗原、当該眼の抗原の 1 つ以上の任意の組み合わせ、または群 2 の抗原の眼の抗原のいずれかに特異である抗体のいずれか。

【請求項 31】

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、群 2 の以下の眼の抗原、当該眼の抗原の 1 つ以上の任意の組み合わせ、または群 2 の抗原の眼の抗原のいずれかに特異である抗体のいずれか。

10

【請求項 32】

(a) 細胞のインビトロ培養物を与えるステップと、
 (b) テスト対象の人の体液とともにそれをインキュベートすることによる当該細胞培養物の処理ステップと、
 (c) ステップ b) に従った処理の後に、前記細胞のインビトロ培養物によるタンパク質の発現を分析および/または細胞の生存度を分析するステップと、
 (d) 診断結果を決定するよう、ステップ c) における前記分析の結果を標準データと比較するステップとを含む、緑内障の診断方法。

20

【請求項 33】

前記インビトロ培養物の細胞は、不死化されたもしくは初代の網膜神経節細胞か、または網膜神経節細胞の前駆細胞である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

ステップ b) における前記処理のための前記体液は血清または涙である、請求項 32 または 33 に記載の方法。

【請求項 35】

ステップ b) における前記処理のための前記体液は、前処理または分別された、請求項 32 または 33 に記載の方法。

【請求項 36】

前記前処理または分別された体液は、自己抗体を含むか、自己抗体の選ばれたものを含むか、または抗体の特定の選ばれたものを含まない、請求項 35 に記載の方法。

30

【請求項 37】

ステップ c) に従ったタンパク質発現分析は、細胞分解と、細胞内および/または細胞外タンパク質を含む細胞タンパク質の回収と、任意でタンパク質消化および/またはタンパク質精製および/またはタンパク質分別もしくは分離を含む、請求項 32 ~ 36 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 38】

ステップ c) に従ったタンパク質発現分析は、質量分析、MALDI TOF 質量分析、SELDI TOF 質量分析、オービトラップ、または液体クロマトグラフィー質量分析によるタンパク質分析を含む、請求項 32 ~ 37 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 39】

ステップ c) は、少なくとも 1 つのバイオマーカの発現を具体的に測定するアッセイを含み、前記バイオマーカは任意で緑内障疾患、自己免疫疾患、神経変性疾患、またはアポトーシスに付随することが知られている、請求項 32 ~ 38 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 40】

前記アッセイは、少なくとも 1 つのバイオマーカに特異的な少なくとも 1 つの抗体プローブを用いる免疫学的アッセイである、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記少なくとも 1 つの抗体プローブは、アクチン、アルブミン、 1 アンチトリブ

50

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眼の抗原の 1 つに対して向けられている、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

ステップ c) に従った前記タンパク質発現分析は、ウェスタンブロット、マイクロアレイ、E L I S A (Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay)、E L I S P O T (Enzyme Linked Immuno Spot Technique) のような免疫学的アッセイを含む、請求項 3 9 ~ 4 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 3】

ステップ c) のタンパク質発現分析は、前記インビトロ細胞培養物の細胞に対してその場で行われる、請求項 3 2 ~ 4 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 4】

ステップ c) は前記細胞の生存度の分析を含み、前記分析は、フローサイトメトリー、ならびに / またはアネキシン V およびプロピジウムでの細胞の標識付け、ならびに / または水溶性テトラゾリウムテストもしくはアラマーブルーステイングを含む、請求項 3 2 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 5】

ステップ c) は、前記タンパク質発現分析の結果のデータ処理を含み、このデータ処理と、ステップ d) の標準データとの前記タンパク質発現分析の結果の比較とは、1 つの組み合わせられた計算処理において行われる、請求項 3 2 ~ 4 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 6】

ステップ d) の診断結果を決定するよう前記タンパク質発現分析の結果を標準データと比較する際、前記標準データは、ステップ b) の前記体液が緑内障患者および健康な人から得られる対照実験から得られる、請求項 3 2 ~ 4 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、医学的診断の分野に存在し、特に、自己免疫反応性の分析に基づき緑内障を診断する方法に関する。この発明は、緑内障の 2 つの診断方法を含む。第 1 および第 2 の診断方法の両方は、緑内障患者の体液における自己免疫反応性に依拠している。本発明のさらなる局面は、緑内障患者の自己免疫反応性を調整する治療方法に関する。

【0 0 0 2】

緑内障の第 1 の診断方法は、少なくとも部分的に精製された眼の抗原に対する体液の自己免疫反応性の分析に基づく。緑内障の第 2 の診断方法は、インビトロで培養された網膜神経節細胞 (R G C) のタンパク質発現に対する体液における自己抗体の作用の分析に基づく。

【背景技術】

【0 0 0 3】

緑内障は、網膜神経節細胞およびそれらの軸索の進行性の損失と、視野の緩やかな損失

10

20

30

40

50

とによって特徴づけられる眼障害の群である。緑内障は、世界的な失明の主要原因の1つである。緑内障の有病率は、ヨーロッパにおける一般人口の約1～2%である。60歳を超える年齢の人々の3～4%までがこの病気を患っている。緑内障の最も一般的な形態は、原発性開放隅角緑内障（POAG）であり、有病率は1.1%～2%の範囲である。

【0004】

緑内障の病因は、部分的に分かっているのみであり、眼内圧の上昇のみがこの病気の原因であるわけではない。眼内圧の増加は今でも主な危険要因であると考えられるが、アポトーシスプロセス、一酸化窒素レベルの上昇、または免疫系の関与などの他の病原性の要因が関連する可能性が高い。

【0005】

さらに、眼内圧の上昇はかなり一般的である（40歳の人口の10%）が、これらのうち一部の人のみが何年間に亘って緑内障を発症する。これまでのところ、眼内圧が上昇した人のうちどの人が緑内障を発症するかを特定する標準的な診断テストは存在しない。緑内障の早期治療は、視力喪失を防止するために決定的であるので、眼内圧の増加とは独立して緑内障を初期段階で検出する診断ツールの向上の必要性が存在する。

【0006】

眼内圧の上昇は、網膜細胞の死および緑内障疾患の発症の主な原因として公知である。細胞死の原因としての圧力の上昇は、インビトロで再現されている。Agarrá（非特許文献1）は、網膜神経節細胞系のインビトロ培養物を上昇された静水圧に晒し、細胞死を誘導した。

【0007】

しかしながら、緑内障のケースのうち約30%が眼内圧の上昇を伴っていないことも公知である。緑内障の疾患の少なくともいくつかの形態は、末梢または中枢神経系の障害を受けた構造の進行性の萎縮を伴う、神経系の局面での進行性の機能障害を有する神経変性疾患のパターンに合致する。したがって、眼内圧の上昇に加えて、たとえば一酸化窒素レベルの上昇、Tリンパ球が媒介するプロセス、または自己免疫攻撃といった網膜神経節細胞の破壊につながるさらなる原因およびメカニズムが議論されている。

【0008】

緑内障の早期検出の方法はまだ限られている。眼内圧を測定することで、当該患者の一部を検出することは可能であるが、変動する圧力レベルによって偽陰性の結果も与えられ得る。その時に患者自身が視覚機能の損失を認識していれば、ほとんどの場合、網膜神経節細胞の不可逆性の大きな欠損がすでに発生していることになる。

【0009】

緑内障のケースのうち眼内圧の上昇を伴っていない約30%は、正常眼圧緑内障と呼ばれる。眼内圧の上昇を測定する従来の検出方法は、これらの患者では役に立たない。正常眼圧緑内障の診断方法の欠如と、初期段階の緑内障の検出方法の欠如とを考慮すると、眼内圧と独立して緑内障を検出するための方法を開発する必要がある。眼の抗原に対して血清抗体を示すいくつかの研究によって、自己免疫が、緑内障における重要な要因として実証されている。たとえば緑内障患者においては、健康な被験者と比較して、熱ショックタンパク質HSP27、HSP60、 α -B-クリスタリン、 α -エノラーゼ、 α -フォドリン、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、およびグリコサミノグリカンが、異なるレベルの結合反応性を有する（たとえば非特許文献2）。興味深いことに、自己破壊的なインパクトを有し得る抗体反応性の上昇のみでなく、ある抗原について減少した自己免疫反応性も、緑内障患者の体液において特徴的となっている。さらに細胞培養アプローチにおいて、抗HSP抗体の直接適用は網膜神経節細胞のアポトーシスにつながることを示され得た（非特許文献3）。

【0010】

以前に、緑内障患者の特定の自己免疫反応性パターンに基づく診断方法が開示された。たとえば、特許文献1は、眼の抗原に対する、血清、涙、眼房水、または唾液といった体液中の複合自己抗体レパトリの分析による緑内障の診断方法を開示する。眼の抗原の

10

20

30

40

50

ための源として、網膜の抗原、視神経抗原、およびその他の抗原の粗混合物が用いられるとともに、複合自己免疫反応性パターンが測定された。ウェスタンブロットアッセイ、化学発光アッセイ、ELISA、放射性免疫アッセイを含む、自己免疫反応性パターンの検出および測定のためのさまざまな免疫分析手法、ならびにデジタル画像検出、処理、および分析のための方法が、テスト対象者、健康な人、および緑内障患者の自己免疫反応性パターンの生成および比較分析のために用いられ、開示された。特許文献1は、多数の眼の抗原の複合混合物から隔離されておらず、そのほとんどが特定されていない眼の抗原に対する自己免疫反応性パターンに依拠する、緑内障の診断方法を教示している。テスト対象者、健康な人、および緑内障患者からの体液における自己免疫反応性パターンの差異により、診断結果が与えられる。しかしながら、癌のような他の病気に関する診断分野における研究によると、未特定のバイオマーカに対する自己免疫反応性に基づく診断はしばしば信頼性が低いということが明らかとなっている。したがって、眼内圧の上昇とは独立した信頼性のある緑内障の診断方法の必要性が存在する。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】WO2004/036220

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】Brain Res. 2006. 1086(1): p. 191-200

20

【非特許文献2】Joachim, S.C., et al., Curr. Eye Res. 2007,32(6): p. 501-9

【非特許文献3】Tezel G, et al. Invest Ophthalmol. Vis. Sci. 1998; 39:2277-2287

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

本発明の目的は、体液の分析によって眼内圧の上昇とは独立して緑内障を検出する、代替的かつ向上され、かつ信頼できる診断方法を提供することである。本発明のさらなる目的は、迅速なテストおよび専門の実験室テストの両方のために用いるのに選択可能な程度の感度および特異度で緑内障を検出する診断方法を提供することである。本発明のさらなる目的は、緑内障を診断するための抗原担持要素およびキットと、緑内障の診断のためのバイオマーカとして機能するとともに、緑内障の治療処置において抑制剤として機能する新たに特定された眼の抗原とを提供することを含む。

30

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明の1つの局面は、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つのサンプルに対する体液における自己免疫反応性の分析に基づく緑内障の第1の診断方法であって、1つ以上の既知の眼の抗原に対する自己免疫反応性が、測定され、当該測定された自己免疫反応性の好ましく重み付けされた寄与についての診断結果に対する緑内障スコアに変換される、方法に関する。

【0015】

本発明のさらなる局面は、少なくとも1つの部分的に精製された眼の抗原を担持する抗原担持要素と、これらの抗原担持要素を調製する方法と、緑内障の診断のためにこれらを用いる方法とを含む。さらなる局面は、抗原担持要素と、任意で補助材料とを含む緑内障の診断のためのキットを含む。さらなる局面は、緑内障の診断方法での使用のために涙のような体液を収集する方法を含む。さらに別の局面は、診断もしくは治療のための方法または組成物における使用のための、緑内障を診断するためのバイオマーカとして機能する眼の抗原か、緑内障の治療処置における治療薬として機能する眼の抗原か、またはこのような眼の抗原に結合する特異抗体の調製のために機能する眼の抗原を含む。

40

【0016】

緑内障の第1の診断方法は、(a)少なくとも1つの少なくとも部分的に精製された眼

50

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)当該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)自己免疫反応性値を決定するよう当該体液における自己抗体とステップb)の少なくとも1つの眼の抗原サンプルとの間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、当該少なくとも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。

【0017】

この出願の文脈における「人間または動物の体液」という用語は、血清、涙、唾液、尿、眼房水、目の硝子体、もしくは脳脊髄液、およびその分画物か、または人間もしくは動物の組織試験体のホモジェネートおよびその分画物を含むが、これらに限定されない。緑内障の診断方法の好ましい実施形態においては、血清または涙が用いられる。

10

【0018】

眼の抗原とは、目においても発生する任意の抗原であり、以下に明示するこれらの眼の抗原のいくつかは明らかに偏在性である。目に存在する眼の抗原は特に、網膜の抗原、視神経の抗原、視神経円板の抗原、小柱網の抗原、ブドウ膜の抗原を含む。緑内障に関連する抗原は、網膜神経節細胞に存在するタンパク質に限定されないが、グリア細胞のような隣接細胞または細胞骨格の構成要素に特徴的な抗原を含むことは知られている。

【0019】

さらに、この出願について、具体的に指定された以下に言及される眼の抗原のすべてを含む「眼の抗原」という用語は、それぞれのタンパク質の生理学的な自然形態だけでなく、翻訳後に修飾される形態、およびペプチドのような任意の他の自然または人工的な誘導体、およびその他、タグ付けされた形態、開裂された形態、化学的に修飾された形態、それら言及した修飾の組合せを含む形態にも適用される。

20

【0020】

少なくとも部分的に精製された眼の抗原とは、標準的なタンパク質精製技術による少なくとも部分的なタンパク質精製によって、それらの生理的環境のタンパク質の複合混合物から分離された眼の抗原のことである。本願明細書における文脈においては、緑内障の診断方法における使用のための少なくとも部分的に精製された眼の抗原として、入手可能な商用グレードの精製度の眼の抗原も考えられる。このような部分的な精製によって、総タンパク質重量に対して、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、もっとも好ましくは少なくとも95%の1つ以上の所望の眼の抗原が作り出される。

30

【0021】

「眼の抗原サンプル」という用語は、1つ以上の少なくとも部分的に精製された眼の抗原を含むサンプルのことである。本発明に従った方法の好ましい実施形態では、眼の抗原サンプルは、ただ1つの眼の抗原を含み、緑内障スコアが別個に、部分的に精製された眼の抗原の各々について個々に決定される。さらに好ましい実施形態では、2つ以上の部分的に精製される眼の抗原が眼の抗原サンプルの少なくとも1つに組み合される。眼の抗原のこのようなサンプルについて、測定された自己免疫反応性は、2つ以上の眼の抗原の組合せに対する自己免疫反応に対応し、これは1つの緑内障スコアにつながる。眼の細胞溶解物のような生理的環境から分離されていない抗原とは対照的に、当該抗原の組合せの構成要素の相対量が制御される。抗原のこのような制御された組合せはさらに、重み付け、すなわちある眼の抗原の測定された自己免疫反応性の寄与を調整する診断結果に対する重み付け係数の効果につながり得る。

40

【0022】

本願明細書において、「眼の抗原」または「抗原」という用語は、かなり長い表現である「少なくとも部分的に精製された眼の抗原」または「少なくとも部分的に精製された眼の抗原のサンプル」の代わりにしばしば交換可能に用いられる。

【0023】

50

本願明細書の文脈における自己免疫反応性または交換可能に言うところの免疫反応性および自己抗体反応性とは、体液とともにインキュベートされる少なくとも部分的に精製された眼の抗原に対する、体液に存在する自己抗体の結合活性である。

【0024】

自己免疫反応性を検出および測定する方法は、ウェスタンブロットアッセイ、化学発光アッセイ、ELISA、放射性免疫アッセイ、およびマイクロアレイなどといった標準的な免疫学的な分析技術を含む。抗原は、抗原担持要素に適用および固定され、次いで検出されるべき自己抗体を含む体液とともにインキュベートされる。その結果として結合された自己抗体が特定され、自己免疫反応性を決定する。特定方法は、たとえば分析されるべきサンプルを事前に標識付けすることと、抗原が結合された自己抗体に結合するか、またはたとえば標識付けされたヤギ抗ヒト免疫グロブリンなどの間接標識に結合する二次抗体を加えることとを含む。さらなる方法は、ビード、ナノ粒子、タグなどといった特定可能な要素の分析を含む。検出方法はさらに、たとえばSELDI-TOF-タイプ（飛行時間質量分析における表面増強レーザ脱離/イオン化）、MALDI（マトリックス支援レーザ脱離/イオン化質量分析）、または他の抗体チップ技術といった、標識付けを必要としない方法を含んでもよい。

10

【0025】

本発明に従った緑内障の診断の第1の方法は、ある眼の抗原に対する緑内障患者における平均的な自己免疫反応性と比較した、健康な人における平均的な自己免疫反応性の差異に依拠する。したがって、体液におけるある眼の抗原に対するあるタイターの自己抗体が緑内障疾患の診断の証拠として用いられる。

20

【0026】

本発明の1つの局面は、健康な人と緑内障患者とでは自己抗体が異なって結合し、かつ緑内障を検出するためおよび治療処置のためのマーカ（またはバイオマーカ）として診断に役立つ新しく特定された眼の抗原に関する。

【0027】

眼の抗原サンプルに対する自己免疫反応性の測定信号から情報を抽出するために、自己免疫反応性の当該測定信号または値が標準データと比較される。好ましい実施形態では、ステップd)の比較が、各眼の抗原サンプルごとに別個に行われる。好ましい実施形態では、標準データは、健康な対照および緑内障患者の両方について、各眼の抗原サンプルに対して測定された自己免疫反応性の平均値を含む。他の好ましい実施形態では、標準データは、各眼の抗原サンプルに対する、当該疾患のある段階について特徴的な測定された自己免疫反応性の平均値を含む。したがって、緑内障疾患の異なる段階の診断、および緑内障疾患の進行の監視も、本発明に従った方法の精神の範囲内である。さらに好ましい実施形態では、自己免疫反応性の標準データは、緑内障の特定の形態のサブタイプに特徴的な自己免疫反応性を含む。

30

【0028】

このような標準データは、テストサンプルと並行して行われる、緑内障の診断方法のステップ(a)~(c)における健康な人および緑内障患者の体液の対照反応によって生成されてもよく、またはこのような標準データは、同一の条件下で異なる時間に行われた対照反応の記録データに由来してもよい。

40

【0029】

好ましい実施形態では、眼の抗原サンプル毎に、テスト対象者の測定値を標準データに相関させ、測定された自己免疫反応性値を緑内障スコアに変換することにより、測定された自己免疫反応性値から緑内障スコアが演繹される。簡素化した例では、緑内障スコアは、0~100の例示的な緑内障診断スケール上で、個々の眼の抗原サンプル毎に対して測定された自己免疫反応性から決定される。当該スケールでは、0は健康な人における特定の眼の抗原に対する測定された自己免疫反応性の平均値に対応し、100は、緑内障患者におけるこの抗原に対する測定された自己免疫反応性の平均値に対応する。

【0030】

50

本発明に従った方法の好ましい実施形態では、多変量統計的手法、ツリーアルゴリズム、または人工ニューラルネットワークの標準的な方法を用いるアルゴリズムが、測定された自己免疫反応性の値から、ステップ(d)に従った対応する緑内障スコアへの変換を計算するよう用いられる。同様にステップ(e)では、いくつかの好ましい実施形態において、アルゴリズムが眼の抗原サンプルの各々について決定された緑内障スコアの分析のために用いられ、診断結果を決定する。さらに好ましい実施形態では、アルゴリズムは両方のステップのために用いられる。さらに別の変形例では、ステップd)の少なくとも1つの緑内障スコアは、緑内障の診断の第1の方法の最後のステップである。これらの変形例に従うと、ステップe)は、緑内障の第1の診断方法に含まれるのではなく、緑内障スコアから診断結果を演繹する医療専門家によって行われる。

10

【0031】

本発明に従った緑内障の診断方法の主な利点は、診断結果が、特定された部分的に精製された抗原の緑内障スコアの分析に基づくということである。

【0032】

好ましい実施形態では、重み付け係数が眼の抗原のサンプルの少なくとも1つに割り当てられる。このような重み付け係数は、診断結果について、特定の眼の抗原サンプルに対する自己免疫反応性の寄与を調整する。好ましい実施形態では、重み付け係数は、第1の診断方法のステップ(c)、(d)、または(e)において計算により導入される。しかしながらいくつかの好ましい実施形態では、重み付け係数は、ステップ(a)または(b)において導入され、さらに別の実施形態では、重み付け係数はステップ(a)~(e)のうち1つより多くのステップにおいて導入される。重み付け係数は、重み付け係数が導入されるステップとは独立して、診断結果を調整する効果を有する。重み付けされた緑内障スコアは、ステップ(a)~(e)のうち1つまたは2つ以上のステップにて導入された重み付け係数から得られる。

20

【0033】

診断結果が重み付けされた緑内障スコアに基づく好ましい実施形態に従うと、個々の抗原に結合する自己抗体から引き出される信号が光学リーダのような信号検出ツールにおいて検出および測定される場合に、特定の重み付け係数が計算ステップにおいて導入される。

【0034】

さらに好ましい実施形態に従うと、重み付け係数は、自己免疫抗体との反応に晒される個々の抗原の量を異なって重み付けすること、および/または個々の抗原に対する自己免疫反応性の検出および測定のための分析ステップの1つ以上を重み付けすることによって導入される。このような実施形態の例は、異なる抗原について固有となるよう設計されたビードによる自己免疫反応性の検出を含み、当該重み付けは、抗原に固有のビードの標識付けの異なる強度か、または異なってグレード付けされた感度の検出器ツールのいずれかによって達成され得る。

30

【0035】

緑内障スコアはたとえば、高い診断妥当性を有する眼の抗原サンプルについての緑内障スコアが診断結果により寄与するように重み付けされる。簡素化された例では、低い標準偏差の平均値からの標準値で、緑内障患者と健康な人との間で大きな有意な値で異なる自己免疫反応性を生じさせる眼の抗原サンプルXは、緑内障患者と健康な人との間でわずかにのみ異なる自己免疫反応性を生じさせ、高い標準偏差の平均的な標準値を有している眼の抗原サンプルYよりも、一般的に診断の妥当性が高い。これに対応して、特に特異度を最大化するよう設計される緑内障テストにおいて、抗原サンプルXについての緑内障スコアは、抗原サンプルYについての緑内障スコアよりもより重く重み付けされる。これにより、診断結果へのそれぞれの寄与を調整する。

40

【0036】

第1の診断方法のさらなる利点は、ステップa)において与えられた眼の抗原のサンプルに含まれる既知の部分的に精製された眼の抗原、および/または任意の割り当てられた

50

重み付け係数が選ばれ得、緑内障の特定の診断テストの目的に依拠して選択されることである。たとえば、当該疾患の初期段階での緑内障の診断のために設計されたスクリーニングテストでは、感度を最大化することが望ましい。このような診断テスト用途の場合、ある数の偽陽性は許容されると考えられるが、偽陰性は回避されるべきである。

【 0 0 3 7 】

第 1 の診断方法の好ましい実施形態のさらなる利点は、特定の患者において高い緑内障スコアを産出する抗原の生理学的な役割についての知見から、付加的な診断情報が抽出され得、これにより診断結果が強化されることである。

【 0 0 3 8 】

当該病気の進行がどのように眼の抗原に対する自己免疫反応性に相関するかが分かってくるにつれて、特定の段階、特に初期段階のこのような抗原の特性が、病気の進行を監視するためのバイオマーカーとして用いられ得る。この監視には、病気の進行を遅らせるまたは止めるという点について医療処置の有効性を監視することが含まれる。臨床的には、網膜神経節細胞の不可逆性の死の前に治療を開始するために、眼内圧が上昇した人の中から、緑内障を発症する人を特定することは非常に重要である。

10

【 0 0 3 9 】

緑内障の診断方法のステップ a) の好ましい実施形態では、以下の 4 8 個の眼の抗原からなる群 1 のうち少なくとも 2 つの部分的に精製された眼の抗原、または少なくとも 3、4、5、6、7、8 もしくは 9 個の抗原、または好ましくは少なくとも 2 つであって、5 もしくは 10 個より少ない抗原が、少なくとも部分的に精製された眼の抗原の 1 つ以上のサンプルに含まれる。群 1 における 4 8 個の眼の抗原は、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、脳由来の神経栄養因子 (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)、ビメンチンである。

20

30

【 0 0 4 0 】

群 2 と称する、上述した抗原の以下のサブグループは、緑内障のための診断マーカーとして初めて特定された。緑内障の診断方法のステップ a) のさらに好ましい実施形態では、以下の 3 6 個の眼の抗原からなる群 2 のうち少なくとも 1 つの部分的に精製された眼の抗原、または少なくとも 2、3、4、5、6、7、8 もしくは 9 個の抗原、または好ましくは少なくとも 2 つであって、5、10、もしくは 20 個より少ない抗原が、少なくとも部分的に精製された眼の抗原の 1 つ以上のサンプルに含まれる。群 2 における 3 6 個の眼の抗原は、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、 - 2 - アドレナリン受容体、脳由来の神経栄養因子 (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、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 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、

40

50

- 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) である。

【 0 0 4 1 】

上述した群 1 の抗原のいくつかについては、それらに対する自己抗体反応性が緑内障患者と健康な人において異なることはすでに知られている。このことは確認されており (実施例および図を参照)、それらの自己抗体反応性は緑内障についても診断妥当性を有している。群 3 のこれらの眼の抗原は、アクチン、 - A - クリスタリン、 - B - 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、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)、ピメンチンである。

10

【 0 0 4 2 】

群 1 の抗原は、3 つのサブグループ A、B、および C に分類されている。健康な人および緑内障患者において異なる眼の抗原に対する自己免疫反応性が測定される実施例および図において記載される方法において、診断の妥当性または抗原が評価された。群 C の抗原、好ましくは群 B の抗原、より好ましくは群 A の抗原が、緑内障の第 1 の診断方法のために用いられる眼の抗原の少なくとも 1 つのサンプルに含まれる。

【 0 0 4 3 】

2 4 個の部分的に精製された眼の抗原の以下の群は、緑内障について非常に高く妥当な診断マーカとして特定され、群 A の抗原として分類された。群 A の抗原は、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)、ピメンチンである。好ましい実施形態では、ステップ a) において提供される眼の抗原の少なくとも 1 つのサンプルは、群 A の眼の抗原から選択される少なくとも 2 つの抗原を含む。

20

30

【 0 0 4 4 】

9 個の部分的に精製された眼の抗原の以下の群が、緑内障について非常に妥当な診断マーカとして特定され、群 B の抗原として分類された。群 B の抗原は、アネキシン I - I V、 - 2 - アドレナリン受容体、カルレチキュリン、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、 - シヌクレインである。さらに好ましい実施形態では、ステップ a) において与えられる眼の抗原の少なくとも 1 つのサンプルは、眼の抗原の群 A および / または群 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。

【 0 0 4 5 】

1 4 個の部分的に精製された眼の抗原の以下の群 C も、緑内障について妥当な診断マーカとして特定された。この群は、アルブミン、脳由来の神経栄養因子 (B D N F)、カルジオリピン、D N A トポイソメラーゼ 1、フィブロネクチン、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、3 - ホスホセリン、チレオグロブリン、トポイソメラーゼ阻害剤からなる。

40

【 0 0 4 6 】

さらに好ましい実施形態では、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、群 2 もしくは群 2 - A と分類される群 2 および群 A の両方に属する抗原が、または群 2 - A B と分類される群 2 と群 A もしくは群 B に属する抗原のうち、少なくとも 1 つの抗原、または好ましくは少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、もしくは 9

50

個の抗原、または好ましくは少なくとも1つであって5もしくは10個より少ない抗原、または好ましくは少なくとも2つであって20個よりも少ない抗原、またはこれらの抗原のすべてを含む。

【0047】

本発明のさらなる局面は、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つのサンプルを担持する抗原担持要素に関する。抗原担持要素の好ましい実施形態は、マイクロアレイチップ、ラテラルフローテストストリップ、およびマイクロ流体チップを含む。いくつかの好ましい実施形態では、抗原担持要素は、ストリップ、もしくはスライド、もしくはプレートなどの上の表面エリアであるか、または装置において眼の抗原サンプルがスポット配置またはマイクロスポット配置される所定の表面である所定の抗原ゾーンを含む。さらに他の好ましい実施形態では、抗原担持要素はさらに体液受取ゾーンを含む。さらに好ましい実施形態では、抗原担持要素は、眼の抗原のサンプルでコーティングされたビードまたは別の基材を含む。さらに好ましい実施形態では、抗原担持要素は、眼の抗原のサンプルの重み付けされた量を担持する。さらに別の実施形態では、抗原担持要素は、群1、群2、群A、群AおよびB、または群2 - Aから選択される眼の抗原を含む。本発明に従った抗原担持要素についての上述した特徴の組合せを用いることは明らかに本発明の精神の範囲内である。

10

【0048】

緑内障の第1の診断方法の好ましい実施形態では、眼の抗原のサンプルのうち少なくとも1つのサンプルを担持する要素は、抗原マイクロアレイチップである。眼の抗原の少なくとも1つのサンプルは、抗原担持要素上において2次元または3次元のマトリックス状にあるスポットの抗原アレイまたは抗原マイクロアレイとしてスポット配置される。抗原担持要素はたとえば、ガラススライド、プレート、チップ、ニトロセルローススライド、またはヒドロゲルスライドなどである。タンパク質アレイは、ニトロセルロースがコーティングされたスライドのような担持要素に対して、適用可能な場合、上述した抗原の特定の群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2つ、好ましくは3~5、3~9、または3~12個のサンプルをスポット配置することにより調製される。当該アレイは、血清、涙、または眼房水のような体液の適切に希釈されたサンプルとともにインキュベートされる。自己免疫反応性はたとえば、当該技術において公知の確立された手法に従って、アレイ上での自己抗体抗原反応の可視化により検出される。この可視化としてはたとえば、蛍光標識付けされた抗IgG抗体での処理を行い、その後、蛍光スキャンングを行うことである。二次抗体から発せられた信号がデジタル化される。スポット強度が測定され、任意で多変量統計的手法を用いて対照の人の体液の結果と比較される。自己抗体反応性の検出のための代替例は、抗原担持要素に添加または存在する構成要素と反応する酵素に結合される抗ヒトIgG抗体による可視化を含み、これにより色の出現または色の変化が発生する。いくつかの適用例におけるこのような色の変化は、直接的に可視化されるか、または光学リーダのような検出器ツールによって可視化されてもよい。さらに別の好ましい実施形態では、別の確立された免疫学的アッセイ技術である競合アッセイを用いて自己免疫反応性が測定される。すなわち、たとえばある眼の抗原について特異の商業的に利用可能な単クローンの蛍光抗体が、ステップa)において与えられた少なくとも部分的に精製された眼の抗原と反応するためにステップb)の体液中に存在する自己抗体と競合している。このようなアッセイにおける特定の眼の抗原に対する体液中の強い自己免疫反応性は、蛍光的に標識付けされた商業的な抗体が体液中の標識付けされていない自己抗体により抗原に結合するのが抑制されるので、弱い信号となる。本発明は、ここでは単に例として言及される当該技術において公知の標準的な免疫学的なアッセイのこれらの例に限定されないことは明らかであるが、少なくとも部分的に精製された眼の抗原に対する体液中の自己免疫反応性を決定するよう適用可能である、当該技術において公知の任意の標準的な免疫学的なアッセイまで拡大する。

20

30

40

【0049】

いくつかの好ましい適用例では、寄与を調整するよう個々の抗原に割り当てられた診断

50

結果に対する重み付け係数が、たとえば異なる量の抗原をマイクロアレイ上にスポット配置することによって、または個々の抗原に結合された抗体から引き出される信号の異なる重み付けによって導入される。さらに好ましい実施形態では、マイクロアレイ上にスポット配置される抗原の量は、検出器ツールによる信号検出の線形の範囲内に自己免疫反応性の予想される信号の強さが存在するように当該信号の強さを調整するよう変動される。

【0050】

実施例7にさらに示されるように、5つの少なくとも部分的に精製された抗原のみを用いる選択による緑内障のテストにより、特異度および感度が約90%にて、緑内障患者と健康な人との間の区別が行われる。したがって、さらに好ましい実施形態では、眼の抗原のサンプルの数は、10、8、6、5、または5より少ないといった小さな数に限定される。これにより、分析が簡易で低コストで実行可能なテストが多数の人々の集団スクリーニングのために提供される。

10

【0051】

緑内障の第1の診断方法のさらに好ましい実施形態において、眼の抗原のサンプルのうち少なくとも1つのサンプルを担持する要素は、ラテラルフローテストストリップである。これらの実施形態の好ましい変形例では、抗原担持要素は、所定の抗原担持ゾーンと、体液のための所定の受取ゾーンとを含む。さらに好ましい変形例では、ラテラルフローテストストリップは、任意でサブゾーンを含むいくつかのゾーンを含む。少なくとも部分的に精製された眼の抗原の選択されたものは抗原ゾーンに適用される。眼の抗原の個々のサンプルは、方法のいくつかの変形例に従って、異なるサブゾーンに適用されてもよく、または1つのゾーンもしくはいくつかのサブゾーンへと混合されてもよい。その後のステップでは、任意で適切に前処理および/または希釈された体液のサンプルが、テストストリップの受取ゾーンに適用される。抗原に結合される自己抗体の可視化のための適切な反応物は、抗原ゾーン、受取ゾーン、またはその両方の中にも含まれてもよい。代替的には、結合された自己抗体を有するテストストリップは、結合ステップの後で、可視化のための反応物とともにインキュベートされてもよい。可視化のような検出ステップは、デジタル化された出力を産出する画像リーダのような分析ツールを用いてまたは用いないで測定される。好ましい適用例では、診断結果への寄与について個々の抗原に割り当てられる重み付け係数は、たとえば異なる量の抗原をテストストリップの抗原ゾーンに適用することによってか、化学反応物の異なる追加によってか、または個々の抗原に結合される抗体から引き出される信号の異なる重み付けによって導入される。マイクロアレイを用いる方法の実施形態について上述した特徴のいくつかおよび特徴の組合せはまた、ラテラルフローテストストリップの好ましい実施形態と同様に適用可能であることは明らかである。

20

30

【0052】

ラテラルフローテストストリップのさらに好ましい実施形態では、涙のような体液を収集するよう、テストストリップの受取ゾーンが患者に直接接触するよう設計されている。体液を収集するための同様の受取ゾーンも、吸着材料の受取ゾーンを含む抗原担持ビードを有するマイクロ流体チップまたはカラムのような抗原担持要素の他の実施形態の一部である。

【0053】

ある抗原に対する自己免疫反応性の欠如または自己免疫反応性の減少も緑内障を示すということは、現状技術から公知である。したがって、いくつかの好ましい実施形態は、選択された抗原に対する自己免疫抗体の結合の欠如または減少が診断結果に寄与しているかまたは診断結果のための基礎となるように設計される。たとえばラテラルフローテストストリップのいくつかの実施形態では、1つ以上の抗原サブゾーンは、自己免疫反応性が病気を示さない抗原を用いてスポット配置され、その一方、他のサブゾーンは、緑内障患者において健康な人よりもより低い自己抗体反応性を引き出す抗原、および/または緑内障患者において健康な人よりもより高い自己抗体反応性を引き出す抗原、および/または自己免疫反応性が緑内障の欠如を示さない抗原、および上記の組合せの好適な変形例を用いてスポット配置される。

40

50

【0054】

緑内障の第1の診断方法のさらに好ましい実施形態では、抗原の少なくとも1つのサンプルのための抗原担持要素は、マイクロ流体チップまたはラボオンチップ装置である。当該抗原担持要素において、個々の抗原が好ましくは別個のマイクロチャンネルに与えられる。体液は、マイクロ流体チップの上に装填されるか、チップの体液受取ゾーン上にて受け取られる。その後、体液は、たとえば圧力制御ユニットによって、マイクロ流体チップのマイクロチャンネルシステムへと動かされる。好ましい実施形態では、自己免疫反応性は、二次の蛍光が標識付けされた抗体と、カメラを搭載する標準的な光学リーダまたは標準的なコンピュータとにより検出され、その後上述したように、定量化され、緑内障スコアに変換される。マイクロアレイチップおよびラテラルフローテストストリップといった他の抗原担持要素の上述した特徴を、この出願に記載される方法および装置のための抗原担持要素のさらなる実施形態のためのマイクロ流体チップの特徴に組み合わせることは、明らかに本発明の精神の範囲内である。これは、健康な人に対して緑内障患者における自己免疫反応性が高い抗原のためのサブゾーンと、健康な人に対して緑内障患者における自己免疫反応性が低い抗原のための他のサブゾーンとを有するマイクロ流体チップを含む。

10

【0055】

本発明のさらなる局面は、緑内障の第1の診断方法のためのテストキットと、眼の抗原のサンプルのうちの少なくとも1つのサンプルを担持する要素および任意の補助材料とを含むテストキットの構成要素とに関する。この局面に従ったいくつかの実施形態では、このようなキットは、診断テストの目的に依拠して、眼の抗原のサンプルのうちの少なくとも1つのサンプルの異なる変形例を担持する抗原担持要素を含む。キットのいくつかの好ましい実施形態では、抗原担持要素は、群1、群2、群A、群AおよびB、または群2-Aから選択される眼の抗原を含み、これらの好ましい実施形態のうちのいくつかにおいて、抗原担持要素上に装填された抗原の量の重み付けがなされる。キットのいくつかの好ましい実施形態では、抗原担持要素は、マイクロアレイスライド、ラテラルフローテストストリップ、もしくはマイクロ流体チップであるか、またはその一部である。このようなテストキットのさらなる実施形態では、分析ツールおよび/もしくはソフトウェアのような補助材料が、画像リーダおよび/またはテスト結果のデジタル化された出力を産出する画像リーダのためのソフトウェアのような分析ツールのために含まれる。このソフトウェアは、測定された自己免疫反応性を定量化するステップ、緑内障スコアまたは診断結果を計算するステップのうち1つ以上のステップのために用いられる。さらなる好ましい実施形態では、体液のサンプルを取得するための補助材料が含まれる。このような補助材料はたとえば、涙を受け取るための吸取紙である。さらに好ましい実施形態は、体液とともに抗原担持要素をインキュベーションした後の自己免疫反応性の検出および測定のための反応物および/または反応容器、抗原担持要素でインキュベーションの前に体液サンプルを処理するための反応物、または体液が収集された吸着材料から体液を溶出するための反応物を含む。緑内障の診断方法の文脈における上記の特徴の任意の組合せは、緑内障の診断方法を実行するためのキットのさらに好ましい実施形態のために組み合わされてもよい。

20

30

【0056】

緑内障の第1の診断方法のさらに好ましい実施形態では、体液試料は、眼の抗原のサンプルのうちの少なくとも1つのサンプルとの反応の前に、まず乾燥され、次いで再可溶化されるか、または溶出される。当該体液試料は、専門的なセッティングまたは家庭でのセッティングのいずれかにおいて収集される。いくつかの変形例では、体液は、ペーパーストリップのような吸着材料の片の上に収集されるか、または抗原担持要素の受取ゾーンもしくは体液のための任意の受取容器に直接的に収集される。体液試料は、乾燥され、たとえば室温にて保存される。特に低い温度での1週間またはそれ以上の保存の後または凍結される場合、乾燥された体液試料に存在する自己抗体は、たとえば緩衝液または生理食塩水により戻され、吸着材料から溶出され得るということが経験により示される。したがって、この実施形態の利点は、収集された体液試料がたとえば患者自身によって家にて収集され、分析のために実験室に郵送されるということである。緑内障の第1の診断方法の

40

50

さらなる好ましい実施形態では、乾燥され分析の前に戻される体液は涙または血清である。

【0057】

涙における自己免疫反応性を測定する緑内障の第1の診断方法の好ましい実施形態では、涙は、ピペットを用いる方法、またはシルマーペーパーストリップもしくは他の好適な吸着材料といった吸取紙ストリップを用いる方法などの任意の標準的な方法により収集される。任意であるが、涙は乾燥され、たとえば室温で1週間、または0~5 以上でそれ以上の間、凍結される場合はより長い間、保存される。その後、たとえばリン酸緩衝化食塩水のような緩衝液により、自己抗体が乾燥またはまだ濡れているペーパーストリップから溶出される。さらに好ましい実施形態では、涙は、たとえばテストストリップの受取ゾーンを目における涙に晒すことにより、ラテラルフローテストストリップ上に直接的に収集される。明らかなことに、たとえば血清の代わりに涙液を用いる実施形態の1つの利点は、涙のサンプルが非侵襲的に得られ得るということである。これは、いくつかの眼科医および視力検査医事務所ならびに自己テストの場合でのように、適宜訓練された医療専門家がいないセッティングにおける特定の利点となる。

10

【0058】

緑内障の第1の診断方法のさらなる局面は、慣例的なスクリーニングにおいて、視力喪失の前に緑内障を早期検出するための迅速なテストへの当該診断方法の使用に関する。好ましい実施形態はたとえば、慣例的なスクリーニングにおいて偽陰性の可能性が最小限にされるように非常に感度がよくなるよう設計される低コストの診断テストである。したがって、その後のフォローアップ、すなわちより入念なテストは、たとえばより多くの数の眼の抗原に依拠し、迅速なテストにおいて陽性のテスト結果を有する人の間で偽陽性を特定するよう設計される。たとえば、上記のさまざまな実施形態において記載されたラテラルフローテストストリップ、マイクロ流体チップ、または簡素なマイクロアレイチップは、このような迅速なテストのために用いられ得る。

20

【0059】

緑内障の第1の診断方法の使用のさらなる局面は、病気の進行および医療処置の効果を監視するための用途に関する。これらの局面の好ましい実施形態では、抗原の選択および/またはこれらに割り当てられた重み付け係数が、緑内障の特定の段階に特徴的な、抗原に対する自己免疫反応性を監視するよう設計される。

30

【0060】

さらなる本発明の局面は、たとえば涙のような患者の体液を患者の目から収集するよう患者を抗原担持要素の受取ゾーンに接触させる方法に関する。好ましい実施形態では、患者は、吸着材料を含む抗原担持要素の受取ゾーンに接触される。受取ゾーン自体には抗原がないが、体液が抗原担持ゾーンに向かって流れる。たとえば、シルマーテストストリップのような吸着紙を含む受取ゾーンを有するテストストリップが受取ゾーンにて人間の目に接触して、涙を収集する。その後、当該涙液は、抗原ゾーンの中へ拡散し、これにより緑内障の診断方法のステップb)に携わることになる。

【0061】

さらなる本発明の局面は、緑内障の診断の方法または緑内障を診断する方法において用いられる抗原担持要素における使用のために以下の群2のうちの眼の抗原のいずれかまたは1つ以上の任意の組合せに関する。群2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、 - 2 - アドレナリン受容体、脳由来の神経栄養因子(BDNF)、カルレチキュリン、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、 - シヌクレイン、チレオグロ

40

50

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）からなる。

【0062】

さらなる本発明の局面は、眼の抗原の以下の群2の眼の抗原のいずれか、当該群2の1つ以上の任意の組合せか、分画物もしくは修飾された眼の抗原のような眼の抗原の誘導体が、または緑内障の治療処置の方法に用いられるか、もしくは医療処置における使用のための組成物に用いられる、具体的には緑内障の処置における使用のための組成物に用いられる群2の眼の抗原のいずれかに特異の抗体のようなりガンドに関する。

【0063】

緑内障を治療するよう医薬組成物のために眼の抗原を用いる好ましい実施形態では、当該眼の抗原は、上昇したレベルで緑内障患者に存在する自己抗体に結合する抑制剤として用いられる。特に、緑内障患者において上昇した自己免疫反応性の多くは、たとえばアネキシンV、フォドリン、ミエリン結合タンパク質、HSP27といったアクチンおよびアクチン結合タンパク質のような細胞骨格タンパク質に対することが分かった。網膜神経節細胞に取り込まれる際のf-アクチン網状組織のような細胞骨格構造に対する自己抗体は、アクチン網状組織を破壊し、細胞アポトーシスを引き起こすことが分かっている。したがって、本発明のこの局面に従うと、網膜神経節細胞の細胞死を防止する医薬組成物が提供される。群2の眼の抗原の少なくとも1つを含む組成物は、緑内障患者において自己抗体に結合して網膜神経節細胞に対する破壊的な作用をブロックする眼の抗原により緑内障疾患の進行を止める。

【0064】

眼内圧の上昇から独立した緑内障の第1の診断方法は、特定された眼の抗原のバイオマーカープロファイルに依拠するが、眼内圧の上昇から独立した第2のこのような診断方法はインビトロ分析における細胞培養に対する体液の影響に依拠する。

【0065】

緑内障の診断の第2の方法は、a)細胞のインビトロ培養物を与えるステップと、b)テスト対象の人の体液とともに細胞のインビトロ培養物をインキュベートするステップと、c)ステップb)に従った処理の後に、当該細胞のインビトロ培養物によるタンパク質の発現を分析および/または細胞の生存度を分析するステップと、d)診断結果を決定するよう、ステップc)における当該分析の結果を標準データと比較するステップとを含む。

【0066】

ステップa)のために、商業的に利用可能な不死化細胞系からの細胞のような、好ましくは人間または動物の初代または不死化細胞、より好ましくは哺乳動物細胞のインビトロ培養物が与えられる。好ましくは、神経細胞、もっとも好ましくは網膜神経節細胞または網膜神経節細胞の前駆細胞が与えられる。

【0067】

健康な人および異なる形態の緑内障または高眼圧を有する患者からの体液に晒された網膜神経節細胞のタンパク質発現パターン、特定のバイオマーカータンパク質の発現、および生存度が区別され得る。したがって、緑内障の診断のための方法の変動可能な好ましい実施形態の特定の利点は、異なる形態の緑内障を有する患者同士の間で区別されること、さらに緑内障を有するかまたは緑内障を発症するリスクが上昇した高眼圧を有する患者の間で区別されることである。したがって、高眼圧の監視とは独立したこの方法は、正常眼圧緑内障の早期診断を可能にするとともに、さらに緑内障を患っている人と患っていない人がいる高眼圧の影響を受けた個人間の区別を可能にする。

【0068】

さらに好ましい変形例では、ステップb)における処理のための体液またはその試料もしくは分画物は、たとえば凍結および/もしくは乾燥によってか、または一般に用いられる血清チューブにおいて見られる保存剤のような保存剤の添加によって保存される。可変の時間期間の保存の後、適切に戻された体液のサンプルは、第2の診断方法のステップb

10

20

30

40

50

)における処理のために用いられる。

【0069】

第2の診断方法のさらに好ましい実施形態では、体液は物理的または化学的に前処理され、これにより診断テストのステップb)における効果を安定化または増強する。たとえば体液は、部分的に精製され、緑内障に関連しない態様で、または体液のサブ分画物に対するステップa)で与えられた細胞の特異反応を示すよう、ステップa)で与えられたインビトロ細胞培養物における細胞成長および細胞のタンパク質発現に干渉する可能性のある物質を体液から除去してもよい。

【0070】

このような実施形態のさらに好ましい変形例では、前処理または分別により、緑内障またはある形態の緑内障に関連する抗原に特異であることが知られる抗体または自己抗体のような抗体の所定の選択されたものを含むか、または濃縮された体液の分画物が産出される。さらに好ましい変形例では、少なくとも1つの抗体が体液から取り除かれる。これらの変形例のいくつかでは、ステップb)での使用の前に体液からの抗体の選択されたものの除去が、緑内障に関連せず診断結果を曖昧にし得る態様で細胞成長を抑制するかまたは細胞のタンパク質発現に影響を与える1つ以上の抗体を取り除くよう機能する。さらなる実施形態ではこのような除去は、ある形態の緑内障に特異であると知られる自己抗体の除去を担う。さらに好ましい実施形態では、細胞は、除去された抗体とともにインキュベートされ、これにより用いられた血清のタイプに対して典型的な細胞の反応を作り出す。

10

【0071】

ステップb)のインキュベーションは、当該技術において公知である標準的なインキュベーション技術に従って行われる。ステップb)の好ましい実施形態の異なる変形例では、インキュベーション時間、インキュベーション温度、および適用された静水圧のレベルが変動される。

20

【0072】

ステップc)では、ステップb)のインキュベーションの間の、ステップa)において与えられた細胞に対する体液の影響が分析される。ステップc)の好ましい実施形態の第1の群では、タンパク質発現パターンが分析される。ステップc)の好ましい実施形態の第2の群では、バイオマーカまたは抗原のような特異タンパク質の発現が分析される。好ましい実施形態の第3の群では、細胞の生存度が分析される。ステップc)のさらなる好ましい実施形態では、上記の方法の1つより多くの方法による分析が行われる。ステップc)のすべてのこれらの実施形態では、分析の結果は、診断結果を決定するようステップd)のために用いられる。

30

【0073】

ステップc)の好ましい実施形態の第1の群の好ましい実施形態では、タンパク質発現分析は、手が付けられていないタンパク質のような全タンパク質と、たとえばインビトロの細胞培養から得られる消化または分画されたタンパク質、たとえば、あらゆる細胞中および上のタンパク質、ならびに細胞が培地中に放出するタンパク質を含むいくつかの変形例において、細胞外タンパク質を、用いて行われる。ステップc)の好ましい実施形態では、タンパク質発現分析に晒されるタンパク質は、細胞分解によりインビトロ細胞培養物から得られ、たとえば沈殿により回収される。任意であるが、当該タンパク質は、たとえばタンパク質消化、タンパク質分別および/もしくは分離、ならびに/または精製ステップにより前処理され、当該技術において公知の標準的なタンパク質分析手法によって分析される。当該技術において公知である適用可能な方法の例には、アセトン沈殿、トリプシン消化、ゲル電気泳動、HPLCなどが含まれるが、これらに限定されない。

40

【0074】

ステップc)の好ましい実施形態の第1の群のさらなる好ましい実施形態では、タンパク質発現分析は、質量分析のような、当該技術において公知である標準的なタンパク質フィンガープリント分析によって行われる。当該分析には、MALDI-TOF TOF MS (マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間型質量分析)、オービトラップ質

50

量分析、LC-MS（液体クロマトグラフィー質量分析）、HPLC-MS（高圧液体クロマトグラフィー質量分析）およびSELDI-TOF-MS（表面増強飛行時間型質量分析）が含まれる。

【0075】

ステップc)の好ましい実施形態の第1の群のさらに好ましい実施形態では、タンパク質発現パターンまたはフィンガープリントのようなタンパク質発現の分析データが、当該技術において公知であるようなデジタル化のためのデジタル画像解析システムまたは他の装置により処理される。好ましい実施形態では、デジタル化されたデータはその後、たとえば判別分析、分類ツリー/回帰ツリー、および/または人工ニューラルネットワークといった多変量統計的手法によって処理される。

10

【0076】

ステップc)の好ましい実施形態の第2の群において、特異タンパク質の発現が分析される。これらの実施形態の好ましい変形例では、ステップc)におけるタンパク質発現の分析は、少なくとも1つの特異タンパク質またはバイオマーカに向けられるアッセイを含む。このような実施形態の好ましい変形例では、バイオマーカは、緑内障疾患、自己免疫疾患、神経変性疾患、またはアポトーシスに関連していることが知られるタンパク質である。好ましい実施形態では、バイオマーカについてのアッセイは、たとえば化学ルミネッセンスまたは蛍光に基づく免疫学的アッセイ、ELISA、Elispot、または緑内障疾患、自己免疫疾患、神経変性疾患、もしくはアポトーシスに関連していることが知られるこのようなバイオマーカについて好ましくは固有である少なくとも1つの抗体プローブを用いるタンパク質アレイといった免疫学的アッセイに基づく。好ましい変形例では、抗体は単クローン抗体である。

20

【0077】

第2の診断方法のステップc)において免疫学的アッセイを用いるタンパク質発現分析の好ましい実施形態では、用いられる抗体は、この出願の第1の発明に開示される群1の48個の抗原の1つ以上に対する特異抗体である。これらの抗原のすべてについて、それらの発現レベルが健康な人と比較して緑内障患者において増加または減少していることが知られている。これらの抗原は、アクチン、アルブミン、 α -1-アンチトリプシン、アネキシンI-IV、アネキシンV、 α -2-アドレナリン受容体、脳由来の神経栄養因子BDNF、カルレチキュリン、カルジオリピン、 α -A-クリスタリン、 α -B-クリスタリン、 α -L-クリスタリン、 α -S-クリスタリン、 α -クリスタリン、DNAトポイソメラーゼ1、フィブロネクチン、 α -フォドリン(=スペクトリン)、グリア線維酸性タンパク質GFAP、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HSP10(=シャペロニン)、HSP27、HSP60、HSP70、インスリン、j α -1、リゾチーム、ミエリン結合タンパク質MBP、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、ニューロン特異エノラーゼNSE、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、 α -シヌクレイン、 β -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)、ピメンチンである。

30

40

【0078】

緑内障の第2の診断方法のステップc)における免疫学的アッセイを用いるタンパク質発現分析のさらに好ましい実施形態では、用いられる抗体は、この出願の第1の発明に開示される群2の36個の抗原の1つ以上に対する特異抗体である。これらの抗原は、アルブミン、 α -1-アンチトリプシン、アネキシンI-IV、アネキシンV、 α -2-アドレナリン受容体、脳由来の神経栄養因子BDNF、カルレチキュリン、カルジオリピン、 α -L-クリスタリン、 α -S-クリスタリン、 α -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 α -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、

50

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、 α -シヌクレイン、 β -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)である。

【0079】

緑内障の第2の診断方法のステップc)における免疫学的アッセイを用いるタンパク質発現分析のさらに好ましい実施形態では、用いられる抗体は、この出願の第1の発明に開示される群Aの24個の抗原の1つ以上に対する特異抗体である。これらの抗原は、アクチン、 α -1-アンチトリプシン、アネキシンV、 α -A-クリスタリン、 α -B-クリスタリン、 α -L-クリスタリン、 α -S-クリスタリン、 α -クリスタリン、 α -フォドリン(=スペクトリン)、グリア線維酸性タンパク質(GFAP)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、HSP27、HSP60、HSP70、j α -1、ミエリン結合タンパク質(MBP)、ニューロン特異エノラーゼ(NSE)、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(VEGF)、ピメンチンである。

10

【0080】

緑内障の第2の診断方法のステップc)における免疫学的アッセイを用いるタンパク質発現分析のさらに好ましい実施形態では、用いられる抗体は、この出願の第1の発明に開示される群AまたはBの33個の抗原の1つ以上に対する特異抗体である。これらの抗原は、アクチン、 α -1-アンチトリプシン、アネキシンV、 α -A-クリスタリン、 α -B-クリスタリン、 α -L-クリスタリン、 α -S-クリスタリン、 α -クリスタリン、 α -フォドリン(=スペクトリン)、グリア線維酸性タンパク質(GFAP)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、HSP27、HSP60、HSP70、j α -1、ミエリン結合タンパク質(MBP)、ニューロン特異エノラーゼ(NSE)、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(VEGF)、ピメンチン、アネキシンI-IV、 β -2-アドレナリン受容体、カルレチキユリン、熱ショックタンパク質HSP10(=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、 α -シヌクレイン、 β -シヌクレインである。

20

30

【0081】

ステップc)における免疫学的アッセイを用いるタンパク質発現分析のさらに好ましい実施形態では、細胞は溶解され、たとえば完全なタンパク質レパートリーまたは特異タンパク質分画物が、ウエスタンブロッティング、ELISA、ELISPOT、またはマイクロアレイにより分析される。

【0082】

マイクロアレイを含む実施形態の好ましい変形例では、単クローン抗体であり得る抗体または選択されたバイオマーカのための他の捕捉剤が、ガラススライドまたはシリコンもしくはニトロセルロース表面を含むがこれらに限定されないチップ表面のような担持要素の上に配置され、その後、当該チップは、ステップb)に従った処理の後で細胞から得られた細胞溶解物またはタンパク質製剤とともにインキュベートされる。他の好ましい変形例では、捕捉剤を担持する要素は、マイクロ流体チップまたはテストストリップである。

40

【0083】

さらに好ましい実施形態では、ステップc)のタンパク質発現分析は、細胞のインビトロ培養物においてその場で行われる。当該その場でのタンパク質発現分析は、標識付方法または標識付けのない方法と、細胞内または細胞外タンパク質の蛍光または化学ルミネッセンスマーキングのような比色法と、ELISPOT(Enzyme Linked Immuno Spot; 酵素結合免疫スポット)法の適用と、細胞内または上に標識付けしているタンパク質および培地などにおけるタンパク質を介した吸収の変化の測定とを含むがこれらに限定されない。その場でのタンパク質発現分析は好ましくは、ステップb)のための体液の除去の後、

50

細胞培養容器内で細胞に対して行われる。

【0084】

ステップc)の好ましい実施形態の第3の群では、細胞の生存度が分析される。細胞の生存度の分析は、たとえばフローサイトメトリー、および/または細胞成長パターンの分析、および/または生存度の監視、および/またはアポトーシスの監視、および/または壊死の監視による細胞計数を含むがこれに限定されない。好ましい方法は、壊死およびアポトーシスを検出するようアネキシンVおよびヨウ化プロビジウムにより細胞を標識付けすることと、細胞の生存度を検出するようWST-Test(水溶性テトラゾリウム)またはアラマブルーステイニング(alamar blue staining)をすることを含むがこれに限定されない。好ましい実施形態では、生存度の分析の異なる方法の結果が標準データと比較され、ステップd)に従った診断結果の決定のために組み合わせられる。さらに好ましい実施形態では、タンパク質発現分析を含むステップc)の好ましい実施形態の第1および/または第2の群の結果も、細胞の生存度の分析を含むステップc)の実施形態の第3の群の結果と組み合わせられる。

10

【0085】

ステップd)では、細胞のタンパク質発現分析および/またはステップc)の細胞生存度分析の結果が、診断結果を決定するよう標準データと比較される。ステップd)の好ましい実施形態では、標準データに対するテスト細胞のタンパク質発現の計算による比較が、当該技術において公知の計算方法を用いて行われる。

【0086】

いくつかの好ましい実施形態では、ステップd)において用いられる標準データは、並行して行われる緑内障の診断の方法のステップ(a)~(c)の対照試験に由来する。対照試験は、以下のサンプルのうち1つ以上を含むが、これらに限定されない。すなわち、当該サンプルは、緑内障患者の体液で処理された細胞と、健康な人からの体液で処理された細胞とである。緑内障患者の体液は、NTG(正常眼圧緑内障)またはPOAG(原発性開放隅角緑内障)のような特定の公知の形態の緑内障を患う緑内障患者からの体液、または当該疾患の初期段階のような当該疾患の特定の段階にある緑内障患者の体液を含む。他の好ましい実施形態では、このような標準データは、異なる時間で行われた対照試験の記録データに由来してもよい。

20

【0087】

ステップc)の好ましい実施形態の第1の群では、ステップd)において決定される診断結果は、テスト対象者の分析された細胞により発現されたタンパク質の複合タンパク質プロファイルを考慮したタンパク質発現分析により、健康な人と緑内障患者との間で異なる。

30

【0088】

ステップc)の好ましい実施形態の第2の群において、ステップd)において決定された診断結果は、ステップb)に従った体液での処理の後、細胞によって発現されたタンパク質のうち選択されたバイオマーカーを考慮したタンパク質発現分析により、健康な人と緑内障患者との間で異なる。

【0089】

ステップc)の好ましい実施形態の第3の群において、ステップd)において決定された診断結果は、ステップb)に従った体液による処理の後で細胞の生存度を考慮することにより、健康な人と緑内障患者との間で異なる。

40

【0090】

本発明に従った方法のさらに好ましい実施形態では、計算処理ステップは、ステップc)におけるタンパク質発現分析および/または細胞生存度分析の結果からのデータの処理と、ステップd)における標準データとのタンパク質発現分析の結果の比較のデータの処理との両方を組み合わせる。

【0091】

ステップd)のいくつかの好ましい実施形態では、タンパク質発現分析および/または

50

ステップc)の細胞生存度分析の結果の計算による比較が行われる。この比較は、当該技術において公知の計算方法に依拠している。ステップb)のテスト対象者の体液で処理された細胞のステップc)の結果と、患者または健康な人の可変の臨床群のような対照群からの体液でステップb)において処理された細胞のステップc)の結果に対応する標準データとの間にもっとも高い類似性のパターン。好ましい変形例では、当該標準データは、並行して行われる対照実験から得られ、他の変形例では、標準データは異なる時間に行われた対照実験に由来する。

【0092】

ステップd)における計算による比較の好ましい変形例では、プログラミングではなく経験から異なる臨床群同士を区別することを学習する人工ニューラルネットワークが用いられる。ステップd)に適用可能な人工ニューラルネットワーク技術の例は、多層フィードフォワードネットワーク(MLFFN)、自己増殖プロセスを有する人工ニューラルネットワーク、他の種類の学習アルゴリズム、ブルーニング技術、および遺伝的アルゴリズムを含む。

10

【0093】

本発明の方法は、タンパク質発現の結果を、複合タンパク質発現プロファイルまたはタンパク質分画物プロファイルの比較のための標準データと、限られた数のバイオマーカーもしくは抗原の発現の比較または細胞生存度分析の比較のための標準データと比較するために、ステップd)について本願明細書において明示したような計算技術だけでなく、たとえば他のパターンマッチング技術の使用、他の分類統計的手法の使用、または他の方法の使用といったような同様の技術も含む。

20

【0094】

いくつかの実施形態における緑内障の第1および第2の診断方法により得られる診断結果は、患者によって理解される準備ができていない診断結果であり、または他の実施形態では、診断結果は、医療専門家によって解釈されるべき1つ以上の診断値を含む。

【図面の簡単な説明】

【0095】

【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。

30

【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。

40

【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。

50

【図 1 1】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 1 0 % の血清を含む培地に加えられ、細胞は標準圧力または 1 5 0 0 0 パスカルの上昇された圧力のいずれかで 4 8 時間 3 7 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 4 0 0 の異なるタンパク質クラスターを数えた。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ーの非常に複雑な合計タンパク質プロファイルは、3 0 7 8 ダルトン (D a) ~ 1 8 3 2 2 2 D a の範囲にあった。ここで示される分画は、4 9 4 3 D a ~ 2 1 9 3 4 D a 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 9 1 9 2 ダルトン、1 2 3 9 0 ダルトン、および 1 2 3 1 4 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 5 9 . 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 1 4 % 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 1 1 . 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 9 1 9 2 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】5 0 . 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 (A N O V A) 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 1 3 . 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 5 5 のマハラノビス距離に示されるように、約 2 0 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

10

20

30

40

50

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 16 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 17】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 18】異なる濃度の 1 4 - 3 - 3 抗体と 1 . 5 μ 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 μ g / m l) 。

【図 19】異なる濃度の - シヌクレイン抗体と 5 0 μ M の H 2 O 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 2 O 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 2 O 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 2 O 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 μ g / m l) 。

【図 20】異なる濃度の G F A P 抗体と 5 0 μ M H 2 O 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 2 O 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 2 O 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 2 O 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 μ g / m l) 。

【発明を実施するための形態】

【0096】

緑内障の第 1 の診断方法に関する実施例および詳細な説明：

実施例 1：血清および眼房水における自己免疫反応性を、緑内障患者および健康な人における特徴的な差異と比較する抗原マイクロアレイ：

原発性開放隅角緑内障 (P O A G ; $n = 13$) を患う患者と、健康な対照 (C T R L ; $n = 13$) との血清および眼房水を抗体分析のために用いた。40 ~ 100 の異なる精製された抗原 (既知のバイオマーカ) を、ニトロセルロースがコーティングされたスライドの上にスポット配置することによりタンパク質アレイを調製した。当該アレイをそれぞれ、血清 (1 : 2 5 0) および眼房水 (1 : 2 0) とともにインキュベートした。抗体抗原反応の可視化のために、蛍光標識付けされた抗ヒト I g G 抗体でアレイを処理し、その後で蛍光スキャニングした。二次抗体から発せられた信号がデジタル化され、多変量統計的

10

20

30

40

50

手法によりスポット強度を比較した。

【0097】

結果：個人間の比較により、血清および眼房水の抗体パターン同士の間には一致もあるが違いもあることが分かった。眼房水および血清の両方において、POAG患者は、健康な被験者（ $P = 0.001$ ）と比較して、 -1 -アンチトリプシンおよびアネキシンVに対して2倍より大きく増加した反応性を示した。対照的に、 $-L$ -クリスタリンは、眼房水（POAG：ME = 5049；SD = 1638；CTRL：ME = 2119；SD = 673； $P = 0.01$ ）において有意に増加した平均（ME）反応性と、POAG患者の血清（ $P = 0.01$ ）において減少した反応性を示した。7つの抗原については、含まれた研究対象者のいずれも、眼房水において免疫反応性を示さなかった。各体液からの10個の抗体/抗原のバイオマーカパネルをそれぞれ用いて、約90%（ROC曲線；血清： $r = 0.91$ ；眼房水： $r = 0.93$ ）の特異度および感度で、特別なアルゴリズムを用いて、POAGとCTRLとを区別することができた。これらの結果により、緑内障患者の血清および眼房水における抗体反応性のアップレギュレーションおよびダウンレギュレーションの両方が確認される。さらに、血清に対する眼房水の反応性の増加は、目における局所的な抗体生成を示唆している。

10

【0098】

実施例2：血清および眼房水サンプルの取得

サンプルの取得は、人間を対象とする医学研究の倫理的原則についてのヘルシンキ宣言に従って行った。インフォームドコンセントを与えて、すべてのボランティアから血液および眼房水を収集した。血液サンプルを1000gで遠心分離し、血清をその後の分析のために -80 で保存した。眼房水サンプルは、サンプリングのすぐ後、 -80 で保存した。すべての参加者は、（ドイツのマインツ大学の）眼科部にてゴールドマン眼圧測定、光干渉断層撮影（OCT）、およびハイデンベルグ網膜トモグラフィ（HRT）を含む完全な眼科検査の対象となり、欧州緑内障協会のガイドラインに従って分類された。平均年齢が73（ $SD \pm 10$ ）歳の白内障手術を経験した31人の患者と、37人の原発性開放隅角緑内障患者（POAG；平均年齢：67歳、 $SD \pm 10$ ）とが、この研究に含まれていた。原発性もしくは続発性緑内障または白内障以外の眼疾患の臨床的症候のない42人の白内障患者は、他の研究に従って対照群（CTRL）とした。POAG患者のIOPは、薬物投与なしで、 > 21 mmHg（ゴールドマン眼圧測定により求めた）であった。POAG患者は、典型的な視野欠陥（周辺視野測定により検査した（OCTOPUS 101視野計；ドイツのヴェーデルのHaag-Strait社））を有するとともに、視神経乳頭陥凹を有した。自己免疫疾患を患う患者またはパーキンソン病のような神経疾患を患う患者は、この研究から除外した。

20

30

【0099】

実施例3：マイクロアレイの調製

Sigma-Aldrich社（ドイツ）およびBioMol社（ドイツのハンブルク）より購入した高度に精製されたタンパク質を抗原として用いた。最適な印刷条件のために1.5%のトレハロースを含むPBS緩衝液により抗原を $1 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ まで希釈した。ピエゾ分配に基づく非接触印刷技術（ドイツのベルリンのScienion社のsciFLEXARRAYER S3）と、一般に用いられるピンベースの接触印刷技術（アメリカ合衆国のアナーパーのDigilab Genomic Solutions社のOmniGrid100）とを用いて、抗原のスポット配置を行った。スポットの形態およびスポット間の変動性について比較により結果を評価した。研究用マイクロアレイの全セットの印刷のために、ピエゾベースのスポット配置技術を用いた。各抗原をニトロセルローススライド（アメリカ合衆国のベンドのGrace Bio-Labs社のOncyte, nitrocellulose 16 multi-pad slides）の上に3重にスポット配置した。陽性および陰性対照として、マウスの抗ヒトIgG/A/M（ $10 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ ）とスポットティング緩衝液とを用いた。当該スポット配置プロセスを、RTにて、湿度が30%で行った。1nlの各抗原希釈液をニトロセルロース表面に、全く

40

50

同じ位置に4回、250 μ lだけスポット配置することにより適用した。スポット体積の正確さおよび液滴の正確な配置を、sciDrop - VOLUMEおよび自動液検出ソフトウェア(ドイツのベルリンのScienion社)を用いて各抗原のスポット配置プロセスの前および後で監視した。

【0100】

インキュベーションおよび洗浄ステップをオービタルシェーカー(ドイツのシュヴァーバハのHeidolph社のTitramax 100)上で4で行った。スライドを16パッドFASTフレームハイブリダイゼーションチャンバ(イギリスのメードストンのWhatmann社)で覆い、4%BSAを含むPBSで1時間ブロックした。その後、0.5%のTween(PBS-T)を含むPBSでスライドを3回洗浄した。患者の血清をPBS中に1:250で希釈し、眼房水をPBS中に1:10の比率で希釈した。これらの希釈液の120 μ lを、調製された抗原スライド上で一晩、ランダムにインキュベートした。PBS-Tを用いるいくつかの洗浄ステップの後、スライドを(アメリカ合衆国のウェストグロブのJackson ImmunoResearch Laboratoriesのヤギ抗ヒトIgGであるPBS-T中に1:500で希釈された)蛍光Cy-5標識付けされた二次抗体とともに暗闇のなかで1時間インキュベートした。PBS-Tでの2つの洗浄ステップの後、HPLCグレードの水を用いる2つの最終洗浄ステップを行った。すべてのマイクロアレイを空気乾燥した後、マイクロアレイスキャナ(イギリスのハイウィクームのAffymetrix社の428 TM Array Scanner)を用いるスキャンニングを行った。スライドの生成された16ビットTIFFイメージ(タグ付けされた情報ファイル形式)をSpotfinder 3.1.1ソフトウェア(アメリカ合衆国のボストンのDana-Faber Cancer InstituteのTM4)を用いて分析した。バックグラウンド除去を、スポット強度=平均強度SP-(合計bkg-合計top5bkg)/(ピクセルSPの数-ピクセルtop5bkgの数)という式に従って行った。式中、SPは任意のスポットを示し、bkgは対応する背景を示し、top5bkgは背景ピクセルの上位5パーセントを示す。変動係数(CV)を以下のように計算した。 $CV = SDS P 3 / \text{平均} SP X \dots SP n$ 。式中、SDSP3は、1つのサンプルの1つの抗原の3つの反復されたスポットに亘る標準偏差を示し、平均SPX...SPnは、すべてのスポット強度平均を示す。

【0101】

実施例4: データの統計的分析

データ正規化および処理によるバイアスが引き起こした結果の歪み比較を提供するよう、まず曲線下面積(AUC)およびZスコアといった2つの異なる種類のデータ変換を生データと対比した。研究データの分析のために、Zスコア=(強度SP-平均強度SP1...SPX)/SDSPX...SPnという式に従ってZスコア変換を適用した。式中、SPは任意のスポット強度を示し、SP1...SPXはすべての46スポットの全体の強度を示す。潜在的なバイオマーカの検出および抗体反応性における有意な変化の概算を多様な統計的手法により行った。群同士の間の比較のため、一元配置ANOVAおよび多変量判別分析(たとえばマハラノビス距離、カノニカルルート)を両方のサンプル材料について別個に用いた。第2のステップでは、抗原の特定の集合から自己抗体パターンの分類率(classification power)の決定のために人工ニューラルネットワーク(ANN)を行った。したがって、データセットをランダムに、群ごとに偶数人の患者の2つの部分に分けた。半分をANNの学習のために用い、残りの半分を当該学習したANNをその分類率に関してテストするために用いた。そのため、学習データセット内に含まれるサンプルは、分類目的のために用いなかった。感度を特異度に対してプロットすることにより結果を可視化した(ROC曲線)。統計的分析のために適用された方法の詳細な説明は、本発明者らのグループの以前の出版物において見つけることができる。個体間の比較のためおよび対応する血清サンプルからの抗体レベルに対する眼房水の抗体レベルの割合を例証するために、各単一の患者についての血清値に基づき両者の間のパーセントの差を計算し、その後、異なる患者群のすべての被験者の平均値を計算した。100%より大きい血清と眼房水の

差が「有意」であると考えた。さらに、測定したデータをすべての収集した臨床記録に相関させた。(アメリカ合衆国のアリゾナ州のタルサのStatsoft社)のStatistica 8.0を用いて統計的な分析を行った。

【0102】

実施例5：GO分析

患者群同士の間有意差がある抗原の生物学的プロセスへの深い洞察を得るために、Cytoscape 2.6.2をBingo 2.3 plugin 50と組み合わせて用いた。ジーンオンロジー(GO)アノテーションを各抗原に割り当てるために、全GOアノテーションデータベースを用い、生物/アノテーションについては、ホモサピエンスを選択した。超幾何学的モデルおよびBenjaminiおよびHochberg偽発見率補正(Benjamini & Hochberg False Discovery Rate correction)($P < 0.05$)が、大きな比率を占めるタンパク質の機能の有意性を保証した。

10

【0103】

実施例6：緑内障スコアの決定の例示的な方法のためのスキーム

緑内障スコアを決定する第1のステップでは、テストサンプルおよび参照サンプルの自己抗体反応性の正規化された強度値の間の差異(%)を計算する。これらの差異(%)は、緑内障スコアを決定するよう、ニューラルネットワーク分析のための入力データとして用いられる。緑内障の診断方法の必要とされる感度および特異度に依拠して、ステップb)の血清を、サンプルの以下の3つの例示的なオプションのうちの1つ、すなわち第1の診断方法のステップa)に従って与えられるサンプル1)、2)または3)を用いてインキュベートした。サンプル1)は、群1の少なくとも部分的に精製された48個のすべての眼の抗原を含み、サンプル2)およびサンプル3)は、12個および5個の少なくとも部分的に精製された眼の抗原をそれぞれ含む。

20

【0104】

予想されるように、ステップa)に従ったサンプルによって構成される眼の抗原の数が多ければ多いほど、感度および特異度に関して、第1の診断方法がより良好になる。わずか5つの眼の抗原を有するサンプル3)でも、約90%の感度および特異度が得られた。

【0105】

さらに、緑内障スコア計算のために、サンプル1)、2)、および3)に含まれた個々の抗原に異なる重み付け係数を割り当てた。この割り当ては、高く重み付けされた抗原(たとえば群Aの抗原)は緑内障スコアに対して高いインパクトを有するように行った。

30

【0106】

規定された参照値とは異なる緑内障スコア、たとえば規定されたしきい値を超える緑内障スコアは、体液が緑内障患者から収集されたテストサンプルを特定する。

【0107】

自己抗体反応性からの正規化された強度値

以下の式による、参照値に対する強度の値の差異(%)の計算

【0108】

【数1】

40

$$\text{差異}(\%) = \frac{(\text{強度値}_{\text{患者}} - \text{強度値}_{\text{参照}}) * 100}{|\text{強度値}_{\text{参照}}|}$$

【0109】

緑内障スコアリング

計算された差異(%)をデータ入力とし、ニューラルネットワークアルゴリズムを用いる緑内障スコアの評価

1)すべてのテストされた抗原に基づくスコアリング

感度：96%

50

特異度：97%

2) MBP、GST、HSP27、プロテインキナーゼ阻害剤C、GFAP、Jo-1、ユビキチン、アクチン、 α -S-クリスタリン、HSP70、スーパーオキシドジスムターゼ、トランスチレチンを含む12個のテストされた抗原のサブセットに基づくスコアリング

感度：92%

特異度：94%

3) HSP70、アクチン、 α -S-クリスタリン、HSP27、GFAPを含む5つのテストされた抗原のサブセットに基づくスコアリング

感度：91%

特異度：88%

緑内障の診断に対するインパクトによると、ポストホックテストまたは判別分析のような統計的分析からのデータを考慮すると、抗原は、緑内障スコアの計算について異なる重みを有する3つの異なる群へと細分される。非常に強い群間差異を示す抗原は群Aに割り当てられ、強い差異を有する抗原は群Bに割り当てられ、異なる群間差異を有する抗原は群Cに割り当てられる。

【0110】

群A（非常に高い妥当性）：

アクチン、 α -1-アンチトリプシン、アネキシンV、 α -A-クリスタリン、 α -B-クリスタリン、 α -L-クリスタリン、 α -S-クリスタリン、 α -クリスタリン、 α -フォドリン（=スペクトリン）、グリア線維酸性タンパク質GFAP、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、HSP27、HSP60、HSP70、Jo-1、ミエリン結合タンパク質MBP、ニューロン特異エノラーゼNSE、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（VEGF）、ピメンチン

群B（高い妥当性）：

アネキシンI-IV、 α -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HSP10、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、 α -シヌクレイン、 β -シヌクレイン

群C（妥当な抗原）：

アルブミン、脳由来の神経栄養因子BDNF、カルジオリピン、DNAトポイソメラーゼ1、フィブロネクチン、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、3-ホスホセリン、チレオグロブリン、トポイソメラーゼ阻害剤

緑内障診断について非常に高い妥当性を示す抗原は群BまたはCからの抗原よりも強く重み付けされ、これにより緑内障スコアに対してより高いインパクトとなる。高い妥当性を有する抗原は、群Cからの抗原よりも強く重み付けされ、これにより、緑内障スコアに対して中程度のインパクトとなる。妥当な抗原は、評価された緑内障スコアに対して最も小さいインパクトとなった。

【0111】

規定されたしきい値を超えた被験者は緑内障患者として診断される。

【0112】

図1：接触印刷（A）およびピエゾエレクトリックベースのスポット配置技術（B）によって生成された抗ヒトIgG/A/Mの3つの反復されたスポットが示される。数字は、スポットごとのそれぞれの平均ピクセル強度を示す。A：すべてのスポットの平均強度は7173.32 ± 1473.27単位である。変動係数（CV）は0.21である。B：平均強度は、11716 ± 374.78単位である。CVは0.03である。

【0113】

再現可能な態様で異なる物性を有するタンパク質の特定のスポット配置に対する最良の

10

20

30

40

50

アプローチを見つけるために、2つの異なるスポット配置技術を比較した。反復したスポットに亘るスポット強度の変動を記述するのに一般的に用いられる方法は、変動係数4.5の決定である。ピンベースの接触印刷技術を用いて、すべての抗原について、3つの技術的な反復されたスポットに亘って0.32のメジアンCVを達成した。図1Aに示されるように、スポットの形態および強度は、当該反復されたスポットに亘って変動する。対照的に、非接触ピエゾベースのスポット配置技術によってスポット配置されたマイクロアレイは、10倍小さいスポット同士間の変動性(メジアンCV=0.029)を示すとともに、スポット形態においてはるかに良好な不変性を示した(図1B)。これらの発見は、sc i D r o p - V O L U M Eおよび自動液検出ソフトウェアから得たデータと一貫している。当該ソフトウェアは、すべての抗原の0.8%の液体積の変動(250 p lの液滴のうち2 p lに相当)を検出した。その結果、抗原溶液の正確に等しい体積のスポット配置を確実にするよう、非接触印刷技術が研究用マイクロアレイスライドの全体集合を印刷するために選ばれた。スポット配置技術の有効性のためにCVの概算と同様に、研究用マイクロアレイの技術的な反復されたスポットについてメジアン変動係数を計算した。これらのマイクロアレイは、0.031のメジアンCVを示し、標準偏差が0.061であった(単一の抗原についてのCVの分布に対する;図2A参照)。その一方、すべてのサンプルに亘って反復されたスポット上での測定された強度についてメジアン標準偏差は、抗原およびその平均スポット強度に依拠して44~480で変動する(図2B参照)。

10

【0114】

図2Aおよび図2B:図2Aは、研究用マイクロアレイ上の各抗原について項目化された生データの変動係数(CV)を示す図である。x軸は異なる抗原を示し、y軸はCV値を示す。すべての抗原に亘るメジアンCVは 0.031 ± 0.061 である。図2Bは、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生データの標準偏差(SD)を示す図である。x軸は異なる抗原を示し、y軸は標準偏差(SD)についての値を示す。

20

【0115】

研究対象患者およびテスト対象者の抗体プロファイリングのために、データ正規化のための異なるアルゴリズムの比較によって、Zスコア変換が、その研究対象群同士の間での比に対する低いバイアス(図3)と、異なる実験および緑内障テストに亘って定量的な態様で測定値を比較する可能性とにより本発明者らのアプローチに対してもっとも適用可能であることが明らかとなった。

30

【0116】

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。

【0117】

すべての研究対象患者において複合抗体反応性パターンと、血清および眼房水における緑内障患者と対照被験者との間の複数の差異(図4Aおよび図4B)とを検出できた。IgG/A/Mのレベルと患者の年齢または性別の間には相関がないことを発見した。さらに、血清(P=0.9、図5A)または眼房水(P=0.6、図5B)のいずれにおいても研究対象群のIgG/A/Mレベルに有意差は発見されなかった。

40

【0118】

図4:血清(A)および眼房水(B)について平均化された抗体強度のプロファイル。20の抗原について、対照被験者(CTRL)および原発性開放隅角緑内障(POAG)患者の平均化された強度が示される。ラインパターンは、患者群(赤=POAG、青=CTRL)を示す。X軸は、群同士の間でもっとも強い差を示した20の抗体のサブセットを示す。Y軸は、計算されたZスコアの値を示す。

【0119】

図5:抗ヒトIgG/A/Mについての決定値が箱ひげ図として示される。X軸は、異なる群(対照群(CON);緑内障群(POAG))を示し、y軸は測定および正規化された強度(Zスコア)を示す。血清(5A)または眼房水(5B)において、両方の群同

50

士の間には有意差は発見され得なかった ($P = 0.05$)。

【0120】

血清では、CTRL被験者と比較して、POAG患者はいくつかの免疫反応性の増加を示したが、いくつかの反応性の減少も明らかとなった (図4A)。実証されるように、HSP27、HSP70、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP)、またはアネキシンVは、対照群と比較して、POAG患者の抗体反応性の上昇を示した。グリア線維酸性タンパク質 (GFAP) またはユビキチンのような他の抗原については、POAG患者は健康な被験者よりも低い抗体反応性を示した。ミオグロビン、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (MOG)、およびDNAトポイソメラーゼ1については、検出不可能なまでの稀少または非常に小さな強度が発見された。一元配置ANOVAおよび多変量判別解析では、POAG患者および健康な対照の血清における全体の抗体反応性の間の有意差が明らかになった ($P = 0.002$) だけでなく、いくつかの単一の抗原については統計的有意差が明らかとなった。たとえば、POAG患者は、MBP ($P = 0.0028$)、HSP27 ($P = 0.019$)、HSP70 ($P = 0.0033$)、または - フォドリン ($P = 0.0027$) (表3) に対して有意に増加した反応性を示した。有意に減少した抗体の反応性は、GFAP ($P = 0.001$)、ユビキチン ($P = 0.0038$)、および - L - クリスタリン ($P = 0.03$) について観察された。

10

【0121】

緑内障の診断のツールとしての自己抗体反応性の潜在的な利用の文脈において、人工ニューラルネットワーク (ANN) を適用することにより、それらの分類率をテストした。患者 (CTRL $N = 18$ 、POAG $N = 17$) のサブセットと、9つの最も有意な血清抗体抗原反応性 (14 - 3 - 3、 - 1 - アンチトリプシン、 - L - クリスタリン、GFAP、HSP27、HSP70、MBP、 - フォドリン、ユビキチン) のデータとを用いてネットワークの学習を行った。その後、当該学習されたネットワークを未知の血清サンプルに適用した。ANNを通じて群分類を示すパーソナライズされたANNの各患者ごとの出力値は、組み合わされた抗体スコア (CTRL 0.5 、POAG 0.5) として用いられた。血清学習データセットのサンプルから計算された抗体スコアは、同じ患者の眼房水サンプルから計算されたスコア ($R = 0.74$ 、 $P = 0.001$ 、図6A) と強い正相関を示した。さらに、学習データセットに含まれなかった見込みのあるサンプル (CTRL $N = 13$ 、POAG $N = 20$; テストデータ) について、血清抗体スコアと眼房水抗体スコアとの間の相関を発見した ($R = 0.72$ 、 $P = 0.001$ 、図6B)。計算された抗体スコアを患者分類のために用いると、血清および眼房水抗体スコアによって、ただ1人の被験者 (CTRL) が誤ってPOAG被験者として分類されただけであった (図6B)。両方のサンプルタイプから計算されたスコアの強い正相関は、個人間の比較を介して検出された血清免疫反応性と眼房水免疫反応性との間の小さな差を強調する。見込みのある緑内障および対照被験者の区別のための感度および特異度は93% (図6C; $AUC = r = 0.93$) であった。

20

30

【0122】

図6: A、B: 血清および眼房水の抗体反応性の散布図である。X軸は、血清抗体スコアからの値を示し、Y軸は、眼房水サンプルからの値を示す。各ドットは単一の患者を示す (青いドット = POAG、赤いドット = CTRL)。A: 学習データセットの中に含まれるサンプルについての散布図である ($R = 0.74$)。B: すべての研究用サンプルについての散布図である ($R = 0.72$)。C: 見込みのある血清サンプル (X軸: 1 - 特異度、Y軸: 感度、 $r = 0.93$) についての受信者動作特性を示す。

40

【0123】

眼房水サンプルの検査も同様に、研究対象群同士の間でいくつかの差異を示した (図4B)。しかしながら血清サンプルとは異なり、ほんのいくつかの反応性の低下が現れただけであった。MBP、HSP70、アネキシンV、またはグルタチオンS - トランスフェラーゼのような抗原のほとんどは、POAG群については反応性の増加を示し、これらの内のいくつかは血清サンプルに従っている。インスリンB鎖またはMOGのようなその他

50

については、稀少な抗体反応性が眼房水において検出でき、これらは部分的に、血清において希薄な反応性を示した同じ抗原（たとえばM O GまたはD N Aトポイソメラーゼ1、表3）である。さらに、統計的分析は、両方のサンプルタイプ同士の間の類似性を裏付けする。このように得られたデータは、眼房水において、たとえばM B PについてはP 0 . 0 2 2、アネキシンVについてはP 0 . 0 3を示した。すなわち両方の抗原は、P O A G患者の血清においても有意に増加した値を示す。P O A G被験者とC T R L被験者との間の一変量の統計的な有意差の数が少ないのに一致して、眼房水サンプルの確認された分類率は血清サンプルの1つよりも小さくなった（R O C曲線；A U C $r = 0 . 7$ ）。

【0124】

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。

10

【0125】

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。C T R L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M B P、H S P 6 0、G F A P）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、P O A G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。

20

30

【0126】

図8：G Oアノテーションによる生物学的機能の分析により、いくつかの大きな比率を占める項目が明らかになった。抗原について超幾何学的モデルによる計算により、血清サンプルにおいて研究対象群同士の間に有意差が示された。x軸では、異なる官能基に起因するタンパク質の数が示される。官能基はy軸上にリスト化される。青いバーは、P O A G被験者における高い免疫反応性を有する抗原を示し、赤いバーは、緑内障患者における低い免疫反応性を有する抗原を示す。アスタリスクは、眼房水にも発見され得た官能基を示す。

【0127】

興味深いことに、ストレス反応、細胞骨格、小胞輸送、およびアポトーシスのような項目は、有意に大きな比率を占めている（図8）。細胞骨格または小胞輸送のような項目は、神経系のプロセスに強く関連付けられ、ストレス反応またはアポトーシスのようなその他の項目は、神経変性疾患に関連して考慮されなければならない。

40

【0128】

図9：A：緑内障患者の典型的な自己抗体パターン。リン酸緩衝化食塩水を用いて、乾燥されたシルマーストリップから涙のタンパク質を溶出し、その後、タンパク質マイクロアレイ上でサンプルインキュベーションを行った。B）受信者操作特性曲線（R O C曲線）。緑内障患者および健康な被験者の涙の自己抗体パターンを、緑内障患者のパターン認識に関連して人工ニューラルネットワークの学習のために用いた。y軸は感度を示し、x軸は1-特異度を示す。これらの自己抗体パターンを用いると、90%の特異度および

50

感度が達成することができた（曲線下面積： $r = 0.93$ ）。

【0129】

図10：週ごとのマイクロアレイデータの変動性。標準的な血清を連続する7週間インキュベートした後、変動係数（CV）の計算を行った。いくつかの異なる抗原について、標準偏差を含むCV（黒のバー）が示される。

【0130】

タンパク質マイクロアレイアプローチを用いて、当該技術において公知のように、緑内障患者の血清および眼房水における抗体反応性の差異を確認できた。さらに、 α -1-アンチトリプシンまたはアネキシンVといったいくつかの新しい抗原が、緑内障においてインパクトを有することが分かった。対照被験者と比較して、POAG患者の血清および眼房水における有意に増加した免疫反応性と、緑内障被験者の血清における有意に縮小した反応性とを検出した。たとえばアネキシンV、シャペロニン、HSP27、HSP60、HSP70、またはMBPといったいくつかの抗原については、緑内障患者の眼房水および血清サンプルにおいて、患者群同士の間と同じ種類の差異が観察され得た。すなわち、両方のサンプルタイプの間類似性に対する第1の暗示が与えられた。一般的に、対照被験者と緑内障患者との間の差異は、血清サンプルにおける11の有意差と対照的に、両方の群の間に8つの一変量の有意差のみが検出され得る眼房水サンプルにおいてより少ないように思われる。眼房水および血清の個人間の比較により、たとえばMBP、GFAP、または α -1-アンチトリプシンといったいくつかの抗原が対照被験者の両方のサンプルタイプの間有意に異なる免疫反応性を示すことが明らかになった。さらに、緑内障被験者のサンプルにおいては、たとえばアルブミンまたはトランスチレチンといったいくつかの抗原が、両方の体液の免疫反応性パターン同士の間で統計的な有意差を示す。血清サンプルと比較するとトランスチレチンは、POAG患者の眼房水において、より高い自己抗体反応性を示した。この結果は、より多くの量のトランスチレチン自体がPOAG患者の眼房水に発見され得たという事実を考慮すると非常に興味深い。全体では、健康な被験者およびPOAG患者において、抗原抗体反応性の80%より多くが両方の流体において一致することが分かった。この結果は、緑内障発病の場所である網膜へ密に接触する眼房水のような眼液における免疫反応性が、抗体の点において、血清における全身的な免疫反応性とあまり異ならないということを示している。したがって、この知見は、緑内障患者の血清抗体パターンにおける検出された変化の特異度を際立たせ、他の眼の疾病にとっても重要であり得る。

【0131】

緑内障の第2の診断方法に関する詳細な説明および実施例：

緑内障を検出するための第2の方法の好ましい実施形態によると、ステップa)については、神経網膜細胞系R28または網膜の前駆細胞系RGC5の細胞培養物が与えられ、ステップb)において、当該細胞が、通常の圧力または15000パスカル（Pa）の上昇された圧力の下、対照の人からの血清と、原発性開放隅角緑内障（POAG）、正常眼圧緑内障（NTG）、および高眼圧症（OHT）を患う患者からの血清とで処理される。高眼圧症患者（OHT）は、視神経損傷または視野損失といった緑内障の症状が存在せず、正常より高い眼内圧を有する。

【0132】

当該実施例では、以下の材料および方法を用いた。しかしながら、本発明は以下に示される材料および方法の組合せに限定されず、以下に記載される方法は、対応する目的のために用いられる代替的な方法と置き換えられてもよい。

【0133】

細胞培養：[G.M. Seigel; Ross Eye Institute, University of Buffaloから提供された]神経網膜細胞系R28を用いた。これは、生後6日のスプレグドローリーネズミに由来する神経網膜細胞系であり、E1A遺伝子の12S部分にて不死化される。当該細胞系は、網膜神経節細胞、光受容細胞、ミュラー細胞といった網膜の前駆細胞、およびグリア細胞の特性を示す [Seigel, G.M., A.L. Mutchler, and E.L. Imperato, Expression of

10

20

30

40

50

glial markers in a retinal precursor cell line. *Mol Vis*, 1996. 2: p. 2]。培養物は、10%のウシ胎仔血清 (FBS; ベルギーのベルビエの Cambrex Bioscience 社) と、5 mg/ml のゲンタマイシン - グルタミン溶液 (シュタインハイムの Sigma - Aldrich GmbH) と、10%のMEMビタミン (100x (Invitrogen 社)) と、10%のMEM非必須アミノ酸 (100x (Invitrogen 社)) とを含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) に維持した。当該細胞は、4 ~ 5 日毎に非酵素的細胞剥離用溶液 (シュタインハイムの Sigma - Aldrich GmbH) が通過され、95%の空気と5%CO₂との湿気のある雰囲気にて37 で成長された。[フォートワースの UNT Health Science Center の N. Agarwal から提供された] 網膜の前駆細胞系 RGC5 は、神経細胞および網膜細胞に対するマーカーを発現する E1A 遺伝子の 12S 部分で同様に不死化された網膜細胞系である [Krishnamoorthy, R. R., P. Agarwal, et al. (2001). "Characterization of a transformed rat retinal ganglion cell line." *Brain Res Mol Brain Res* 86 (1-2): 1-12.; Van Bergen, N. J., J. P. Wood, et al. (2009). "Recharacterization of the RGC-5 retinal ganglion cell line." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50(9): 4267-4272.]。培養物は、10%のFBSと、100 U/ml のペニシリンと、100 μg/ml のストレプトマイシンと、2 mM のグルタミンとを含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) に維持され、5%のCO₂を有する湿気のある大気において37 で成長された。当該培地は、2日おきに交換され、当該細胞は4 ~ 5日毎に非酵素的細胞剥離用溶液を通過された。

10

20

【0134】

細胞溶解物の調製：いくつかの実験では、当該培地は48時間後、排出され、5 ml の実験プレートの底部上で成長している細胞を5 ml のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS; Invitrogen 社) で2回洗浄した。400 : 1の割合で加えられたプロテイナーゼ阻害剤ミックス (P1860 (シュタインハイムの Sigma - Aldrich GmbH)) を有する100 μl の溶解緩衝液 (尿素9.5 M、Chaps 2%、DTT 1%) を当該細胞にピペットで移した。次いで、これらをプレートから削り取り、氷で冷却されたエッペンドルフチューブの中に与えた。次いでこれらの細胞を、振幅が80%とし周波数/サイクルが3 x 25時間について0.5とした超音波パルスエコー機器 (Labsonic (登録商標) M (ゲッティンゲンの Sartorius 社)) を用いて溶解した。24のウェルプレートにおいて、150 μl のPBSで当該細胞を2回洗浄した後、付加的なプロテイナーゼ阻害剤ミックスを有する60 μl のSeldi緩衝液を加えた。細胞を再びウェルの底部から削り取り、上述したように溶解させた。超音波パルスエコー機器を用いる各溶解サイクルの後、当該細胞を氷の上に配置した。次いで、5 ml の実験ウェルプレートからの細胞溶解物のタンパク質濃度をLowryの方法を用いて測定した [Lowry, O.H., et al., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951. 193(1): p. 265-75]。

30

【0135】

さらなる実験において、培地を排出し、細胞を暖かいカルシウムのないPBSで洗浄した。次いで、細胞を非酵素的細胞剥離用溶液を用いて細胞培養プレートから剥離した。剥離した細胞を10分間、4 で300 gにて遠心分離した。上澄みを除去し、細胞ペレットをPBSで洗浄した。当該細胞を再び遠心分離し、上澄みを除去し、細胞を-80 で凍結した。凍結の後、細胞を解凍し、0.1%のドデシルD - マルトシドおよびプロテイナーゼ阻害剤を有する溶解緩衝液を加えた。氷で冷却した超音波処理槽の中に溶解緩衝液とともに当該細胞を1分間配置することにより細胞溶解を強めた。さらに、Lowryの方法を用いてタンパク質濃度を測定した。

40

【0136】

細胞溶解物からの総タンパク質の調製：細胞のタンパク質プロファイルを測定するために、上記のように調製した細胞溶解物からタンパク質の150 μg相当を除去し、-80 の8倍量 (体積) のアセトンのサンプルへの追加により、アセトンにて当該タンパク質

50

を沈殿させ、30分間、氷の上でインキュベートした。次いで、サンプルを30分間、4で14000rpmにて遠心分離した。次いで、アセトンを排出し、PBSを当該タンパク質ペレットに加え、タンパク質の最終濃度を $8\mu\text{g}/\mu\text{l}$ とした。タンパク質をPBS中に溶解するために、当該チューブを超音波氷槽に30分間、配置した。次いで、当該サンプルの $2\mu\text{l}$ をSeldi-ToF-MSのタンパク質チップ上にスポット配置した。

【0137】

オービトラップ(Orbitrap)によるペプチドフラグメントの分析：ドデシル-D-マルトシドを用いる方法に従って調製された細胞溶解物から $60\mu\text{g}$ 相当のタンパク質を取得し、12%ビス-トリスゲル電気泳動(Invitrogen社)を用いて分離した。これらのレーンを16の等しいサイズの片に分割し、これらの片におけるタンパク質をトリプシンで消化した。消化の後、ゲルからタンパク質を抽出し、各片のタンパク質をC18ジップチップ(ZipTIPS)を用いて8つの異なる分画物にさらに分別した。これらのジップチップには、サンプルが装填され、チップ部から10%~50%のアセトニトリル勾配を用いてペプチドが解放された。次いで、当該分画物はオービトラップターゲット上に装填され、シナピン酸マトリックスで覆われる。製造者のプロトコルに従って、オービトラップによりペプチドを測定した。たとえばオービトラップを用いてペプチドを測定することによって得られたペプチドの質量についての情報は、いくつかのデータベースに送られ、当該データベースに記録されたタンパク質の既知のペプチドフラグメントと比較された。測定されたタンパク質のリストが生成された。異なる実験群における測定されたタンパク質の強度が生成および比較された。

10

20

【0138】

Seldi-ToF質量分析による総細胞タンパク質の分析：タンパク質プロファイルを分析するために、(たとえばアメリカ合衆国のカリフォルニア州のハーキュリーズのBioRad社またはフリーモントのCiphergen Biosystems Incにて商業的に利用可能な)表面増強レーザ脱離/イオン化飛行時間形質量分析計PBS-II SELDI-TOFを用いた。この質量分析計は、異なる化学的表面を有するタンパク質チップを用いる。弱いカチオン交換体(CM10)または逆相面(H50)のいずれかを有する、8か所スポット配置されたいくつかのチップ上に各サンプルが装填された(これらを製造者のプロトコルに従って処理した後)。サンプルを乾燥させた後、 $1\mu\text{l}$ のシナピン酸マトリックス、エネルギー吸収分子、(20mg のシナピン酸、 $750\mu\text{l}$ のACN、 $750\mu\text{l}$ の H_2O -HPLC、 $15\mu\text{l}$ のTFA)が各スポット上に2回ピペットで移され、常に結晶化することを可能にする。次いで、Protein Chip Softwareバージョン3.2を用いて一度に24のチップを分析することができるタンパク質チップアレイオートローダとともに、PBS-IIc Protein Chip Readerを用いてサンプルを分析した。これらのサンプルは、200までのレーザ強度、デフレクタ設定を2800Da、検出器感度を9、分子質量検出範囲を3000~200000Da($3000\sim 15000\text{Da}$ に最適化)とし、測定した。

30

【0139】

Seldi-ToF-MSによって測定したタンパク質プロファイルのピーク検出：次いで、測定したタンパク質プロファイルをCiphergen Express Data Manager Softwareバージョン3.0(CE; Ciphergen Biosystems社)に送った。ベースラインが控除され、ピークが製造プロトコルに従って検出された。

40

【0140】

検出されたピークから、各実験設定毎のピーククラスタのリストを生成した。これらのクラスタリストを統計的分析プログラム(Statistica、バージョン8.0; オクラホマ州のタルサのStatsoft社)にエクスポートした。このプログラムは、複数のバイオマーカーピークの組合せに基づき多変量判別分析を計算するのに用いられた。当該プログラムは、どのタンパク質ピークが個々の実験群同士の間で有意に異なるかを示す

50

ことができるとともに、群同士の間を識別するよう用いられ得る。POAG血清とともにインキュベートされた細胞を健康な血清とともにインキュベートされた細胞と比較する第1の研究において、異なる群同士の間での識別が最も可能なピークを示した10のタンパク質の集団のバイオマーカーパネルを検出した。

【0141】

統計的分析による、上昇された圧力がある状態またはない状態での異なる血清とともにインキュベートされた細胞のタンパク質発現分析の結果に比較：従属変数（血清タイプ/圧力高度）の影響と、細胞のタンパク質プロファイルについての独立変数の影響とを決定するために、統計を用いて分散成分および混合モデルANOVAを計算した。この計算は、存在するバイオマーカーパネルのカノニカルルートに基づいた。さらに、単一のタンパク質バイオマーカー毎にこれらの変数の影響を計算した。さらに、この分析は、タンパク質プロファイルに対する血清における抗体の影響を計算するよう行う。さらに、抗体除去の後でタンパク質プロファイルが変化する方向を示すようマハラノビス距離を計算した。

10

【0142】

当該計算されたバイオマーカーを用いて、受診者動作曲線（ROC）を計算した。感度が88%および特異度が90%で緑内障血清の検出を実証することができた。図17に示されるように、曲線下面積は $r: 0.92$ である。

【0143】

さらに、ニューラルネットワークを生成した。これは、タンパク質プロファイルのピーク情報が与えられた統計的データモデリングツールである。データが十分に有意/有力な場合、当該ネットワークは実験群同士を区別するよう学習する能力を有するとともに、新しいサンプルを特定することが可能/新しいサンプルを合致した群に関連づけることが可能である。

20

【0144】

タンパク質特定：Seldi-ToF MSを用いて測定されたタンパク質バイオマーカーを特定するために、Maldi-ToF-ToF MSを用いた。細胞溶解物におけるタンパク質は、アセトン沈殿を用いて調製した後、実験の毎に200 μ g相当のタンパク質を用いてSDS-Pageを介して分離した。残存するペレットを、15 μ lのH₂Oで希釈した5 μ lのNuPage（登録商標）LDS Sample buffer 4x（Invitrogen社）に溶解した。90 $^{\circ}$ Cで5分間タンパク質を変性した後、NuPage（登録商標）MES SDS Running Buffer 20x（Invitrogen社）を用いて、12%のビス-トリゲル（Invitrogen社）により分離した。この実験の後、10分間、ゲルを固定液（40mlのH₂O、50mlのメタノール、10mlの酢酸）でインキュベートし、その後、製造者のプロトコルに従って一晩に亘って、染色液（Invitrogen社のColloidal Blue着色キット）（55mlのH₂O、20mlのメタノール、20mlの着色剤A、5mlの着色剤B）でインキュベートした。バイオマーカーを含むゲルのバンドにおけるタンパク質を、以下のプロトコルに従って溶出した。すなわち、当該バンドの2x1mm分画物をゲルから切り出し、100 μ lの洗浄液（50%メタノール、40%H₂O、10%酢酸）の中に移し、活発な揺動とともに30分間インキュベートし、その後、100%のACNにより20分間、脱水した。次いで、50 μ lの溶出液（50%ギ酸、25%ACN、15%イソプロパノール、10%H₂O）を乾燥されたゲル片に加え、4時間インキュベートした。2 μ lのサンプルをSeldi-ToF MSにより測定し、溶出されたタンパク質を示した。当該タンパク質をSeldi-MSを用いて示した後、消化を行った。バンドの残りは、小さな片に切断し、50 μ lのACNを15分間加えた。短い遠心分離およびACNの排出の後、ゲル片をスピードバックドライヤで10分間乾かし、50 μ lのトリプシン緩衝液（50mMのNH₄HCO₃、14.8ng/ μ lのトリプシン）で覆い、およそ12時間、37 $^{\circ}$ Cで放置した。消化されたタンパク質に20 μ lの25mMのNH₄HCO₃を加え、その後、当該消化されたタンパク質を、30分間のインキュベーションにより、20 μ l抽出溶液（5%ギ酸；50%ACN；45%H₂O）を用いて抽出し

30

40

50

た。重層法を用いて、 $2 \times 0.5 \mu\text{l}$ ケイ皮酸マトリックスを用いて $1 \mu\text{l}$ の消化されたタンパク質を MALDI アンカーターゲット (anchor target) 上に装填した。製造者プロトコルに従って Mal di - T of T of MS (Bruker Ultra Flex II) を用いて、分別されたタンパク質を測定した。

【0145】

1つの好ましい実施形態に従った緑内障の診断テストの実施例1~4における設定が図11において概説される。上述した細胞培養条件に従って、5mlの(nunc lon Surface)実験プレートにおいて実施例1を実施した。実施例2および3は、24のウェルプレートにおいて実施され、その細胞培養条件は以下のように若干適合させた。細胞をca40%のコンフルエントにプレートに配置し、FBSではなく10%の実験血清を含む上記にリスト化されたDMEM培地で処理した。次いで、95%の空気と5%のCO₂との湿気のある雰囲気において37°Cで48時間、15000パスカル(112mmHg)の上昇した圧力がある状態またはない状態のいずれかで、これらをインキュベートした。上昇した[静水圧の]圧力を生成するために、特別に設計されたガラス圧力チャンバを用いた。37°Cのインキュベータに配置し、95%の合成空気と5%のCO₂を含む(ルートヴィヒスハーフェンのAir Liquide社)圧縮空気供給装置に取り付けた。実施例4における細胞を、上述した細胞培養条件に従って、10mlの細胞培養プレートにおいて成長させた。

10

【0146】

実施例A

実施例Aを5ml(nunc lon Surface)実験プレートにおいて実施した。通常の圧力または上昇された圧力のいずれかが存在した状態において健康な血清とともにインキュベートした細胞のタンパク質プロファイルを、POAGを患っている患者からの血清とともにインキュベートした細胞のタンパク質プロファイルと比較した。各群におけるサンプル数は、4つの異なる血清サンプルを用いて、n=8であった。患者を欧州緑内障協会のガイドラインに従って分類した(The European Glaucoma Society. Terminology and Guidelines for Glaucoma. <http://www.eugs.org>. 2004)。

20

【0147】

判別分析は、タンパク質プロファイル分析の前の細胞の処理に依拠して、細胞において有意にアップレギュレートまたはダウンレギュレートした10のタンパク質のパネルを示した。A: 圧力がある状態での健康な人からの血清を用いた処理; B: 圧力がない状態での健康な人からの血清を用いた処理; C: 圧力がある状態でのPOAG患者からの血清を用いた処理; D: 圧力がない状態でのPOAG患者からの血清を用いた処理。図13は、群のうちのいくつかにおいて有意差をすべて示す分子量9192、12390、12314Daを有するタンパク質バイオマーカの3つの例を示す。図13は、圧力がある状態およびない状態の両方でPOAGを患っている患者からの血清で処理された細胞においてアップレギュレートされた9192Daのバイオマーカを示す(p=0.000058)。12390ダルトンのバイオマーカは、図13に示されるように15000paの上昇した圧力でPOAG血清とともにインキュベートされた細胞においてのみ有意に(p=0.000086)ダウンレギュレートした。この判別分析はさらに、血清のタイプにかかわらず圧力がある状態で処理された細胞において有意に(p=0.000000)ダウンレギュレートされたバイオマーカを示した。例として、図13は、12314ダルトンのバイオマーカを示す。

30

40

【0148】

図14aは、上述したようなさまざまな処理A、B、C、またはDによるタンパク質プロファイルにおける差異への寄与を示す。細胞のタンパク質プロファイルに対する、血清タイプ、圧力、および血清タイプと圧力との両方の組合せの全体の影響を見て、分散分析を計算した。図14は、血清タイプがタンパク質プロファイルに対して最も大きな影響、すなわち59.1%を有したことを示す。圧力自体は、タンパク質プロファイルに対して11.6%の影響を有した。したがって、タンパク質プロファイルにおける差異によって

50

証明されるタンパク質発現に対する影響は、大気圧と比較して上昇された圧力がある状態で細胞を処理することと比較して、健康な人の血清ではなく P O A G 患者の血清で細胞を処理することにより、はるかに大きくなる。

【 0 1 4 9 】

血清タイプの大きな影響は、全体のタンパク質プロファイルについてのみでなく、選択されたバイオマーカについて分散分析を計算した場合にも見ることができた。たとえば、図 1 4 b は、9 1 9 2 ダルトンのバイオマーカについての以下の分散分析を示す。ここでも、血清タイプの影響は最も重大であり、5 5 . 1 % の有意な効果を有するよう示され得た。

【 0 1 5 0 】

実施例 1 のこれらの結果は、健康な人および / または P O A G 患者からの血清で処理された細胞と比較した、テスト対象者の血清で処理された細胞のタンパク質プロファイルの分析が、P O A G 疾患を診断するための高感度なテストとして機能するというを示す。

【 0 1 5 1 】

上述したように、好ましい変形例では、発現レベルが健康な人と比較して緑内障患者において増加もしくは減少する、または通常の細胞成長と比較して、他の自己免疫障害もしくは神経変性障害もしくはアポトーシスの間に増加もしくは減少することが分かっているバイオマーカまたは抗原が選択される。このようなバイオマーカの例は、ヒストン H 4 である。実施例 A (図 1 3) における 9 1 9 2 ダルトンのこのタンパク質は、M A L D I - T O F - T O F - M S により、ヒストン H 4 タンパク質のフラグメントとして特定された。

【 0 1 5 2 】

実施例 1 では、ヒストン H 4 発現のレベル、すなわち 9 1 9 2 ダルトンのバイオマーカは、緑内障を患っている患者からの血清とともにインキュベートした細胞において有意に増加した。この影響は、上昇された圧力がある状態で付加的にインキュベートすることにより増加した。

【 0 1 5 3 】

ヒストン H 3 および H 4 は、真核細胞におけるクロモゾームのヌクレオソームコア粒子へと集合するコアヒストンに属し、さらに遺伝子調節において伴われる。ヒストン、特に H 3 および H 4 は、たとえばアセチル化またはメチル化により翻訳後に修飾され得る。医学研究の結果、ヒストンの発現レベル、修飾、および位置における変化は、いくつかの他の神経変性疾患、たとえばアルツハイマー病およびパーキンソン病とも関連付けられるということが明らかになっている。興味深いことに、ヒストンは、いくつかの神経変性疾患の病理学的なメカニズムに關与するだけでなく、ヒストン発現および修飾における変化によって影響を受ける大腸癌細胞のような癌細胞にも關与する。ヒストンの生理学的な關与を考慮すると、ヒストン発現のレベルの変化は、アポトーシスへとつながることになる。これは、緑内障が網膜神経節細胞のアポトーシスを伴うという事実と合致する。したがって、緑内障の病気に關連することが既知であるバイオマーカもしくは抗原、またはさらにより一般的には自己免疫疾患もしくは神経変性疾患もしくはアポトーシスに關連することが既知であるバイオマーカもしくは抗原は、ステップ c) における選択されたバイオマーカに向けられたタンパク質発現分析についての有望な候補である。

【 0 1 5 4 】

別の興味深い発見は、上昇された圧力がある状態での 4 8 時間のインキュベーションの間、P O A G 血清とともにインキュベートされた細胞の 3 5 % までが生存力を失った一方、健康な血清とともにインキュベートされた細胞のうち約 1 0 % のみが死んだ。

【 0 1 5 5 】

実施例 B

2 4 のウェルプレートにおいて実施例 B を実施した。対照として、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を、原発性開放隅角緑内障 (P O A

10

20

30

40

50

G)、正常眼圧緑内障(NTG)、および高眼圧症(OHT)を患っている患者から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と比較した。

【0156】

タンパク質プロファイルはさらに、非常に複雑なパターンを示した。図16は、測定されたタンパク質の範囲の拡大図を示す図である。判別分析はさらに、有意なバイオマーカのパネルを明らかにした。POAG血清を用いる第1の研究で見られるバイオマーカのいくつかは、上で見られたようにアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションの点において同じ効果を示すこの実験においても見つけられ得る。これらのバイオマーカのうちの1つは、9207ダルトンであり、POAG血清のみを用いた第1の実験において見られた9192ダルトンのバイオマーカと均等であるとみなされ得るとともに、緑内障患者からの血清とともにインキュベートされた細胞において増加された。バイオマーカは、図16bに示され得る。以前の実施例に示されるように、バイオマーカは、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アップレギュレートされる。

10

【0157】

実施例Bは、以下の別の興味深い結果を産出する。OHTを患っている患者の血清で処理された細胞は、全タンパク質プロファイルと、健康な人からの血清で処理された細胞として選択されたバイオマーカとの両方について非常に類似したタンパク質発現プロファイルを有する。この結果は、眼内圧が上昇した人々の約1%のみが緑内障を発症するという臨床的観察に合致しており、本発明に従った方法の利点は、この方法は緑内障を発症することになる高眼圧を有する人々を特定することができるという点である。

20

【0158】

実施例C

24のウェルプレートにおいて実施例Cを実施した。対照として健康な血清とともにインキュベートした細胞のタンパク質プロファイルを、抗体を含むかまたは血清から抗体を取り除いた後のPOAGを患っている患者からの血清とともにインキュベートした細胞のタンパク質プロファイルと比較した。抗体は、免疫グロブリンについてのアフィニティーマトリックスでコーティングされた磁性のプロテインGビード(Dynabeads(登録商標)Protein G;ノルウェーのオスロのDyna1 Biotech ASA社)を用いて取り除いた。20 μ lのビードを用いて35 μ lの血清を精製した。ビードを用いるために、pH5の600 μ lのNaAcで、2回は2分間、1回は5分間、ビードを洗浄した。次いで、ビードを血清に加え、12でオービタルシェーカー上にて6時間インキュベートした。

30

【0159】

健康な人からの血清で処理された細胞のタンパク質プロファイルと比較して、POAG患者からの血清で処理された細胞のタンパク質プロファイルと、抗体が上記のように取り除かれたPOAG患者からの血清で処理された細胞のタンパク質プロファイルとにおける変化についての分散分析を図15に示す。タンパク質プロファイルに対する抗体の影響は50.5%と同じぐらい高い。マハラノビス距離の計算により、抗体除去の後でPOAG血清とともにインキュベートした細胞のタンパク質プロファイルが、健康な血清とともにインキュベートした細胞に対して有意に変化したことが明らかになった。すなわち、POAG血清とともにインキュベートし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よって示されるように、健康な血清によってインキュベートしたタンパク質プロファイルとはより異なる。抗体(POAG抗体)が取り除かれたPOAG血清とともにインキュベートした細胞のタンパク質プロファイルは、約20のマハラノビス距離によって示されるように健康な血清とともにインキュベートしたタンパク質プロファイルとはあまり異ならない。

40

【0160】

これらの結果は、健康な対照の人に対する、緑内障患者に由来する体液における自己免疫反応性の差異に基づき緑内障を診断するための第1の方法において提示されるデータと合致する。

50

【 0 1 6 1 】

実施例 D :

P O A G または健康な血清とともに 2 4 時間インキュベートされた R G C 5 細胞を用いて 1 0 m l の細胞培養皿において実施例 D を実施した。タンパク質またはペプチドパターンをオービトラップを用いて測定した。さらに、細胞溶解物は非常に複合的であり、予備的研究において、1 5 0 を超えるタンパク質がオービトラップにより検出された。オービトラップによって測定された当該タンパク質の強度の差異を分析した後、実験群同士の間
の有意差を検出し得た。たとえば熱ショックタンパク質 6 0、フィラミン B、またはアクチンといった、健康な血清とともにインキュベートした細胞において有意にアップレギュレートされたタンパク質と、たとえば延長因子 1、T - 複合タンパク質 1 サブユニット B、ホスホグリセレートキナーゼ 1 といった P O A G 血清とともにインキュベートした細胞においてアップレギュレートされたタンパク質とを検出することができた。

【 0 1 6 2 】

【表 1】

タンパク質	健康	POAG
フィラミン-B (FLN-B) (β -フィラミン) (アクチン結合様タンパク質) (ABP-280様タンパク質) - (マウス)	16042	9315
アクチン、細胞質1 (β -アクチン) - (マウス)	28305	15835
60 kDaの熱ショックタンパク質、ミトコンドリア前駆体(Hsp60)(60 kDaのシャペロニン)(CPN60)(熱ショックタンパク質60)(HSP-60)(ミトコンドリア基質タンパク質P1)(HSP-65) - (マウス)	16857	9368
延長因子1- α 1 (EF1- α -1)(延長因子1A-1)(eEF1A-1)(延長因子Tu)(EF-Tu) - ハツカネズミ - (マウス)	12445	38739
T-複合タンパク質1サブユニット α B (TCP-1- α (CCT-アルファ)(Tailless複合ポリペプチド1B)(TCP-1-B) - ハツカネズミ (マウス)	9592	20470
ホスホグリセレートキナーゼ1 (EC2.7.2.3) - ハツカネズミ (マウス)	12914	29310

10

20

30

40

50

【0163】

緑内障についての抗体の治療用途に関する実施例：

実施例 i：

ウェルにつき45000個の細胞を有する24のウェルプレートにRGC5細胞を配置した。次いで、緑内障について診断能力(群1からの抗体)を有することが知られる、異なる濃度の14-3-3(プロテインキナーゼc阻害剤)抗体で3時間、細胞をプレインキュベートした。細胞ストレスおよび細胞死を誘発するために、RGC5細胞を1.5 μ Mのスタウロsporinにてインキュベートした。5時間後、細胞の生存度をクリスタルバイオレットを用いて測定した。異なる濃度の14-3-3抗体とともにインキュベートした場合、ストレスを受けた細胞の生存度の有意および非常に著しい増加を検出することができた。1 μ g/mlの14-3-3抗体とともにインキュベートした細胞について、7

．4%の有意に増加した生存度 ($p < 0.05$) が検出され得た。0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の 14-3-3 抗体とともにインキュベートした細胞において、11.6%の生存度の非常に有意な増加 ($p < 0.01$) が検出された (図18)。

【0164】

実施例 i i :

ウェルにつき45000個の細胞を有する24のウェルプレートにRGC5細胞を配置した。次いで、緑内障について診断能力(群1からの抗体)を有することが知られる、異なる濃度の -シヌクレイン抗体で3時間、細胞をプレインキュベートした。細胞ストレスおよび細胞死を誘発するために、RGC5細胞を50 μM の H_2O_2 にてインキュベートした。1時間後、細胞の生存度をクリスタルバイオレットを用いて測定した。異なる濃度の -シヌクレイン抗体とともにインキュベートした場合、ストレスを受けた細胞の生存度の有意および非常に有意な増加を検出することができた。異なる抗体濃度(0.05、0.5、1および5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の -シヌクレイン抗体とともにインキュベートした細胞において、15.3%までの有意に増加した生存度 ($p < 0.05$) が検出され得た。1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の -シヌクレイン抗体とともにインキュベートした細胞について、13.2%の生存度の非常に著しい増加 ($p < 0.01$) が検出された (図19)。

10

【0165】

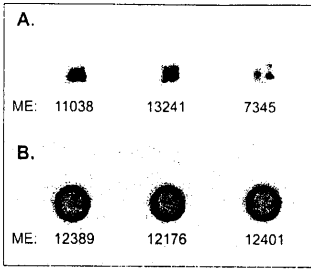
実施例 i i i :

ウェルにつき45000個の細胞を有する24のウェルプレートにRGC5細胞を配置した。次いで、緑内障について診断能力(群1からの抗体)を有することが知られる、異なる濃度のGFAP抗体で3時間、細胞をプレインキュベートした。細胞ストレスおよび細胞死を誘発するために、RGC5細胞を50 μM の H_2O_2 にてインキュベートした。1時間後、細胞の生存度をクリスタルバイオレットを用いて測定した。異なる濃度のGFAP抗体とともにインキュベートした場合、ストレスを受けた細胞の生存度の有意な増加を検出することができた。異なる抗体濃度(0.1、0.5、および1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) のGFAP抗体とともにインキュベートした細胞について、9.8%までの有意に増加した生存度 ($p < 0.05$) が検出され得た (図20)。

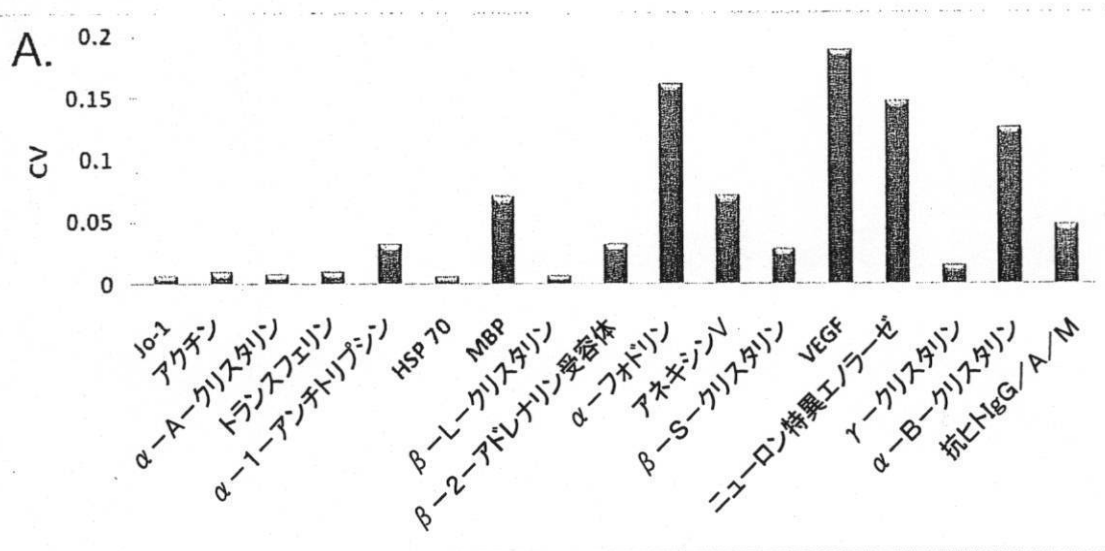
20

【 図 1 】

Figure 1:



【 図 2 A 】
Figure 2 A



【 図 2 B 】

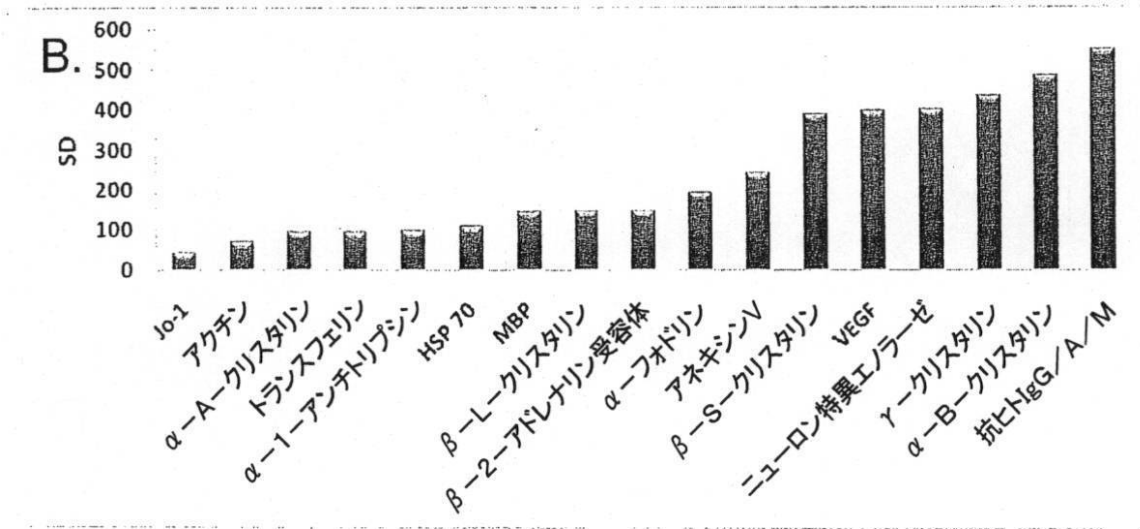
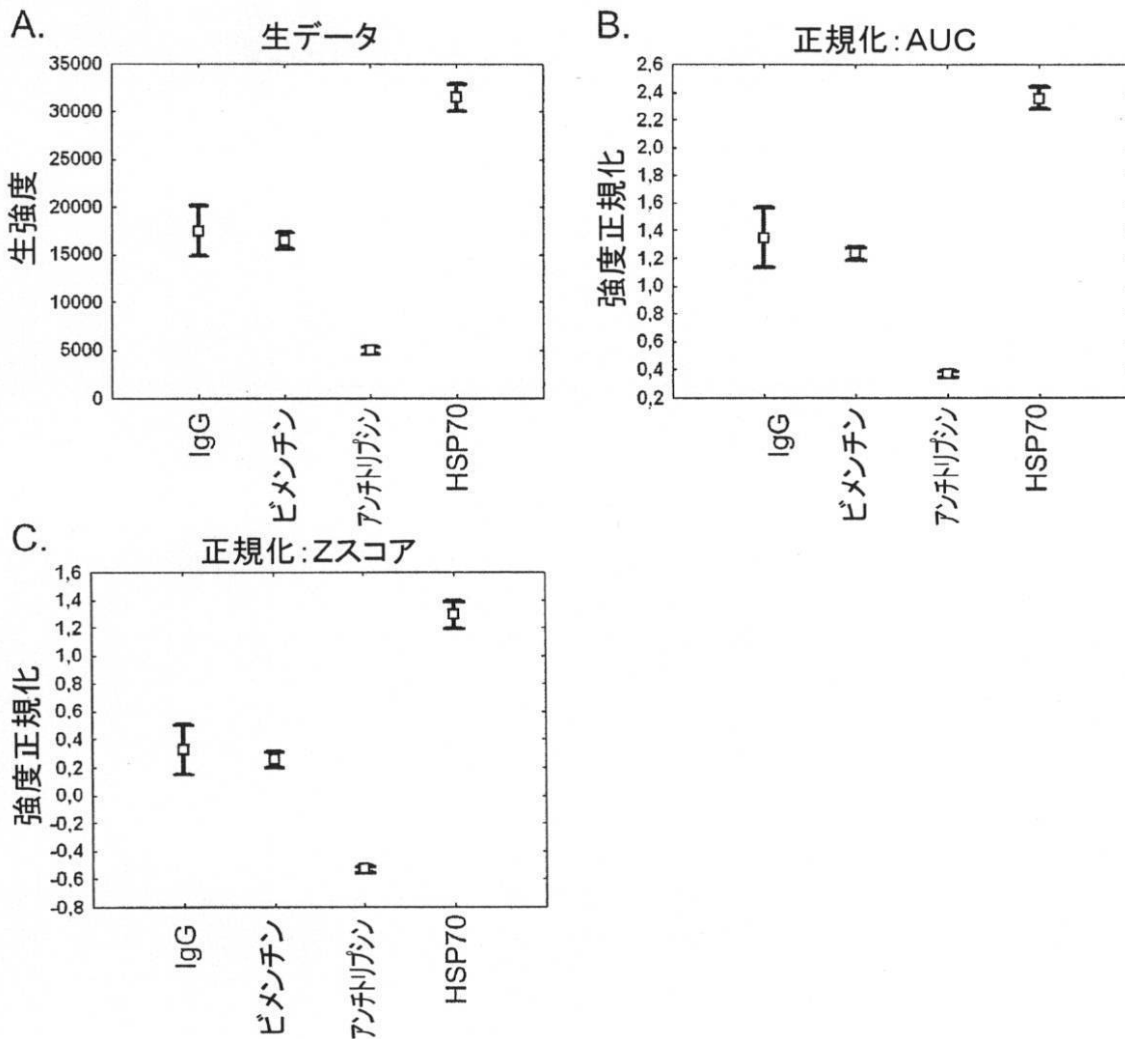


Figure 2 B

【 図 3 】

Figure 3:



【 図 4 】
Figure 4 A:

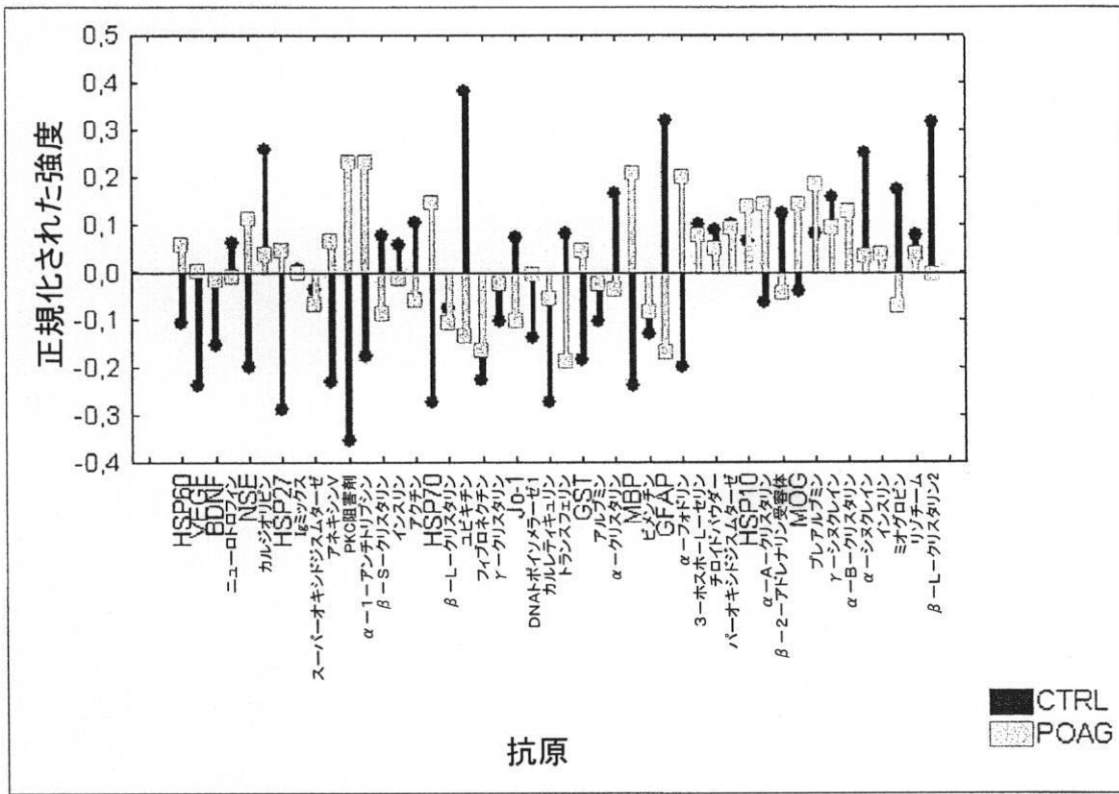
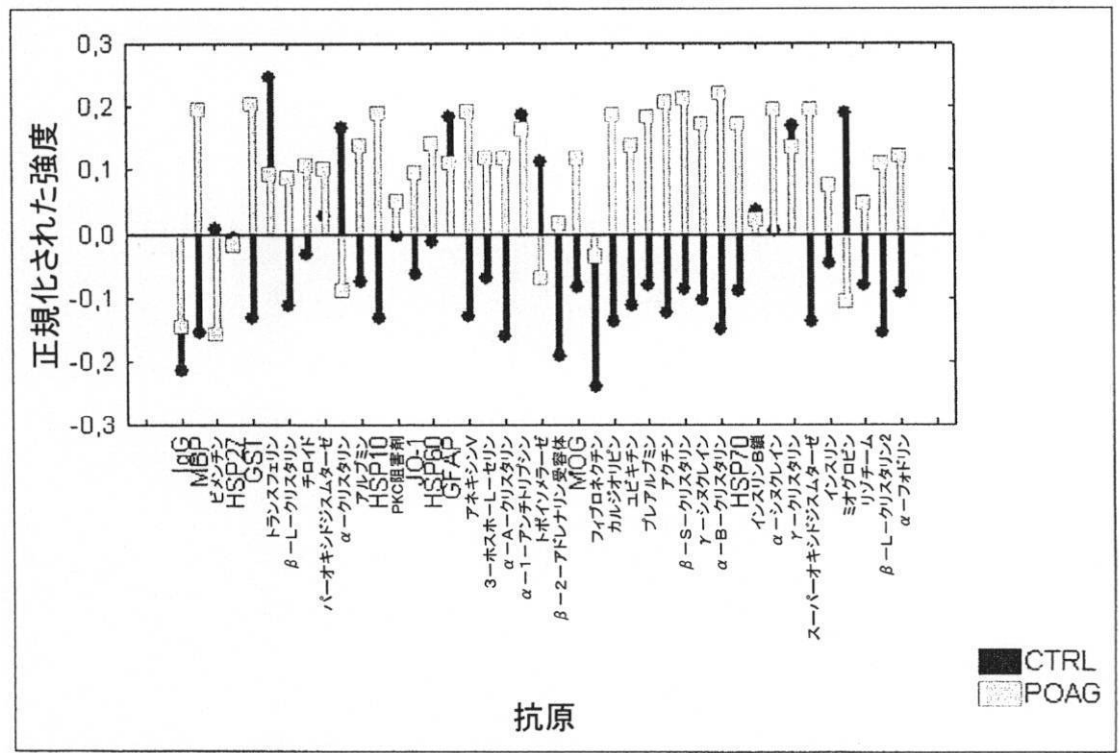
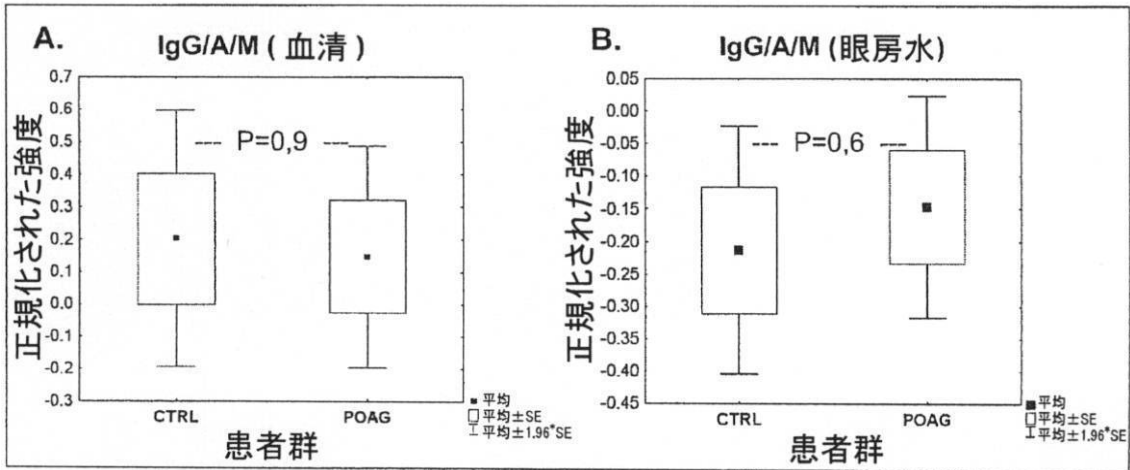


Figure 4 B:

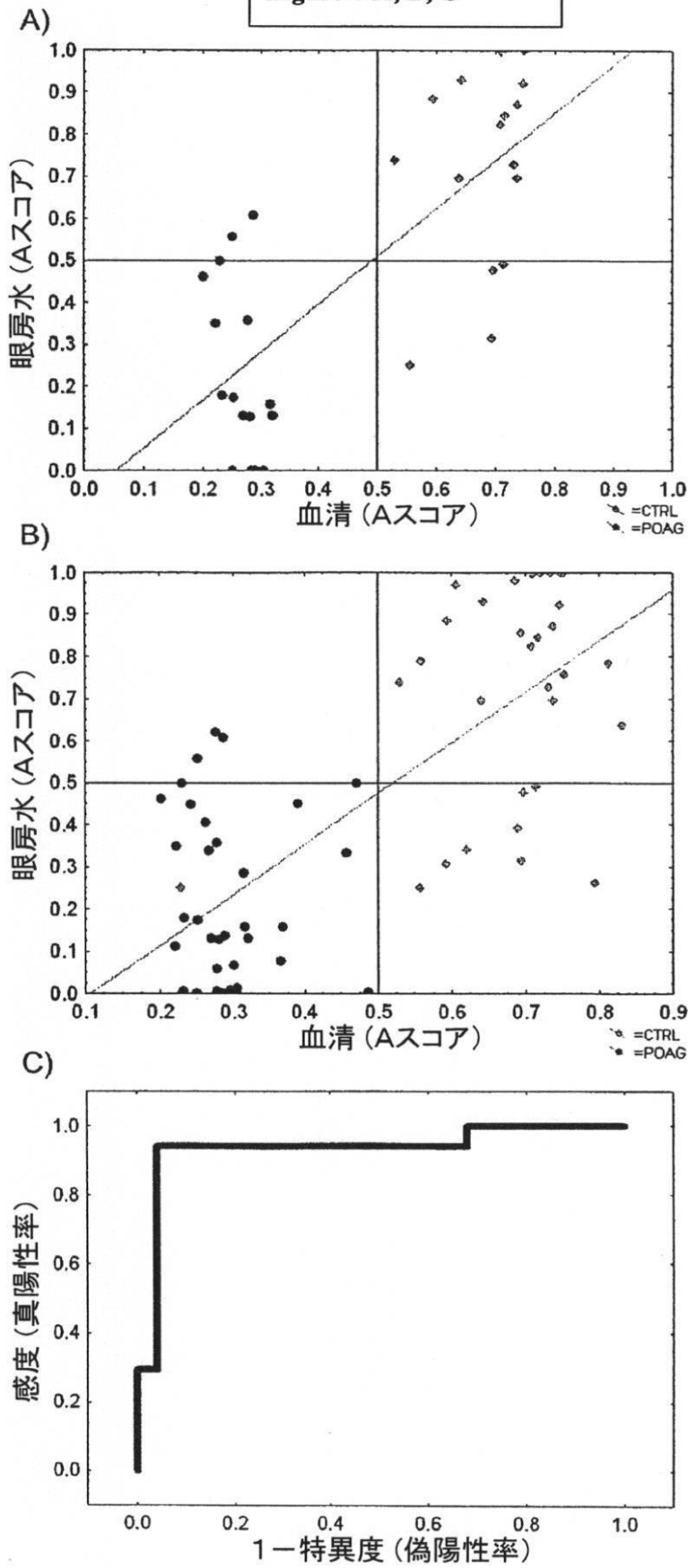


【 図 5 】
Figure 5:

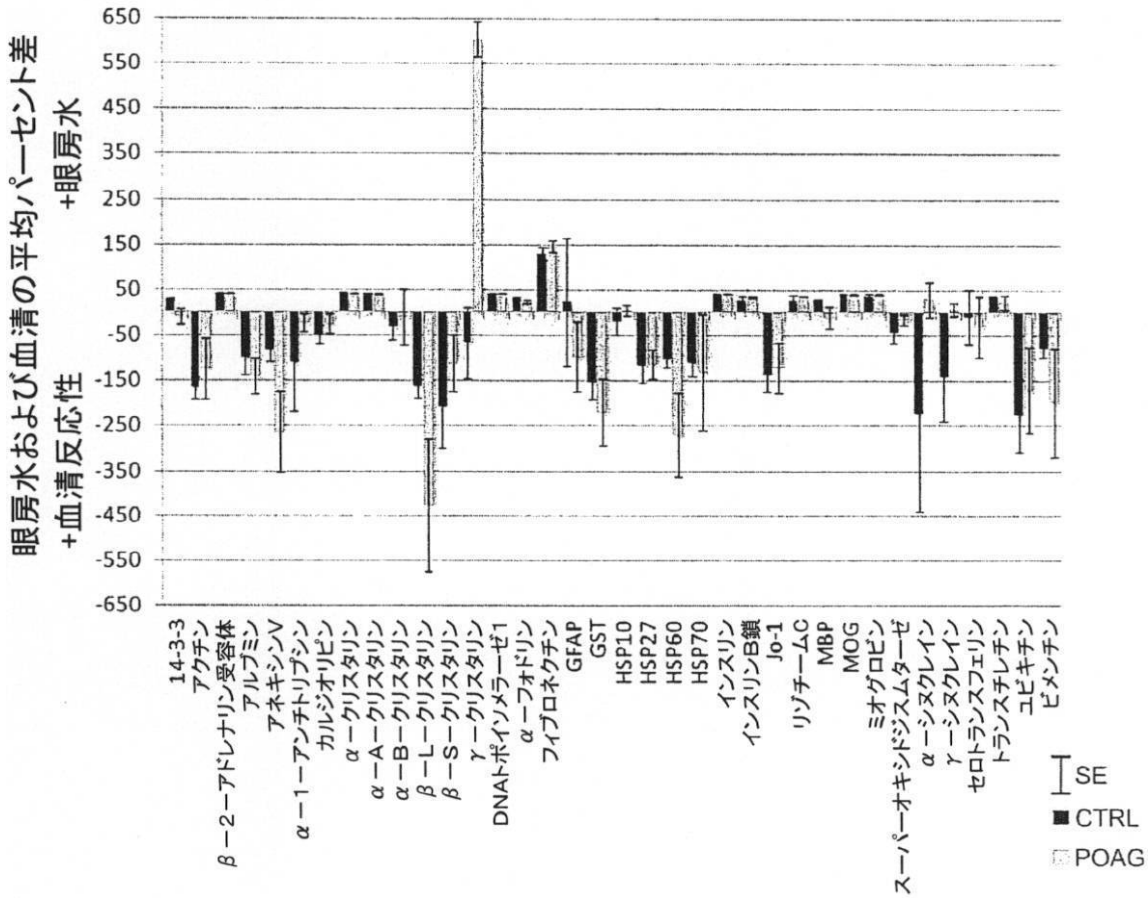


【 図 6 】

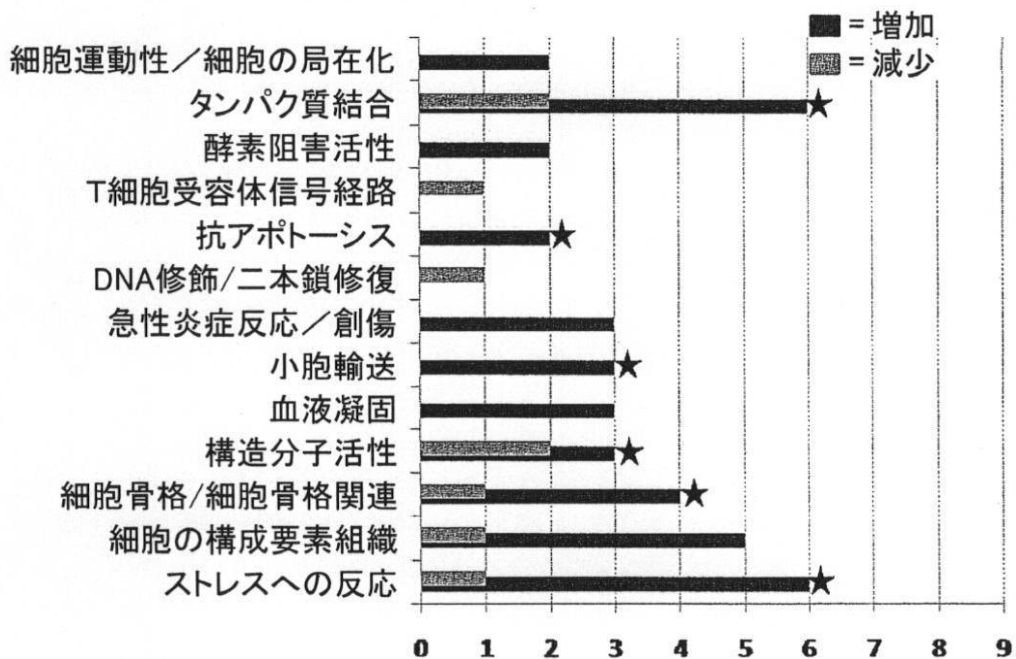
Figure 6 A, B, C



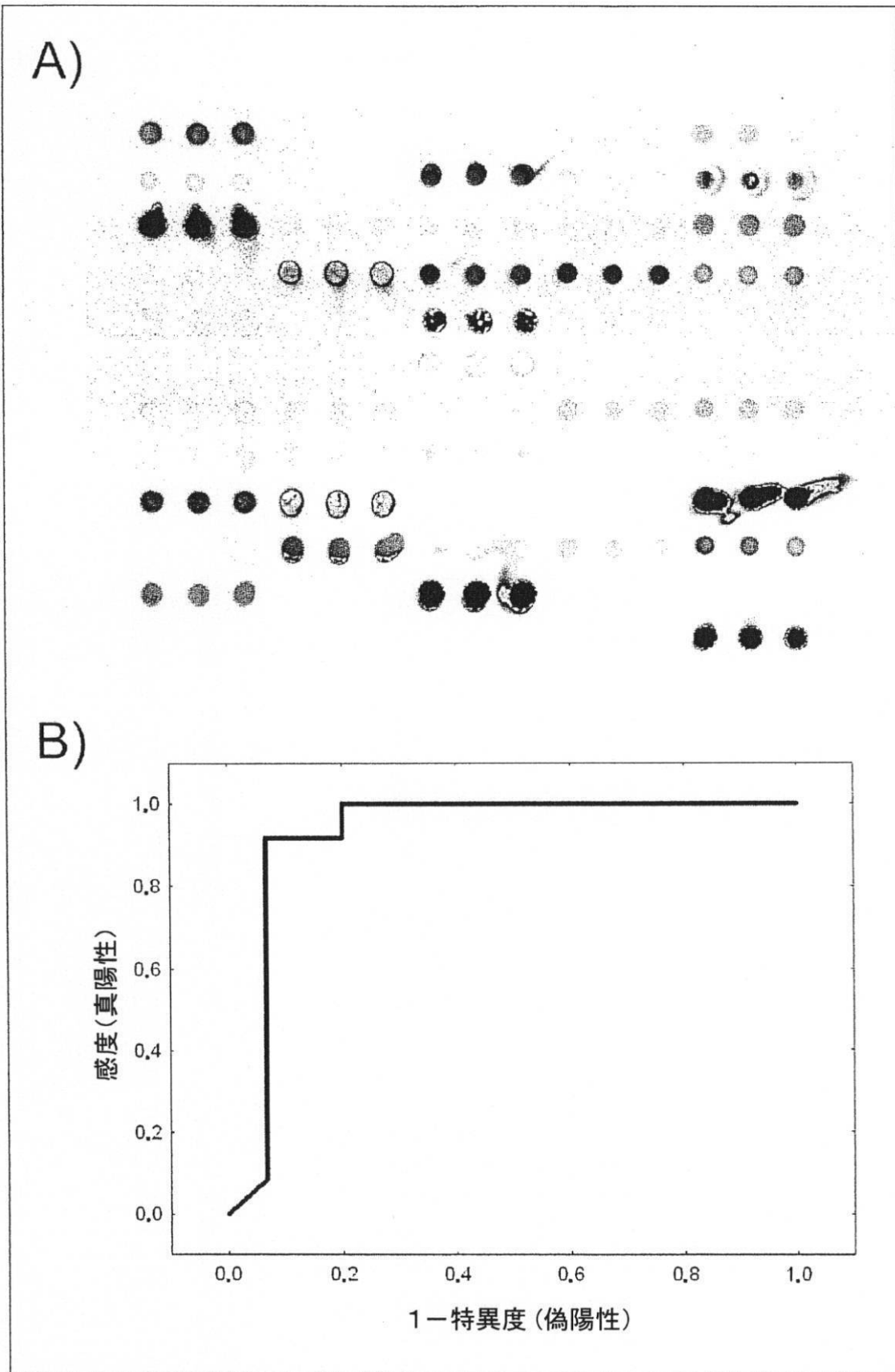
【 図 7 】
Figure 7:



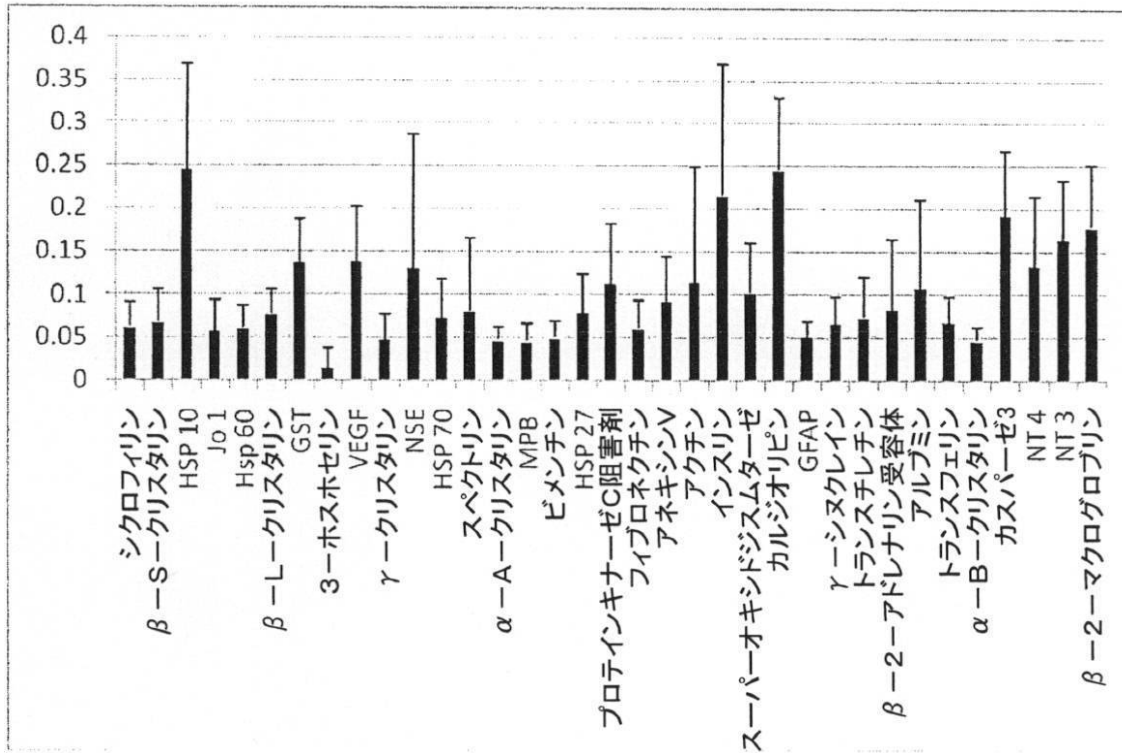
【 図 8 】
Figure 8:



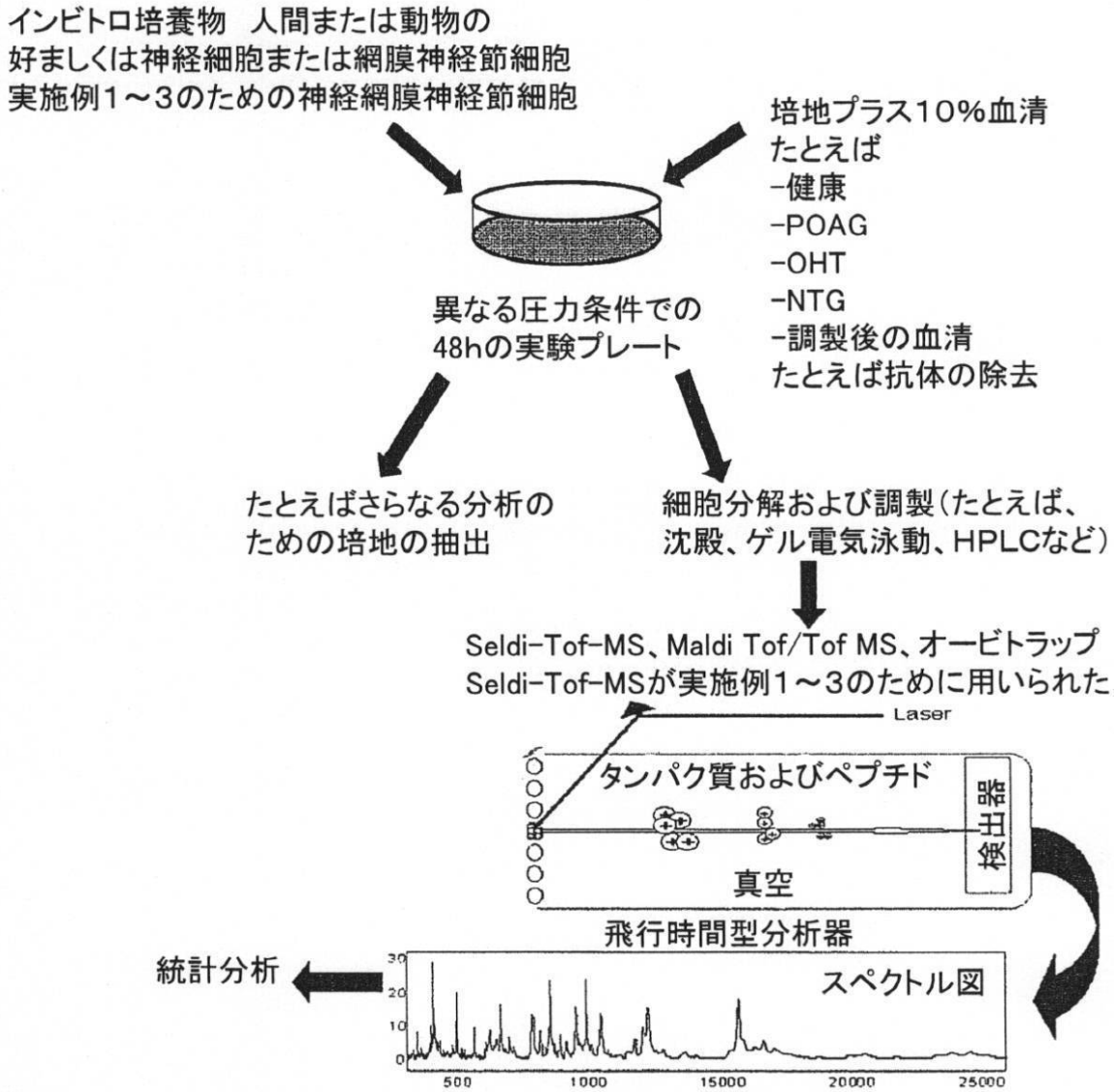
【 図 9 】
Figure 9:



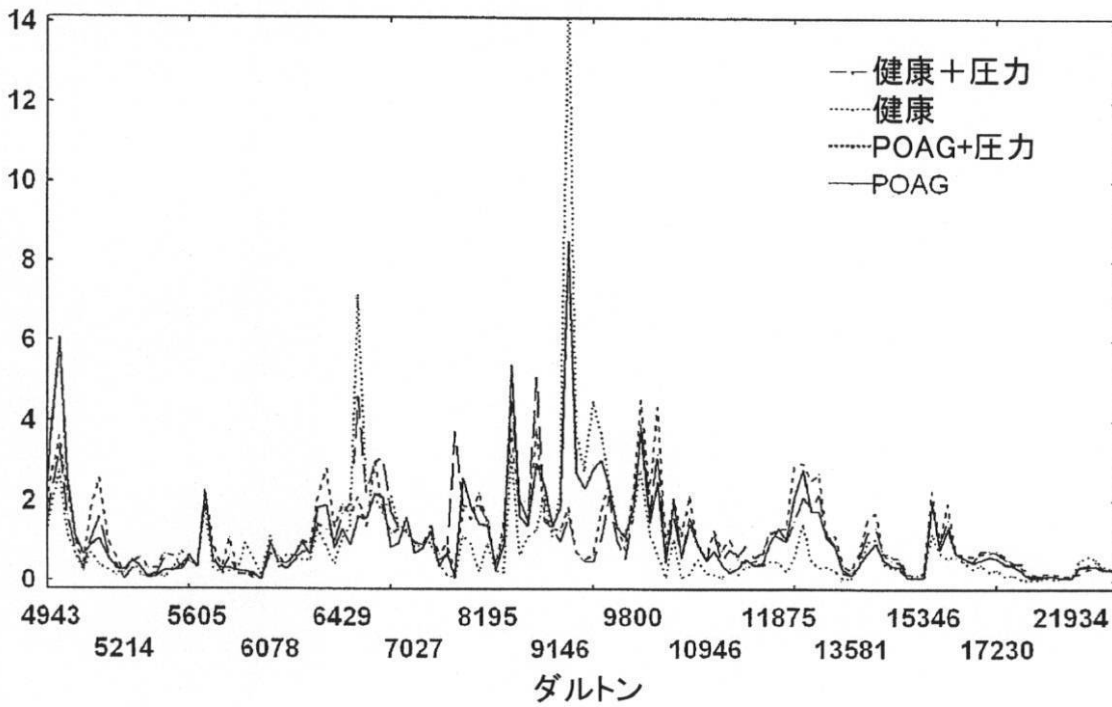
【 図 10 】
Figure 10:



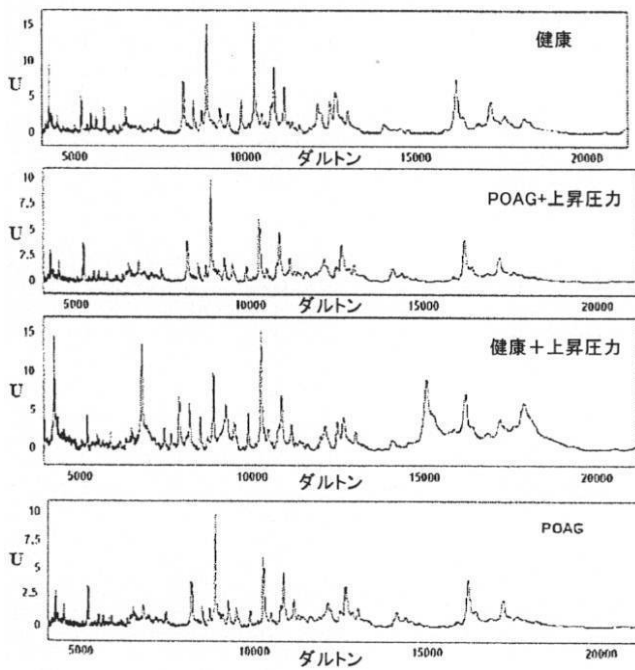
【図 11】
Figure 11:



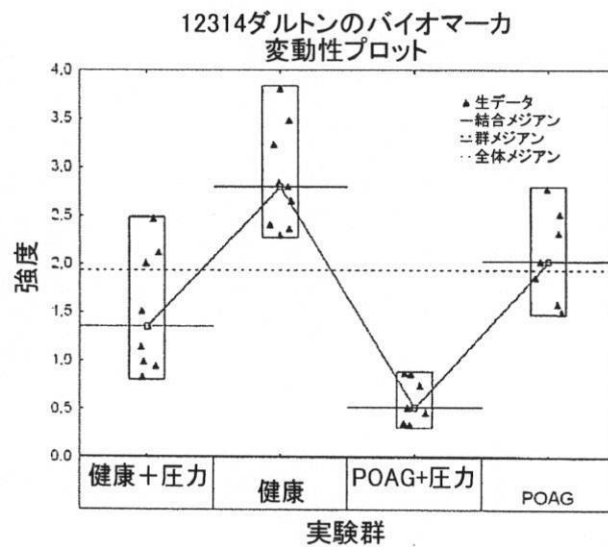
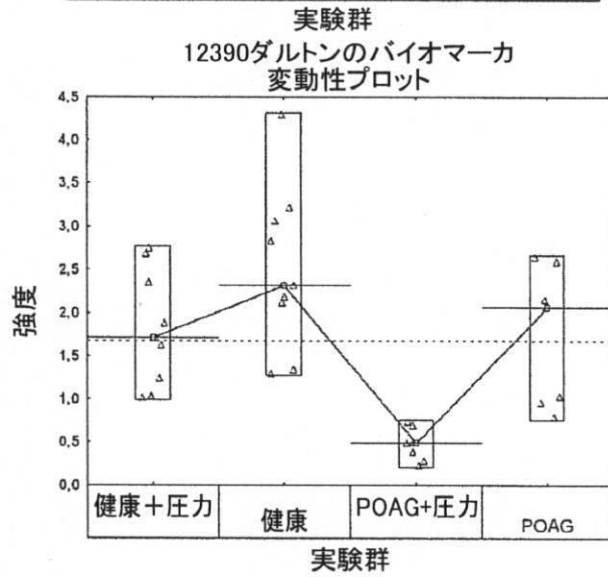
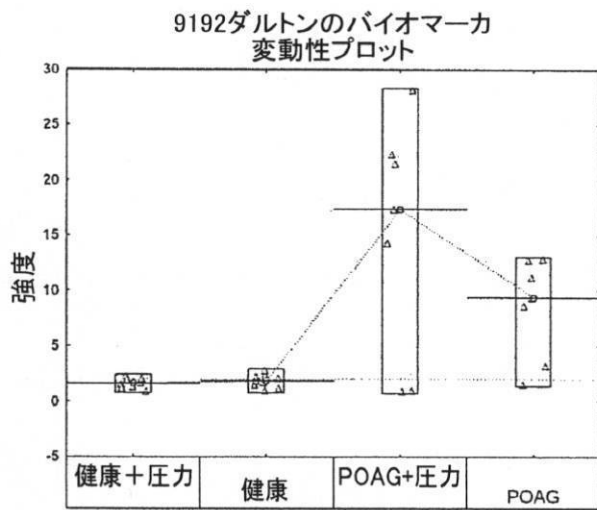
【 図 1 2 a 】
Figure 12a:



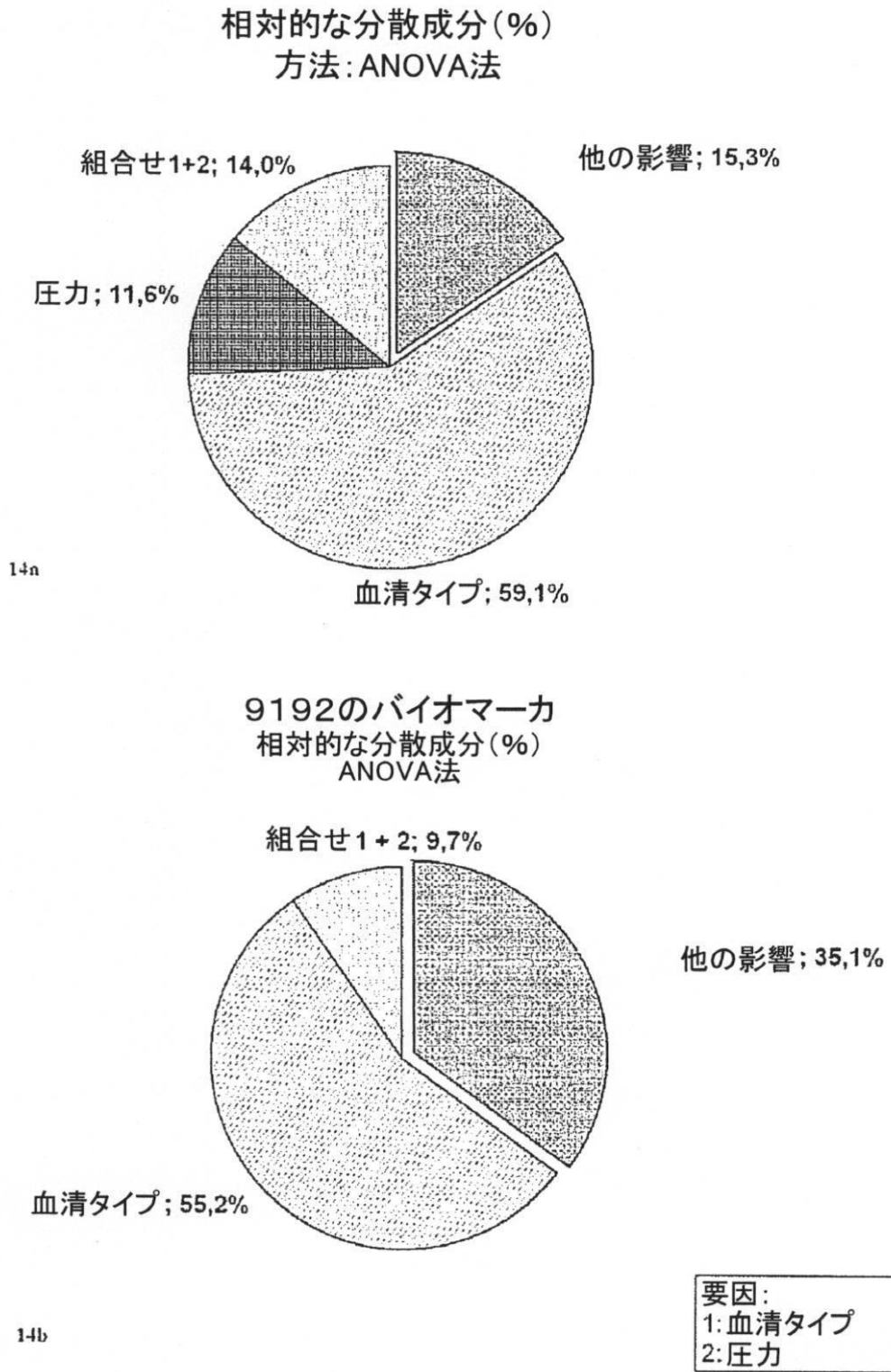
【 図 1 2 b 】
Figure 12 b:



【図13】
Figure 13:

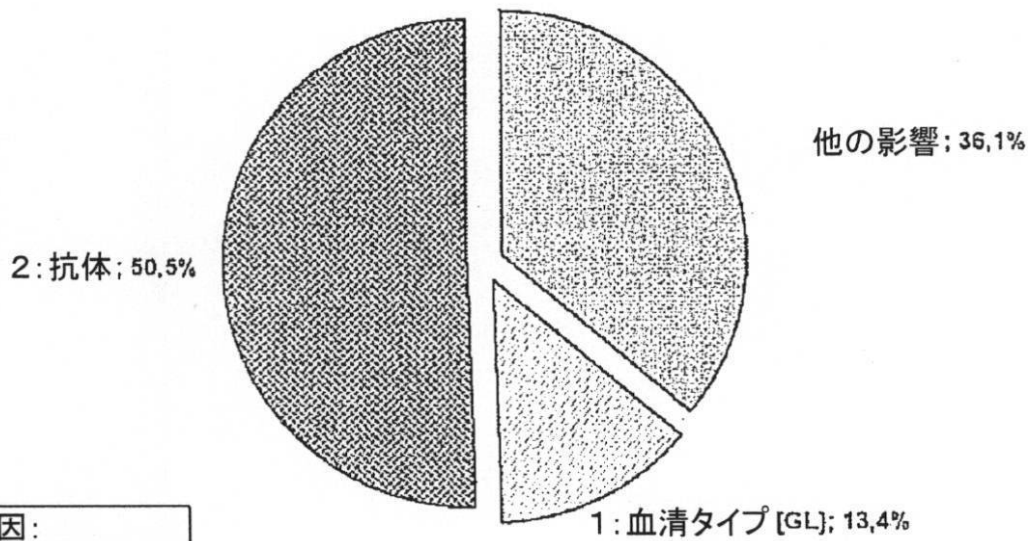


【図14】
Figure 14 a, b:



【図15a】

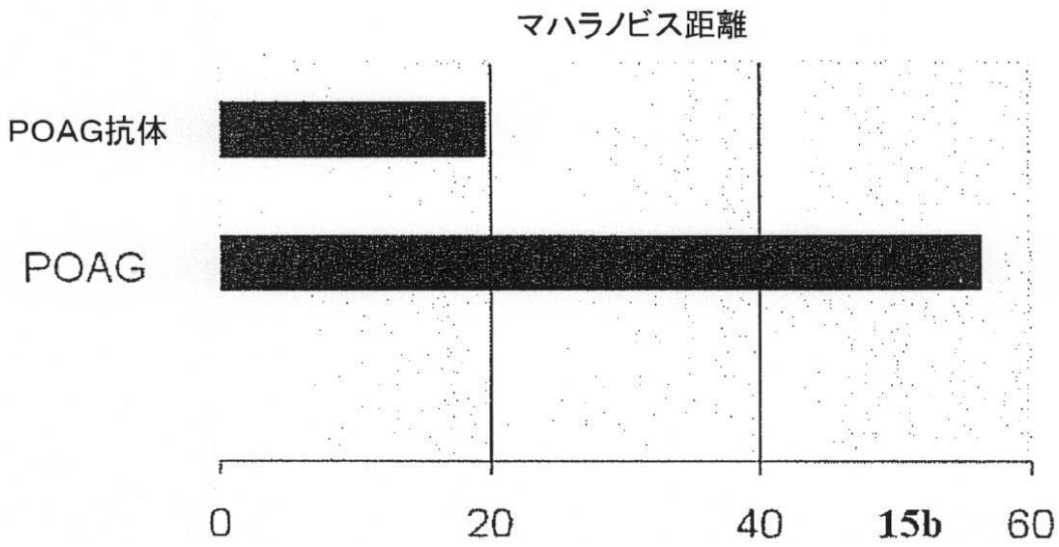
相対的な分散成分(%)
方法:ANOVA法



要因:
1:血清タイプ
2:抗体

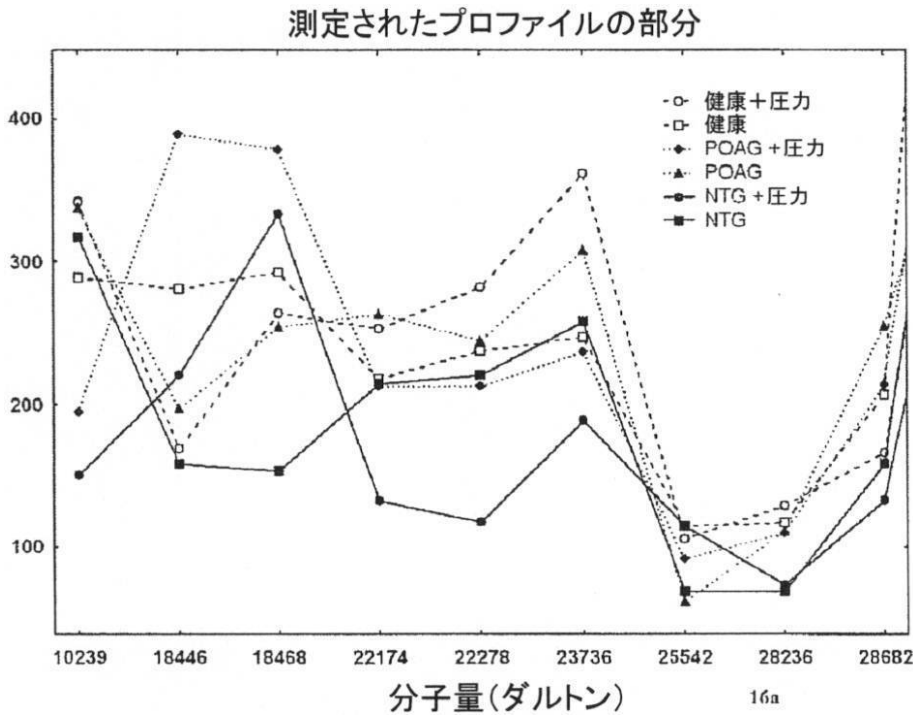
15a

【図15b】

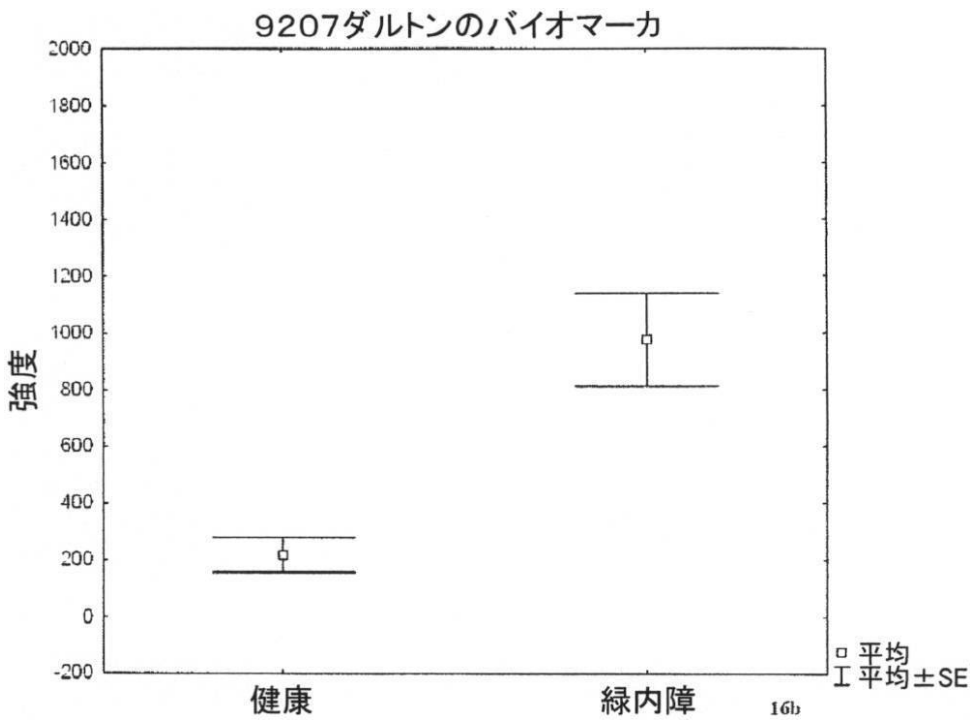


15b

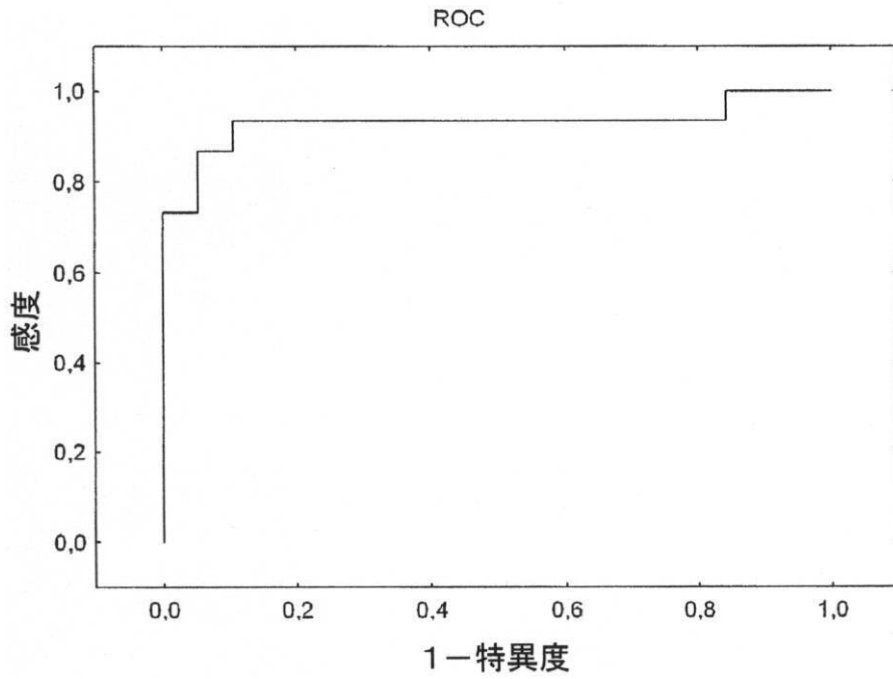
【図16a】



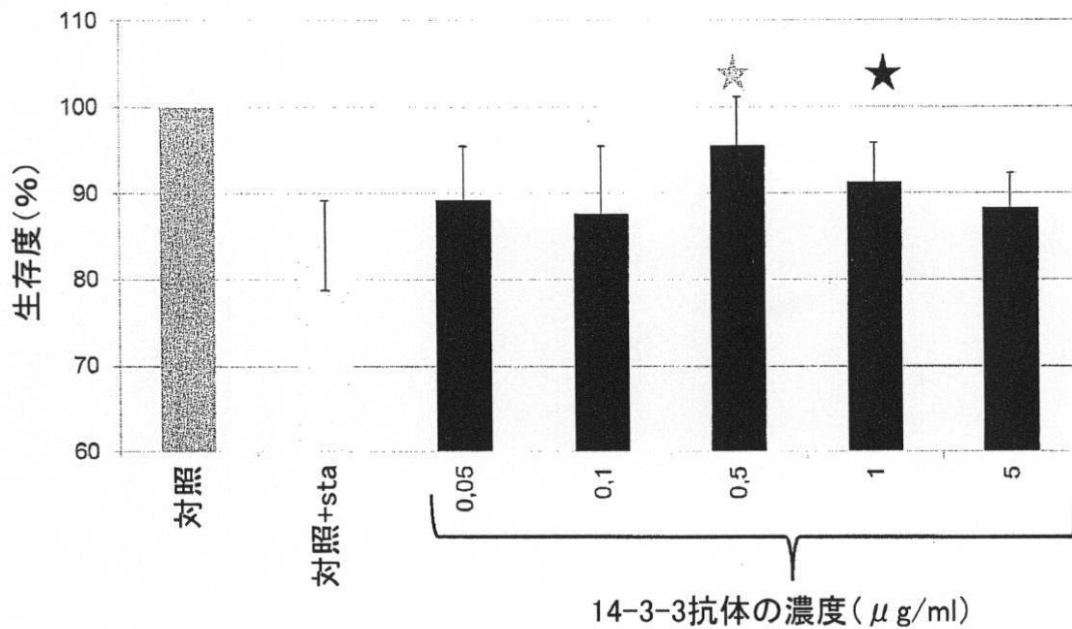
【図16b】



【 図 1 7 】
Figure17:



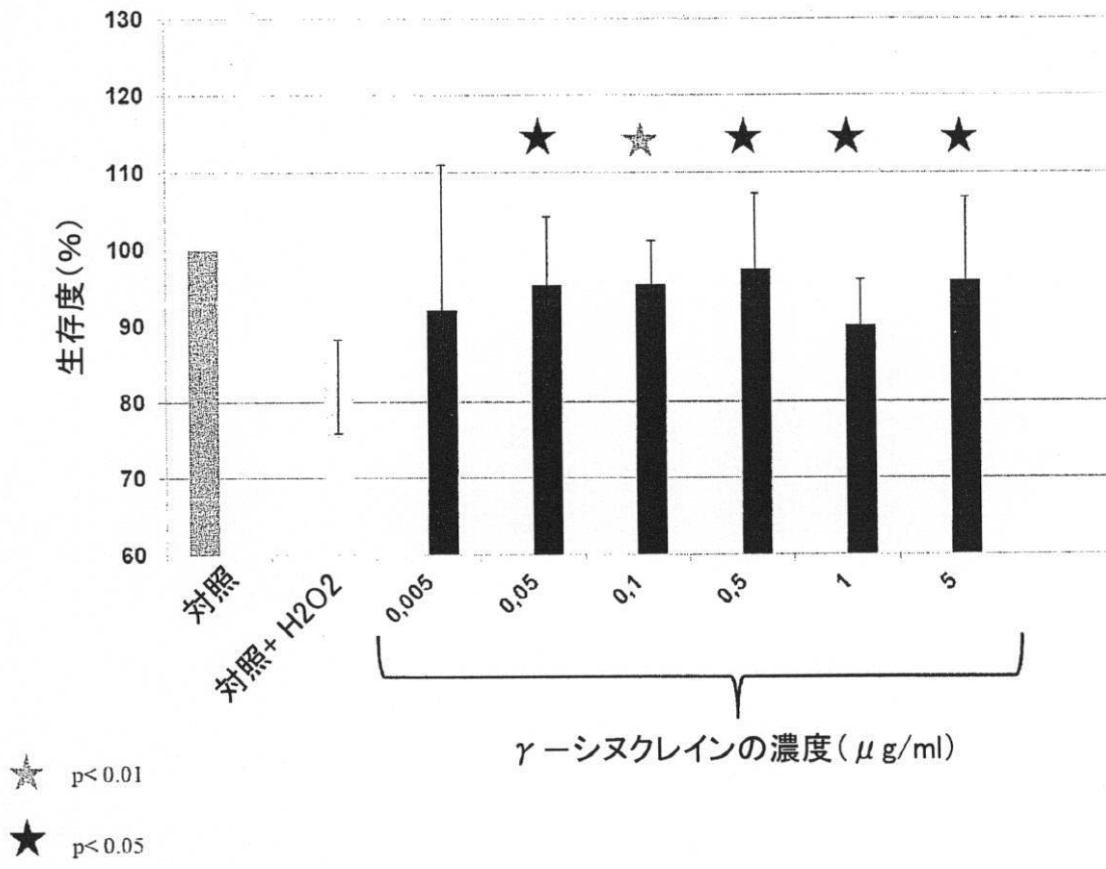
【 図 1 8 】
Figure 18:



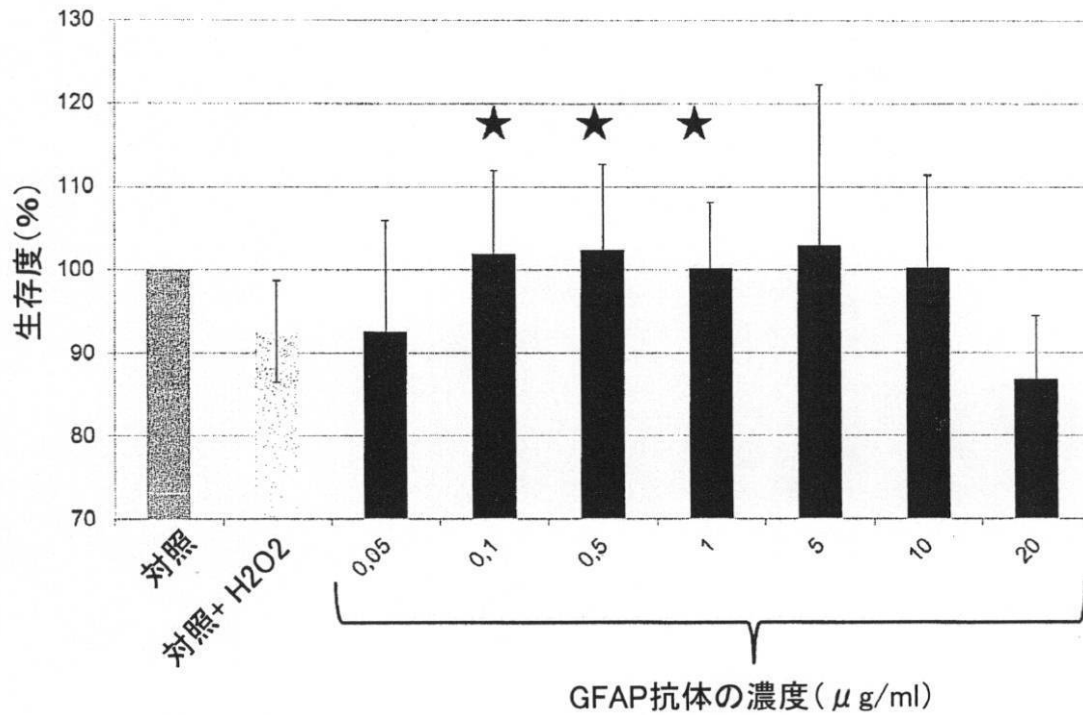
★ p < 0.01

★ p < 0.05

【 図 19 】
Figure 19:



【図 20】
Figure 20:



★ p < 0.05

【手続補正書】

【提出日】平成27年12月28日(2015.12.28)

【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) アクチン、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、 - 2 - アドレナリン受容体、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、カルレチキユリン、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、グリア線維酸性タンパク質 (GFAP)、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 HSP 10、HSP 27、HSP 60、HSP 70、インスリン、j o - 1、リゾチーム、ミエリン結合タンパク質 (MBP)、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、ニューロン特異エノラーゼ (NSE)、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 (VEGF) およびビメンチンからなる群から選択される、少なくとも4つの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を含む、

眼の抗原サンプルの少なくとも1つと体液との反応を検出および/または定量化する方法であって、

前記方法は、

(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) 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、

緑内障の診断方法のためのものである、方法。

【請求項2】

少なくとも2つの眼の抗原が、 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、グリア線維酸性タンパク質 (GFAP)、
グルタチオン - S - トランスフェラーゼ、HSP 27、HSP 60、HSP 70、j o -
1、リゾチーム、 ミエリン結合タンパク質 (MBP)、 ニューロン特異エノラーゼ (NSE)、
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 (VEGF) およびビメンチン
からなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

少なくとも2つの眼の抗原が、 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、- 2 - アドレナリン受容体、 脳由来神経栄養因子 (BDNF)
、カルレチキュリン、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
HSP 10、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、- 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)
からなる群から選択される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

少なくとも1つの眼の抗原が、 アネキシン I - IV、 - 2 - アドレナリン受容体、カル
レチキュリン、 熱ショックタンパク質 HSP 10、 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、 - シヌクレインおよび - シヌクレイン からなる群か
ら選択される、 請求項1または2に記載の方法。

【請求項5】

少なくとも1つの眼の抗原が、 アルブミン、 脳由来の神経栄養因子 (BDNF)、 カル
ジオリピン、 DNAトポイソメラーゼ1、 フィブロネクチン、 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、 3 - ホスホセリン、 チレオグロブリン および
トポイソメラーゼ阻害剤 からなる群から選択される、 請求項1または2に記載の方法。

【請求項6】

少なくとも1つの眼の抗原が、 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)、 カルレチキュリン、 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、フィブネクチン、熱ショックタンパク質HSP10、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およびユビキチンからなる群から選択される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項7】

少なくとも1つの眼の抗原が、 - 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、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、トランスチレチンおよびユビキチンからなる群から選択される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項8】

ステップ(c)、(d)および(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、請求項1~7のいずれかに記載の方法。

【請求項9】

少なくとも1つの重み付け係数が、ステップ(c)、(d)および(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つに割り当てられる、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

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8に記載の方法。

【請求項11】

ステップ(a)における眼の抗原の少なくとも1つのサンプルが、10よりも少ない眼の抗原を含む、請求項1~10のいずれかに記載の方法。

【請求項12】

前記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、マイクロアレイチップ、ラテラルフローテストストリップまたはマイクロ流体チップである抗原担持要素の上に担持される、請求項1~11のいずれかに記載の方法。

【請求項13】

体液が、収集され、乾燥される、請求項1~12のいずれかに記載の方法。

【請求項14】

体液が、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13に記載の方法。

【請求項15】

体液が涙である、請求項1~14のいずれかに記載の方法。

【請求項16】

測定された前記体液は抗原担持要素の受取ゾーンに収集され、前記体液はその自己免疫反応性の分析のために前記抗原担持要素上の抗原担持ゾーンへと移送されるか、または前記体液は吸着材料から前記抗原担持要素へ直接的に流れるまたは拡散する、請求項1~15のいずれかに記載の方法。

【請求項17】

請求項1~16のいずれかに記載の方法に使用されるための抗原担持要素であって、請

請求項 1 または 2 に記載された少なくとも 4 つの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 18】

抗原ゾーンと体液のための受取ゾーンとを含む、請求項 17 に記載の抗原担持要素であって、

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む、抗原担持要素。

【請求項 19】

請求項 1 ~ 16 のいずれかに記載の方法のための、緑内障の診断のためのキット。

【請求項 20】

請求項 17 または 18 に記載の抗原担持要素を含む、請求項 19 に記載のキット。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

C 1 2 Q 1/04

(72)発明者 ブファイファー, ノルベルト

ドイツ、5 5 1 3 1 マイツ、アンナベルクシュトラーゼ、6 4

(72)発明者 ベル, カタリーナ

ドイツ、5 5 1 2 9 マイツ、フセルレーベンベーク、9 2

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ79 QR48 QS03 QS33 QS36
QX02

专利名称(译)	青光眼的诊断方法		
公开(公告)号	JP2016048265A	公开(公告)日	2016-04-07
申请号	JP2015253808	申请日	2015-12-25
[标]申请(专利权)人(译)	EM爱情股份公司 M-LAB有限公司		
申请(专利权)人(译)	EM - 爱股份公司		
[标]发明人	グルースフランツ ベームニルス プファイファーノルベルト ベルカタリーナ		
发明人	グルース,フランツ ベーム,ニルス プファイファー,ノルベルト ベル,カタリーナ		
IPC分类号	G01N33/564 G01N37/00 G01N33/543 G01N33/53 C12Q1/04		
CPC分类号	A61P27/02 A61P27/06 G01N33/6893 G01N2800/168 G01N33/564		
FI分类号	G01N33/564.Z G01N37/00.102 G01N37/00.101 G01N33/543.521 G01N33/53.N C12Q1/04		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QS03 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX02		
优先权	61/342363 2010-04-13 US		
其他公开文献	JP6225157B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种替代的，改进的和可靠的诊断方法，通过分析体液来检测青光眼，而不受眼压升高的影响。解决方案：首先根据体液免疫反应性分析诊断青光眼的方法至少一种至少部分精制的眼抗原样品，包括：测定每种抗原对诊断结果的免疫反应性；并转换成青光眼评分。图纸：图1

(21) 出願番号	特願2015-253808 (P2015-253808)	(71) 出願人	512264828 エム・ラブ・アクチェンゲゼルシャフト
(22) 出願日	平成27年12月25日 (2015.12.25)		M-LAB AG
(62) 分割の表示	特願2013-504084 (P2013-504084) の分割		スイス、8006 チューリッヒ、プフル ークシュトラーセ、1、ミヒェル・ポーラ 方
原出願日	平成23年4月13日 (2011.4.13)	(74) 代理人	110001195 特許業務法人深見特許事務所
(31) 優先権主張番号	61/342,363	(72) 発明者	グルース, フランツ ドイツ、48691 プレーテン、ツァ・ ヒューネンブルク、2
(32) 優先日	平成22年4月13日 (2010.4.13)	(72) 発明者	ベーム, ニルス ドイツ、55218 インゲルハイム、ク ルプファルツシュトラーセ、22
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く