

(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2004-505261

(P2004-505261A)

(43) 公表日 平成16年2月19日(2004.2.19)

(51) Int.Cl.⁷

G 0 1 N 33/53

F I

G 0 1 N 33/53

N

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁)

(21) 出願番号	特願2002-516357 (P2002-516357)	(71) 出願人	599068186 アテナ ダイアグナスティクス, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 1 6 0 5 ウスター, プランテーション ストリート 3 7 7
(86) (22) 出願日	平成13年7月24日 (2001.7.24)	(74) 代理人	100095832 弁理士 細田 芳徳
(85) 翻訳文提出日	平成14年3月26日 (2002.3.26)	(72) 発明者	ロビチャウド, ノーマンド, ジェイ. アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 1 4 5 3 レオミンスター, ランカスター ストリート 2 7
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/023239	(72) 発明者	カーティルス, ルイス, ビー. アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 1 3 6 6 ピーターシャム, グレン バレー ロード 2 4 9
(87) 国際公開番号	W02002/010441		
(87) 国際公開日	平成14年2月7日 (2002.2.7)		
(31) 優先権主張番号	09/626, 685		
(32) 優先日	平成12年7月27日 (2000.7.27)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(81) 指定国	CA, JP		

(54) 【発明の名称】 カルボニル基でコーティングされた固相反応材を使用するスフィンゴ糖脂質に対する抗体の検出

(57) 【要約】

カルボニル基がその上に結合しており、かつ目的とするスフィンゴ糖脂質（１つまたは複数）が目的とするスフィンゴ糖脂質のアミノ基と固相反応材に結合したカルボニル基との間のアミド結合により固相反応材に連結された固相反応材を使用する工程を含む、サンプル中の目的とする１つ以上のスフィンゴ糖脂質に対する抗体を検出する方法を開示する。目的とするスフィンゴ糖脂質（１つまたは複数）に対する抗体を検出する方法は個体において自己免疫疾患を診断する方法において使用されうる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

目的とするスフィンゴ糖脂質に対する抗体を同定するための、カルボニル基がその上に結合しており、かつ目的とするスフィンゴ糖脂質が前記結合したカルボニル基に連結されている修飾型固相反応材。

【請求項 2】

該反応材が、結合した対象抗原をさらに含んでなる請求項 1 記載の修飾型固相反応材。

【請求項 3】

該反応材が、前記結合したカルボニル基に連結された複数の異なるスフィンゴ糖脂質をさらに含んでなる請求項 1 または 2 記載の修飾型固相反応材。

10

【請求項 4】

該反応材が、マイクロタイタープレートである請求項 1、2 または 3 記載の修飾型固相反応材。

【請求項 5】

請求項 1、2、3 または 4 に記載の修飾型固相反応材を含んでなる、目的とするスフィンゴ糖脂質に対する抗体の検出用キット。

【請求項 6】

a) カルボニル基がその上に結合しており、かつ目的とするスフィンゴ糖脂質が前記結合したカルボニル基に連結されている修飾型固相反応材に試験サンプルを接触させる工程；
b) 存在する場合、試験サンプル中の抗体が、前記修飾型固相反応材の前記結合したカルボニル基に連結された目的とするスフィンゴ糖脂質に結合することができる条件の下で前記修飾型固相反応材を維持する工程；ならびに

20

c) 目的とするスフィンゴ糖脂質に結合した抗体の存在の有無を検出する工程、を含む、試験サンプル中の目的とするスフィンゴ糖脂質に対する抗体の存在の有無を検出する方法。

【請求項 7】

a) カルボニル基がその上に結合しており、かつ目的とするスフィンゴ糖脂質が前記結合したカルボニル基に連結されている修飾型固相反応材に試験サンプルを接触させる工程；
b) 存在する場合、試験サンプル中の抗体が、前記修飾型固相反応材の前記結合したカルボニル基に連結された目的とするスフィンゴ糖脂質に結合することができる条件の下で前記修飾型固相反応材を維持する工程；ならびに

30

c) 目的とするスフィンゴ糖脂質に結合した抗体の量を測定する工程、を含む、試験サンプル中の目的とするスフィンゴ糖脂質に対する抗体の量を測定する方法。

【請求項 8】

該修飾型固相反応材が、結合したカルボニル基に連結された対照抗原をさらに含んでなり、目的とするスフィンゴ糖脂質に対する抗体の量が、以下：

前記修飾型固相反応材に結合したカルボニル基に連結された対照抗原に結合した抗体の量を測定する工程；ならびに

目的とするスフィンゴ糖脂質に結合した抗体の量から対照抗原に結合した抗体の量を差し引く工程、

40

により、さらに測定され、対照抗原に結合した抗体の量とスフィンゴ糖脂質に結合した抗体の量との差が目的とするスフィンゴ糖脂質に対する特異的抗体の量と等しい、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

目的とするスフィンゴ糖脂質に対する抗体に結合する薬剤と共に修飾型固相反応材をインキュベートする工程を含む方法により、抗体を検出する、または抗体の量を測定する、請求項 6、7 または 8 記載の方法。

【請求項 10】

a) カルボニル基がその上に結合しており、かつ目的とするスフィンゴ糖脂質が前記結合

50

したカルボニル基に連結されている修飾型固相反応材に個体由来の試験サンプルを接触させる工程；

b) 存在する場合、試験サンプル中の抗体が、前記固相反応材の前記結合したカルボニル基に連結されたスフィンゴ糖脂質に結合することができる条件の下で前記修飾型固相反応材を維持する工程；ならびに

c) 目的とするスフィンゴ糖脂質に結合した抗体の量を測定する工程、
を含み、目的とするスフィンゴ糖脂質に対する抗体の量が、1) 対照サンプル中の量よりも統計学的に有意な量だけ多い、または2) 基準量以上であることにより、自己免疫疾患の存在が示される、個体において自己免疫疾患を診断する方法。

【発明の詳細な説明】

10

【0001】

発明の背景

スフィンゴ糖脂質 (glycosphingolipid) であるスルホグルクロニルパラグロボシド (SGPG) に対する抗体は多くの種々の自己免疫疾患に関与している。例えば、GMガングリオシドに対する血清IgM抗体が、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) (Younes - Chennoufi, B. A. 他、J. Neuroimmunol. 57: 111 ~ 5 (1995)) 患者、慢性炎症性脱髄性多発神経障害 (Yuki, N. 他、J. Neuroimmunol. 70: 1 ~ 6 (1996)) 患者、および急性ギラン-バレー症候群 (Ilyas, A. A. 他、J. Neurol. Sci. 105: 108 ~ 17 (1991)) 患者において見出されている。

20

【0002】

固相酵素免疫測定法 (ELISA) が、抗スフィンゴ糖脂質抗体を同定するために使用されている；しかし、バックグラウンド値が高いために、そのような抗体の量を正確に評価することが頻繁に妨げられている。抗スフィンゴ糖脂質抗体の信頼できる測定が、免疫疾患の正しい診断には重要である。

【0003】

発明の概要

本発明は、修飾された固相反応材 (reactant) を使用して、神経系の特定の抗原 (1つまたは複数) に対する抗体の存在の有無または量を試験サンプル中において測定する方法に関する。この方法では、カルボニル基をその表面に結合させることによって修飾された固相反応材 (マイクロタイタープレートなど) が用いられる。1つまたは2つ以上の目的とするスフィンゴ糖脂質 (例えば、スルホグルクロニルパラグロボシド (SGPG)) が、スフィンゴ糖脂質のアミノ基と、固相反応材に結合させたカルボニル基との間におけるアミド結合によって修飾型固相反応材に連結される。他のスフィンゴ糖脂質、糖脂質、糖タンパク質、ガングリオシドまたは炭水化物などの1つまたは2つ以上の対照抗原もまた修飾型固相反応材の表面に結合させることができる。目的とするスフィンゴ糖脂質 (1つまたは複数) がその上に連結されている修飾型固相反応材は、試験サンプル中に存在し得る目的とするスフィンゴ糖脂質 (1つまたは複数) に対する何らかの抗体が、修飾型固相反応材に連結されている目的とするスフィンゴ糖脂質 (1つまたは複数) に結合することができるような条件のもとで、個体に由来する体液 (例えば、血液、血清、脳脊髄液または尿) の試験サンプルなどの試験サンプルと接触させられる。その後、目的とするスフィンゴ糖脂質 (1つまたは複数) に対する試験サンプル中の抗体の存在の有無または量が、固相酵素免疫測定法 (ELISA) または別の適切な固相アッセイなどの標準的な方法を使用して測定される。対照抗原が修飾型固相反応材に結合している場合、対照抗原に対する試験サンプル中の抗体の存在の有無またはレベルもまた、同じ方法を使用して測定することができる。目的とするスフィンゴ糖脂質に対する抗体の特異的な反応性は、対照抗原に結合している抗体の量を上回る、目的とするスフィンゴ糖脂質に結合している抗体の量によって決定される。

30

40

【0004】

本方法は、個体における自己免疫疾患の診断において使用することができる。個体に由来

50

する試験サンプル中の目的とするスフィンゴ糖脂質に対する抗体の量が本方法を使用して測定される。目的とするスフィンゴ糖脂質に対する抗体の量が対照サンプル中の目的とするスフィンゴ糖脂質に対する抗体の量よりも統計学的に有意な量だけ大きいことにより、自己免疫疾患の存在が示され得る。あるいは、目的とするスフィンゴ糖脂質に対する抗体の量が確立された基準量以上であることにより、疾患の存在が示され得る。例えば、本方法は、予備的なスクリーニングアッセイとして使用することができる；目的とするスフィンゴ糖脂質に対する抗体の量が対照サンプル中の目的とするスフィンゴ糖脂質に対する抗体の量よりも統計学的に有意な量だけ大きいこと、あるいは目的とするスフィンゴ糖脂質に対する抗体の量が確立された基準量以上であることは、自己免疫疾患に関連している他の抗体のさらなる研究を具体化する「陽性」のスクリーニング結果と見なされる。

10

【0005】

本発明はまた、本発明の方法において使用される、カルボニル基がその上に結合し、かつ目的とするスフィンゴ糖脂質（1つまたは複数）がそのカルボニル基に連結されている修飾された固相反応材、ならびにそのような修飾型固相反応材を含有する試験キットに関する。

【0006】

本方法の高い感度および特異性は自己免疫疾患の示差的な診断を明確にすることができる。さらに、カルボニル基がその表面に結合している修飾型固相反応材により、このような修飾を有しない固相反応材を用いる類似するアッセイを行うためにさもなくば必要な量よりも少ない量のスフィンゴ糖脂質の使用が可能になる。また、カルボニル基がその表面に結合している修飾型固相反応材は、毒性の溶媒を必要とすることなく、目的とするスフィンゴ糖脂質でコーティングすることができる；このコーティングは、湿度による影響を受けず、従って、再現性のある安定したアッセイ結果をもたらす。

20

【0007】

発明の詳細な説明

本発明の好ましい実施形態の説明を下記に示す。

【0008】

本明細書中に記載される発明は、サンプル中の1つまたは2つ以上の目的とするスフィンゴ糖脂質に対する抗体の存在の有無または量を決定する方法に関する。本発明はさらに、個体に由来するサンプル中の1つまたは2つ以上の目的とするスフィンゴ糖脂質に対する抗体の量を測定することによって個体における自己免疫疾患を診断する方法に関する。出願人は、ある種のスフィンゴ糖脂質の抗体に対する著しく増大した感度が、スフィンゴ糖脂質をプレートにアミド結合させることができるカルボニル基で修飾されたマイクロタイタープレートを使用して固相酵素免疫測定法（ELISA）を行うことによって達成され得ることを発見した。

30

【0009】

この発見の結果、サンプル中の1つまたは2つ以上の目的とするスフィンゴ糖脂質に対する抗体の存在の有無および/または量を決定する非常に高感度で特異的な方法を今や利用することができる。本方法では、修飾型固相反応材が使用される。本明細書中で使用されている用語「固相反応材」は、マイクロタイタープレート、メンブラン（例えば、ニトロセルロース）、ビーズ、ディップスティック、薄層クロマトグラフィープレートまたは他の固体媒体などの固体媒体を示す。好ましい実施形態において、固相反応材は、固相酵素免疫測定法などの固相免疫アッセイにおいて使用され得るマイクロタイタープレートである。固相反応材は、カルボニル基が反応材に接合される（grafted）ように修飾される。カルボニル基が存在する結果、スフィンゴ糖脂質などのある種の抗原を固相反応材上のカルボニル基と抗原のアミノ基との間のアミド結合によって固相反応材の表面に連結させることができる。このような方法で抗原をその表面に結合させることができる代表的な固相反応材は、Co-star DNA-BIND共有結合（covalent）プレート（Co-star、Corning、NY）である。カルボニル基がその上に結合している固相反応材、従って、抗原をその表面にアミド結合によって結合させることができ

40

50

る能力を有する固相反応材は、本明細書中では「修飾型固相反応材」という。

【0010】

1つまたは2つ以上の目的とするスフィンゴ糖脂質が修飾型固相反応材に結合させられる。修飾型固相反応材に「連結(linked)」または「結合(attached)」している目的とするスフィンゴ糖脂質は、アミド結合をスフィンゴ糖脂質のアミノ基と修飾型固相反応材に結合しているカルボニル基との間において形成しているスフィンゴ糖脂質である。代表的なスフィンゴ糖脂質には、スルホグルクロニルパラグロボシド(SGGP)が含まれる。1つのタイプのスフィンゴ糖脂質を使用することができる；あるいは、2つ以上のタイプのスフィンゴ糖脂質を共有結合(covalent-linkage)固相反応材に連結させることができる。本明細書中で使用されている、「少なくとも1つ」の目的とするスフィンゴ糖脂質がその上に連結されている固相反応材は、1つのタイプの目的とするスフィンゴ糖脂質のみがその表面に存在し得るか、または2つ以上のタイプの目的とするスフィンゴ糖脂質がその表面に存在し得る。好ましい実施形態では、SGGPを修飾型固相反応材に連結させる。代表的な連結方法では、メタノール中で再構成され、リン酸塩緩衝生理食塩水に希釈された目的とするスフィンゴ糖脂質が使用される。所望する場合には、EDAC(1-エチル-3-(3-ジエチルアミノプロピル)カルボジイミド)もまた含まれ得る；例えば、1つの実施形態において、目的とするスフィンゴ糖脂質がSGGPである場合、EDACが、スフィンゴ糖脂質を含有する溶液に含まれる；その後、スフィンゴ糖脂質を含有する溶液は修飾型固相反応材をコーティングすることができる。修飾型固相反応材はカルボニル基を含有するので、スフィンゴ糖脂質に存在するアミノ基は、修飾型固相反応材上のカルボニル基にさらされたときにカルボニル基との間でアミド結合を形成する。1つまたは2つ以上のスフィンゴ糖脂質が結合している修飾型固相反応材は、本明細書中では「スフィンゴ糖脂質修飾型固相反応材」という。

10

20

30

40

50

【0011】

別のスフィンゴ糖脂質または糖タンパク質または炭水化物などの対照抗原もまた、修飾型固相反応材に結合させることができる。2つ以上の対照抗原を使用することができる。対照抗原は、例えば、既知の疾患状態を有する個体に由来する多数のサンプルを評価することによって同定することができる。「特異的な結合」は、サンプルの臨床的状态(疾患状態)に関して、目的とする抗原に対するサンプル中の抗体の統計学的に明らかにされた結合(例えば、特定の疾患状態を有する個体に由来する統計学的に有意な数のサンプルにおける、特定の抗原に対する抗体の結合)であることを意味する。既知の臨床的状态を有する個体に由来するサンプルによる特定の抗原に対する結合がないことは、非反応性(対照)の抗原であることを示していると一般に受けとめられる。

【0012】

対照抗原(1つまたは複数)は、目的とするスフィンゴ糖脂質(1つまたは複数)を修飾型固相反応材上にコーティングするために使用される方法と類似する方法を使用して修飾型固相反応材に結合させることができる。対照抗原は、通常、目的とするスフィンゴ糖脂質(1つまたは複数)とは異なる位置において修飾型固相反応材に結合させる。例えば、固相反応材がマイクロタイタープレートである場合、目的とするスフィンゴ糖脂質をプレートの特定のウェルに結合させることができ、そして対照抗原をプレートの他のウェルに結合させることができる。別の例において、2つ以上の目的とするスフィンゴ糖脂質をプレートに結合させる場合、対照抗原をプレートの特定のウェルに結合させる；第1の目的とするスフィンゴ糖脂質をプレートの他のウェルに結合させる；第2の目的とするスフィンゴ糖脂質を、対照抗原または目的とする第1のスフィンゴ糖脂質のいずれか等とは異なる、プレートのウェルに結合させる。あるいは、対照抗原を別の固相反応材に結合させることができる。この場合、別の固相反応材は、目的とするスフィンゴ糖脂質(1つまたは複数)がコーティングされているのと同じタイプの固相反応材である。用語「スフィンゴ糖脂質修飾型固相反応材」は、1つまたは2つ以上の目的とするスフィンゴ糖脂質がその上に結合しているそのような修飾型固相反応材、ならびに1つまたは2つ以上の目的とするスフィンゴ糖脂質がその上に結合し、かつ1つまたは2つ以上の対照抗原がその上の異

なる位置で結合しているそのような修飾された共有結合固相反応材をいう。用語「対照抗原固相反応材」は、対照抗原（１つまたは複数）だけがその上に結合している固相反応材をいうために使用される。

【 0 0 1 3 】

スフィンゴ糖脂質修飾型固相反応材（および使用される場合には対照抗原固相反応材）は、試験サンプル中の１つまたは２つ以上の目的とするスフィンゴ糖脂質に対する抗体の存在の有無および／または量を決定するためのアッセイにおいて使用される。目的とするスフィンゴ糖脂質に対する抗体の存在、非存在および／または量についてのアッセイ対象の試験サンプルは、個体から得られる体液または組織のサンプルであり得る。例えば、試験サンプルは、血液、血清、脳脊髄液、尿、鼻腔分泌物、唾液、あるいは任意の他の体液または組織を含み得る。あるいは、試験サンプルは、個体から得られた体液または組織のサンプルから単離された抗体、特に I g M 抗体、I g G 抗体および／または I g A 抗体を含み得る。好ましい実施形態において、試験サンプルは、神経障害を有することが疑われる個体に由来する血清サンプルである。

10

【 0 0 1 4 】

試験サンプル中における抗スフィンゴ糖脂質抗体の存在の有無および／または量を決定するために、スフィンゴ糖脂質修飾型固相反応材を試験サンプルと接触させる。試験サンプルと接触させたスフィンゴ糖脂質修飾型固相反応材は、本明細書中では「接触させたスフィンゴ糖脂質修飾型固相反応材」という。接触させたスフィンゴ糖脂質修飾型固相反応材は、試験サンプル中に存在し得る目的とするスフィンゴ糖脂質（１つまたは複数）に対する何らかの抗体が、固相反応材に結合している目的とするスフィンゴ糖脂質（１つまたは複数）に結合することができる適切な条件のもとで維持される。用語「目的とするスフィンゴ糖脂質に対する抗体」は、目的とするスフィンゴ糖脂質に優先的に結合する抗体（１つまたは複数）をいう。例えば、目的とするスフィンゴ糖脂質に対する抗体は、統計学的に有意な量だけ、対照抗原（例えば、糖脂質、糖タンパク質または炭水化物）に対するよりも多い量で、かつ／または他のスフィンゴ糖脂質に対するよりも多い量で目的とするスフィンゴ糖脂質に優先的に結合する。

20

【 0 0 1 5 】

修飾型固相反応材上において目的とするスフィンゴ糖脂質（１つまたは複数）に結合している、試験サンプル中の目的とするスフィンゴ糖脂質（１つまたは複数）に対する抗体の存在の有無および／または量が、存在する場合には決定される。その量は、目的とするそれぞれのスフィンゴ糖脂質に対して別々に測定される。抗体は、目的とするスフィンゴ糖脂質と特異的に相互作用することが予想される；すなわち、抗体は、目的とする１つのスフィンゴ糖脂質と優先的に相互作用するが、目的とする別のスフィンゴ糖脂質とは優先的に相互作用しない。

30

【 0 0 1 6 】

抗体の存在の有無および／または量は、固相酵素免疫測定法（E L I S A）、固相放射免疫アッセイまたは他の固相免疫アッセイを含む標準的な技術を使用する様々な方法で決定することができる（Ausubel, F. M. 他編、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1996年、特にユニット11.2（E L I S A）およびユニット11.16（特異的抗体力価の測定）を参照のこと；この参考文献の全教示は参照により本明細書中に組み込まれる）。例えば、典型的な固相免疫アッセイでは、修飾型固相反応材に結合した目的とするスフィンゴ糖脂質に結合している抗体の存在の有無または量が、目的とするスフィンゴ糖脂質に対する抗体に結合する検出抗体などの顕色試薬を使用して決定される。検出抗体は、検出を容易にするために、酵素または蛍光基（fluorophore）などの別の分子に連結または結合させることができる。あるいは、検出抗体はヨウ素化される。２つ以上の目的とするスフィンゴ糖脂質が使用される場合、異なる検出抗体を、それぞれの目的とするスフィンゴ糖脂質に対する各抗体を検出するために使用することができる。例えば、１つの目的とするスフィンゴ糖脂質に対する抗体に結合する検出抗体を第１の蛍光基に

40

50

結合させることができ、そして第2の目的とするスフィンゴ糖脂質に対する抗体に結合する検出抗体を、第1の蛍光基とは識別可能な第2の蛍光基に結合させることができる。あるいは、同じ検出試薬が使用される場合、特定の位置における検出試薬の存在が、その位置において修飾型固相反応材に結合している目的とするスフィンゴ糖脂質に対する抗体の存在に対応するように、異なる目的とするスフィンゴ糖脂質を異なる同定可能な位置で修飾型固相反応材に結合させることができる。

【0017】

好ましい実施形態では、ELISAアッセイが、西洋ワサビペルオキシダーゼなどの酵素に連結されている検出抗体を顕色試薬として使用して行われる。接触させたスフィンゴ糖脂質修飾型固相反応材は顕色試薬とともにインキュベーションされ、顕色処理された、接触させた固相反応材が得られる。続いて、酵素の基質が、顕色処理された、接触させた固相反応材に加えられ、そして酵素のその基質に対する活性量（例えば、基質の加水分解量）が光学密度の測定などの適切な手段により測定される。

10

【0018】

目的とするスフィンゴ糖脂質（1つまたは複数）に対する抗体の力価は、標準的な変換アルゴリズムを使用して、目的とするスフィンゴ糖脂質に対する抗体に結合した検出抗体の量から計算することができる。例えば、顕色試薬が西洋ワサビペルオキシダーゼを含む場合、抗体の力価は、Pestronk他（Ann. Neurol. 27: 316~326 (1990)）に示されているように計算することができる。

【0019】

対照抗原が修飾型固相反応材に結合している場合、対照抗原に結合している抗体の力価は、目的とするスフィンゴ糖脂質に結合している抗体の力価から差し引かれる。目的とするスフィンゴ糖脂質に結合している抗体の力価と、対照抗原（1つまたは複数）に結合している抗体の力価との差は、目的とするスフィンゴ糖脂質に対する抗体が特異的（選択的）に結合していることを示している。対照抗原が別の修飾型固相反応材に結合している場合、対照抗原修飾型固相反応材は、スフィンゴ糖脂質修飾型固相反応材と同じ様式で試験サンプルと接触させられ、そして同じ条件下で維持される。対照抗原に対する抗体の量が、目的とするスフィンゴ糖脂質に対する抗体の量を決定するために使用されているのと同じ方法によって決定される。

20

【0020】

自己免疫疾患（特に、免疫媒介性神経障害）が、目的とするスフィンゴ糖脂質に対する抗体の量を測定するこれらの方法を使用して診断され得る。目的とする疾患を診断するために、試験サンプルは、神経障害の存在についての試験対象の個体から得られたサンプルである。試験サンプル中の目的とするスフィンゴ糖脂質（1つまたは複数）に対する抗体の量が、少なくとも1つの比較可能な対照サンプル（すなわち、目的とする疾患に罹患していない個体に由来する同じタイプ（1つまたは複数）の抗体（IgM、IgGおよび/またはIgA）のサンプル）における目的とするスフィンゴ糖脂質（1つまたは複数）に対する比較可能な抗体の量と比較される。対照サンプルは、目的とする疾患に悩まされていない任意の個体に由来するサンプルであり得る；しかし、対照サンプルが、疾患を有しない個体に由来することは必ずしも必要ない。例えば、対照サンプルは、異なる免疫媒介性疾患または全身性免疫障害を有する個体に由来するサンプルであり得る。「比較可能」な正常なサンプルは、試験サンプルと同じタイプの体液または組織のサンプルである；あるいは、試験サンプルが、体液または組織のサンプルから単離されたIgM抗体である場合、比較可能な正常なサンプルまたは対照サンプルは、同じタイプの体液または組織から単離されたIgM抗体のサンプルである。2つ以上の対照サンプルを使用することができる。試験サンプル中の結合している特異的（選択的）なスフィンゴ糖脂質抗体の量が、比較可能な対照サンプル中の結合している特異的（選択的）なスフィンゴ糖脂質抗体の量よりも統計学的に有意な量だけ多く存在することにより、神経障害の診断と相関され得る「陽性」の結果が示される。あるいは、「陽性」の結果はまた、初期のスクリーニングアッセイに対する「陽性」の結果と見なされ得る；陽性の初期スクリーニングアッセイは、神経

30

40

50

障害に寄与するか、または神経障害について診断される同じ自己抗体またはさらなる自己抗体の存在を検出するために試験をさらに行うべきであることを示している。

【0021】

あるいは、試験サンプル中の目的とするスフィンゴ糖脂質（1つまたは複数）に対する抗体の量は「基準量」と比較することができる。本明細書中で使用されている基準量は、特定の疾患状態と関連することが以前に明らかにされている目的とするスフィンゴ糖脂質に対する抗体の量（たとえば、力価）である。例えば、基準量は、上記に記載されているような比較可能な対照サンプルだけでなく、既知の疾患（例えば、神経障害）を有する個体に由来する1組のサンプルにおける目的とするスフィンゴ糖脂質（1つまたは複数）に対する抗体の量を評価し、そしてどのくらいの抗体量が疾患と関連するかを決定することによって決定することができる。試験サンプル中の目的とするスフィンゴ糖脂質（1つまたは複数）に対する抗体の量が基準量以上であることは、疾患の診断と関連され得る「陽性」の結果を示している。あるいは、上記において議論されているように、「陽性」の結果はまた、初期スクリーニングアッセイについて「陽性」の結果であると思なすことができる。このことは、神経障害に寄与するか、または神経障害について診断される同じ自己抗体またはさらなる自己抗体の存在を検出するために試験をさらに行うべきであることを示している。

10

【0022】

本発明はまた、本発明の方法において使用され得るキットを包含する。キットは下記の構成成分を含む：（1）カルボニル基を有し、かつアミド結合によって結合している1つまたは2つ以上の目的とするスフィンゴ糖脂質をも有する修飾型固相反応材；および（2）目的とするスフィンゴ糖脂質（1つまたは複数）に対する抗体に結合する標識された検出抗体。検出抗体は、抗体のタイプ（例えば、IgM、IgGまたはIgA）に対して特異的であり得る。検出抗体は、酵素、放射活性分子または蛍光剤などの検出可能な薬剤に結合した抗体を含むことができる。検出抗体が、添加された基質と反応して着色生成物をもたらす酵素（西洋ワサビペルオキシダーゼなど）に結合している場合、キットはその基質を含むことができる。

20

【0023】

次に、本発明を下記の実施例によってさらに説明する。

【0024】

30

実施例：

共有結合固相酵素免疫測定法（ELISA）プレートを使用する抗体力価の比較抗体の共有結合プレートへの連結

新しい1%EDACを含むPBS（1mlのPBSに対して0.01gEDC）を各アッセイプレートについて5.5ml調製した。SGPG保存溶液のアリコートに1%EDACに希釈して、所望する濃度の抗原コーティング溶液を作製した。

【0025】

各プレートには、5.5mlの抗原コーティング溶液が必要であった。プレートを、プレートを損傷させ得る直射光を避けるホイル袋から使用直前に取り出した。抗原コーティング溶液（100μl/ウェル）をA列、B列、E列およびF列に加え、C列、D列、G列およびH列は、抗原ブランクウェルとして未コーティングのままにした。コーティングされたプレートを暗所において4で一晩（16時間）インキュベーションした。その後、コーティング溶液を吸引して、プレートを1%BSAで3回洗浄した。3回目の洗浄が終わった後、すべてのプレートウェルを1%BSAで満たして、プレートを暗所において4で少なくとも16時間ブロッキングした。

40

【0026】

サンプルの添加

Tecan社のロボット（Tecan USA、Durham、NC）を使用して、希釈されたサンプルおよび対照をプレートに加えた。その後、プレートを暗所において4で一晩インキュベーションした。

50

【0027】

検出抗体ブローブおよび比色定量反応

検出抗体（ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ヒトIgM）を1%BSAで希釈して、使用前の抗体の各ロットについて決定されている所望の希釈度にした。11mlの希釈された検出抗体を各プレートについて使用した。アッセイプレートを吸引して、1%BSAで6回洗浄し、その後、プロットした。希釈された検出抗体溶液（100μl/ウェル）をすべてのアッセイプレートに加えて、プレートを暗所において室温で2時間インキュベーションした。そのとき、基質溶液を調製した：100mgのOPDおよび12μlの30%過酸化水素を100mlの0.1Mクエン酸（pH4.5）に加えて、基質溶液（1枚のアッセイプレートあたり11ml）を作製した。その後、すべてのアッセイプレートを吸引して、1%BSAで6回洗浄し、その後、プロットした。基質溶液（100μl/ウェル）をすべてのアッセイプレートに加え、その後、遮光するためにカバーを置いた。プリーズ（Please）を室温でインキュベーションして、両方の陽性対照が使用中の陽性対照について確認されている確立された最少ODに達するまで、405nmにおいて基質添加後の約20分間の読み取りを行った。

【0028】

結果

バックグラウンドノイズ

結果

カルボニル基で修飾されたプレート（Co-star DNA-Bind）と第二級アミノ基で修飾されたプレート（Nunc Covalink）とのバックグラウンドノイズの比較を上記のように行った。陽性の臨床的SGPG対照を、シグナルを表すために使用し、バックグラウンドはBSA緩衝液ブランク（サンプルなし）とした。結果を表1および図に示す。

【0029】

【表1】

表1 異なるELISAプレートでのバックグラウンドノイズの比較

プレート	シグナル	バックグラウンド
Co-star DNA-Bind	0.815	0.054
Nunc Covalink	0.815	0.354

【0030】

図には、カルボニル基がその上に結合しているプレート（Co-star DNA-Bindプレート）と第二級アミノ基がその表面に結合しているプレート（NUNC Coatingプレート、Nunc；Roskilde、デンマーク）とのシグナル対バックグラウンドノイズを比較した結果が示されている。カルボニル基を有するプレートは、第二級アミノ基を有するプレートと比較して低いバックグラウンドノイズを示したことが理解され得る。

【0031】

再現性および感度

共有結合プレートに連結させたSGPGでの実験により、並外れた再現性が明らかにされた。共有結合プレートの日間変動性を測定するために、25個のSGPG臨床サンプル（SGPGに対する抗体が存在する血清）を2日離して上記のようにアッセイした。サンプルについての生データの平均変動は、限界分散（critical variance）（C.V.）によって評価される場合、7%に等しかった（表2参照）。この値は、20%（例えば、Torbeck, L.D., Assay Validation Basics（Suffield Press, Skokie IL, 1996年5月）を参照のこと）である臨床ELISAアッセイについて通常的に受け入れられ得るC.V.よりも

十分に小さい。

【 0 0 3 2 】

【 表 2 】

表2 アッセイ変動

サンプル #	1日目 生データ	2日目 生データ	平均 生データ	標準偏差 生データ	% C.V.
1	0.435	0.400	0.418	0.025	6%
2	0.421	0.380	0.401	0.029	7%
3	0.235	0.255	0.301	0.014	5%
4	0.865	0.911	0.888	0.033	4%
5	0.543	0.478	0.511	0.046	9%
6	0.678	0.726	0.678	0.034	5%
7	0.532	0.467	0.532	0.046	9%
8	0.739	0.657	0.712	0.058	8%
9	0.651	0.578	0.615	0.052	8%
10	0.349	0.299	0.324	0.035	11%
11	0.496	0.412	0.454	0.059	13%
12	0.716	0.667	0.692	0.035	5%
13	0.775	0.834	0.805	0.042	5%
14	0.653	0.735	0.694	0.058	8%
15	0.554	0.478	0.516	0.054	10%
16	0.453	0.432	0.443	0.015	3%
17	0.169	0.203	0.186	0.024	13%
18	0.178	0.156	0.167	0.016	9%
19	0.564	0.556	0.560	0.006	1%
20	0.435	0.378	0.407	0.040	10%
21	0.902	0.923	0.913	0.015	2%
22	0.334	0.299	0.317	0.025	8%
23	0.567	0.533	0.550	0.024	4%
24	0.456	0.467	0.462	0.008	2%
25	0.786	0.734	0.760	0.037	5%
				平均 % C.V.	7%

10

20

30

【 0 0 3 3 】

% C . V . = (標準偏差) ÷ (平均) × 1 0 0

【 0 0 3 4 】

S G P G に対する E L I S A は、神経学的症状の病因を同定することにおいて、M A G ウエスタンなどの別の臨床アッセイに対する予備的なスクリーニング試験として使用することができる。M A G ウエスタン、ミエリン結合糖タンパク質に対する抗体を検出するために使用される；抗 M A G 抗体は末梢神経障害（例えば、Quarles, R. H. および Weiss, M. D.、Muscle Nerve、22 (7) : 800 ~ 22 (1999) に記載されている M A G 抗体に関連する脱髄性の感覚神経障害または感覚運動神経障害を参照のこと）と関連する。S G P G に対する E L I S A は予備的なスクリーニングアッセイである；S G P G アッセイにおいて陽性であると評価されるサンプルは、その後、M A G ウエスタンアッセイにおいて試験される。S G P G アッセイにおいて陽性の結果、その後の M A G ウエスタンアッセイにおいて陰性の結果の場合は、偽陽性と見なされる。しかし、S G P G アッセイにおいて陽性の結果、その後の M A G ウエスタンアッセイにおいて陽性の結果は、神経学的症状に対する自己免疫的病因を示唆している（従って、神経障害について診断され得る）。

40

【 0 0 3 5 】

M A G ウエスタンを用いて以前に試験された個体に由来する一連の臨床サンプルを、従来のプレート（Falcon社のポリスチレンプレート）と、スフィンゴ糖脂質をプレート

50

にアミド連結させることができるカルボニル基で修飾されたプレート（C o - s t a r DNA - B I N D プレート）との両方を使用して上記のように試験した。その結果、M A G 陰性サンプル（M A G ウェスタンアッセイにおいて抗体の結合を有しないサンプル）は両方のプレートについて同一の陰性 S G P G 値を示すことが示された。しかし、驚くべきことに、M A G 陽性サンプル（M A G ウェスタンアッセイにおいて抗体の結合を示すサンプル）の 90%（27/30）は、修飾されたプレートにおいて、従来のプレートよりも大きな抗体力価を有していた。結果を表 3 に示す。

【 0 0 3 6 】

【表 3】

表3 MAGウェスタン陽性サンプルについてのSGPG抗体力価の比較
（高い方の力価値を太字で表示）

サンプル#	従来のプレート SGPG力価	共有結合プレートSGPG 力価
1	6400	409600
2	51200	819200
3	102400	819200
4	204800	204800
5	25600	409600
6	51200	204800
7	102400	>819200
8	819200	>819200
9	12800	102400
10	409600	>819200
11	102400	>819200
12	204800	>819200
13	819200	>819200
14	102400	819200
15	12800	204800
16	819200	>819200
17	819200	204800
18	51200	204800
19	1600	6400
20	25600	819200
21	51200	204800
22	409600	204800
23	409600	>819200
24	25600	204800
25	819200	>819200
26	51200	409600
27	3200	102400
28	25600	204800
29	3200	204800
30	102400	819200

【 0 0 3 7 】

これらの結果により、スフィンゴ糖脂質をプレートにアミド結合させることができるカルボニル基で修飾されたプレートを使用するアッセイは、M A G ウェスタン陽性サンプルに

10

20

30

40

50

おける抗体に対して著しくより大きな感度を有することが明らかにされる。従って、このアッセイは、M A G ウェスタンアッセイを使用して試験しなければならないサンプルに対するより高感度なスクリーニング試験として役に立つ。

【 0 0 3 8 】

本発明がその好ましい実施形態を参照して具体的に示され、かつ説明されているが、形態および細部における様々な変化が、添付された特許請求の範囲によって包含される本発明の範囲から逸脱することなく本発明において行われ得ることが当業者により理解されるであろう。本明細書中に引用されているすべての参考文献の教示はその全体が参照により組み込まれる。

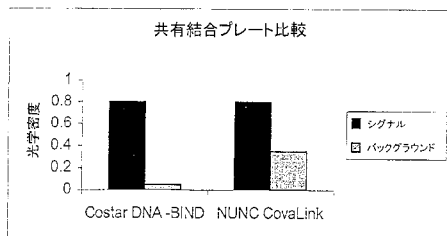
【 図面の簡単な説明 】

10

【 図 1 】

図は、2種類の固相反応材のシグナル対バックグラウンドノイズの比較を示すグラフである。黒：シグナル；灰色：バックグラウンド。

【 図 1 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
7 February 2002 (07.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/10441 A1

- (51) International Patent Classification: **C12Q 1/06**,
G01N 33/53, 33/531, 33/533, 33/536, 33/537, 33/541,
33/543, 33/551, 33/563, 33/564, 33/566
- (72) Inventors: **ROBICHAUD, Normand, J.**, 27 Lancaster
Street, Leominster, MA 01453 (US). **KERTILES, Louis,**
P., 249 Glen Valley Road, Petersham, MA 01366 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/23239
- (74) Agents: **BROOK, David, E.** et al., Hamilton, Brook,
Smith & Reynolds, P.C., 530 Virginia Road, P.O. Box
9133, Concord MA 01742-9133 (US).
- (22) International Filing Date: 24 July 2001 (24.07.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (81) Designated States (national): CA, JP.
- (30) Priority Data: 09/626,685 27 July 2000 (27.07.2000) US
Published:
— with international search report
- (71) Applicant: **ATHENA DIAGNOSTICS, INC.** [US/US];
377 Plantation Street, Four Biotech Park, Worcester, MA
01605 (US). For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/10441 A1

(54) Title: DETECTION OF ANTIBODIES TO GLYCOSPHINGOLIPIDS USING SOLID-PHASE REACTANTS COATED
WITH CARBONYL GROUPS(57) Abstract: Methods of detecting antibodies to one or more glycosphingolipid(s) of interest in a sample are disclosed which
comprise using a solid-phase reactant having carbonyl groups attached thereon, and the glycosphingolipid(s) of interest linked to the
solid-phase reactant by an amide bond between an amino group of the glycosphingolipid of interest and a carbonyl group attached
to the solid-phase reactant. The methods of detecting antibodies to glycosphingolipid(s) of interest can be used in methods of diag-
nosing autoimmune diseases in an individual.

WO 02/10441

PCT/US01/23239

DETECTION OF ANTIBODIES TO GLYCOSPHINGOLIPIDS USING
SOLID-PHASE REACTANTS COATED WITH CARBONYL GROUPS

BACKGROUND OF THE INVENTION

Antibodies to the glycosphingolipid, sulfolglucuronyl paragloboside (SGPG) have been implicated in many different autoimmune diseases. For example, serum IgM antibodies to GM ganglioside have been found in patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (Younes-Chennoufi, B.A. *et al.*, *J. Neuroimmunol.* 57:111-5 (1995)) chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (Yuki, N. *et al.*, *J. Neuroimmunol.* 70:1-6 (1996)), and acute Guillain-Barré syndrome (Ilyas, A.A. *et al.*, *J. Neurol. Sci.* 105:108-17 (1991)).

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) have been used for identification of anti-glycosphingolipid antibodies; however, high background values frequently interfere with accurate assessment of the amount of such antibodies. Reliable measurement of anti-glycosphingolipid antibodies is critical for correct diagnosis of immune diseases.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention pertains to methods of determining, in a test sample, the presence or absence, or the amount, of antibodies directed against a specific nervous system antigen or antigens, using a modified solid-phase reactant. The method utilizes a solid-phase reactant, such as a microtiter plate, that is modified with carbonyl groups attached to its surface. One or more glycosphingolipids of interest (e.g., sulfolglucuronyl paragloboside (SGPG)) are linked to the modified solid-phase reactant by an amide bond between an amino group of the glycosphingolipid and a carbonyl group attached to the solid-phase reactant. One or more control antigens, such as other glycosphingolipids, glycolipids, glycoproteins, gangliosides or carbohydrates, can also be attached on the surface of the modified solid-phase reactant. The modified solid-phase reactant having glycosphingolipid(s)

WO 02/10441

PCT/US01/23239

-2-

of interest linked thereon is contacted with a test sample, such as a test sample of a bodily fluid (e.g., blood, serum, cerebrospinal fluid, or urine) from an individual, under conditions such that any antibody to the glycosphingolipid(s) of interest that may be present in the test sample can bind to the glycosphingolipid(s) of interest
5 linked to the modified solid-phase reactant. The presence or absence, or amount, of antibodies in the test sample to the glycosphingolipid(s) of interest is then determined using standard methods, such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or another appropriate solid-phase assay. If a control antigen is attached on the modified solid-phase reactant, the presence or absence, or level, of antibodies in
10 the test sample to the control antigen, can also be determined using the same methods. Specific reactivity of antibodies to the glycosphingolipid of interest is determined by the amount of antibody binding to the glycosphingolipid of interest that is above the amount of antibody binding to the control antigen.

The methods can be used in diagnosis of autoimmune diseases in an
15 individual. The amount of antibody to a glycosphingolipid of interest in a test sample from the individual is determined using the methods. An amount of antibody to a glycosphingolipid of interest that is greater, by an amount that is statistically significant, than the amount of antibody to the glycosphingolipid of interest in a control sample, may be indicative of the presence of an autoimmune
20 disease. Alternatively, an amount of antibody to a glycosphingolipid of interest that is equal to or greater than an established reference amount may be indicative of the presence of the disease. For example, the methods can be used as a preliminary screening assay; an amount of antibody to a glycosphingolipid of interest that is greater, by an amount that is statistically significant, than the amount of antibody to
25 the glycosphingolipid of interest in a control sample, or an amount of antibody to a glycosphingolipid of interest that is equal to or greater than an established reference amount, is considered a "positive" screening result that substantiates additional study of other antibodies that are involved in autoimmune disease.

The invention also pertains to modified solid-phase reactants having
30 carbonyl groups attached thereon and glycosphingolipid(s) of interest linked to the

WO 02/10441

PCT/US01/23239

-3-

carbonyl groups, as well as test kits containing such modified solid-phase reactants, for use in the methods of the invention.

The high sensitivity and specificity of the methods can clarify the differential diagnosis of autoimmune diseases. Furthermore, a modified solid-phase reactant
5 having carbonyl groups attached to its surface allows the use of a smaller amount of glycosphingolipid than the amount which would otherwise be necessary to perform similar assays with a solid-phase reactant not having this modification. In addition, a modified solid-phase reactant having carbonyl groups attached to its surface can be coated with a glycosphingolipid of interest without a need for toxic solvents; the
10 coating is not affected by humidity, and yields consistent and reproducible assay results.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWING

The Figure is a graphic depiction of a comparison of signal to background noise of two types of solid phase reactants. Black, signal; grey, background.

15 DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

A description of preferred embodiments of the invention follows.

The invention described herein relates to methods of determining the presence or absence, or amount, of antibodies to one or more glycosphingolipid(s) of interest in a sample. The invention further pertains to methods of diagnosing
20 autoimmune diseases in an individual by determining the amount of antibodies to one or more glycosphingolipid(s) of interest in a sample from the individual. Applicant has discovered that significantly increased sensitivity for antibodies to certain glycosphingolipids can be achieved by conducting an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using microtiter plates that are modified with
25 carbonyl groups, allowing amide linkage of glycosphingolipids to the plates.

As a result of this discovery, highly sensitive and specific methods of determining the presence or absence, and/or the amount, of antibody to one or more glycosphingolipid(s) of interest in a sample are now available. In the methods, a modified solid-phase reactant is used. The term, "solid-phase reactant", as used

WO 02/10441

PCT/US01/23239

-4-

herein, refers to a solid medium, such as a microtiter plate, a membrane (e.g., nitrocellulose), a bead, a dipstick, a thin-layer chromatographic plate, or other solid medium. In a preferred embodiment, the solid-phase reactant is a microtiter plate that can be used in a solid-phase immunoassay, such as an enzyme-linked

5 immunosorbent assay. The solid-phase reactant is modified such that carbonyl groups are grafted into the reactant. As a result of the presence of the carbonyl groups, certain antigens, such as glycosphingolipids, can be linked on the surface of the solid-phase reactant by an amide bond between the carbonyl group on the solid-phase reactant and the amino group of the antigen. A representative solid-phase
10 reactant that allows linkage of antigens on its surface in this manner is the Co-star DNA-BIND covalent plate (Co-star, Corning, NY). A solid-phase reactant that has carbonyl groups attached thereon and therefore has the ability to allow amide bond linkage of antigens onto its surface is referred to herein as a "modified solid-phase reactant".

15 One or more glycosphingolipid(s) of interest is linked to the modified solid-phase reactant. A glycosphingolipid of interest that is "linked" or "attached" to the modified solid-phase reactant is a glycosphingolipid that has formed an amide bond between an amino group of the glycosphingolipid and the carbonyl group attached to the modified solid-phase reactant. Representative glycosphingolipids include
20 sulfoglucuronyl paragloboside (SGPG). One type of glycosphingolipid can be used; alternatively, more than one type of glycosphingolipid can be linked to the covalent-linkage solid-phase reactant. As used herein, a solid-phase reactant having "at least one" glycosphingolipid of interest linked thereon may have only one type of glycosphingolipid of interest thereon, or may also have more than one type of
25 glycosphingolipid of interest thereon. In a preferred embodiment, SGPG is linked to the modified solid-phase reactant. A representative method of linking uses the glycosphingolipid of interest reconstituted in methanol and diluted into phosphate buffered saline. EDAC (1-ethyl-3-(3-diethylaminopropyl)carbodiimide) can also be included, if desired; for example, in one embodiment, if the glycosphingolipid of
30 interest is SGPG, EDAC is included in the solution containing the glycosphingolipid; the solution containing the glycosphingolipid is then allowed to

WO 02/10441

PCT/US01/23239

-5-

coat the modified solid-phase reactant. Because the modified solid-phase reactant contains carbonyl groups, amino groups present on the glycosphingolipids form amide bonds with the carbonyl groups when exposed to the carbonyl groups on the modified solid-phase reactant. A modified solid-phase reactant on which one or
5 more glycosphingolipid(s) is attached is referred to herein as a "glycosphingolipid modified solid-phase reactant".

A control antigen, such as another glycosphingolipid, or a glycoprotein or carbohydrate, can also be attached to the modified solid-phase reactant. More than one control antigen can be used. A control antigen can be identified, for example,
10 by evaluation of a number of samples from individuals having known disease states. "Specific binding" is indicated by statistically demonstrated binding of antibody in the sample to the antigen of interest, relative to the clinical status (disease state) of the samples (e.g., binding, in a statistically significant number of samples from individuals having a particular disease state, of antibody to the particular antigen).
15 A lack of binding to a particular antigen by a sample from an individual having a known clinical status is generally accepted as being indicative of a non-reactive (control) antigen.

The control antigen(s) can be attached to the modified solid-phase reactant using methods similar to those used to coat the glycosphingolipid(s) of interest onto
20 the modified solid-phase reactant. The control antigen is usually attached to the modified solid-phase reactant at a different location than the glycosphingolipid(s) of interest. For example, if the solid-phase reactant is a microtiter plate, a glycosphingolipid of interest can be attached to certain wells of the plate, and the control antigen can be attached to other wells of the plate. In another example, if
25 more than one glycosphingolipid of interest is attached to the plate, the control antigen is attached to certain wells of the plate; a first glycosphingolipid of interest is attached to other wells of the plate; a second glycosphingolipid of interest is attached to different wells of the plate from either the control antigen or the first glycosphingolipid of interest, etc. Alternatively, the control antigen can be attached
30 to a separate solid-phase reactant, the separate solid-phase reactant being the same type of solid-phase reactant as that onto which the glycosphingolipid(s) of interest is

WO 02/10441

PCT/US01/23239

-6-

coated. It is intended that the term, "glycosphingolipid modified solid-phase reactant", refers to those modified solid-phase reactants having one or more glycosphingolipid(s) of interest attached thereon, as well as to those modified covalent-linkage solid-phase reactants having one or more glycosphingolipid(s) of interest attached thereon as well as one or more control antigens attached at a different location thereon. The term, "control antigen solid-phase reactant" is used to refer to a solid-phase reactant having solely control antigen(s) attached thereto.

The glycosphingolipid modified solid-phase reactant (and control antigen solid-phase reactant, if used) is used in an assay to determine the presence or absence, and/or the amount, of antibody to one or more glycosphingolipid(s) of interest in a test sample. The test sample to be assayed for the presence, absence, and/or amount of antibody to a glycosphingolipid of interest can be a sample of bodily fluid or tissue from an individual. For example, the test sample can comprise blood, serum, cerebrospinal fluid, urine, nasal secretion, saliva, or any other bodily fluid or tissue. Alternatively, the test sample can comprise antibodies, and particularly IgM, IgG and/or IgA antibodies, that have been isolated from a sample of bodily fluid or tissue from the individual. In a preferred embodiment, the test sample is a serum sample from an individual suspected of having a neuropathy.

To determine the presence or absence, and/or amount, of anti-glycosphingolipid antibody in a test sample, the glycosphingolipid modified solid-phase reactant is contacted with the test sample. A glycosphingolipid modified solid-phase reactant that has been contacted with a test sample is referred to herein as a "contacted glycosphingolipid modified solid-phase reactant." The contacted glycosphingolipid modified solid-phase reactant is maintained under appropriate conditions to allow binding of any antibody to the glycosphingolipid(s) of interest that may be present in the test sample, to the glycosphingolipid(s) of interest that is attached to the solid-phase reactant. The term, "antibody to a glycosphingolipid of interest" refers to an antibody or antibodies that preferentially binds to the glycosphingolipid of interest. For example, an antibody to a glycosphingolipid of interest preferentially binds to the glycosphingolipid of interest in an amount that is greater than to control antigens (e.g., glycolipids, glycoproteins or carbohydrates),

WO 02/10441

PCT/US01/23239

-7-

and/or in an amount that is greater than to other glycosphingolipids, by an amount that is statistically significant.

- The presence or absence, and/or the amount, of antibody to the glycosphingolipid(s) of interest in the test sample, if any, that has bound to the glycosphingolipid(s) of interest on the modified solid-phase reactant is determined. The amount is determined separately for each glycosphingolipid of interest. It is expected that an antibody will specifically interact with a glycosphingolipid of interest; that is, an antibody will interact preferentially with one glycosphingolipid of interest, and not to another glycosphingolipid of interest.
- The presence or absence, and/or amount, of antibody can be determined by a variety of methods using standard techniques, including enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), solid phase radioimmunoassay, or other solid phase immunoassays (see Ausubel, F.M. *et al.*, eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1996, especially units 11.2 (ELISA) and 11.16 (Determination of Specific Antibody Titer); the entire teachings of this reference are incorporated herein by reference). In a typical solid-phase immunoassay, for example, the presence or absence, or amount, of antibody bound to the glycosphingolipid of interest attached to the modified solid-phase reactant is determined using a developing reagent, such as a detection antibody that binds to the antibody to the glycosphingolipid of interest. The detection antibody can be linked or conjugated to another molecule, such as an enzyme or fluorophore, to facilitate detection. Alternatively, the detection antibody is iodinated. If more than one glycosphingolipid of interest is used, different detection antibodies can be used to detect each antibody to each glycosphingolipid of interest. For example, a detection antibody that binds to an antibody to one glycosphingolipid of interest can be conjugated to a first fluorophore, and a detection antibody that binds to an antibody to a second glycosphingolipid of interest can be conjugated to a second fluorophore that is distinguishable from the first fluorophore. Alternatively, if the same detection reagent is used, the different glycosphingolipids of interest can be attached to the modified solid-phase reactant at a different, identifiable location, such that the presence of a detection reagent at a particular location corresponds to the presence of

WO 02/10441

PCT/US01/23239

-8-

antibodies to the glycosphingolipid of interest attached to the modified solid-phase reactant at that location.

In a preferred embodiment, an ELISA assay is performed, using as a developing reagent a detection antibody that is linked to an enzyme, such as horseradish peroxidase. The contacted glycosphingolipid modified solid phase-reactant is incubated with the developing reagent, forming a developed, contacted solid-phase reactant. Subsequently, a substrate of the enzyme is added to the developed, contacted solid-phase reactant, and the amount of activity of the enzyme on its substrate (e.g., the amount of hydrolysis of the substrate) is measured by an appropriate means, such as by measuring optical density.

Titers of antibodies to the glycosphingolipid(s) of interest can be calculated from the amount of detector antibody bound to the antibodies to the glycosphingolipid of interest, using standard conversion algorithms. For example, if the developing reagent comprises horseradish peroxidase, titers of antibody can be calculated as set forth in Pestronk *et al.* (Ann. Neurol. 27:316-326 (1990)).

If a control antigen is attached to the modified solid-phase reactant, titers of antibody binding to the control antigen are subtracted from the titers of antibody binding to the glycosphingolipid of interest. The difference between the titer of antibody binding to the glycosphingolipid of interest and the titer of antibody binding to the control antigen(s) is indicative of the specific (selective) binding of the antibody to the glycosphingolipid of interest. If the control antigen is attached to a separate modified solid-phase reactant, the control antigen modified solid-phase reactant is contacted with the test sample in the same manner as the glycosphingolipid modified solid-phase reactant and maintained under the same conditions. The amount of antibody to the control antigen is determined by the same method as is used to determine the amount of antibody to the glycosphingolipid of interest.

Autoimmune diseases, particularly immune-mediated neuropathies, can be diagnosed using these methods of determining the amount of antibody to a glycosphingolipid of interest. To diagnose a disease of interest, the test sample is a sample from an individual to be tested for the presence of a neuropathy. The amount

WO 02/10441

PCT/US01/23239

-9-

of antibody to a glycosphingolipid(s) of interest in the test sample is compared with the amount of comparable antibody to the glycosphingolipid(s) of interest in at least one comparable control sample (i.e., a sample of the same type(s) of antibody (IgM, IgG, and/or IgA) from an individual who is not afflicted by the disease of interest).

- 5 The control sample can be a sample from any individual who is not afflicted with the disease of interest; it is not necessary that the control sample be from an individual who is free of disease. For example, the control sample can be a sample from an individual who has a different immune-mediated disease, or systemic immune disorders. A "comparable" normal sample is a sample of the same type of body fluid
10 or tissue as the test sample; alternatively, if the test sample is IgM antibodies isolated from a sample of fluid or tissue, the comparable normal or control sample is a sample of IgM antibodies isolated from the same type of bodily fluid or tissue. More than one control sample can be used. The presence of an amount of specific (selective) glycosphingolipid antibody binding in the test sample that is greater, by
15 an amount that is statistically significant, than the amount of specific (selective) glycosphingolipid antibody binding in a comparable control sample, is indicative of a "positive" result which can be correlated with a diagnosis of the neuropathy. Alternatively, a "positive" result can also be considered a "positive" result for an initial screening assay; a positive initial screening assay indicates that further tests
20 should be performed to detect the presence of the same or additional autoantibodies which contribute to, or are diagnostic for, the neuropathy.

- Alternatively, the amount of antibody to a glycosphingolipid(s) of interest in the test sample can be compared with a "reference amount". A reference amount, as used herein, is an amount (e.g., a titer) of antibody to a glycosphingolipid of interest
25 which has been previously determined to correlate with a particular disease state. For example, a reference amount can be determined by assessing the amount of antibody to glycosphingolipid(s) of interest in a set of samples from individuals having known diseases (e.g., neuropathies), as well as comparable control samples as described above, and determining what amount of antibody correlates with
30 disease. An amount of antibody to a glycosphingolipid(s) of interest in the test sample that is equal to, or greater than, the reference amount, is indicative of a

WO 02/10441

PCT/US01/23239

-10-

“positive” result which can be correlated with a diagnosis of the disease. Alternatively, as discussed above, a “positive” result can also be considered a “positive” result for an initial screening assay, indicating that further tests should be performed to detect the presence of the same or additional autoantibodies which contribute to, or are diagnostic for, the neuropathy.

The present invention also includes kits to be used in methods of the invention. Kits can include the following components: (1) a modified solid-phase reactant having carbonyl groups, and also having one or more glycosphingolipid(s) of interest attached thereto by amide bonds; and (2) labeled detector antibody that binds to the antibody to the glycosphingolipid(s) of interest. The detector antibody can be specific for the type of antibody (e.g., IgM, IgG or IgA). Detector antibody can comprise an antibody bound to a detectable agent, such as an enzyme, radioactive molecule, or fluorescent agent. If the detector antibody is bound to an enzyme that reacts with an added substrate to yield a colored product, such as horseradish peroxidase, the kit can also include the substrate.

The invention is now further illustrated by the following Exemplification.

EXEMPLIFICATION:

COMPARISON OF ANTIBODY TITERS USING COVALENT-LINKAGE, ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) PLATES

20 *Linking of Antigen to Covalent Plates*

Fresh, 1% EDAC in PBS (0.01 g EDC per ml PBS) was prepared, for 5.5 ml for each assay plate. An aliquot of SGPG stock was diluted into 1% EDAC to make the antigen coating solution at the desired concentration.

Each plate required 5.5 ml of coating antigen solutions. Plates were removed from foil pouches just prior to use, avoiding direct light that could damage the plates. Antigen coating solution (100 µl/well) was added to rows A, B, E, and F; rows C, D, G and H were left un-coated as the antigen blank wells. Coated plates were incubated in the dark at 4°C overnight (16 hours). The coating solution was then aspirated, and the plates washed 3 times with 1% BSA. After the third wash,

WO 02/10441

PCT/US01/23239

-11-

all plate wells were filled with 1% BSA, and the plates were blocked for at least 16 hours at 4°C in the dark.

Sample Addition

A Tecan robot (Tecan USA, Durham, NC) was used to add diluted samples
5 and controls to the plates. The plates were then incubated at 4°C overnight in the dark.

Detection Antibody Probe and Colorimetric Reaction

Detection antibody (peroxidase conjugated goat anti-human IgM) was
diluted in 1% BSA to the desired dilution, which was determined for each lot of
10 antibody prior to use. Eleven ml of dilute detection antibody were used for each
plate. Assay plates were aspirated and washed 6 times with 1% BSA, and then
blotted. Dilute detection antibody solution (100 µl/well) was added to all assay
plates, and the plates were incubated in the dark at room temperature for 2 hours.
Substrate solution was then prepared: 100 mg of OPD and 12 µl of 30% hydrogen
15 peroxide were added to 100 ml of 0.1 M citric acid (pH 4.5) to form substrate
solution (11 ml per assay plate). All assay plates were then aspirated and washed 6
times with 1% BSA, and then blotted. Substrate solution (100 µl/well) was added to
all assay plates, which were then covered to avoid light exposure. Plates were
incubated at room temperature, and read approximately 20 minutes after addition of
20 substrate at 405 nm until both positive controls reached the established minimum
OD validated for the positive control in use.

Results

Background noise

Results

25 A comparison of the background noise of the plate modified with carbonyl
groups (Co-star DNA-Bind) and a plate modified with secondary amino groups
(Nunc Covalink) was performed, as described above. A positive clinical SGPG

WO 02/10441

PCT/US01/23239

-12-

control was used to represent the signal, and the background was a BSA buffer blank (absence of sample). Results are shown in Table 1 and The Figure.

Table 1 Comparison of Background Noise with Different ELISA Plates

Plate	Signal	Background
Co-star DNA-Bind	0.815	0.054
Nunc Covalink	0.815	0.354

The Figure demonstrates the results of the comparison of the signal to background noise of the plate having carbonyl groups attached thereon (the Co-star DNA-BIND plate) and the plate having secondary amino groups on its surface (NUNC Coating plate, Nunc; Roskilde, Denmark). It can be seen that the plate having carbonyl groups exhibited low background noise compared to the plate having secondary amino groups.

Reproducibility and Sensitivity

Experiments with SGPG linked to covalent plates demonstrated exceptional reproducibility. To measure day-to-day variability of the covalent plates, twenty-five SGPG clinical samples (serum in which antibodies to SGPG were present) were assayed on two separate days, as described above. The raw data average variation for the samples, measured by critical variance (C.V.) was equal to 7% (see Table 2). This value is well below the customary acceptable C.V. for clinical ELISA assays, which is 20% (see, e.g., Torbeck, L.D., *Assay Validation Basics*, Suffield Press, Skokie IL, May 1996).

WO 02/10441

PCT/US01/23239

-13-

Table 2 Assay Variation

	Sample #	Day 1 raw data	Day 2 raw data	Average raw data	Std.Dev. raw data	% C.V.
5	1	0.435	0.400	0.418	0.025	6%
	2	0.421	0.380	0.401	0.029	7%
	3	0.235	0.255	0.301	0.014	5%
	4	0.865	0.911	0.888	0.033	4%
	5	0.543	0.478	0.511	0.046	9%
10	6	0.678	0.726	0.678	0.034	5%
	7	0.532	0.467	0.532	0.046	9%
	8	0.739	0.657	0.712	0.058	8%
	9	0.651	0.578	0.615	0.052	8%
	10	0.349	0.299	0.324	0.035	11%
15	11	0.496	0.412	0.454	0.059	13%
	12	0.716	0.667	0.692	0.035	5%
	13	0.775	0.834	0.805	0.042	5%
	14	0.653	0.735	0.694	0.058	8%
	15	0.554	0.478	0.516	0.054	10%
20	16	0.453	0.432	0.443	0.015	3%
	17	0.169	0.203	0.186	0.024	13%
	18	0.178	0.156	0.167	0.016	9%
	19	0.564	0.558	0.560	0.006	1%
	20	0.435	0.378	0.407	0.040	10%
25	21	0.902	0.823	0.913	0.015	2%
	22	0.334	0.299	0.317	0.025	8%
	23	0.567	0.533	0.550	0.024	4%
	24	0.456	0.467	0.462	0.008	2%
	25	0.786	0.734	0.760	0.037	5%
Average % C.V.						7%

$$\% \text{ C.V.} = (\text{Std. Dev.}) \div (\text{Average}) \times 100$$

30 An ELISA for SGPG can be used as a preliminary screening test for another clinical assay, such as the MAG Western, in identifying the etiology of neurological symptoms. The MAG Western is used to detect antibodies to myelin associated glycoprotein; anti-MAG antibodies are associated with peripheral neuropathies (see, e.g., demyelinating sensory or sensorimotor neuropathy associated with MAG

35 antibodies described in Quarles, R.H. and Weiss, M.D., *Muscle Nerve* 22(7):800-22 (1999)). The ELISA for SGPG is a preliminary screening assay; samples testing positive in the SGPG assay are then tested in the MAG Western assay. A positive result in the SGPG assay, followed by a negative result in the MAG Western assay, is considered a false positive. However, a positive result in the SGPG assay,

WO 02/10441

PCT/US01/23239

-14-

followed by a positive result in the MAG Western assay, suggests an autoimmune etiology for neurological symptoms (and thus can be diagnostic for the neuropathy).

A series of clinical samples from individuals previously tested with the MAG Western were tested as described above, using both a traditional plate (Falcon
5 polystyrene plate) and a plate modified with carbonyl groups allowing amide linkage of glycosphingolipids to the plates (Co-star DNA-BIND plate). The results indicated that the MAG negative samples (sample which had no binding of antibodies in the MAG Western assay) showed identical negative SGPG values with both plates. Surprisingly, however, 90% (27 of 30) of the MAG positive samples
10 (samples which showed binding of antibodies in the MAG Western assay) had higher antibody titers on the modified plates than on traditional plates. Results are shown in Table 3.

WO 02/10441

PCT/US01/23239

-15-

TABLE 3: Comparison of SGPG Antibody Titers for MAG Western positive samples (higher titer values are boldfaced)

	Sample #	Traditional Plate SGPG Titer	Covalent Plate SGPG Titer
5	1	6400	409600
	2	51200	819200
	3	102400	819200
	4	204800	204800
	5	25600	409600
10	6	51200	204800
	7	102400	>819200
	8	819200	>819200
	9	12800	102400
	10	409600	>819200
15	11	102400	>819200
	12	204800	>819200
	13	819200	>819200
	14	102400	819200
	15	12800	204800
20	16	819200	>819200
	17	819200	204800
	18	51200	204800
	19	1600	6400
	20	25600	819200
25	21	51200	204800
	22	409600	204800
	23	409600	>819200
	24	25600	204800
	25	819200	>819200
30	26	51200	409600
	27	3200	102400
	28	25600	204800
	29	3200	204800
	30	102400	819200

35 These results demonstrate that the assay using a plate modified with carbonyl groups allowing amide linkage of glycosphingolipids to the plates is significantly more sensitive for antibodies in the MAG Western positive samples. Thus, it

WO 02/10441

PCT/US01/23239

-16-

serves as a more sensitive screening test for samples which should be tested using the MAG Western assay.

While this invention has been particularly shown and described with references to preferred embodiments thereof, it will be understood by those skilled in the art that various changes in form and details may be made therein
5 without departing from the scope of the invention encompassed by the appended claims. The teachings of all references cited herein are incorporated by reference in their entirety.

WO 02/10441

PCT/US01/23239

-17-

CLAIMS

What is claimed is:

1. A modified solid-phase reactant for identifying an antibody to a glycosphingolipid of interest, said reactant having carbonyl groups
5 attached thereon, and glycosphingolipid of interest linked to said attached carbonyl groups.
2. The modified solid-phase reactant of Claim 1, wherein the reactant further comprises an attached control antigen.
3. The modified solid-phase reactant of Claims 1 or 2, wherein the reactant
10 further comprises a plurality of different glycosphingolipids linked to said attached carbonyl groups.
4. The modified solid-phase reactant of Claims 1, 2 or 3, wherein the reactant is a microtiter plate.
5. A kit for detecting antibody to a glycosphingolipid of interest, comprising
15 a modified solid-phase reactant of Claims 1, 2, 3 or 4.
6. A method of detecting the presence or absence of antibody to a glycosphingolipid of interest in a test sample, the method comprising:
 - a) contacting the test sample to a modified solid-phase reactant
having carbonyl groups attached thereon, and glycosphingolipid of
20 interest linked to said attached carbonyl groups;
 - b) maintaining said modified solid-phase reactant under conditions to allow antibody in the test sample, if present, to bind to the glycosphingolipid of interest linked to said attached carbonyl groups of said modified solid-phase reactant; and

WO 02/10441

PCT/US01/23239

-18-

- c) detecting the presence or absence of antibody bound to the glycosphingolipid of interest.
7. A method of determining the amount of antibody to a glycosphingolipid of interest in a test sample, the method comprising:
- 5 a) contacting the test sample to a modified solid-phase reactant having carbonyl groups attached thereon, and glycosphingolipid of interest linked to said attached carbonyl groups;
- b) maintaining said modified solid-phase reactant under conditions to allow antibody in the test sample, if present, to bind to the glycosphingolipid of interest linked to said attached carbonyl groups of said modified solid-phase reactant; and
- 10 c) determining the amount of antibody bound to the glycosphingolipid of interest.
8. The method of Claim 7, wherein the modified solid-phase reactant further comprises control antigen linked to the attached carbonyl groups, and wherein the amount of antibody to the glycosphingolipid of interest is further determined by:
- 15 determining the amount of antibody bound to the control antigen linked to the attached carbonyl groups of said modified solid-phase reactant; and
- 20 subtracting the amount of antibody bound to the control antigen from the amount of antibody bound to the glycosphingolipid of interest,
- 25 wherein the difference between the amount of antibody bound to the control antigen and the amount of the antibody bound to the glycosphingolipid is equal to the amount of antibody specific to the glycosphingolipid of interest.

WO 02/10441

PCT/US01/23239

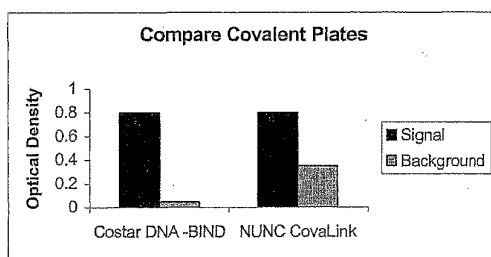
-19-

9. The method of Claim 6, 7 or 8, wherein the antibody is detected, or the amount of antibody is determined, by a method comprising incubating the modified solid-phase reactant with an agent that binds to the antibody to the glycosphingolipid of interest.
- 5 10. A method of diagnosing an autoimmune disease in an individual, said method comprising:
- a) contacting a test sample from the individual to a modified solid-phase reactant having carbonyl groups attached thereon and glycosphingolipid of interest linked to said attached carbonyl groups;
- 10 b) maintaining the modified solid-phase reactant under conditions to allow antibody in the test sample, if present, to bind to the glycosphingolipid linked to said attached carbonyl groups of said solid-phase reactant; and
- 15 c) determining the amount of antibody bound to the glycosphingolipid of interest,
- wherein an amount of antibody to the glycosphingolipid of interest that is either 1) greater, by an amount that is statistically significant, than the amount in a control sample, or 2) equal to or greater than a reference
- 20 amount, is indicative of the presence of the autoimmune disease.

WO 02/10441

PCT/US01/23239

1/1



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/23239
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/06; G01N 33/53, 33/531, 33/533, 33/536, 33/537, 33/541, 33/543, 33/551, 33/563, 33/564, 33/566 US CL : 435/7.1, 7.72, 7.9, 7.92, 39, 967, 975; 436/501, 507, 513, 518, 524, 536, 538, 540, 542, 543, 546, 811 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) U.S. : 435/7.1, 7.72, 7.9, 7.92, 39, 967, 975; 436/501, 507, 513, 518, 524, 536, 538, 540, 542, 543, 546, 811 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Medline, Embase, Biosis Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STN, EAST		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6,077,681 A (PESTRONK) 20 June 2000 (20.06.2000), see entire document.	1-3, 6-10
Y	LAURITZEN et al. Peptide Dot Immunoassay and Immunoblotting: Electroblothing from Aluminum Thin-Layer Chromatography Plates and Isoelectric Focusing Gels to Activated Nitrocellulose. Electrophoresis. 1993, Vol. 14, pages 852-859, see entire document.	1-3, 6-10
Y	YOUNES-CHENNOUFI et al. Anti-Sulfoglucuronyl Paragloboside IgM Antibodies in Amyotrophic Lateral Sclerosis. J. Neuroimmunology. 1995, Vol. 57, pages 111-115, see entire document.	1-3, 6-10
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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	"T" later documents 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	
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"A" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 30 August 2001 (30.08.2001)	Date of mailing of the international search report 02 NOV 2001	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Kurtic Padmanabhan Telephone No. 703-308-0196	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	
	International application No. PCT/US01/23239
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)	
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1.	☐ Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	☐ Claim 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.	☒ Claim Nos.: 4-5 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 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.

专利名称(译)	使用涂有羰基的固相反应材料检测抗鞘糖脂抗体		
公开(公告)号	JP2004505261A	公开(公告)日	2004-02-19
申请号	JP2002516357	申请日	2001-07-24
[标]申请(专利权)人(译)	雅典娜诊断茄子遗传学公司		
申请(专利权)人(译)	雅典娜诊断茄子遗传学公司		
[标]发明人	ロビチャウドノーマンドジェイ カーティルスルイスピー		
发明人	ロビチャウド,ノーマンド,ジェイ. カーティルス,ルイス,ピー.		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/564		
CPC分类号	G01N33/564 G01N33/54353 G01N2405/10 Y10S435/967 Y10S435/969 Y10S435/975 Y10S436/811		
FI分类号	G01N33/53.N		
优先权	09/626685 2000-07-27 US		
其他公开文献	JP2004505261A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了检测样品中一种或多种目标鞘糖脂的抗体的方法，其包括使用具有连接有羰基的羰基的固相反应物，和通过其与固相反应物连接的目标鞘糖脂。目标鞘糖脂的氨基与附着于固相反应物的羰基之间的酰胺键。检测目标鞘糖脂抗体的方法可用于诊断个体自身免疫疾病的方法中。

プレート	シグナル	バックグラウンド
Co-star DNA-Bind	0.815	0.054
Nunc Covalink	0.815	0.354