

(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2005-512056

(P2005-512056A)

(43) 公表日 平成17年4月28日(2005.4.28)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/564	GO 1 N 33/564	Z 4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 5/14	A 6 1 P 5/14	
A 6 1 P 5/38	A 6 1 P 5/38	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 58 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-549916 (P2003-549916)	(71) 出願人	399031230 アールエスアール リミテッド
(86) (22) 出願日	平成14年11月26日 (2002.11.26)		イギリス国 シーエフ2 7エイチイー
(85) 翻訳文提出日	平成16年5月24日 (2004.5.24)		カーディフ, ペントウィン, アベニュー
(86) 国際出願番号	PCT/GB2002/005285		パーク (番地なし)
(87) 国際公開番号	W02003/048772	(74) 代理人	100083932 弁理士 廣江 武典
(87) 国際公開日	平成15年6月12日 (2003.6.12)	(74) 代理人	100121429 弁理士 宇野 健一
(31) 優先権主張番号	0128583.2	(74) 代理人	100129698 弁理士 武川 隆宣
(32) 優先日	平成13年11月28日 (2001.11.28)	(74) 代理人	100129676 弁理士 ▲高▼荒 新一
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100130074 弁理士 中村 繁元
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 膵島細胞抗原分子及び又はインスリンに反応する自己抗体の検出

(57) 【要約】

膵島細胞抗原分子及びインスリン、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片から選択された一つ以上の抗原分子に反応する検体の自己抗体に関して、動物被検体から取得した体液試料をスクリーニングする方法と、こうした方法において使用するキット。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

膵島細胞抗原分子及びインスリン、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された一つ以上の抗原分子に反応する検体の自己抗体に関して、動物被検体から取得した体液試料をスクリーニングする方法であって、

(a) 前記被検体からの前記体液試料を提供するステップと、

(b) 検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能な抗原分子の一つ以上の第一のソースを提供するステップにして、前記抗原分子が、膵島細胞抗原分子と、インスリンと、前記膵島細胞抗原分子又はインスリンの一つ以上の変異体、類似体、誘導体、又は断片と、膵島細胞抗原分子、インスリン、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子と、から選択されるステップと、

10

(c) 検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能な抗原分子の一つ以上の第二のソースを提供するステップにして、前記抗原分子が、膵島細胞抗原分子と、インスリンと、前記膵島細胞抗原分子又はインスリンの一つ以上の変異体、類似体、誘導体、又は断片と、膵島細胞抗原分子、インスリン、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子と、から選択されるステップと、

(d) ステップ(b)及び(c)で提供された前記抗原分子を、スクリーニング中の前記体液試料に、同時又は連続的に接触させるステップにして、これにより、検体の自己抗体は、前記体液試料内に存在する時、前記抗原分子と相互作用でき、[前記第一のソースの抗原分子] - [検体の自己抗体] - [前記第二のソースの抗原分子]を含む一つ以上の複合体を形成可能となり、これにおいて、前記第一及び第二のソースの前記抗原分子は、前記一つ以上の複体内に存在する時に、共通の抗原分子を含むか、又はこれに由来し、或いは、これにおいて、前記第一及び第二のソースの前記抗原分子の結合領域は、前記検体の自己抗体に関して、前記一つ以上の複体内に存在する時に、共通の抗原分子内に存在するか、又はこれに由来するステップと、

20

(e) ステップ(d)の前に、又は同時に、又は後に、固定化手段を提供するステップにして、これにより、ステップ(d)において形成された複体内に存在する前記第一のソースの前記抗原分子を、ステップ(d)の前に、又は同時に、又は後に、固体支持体に固定化するステップと、

30

(f) ステップ(d)の前に、又は同時に、又は後に、直接的又は間接的に検出可能な標識手段を提供するステップにして、これにより、ステップ(d)において形成された複体内に存在する前記第二のソースの前記抗原分子に対して、ステップ(d)の前に、又は同時に、又は後に、こうした直接的又は間接的に検出可能な標識手段を設けるステップと、

(g) 前記試料内に存在する検体の自己抗体の表示を提供できるように、(d)において形成され、(e)に従って固定化された複体の存在を検出するステップと、を含む方法。

【請求項 2】

40

検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能な前記第一及び第二のソースの前記抗原分子が、GAD₆₅と、GAD₆₇と、IA-2と、インスリンと、GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、又はインスリンの一つ以上の変異体、類似体、誘導体、又は断片と、GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、インスリン、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子とで構成されるグループから選択される、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能な前記第一及び第二のソースの前記抗原分子が、GAD₆₅と、GAD₆₇と、IA-2と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片と、GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、及び前記一つ以上のその

50

変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子とで構成されるグループから選択される、請求項2記載の方法。

【請求項4】

GAD₆₅と、GAD₆₇と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるものと、GAD₆₅、GAD₆₇、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子とから選択され、ステップ(e)による固体支持体に固定化された、GAD抗原分子により本質的に構成される、抗原分子の第一のソースと、GAD₆₅と、GAD₆₇と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるものと、GAD₆₅、GAD₆₇、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子とから選択され、ステップ(f)による標識手段が設けられた、GAD抗原分子により本質的に構成される、抗原分子の第二のソースと、を提供するステップを含む、請求項3記載の方法。

10

【請求項5】

IA-2と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるものと、IA-2、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子とから選択され、ステップ(e)による固体支持体に固定化された、IA-2抗原分子により本質的に構成される、抗原分子の第一のソースと、IA-2と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるものと、IA-2、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子とから選択され、ステップ(f)による標識手段が設けられた、IA-2抗原分子により本質的に構成される、抗原分子の第二のソースと、を提供するステップを含む、請求項3記載の方法。

20

【請求項6】

(i) 検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互反応可能なGAD抗原分子の第一及び第二のソースにして、前記GAD抗原分子が、GAD₆₅と、GAD₆₇と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片と、GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子とから選択され、前記融合分子の前記抗原分子の少なくとも一つが、GAD₆₅、GAD₆₇、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片を含み、前記第一のソースのGAD抗原分子が、ステップ(e)による固体支持体に固定化され、前記第二のソースのGAD抗原分子には、ステップ(f)による標識手段が設けられたものと、(ii) 検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互反応可能なIA-2抗原分子の第一及び第二のソースにして、前記IA-2抗原分子が、IA-2と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片と、IA-2、GAD₆₅、GAD₆₇、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子とから選択され、前記融合分子の前記抗原分子の少なくとも一つが、IA-2、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片を含み、前記第一のソースのIA-2抗原分子が、ステップ(e)による固体支持体に固定化され、前記第二のソースのIA-2抗原分子には、ステップ(f)による標識手段が設けられたものと、を提供するステップを含む、請求項3記載の方法。

30

40

【請求項7】

豚島細胞抗原分子或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された一つ以上の抗原分子に反応する検体の自己免疫に関して、動物被検体から取得した体

50

液試料をスクリーニングする方法であって、

(a) 前記被検体からの前記体液試料を提供するステップと、

(b) 検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能な抗原分子の一つ以上の第一のソースを提供するステップにして、前記抗原分子が、G A D_{6.5}と、G A D_{6.7}と、I A - 2と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片と、G A D_{6.5}、G A D_{6.7}、I A - 2、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子と、から選択されるステップと、

(c) 検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能な抗原分子の一つ以上の第一のソースを提供するステップにして、前記抗原分子が、G A D_{6.5}と、G A D_{6.7}と、I A - 2と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片と、G A D_{6.5}、G A D_{6.7}、I A - 2、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子と、から選択されるステップと、

10

(d) ステップ (b) 及び (c) で提供された前記抗原分子を、スクリーニング中の前記体液試料に、同時又は連続的に接触させるステップにして、これにより、検体の自己抗体は、前記体液試料内に存在する時、前記抗原分子と相互作用でき、[前記第一のソースの抗原分子] - [検体の自己抗体] - [前記第二のソースの抗原分子] を含む一つ以上の複合体を形成可能となり、これにおいて、前記第一及び第二のソースの前記抗原分子は、前記一つ以上の複体内に存在する時に、共通の抗原分子を含むか、又はこれに由来し、或いは、これにおいて、前記第一及び第二のソースの前記抗原分子の結合領域は、前記検体の自己抗体に関して、前記一つ以上の複体内に存在する時に、共通の抗原分子内に存在するか、又はこれに由来するステップと、

20

(e) ステップ (d) の前に、又は同時に、又は後に、固定化手段を提供するステップにして、これにより、ステップ (d) において形成された複体内に存在する前記第一のソースの前記抗原分子を、ステップ (d) の前に、又は同時に、又は後に、固体支持体に固定化するステップと、

(f) ステップ (d) の前に、又は同時に、又は後に、直接的又は間接的に検出可能な標識手段を提供するステップにして、これにより、ステップ (d) において形成された複体内に存在する前記第二のソースの前記抗原分子に対して、ステップ (d) の前に、又は同時に、又は後に、こうした直接的又は間接的に検出可能な標識手段を設けるステップと、

30

(g) 前記試料内に存在する検体の自己抗体の表示を提供できるように、(d) において形成され、(e) に従って固定化された複体の存在を検出するステップと、を含む方法。

【請求項 8】

G A D 或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片に反応する検体の自己免疫に関して、動物被検体から取得した体液試料をスクリーニングする方法であって、

(a) 前記被検体からの前記体液試料を提供するステップと、

(b) G A D_{6.5}と、G A D_{6.7}と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能なものと、G A D_{6.5}、G A D_{6.7}、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子と、から選択された G A D 抗原分子により本質的に構成される、抗原分子の第一及び第二のソースを提供するステップにして、前記第一のソースの G A D 抗原分子が、ステップ (d) による固体支持体に固定化され、前記第二のソースの G A D 抗原分子には、ステップ (e) による標識手段が設けられるステップと、

40

(c) ステップ (b) で提供された前記抗原分子を、スクリーニング中の前記体液試料に、同時又は連続的に接触させるステップにして、これにより、検体の自己抗体は、前記体液試料内に存在する時、前記抗原分子と相互作用でき、[前記第一のソースの G A D 抗

50

原分子] - [検体の自己抗体] - [前記第二のソースのGAD抗原分子]を含む一つ以上の複合体を形成可能となるステップと、

(d)ステップ(c)の前に、又は同時に、又は後に、固定化手段を提供するステップにして、これにより、ステップ(c)において形成された複体内に存在する前記第一のソースの前記GAD抗原分子を、ステップ(c)の前に、又は同時に、又は後に、固体支持体に固定化するステップと、

(e)ステップ(c)の前に、又は同時に、又は後に、直接的又は間接的に検出可能な標識手段を提供するステップにして、これにより、ステップ(c)において形成された複体内に存在する前記第二のソースの前記GAD抗原分子に対して、ステップ(c)の前に、又は同時に、又は後に、こうした直接的又は間接的に検出可能な標識手段を設けるステップと、

10

(f)前記試料内に存在する検体の自己抗体の表示を提供できるように、(c)において形成され、(d)に従って固定化された複体の存在を検出するステップと、を含む方法。

【請求項9】

IA-2 或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片に反応する検体の自己免疫に関して、動物被検体から取得した体液試料をスクリーニングする方法であって、前記方法が、

(a)前記被検体からの前記体液試料を提供するステップと、

(b)IA-2と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能なものと、IA-2、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子と、から選択されたIA-2抗原分子により本質的に構成される、抗原分子の第一及び第二のソースを提供するステップにして、前記第一のソースのIA-2抗原分子が、ステップ(d)による固体支持体に固定化され、前記第二のソースのIA-2抗原分子には、ステップ(e)による標識手段が設けられるステップと、

20

(c)ステップ(b)で提供されたIA-2前記抗原分子を、スクリーニング中の前記体液試料に、同時又は連続的に接触させるステップにして、これにより、検体の自己抗体は、前記体液試料内に存在する時、前記IA-2抗原分子と相互作用でき、[前記第一のソースのIA-2抗原分子] - [検体の自己抗体] - [前記第二のソースのIA-2抗原分子]を含む一つ以上の複合体を形成可能となるステップと、

30

(d)ステップ(c)の前に、又は同時に、又は後に、固定化手段を提供するステップにして、これにより、ステップ(c)において形成された複体内に存在する前記第一のソースの前記IA-2抗原分子を、ステップ(c)の前に、又は同時に、又は後に、固体支持体に固定化するステップと、

(e)ステップ(c)の前に、又は同時に、又は後に、直接的又は間接的に検出可能な標識手段を提供するステップにして、これにより、ステップ(c)において形成された複体内に存在する前記第二のソースの前記IA-2抗原分子に対して、ステップ(c)の前に、又は同時に、又は後に、こうした直接的又は間接的に検出可能な標識手段を設けるステップと、

40

(f)前記試料内に存在する検体の自己抗体の表示を提供できるように、(c)において形成され、(d)に従って固定化された複体の存在を検出するステップと、を含む方法。

【請求項10】

GAD及びIA-2 或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片にそれぞれ反応する第一及び第二の検体の自己免疫に関して、動物被検体から取得した体液試料をスクリーニングする方法であって、

(a)前記被検体からの前記体液試料を提供するステップと、

(b)検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互反応可能なGAD抗原分子

50

の第一及び第二のソースを提供するステップにして、前記 G A D 抗原分子が、G A D₆₅と、G A D₆₇と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片と、G A D₆₅、G A D₆₇、I A - 2、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子とから選択され、前記融合分子の前記抗原分子の少なくとも一つが、G A D₆₅、G A D₆₇、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片を含み、前記第一のソースの G A D 抗原分子が、ステップ (e) による固体支持体に固定化され、前記第二のソースの G A D 抗原分子には、ステップ (f) による標識手段が設けられるステップと、

(c) 検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互反応可能な I A - 2 抗原分子の第一及び第二のソースを提供するステップにして、前記 I A - 2 抗原分子が、I A - 2 と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片と、I A - 2、G A D₆₅、G A D₆₇、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子とから選択され、前記融合分子の前記抗原分子の少なくとも一つが、I A - 2、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片を含み、前記第一のソースの I A - 2 抗原分子が、ステップ (e) による固体支持体に固定化され、前記第二のソースの I A - 2 抗原分子には、ステップ (f) による標識手段が設けられるステップと、

(d) ステップ (b) 及び (c) で提供された前記抗原分子を、スクリーニング中の前記体液試料に、同時又は連続的に接触させるステップにして、これにより、検体の自己抗体は、前記体液試料内に存在する時、前記抗原分子と相互作用でき、[前記第一のソースの G A D 抗原分子] - [検体の自己抗体] - [前記第二のソースの G A D 抗原分子] 又は [前記第一のソースの I A - 2 抗原分子] - [検体の自己抗体] - [前記第二のソースの I A - 2 抗原分子] を含む一つ以上の複合体を形成可能となるステップと、

(e) ステップ (d) の前に、又は同時に、又は後に、固定化手段を提供するステップにして、これにより、ステップ (d) において形成された複体内に存在する前記第一のソースの前記 G A D 又は I A - 2 抗原分子を、ステップ (d) の前に、又は同時に、又は後に、固体支持体に固定化するステップと、

(f) ステップ (d) の前に、又は同時に、又は後に、直接的又は間接的に検出可能な標識手段を提供するステップにして、これにより、ステップ (d) において形成された複体内に存在する前記第二のソースの前記 G A D 又は I A - 2 抗原分子に対して、ステップ (d) の前に、又は同時に、又は後に、こうした直接的又は間接的に検出可能な標識手段を設けるステップと、

(g) 前記試料内に存在する検体の自己抗体の表示を提供できるように、(d) において形成され、(e) に従って固定化された複体の存在を検出するステップと、を含む方法。

【請求項 1 1】

第一及び第二のソースの抗原分子が、前記一つ以上の複体内に存在する時に、一つ以上の共通抗原分子を含む、請求項 1 乃至 1 0 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2】

前記第一及び第二のソースの抗原分子が、一つ以上の複体内に存在する時に、G A D₆₅ 又は G A D₆₇ のいずれかを含む、請求項 1 乃至 4、6 乃至 8、又は 1 0 のいずれかに依存する、請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 1 3】

第一及び第二のソースの抗原分子が、一つ以上の複体内に存在する時に、I A - 2 を含む、請求項 1 乃至 3、5 乃至 7、9、又は 1 0 のいずれかに依存する、請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 1 4】

第一又は第二のソースのいずれか一方の抗原分子が、一つ以上の複体内に存在する時に、膵島細胞抗原分子及びインスリンから選択された抗原分子を含み、他方の抗原分子が、一つ以上の複体内に存在する時に、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に

相互作用可能である上記の一方の抗原分子の一つ以上の変異体、類似体、誘導体、又は断片を含む、請求項 1 乃至 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

第一又は第二のソースの抗原分子の一方が、一つ以上の複合体内に存在する時に、GAD₆₅又はGAD₆₇を含み、他方の抗原分子が、一つ以上の複合体内に存在する時に、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるGAD₆₅、GAD₆₇の一つ以上の変異体、類似体、誘導体、又は断片を含む、請求項 1 乃至 4、6 乃至 8、又は 10 のいずれかに依存する、請求項 14 記載の方法。

【請求項 16】

第一又は第二のソースの抗原分子の一方が、一つ以上の複合体内に存在する時に、IA-2を含み、他方の抗原分子が、一つ以上の複合体内に存在する時に、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるIA-2の一つ以上の変異体、類似体、誘導体、又は断片を含む、請求項 1 乃至 3、5 乃至 7、9、又は 10 のいずれかに依存する、請求項 14 記載の方法。

10

【請求項 17】

第一及び第二のソースの両方の抗原分子が、一つ以上の複合体内に存在する時、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能である、共通の抗原分子の、同じもの又は異なるものにするのが可能な、変異体、類似体、誘導体、又は断片を含む、請求項 1 乃至 11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 18】

第一及び第二のソースの両方の抗原分子が、一つ以上の複合体内に存在する時、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能である、GAD₆₅又はGAD₆₇の、同じもの又は異なるものにするのが可能な、変異体、類似体、誘導体、又は断片を含む、請求項 1 乃至 4、6 乃至 8、又は 10 のいずれかに依存する、請求項 17 記載の方法。

20

【請求項 19】

第一及び第二のソースの両方の抗原分子が、前記一つ以上の複合体内に存在する時、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能である、IA-2の、同じもの又は異なるものにするのが可能な、変異体、類似体、誘導体、又は断片を含む、請求項 1 乃至 3、5 乃至 7、9、又は 10 のいずれかに依存する、請求項 17 記載の方法。

30

【請求項 20】

前記一つ以上の第一のソースの前記抗原分子が、スクリーニング中の体液試料との接触の前に、固体支持体に固定化される、請求項 1 乃至 19 のいずれかに記載の方法。

【請求項 21】

前記一つ以上の第一のソースの前記固定化抗原分子を、その後、体液試料と前記一つ以上の第二のソースの前記抗原分子との接触と同時に、或いは連続して、スクリーニング中の体液試料と接触させる、請求項 20 記載の方法。

【請求項 22】

前記一つ以上の第一のソースの前記固定化抗原分子を、その後、抗原分子が固体支持体に固定化された[抗原分子]-[検体の自己抗体]を含む中間複合体が形成できるように、スクリーニング中の体液試料に接触させ、こうして形成された固定化中間複合体を、その後、溶液相において存在する、前記一つ以上の第二のソースの前記抗原分子に接触させ、第一のソースの抗原分子を介して固定支持体に固定化された[前記第一のソースの抗原分子]-[検体の自己抗体]-[前記第二のソースの抗原分子]を含む、前記複合体が形成できるようにする、請求項 21 記載の方法。

40

【請求項 23】

膵島細胞抗原分子及びインスリン、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された一つ以上の抗原分子に反応する検体の自己抗体に関して、動物被検体から取得した体液試料をスクリーニングする方法であって、

(a) 前記被検体からの前記体液試料を提供するステップと、

50

(b) 検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能な抗原分子の一つ以上の第一のソースを提供するステップにして、前記抗原分子が、膵島細胞抗原分子と、インスリンと、前記膵島細胞抗原分子又はインスリンの一つ以上の変異体、類似体、誘導体、又は断片と、膵島細胞抗原分子、インスリン、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子と、から選択され、前記前記一つ以上の第一のソースの抗原分子が、固体支持体に固定化されるステップと、

(c) 検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能な抗原分子の一つ以上の第二のソースを提供するステップにして、前記抗原分子が、膵島細胞抗原分子と、インスリンと、前記膵島細胞抗原分子又はインスリンの一つ以上の変異体、類似体、誘導体、又は断片と、膵島細胞抗原分子、インスリン、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子と、から選択され、前記一つ以上の第二のソースの抗原分子が、溶液相において提供されるステップと、

10

(d) ステップ(b)及び(c)で提供された前記抗原分子を、スクリーニング中の前記体液試料に、同時又は連続的に接触させるステップにして、これにより、検体の自己抗体は、前記体液試料内に存在する時、前記抗原分子と相互作用でき、[前記第一のソースの抗原分子] - [検体の自己抗体] - [前記第二のソースの抗原分子]を含む一つ以上の固定化された複合体を形成可能となり、これにおいて、前記第一及び第二のソースの前記抗原分子は、前記一つ以上の複体内に存在する時に、共通の抗原分子を含むか、又はこれに由来し、或いは、これにおいて、前記第一及び第二のソースの前記抗原分子の結合領域は、前記検体の自己抗体に関して、前記一つ以上の複体内に存在する時に、共通の抗原分子内に存在するか、又はこれに由来し、これにおいて、前記複合体が、前記第一のソースの前記抗原分子を介して、固体支持体に固定化されるステップと、

20

(e) ステップ(d)の前に、又は同時に、又は後に、直接的又は間接的に検出可能な標識手段を提供するステップにして、これにより、ステップ(d)において形成された複体内に存在する前記第二のソースの前記抗原分子に対して、ステップ(d)の前に、又は同時に、又は後に、こうした直接的又は間接的に検出可能な標識手段を設けるステップと、

(f) 前記試料内に存在する検体の自己抗体の表示を提供できるように、(d)において形成された複合体の存在を検出するステップと、を含む方法。

30

【請求項24】

前記第一及び第二のソースの前記抗原分子が、GAD₆₅と、GAD₆₇と、IA-2と、インスリンと、GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、又はインスリンの一つ以上の変異体、類似体、誘導体、又は断片と、GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、インスリン、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子とで構成されるグループから選択される、請求項23記載の方法。

【請求項25】

前記第一及び第二のソースの前記抗原分子が、GAD₆₅と、GAD₆₇と、IA-2と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片と、GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能なものとで構成されるグループから選択される、請求項24記載の方法。

40

【請求項26】

膵島細胞抗原分子及びインスリン、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された一つ以上の抗原分子に反応する検体の自己抗体に関して、動物被検体から取得した体液試料をスクリーニングするキットであって、

(a) 検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能な抗原分子の一つ

50

以上の第一のソースにして、前記抗原分子が、膵島細胞抗原分子と、インスリンと、前記膵島細胞抗原分子又はインスリンの一つ以上の変異体、類似体、誘導体、又は断片と、膵島細胞抗原分子、インスリン、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子と、から選択されるものと、

(b) 検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能な抗原分子の一つ以上の第二のソースにして、前記抗原分子が、膵島細胞抗原分子と、インスリンと、前記膵島細胞抗原分子又はインスリンの一つ以上の変異体、類似体、誘導体、又は断片と、膵島細胞抗原分子、インスリン、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子と、

10

(c) ステップ(a)及び(b)で提供された前記抗原分子を、スクリーニング中の前記体液試料に、同時又は連続的に接触させる手段にして、これにより、検体の自己抗体は、前記体液試料内に存在する時、前記抗原分子と相互作用でき、[前記第一のソースの抗原分子] - [検体の自己抗体] - [前記第二のソースの抗原分子]を含む一つ以上の複合体を形成可能となり、これにおいて、前記第一及び第二のソースの前記抗原分子は、前記一つ以上の複体内に存在する時に、共通の抗原分子を含むか、又はこれに由来し、或いは、これにおいて、前記第一及び第二のソースの前記抗原分子の結合領域は、前記検体の自己抗体に関して、前記一つ以上の複体内に存在する時に、共通の抗原分子内に存在するか、又はこれに由来するものと、

20

(d) (c)において定められるような複体内に存在する前記第一のソースの前記抗原分子を、前記第一のソースの抗原分子とスクリーニング中の体液試料との接触の前に、又は同時に、又は後に、固体支持体に固定化する手段と、

(e) (c)において定められるような複体内に存在する前記第二のソースの前記抗原分子に、前記第二のソースの前記抗原分子とスクリーニング中の体液試料との接触の前に、又は同時に、又は後に、直接的又は間接的に検出可能な標識手段を提供する手段と、

(f) 前記試料内に存在する検体の自己抗体の表示を提供できるように、(c)において定められ、(d)において定められるように固定化された複体の存在を検出する手段と、を備えるキット。

30

【請求項27】

前記第一及び第二のソースの前記抗原分子が、GAD₆₅と、GAD₆₇と、IA-2と、インスリンと、GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、又はインスリンの一つ以上の変異体、類似体、誘導体、又は断片と、GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、インスリン、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子とで構成されるグループから選択される、請求項26記載のキット。

【請求項28】

前記第一及び第二のソースの前記抗原分子が、GAD₆₅と、GAD₆₇と、IA-2と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片と、GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能なものとで構成されるグループから選択される、請求項27記載のキット。

40

【請求項29】

GAD₆₅と、GAD₆₇と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるものと、GAD₆₅、GAD₆₇、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子とから選択され、(d)において定められるような固体支持体に固定化された、GAD抗原分子により本質的に構成される、抗原分子の第一のソース、及び、GAD₆₅と、GAD₆₇と、一つ以上のその変

50

異体、類似体、誘導体、又は断片にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるものと、GAD₆₅、GAD₆₇、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子とから選択され、(e)において定められるような標識手段が設けられた、GAD抗原分子により本質的に構成される、抗原分子の第二のソース、を備える、請求項28記載のキット。

【請求項30】

IA-2と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるものと、IA-2、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子とから選択され、(d)において定められるような固体支持体に固定化された、IA-2抗原分子により本質的に構成される、抗原分子の第一のソース、及び、IA-2と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるものと、IA-2、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子とから選択され、(e)において定められるような標識手段が設けられた、IA-2抗原分子により本質的に構成される、抗原分子の第二のソース、を備える、請求項28記載のキット。

【請求項31】

(i) 検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互反応可能なGAD抗原分子の第一及び第二のソースにして、前記GAD抗原分子が、GAD₆₅と、GAD₆₇と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片と、GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子とから選択され、前記融合分子の前記抗原分子の少なくとも一つが、GAD₆₅、GAD₆₇、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片を含み、前記第一のソースのGAD抗原分子が、(d)において定められるような固体支持体に固定化され、前記第二のソースのGAD抗原分子には、(e)において定められるような標識手段が設けられたものと、

(ii) 検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互反応可能なIA-2抗原分子の第一及び第二のソースにして、前記IA-2抗原分子が、IA-2と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片と、IA-2、GAD₆₅、GAD₆₇、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子とから選択され、前記融合分子の前記抗原分子の少なくとも一つが、IA-2、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片を含み、前記第一のソースのIA-2抗原分子が、(d)において定められるような固体支持体に固定化され、前記第二のソースのIA-2抗原分子には、(e)において定められるような標識手段が設けられたものと、を備える、請求項28記載のキット。

【請求項32】

膵島細胞抗原分子或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された一つ以上の抗原分子に反応する検体の自己免疫に関して、動物被検体から取得した体液試料をスクリーニングするキットであって、

(a) 検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能な抗原分子の一つ以上の第一のソースにして、前記抗原分子が、GAD₆₅と、GAD₆₇と、IA-2と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片と、GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子と、から選択されるものと、

(b) 検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能な抗原分子の一つ以上の第一のソースにして、前記抗原分子が、GAD₆₅と、GAD₆₇と、IA-2と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片と、GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直

10

20

30

40

50

接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子と、から選択されるものと、

(c) ステップ(a)及び(b)で提供された前記抗原分子を、スクリーニング中の前記体液試料に、同時又は連続的に接触させる手段にして、これにより、検体の自己抗体は、前記体液試料内に存在する時、前記抗原分子と相互作用でき、[前記第一のソースの抗原分子] - [検体の自己抗体] - [前記第二のソースの抗原分子]を含む一つ以上の複合体を形成可能となり、これにおいて、前記第一及び第二のソースの前記抗原分子は、前記一つ以上の複体内に存在する時に、共通の抗原分子を含むか、又はこれに由来し、或いは、これにおいて、前記第一及び第二のソースの前記抗原分子の結合領域は、前記検体の自己抗体に関して、前記一つ以上の複体内に存在する時に、共通の抗原分子内に存在するか、又はこれに由来するものと、

10

(d) (c)において定められるような複体内に存在する前記第一のソースの前記抗原分子を、前記第一のソースの抗原分子とスクリーニング中の体液試料との接触の前に、又は同時に、又は後に、固体支持体に固定化する手段と、

(e) (c)において定められるような複体内に存在する前記第二のソースの前記抗原分子に、前記第二のソースの前記抗原分子とスクリーニング中の体液試料との接触の前に、又は同時に、又は後に、直接的又は間接的に検出可能な標識手段を提供する手段と、

(f) 前記試料内に存在する検体の自己抗体の表示を提供できるように、(c)において定められ、(d)において定められるように固定化された複合体の存在を検出する手段と、を備えるキット。

【請求項33】

20

GAD 或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片のみに反応する検体の自己免疫に関して、動物被検体から取得した体液試料をスクリーニングするキットであって、

(a) GAD₆₅と、GAD₆₇と、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能な一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片と、GAD₆₅、GAD₆₇、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子と、から選択されたGAD抗原分子により本質的に構成される、抗原分子の第一及び第二のソースにして、前記第一のソースのGAD抗原分子が、(c)において定められるような固体支持体に固定化され、前記第二のソースのGAD抗原分子には、(d)において定められるような標識手段が設けられるものと、

30

(b) (a)で提供された前記抗原分子を、スクリーニング中の前記体液試料に、同時又は連続的に接触させる手段にして、これにより、検体の自己抗体は、前記体液試料内に存在する時、前記抗原分子と相互作用でき、[前記第一のソースのGAD抗原分子] - [検体の自己抗体] - [前記第二のソースのGAD抗原分子]を含む一つ以上の複合体を形成可能となるものと、

(c) (b)において定められるような複体内に存在する前記第一のソースの前記GAD抗原分子を、前記第一のソースのGAD抗原分子とスクリーニング中の体液試料との接触の前に、又は同時に、又は後に、固体支持体に固定化する手段と、

(d) (b)において定められるような複体内に存在する前記第二のソースの前記GAD抗原分子に、前記第二のソースの前記GAD抗原分子とスクリーニング中の体液試料との接触の前に、又は同時に、又は後に、直接的又は間接的に検出可能な標識手段を提供する手段と、

40

(e) 前記試料内に存在する検体の自己抗体の表示を提供できるように、(b)において定められ、(c)において定められるように固定化された複合体の存在を検出する手段と、を備えるキット。

【請求項34】

IA-2 或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片に反応する検体の自己免疫に関して、動物被検体から取得した体液試料をスクリーニングするキットであって、(a) IA-2と、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能な

50

一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片と、I A - 2、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子と、から選択されたI A - 2抗原分子により本質的に構成される、抗原分子の第一及び第二のソースにして、前記第一のソースのI A - 2抗原分子が、(c)において定められるような固体支持体に固定化され、前記第二のソースのI A - 2抗原分子には、(d)において定められるような標識手段が設けられるものと、

(b)(a)で提供された前記I A - 2抗原分子を、スクリーニング中の前記体液試料に、同時又は連続的に接触させる手段にして、これにより、検体の自己抗体は、前記体液試料内に存在する時、前記I A - 2抗原分子と相互作用でき、[前記第一のソースのI A - 2抗原分子] - [検体の自己抗体] - [前記第二のソースのI A - 2抗原分子]を含む一つ以上の複合体を形成可能となるものと、

(c)(b)において定められるような複体内に存在する前記第一のソースの前記I A - 2抗原分子を、前記第一のソースのI A - 2抗原分子とスクリーニング中の体液試料との接触の前に、又は同時に、又は後に、固体支持体に固定化する手段と、

(d)(b)において定められるような複体内に存在する前記第二のソースの前記I A - 2抗原分子に、前記第二のソースの前記I A - 2抗原分子とスクリーニング中の体液試料との接触の前に、又は同時に、又は後に、直接的又は間接的に検出可能な標識手段を提供する手段と、

(e)前記試料内に存在する検体の自己抗体の表示を提供できるように、(b)において定められ、(c)において定められるように固定化された複合体の存在を検出する手段と、を備えるキット。

【請求項35】

G A D及びI A - 2或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片にそれぞれ反応する第一及び第二の検体の自己免疫に関して、動物被検体から取得した体液試料をスクリーニングするキットであって、

(a)検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互反応可能なG A D抗原分子の第一及び第二のソースにして、前記G A D抗原分子が、G A D₆₅と、G A D₆₇と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片と、G A D₆₅、G A D₆₇、I A - 2、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子とから選択され、前記融合分子の前記抗原分子の少なくとも一つが、G A D₆₅、G A D₆₇、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片を含み、前記第一のソースのG A D抗原分子が、(d)において定められるような固体支持体に固定化され、前記第二のソースのG A D抗原分子には、(e)において定められるような標識手段が設けられるものと、

(b)検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互反応可能なI A - 2抗原分子の第一及び第二のソースにして、前記I A - 2抗原分子が、I A - 2と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片と、I A - 2、G A D₆₅、G A D₆₇から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子とから選択され、前記融合分子の前記抗原分子の少なくとも一つが、I A - 2、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片を含み、前記第一のソースのI A - 2抗原分子が、(d)において定められるような固体支持体に固定化され、前記第二のソースのI A - 2抗原分子には、(e)において定められるような標識手段が設けられるものと、

(c)ステップ(a)及び(b)で提供された前記抗原分子を、スクリーニング中の前記体液試料に、同時又は連続的に接触させる手段にして、これにより、検体の自己抗体は、前記体液試料内に存在する時、前記抗原分子と相互作用でき、[前記第一のソースのG A D抗原分子] - [検体の自己抗体] - [前記第二のソースのG A D抗原分子]又は[前記第一のソースのI A - 2抗原分子] - [検体の自己抗体] - [前記第二のソースのI A - 2抗原分子]を含む一つ以上の複合体を形成可能となるものと、

(d)(c)において定められるような複体内に存在する前記第一のソースの前記G A D又はI A - 2抗原分子を、前記第一のソースのG A D又はI A - 2抗原分子とスクリ

ーニング中の体液試料との接触の前に、又は同時に、又は後に、固体支持体に固定化する手段と、

(e) (c) において定められるような複合体内に存在する前記第二のソースの前記 G A D 又は I A - 2 抗原分子に、前記第二のソースの前記 G A D 又は I A - 2 抗原分子とスクリーニング中の体液試料との接触の前に、又は同時に、又は後に、直接的又は間接的に検出可能な標識手段を提供する手段と、

(f) 前記試料内に存在する検体の自己抗体の表示を提供できるように、(c) において定められ、(d) において定められるように固定化された複合体の存在を検出する手段と、を備えるキット。

【請求項 36】

10

第一及び第二のソースの抗原分子が、一つ以上の共通抗原分子を含む、請求項 26 乃至 35 のいずれかに記載のキット。

【請求項 37】

前記第一及び第二のソースの前記抗原分子が、G A D_{6.5} 又は G A D_{6.7} を含む、請求項 26 乃至 29、31 乃至 33、又は 35 のいずれかに依存する、請求項 36 記載のキット。

【請求項 38】

第一及び第二のソースの前記抗原分子が、I A - 2 を含む、請求項 26 乃至 28、30 乃至 32、34 又は 35 のいずれかに依存する、請求項 36 記載のキット。

【請求項 39】

第一又は第二のソースのいずれかの抗原分子が、膝島細胞抗原分子及びインスリンから選択され、他方のソースの抗原分子が、第一又は第二のソースのいずれかの前記抗原分子の一つ以上の変異体、類似体、誘導體、又は断片にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるものを含む、請求項 26 乃至 35 のいずれかに記載のキット。

20

【請求項 40】

第一又は第二のソースのいずれかの抗原分子が、G A D_{6.5} 又は G A D_{6.7} を含み、他方のソースの抗原分子が、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能である G A D_{6.5} 又は G A D_{6.7} の一つ以上の変異体、類似体、誘導體、又は断片を含む、請求項 26 乃至 29、31 乃至 33、又は 35 のいずれかに依存する、請求項 39 記載のキット。

30

【請求項 41】

第一又は第二のソースのいずれかの抗原分子が、I A - 2 を含み、他方のソースの抗原分子が、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能である I A - 2 の一つ以上の変異体、類似体、誘導體、又は断片を含む、請求項 26 乃至 28、30 乃至 32、34 又は 35 のいずれかに依存する、請求項 39 記載のキット。

【請求項 42】

第一及び第二のソースの両方の抗原分子が、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能である、共通の抗原分子の、同じもの又は異なるものにすることが可能な、変異体、類似体、誘導體、又は断片を含む、請求項 26 乃至 36 のいずれかに記載のキット。

40

【請求項 43】

第一及び第二のソースの両方の抗原分子が、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能である、G A D_{6.5} 又は G A D_{6.7} の、同じもの又は異なるものにすることが可能な、変異体、類似体、誘導體、又は断片を含む、請求項 26 乃至 29、31 乃至 33、又は 35 のいずれかに依存する、請求項 42 記載のキット。

【請求項 44】

第一及び第二のソースの両方の抗原分子が、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能である、I A - 2 の、同じもの又は異なるものにすることが可能な、変異体、類似体、誘導體、又は断片を含む、請求項 26 乃至 28、30 乃至 32、34 又は 35 のいずれかに依存する、請求項 42 記載のキット。

50

【請求項 4 5】

固定化手段を備え、これにより、前記一つ以上の第一のソースの抗原分子が、スクリーニング中の体液試料との接触の前に、固体支持体に固定化される、請求項 2 6 乃至 4 4 のいずれかに記載のキット。

【請求項 4 6】

接触手段を備え、これにより、このように固定化された、前記一つ以上の第一のソースの抗原分子を、体液試料と前記一つ以上の第二のソースの抗原分子との接触と同時に、或いは連続して、スクリーニング中の体液試料と接触させる、請求項 4 5 記載のキット。

【請求項 4 7】

接触手段が提供され、これにより、固定化された、前記一つ以上の第一のソースの抗原分子を、抗原分子が固体支持体に固定化された [抗原分子] - [検体の自己抗体] を含む中間複合体が形成できるようにスクリーニング中の体液試料に接触させ、こうして形成された固定化中間複合体は、その後、溶液相において存在する、前記一つ以上の第二のソースの抗原分子と接触させ、前記第一のソースの抗原分子を介して固定支持体に固定化された [前記第一のソースの抗原分子] - [検体の自己抗体] - [前記第二のソースの抗原分子] を含む、前記一つ以上の複合体を形成できるようにする、請求項 4 6 記載のキット。

10

【請求項 4 8】

膵島細胞抗原分子及びインスリン、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された一つ以上の抗原分子に反応する検体の自己抗体に関して、動物被検体から取得した体液試料をスクリーニングするキットであって、前記キットが、

20

(a) 検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能な抗原分子の一つ以上の第一のソースにして、前記抗原分子が、膵島細胞抗原分子と、インスリンと、前記膵島細胞抗原分子又はインスリンの一つ以上の変異体、類似体、誘導体、又は断片と、膵島細胞抗原分子、インスリン、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子と、から選択され、これにおいて、前記第一のソースの前記抗原分子が、固体支持体に固定化されるものと、

(b) 検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能な抗原分子の一つ以上の第二のソースにして、前記抗原分子が、膵島細胞抗原分子と、インスリンと、前記膵島細胞抗原分子又はインスリンの一つ以上の変異体、類似体、誘導体、又は断片と、膵島細胞抗原分子、インスリン、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子と、から選択され、前記前記第二のソースの抗原分子が溶液相において提供され、これに対して (d) において定められるような標識手段が設けられるものと、

30

(c) ステップ (a) 及び (b) で提供された前記抗原分子を、スクリーニング中の前記体液試料に、同時又は連続的に接触させる手段にして、これにより、検体の自己抗体は、前記体液試料内に存在する時、前記抗原分子と相互作用でき、 [前記第一のソースの抗原分子] - [検体の自己抗体] - [前記第二のソースの抗原分子] を含む一つ以上の固定化された複合体を形成可能となり、これにおいて、前記第一及び第二のソースの前記抗原分子は、前記一つ以上の複体内に存在する時に、共通の抗原分子を含むか、又はこれに由来し、或いは、これにおいて、前記第一及び第二のソースの前記抗原分子の結合領域は、前記検体の自己抗体に関して、前記一つ以上の複体内に存在する時に、共通の抗原分子内に存在するか、又はこれに由来し、前記前記固定化複合体が、前記複体内に存在する前記第一のソースの前記抗原分子を介して、固体支持体に固定化されるものと、

40

(d) (c) において定められるような複体内に存在する前記第二のソースの前記抗原分子に、前記第二のソースの前記抗原分子とスクリーニング中の前記体液試料との接触の前に、又は同時に、又は後に、直接的又は間接的に検出可能な標識手段を提供する手段と、

(e) 前記試料内に存在する検体の自己抗体の表示を提供できるように、(c) において定められるような複体の存在を検出する手段と、を備えるキット。

50

【請求項 49】

前記第一及び第二のソースの前記抗原分子が、GAD₆₅と、GAD₆₇と、IA-2と、インスリンと、GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、又はインスリンの一つ以上の変異体、類似体、誘導體、又は断片と、GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、インスリン、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子とで構成されるグループから選択される、請求項 48 記載のキット。

【請求項 50】

前記第一及び第二のソースの前記抗原分子が、GAD₆₅と、GAD₆₇と、IA-2と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片と、GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能なものとで構成されるグループから選択される、請求項 49 記載のキット。

10

【請求項 51】

以下の疾病状態の一つ以上 - 一型糖尿病及び又はスティフマン症候群、二型糖尿病、一つ以上の自己免疫性甲状腺疾患、セリアック病、一つ以上の結合組織病、副腎自己免疫、或いは二種類以上の自己免疫疾患の組み合わせ - を患っていることが疑われる、その影響を受けやすい、或いは有している、動物被検体から、前記体液試料が取得される、請求項 1 乃至 25 のいずれかに記載の方法、或いは請求項 26 乃至 50 のいずれかに記載のキット。

20

【請求項 52】

膵島細胞抗原分子及びインスリンから選択された一つ以上の抗原分子に反応する自己抗体の存在に関連する一つ以上の疾病状態の発症又は存在の可能性を、前記一つ以上の疾病状態を有することが疑われる、或いはこうした疾病状態の影響を受けやすい動物被検体において診断する方法であって、膵島細胞抗原分子及びインスリンから選択された一つ以上の抗原分子に反応し、前記一つ以上の疾病状態の発症又は存在の可能性を示す自己抗体を、被検体において検出するステップを含み、これにより、請求項 1 乃至 25 のいずれかに記載の方法、或いは請求項 26 乃至 50 のいずれかに記載のキットが利用され、検出された自己抗体が前記一つ以上の疾病状態の発症又は存在の可能性の診断を提供することができる方法。

30

【請求項 53】

動物被検体において膵島細胞抗原分子及びインスリンから選択された一つ以上の抗原分子に反応する自己抗体の存在に関連する一つ以上の疾病状態の発症を遅延させる、又は予防する方法、或いは、前記一つ以上の疾病状態を有する、又はこうした疾病状態から回復している動物被検体を治療する方法であって、膵島細胞抗原分子及びインスリンから選択された一つ以上の抗原分子に反応し、こうした一つ以上の疾病状態の発症又は存在を示す自己抗体を、被検体からの体液試料において、請求項 1 乃至 25 のいずれかに記載の方法、或いは請求項 26 乃至 50 のいずれかに記載のキットを利用して、最初に検出し、これにより、被検体における前記一つ以上の疾病状態の発症又は存在の可能性の診断を提供するステップと、前記被検体に対して、前記一つ以上の疾病状態の発症を遅らせること、こうした疾病状態を未然に防ぐこと、予防すること、及び又は治療することにおいて有効な少なくとも一つの治療的に有効な量の治療剤を投与するステップとを含む方法。

40

【請求項 54】

一つ以上の疾病状態が、一型糖尿病及び又はスティフマン症候群、二型糖尿病、一つ以上の自己免疫性甲状腺疾患、セリアック病、一つ以上の結合組織病、副腎自己免疫、或いは二種類以上の自己免疫疾患の組み合わせから選択される、請求項 52 又は 53 記載の方法。

【請求項 55】

50

組み合わせにおいて、膵島細胞抗原分子及びインスリンから選択された一つ以上の抗原分子に反応する自己抗体の存在に関連する一つ以上の疾病状態の治療において有効な少なくとも一つの治療的に有効な量の治療剤と組み合わせた、請求項 26 乃至 50 のいずれかに記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、膵島細胞抗原分子及び又はインスリンに反応する自己抗体の検出に有用な方法及びキット、例えば、インスリン依存性糖尿病（IDDM、一型糖尿病）の発症又は存在を示す自己抗体の検出に有用な方法及びキットに関する。 10

【背景技術】

【0002】

一型糖尿病は、ヒトに影響を及ぼす非常に一般的な自己免疫疾患の一つであり、ヨーロッパ及び北アメリカでは200万人を越える個人が、この疾患にかかっている（M A Atkinson, G S Eisenbarth. 一型糖尿病：疾患の病因及び治療に関する新たな観点, The Lancet, 2001 358: 221-229）。一型糖尿病の発生率は、世界全体で一年間に2.5%増加しており、この疾患の発生率は、2010年には1998年のものより40%高くなると予測されている（M A Atkinson, G S Eisenbarth. 一型糖尿病：疾患の病因及び治療に関する新たな観点, The Lancet, 2001 358: 221-229）。 20

【0003】

膵臓細胞抗原に対する自己抗体は、広く認められた一型糖尿病の血清学的標識であり、これに含まれるのは、免疫蛍光試験（ICA）において島細胞に反応する自己抗体と、グルタミン酸デカルボキシラーゼ（GAD、特に、その65kDaアイソフォーム、GAD₆₅）に対する自己抗体と、タンパク質チロシンホスファターゼ状島細胞抗原（IA-2又はICA512と呼ぶ場合がある）に対する自己抗体と、インスリンに対する自己抗体とである。GAD₆₅自己抗体とIA-2自己抗体とは、ICA反応の構成要素である（M A Atkinson, G S Eisenbarth. 一型糖尿病：疾患の病因及び治療に関する新たな観点, The Lancet, 2001 358: 221-229）。GAD₆₅、IA-2、及びインスリンに対する三種類の自己抗体の少なくとも一つは、血清の診断において、一型糖尿病の患者の約90%で存在する（M A Atkinson, G S Eisenbarth. 一型糖尿病：疾患の病因及び治療に関する新たな観点, The Lancet, 2001 358: 221-229）。膵臓細胞に対する自己免疫の血清学的標識である上記の自己抗体の測定は、糖尿病予防の試験に関与する患者をモニタする際にも有用である（M A Atkinson, G S Eisenbarth. 一型糖尿病：疾患の病因及び治療に関する新たな観点, The Lancet, 2001 358: 221-229）。 30

【0004】

現在、GAD₆₅自己抗体は、³⁵S、³H、又は¹²⁵Iにより放射性標識されたGAD₆₅を利用する免疫沈降アッセイ（IPA）を使用して測定されている。³⁵S又は³Hにより標識されたGAD₆₅は、*in vitro*転写/翻訳システムにおいて製造されてきた（C E Grubin, T Daniels, B Toivola, M Landdin-Olsson, W A Hagopian, L Li, A E Karlsson, E Boel, B Michelsen, A Lernmark. 小児期IDDMにおけるアイソフォーム特異的グルタミン酸デカルボキシラーゼ抗体の診断精度を決定する新しいラジオリガンド結合アッセイ, Diabetologia, 1994 37: 344-350、J S Petersen, K R Hejnaes, A Moody, A E Karlsson, M O Marshall, M Hoier-Madsen, E Boel, B K Michelsen, T Dyrberg. 単純なラジオリガンドアッセイを使用した糖尿病及びその他の自己免疫疾患におけるGAD₆₅抗体の検出, Diabetes, 1994 43: 459-467、及びA Falorni, E Ortqvist, B Persson, A Lernmark. ³⁵S又は³H組み換えヒトリガンドを使用するグルタミン酸デカルボキシラーゼ（GAD₆₅）及びGAD₆₅自己抗体に関するラジオイムノアッセイ, Journal of Immunological Methods, 1995 186: 88-89）。天然GAD₆₅、例えば、脳組織から分離されたラット又はブタGAD₆₅（M J Rowley, I R Mackay, Q-Y Chen, W J Knowles, P Z Zimmet. 40

グルタミン酸デカルボキシラーゼに対する抗体は糖尿病の主要な型を識別する, Diabetes, 1992 41:548:551、及びM Ohta, H Obayashi, K Takahashi, Y Kitagawa, K Nakano, S Matsuo, M Ohishi, N Itoh, K Hayashi, K Ohta. 糖尿病患者におけるグルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) に関する単純な固相ラジオイムノアッセイ, J Clin Biochem Nutr, 1996 20: 139-148)、或いは、例えば、昆虫細胞、酵母、又は哺乳類細胞において発現する、組み換えヒトGAD₆₅ (F Luhder, K-P Woltanski, L Mauch, H Haubruck, K-D Kohnert, I Rjasanowski, D Michaelis, M Ziegler. ラジオイムノアッセイによるグルタミン酸デカルボキシラーゼの65 - kDaアイソフォームに対する自己抗体の検出, European Journal of Endocrinology, 1994 130: 575-80、M Powell, L Prentice, T Asawa, R Kato, J Sawicka, H Tanaka, V Petersen, A Munkley, S Morgan, B Ress Smith, J Furmaniak. Clinica Chimica Acta, 1996 256: 175-188、及びT Matsuda, M Yano, No Abiru, H Takino, S Akazawa, S Nagataki, K Yasukawa. 骨髄腫細胞における組み換えヒトグルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) の発現及びGADに対する自己抗体の酵素に関連する酵素免疫測定 (ELISA), J Biochem, 1997 121: 20-24) は、¹²⁵Iにより標識され、IPAにおいて使用されてきた。GAD₆₅及びIA-2の組み換え融合タンパク質も、結合自己抗体試験に関して、IPAにおいて使用されてきた (A Zaialov, M Ankelo, A Westerlund-Karlsson, M Knip, J Illonen, A Hinkkanen. 糖尿病に関連するGAD₆₅及びIA-2に対する自己抗体の分析における新しい融合タンパク質, Journal of Immunological Methods, 2000 246: 91-96、及びM Rickert, J Seissler, W Dangel, H Lorenz, W Richter. インスリン依存型糖尿病におけるグルタミン酸デカルボキシラーゼの65 - kDaアイソフォーム及び島抗原-2の結合分析に関する融合タンパク質, Clinical Chemistry, 2001 47(5):926-934)。

【0005】

しかしながら、³⁵S - GAD₆₅に基づく現在利用可能なIPAは、技術的な要求が厳しく、標準化が困難であり、比較的費用がかかり、キット形式に適合化されていない。ヒト組み換え¹²⁵I - GAD₆₅に基づくアッセイは、³⁵S - GAD₆₅に基づくアッセイと等しい感度及び特異性を有するが、優れた再現性、技術的な単純さ、低いコストという付加的な利点を示しており、キットとして容易に適合化されている。しかしながら、残念なことに、ラット又はブタ脳組織から分離された¹²⁵I - GAD₆₅に基づくアッセイは、GAD₆₇アイソフォームによる汚染のため、特異性が低いという難点を有する。

【0006】

GAD₆₅自己抗体は、様々なタイプのELISAによっても測定されてきた (A M Gronowski, E C C Wong, T R Wilhite, D L Martin, C H Smith, C A Parvin, M Landt. *varrelisa* ELISAによるグルタミン酸脱炭素酵素自己抗体の検出, Clinical Chemistry, 1995 41(10): 1532-1534、及びH D Mehta, B S Vold, S Minkin, E F Ullman. DELISA: GAD₆₅自己抗体のための高感度非同位体アッセイ、インスリン依存型糖尿病に関する重要な危険事前評価標識, Clinical Chemistry, 1996 42(2): 263-269)。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

しかしながら、ELISAによってGAD₆₅自己抗体を測定するために現在利用可能な試験は、上記のIPAと比較して感度及び特異性に乏しく、能力の調査においてIPAに十分に匹敵するものではない (R S Schmidli, P G Colman, E Bonifacio, Participating Laboratories. グルタミン酸デカルボキシラーゼ抗体に関する52のアッセイの疾患感度及び特異性、第二回国際GADA bワークショップ, Diabetes, 1995 44: 636-640)。

【課題を解決するための手段】

【0008】

しかしながら、本発明は、これまで一型糖尿病の発症又は存在を示す自己抗体のスクリーニングにおいて利用される方法及びキットに関連していた問題を軽減し、膵島細胞抗原分子及び又はインスリンに反応する自己抗体の検出における一般的な適用性を有する。特

に、本発明では、上記のような従来技術の手法と比較する時、改良された特異性及び感度を有する方法及びキットを利用する。

【0009】

本発明では、膵島細胞抗原分子及びインスリン、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された一つ以上の抗原分子に反応する検体の自己抗体に関して、動物被検体から取得した体液試料をスクリーニングする方法が提供され、前記方法は、

(a) 前記被検体からの前記体液試料を提供するステップと、

(b) 検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能な抗原分子の一つ以上の第一のソースを提供するステップにして、前記抗原分子が、膵島細胞抗原分子と、インスリンと、前記膵島細胞抗原分子又はインスリンの一つ以上の変異体、類似体、誘導体、又は断片と、膵島細胞抗原分子、インスリン、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子と、から選択されるステップと、

(c) 検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能な抗原分子の一つ以上の第二のソースを提供するステップにして、前記抗原分子が、膵島細胞抗原分子と、インスリンと、前記膵島細胞抗原分子又はインスリンの一つ以上の変異体、類似体、誘導体、又は断片と、膵島細胞抗原分子、インスリン、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子と、から選択されるステップと、

(d) ステップ(b)及び(c)で提供された前記抗原分子を、スクリーニング中の前記体液試料に、同時又は連続的に接触させるステップにして、これにより、検体の自己抗体は、前記体液試料内に存在する時、前記抗原分子と相互作用でき、[前記第一のソースの抗原分子] - [検体の自己抗体] - [前記第二のソースの抗原分子]を含む一つ以上の複合体を形成可能となり、これにおいて、前記第一及び第二のソースの前記抗原分子は、前記一つ以上の複体内に存在する時に、共通の抗原分子を含むか、又はこれに由来し、或いは、これにおいて、前記第一及び第二のソースの前記抗原分子の結合領域は、前記検体の自己抗体に関して、前記一つ以上の複体内に存在する時に、共通の抗原分子内に存在するか、又はこれに由来するステップと、

(e) ステップ(d)の前に、又は同時に、又は後に、固定化手段を提供し、これにより、ステップ(d)において形成された複体内に存在する前記第一のソースの前記抗原分子を、ステップ(d)の前に、又は同時に、又は後に、固体支持体に固定化するステップと、

(f) ステップ(d)の前に、又は同時に、又は後に、直接的又は間接的に検出可能な標識手段を提供するステップにして、これにより、ステップ(d)において形成された複体内に存在する前記第二のソースの前記抗原分子に対して、ステップ(d)の前に、又は同時に、又は後に、こうした直接的又は間接的に検出可能な標識手段を設けるステップと、

(g) 前記試料内に存在する検体の自己抗体の表示を提供できるように、(d)において形成され、(e)に従って固定化された複体の存在を検出するステップと、を含む。

【0010】

本発明による検体の自己抗体をスクリーニングする方法は、こうした自己抗体を高い特異性及び感度で検出する方法を提供することにおいて特に有利である。

【0011】

本発明で求められるような、検体の自己抗体との反応が可能である一つ以上の抗原分子、或いは、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片、或いは、その融合分子は、任意の膵島細胞抗原分子及びインスリン、及び一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片、或いはその融合分子から選択することが可能であり、特に、グルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD、及び特に、グルタミン酸デカルボキシラーゼの65KDa及び67KDaアイソフォーム、GAD₆₅及びGAD₆₇)、タンパク質チロシンホスファタ

ーゼ状島細胞抗原 (I A - 2)、及びインスリン、或いは、一つ以上のその変異体 (例えば、 I A - 2 ベータ等)、類似体、誘導體、又は断片、或いは、上の二つ以上を含む融合分子にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるものによって構成されるグループから適切に選択することができる。特に、本発明の好適な実施形態では、一つ以上の上記の膵島細胞抗原分子又はインスリンが利用され、これは特に、上記の膵島細胞抗原分子であり、好ましくは、一つ以上の G A D_{6.5}、G A D_{6.7}、又は I A - 2 である。また、一つ以上の上記の膵島細胞抗原分子又はインスリンの一つ以上の変異体、類似体、誘導體、又は断片を利用することが好適な場合があり、これは特に、上記の膵島細胞抗原分子の一つ以上の変異体、類似体、誘導體、又は断片であり、好ましくは、一つ以上の G A D_{6.5}、G A D_{6.7}、又は I A - 2 の変異体、類似体、誘導體、又は断片である。本発明の更なる代替の好適な実施形態では、一つ以上の融合分子を利用することが好適な場合があり、これは、上記の膵島細胞抗原分子、インスリン、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む。

10

【 0 0 1 2 】

したがって、本明細書で使用する G A D という用語は、特に G A D_{6.5} 又は G A D_{6.7} を含め、G A D の全てのアイソフォームを包含し、本発明の特定の実施形態では、G A D_{6.5} を利用することが好適な場合があり、本発明の他の実施形態では、G A D_{6.7} を利用することが好適な場合があると理解されることになる。更に上記から、本発明は、その範囲内に、G A D_{6.5} 又は G A D_{6.7} 或いは一つ以上のその断片 (その結合領域等) を含むことが可能な融合分子を含むことが可能であると理解されることになる。例えば、本発明の範囲内で使用される融合分子は、G A D_{6.7} に直接的又は間接的に融合した G A D_{6.5}、或いは、G A D_{6.7} の一つ以上の結合領域に直接的又は間接的に融合した G A D_{6.5} の一つ以上の結合領域を含むことができる。更に、本発明の範囲内で使用される融合分子は、I A - 2 ベータ或いは一つ以上のその結合領域に直接的又は間接的に融合した I A - 2 或いは一つ以上のその結合領域を含むことができると理解されることにもなる。本発明は、更に、I A - 2 或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片に直接的又は間接的に融合した G A D_{6.5} 又は G A D_{6.7} 或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片に関しても可能となる。

20

【 0 0 1 3 】

特に、本発明で求められるような検体の自己抗体との反応が可能な、一つ以上の抗原分子、或いはその変異体、類似体、誘導體、又は断片は、グルタミン酸デカルボキシラーゼ (特に、G A D_{6.5} 又は G A D_{6.7}) 及びタンパク質チロシンホスファターゼ状島細胞抗原 (I A - 2)、或いは、一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるものによって構成されるグループから適切に選択することができる。

30

【 0 0 1 4 】

したがって、本発明の好適な態様において、ほぼ上で説明したようなスクリーニングの方法は、G A D 及び又は I A - 2、及び G A D_{6.5} 又は G A D_{6.7} を含む一つ以上の抗原分子、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片、及び又は I A - 2、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用できるものに対する検体の自己抗体を検出するステップにおいて使用される。本発明において融合抗原分子が利用される場合には、適切な融合分子は、I A - 2 或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片に直接的又は間接的に融合した、G A D_{6.5} 又は G A D_{6.7} 或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片を含むことが可能であり、また、適切な融合分子は、G A D_{6.7} に直接的又は間接的に融合した G A D_{6.5}、或いは、G A D_{6.7} の一つ以上の結合領域に直接的又は間接的に融合した G A D_{6.5} の一つ以上の結合領域を含むことが可能であり、また、適切な融合分子は、I A - 2 ベータ或いは一つ以上のその結合領域に直接的又は間接的に融合した I A - 2 或いは一つ以上のその結合領域を含むことが可能である。

40

50

【 0 0 1 5 】

好ましくは、本発明による方法は、GAD₆₅と、GAD₆₇と、IA-2と、インスリンと、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片と、GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、インスリン、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるものことから選択され、本発明による方法のステップ(e)による固体支持体に固定化された、抗原分子の一つ以上の第一のソース、及び、GAD₆₅と、GAD₆₇と、IA-2と、インスリンと、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片と、GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、インスリン、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるものことから選択され、本発明による方法のステップ(f)による標識手段が設けられた、抗原分子の一つ以上の第二のソース、を提供するステップを含む。

10

【 0 0 1 6 】

更に好ましくは、本発明による方法は、GAD₆₅と、GAD₆₇と、IA-2と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片と、GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるもの(例えば、IA-2 或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片に直接的又は間接的に融合した、GAD₆₅、GAD₆₇、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるものを含む融合分子)とから選択され、本発明による方法のステップ(e)による固体支持体に固定化された、抗原分子の一つ以上の第一のソースと、GAD₆₅と、GAD₆₇と、IA-2と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片と、GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、及び一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるもの(IA-2 或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片に直接的又は間接的に融合した、GAD₆₅ 又は GAD₆₇ 或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるものを含む融合分子等)とから選択され、本発明による方法のステップ(f)による標識手段が設けられた、抗原分子の第二のソースと、を提供するステップを含む。本発明による方法で、GADに対する自己検体を検出する必要がある際には、前記方法は、GAD₆₅と、GAD₆₇と、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能である一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片と、GAD₆₅、GAD₆₇、及び一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子(GAD₆₇に直接的又は間接的に融合したGAD₆₅、或いは、GAD₆₇の一つ以上の結合領域に直接的又は間接的に融合したGAD₆₅の一つ以上の結合領域で、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるものを含む融合分子等)とから選択され、本発明による方法のステップ(e)による固体支持体に固定化された、GAD抗原分子により本質的に構成される、抗原分子の第一のソース、及び、GAD₆₅と、GAD₆₇と、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能である一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片と、GAD₆₅、GAD₆₇、及び一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるもの(GAD₆₇に直接的又は間接的に融合したGAD₆₅、或いは、GAD₆₇の一つ以上の結合領域に直接的又は間接的に融合したGAD₆₅の一つ以上の結合領域で、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるものを含む融合分子)とから選択され、本発明による方法のステップ(f)

20

30

40

50

による標識手段が設けられた、GAD抗原分子により本質的に構成される、抗原分子の第二のソース、を提供するステップを含むことが好適な場合がある。また、本発明による方法で、IA-2に対する自己抗体を検出する必要がある際には、前記方法は、IA-2と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるものと、IA-2、及び一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるもの（IA-2ベータ或いは一つ以上のその結合領域に直接的又は間接的に融合したIA-2或いは一つ以上のその結合領域等）とから選択され、本発明による方法のステップ（e）による固体支持体に固定化された、IA-2抗原分子により本質的に構成される、抗原分子の第一のソースと、IA-2と、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能である一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片と、IA-2、及び一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるもの（IA-2ベータ或いは一つ以上のその結合領域に直接的又は間接的に融合したIA-2或いは一つ以上のその結合領域等）とから選択され、本発明による方法のステップ（f）による標識手段が設けられた、IA-2抗原分子により本質的に構成される、抗原分子の第二のソースと、を提供するステップを含むことが好適な場合がある。本発明による更なる代替では、本発明による方法でGAD及びIA-2の両方に対する自己免疫を検出する必要がある場合、前記方法は、（i）検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互反応可能なGAD抗原分子の第一及び第二のソースにして、前記GAD抗原分子が、GAD₆₅と、GAD₆₇と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片と、GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子とから選択され、前記融合分子の前記抗原分子の少なくとも一つが、GAD₆₅、GAD₆₇、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片を含み、前記第一のソースのGAD抗原分子が、ステップ（e）による固体支持体に固定化され、前記第二のソースのGAD抗原分子には、ステップ（f）による標識手段が設けられたものと、（ii）検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互反応可能なIA-2抗原分子の第一及び第二のソースにして、前記IA-2抗原分子が、IA-2と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片と、IA-2、GAD₆₅、GAD₆₇、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子とから選択され、前記融合分子の前記抗原分子の少なくとも一つが、IA-2、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片を含み、前記第一のソースのIA-2抗原分子が、ステップ（e）による固体支持体に固定化され、前記第二のソースのIA-2抗原分子には、ステップ（f）による標識手段が設けられたものと、を提供するステップを含む。

【0017】

したがって、本発明の好適な実施形態は、臍島細胞抗原分子或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片から選択された一つ以上の抗原分子に反応する検体の自己免疫に関して、動物被検体から取得した体液試料をスクリーニングする方法を適切に含むことが可能であり、前記方法は、

（a）前記被検体からの前記体液試料を提供するステップと、

（b）検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能な抗原分子の一つ以上の第一のソースを提供するステップにして、前記抗原分子が、GAD₆₅と、GAD₆₇と、IA-2と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片と、GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子と、から選択されるステップと、

（c）検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能な抗原分子の一つ

以上の第一のソースを提供するステップにして、前記抗原分子が、GAD₆₅と、GAD₆₇と、IA-2と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片と、GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子と、から選択されるステップと、

(d)ステップ(b)及び(c)で提供された前記抗原分子を、スクリーニング中の前記体液試料に、同時又は連続的に接触させるステップにして、これにより、検体の自己抗体は、前記体液試料内に存在する時、前記抗原分子と相互作用でき、[前記第一のソースの抗原分子] - [検体の自己抗体] - [前記第二のソースの抗原分子]を含む一つ以上の複合体を形成可能となり、これにおいて、前記第一及び第二のソースの前記抗原分子は、前記一つ以上の複体内に存在する時に、共通の抗原分子を含むか、又はこれに由来し、或いは、これにおいて、前記第一及び第二のソースの前記抗原分子の結合領域は、前記検体の自己抗体に関して、前記一つ以上の複体内に存在する時に、共通の抗原分子内に存在するか、又はこれに由来するステップと、

10

(e)ステップ(d)の前に、又は同時に、又は後に、固定化手段を提供するステップにして、これにより、ステップ(d)において形成された複体内に存在する前記第一のソースの前記抗原分子を、ステップ(d)の前に、又は同時に、又は後に、固体支持体に固定化するステップと、

(f)ステップ(d)の前に、又は同時に、又は後に、直接的又は間接的に検出可能な標識手段を提供するステップにして、これにより、ステップ(d)において形成された複体内に存在する前記第二のソースの前記抗原分子に対して、ステップ(d)の前に、又は同時に、又は後に、こうした直接的又は間接的に検出可能な標識手段を設けるステップと、

20

(g)前記試料内に存在する検体の自己抗体の表示を提供できるように、(d)において形成され、(e)に従って固定化された複体の存在を検出するステップと、を含む。

【0018】

また、本発明の好適な実施形態は、GAD或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片のみに反応する検体の自己免疫に関して、動物被検体から取得した体液試料をスクリーニングするステップを適切に含むことが可能であり、前記方法は、

(a)前記被検体からの前記体液試料を提供するステップと、

30

(b)GAD₆₅と、GAD₆₇と、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能な一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片と、GAD₆₅、GAD₆₇、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子と、から選択されたGAD抗原分子により本質的に構成される、抗原分子の第一及び第二のソースを提供するステップにして、前記第一のソースのGAD抗原分子が、ステップ(d)による固体支持体に固定化され、前記第二のソースのGAD抗原分子には、ステップ(e)による標識手段が設けられるステップと、

(c)ステップ(b)で提供された前記抗原分子を、スクリーニング中の前記体液試料に、同時又は連続的に接触させるステップにして、これにより、検体の自己抗体は、前記体液試料内に存在する時、前記抗原分子と相互作用でき、[前記第一のソースのGAD抗原分子] - [検体の自己抗体] - [前記第二のソースのGAD抗原分子]を含む一つ以上の複合体を形成可能となるステップと、

40

(d)ステップ(c)の前に、又は同時に、又は後に、固定化手段を提供するステップにして、これにより、ステップ(c)において形成された複体内に存在する前記第一のソースの前記GAD抗原分子を、ステップ(c)の前に、又は同時に、又は後に、固体支持体に固定化するステップと、

(e)ステップ(c)の前に、又は同時に、又は後に、直接的又は間接的に検出可能な標識手段を提供するステップにして、これにより、ステップ(c)において形成された複体内に存在する前記第二のソースの前記GAD抗原分子に対して、ステップ(c)の前

50

に、又は同時に、又は後に、こうした直接的又は間接的に検出可能な標識手段を設けるステップと、

(f) 前記試料内に存在する検体の自己抗体の表示を提供できるように、(c)において形成され、(d)に従って固定化された複合体の存在を検出するステップと、を含む。

【0019】

また、本発明の好適な実施形態は、IA-2 或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片に反応する検体の自己免疫に関して、動物被検体から取得した体液試料をスクリーニングするステップを適切に含むことが可能であり、前記方法は、

(a) 前記被検体からの前記体液試料を提供するステップと、

(b) IA-2 と、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能な一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片と、IA-2、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子と、から選択されたIA-2 抗原分子により本質的に構成される、抗原分子の第一及び第二のソースを提供するステップにして、前記第一のソースのIA-2 抗原分子が、ステップ(d)による固体支持体に固定化され、前記第二のソースのIA-2 抗原分子には、ステップ(e)による標識手段が設けられるステップと、

(c) ステップ(b)で提供されたIA-2 前記抗原分子を、スクリーニング中の前記体液試料に、同時又は連続的に接触させるステップにして、これにより、検体の自己抗体は、前記体液試料内に存在する時、前記IA-2 抗原分子と相互作用でき、[前記第一のソースのIA-2 抗原分子] - [検体の自己抗体] - [前記第二のソースのIA-2 抗原分子]を含む一つ以上の複合体を形成可能となるステップと、

(d) ステップ(c)の前に、又は同時に、又は後に、固定化手段を提供するステップにして、これにより、ステップ(c)において形成された複体内に存在する前記第一のソースの前記IA-2 抗原分子を、ステップ(c)の前に、又は同時に、又は後に、固体支持体に固定化するステップと、

(e) ステップ(c)の前に、又は同時に、又は後に、直接的又は間接的に検出可能な標識手段を提供するステップにして、これにより、ステップ(c)において形成された複体内に存在する前記第二のソースの前記IA-2 抗原分子に対して、ステップ(c)の前に、又は同時に、又は後に、こうした直接的又は間接的に検出可能な標識手段を設けるステップと、

(f) 前記試料内に存在する検体の自己抗体の表示を提供できるように、(c)において形成され、(d)に従って固定化された複合体の存在を検出するステップと、を含む。

【0020】

また、本発明の好適な実施形態は、GAD 及びIA-2 或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片にそれぞれ反応する第一及び第二の検体の自己免疫に関して、動物被検体から取得した体液試料をスクリーニングするステップを適切に含むことが可能であり、前記方法は、

(a) 前記被検体からの前記体液試料を提供するステップと、

(b) 検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互反応可能なGAD 抗原分子の第一及び第二のソースを提供するステップにして、前記GAD 抗原分子が、GAD₆₅ と、GAD₆₇ と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片と、GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子とから選択され、前記融合分子の前記抗原分子の少なくとも一つが、GAD₆₅、GAD₆₇、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片を含み、前記第一のソースのGAD 抗原分子が、ステップ(e)による固体支持体に固定化され、前記第二のソースのGAD 抗原分子には、ステップ(f)による標識手段が設けられるステップと、

(c) 検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互反応可能なIA-2 抗原分子の第一及び第二のソースを提供するステップにして、前記IA-2 抗原分子が、IA-2 と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片と、IA-2、GAD₆₅、GA

10

20

30

40

50

D₆₇、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子とから選択され、前記融合分子の前記抗原分子の少なくとも一つが、IA-2、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片を含み、前記第一のソースのIA-2抗原分子が、ステップ(e)による固体支持体に固定化され、前記第二のソースのIA-2抗原分子には、ステップ(f)による標識手段が設けられるステップと、

(d)ステップ(b)及び(c)で提供された前記抗原分子を、スクリーニング中の前記体液試料に、同時又は連続的に接触させるステップにして、これにより、検体の自己抗体は、前記体液試料内に存在する時、前記抗原分子と相互作用でき、[前記第一のソースのGAD抗原分子] - [検体の自己抗体] - [前記第二のソースのGAD抗原分子]又は

10

[前記第一のソースのIA-2抗原分子] - [検体の自己抗体] - [前記第二のソースのIA-2抗原分子]を含む一つ以上の複合体を形成可能となるステップと、

(e)ステップ(d)の前に、又は同時に、又は後に、固定化手段を提供するステップにして、これにより、ステップ(d)において形成された複体内に存在する前記第一のソースの前記GAD又はIA-2抗原分子を、ステップ(d)の前に、又は同時に、又は後に、固体支持体に固定化するステップと、

(f)ステップ(d)の前に、又は同時に、又は後に、直接的又は間接的に検出可能な標識手段を提供するステップにして、これにより、ステップ(d)において形成された複体内に存在する前記第二のソースの前記GAD又はIA-2抗原分子に対して、ステップ(d)の前に、又は同時に、又は後に、こうした直接的又は間接的に検出可能な標識手段を設けるステップと、

20

(g)前記試料内に存在する検体の自己抗体の表示を提供できるように、(d)において形成され、(e)に従って固定化された複合体の存在を検出するステップと、を含む。

【0021】

本発明による方法では、第一及び第二のソースの抗原分子は、ほぼ上で説明したような前記一つ以上の複体内に存在する時、両方とも、一つ以上の共通の抗原分子を含むことが好適な場合がある。例えば、前記第一及び第二のソースの抗原分子は、一つ以上の複体内に存在する時、GAD₆₅又はGAD₆₇を含むことが可能であり、また、第一及び第二のソースの抗原分子は、一つ以上の複体内に存在する時、IA-2を含むことが可能である。

30

【0022】

また、第一又は第二のソースのいずれか一方の抗原分子は、一つ以上の複体内に存在する時、膵島細胞抗原分子及びインスリンから選択された抗原分子を含み、他方の抗原分子は、一つ以上の複体内に存在する時、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能である上記の一方の抗原分子の一つ以上の変異体、類似体、誘導體、又は断片を含むことが好適な場合がある。例えば、第一又は第二のソースの抗原分子の一方が、一つ以上の複体内に存在する時に、GAD₆₅又はGAD₆₇を含む場合、他方の抗原分子は、一つ以上の複体内に存在する時に、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるGAD₆₅又はGAD₆₇の一つ以上の変異体、類似体、誘導體、又は断片を含むことができる。更なる例では、第一又は第二のソースの抗原分子の一方が、

40

【0023】

本発明の更なる代替実施形態では、第一及び第二のソースの両方の抗原分子が、一つ以上の複体内に存在する時、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能である、共通の抗原分子の、同じもの又は異なるものにすることが可能な、変異体、類似体、誘導體、又は断片を含む状態にすることができる。例えば、第一及び第二のソースの両方の抗原分子は、一つ以上の複体内に存在する時、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能である、GAD₆₅又はGAD₆₇の、同じもの又は異なるも

50

のにすることが可能な、変異体、類似体、誘導體、又は断片を含むことができる。更なる例では、第一及び第二のソースの両方の抗原分子が、前記一つ以上の複合体内に存在する時、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能である、IA-2の、同じもの又は異なるものにするのが可能な、変異体、類似体、誘導體、又は断片を含む状態にすることができる。上記から理解できるように、両方の抗原分子が、本発明の方法に従って形成された複合体内に存在する時、共通の抗原分子に由来する変異体、類似体、誘導體、又は断片を含む場合、こうした変異体、類似体、誘導體、又は断片は、同じもの又は異なるものにするのが可能である（例えば、GAD₆₅又はGAD₆₇の異なる変異体を変異体1及び2がそれぞれ表すことが可能な場合の変異体1及び変異体2、或いは、別個の、又は重複する可能性がある、GAD₆₅又はGAD₆₇のエピトープ等、GAD₆₅又はGAD₆₇の異なる断片を断片1及び2がそれぞれ表すことが可能な場合の変異体1及び変異体2）。

10

【0024】

本発明による方法において融合分子が利用される場合には、こうした融合分子は別個の抗原分子（例えば、GAD₆₅及びIA-2）を含むことができるが、本発明に従って形成された複合体において、第一及び第二のソースによってそれぞれ提供される、検体の自己抗体に関する抗原融合分子の結合領域は、共通の抗原分子に存在するか、或いはこれに由来することになると理解される。本発明による一つ以上の融合分子を利用して形成することが可能な複合体の例は、(i) [GAD-IA-2]_{imm} - [検体の自己抗体] - [GAD-IA-2]_{label} を含み、ここで、抗体がGAD自己抗体を含む場合には、前記自己抗体は、[GAD-IA-2]_{imm} 及び [GAD-IA-2]_{label} に存在するGADの結合領域と相互作用し、又は、抗体がIA-2自己抗体を含む場合には、前記自己抗体は、[GAD-IA-2]_{imm} 及び [GAD-IA-2]_{label} に存在するIA-2の結合領域と相互作用し、或いは(ii) [GAD(断片)_{imm}] - [検体の自己抗体] - [GAD-IA-2]_{label} を含み、ここで、GAD検体自己抗体は、[GAD(断片)_{imm}] 及び [GAD-IA-2]_{label} に存在するGADの結合領域と相互作用し、或いは(iii) [IA-2(断片)_{imm}] - [検体の自己抗体] - [GAD-IA-2]_{label} を含み、ここで、IA-2検体自己抗体は、[IA-2(断片)_{imm}] 及び [GAD-IA-2]_{label} に存在するIA-2の結合領域と相互作用し、ここでGADはGAD₆₅又はGAD₆₇を表すことが可能である。

20

30

【0025】

検出可能な標識手段は、酵素標識と、同位体標識と、化学発光標識と、蛍光標識と、色素と、その他とで構成されるグループから適切に選択することが可能であり、通常は、アルカリホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ピオチン、又はその他で構成されるグループから選択することが可能であり、特に、ピオチンを含むことができる。モニタリングには、こうした検出可能な標識手段の（ほぼ上で説明したような一つ以上の抗原分子、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片、或いは一つ以上のその融合分子に取り付けた時の）それに関する一つ以上の基質との反応（アビジン又はストレプトアビジン接合体、例えば、ストレプトアビジン・ホースラディッシュペルオキシダーゼ接合体又はその他等）を関与させることが可能であり、これにより、結果として生じた接合体は、光学濃度又はその他の測定値によって、適切に検出することができる。

40

【0026】

検出可能な標識手段は、ほぼ上で説明したような、一つ以上の抗原分子、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片、或いは一つ以上のその融合分子に、直接的に提供することができる。追加又は代替として、検出可能な標識手段は、ほぼ上で説明したような、一つ以上の抗原分子、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片、或いは一つ以上のその融合分子に、間接的に提供することが可能であり、これは通常、ほぼ上で説明したような、一つ以上の抗原分子、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片、或いは一つ以上のその融合分子と結合することが可能な一つ以上の抗体又はその他の結合剤に、検出可能な標識手段を提供することで行われる。

50

【 0 0 2 7 】

本発明による自己抗体に関するスクリーニングの方法は、通常、(i) 被検体からの体液試料内に存在するこうした自己抗体と、(i i) 本発明によって提供される、ほぼ上で説明したような、一つ以上の抗原分子、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片、或いは一つ以上のその融合分子との反応を直接的にモニタするステップを含み、これは通常、この技術において知られている非競合的なサンドイッチ型のアッセイ手法を利用することで行われる。

【 0 0 2 8 】

本発明の好適な実施形態によれば、ほぼ上で説明したような、一つ以上の第一のソースの抗原分子、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片、或いは一つ以上のその融合分子は、固体支持体に固定化され、ほぼ上で説明したような、一つ以上の第二のソースの抗原分子、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片、或いは一つ以上のその融合分子には、検出可能な標識手段が設けられ、これにおいて、好ましくは、一つ以上の第二のソースの抗原分子は、既知の E L I S A 手法での使用において従来通りである溶液相で提供される。

【 0 0 2 9 】

好ましくは、本発明による方法において、一つ以上の第一のソースの抗原分子、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片、或いは一つ以上のその融合分子にして、検体の自己抗体が前記体液試料に存在する時に相互作用可能であるものは、スクリーニングされる体液試料に接触する前に、固体支持体に固定化される。こうした固定化された、一つ以上の第一のソースの抗原分子、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片、或いは一つ以上のその融合分子にして、検体の自己抗体が前記体液試料に存在する時に相互作用可能であるものは、その後、一つ以上の第二のソースの抗原分子、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片、或いは一つ以上のその融合分子にして、検体の自己抗体が前記体液試料に存在する時に相互作用可能であるものと体液試料との接触と同時に、或いは連続して、スクリーニング中の体液試料と接触させる。特に好ましくは、固定化された、一つ以上の第一のソースの抗原分子、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片、或いは一つ以上のその融合分子にして、検体の自己抗体が前記体液試料に存在する時に相互作用可能であるものは、抗原分子が固体支持体に固定化された [抗原分子] - [検体の自己抗体] を含む中間複合体が形成できるようにスクリーニング中の体液試料に接触させ、こうして形成された固定化中間複合体は、その後、溶液相において存在する、一つ以上の第二のソースの抗原分子、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片、或いは一つ以上のその融合分子にして、検体の自己抗体が前記体液試料に存在する時に相互作用可能であるものと接触させ、第一のソースの抗原分子を介して固定支持体に固定化された [前記第一のソースの抗原分子] - [検体の自己抗体] - [前記第二のソースの抗原分子] を含む、これまでに説明した複合体が形成できるようにする。

【 0 0 3 0 】

したがって、本発明は、膵島細胞抗原分子及びインスリン、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片から選択された一つ以上の抗原分子に反応する検体の自己抗体に関して、動物被検体から取得した体液試料をスクリーニングする方法を提供し、前記方法は、

(a) 前記被検体からの前記体液試料を提供するステップと、

(b) 検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能な抗原分子の一つ以上の第一のソースを提供するステップにして、前記抗原分子が、膵島細胞抗原分子と、インスリンと、前記膵島細胞抗原分子又はインスリンの一つ以上の変異体、類似体、誘導體、又は断片と、膵島細胞抗原分子、インスリン、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子と、から選択され、前記一つ以上の第一のソースの抗原分子が、固体支持体に固定化されるステップと、

10

20

30

40

50

(c) 検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能な抗原分子の一つ以上の第二のソースを提供するステップにして、前記抗原分子が、膵島細胞抗原分子と、インスリンと、前記膵島細胞抗原分子又はインスリンの一つ以上の変異体、類似体、誘導体、又は断片と、膵島細胞抗原分子、インスリン、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子と、から選択され、前記一つ以上の第二のソースの抗原分子が、溶液相において提供されるステップと、

(d) ステップ(b)及び(c)で提供された前記抗原分子を、スクリーニング中の前記体液試料に、同時又は連続的に接触させるステップにして、これにより、検体の自己抗体は、前記体液試料内に存在する時、前記抗原分子と相互作用でき、[前記第一のソースの抗原分子] - [検体の自己抗体] - [前記第二のソースの抗原分子]を含む一つ以上の固定化された複合体を形成可能となり、これにおいて、前記第一及び第二のソースの前記抗原分子は、前記一つ以上の複体内に存在する時に、共通の抗原分子を含むか、又はこれに由来し、或いは、これにおいて、前記第一及び第二のソースの前記抗原分子の結合領域は、前記検体の自己抗体に関して、前記一つ以上の複体内に存在する時に、共通の抗原分子内に存在するか、又はこれに由来し、これにおいて、前記複合体が、前記第一のソースの前記抗原分子を介して、固体支持体に固定化されるステップと、

(e) ステップ(d)の前に、又は同時に、又は後に、直接的又は間接的に検出可能な標識手段を提供するステップにして、これにより、ステップ(d)において形成された複体内に存在する前記第二のソースの前記抗原分子に対して、ステップ(d)の前に、又は同時に、又は後に、こうした直接的又は間接的に検出可能な標識手段を設けるステップと、

(f) 前記試料内に存在する検体の自己抗体の表示を提供できるように、(d)において形成された複合体の存在を検出するステップと、を含む。

【0031】

本発明で求められるような、検体の自己抗体との反応が可能である一つ以上の抗原分子、或いは、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片、或いは、その融合分子は、任意の膵島細胞抗原分子及びインスリン、及び一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片、或いはその融合分子から選択することが可能であり、特に、グルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD、及び特に、グルタミン酸デカルボキシラーゼの65KDa及び67KDaアイソフォーム、GAD₆₅及びGAD₆₇)、タンパク質チロシンホスファターゼ状膵島細胞抗原(IA-2)、及びインスリン、或いは、一つ以上のその変異体(例えば、IA-2ベータ等)、類似体、誘導体、又は断片、或いは、上の二つ以上を含む融合分子にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるものによって構成されるグループから適切に選択することができる。特に、本発明で求められるような、検体の自己抗体と反応が可能である一つ以上の抗原分子、或いは、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片は、グルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD、及び特に、グルタミン酸デカルボキシラーゼの65KDa及び67KDaアイソフォーム、GAD₆₅及びGAD₆₇)、及びタンパク質チロシンホスファターゼ状膵島細胞抗原(IA-2)、或いは、一つ以上のその変異体(例えば、IA-2ベータ等)、類似体、誘導体、又は断片にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるものによって構成されるグループから適切に選択することができる。

【0032】

しかしながら、その他の接触手法が可能であり、例えば、本発明によれば、一つ以上の第一の抗原ソースの抗原分子、或いは、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片、或いは、一つ以上のその融合分子を、上記のような接触ステップの前に、最初に固定化するのではなく、ほぼ上で説明したような固体支持体を、一つ以上の第一の抗原ソースの抗原分子、或いは、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片、或いは、一つ以上のその融合分子に関するバインダに最初に接触させ、その後、このように処理された固体支持体を、一つ以上の第一及び第二のソースの上記抗原分子、或いは、一つ以上のそ

10

20

30

40

50

の変異体、類似体、誘導体、又は断片、或いは、一つ以上のその融合分子と、スクリーニング中の体液試料とに接触させることが可能である。

【0033】

本発明で利用される固体支持体と条件とに関して、この支持体と条件とは、一般に、既知のイムノアッセイ手法において利用される支持体及び条件と基本的には相違しない。本発明に従って使用する固体支持体は、既知のELISA手法で現在利用されるようなELISAプレートを備えることが可能であり、或いは、チューブ、粒子、磁気ビーズ、ニトロセルロース、又はその他といった、本発明での使用に適した他の任意の支持体を利用してもよい。

【0034】

本発明では、膵島細胞抗原分子及びインスリン、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された一つ以上の抗原分子に反応する検体の自己抗体に関して、動物被検体から取得した体液試料をスクリーニングするキットが提供され、前記キットは、

(a) 検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能な抗原分子の一つ以上の第一のソースにして、前記抗原分子が、膵島細胞抗原分子と、インスリンと、前記膵島細胞抗原分子又はインスリンの一つ以上の変異体、類似体、誘導体、又は断片と、膵島細胞抗原分子、インスリン、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子と、から選択されるものと、

(b) 検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能な抗原分子の一つ以上の第二のソースにして、前記抗原分子が、膵島細胞抗原分子と、インスリンと、前記膵島細胞抗原分子又はインスリンの一つ以上の変異体、類似体、誘導体、又は断片と、膵島細胞抗原分子、インスリン、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子と、から選択されるものと、

(c) ステップ(a)及び(b)で提供された前記抗原分子を、スクリーニング中の前記体液試料に、同時又は連続的に接触させる手段にして、これにより、検体の自己抗体は、前記体液試料内に存在する時、前記抗原分子と相互作用でき、[前記第一のソースの抗原分子] - [検体の自己抗体] - [前記第二のソースの抗原分子]を含む一つ以上の複合体を形成可能となり、これにおいて、前記第一及び第二のソースの前記抗原分子は、前記一つ以上の複体内に存在する時に、共通の抗原分子を含むか、又はこれに由来し、或いは、これにおいて、前記第一及び第二のソースの前記抗原分子の結合領域は、前記検体の自己抗体に関して、前記一つ以上の複体内に存在する時に、共通の抗原分子内に存在するか、又はこれに由来するものと、

(d) (c)において定められるような複体内に存在する前記第一のソースの前記抗原分子を、前記第一のソースの抗原分子とスクリーニング中の体液試料との接触の前に、又は同時に、又は後に、固体支持体に固定化する手段と、

(e) (c)において定められるような複体内に存在する前記第二のソースの前記抗原分子に、前記第二のソースの前記抗原分子とスクリーニング中の体液試料との接触の前に、又は同時に、又は後に、直接的又は間接的に検出可能な標識手段を提供する手段と、

(f) 前記試料内に存在する検体の自己抗体の表示を提供できるように、(c)において定められ、(d)において定められるように固定化された複体の存在を検出する手段と、を備える。

【0035】

本発明による検体の自己抗体をスクリーニングするキットは、こうした自己抗体の特異性及び感度の高い検出を可能にすることにおいて特に有利である。

【0036】

本発明で求められるような、検体の自己抗体との反応が可能である一つ以上の抗原分子、或いは、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片、或いは、その融合分子は

10

20

30

40

50

、任意の膵島細胞抗原分子及びインスリン、及び一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片、或いはその融合分子から選択することが可能であり、特に、グルタミン酸デカルボキシラーゼ（GAD、及び特に、グルタミン酸デカルボキシラーゼの65kDa及び67kDaアイソフォーム、GAD₆₅及びGAD₆₇）、タンパク質チロシンホスファターゼ状島細胞抗原（IA-2）、及びインスリン、或いは、一つ以上のその変異体（例えば、IA-2ベータ等）、類似体、誘導体、又は断片、或いは、上の二つ以上を含む融合分子にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるものによって構成されるグループから適切に選択することができる。特に、本発明で求められるような検体の自己抗体との反応が可能で、一つ以上の抗原分子、或いはその変異体、類似体、誘導体、又は断片は、グルタミン酸デカルボキシラーゼ（特に、GAD₆₅又はGAD₆₇）及びタンパク質チロシンホスファターゼ状島細胞抗原（IA-2）、或いは、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるものによって構成されるグループから適切に選択することができる。本発明によるキットにおいて使用される抗原分子及び適切な融合分子の様々な実施形態は、本発明による方法を参照してほぼ上で更に詳細に説明した通りである。

10

【0037】

したがって、本発明の好適な態様において、ほぼ上で説明したようなスクリーニング用キットは、GAD₆₅又はGAD₆₇及び又はIA-2、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片と、GAD₆₅又はGAD₆₇、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片、及び又はIA-2、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片を含む一つ以上の抗原分子とに対する検体の自己抗体を検出するステップにおいて使用される。本発明によるキットにおいて融合抗原分子が利用される場合には、適切な融合分子は、本発明による方法を参照してほぼ上で更に詳細に説明したような、GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含むことができる。

20

【0038】

好ましくは、本発明によるキットは、GAD₆₅と、GAD₆₇と、IA-2と、インスリンと、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片と、GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、インスリン、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるものから選択され、(d)において定められるような固体支持体に固定化された、抗原分子の一つ以上の第一のソース、及び、GAD₆₅と、GAD₆₇と、IA-2と、インスリンと、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片と、GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、インスリン、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるものから選択され、(e)において定められるような標識手段が設けられた、抗原分子の一つ以上の第二のソース、を備える。

30

【0039】

更に好ましくは、本発明によるキットは、GAD₆₅と、GAD₆₇と、IA-2と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片と、GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるものから選択され、(d)において定められるような固体支持体に固定化された、抗原分子の一つ以上の第一のソース、及び、GAD₆₅と、GAD₆₇と、IA-2と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片と、GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるものから選択され、(e)において定められるような標識手段が設けられた、一つ以上の抗原分子の第二

40

50

のソース、を備える。本発明によるキットは、GAD₆₅と、GAD₆₇と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片と、GAD₆₅、GAD₆₇、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるものことから選択され、(d)において定められるような固体支持体に固定化された、GAD抗原分子により本質的に構成される、抗原分子の第一のソース、及び、GAD₆₅と、GAD₆₇と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片と、GAD₆₅、GAD₆₇、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるものことから選択され、(e)において定められるような標識手段が設けられた、GAD抗原分子により本質的に構成される、抗原分子の第二のソース、を備えることが好適な場合がある。また、本発明によるキットは、IA-2と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるものと、IA-2、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子とから選択され、(e)において定められるような固体支持体に固定化された、IA-2抗原分子により本質的に構成される、抗原分子の第一のソース、及び、IA-2と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるものと、IA-2、及び一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子とから選択され、(e)において定められるような標識手段が設けられた、IA-2抗原分子により本質的に構成される、抗原分子の第二のソース、を備えることが好適な場合がある。本発明による更なる代替では、本発明によるキットは、(i)検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互反応可能なGAD抗原分子の第一及び第二のソースにして、前記GAD抗原分子が、GAD₆₅と、GAD₆₇と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片と、GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子とから選択され、前記融合分子の前記抗原分子の少なくとも一つが、GAD₆₅、GAD₆₇、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片を含み、前記第一のソースのGAD抗原分子が、(d)において定められるような固体支持体に固定化され、前記第二のソースのGAD抗原分子には、(e)において定められるような標識手段が設けられたものと、(ii)検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互反応可能なIA-2抗原分子の第一及び第二のソースにして、前記IA-2抗原分子が、IA-2と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片と、IA-2、GAD₆₅、GAD₆₇、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子とから選択され、前記融合分子の前記抗原分子の少なくとも一つが、IA-2、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片を含み、前記第一のソースのIA-2抗原分子が、(d)において定められるような固体支持体に固定化され、前記第二のソースのIA-2抗原分子には、(e)において定められるような標識手段が設けられたものと、を備える。

【0040】

したがって、本発明の好適な実施形態は、膵島細胞抗原分子或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された一つ以上の抗原分子に反応する検体の自己免疫に関して、動物被検体から取得した体液試料をスクリーニングするキットを適切に含むことが可能であり、前記キットは、

(a)検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能な抗原分子の一つ以上の第一のソースにして、前記抗原分子が、GAD₆₅と、GAD₆₇と、IA-2と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片と、GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直

接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子と、から選択されるものと、

(b) 検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能な抗原分子の一つ以上の第一のソースにして、前記抗原分子が、GAD₆₅と、GAD₆₇と、IA-2と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片と、GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子と、から選択されるものと、

(c) ステップ(a)及び(b)で提供された前記抗原分子を、スクリーニング中の前記体液試料に、同時又は連続的に接触させる手段にして、これにより、検体の自己抗体は、前記体液試料内に存在する時、前記抗原分子と相互作用でき、[前記第一のソースの抗原分子] - [検体の自己抗体] - [前記第二のソースの抗原分子]を含む一つ以上の複合体を形成可能となり、これにおいて、前記第一及び第二のソースの前記抗原分子は、前記一つ以上の複体内に存在する時に、共通の抗原分子を含むか、又はこれに由来し、或いは、これにおいて、前記第一及び第二のソースの前記抗原分子の結合領域は、前記検体の自己抗体に関して、前記一つ以上の複体内に存在する時に、共通の抗原分子内に存在するか、又はこれに由来するものと、

(d) (c)において定められるような複体内に存在する前記第一のソースの前記抗原分子を、前記第一のソースの抗原分子とスクリーニング中の体液試料との接触の前に、又は同時に、又は後に、固体支持体に固定化する手段と、

(e) (c)において定められるような複体内に存在する前記第二のソースの前記抗原分子に、前記第二のソースの前記抗原分子とスクリーニング中の体液試料との接触の前に、又は同時に、又は後に、直接的又は間接的に検出可能な標識手段を提供する手段と、

(f) 前記試料内に存在する検体の自己抗体の表示を提供できるように、(c)において定められ、(d)において定められるように固定化された複体の存在を検出する手段と、を備える。

【0041】

また、本発明の好適な実施形態は、GAD或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片のみに反応する検体の自己免疫に関して、動物被検体から取得した体液試料をスクリーニングするキットを適切に含むことが可能であり、前記キットは、

(a) GAD₆₅と、GAD₆₇と、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能な一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片と、GAD₆₅、GAD₆₇、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子と、から選択されたGAD抗原分子により本質的に構成される、抗原分子の第一及び第二のソースにして、前記第一のソースのGAD抗原分子が、(c)において定められるような固体支持体に固定化され、前記第二のソースのGAD抗原分子には、(d)において定められるような標識手段が設けられるものと、

(b) (a)で提供された前記抗原分子を、スクリーニング中の前記体液試料に、同時又は連続的に接触させる手段にして、これにより、検体の自己抗体は、前記体液試料内に存在する時、前記抗原分子と相互作用でき、[前記第一のソースのGAD抗原分子] - [検体の自己抗体] - [前記第二のソースのGAD抗原分子]を含む一つ以上の複合体を形成可能となるものと、

(c) (b)において定められるような複体内に存在する前記第一のソースの前記GAD抗原分子を、前記第一のソースのGAD抗原分子とスクリーニング中の体液試料との接触の前に、又は同時に、又は後に、固体支持体に固定化する手段と、

(d) (b)において定められるような複体内に存在する前記第二のソースの前記GAD抗原分子に、前記第二のソースの前記GAD抗原分子とスクリーニング中の体液試料との接触の前に、又は同時に、又は後に、直接的又は間接的に検出可能な標識手段を提供する手段と、

(e) 前記試料内に存在する検体の自己抗体の表示を提供できるように、(b)において定められ、(c)において定められるように固定化された複体の存在を検出する手段

10

20

30

40

50

と、を備える。

【0042】

また、本発明の好適な実施形態は、I A - 2 或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片に反応する検体の自己免疫に関して、動物被検体から取得した体液試料をスクリーニングするキットを適切に含むことが可能であり、前記キットは、

(a) I A - 2 と、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能な一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片と、I A - 2、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子と、から選択された I A - 2 抗原分子により本質的に構成される、抗原分子の第一及び第二のソースにして、前記第一のソースの I A - 2 抗原分子が、(c) において定められるような固体支持体に固定化され、前記第二のソースの I A - 2 抗原分子には、(d) において定められるような標識手段が設けられるものと、

10

(b) (a) で提供された前記 I A - 2 抗原分子を、スクリーニング中の前記体液試料に、同時又は連続的に接触させる手段にして、これにより、検体の自己抗体は、前記体液試料内に存在する時、前記 I A - 2 抗原分子と相互作用でき、[前記第一のソースの I A - 2 抗原分子] - [検体の自己抗体] - [前記第二のソースの I A - 2 抗原分子] を含む一つ以上の複合体を形成可能となるものと、

(c) (b) において定められるような複体内に存在する前記第一のソースの前記 I A - 2 抗原分子を、前記第一のソースの I A - 2 抗原分子とスクリーニング中の体液試料との接触の前に、又は同時に、又は後に、固体支持体に固定化する手段と、

20

(d) (b) において定められるような複体内に存在する前記第二のソースの前記 I A - 2 抗原分子に、前記第二のソースの前記 I A - 2 抗原分子とスクリーニング中の体液試料との接触の前に、又は同時に、又は後に、直接的又は間接的に検出可能な標識手段を提供する手段と、

(e) 前記試料内に存在する検体の自己抗体の表示を提供できるように、(b) において定められ、(c) において定められるように固定化された複合体の存在を検出する手段と、を備える。

【0043】

また、本発明の好適な実施形態は、G A D 及び I A - 2 或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片にそれぞれ反応する第一及び第二の検体の自己免疫に関して、動物被検体から取得した体液試料をスクリーニングするキットを適切に含むことが可能であり、前記キットは、

30

(a) 検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互反応可能な G A D 抗原分子の第一及び第二のソースにして、前記 G A D 抗原分子が、G A D₆₅ と、G A D₆₇ と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片と、G A D₆₅、G A D₆₇、I A - 2、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子とから選択され、前記融合分子の前記抗原分子の少なくとも一つが、G A D₆₅、G A D₆₇、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片を含み、前記第一のソースの G A D 抗原分子が、(d) において定められるような固体支持体に固定化され、前記第二のソースの G A D 抗原分子には、(e) において定められるような標識手段が設けられるものと、

40

(b) 検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互反応可能な I A - 2 抗原分子の第一及び第二のソースにして、前記 I A - 2 抗原分子が、I A - 2 と、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片と、I A - 2、G A D₆₅、G A D₆₇、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子とから選択され、前記融合分子の前記抗原分子の少なくとも一つが、I A - 2、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片を含み、前記第一のソースの I A - 2 抗原分子が、(d) において定められるような固体支持体に固定化され、前記第二のソースの I A - 2 抗原分子には、(e) において定められるような標識手段が設けられるものと、

50

(c) ステップ (a) 及び (b) で提供された前記抗原分子を、スクリーニング中の前記体液試料に、同時又は連続的に接触させる手段にして、これにより、検体の自己抗体は、前記体液試料内に存在する時、前記抗原分子と相互作用でき、[前記第一のソースの GAD 抗原分子] - [検体の自己抗体] - [前記第二のソースの GAD 抗原分子] 又は [前記第一のソースの IA - 2 抗原分子] - [検体の自己抗体] - [前記第二のソースの IA - 2 抗原分子] を含む一つ以上の複合体を形成可能となるものと、

(d) (c) において定められるような複体内に存在する前記第一のソースの前記 GAD 又は IA - 2 抗原分子を、前記第一のソースの GAD 又は IA - 2 抗原分子とスクリーニング中の体液試料との接触の前に、又は同時に、又は後に、固体支持体に固定化する手段と、

(e) (c) において定められるような複体内に存在する前記第二のソースの前記 GAD 又は IA - 2 抗原分子に、前記第二のソースの前記 GAD 又は IA - 2 抗原分子とスクリーニング中の体液試料との接触の前に、又は同時に、又は後に、直接的又は間接的に検出可能な標識手段を提供する手段と、

(f) 前記試料内に存在する検体の自己抗体の表示を提供できるように、(c) において定められ、(d) において定められるように固定化された複合体の存在を検出する手段と、を備える。

【0044】

本発明によるキットでは、第一及び第二のソースの抗原分子は、一つ以上の共通の抗原分子を含むことが好適な場合がある。例えば、前記第一及び第二のソースの抗原分子は、GAD₆₅ 又は GAD₆₇ を含むことが可能であり、また、第一及び第二のソースの抗原分子は、両方とも IA - 2 を含むことが可能である。

【0045】

また、第一又は第二のソースのいずれかの抗原分子は、膵島細胞抗原分子及びインスリンから選択され、他方のソースの抗原分子は、第一又は第二のソースのいずれかの上記抗原分子の一つ以上の変異体、類似体、誘導体、又は断片にして、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能であるものを含むことが好適な場合がある。

例えば、第一又は第二のソースのいずれかの抗原分子が、GAD₆₅ 又は GAD₆₇ を含む場合、他方のソースの抗原分子は、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能である GAD₆₅ 又は GAD₆₇ の一つ以上の変異体、類似体、誘導体、又は断片を含む。更なる例では、第一又は第二のソースのいずれかの抗原分子が、IA - 2 を含む場合、他方のソースの抗原分子は、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能である IA - 2 の一つ以上の変異体、類似体、誘導体、又は断片を含む。

【0046】

本発明の更なる代替実施形態では、第一及び第二のソースの両方の抗原分子が、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能である、共通の抗原分子の、同じもの又は異なるものにするのが可能な、変異体、類似体、誘導体、又は断片を含む状態にすることができる。例えば、第一及び第二のソース両方の抗原分子は、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能である、GAD₆₅ 又は GAD₆₇ の、同じもの又は異なるものにするのが可能な、変異体、類似体、誘導体、又は断片を含むことができる。更なる例では、第一及び第二のソース両方の抗原分子が、検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能である、IA - 2 の、同じもの又は異なるものにするのが可能な、変異体、類似体、誘導体、又は断片を含む状態にすることができる。上記から理解できるように、第一及び第二のソースの抗原分子が、共通の抗原分子に由来する変異体、類似体、誘導体、又は断片を含む場合、それぞれのソースによって提供されるこうした変異体、類似体、誘導体、又は断片は、同じもの又は異なるものにする事ができる(例えば、GAD₆₅ 又は GAD₆₇ の異なる変異体を変異体 1 及び 2 がそれぞれ表すことが可能な場合、抗原分子の第一のソースによって提供される変異体 1 及び抗原分子の第二のソースによって提供される変異体 2、或いは、別個の、又は重複する可能性がある、GAD₆₅ 又は GAD₆₇ のエピトープ等、GAD₆₅ 又は GAD₆₇ の異なる断片を断片 1 及

10

20

30

40

50

び2がそれぞれ表すことが可能な場合、抗原分子の第一のソースによって提供される変異体1及び抗原分子の第二のソースによって提供される変異体2)。

【0047】

検出可能な標識手段は、酵素標識と、同位体標識と、化学発光標識と、蛍光標識と、色素と、その他とで構成されるグループから適切に選択することが可能であり、通常は、アルカリホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ビオチン、又はその他で構成されるグループから選択することが可能であり、特に、ビオチンを含むことができる。こうした検出可能な標識手段は(ほぼ上で説明したような一つ以上の抗原分子、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片、或いは一つ以上のその融合分子に取り付けた時)、それに関する一つ以上の基質と適切に反応させることが可能であり(アビジン又はストレプトアビジン接合体、例えば、ストレプトアビジン・ホースラディッシュペルオキシダーゼ接合体又はその他等)、これにより、結果として生じた接合体は、光学濃度又はその他の測定値によって、適切に検出することができる。

10

【0048】

検出可能な標識手段は、ほぼ上で説明したような、一つ以上の抗原分子、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片、或いは一つ以上のその融合分子に、直接的に提供することができる。追加又は代替として、検出可能な標識手段は、ほぼ上で説明したような、一つ以上の抗原分子、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片、或いは一つ以上のその融合分子に、間接的に提供することが可能であり、これは通常、ほぼ上で説明したような、一つ以上の抗原分子、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片、或いは一つ以上のその融合分子と結合することが可能な一つ以上の抗体又はその他の結合剤に、検出可能な標識手段を提供することで行われる。

20

【0049】

本発明による自己抗体に関するスクリーニング用キットは、通常、(i)被検体からの体液試料内に存在するこうした自己抗体と、(ii)本発明によって提供される、ほぼ上で説明したような、一つ以上の抗原分子、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片、或いは一つ以上のその融合分子との反応を直接的にモニタする手段を更に備え、これは通常、この技術において知られている非競合的なサンドイッチ型のアッセイ手法を利用することで行われる。

【0050】

本発明の好適な実施形態によれば、ほぼ上で説明したような、一つ以上の第一のソースの抗原分子、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片、或いは一つ以上のその融合分子は、固体支持体に固定化され、ほぼ上で説明したような、一つ以上の第二のソースの抗原分子、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片、或いは一つ以上のその融合分子には、検出可能な標識手段が設けられ、これにおいて、好ましくは、一つ以上の第二のソースの抗原分子は、既知のELISA手法での使用において従来通りである溶液相で提供される。

30

【0051】

好ましくは、本発明によるキットは、固定化手段を備え、これにより、一つ以上の第一のソースの抗原分子、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片、或いは一つ以上のその融合分子にして、検体の自己抗体が前記体液試料に存在する時に相互作用可能であるものは、スクリーニングされる体液試料に接触する前に、固体支持体に固定化される。本発明によるキットは、接触手段を適切に備え、これにより、このように固定化された、一つ以上の第一のソースの抗原分子、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片、或いは一つ以上のその融合分子にして、検体の自己抗体が前記体液試料に存在する時に相互作用可能であるものと体液試料との接触と同時に、或いは連続して、スクリーニング中の体液試料と接触させることができる。

40

50

特に好ましくは、接触手段が提供され、これにより、固定化された、一つ以上の第一のソースの抗原分子、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片、或いは一つ以上のその融合分子にして、検体の自己抗体が前記体液試料に存在する時に相互作用可能であるものを、抗原分子が固体支持体に固定化された〔抗原分子〕 - 〔検体の自己抗体〕を含む中間複合体が形成できるようにスクリーニング中の体液試料に接触させ、こうして形成された固定化中間複合体は、その後、溶液相において存在する、一つ以上の第二のソースの分子、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片、或いは一つ以上のその融合分子にして、検体の自己抗体が前記体液試料に存在する時に相互作用可能であるものと接触させ、前記第一のソースの抗原分子を介して固定支持体に固定化された〔前記第一のソースの抗原分子〕 - 〔検体の自己抗体〕 - 〔前記第二のソースの抗原分子〕を含む、これまでに説明した複合体を形成できるようにする。 10

【0052】

したがって、本発明は、膵島細胞抗原分子及びインスリン、或いは一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片から選択された一つ以上の抗原分子に反応する検体の自己抗体に関して、動物被検体から取得した体液試料をスクリーニングするキットを提供し、前記キットは、

(a) 検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能な抗原分子の一つ以上の第一のソースにして、前記抗原分子が、膵島細胞抗原分子と、インスリンと、前記膵島細胞抗原分子又はインスリンの一つ以上の変異体、類似体、誘導體、又は断片と、膵島細胞抗原分子、インスリン、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子と、から選択され、これにおいて、前記一つ以上の第一のソースの前記抗原分子が、固体支持体に固定化されるものと、 20

(b) 検体の自己抗体が前記体液試料内に存在する時に相互作用可能な抗原分子の一つ以上の第二のソースにして、前記抗原分子が、膵島細胞抗原分子と、インスリンと、前記膵島細胞抗原分子又はインスリンの一つ以上の変異体、類似体、誘導體、又は断片と、膵島細胞抗原分子、インスリン、及び前記一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片から選択された、二つ以上の直接的又は間接的に融合した抗原分子を含む融合分子と、から選択され、前記一つ以上の第二のソースの抗原分子が溶液相において提供され、これに対して(d)において定められるような標識手段が設けられるものと、 30

(c) ステップ(a)及び(b)で提供された前記抗原分子を、スクリーニング中の前記体液試料に、同時又は連続的に接触させる手段にして、これにより、検体の自己抗体は、前記体液試料内に存在する時、前記抗原分子と相互作用でき、〔前記第一のソースの抗原分子〕 - 〔検体の自己抗体〕 - 〔前記第二のソースの抗原分子〕を含む一つ以上の固定化された複合体を形成可能となり、これにおいて、前記第一及び第二のソースの前記抗原分子は、前記一つ以上の複体内に存在する時に、共通の抗原分子を含むか、又はこれに由来し、或いは、これにおいて、前記第一及び第二のソースの前記抗原分子の結合領域は、前記検体の自己抗体に関して、前記一つ以上の複体内に存在する時に、共通の抗原分子内に存在するか、又はこれに由来し、前記固定化複合体が、前記複体内に存在する前記第一のソースの前記抗原分子を介して、固体支持体に固定化されるものと、 40

(d) (c)において定められるような複体内に存在する前記第二のソースの前記抗原分子に、前記第二のソースの前記抗原分子とスクリーニング中の前記体液試料との接触の前に、又は同時に、又は後に、直接的又は間接的に検出可能な標識手段を提供する手段と、

(e) 前記試料内に存在する検体の自己抗体の表示を提供できるように、(c)において定められるような複合体の存在を検出する手段と、を備える。

【0053】

しかしながら、本発明によるキットには、その他の接触手段が存在してもよく、例えば、本発明によれば、一つ以上の第一の抗原ソースの抗原分子、或いは、一つ以上のその変異体、類似体、誘導體、又は断片、或いは、一つ以上のその融合分子を、上記のような接 50

触ステップの前に、最初に固定化する手段を提供するのではなく、ほぼ上で説明したような固体支持体を、一つ以上の第一の抗原ソースの抗原分子、或いは、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片、或いは、一つ以上のその融合分子に関するバインダに最初に接触させる手段を提供し、その後、このように処理された固体支持体を、一つ以上の第一及び第二のソースの上記抗原分子、或いは、一つ以上のその変異体、類似体、誘導体、又は断片、或いは、一つ以上のその融合分子と、スクリーニング中の体液試料とに接触させる手段をキットが備えるようにすることが可能である。

【 0 0 5 4 】

本発明によるキットにおいて利用される固体支持体と条件とに関して、この支持体と条件とは、一般に、既知のイムノアッセイ手法において利用される支持体及び条件と基本的には相違しない。本発明によるキットにおいて使用する固体支持体は、既知の E L I S A 手法で現在利用されるような E L I S A プレートを用意することが可能であり、或いは、チューブ、粒子、磁気ビーズ、ニトロセルロース、又はその他といった、本発明での使用に適した他の任意の支持体を利用してもよい。

10

【 0 0 5 5 】

本発明によって提供される方法による、或いは、本発明によって提供されるキットを利用することによる、膵島細胞抗原分子及びインスリンから選択された一つ以上の抗原分子に反応する検体の自己抗原の検出は、こうした検体の自己抗体の存在に関連する多数の疾病状態の診断に有用である場合がある。特に、本発明は、以下の疾病状態のいずれか - 一型糖尿病及び又はステイフマン症候群、二型糖尿病、一つ以上の自己免疫性甲状腺疾患、セリアック病、一つ以上の結合組織病、副腎自己免疫、或いは二種類以上の自己免疫疾患の組み合わせ - を患っていることが疑われる、その影響を受けやすい、或いは有している、動物被検体からの体液試料をスクリーニングするステップにおいて利用可能であり、本発明は、更に、動物被検体における上記疾病状態のいずれかを診断する方法を提供する。

20

【 0 0 5 6 】

これまでの説明から理解できるように、本発明は、動物被検体から取得した体液試料において、膵島細胞抗原分子及びインスリンから選択された一つ以上の抗原分子に反応し、上記の疾病状態の発症又は存在を示す、検体の自己抗体を検出するアッセイ方法及びキットを提供する。体液試料におけるこうした自己抗体（又は、少なくとも、試料におけるこうした自己抗体のレベル）の検出は、試料を取得した被検体における、こうした疾病状態の発症又は存在の可能性を示し、したがって、こうした疾病状態の発症又は存在の可能性の診断を可能にすることができる。

30

【 0 0 5 7 】

したがって、本発明では、膵島細胞抗原分子及びインスリンから選択された一つ以上の抗原分子に反応する自己抗体の存在に関連する疾病状態の発症又は存在の可能性を、こうした疾病状態を有することが疑われる、或いはこうした疾病状態の影響を受けやすい動物被検体（特に、ヒト被検体）において診断する方法が更に提供され、前記方法は、膵島細胞抗原分子及びインスリンから選択された一つ以上の抗原分子に反応し、こうした疾病状態の発症又は存在の可能性を示す自己抗体を、ほぼ上で説明したような被検体からの体液試料において検出するステップを含み、これにより、検出された自己抗体は、こうした疾病状態の発症又は存在の可能性の診断を提供することができる。

40

【 0 0 5 8 】

したがって、本発明では、動物被検体（特に、ヒト被検体）において膵島細胞抗原分子及びインスリンから選択された一つ以上の抗原分子に反応する自己抗体の存在に関連する疾病状態の発症を遅延させる、又は予防する方法、或いは、こうした疾病状態を有する、又はこうした疾病状態から回復している動物被検体（特に、ヒト被検体）を治療する方法が更に提供され、前記方法は、膵島細胞抗原分子及びインスリンから選択された一つ以上の抗原分子に反応し、こうした疾病状態の発症又は存在を示す自己抗体を、ほぼ上で説明したような被検体からの体液試料において最初に検出し、これにより、被検体におけるこうした疾病状態の発症又は存在の可能性の診断を提供するステップと、前記被検体に対し

50

て、こうした疾病状態の発症を遅らせること、こうした疾病状態を未然に防ぐこと、予防すること、及び又は治療することにおいて有効な少なくとも一つの治療的に有効な量の治療剤を投与するステップとを含む。

【0059】

したがって、本発明では、動物被検体（特に、ヒト被検体）において膵島細胞抗原分子及びインスリンから選択された一つ以上の抗原分子に反応する自己抗体の存在に関連する疾病状態の発症を遅延させる又は予防することの有効性を評価する方法、或いは、こうした疾病状態を有する、又はこうした疾病状態から回復している動物被検体（特に、ヒト被検体）を治療することの有効性を評価する方法が提供され、前記方法は、被検体に対して、膵島細胞抗原分子及びインスリンから選択された一つ以上の抗原分子に反応する自己抗体の存在に関連する、こうした疾病状態の発症を遅らせること、こうした疾病状態を未然に防ぐこと、予防すること、及び又は治療することにおいて有効な少なくとも一つの治療的に有効な量の治療剤を投与するステップと、被検体から取得した体液試料において、こうした疾病状態の発症又は存在を示す自己抗体を検出し、前記試料内での前記自己抗体の存在の表示を提供できるようにし、これにより、被検体を治療すること或いは被検体におけるこうした疾病状態の発症を遅延させること又は予防することの有効性の表示を提供するステップとを含む。

10

【0060】

本発明では、ほぼ上で説明したようなキットが、膵島細胞抗原分子及びインスリンから選択された一つ以上の抗原分子に反応する自己抗体の存在に関連する疾病状態の治療において有効な少なくとも一つの治療的に有効な量の治療剤と組み合わせて、更に提供される。

20

【0061】

本発明によってスクリーニングされる体液の試料は、通常、血液試料、或いは、特に血清試料又は血漿試料といった、その他の流体の血液部分であるが、前記試料は、原則的には、唾液又は尿又は可溶性組織抽出物といった、別の生物学的流体にすることができる。

【0062】

「抗原」又は「抗原分子」という用語は、本明細書での使用において、本明細書で説明する抗体が相互作用可能であり、抗体と結合して特定の抗体抗原複合体を形成できる化合物を意味する。抗原又は抗原分子は、天然又は合成物質にすることが可能であり、これに対する修飾は、好ましくは、特定の抗体に対する結合特性に悪影響を及ぼさないようなものとする。

30

【0063】

前記のように、本発明は、本明細書で説明するように抗原分子の「変異体」、「類似体」、「誘導体」、及び「断片」の使用をカバーしており、「変異体」、「類似体」、「誘導体」、及び「断片」という用語は、本明細書での使用において、特に特定の抗体に関する結合特性について、基本的に自然発生抗原分子と同じ生物学的機能又は活性を保持するポリペプチドとして特徴付けることができる。適切な場合、変異体、類似体、誘導体、及び断片と、本明細書で説明したような変異体、類似体、及び誘導体とは、アミノ酸の一次構造の配座を有し、この中では、自然発生抗原分子のいくつか又は少数（5乃至10、1乃至5、又は1乃至3等）のアミノ酸残基が、任意の組み合わせで、置換、削除、又は付加される。この中で特に好適なものは、自然発生抗原分子の生物活性又は機能を変更しない、或いは大幅に変更しない、サイレント置換、付加、及び欠失である。下で更に詳細に説明するように、同類置換が好適となる場合がある。

40

【0064】

更に詳しくは、本発明による使用に適した抗原分子の変異体、類似体、又は誘導体は、一つ以上のアミノ酸残基が保存又は非保存アミノ酸残基（好ましくは保存アミノ酸残基）によって置換されたもの、或いは、一つ以上のアミノ酸残基が置換基又はその他を含むものに行うことができる。こうした変異体、類似体、及び誘導体は、本明細書の教示内容から当業者の範囲内にあると考えられる。

50

【0065】

最も代表的なものとして、変異体、類似体、又は誘導体は、同類アミノ酸置換によって基準（本明細書で自然発生抗原分子と呼ばれるもの等）から変化したものである。こうした置換は、ポリペプチド内の一定のアミノ酸を、同様の性質の別のアミノ酸により置換するものである。通常、同類置換と考えられるものは、脂肪族アミノ酸A、V、L、及びI間と、水酸残基S及びT間と、酸性残基D及びE間と、アミド残基N及びQ間と、塩基残基K及びR間と、芳香族残基F及びY間とにおける、一対一の交換である。

【0066】

更に詳しくは、「断片」という用語は、本明細書で使用において、本明細書で自然発生アミノ酸と呼ばれるもの及びその変異体又は誘導体のアミノ酸配列と、全てではなく一部が

完全に同じであるアミノ酸配列を有するポリペプチドを意味し、こうした断片は、「自立状態」、即ち、他のアミノ酸又はポリペプチドの一部ではない又はこれらに融合していない状態にすることが可能であり、或いは、より大きなポリペプチド内に含まれ、その一部又は領域を形成することが可能である。本発明のコンテクストにおいて、本発明による使用に特に好適な断片は、本明細書で抗原分子と呼ばれるものの一つ以上のエピトープにすることが可能であり、上記のように、こうしたエピトープ断片は、「自立状態」の形態で使用することが可能であり、或いは、これらが一部又は領域を形成する、足場ポリペプチド等のより大きなポリペプチド内で使用することができる。本発明による、ほぼ分離状態又は自立状態の形態にあるこうしたエピトープ断片の使用は、全長の抗原の使用と比較した時にほぼ分離状態又は自立状態のエピトープ断片で安定性が向上する点において、及び又は、全長の抗原の使用と比較して、ほぼ分離状態又は自立状態のエピトープ断片の使用には特異性の向上が伴う点において、有利となる場合がある。

【発明を実施するための最良の形態】

【0067】

次に、本発明について、本発明の範囲をいかなる形でも制限しない以下の例により、更に例示する。

【0068】

実施例

GAD₆₅コーティングELISAプレートの調製

SDS - PAGE (M Powell, L Prentice, T Asawa, R Kato, J Sawicka, H Tanaka, V Petersen, A Munkley, S Morgan, B Ress Smith, J Furmaniak. Clinica Chemica Acta, 1996 256: 175-188) での評価において純度95%を越えるヒト組み換えGAD₆₅を、1.59 g/LのNa₂CO₃と、2.94 g/LのNaHCO₃と、0.1 g/LのNaN₃と、0.01 g/Lのフェノールレッドと、5 mg/LのBSA (pH 9.2) を含むコーティング緩衝液において150 µg/Lに希釈し、結果として生じた溶液150 µLを、96ウェルELISAプレート(Nunc F8 MaxiSorpの商標で入手)に加えた。次に、このプレートを、4 で一晩培養し、ウェルの中身を吸引し、10 g/LのBSAと、1 g/LのNaN₃と、11.69 g/LのNaClと、18.17 g/Lのトリスト、10 mL/Lのポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート(Tween 20の商標で入手可能(pH 8.3))とを含む高濃度塩緩衝液(HSB)により三度洗浄した。3 g/LのBSAと、9 g/LのNaClと、20 g/Lのスクロースと、0.2 g/LのNaN₃とを含むポストコート緩衝液を、ウェルに追加し(ウェル当たり250 µL)、室温で30分間培養した。その後、このポストコート緩衝液を吸引し、プレートを真空化で乾燥させ、シリカゲルと共に密封バッグ内において4 で使用まで保管した。

【0069】

ビオチンによるGAD₆₅の標識

PBS (1.15 g/LのNa₂HPO₄、0.2 g/LのKH₂PO₄、0.2 g/LのKCl、8 g/LのNaCl)内のヒト組み換えGAD₆₅を、市販のビオチン化試薬(E

Z - Linkの商標でPerbio Scienceから入手可能なスルホ - NHS - L C - LC - ビオチン)と、24パートのビオチン化試薬に対して1パートのGAD₆₅のモル比で、30分間室温で反応させた。この反応は、4でのPBSに対する透析により停止させ、結果的に生じた物質を、-70で、少量のアリコートで保管した。

【0070】

上の手法により結果的に生じたビオチン標識GAD₆₅(GAD₆₅-Bi)を、20g/LのBSAにおいて、3mg/Lまで希釈し、0.22μmフィルタにより濾過し、バイアル当たり1mLのアリコートとし、フリーズドライ後、-20で保管した。使用のためには、7.5mLのHSBをバイアルに追加し、GAD₆₅-Biの最終濃度を400μg/Lとした。

10

【0071】

GAD₆₅自己抗体アッセイ用のキャリブレータの調製

GAD₆₅に対する三つのヒト単クローン抗体のIgG調製物(M J Powell, N Hayakawa, M Masuda, J Sanders, M Evans, LDKE Premawardhana, J Furmaniak, B Rees Smith. 臨床的糖尿病のない患者からのグルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD₆₅)に対する三つのヒト単クローン抗体の分離及び特徴付け. Diabetes/Metabolism Research and Reviews, 2001 17(S1): 021)を、HSBにおいて希釈し、OD450nmでの吸光度を4.0乃至0.1とした。これらの単クローン抗体は、一型糖尿病の患者からの血清において確認されるGAD₆₅自己抗体を代表するものとして知られている(M J Powell, N Hayakawa, M Masuda, J Sanders, M Evans, LDKE Premawardhana, J Furmaniak, B Rees Smith. 臨床的糖尿病のない患者からのグルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD₆₅)に対する三つのヒト単クローン抗体の分離及び特徴付け. Diabetes/Metabolism Research and Reviews, 2001 17(S1): 021)。

20

【0072】

GAD₆₅自己抗体の検出

上の手法に従って調製したGAD₆₅によりコーティングされたプレートを室温にし、テストドナーから取得した25μLの未希釈血清試料、或いは上の手法に従って調製されたキャリブレータを、二つのプレートウェルを一組として追加し、200rpmで振盪しながら室温で一時間培養した。次に、この試料を吸引し、ウェルをバッファ(8.7g/LのNaCl、2.4g/Lのトリス、0.5mL/LのTween 20、pH7.6)により三度洗浄し、その後、上の手法に従って調製したHSB(400μg)において希釈したGAD₆₅-Biを100μL追加し、200rpmで振盪しながら室温で一時間培養した。培養後、ウェルの中身を吸引し、ウェルをバッファ(8.7g/LのNaCl、2.4g/Lのトリス、0.5mL/LのTween 20、pH7.6)により三度洗浄した。その後、1μg/mLに希釈したストレプトアビジン・ホースラディッシュペルオキシダーゼ接合体100μLを追加し、200rpmで振盪しながら室温で20分間培養した。吸引後、ウェルをバッファ(8.7g/LのNaCl、2.4g/Lのトリス、0.5mL/LのTween 20、pH7.6)により一度洗浄した。次に、100μLのテトラメチルベンジジンを追加し、暗所で20分間培養し、その後、0.5mol/LのH₂SO₄を50μL追加した。次に、ウェルの吸光度をELISAプレートリーダーにおいて450nmで測定し、或いは、OD450nm>4.0となる試料の場合は、更に405nmで吸光度を測定した。

30

40

【0073】

上の手順は、IA-2自己抗体と、GAD₆₅及びIA-2自己抗体の結合検出にも適用した(特に、ビオチンにより標識したIA-2であるIA-2-Biの調製を伴う)。キャリブレーション曲線の生成に関するIA-2の基準調製物は、多クローンIA-2自己抗体から調製した。

【0074】

結果

OD450nmで得られたGAD₆₅の代表的なキャリブレーション曲線は、図1aに表

50

示されている。0 E L I S A 単位 / m L 乃至 5 1 2 E L I S A 単位 / m L で任意に割り当てた G A D_{6.5} 自己抗体 E L I S A 単位の七つのキャリブレーションプレートを含めた。これらのキャリブレーションプレートの O D 4 5 0 n m 値は、キャリブレーションプレート 0、1.0、2.0、8.0、32、128、及び 512 に関して、それぞれ、0.033、0.168、0.310、1.020、3.187、> 4.0、及び > 4.0 となった。O D 4 0 5 n m 値は、図 1 b に示すように、キャリブレーションプレート 0、1.0、2.0、8.0、32、128、及び 512 に関して、それぞれ、0.008、0.048、0.090、0.290、0.929、1.385、及び 1.620 となった。結果として、O D 4 5 0 n m 値が 4.0 より大きくなる試料は、図 1 b に示すように、O D 4 0 5 n m のキャリブレーション曲線の範囲内で測定可能となった。健康な血液ドナーからの n = 25 の血清に関して、4 5 0 n m での吸光度の平均値 ± 標準偏差は、0.04 ± 0.015 となった。

10

【0075】

本発明による G A D_{6.5} 自己抗体測定の結果は、表 1 及び 2 に表示されている。一型糖尿病である n = 18 の患者と、グレーブス病である n = 14 の患者とからの血清における G A D_{6.5} 自己抗体の結果は、表 1 に表示されている。本発明による E L I S A に基づく手法を利用した時、18 の糖尿病血清は全て G A D_{6.5} 自己抗体に関して陽性だったが (1.0 E L I S A 単位 / m L を超えるレベル)、ラジオイムノアッセイ (R I A) では、これらの患者のうち 13 のみが陽性となった。R I A において陰性となった五つの試料は、O D 4 5 0 n m での本発明による E L I S A に基づく手法において、0.117 乃至 0.980 (1.3 乃至 10.7 E L I S A 単位 / m L) の低レベルの G A D_{6.5} 自己抗体を示した。R I A において低レベルの試料 (1.0 乃至 7.5 R I A 単位 / m L) の場合、本発明による E L I S A に基づく手法における O D 4 5 0 n m 値は、0.290 乃至 1.060 (12.0 乃至 105.8 E L I S A 単位 / m L) となった。R I A において高レベルの G A D_{6.5} 自己抗体 (26.8 乃至 118.8 R I A 単位 / m L) を伴う試料の場合、本発明による E L I S A に基づく手法における O D 4 5 0 n m 値は、非常に高く、> 4.0 (> 128 E L I S A 単位 / m L) となったため、この試料における G A D_{6.5} 自己抗体レベルとキャリブレーション曲線との間の関係は、4 0 5 n m での測定後に計算された。E L I S A を実行する前の非標識 G A D_{6.5} (最終濃度 0.0005 乃至 0.01 µ g / m L) を伴う試験血清の前保温では、O D 4 5 0 n m 値での用量依存性の減少が生じた。こうした実験では、本発明による G A D_{6.5} 自己抗体 E L I S A に基づく手法の特異性が確認された。

20

30

【0076】

グレーブス病である患者からの n = 14 の血清の場合は、全試料の O D 4 5 0 n m 値が、0.05 を下回り (本発明による E L I S A に基づく手法において < 1 E L I S A 単位 / m L)、これらの全試料は、R I A において、G A D_{6.5} 自己抗体に関して陰性となった (< 1 R I A 単位 / m L)。

【0077】

本発明による E L I S A に基づく手法と R I A とにおける G A D_{6.5} 自己抗体の最低検出限界の比較は、表 2 に表示されている。島細胞自己抗体に関する W H O 基準調製物 [N I B S C 9 7 / 5 5 0] の R I A 希釈では、250 乃至 31.25 W H O 単位 / m L で、検出可能なレベルの G A D_{6.5} 自己抗体が確認された。しかしながら、本発明による E L I S A に基づく手法において、G A D_{6.5} 自己抗体は、250 乃至 3.91 W H O 単位 / m L の W H O 標準希釈のケースにおいて検出可能となった。更に、(高レベルの G A D_{6.5} 自己抗体を伴う患者からの) 血清試料 Z の希釈プロフィールの例が、表 2 に表示されている。R I A の場合、G A D_{6.5} 自己抗体は、試料 Z において、1 / 8 乃至 1 / 8 1 9 2 の希釈の範囲で検出可能となった。本発明による E L I S A に基づく手法の場合、G A D_{6.5} 自己抗体は、1 / 8 乃至 1 / 3 2 7 6 8 の希釈の範囲で検出可能となった。結果として、W H O 標準と患者の血清との終点希釈分析は、本発明による E L I S A に基づく手法において、R I A と比較して四倍乃至八倍高い希釈を検出可能であることを示唆した。

40

【0078】

50

本発明によるELISAに基づく手法でのIA-2自己抗体の測定結果の例は、表3に表示されている。一組のIA-2自己抗体キャリブレーション(0、1.0、2.0、4.0、8.0、16、32、64、128 ELISA単位/mL)に関する代表的なOD450 nm値は、0.054乃至>4.0であり、OD405の値は、0.008乃至1.874である。RIAにおいて、2.0乃至38.9 RIA単位/mLのIA-2自己抗体レベルを有するn=10の一型糖尿病患者からの血清は、本発明によるELISAに基づく手法において、全て陽性となった。これらの試料は、0.209乃至>4.0(2.6乃至>32 ELISA単位/mL)のOD450 nm値を示した。WHO標準は、IA-2自己抗体のRIAにおいて250 WHO単位/mL及び125 WHO単位/mLにおいて検出可能だったが、しかしながら、本発明によるELISAに基づく手法では、更なる

10

【0079】

GAD₆₅自己抗体とIA-2自己抗体とに関する結合アッセイの結果は、表4及び5に表示されている。表4は、IA-2-Bi、又はGAD₆₅-Bi、又はIA-2-BiプラスGAD₆₅-Biがアッセイにおいて使用された時の本発明によるELISAに基づく手法でのGAD₆₅自己抗体とIA-2自己抗体と結合測定の結果を示している。IA-2自己抗体キャリブレーションの場合において、GAD₆₅-Biが使用された時には、本発明によるELISAに基づく手法では信号が検出されなかったが、IA-2-Bi又はIA-2-BiプラスGAD₆₅-Biが使用された時には、OD450 nmの用量依存性の増加が観察された。IA-2-Bi単独でのOD450 nm信号は、基本的にIA-2-BiプラスGAD₆₅-Biでの信号と同じだった。GAD₆₅自己抗体キャリブレーションの場合において、IA-2-Biがアッセイで使用された時には、信号が検出されなかったが、GAD₆₅-Bi及びIA-2-BiプラスGAD₆₅-Biでは、OD450 nmの用量依存性の増加が観察された。GAD₆₅-Bi単独の場合と、IA-2-BiプラスGAD₆₅-BiプラスGAD₆₅-Biの場合とのOD450 nm信号は同等だった。異なる希釈の血清試料Zにおける両方の自己抗体の測定値は、IA-2自己抗体又はGAD₆₅自己抗体の単独での結果と有効な一致を示した。個別の健康な血液ドナーからの血清、或いは健康な

20

30

【0080】

IA-2自己抗体及びGAD₆₅自己抗体の結合測定の更に詳細な結果は、表5に表示されている。このアッセイでは、一型糖尿病の患者からの血清を試験した。IA-2自己抗体及びGAD₆₅自己抗体を、これらの血清においてRIAにより評価し、血清1乃至3は、IA-2自己抗体及びGAD₆₅自己抗体の両方に関して陽性となり、血清4乃至6は、GAD₆₅自己抗体では陰性だが、IA-2自己抗体では陽性となり、血清7乃至9は、GAD₆₅自己抗体では陽性だが、IA-2自己抗体では陰性となり、血清10乃至12は、IA-2又はGAD₆₅自己抗体の両方に関して陰性となった。表5に示すように、結合アッセイにおいては、一方又は他方又は両方の抗体が、血清試料中で検出された。更に、RIAでは境界線のレベル(0.9 RIA単位/mL)のIA-2自己抗体を有した血清6の場合、本発明による結合したELISAに基づく手法での信号は、明らかに陽性だった。

40

【0081】

様々な患者下位集団に関する、本発明によるGAD₆₅自己抗体、IA-2自己抗体、及び結合したGAD₆₅及びIA-2自己抗体とのELISAによる結果の追加的な例は、それぞれ表6、7、及び8に表示されている。

50

【 0 0 8 2 】

結論

上の結果は、本発明による非放射性の手法により、試験試料中のGAD₆₅自己抗体の測定が可能となることを示している。この本発明による非放射性の手法は、IA-2自己抗体を別個又は同時に測定するために利用することもできる。この測定は、特異的であり、確立された放射性の基準方法によるGAD₆₅自己抗体及びIA-2自己抗体測定の結果と一致する(M Powell, L Prentice, T Asawa, R Kato, J Sawicka, H Tanaka, V Petersen, A Munkley, S Morgan, B Rees Smith, J Furmaniak, Clinica Chimica Acta, 1996 256 : 175-188、及びM Masuda, M Powell, S Chen, C Beer, P Fichna, B Rees Smith, J Furmaniak. インスリン依存性糖尿病におけるIA-2に対する自己抗体。新しい免疫沈降アッセイによる測定, Clinica Chimica Acta, 2000 291: 53-66)。更に、本発明による非放射性の手法でのGAD₆₅自己抗体及びIA-2自己抗体の測定は、RIAによる結果と比較して、少なくとも同等の感度を有する(表1、2、及び3)。

10

【 0 0 8 3 】

本発明による手法は、診断及びスクリーニングの目的での使用に都合のよい、GAD₆₅自己抗体又はIA-2自己抗体を高感度で測定する非放射性アッセイを提供する。本発明によるGAD₆₅及びIA-2自己抗体の結合アッセイは、大きな個体群のスクリーニングプログラムでの使用に関して、特に有利となる可能性がある。

表 1

20

¹²⁵I 標識 GAD₆₅に基づく、本発明によるELISAとラジオイムノアッセイ(RIA)とにおける患者血清中のGAD₆₅自己抗体

試料	ELISA ELISA単位/ mL	OD450nm	OD405nm	RIA RIA単位/mL
血清試料 一型DM				
1	10.7	0.980	0.254	<1.0
2	8.1	0.660	0.158	<1.0
3	2.1	0.183	0.024	<1.0
4	1.3	0.117	0.001	<1.0
5	4.4	0.432	0.091	<1.0
6	>128	>4.0	2.100	74.3
7	>128	>4.0	2.283	118.8
8	>128	>4.0	2.155	83.2
9	>128	>4.0	2.230	87.4
10	>128	>4.0	2.023	83.0
11	>128	>4.0	1.774	41.9
12	>128	>4.0	1.554	26.8
13	105.8	3.596	1.060	7.5
14	21.9	1.830	0.485	3.6
15	20.2	1.735	0.466	3.1
16	12.0	1.116	0.290	1.5
17	43.4	2.615	0.732	4.7
18	20.8	1.771	0.473	2.2
血清試料 グレース				
1	<1.0	0.015		<1.0
2	<1.0	0.019		<1.0
3	<1.0	0.049		<1.0
4	<1.0	0.048		<1.0
5	<1.0	0.008		<1.0
6	<1.0	0.031		<1.0
7	<1.0	0.036		<1.0
8	<1.0	0.033		<1.0
9	<1.0	0.029		<1.0
10	<1.0	0.037		<1.0
11	<1.0	0.036		<1.0
12	<1.0	0.042		<1.0
13	<1.0	0.041		<1.0
14	<1.0	0.047		<1.0

10

20

30

40

脚注：1 RIA 単位 / mL を上回る GAD Ab レベルは、RIA によって陽性とみなした。一型 DM = 一型糖尿病。グレース = グレース病。

表 2

ELISA 及び RIA における GAD₆₅ Ab 測定の感度の比較

ELISA及びRIAにおけるGAD₆₅ Ab測定の感度の比較

試料	ELISA ELISA単 位/mL	OD450nm	OD405nm	RIA RIA単位/mL
WHO標準(97 /550)*				
250	>128	>4.0	1.234	6.4
125	45.5	2.670	0.742	3.6
62.5	17.4	1.557	0.422	2.5
31.25	10.0	0.894	0.225	1.1
15.63	4.4	0.431	0.095	<1.0
7.81	2.2	0.202	0.023	<1.0
3.91	1.2	0.100	0.00	<1.0
1.95	<1.0	0.058	0.00	<1.0
0.98	<1.0	0.031	0.00	<1.0
試料Z				
1/8	>128	>4.0	2.048	91
1/32	>128	>4.0	1.868	76
1/128	>128	>4.0	1.769	38
1/512	>128	>4.0	1.591	13
1/1024	90	3.714	1.120	5.6
1/2048	29.4	2.542		3.1
1/4096	12.0	1.375		1.4
1/8192	6.9	0.784		1.0
1/16384	2.8	0.385		<1.0
1/32768	1.6	0.210		<1.0
1/65536	<1.0	0.132		<1.0
1/131072	<1.0	0.092		<1.0
1/262144	<1.0	0.055		<1.0

脚注：1RIA単位/mLを上回るGAD Abレベルは、RIAにおいて陽性とみなした。*WHO単位/mL

表3

¹²⁵I標識IA-2/ICA512に基づく、ELISA及びRIAにおけるIA-2/ICA512自己抗体の測定

10

20

30

40

試料	ELISA ELISA単位 /mL	OD450nm	OD405nm	RIA RIA単位/mL
IA-2 Ab キャリブプレート				
	0	0.054	0.008	
	1	0.114	0.021	
	2	0.183	0.040	
	4	0.313	0.073	
	8	0.614	0.166	
	16	1.219	0.340	
	32	2.506	0.719	
	64	>4	1.371	
	128	>4	1.874	
血清試料—一型 DM				
1	>32	>4	1.420	14.8
2	>32	>4	1.594	38.9
3	11.2	0.859	0.228	2.8
4	>32	>4	2.096	22.7
5	>32	>4	2.348	33.9
6	6.5	0.516	0.140	6.3
7	>32	>4	2.354	15.8
8	4.1	0.265	0.067	2.9
9	2.6	0.209	0.055	2.3
10	8.4	0.664	0.179	2.0
WHO標準(9 7/550)*				
250	18.8	1.503		2.0
125	9.2	0.721		1.2
62.5	4.0	0.337		<1.0
31.25	2.0	0.191		<1.0
15.63	<1.0	0.116		<1.0
7.81	<1.0	0.093		<1.0
個別の健康な血 液ドナー				
1	<1.0	0.030		<1.0
2	<1.0	0.036		<1.0
3	<1.0	0.043		<1.0
4	<1.0	0.045		<1.0
5	<1.0	0.070		<1.0
6	<1.0	0.045		<1.0
7	<1.0	0.063		<1.0
8	<1.0	0.037		<1.0
9	<1.0	0.071		<1.0
10	<1.0	0.069		<1.0

10

20

30

40

脚注：1 RIA 単位 / mL を上回る IA-2 / ICA512 Ab レベルは、RIA に
おいて陽性とみなした。一型 DM = 一型糖尿病。* WHO 単位 / mL

50

表 4

E L I S A における結合 G A D₆₅ A b 及び I A - 2 / I C A 5 1 2 A b 測定

試料 E L I S A 単位 / m L	I A - 2 - B i O D 4 5 0 n m	G A D ₆₅ - B i O D 4 5 0 n m	G A D ₆₅ - B i + I A - 2 - B i O D 4 5 0 n m
I A - 2 A b キヤ リプレート			
8	1. 3 1 4	0. 0 2 2	1. 2 5 2
1 6	2. 7 3 0	0. 0 3 3	2. 5 7 4
3 2	3. 8 8 8	0. 0 3 1	3. 8 2 4
G A D ₆₅ A b キヤ リプレート			
4	0. 0 5 3	0. 4 6 0	0. 4 5 8
1 6	0. 0 4 5	1. 5 1 8	1. 4 0 0
3 2	0. 0 4 3	2. 0 3 3	2. 1 6 0
血清試料 Z			
希釈 1 / 2	3. 0 6 9	> 4	> 4
1 / 4	2. 3 2 8	> 4	> 4
1 / 8	0. 9 0 5	> 4	> 4
1 / 1 6	0. 4 0 1	3. 9 3 6	3. 8 7 5
1 / 3 2	0. 1 9 7	3. 3 7 9	3. 6 2 6
1 / 6 4	0. 1 4 3	2. 2 0 9	2. 5 1 2
1 / 1 2 8	0. 0 6 9	1. 7 1 8	1. 5 7 1
個別の健康な血液ド ナーの血清	0. 0 1 9	0. 0 0 6	0. 0 2 3
健康な血液ドナーの 血清プール	0. 0 2 2	0. 0 1 5	0. 0 4 6

10

20

30

表 5

E L I S A における結合 G A D₆₅ A b 及び I A - 2 / I C A 5 1 2 A b 測定

試料 ELISA単位 /mL	OD450nm	OD405nm	GAD ₆₅ Ab RIA RIA単位/mL	IA-2/ICA512 Ab RIA RIA単位/mL
GAD ₆₅ Ab キャリアプレート				
0	0.080	0.028		
2	0.231	0.070		
8	0.737	0.219		
16	1.476	0.436		
32	2.117	0.613		
64	2.648	0.755		
128	3.607	1.083		
IA-2 Ab キャリアプレート				
0	0.065	0.025		
2	0.205	0.054		
4	0.308	0.081		
8	0.552	0.154		
16	1.116	0.327		
32	2.031	0.590		
64	3.596	1.079		
128	>4	1.777		
血清試料—一型 DM				
1	>4	1.646	10.8	14.8
2	>4	1.964	50.2	39.0
3	1.640	0.481	3.1	2.8
4	>4	1.927	陰性	22.7
5	>4	2.428	陰性	39.9
6	0.298	0.100	陰性	0.9
7	3.594	1.063	26.8	陰性
8	>4	2.092	253.0	陰性
9	1.874	0.554	2.2	陰性
10	0.068	0.040	陰性	陰性
11	0.074	0.029	陰性	陰性
12	0.066	0.021	陰性	陰性
健康な血液ドナー の血清プール	0.073	0.020	陰性	陰性

10

20

30

40

脚注：1 RIA 単位 / mL を上回る GAD₆₅ Ab レベルは、RIA において陽性とみなした。1 RIA 単位 / mL を上回る IA-2 / ICA512 Ab レベルは、RIA において陽性とみなした。一型 DM = 一型糖尿病。

50

表 6

¹²⁵I 標識 GAD₆₅に基づく、ELISA又はラジオイムノアッセイ(RIA)により、様々な患者グループで測定されたGAD₆₅ A b

	ELISA 陽性の数 (%) (5 単位/mL以上=陽性)	RIA 陽性の数 (%) (25 単位/mL以上=陽性)
健康な血液提供者 n=300	2/300 (0.7%) ¹	3/300 (1%) ²
一型DM n=39	39/39 (100%) ³	32/39 (82%) ⁴
二型DM n=62	1/62 (1.6%) ⁵	0/62 (0%)
グレース病 n=88	2/88 (2.3%) ⁶	3/88 (3.4%) ⁷
橋本甲状腺炎 n=11	1/11 (9%) ⁸	0/11
リウマチ様関節炎 n=10	0/10	0/10
全身性エリテマトーデス n=10	1/10 (10%) ⁹	1/10 (10%) ⁹

¹ GAD₆₅ A b ELISAにおいて陽性の試料の値は、11 単位/mL及び>500 単位/mLだった(全ての単位/mLは、WHO97/550)。吸着実験は、特定のGAD₆₅ A bの存在を示唆した。同じ試料は、RIAにおいて、それぞれ陰性及び2500 単位/mLとなった。

【0084】

² GAD₆₅ A b RIAにおいて陽性の試料の値は、33、100及び2500 単位/mLだった。同じ試料は、ELISAにおいて、それぞれ陰性、陰性、及び>500 単位/mLとなった。

【0085】

³ 値の範囲：5.2乃至500を上回る単位/mL

⁴ 値の範囲：陰性乃至3800 単位/mL

⁵ GAD₆₅ A b ELISAにおいて陽性の試料の値は、40 単位/mLだった。同じ試料は、RIAにおいて、陰性となった。

【0086】

⁶ GAD₆₅ A b ELISAにおいて陽性の試料の値は、306及び500 単位/mLだった。同じ試料は、RIAにおいて、それぞれ354 単位/mL及び1700 単位/mLとなった。

【0087】

⁷ GAD₆₅ A b RIAにおいて陽性の試料の値は、78、354及び1700 単位/mLだった。同じ試料は、ELISAにおいて、それぞれ陰性、306、及び500 単位/mLとなった。

【0088】

10

20

30

40

50

⁸ GAD₆₅ Ab ELISAにおいて陽性の試料の値は、24単位/mLで、この試料はRIAにおいて陰性となった。

【0089】

⁹ 同じ試料が、GAD₆₅ Ab ELISA及びRIAにおいて、それぞれ15単位/mL及び30単位/mLで陽性となった。

表7

¹²⁵ I 標識 IA-2 / ICA512に基づく、ELISA又はラジオイムノアッセイ (RIA) により、様々な患者グループで測定された IA-2 Ab

	ELISA 陽性の数 (%) (30単位/mL以上=陽性)	RIA 陽性の数 (%) (125単位/mL以上=陽性)
健康な血液提供者 n=210	2/210 (1%) ¹	2/210 (1%) ²
一型DM n=30	12/30 (40%) ³	12/30 (40%) ⁴
二型DM n=62	1/62 (1.6%) ⁵	0/62
グレース病 n=102	0/102	0/102
リウマチ様関節炎 n=10	0/10	0/10
全身性エリテマトーデス n=10	0/10	0/10

¹ IA-2 Ab ELISAにおいて陽性の試料の値は、44単位/mL及び179単位/mLだった (単位/mLは、WHO97/550)。吸着実験は、これらの試料において特定の IA-2 Ab の存在を示唆した。同じ試料は、RIAにおいて陰性となった。

【0090】

² RIAでの IA-2 Ab 陽性試料の値は、150単位/mL及び288単位/mLだった。同じ試料は、ELISAにおいて陰性となった。

【0091】

³ 値の範囲：132乃至>4000単位/mL

⁴ 値の範囲：178乃至4508単位/mL

⁵ IA-2 Ab 陽性試料の値は、101単位/mLだった。同じ試料は、RIAにおいて陰性となった。

表8

様々な患者グループにおける GAD₆₅ Ab ELISA、IA-2 Ab ELISA、及び結合 GAD₆₅ Ab + IA-2 Ab ELISAの結果

10

20

30

40

	陽性の数 (%)		
	GAD ₆₅ Ab ELISA	IA-2 Ab ELISA	GAD ₆₅ Ab + IA-2 Ab ELISA
一型DM n=35	28/35 ¹ (80%)	14/35 ² (40%)	33/35 ³ (94.3%)
二型DM n=44	1/44 ⁴ (2.3%)	1/44 ⁵ (2.3%)	2/44 ⁶ (4.5%)
健康な血液提供者 n=73	2/73 ⁷ (2.7%)	0/73 (0%)	2/73 ⁸ (2.7%)
グレーブス病 n=20	0/20 (0%)	0/20 (0%)	0/20 (0%)
リウマチ様関節炎 n=10	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)
全身性エリテマトーデス n=10	1/10 ⁹ (10%)	0/10 (0%)	1/10 ¹⁰ (10%)

10

20

¹ ELISAにおいて陽性の試料のGAD₆₅ Abの値は、7.3乃至>500単位/mLの範囲となった(単位/mLは、WHO97/550)。

【0092】

² ELISAにおいて陽性の試料のIA-2 Abの値は、34乃至3613単位/mLの範囲となった(単位/mLは、WHO97/550)。

【0093】

³ 全ての結合ELISAの結果は、次のように計算された指数として表現した：

30

$\frac{\text{試料のOD}_{450nm}}{\text{健康な血液提供者のプール血清のOD}_{450nm}}$

2.0以上の値は陽性である。

【0094】

18血清は、GAD₆₅ Abに関して陽性で、IA-2 Abに関して陰性であり、18件全てが結合ELISAにおいて陽性となった。

【0095】

4血清は、IA-2 Abに関して陽性で、GAD₆₅ Abに関して陰性で、4件全てが結合ELISAにおいて陽性となった。

40

【0096】

10血清は、GAD₆₅ Ab及びIA-2 Abに関して陽性であり、10件全てが結合ELISAにおいて陽性となった。

【0097】

1血清は、GAD₆₅ Ab及びIA-2 Abに関して陰性だったが、結合ELISAにおいて陽性となった。

【0098】

2血清は、三種類全てのアッセイで陰性となった。

【0099】

⁴ この一陽性試料では、GAD₆₅ Abレベルが10単位/mLとなり、IA-2

50

A b は陰性となった。

【 0 1 0 0 】

⁵ この一陽性試料では、G A D₆₅ A b が陰性となり、I A - 2 A b レベルは 7 6 単位 / m L となった。

【 0 1 0 1 】

⁶ 陽性試料は、4 及び 5 において説明したものと同じになった（指数値は、それぞれ 7 . 8 及び 4 . 8 ）。

【 0 1 0 2 】

様々な患者グループにおける G A D₆₅ A b E L I S A、I A - 2 A b E L I S A、及び結合 G A D₆₅ A b + I A - 2 A b E L I S A の結果

⁷ この二つの陽性試料では、G A D₆₅ A b レベルは 9 及び > 5 0 0 単位 / m L となったが、I A - 2 A b は陰性となった。

【 0 1 0 3 】

⁸ 陽性試料は、7 において説明したものと同じになった。これらの試料の指数値は、それぞれ 3 . 6 及び 5 5 . 0 となった。

【 0 1 0 4 】

⁹ G A D₆₅ A b レベルは 1 5 単位 / m L となったが、I A - 2 A b は陰性となった。

【 0 1 0 5 】

¹⁰ 陽性試料は、9 において説明したものと同じになった。指数値は、6 . 0 となった

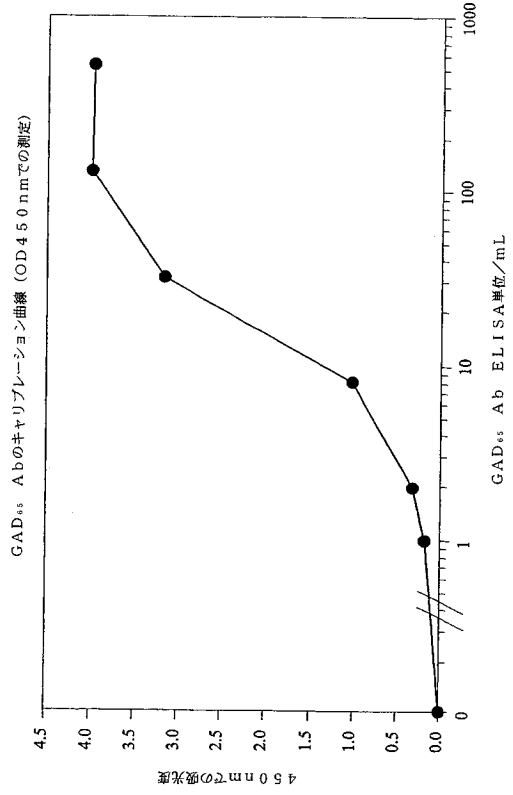
【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 0 6 】

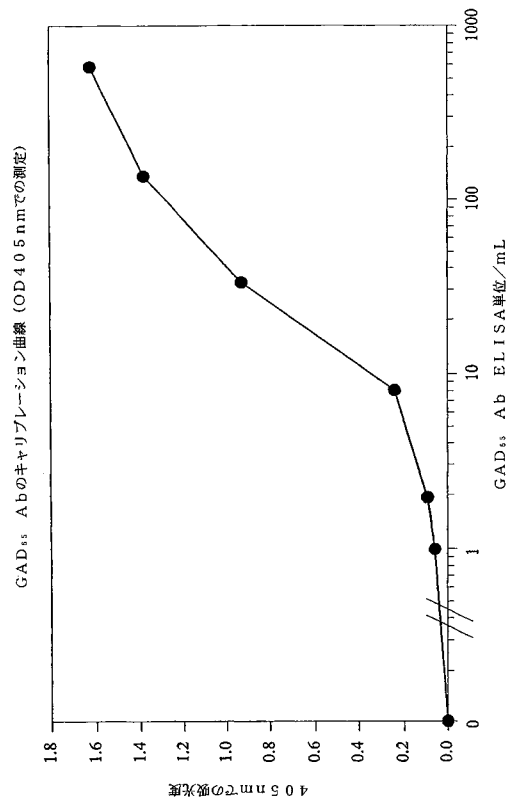
【 図 1 a 】 図 1 a は、O D 4 5 0 n m で得られた G A D₆₅ の代表的なキャリブレーション曲線を示す。

【 図 1 b 】 図 1 b は、測定可能となった O D 4 0 5 n m のキャリブレーション曲線を示す。

【図 1 a】



【図 1 b】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internat. application No PCT/GB 02/05285										
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/564 G01N33/543												
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) IPC 7 G01N												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched												
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, PAJ, WPI Data, BIOSIS, EMBASE												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
Y	EP 0 902 286 A (ORTHO CLINICAL DIAGNOSTICS) 17 March 1999 (1999-03-17) figures 1,2 ---	1-55										
Y	WO 88 09933 A (WALKER LAB LTD) 15 December 1988 (1988-12-15) claims ---	1-55										
Y	EP 0 569 800 A (MILES INC) 18 November 1993 (1993-11-18) column 9, line 43 -column 11, line 31 --- -/--	1-55										
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.												
* Special categories of cited documents : <table border="0"> <tr> <td>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>*E* earlier document but published on or after the international filing date</td> <td>*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</td> </tr> <tr> <td>*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)</td> <td>*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.</td> </tr> <tr> <td>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>*G* document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	*E* earlier document but 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	*G* document member of the same patent family	*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention											
E earlier document but 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	*G* 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 17 July 2003	Date of mailing of the international search report 01/08/2003											
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Vadot-Van Geldre, E											

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/GB 02/05285
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WOLK M ET AL: "Association between high concentration of antibodies to insulin and some diseases common in the elderly." GERONTOLOGY, vol. 39, no. 6, 1993, pages 334-337, XP008019671 ISSN: 0304-324X abstract -----	1-55

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB 02/05285

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 1-25, 52-54 are directed to a diagnostic method/method of treatment practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependant 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.

International Application No. PCT/GB 02 05285

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

In view of the large number and also the wording of the claims presently on file, which render it difficult, if not impossible, to determine the matter for which protection is sought, the present application fails to comply with the clarity and conciseness requirements of Article 6 PCT (see also Rule 6.1(a) PCT) to such an extent that a meaningful search is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the application which do appear to be clear (and concise), namely the examples.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: application No

PCT/GB 02/05285

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0902286 A	17-03-1999	US 6121006 A	19-09-2000
		CA 2246896 A1	11-03-1999
		EP 0902286 A2	17-03-1999
		JP 11148936 A	02-06-1999
WO 8809933 A	15-12-1988	AT 80740 T	15-10-1992
		DE 3874741 D1	22-10-1992
		DE 3874741 T2	22-07-1993
		EP 0366673 A1	09-05-1990
		WO 8809933 A1	15-12-1988
		JP 2503951 T	15-11-1990
EP 0569800 A	18-11-1993	US 5200318 A	06-04-1993
		AU 3854393 A	18-11-1993
		CA 2095278 A1	14-11-1993
		EP 0569800 A1	18-11-1993
		JP 6034629 A	10-02-1994

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 37/02	
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	F
G 0 1 N 33/573	G 0 1 N 33/573	A

(81) 指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72) 発明者 スミス,バーナード,リース
イギリス国 カーディフ シーエフ3 6 エックスディー,オールド セント メロンズ ストリート,ドルードストン ロード,リッチモンド ハウス

(72) 発明者 ファーマニアク,ジャドウィガ
イギリス国 カーディフ シーエフ4 9 エイチエックス,ソーンヒル,ハンターズ グリーン,ヘブンウッド ドライブ 3 5

(72) 発明者 パウエル,マイケル
イギリス国 カーディフ シーエフ5 1 ディーエヌ,カントン,ペンシズリー ロード 1 4 1

Fターム(参考) 4C084 AA17 NA14 ZB072 ZC062 ZC082 ZC352

专利名称(译)	检测胰岛细胞抗原分子和/或与胰岛素反应的自身抗体		
公开(公告)号	JP2005512056A	公开(公告)日	2005-04-28
申请号	JP2003549916	申请日	2002-11-26
[标]申请(专利权)人(译)	R S R有限公司		
申请(专利权)人(译)	伯爵S.厄尔有限公司		
[标]发明人	スミスバーナードリース ファーマニアックジャドウィガ パウエルマイケル		
发明人	スミス,バーナード,リース ファーマニアック,ジャドウィガ パウエル,マイケル		
IPC分类号	A61K45/00 A61P3/10 A61P5/14 A61P5/38 A61P37/02 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/564 G01N33/573		
CPC分类号	A61P3/10 A61P5/14 A61P5/38 A61P37/02 C12Y301/01048 C12Y301/03048 C12Y401/01015 G01N33/54306 G01N33/564 G01N33/538 G01N33/543 G01N33/573 G01N2333/916 G01N2333/988 G01N2496/00 G01N2800/042		
FI分类号	G01N33/564.Z A61K45/00 A61P3/10 A61P5/14 A61P5/38 A61P37/02 G01N33/53.F G01N33/573.A		
F-TERM分类号	4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZB072 4C084/ZC062 4C084/ZC082 4C084/ZC352		
代理人(译)	宇野健一		
优先权	2001028583 2001-11-28 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

关于与选自胰岛细胞抗原分子和胰岛素的一种或多种抗原分子或其一种或多种突变体,类似物,衍生物或片段反应的样品的自身抗体,从动物受试者获得的体液样品以及用于这种方法的套件。

試料	ELISA ELISA単位/ mL	OD450nm	OD405nm	RIA RIA単位/mL
血清試料 一型DM				
1	10.7	0.980	0.254	<1.0
2	3.1	0.680	0.158	<1.0
3	2.1	0.183	0.024	<1.0
4	1.3	0.117	0.001	<1.0
5	4.4	0.432	0.091	<1.0
6	>128	>4.0	2.100	74.3
7	>128	>4.0	2.283	118.8
8	>128	>4.0	2.155	83.2
9	>128	>4.0	2.230	87.4
10	>128	>4.0	2.023	83.0
11	>128	>4.0	1.774	41.9
12	>128	>4.0	1.554	26.8
13	105.8	3.596	1.060	7.5
14	21.9	1.830	0.485	3.6
15	20.2	1.735	0.466	3.1
16	12.0	1.116	0.299	1.5
17	43.4	2.615	0.732	4.7
18	20.8	1.771	0.473	2.2
血清試料 グレープス				
1	<1.0	0.015		<1.0
2	<1.0	0.019		<1.0
3	<1.0	0.049		<1.0
4	<1.0	0.048		<1.0
5	<1.0	0.008		<1.0
6	<1.0	0.031		<1.0
7	<1.0	0.036		<1.0
8	<1.0	0.033		<1.0
9	<1.0	0.029		<1.0
10	<1.0	0.037		<1.0
11	<1.0	0.036		<1.0
12	<1.0	0.042		<1.0
13	<1.0	0.041		<1.0
14	<1.0	0.047		<1.0