

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-544971

(P2009-544971A)

(43) 公表日 平成21年12月17日(2009.12.17)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N	33/53	N
GO 1 N 33/543	(2006.01)	GO 1 N	33/543	5 4 5 A
		GO 1 N	33/543	Z N A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2009-521844 (P2009-521844)	(71) 出願人	509024123 イノヴァ ダイアグノスティクス インコーポレイテッド アメリカ合衆国 92131 カリフォルニア州 サンディエゴ オールド グローブ ロード 9900
(86) (22) 出願日	平成19年7月26日 (2007.7.26)	(74) 代理人	100083806 弁理士 三好 秀和
(85) 翻訳文提出日	平成21年3月19日 (2009.3.19)	(74) 代理人	100095500 弁理士 伊藤 正和
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/016853	(74) 代理人	100111235 弁理士 原 裕子
(87) 国際公開番号	W02008/013914		
(87) 国際公開日	平成20年1月31日 (2008.1.31)		
(31) 優先権主張番号	60/833,757		
(32) 優先日	平成18年7月26日 (2006.7.26)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/918,225		
(32) 優先日	平成19年3月14日 (2007.3.14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 急性アテローム硬化症候群を有する患者を診断するための組成物および方法

(57) 【要約】

本発明は、自己免疫の分野に属する。より詳細には、本発明は、アテローム性動脈硬化症の指標としてのベータ2 - グリコプロテイン I (β_2 - G P I) のドメイン 4 に対する自己抗体の検出に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者の急性アテローム硬化症候群を診断する方法であって、前記患者で I g A ドメイン 4 特異的抗ベータ 2 - グリコプロテイン I (β_2 - G P I) 抗体の存在または不在を決定するステップを含み、前記 I g A 抗 β_2 - G P I 抗体の存在によって、前記患者が急性アテローム硬化症候群であることが示される方法。

【請求項 2】

患者の急性アテローム硬化症候群を診断する方法であって、

- a . 急性アテローム硬化症候群である疑いがある患者から試料を取得するステップと、
- b . 前記試料を、ドメイン 4 エピトープを含む β_2 - G P I 抗原と接触させるステップ

10

と、

c . 前記ドメイン 4 エピトープに結合する I g A ドメイン 4 特異的抗 β_2 - G P I 抗体の存在または不在を検出するステップと

を含み、前記試料中の前記 I g A ドメイン 4 特異的抗 β_2 - G P I 抗体の存在によって、前記患者が急性アテローム硬化症候群であることが示される方法。

【請求項 3】

患者の急性アテローム硬化症候群を診断する方法であって、

a . 急性アテローム硬化症候群である疑いがある患者由来の試料を、リンカー配列を含まない配列番号 5 のアミノ酸配列を含む β_2 - G P I 抗原のドメイン 4 に由来するエピトープと、前記エピトープおよび I g A ドメイン 4 特異的抗 β_2 - G P I 抗体の複合体を形成

20

b . 前記複体内の前記 I g A ドメイン 4 特異的抗 β_2 - G P I 抗体の存在または不在を検出し、前記患者における前記ドメイン 4 特異的 I g A 抗 β_2 - G P I 抗体の存在によって、前記患者が急性アテローム硬化症候群であることが示されるステップと、

を含む方法。

【請求項 4】

前記 I g A 抗 β_2 - G P I 抗体が酵素結合免疫吸着アッセイで検出される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記患者における抗カルジオリピン (a C L) 抗体の存在または不在を決定するステップをさらに含み、前記患者における前記ドメイン 4 特異的 I g A 抗 β_2 - G P I 抗体の存在、および抗カルジオリピン (a C L) 抗体の不在によって、前記患者が急性アテローム硬化症候群であることが示される、請求項 2 に記載の方法。

30

【請求項 6】

前記 I g A ドメイン 4 特異的抗 β_2 - G P I 抗体および a C L 抗体が独立した酵素結合免疫吸着アッセイで検出される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記ドメイン 4 エピトープが、配列番号 4 のドメイン 3 アミノ酸配列と、配列番号 3 のドメイン 2 アミノ酸配列、または配列番号 4 のドメイン 3 アミノ酸配列に隣接した配列番号 3 のドメイン 2 アミノ酸配列の部分とをさらに含む、請求項 3 に記載の方法。

40

【請求項 8】

前記ドメイン 4 エピトープが、配列番号 6 のドメイン 5 アミノ酸配列、または配列番号 5 のドメイン 4 アミノ酸配列に隣接した配列番号 6 のドメイン 5 アミノ酸配列の部分とをさらに含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記 I g A ドメイン 4 特異的抗ベータ 2 - グリコプロテイン I (β_2 - G P I) 抗体を、存在する場合には、配列番号 5 のアミノ酸配列を有するポリペプチドと反応させるステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記 I g A ドメイン 4 特異的抗ベータ 2 - グリコプロテイン I (β_2 - G P I) 抗体を

50

、存在する場合には、配列番号 5 + 配列番号 6 のアミノ酸配列を有するポリペプチドと反応させるステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 1】

前記 2 - GPI 抗原がドメイン 1 のいかなる部分も含まない、請求項 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、自己免疫の分野に属する。より詳細には、本発明は、アテローム性動脈硬化症の指標としてのベータ 2 - グリコプロテイン I (2 - GPI) のドメイン 4 に対する自己抗体の検出に関する。

10

【背景技術】

【0002】

最近、急性心筋梗塞の患者および虚血性脳卒中の患者においても、ベータ 2 - グリコプロテイン I (2 - GPI) に対する Ig A クラスの自己抗体が報告されている (Ranzolin A ら、Arg Bras . Cardiol . 83 (2) : 141 ~ 4 ; 137 ~ 40 (2004 年) ; Kahles T ら、Rheumatology 44 (9) : 1161 ~ 5 (2005 年) ; Staub HL ら、Arg Neuropsychiat 61 (3B) : 757 ~ 63 (2003 年)) 。これらの研究のうちの 2 つからもたらされた衝撃的な観察は、Ig A 2 - GPI 自己抗体が、通常、Ig A 抗カルジオリピン抗体 (ACA) に関して陰性であった患者で検出されたことであった (Ranzolin A ら、Arg Bras . Cardiol . 83 (2) : 141 ~ 4 ; 137 ~ 40 (2004 年) ; Staub HL、Arg Neuropsychiat 61 (3B) : 757 ~ 63 (2003 年)) 。この知見は、APS の患者では、通常、抗 2 - GPI 抗体と抗カルジオリピン抗体との両方が陽性である点で、抗リン脂質症候群 (APS) の患者の観察結果と際立った対照にある。

20

【0003】

2 - GPI は、N 末端から 1 ~ 5 に付番された 5 つの相同性ドメインで構成された血清タンパク質である。ドメイン 1 ~ 4 は、2 本の内部ジスルフィド架橋を形成する、4 つの保存されたシステイン残基のフレームワークを特徴とするモチーフを含む約 60 アミノ酸で構成されている (Lozier , J . ら、PNAS 81 : 3640 ~ 3644 (1984 年)) 。第 5 のドメインは、6 つのシステインを有する 82 アミノ酸残基を含む点でドメイン 1 ~ 4 と異なっている。第 5 のドメインは、リン脂質結合部位を含んでいる (Hunt , J . ら、PNAS 90 : 2141 ~ 2145 (1993 年)) 。

30

【0004】

抗 2 - GPI 自己抗体のドメイン特異性に関して、相反する知見が公表されている。例えば、ある研究では、昆虫細胞内で発現された組換え 2 - GPI および 2 - GPI ドメイン欠失変異体 (Dm) を用いて、APS 患者由来の血清試料中に見出された抗 2 - GPI 自己抗体が、2 - GPI のドメイン 1 を認識することが示された (Iverson , GM ら、PNAS 95 : 15542 ~ 15546 (1998 年)) 。

40

【0005】

APS 患者における Ig G 抗 2 - GPI 自己抗体が 2 - GPI のドメイン 3、4、および 5 にあるエピトープを認識するという報告もある (Blank , M ら、PNAS 96 : 5164 ~ 8 (1999 年) ; Blank , M ら、PNAS 96 : 5164 ~ 8 (1999 年) ; Koike T ら、J . Autoimmun 15 : 97 ~ 100 (2000 年) ; Yang CD ら、APLAR J . Rheumatol 1 : 96 ~ 100 (1997 年) ; Iverson , GM ら、J . of Autoimmunity 18 : 289 ~ 297 (2002 年) ; および McNeelley PA ら、Thromb Haemost 86 : 590 ~ 5 (2001 年)) 。

【発明の概要】

50

【発明が解決しようとする課題】**【0006】**

したがって、APS患者が示す抗体プロフィール（カルジオリピンIgG陽性/₂- GPI IgG / IgA陽性）に関する理解、およびAPS患者および心臓血管疾患の患者の抗体の異なったドメイン特異性に基づいた、これらのプロフィールと、急性虚血性疾患を有する心臓血管疾患の患者が示すプロフィール（カルジオリピンIgG / IgA陰性 / ₂- GPI IgA陽性）との相違に関する理解を向上させる必要性がある。本発明は、このような理解の向上を提供するものであり、ドメイン4に結合するIgA抗₂- GPI自己抗体が、APS患者および様々な心臓血管疾患の患者で高い割合で見出されるという知見に関する。

10

【課題を解決するための手段】**【0007】**

本発明は、部分的に、急性アテローム硬化症候群（ASS）の疑いがある患者を診断する方法であって、₂- GPIのドメイン4に由来するエピトープを有するポリペプチドを含む抗原を調製するステップと、上記抗原を上記患者由来の生物試料と反応させるステップと、上記試料中の、上記抗原に結合しているIgA抗体を検出するステップとを含む方法に関する。

【発明の効果】**【0008】**

本発明による抗原は、ドメイン4全体またはドメイン4の抗原性断片からなるものでもよく、および/もしくはドメイン2、3、および5の配列のすべてまたは一部を含むものでもよい。したがって、「ドメイン4に由来するエピトープ」という語句は、他の4つのドメインと比較した場合、ドメイン4に優先的に結合するという点において、ドメイン4に選択的な抗体によって上記エピトープが認識されることを意図する。したがって、上記エピトープは、ドメイン4（もしくはその断片）単独、またはドメイン2、3および4；2、3、4および5；3および4；4および5；3、4および5の組合せからなるポリペプチド、ならびに/もしくはこれらの断片でありうる。

20

【0009】

下記に示す通り、ドメイン4配列は56アミノ酸からなる。ドメイン4由来の連続したアミノ酸の最小数がおよそ6であることを考慮すると、ポリグリシンおよび他の小さな非極性アミノ酸などの非干渉性連結領域によって分離された反復単位を有する、上記ドメイン4エピトープの多量体（二量体、三量体など）である抗原を構築することも可能である。このような連結領域は、上記エピトープの、天然に存在する隣接配列を含んでもよく、または含まなくてもよい。

30

【0010】

一実施形態によれば、本発明は、患者の急性アテローム硬化症候群を診断する方法であって、前記患者においてIgAドメイン4特異的抗β₂-グリコプロテインI（₂- GPI）抗体の存在または不在を決定するステップを含み、上記IgA抗₂- GPI抗体の存在によって、前記患者が急性アテローム硬化症候群であることが示される方法である。

40

【0011】

他の一実施形態では、本発明は、患者の急性アテローム硬化症候群を診断する方法であって、a. 急性アテローム硬化症候群を有する疑いがある患者から試料を取得するステップと、b. 上記試料を、ドメイン4エピトープを含む₂- GPI抗原と接触させるステップと、c. 上記ドメイン4エピトープに結合するIgAドメイン4特異的抗₂- GPI抗体の存在または不在を検出するステップ、とを含み、前記試料中の前記IgAドメイン4特異的抗₂- GPI抗体の存在によって、前記患者が急性アテローム硬化症候群であることが示される方法である。

【0012】

さらに別の実施形態では、本発明は、患者の急性アテローム硬化症候群を診断する方法

50

であって、a. 急性アテローム硬化症候群を有する疑いがある患者からの試料を、リンカー配列を含まない配列番号5のアミノ酸配列を含む₂-GP I抗原のドメイン4に由来するエピトープと、上記エピトープおよびIg Aドメイン4特異的抗₂-GP I抗体の複合体を形成するのに適した条件下で接触させるステップと、b. 上記複合体内のIg Aドメイン4特異的抗₂-GP I抗体の存在または不在を検出するステップとを含み、前記患者における前記ドメイン4特異的Ig A抗₂-GP I抗体の存在によって、前記患者が急性アテローム硬化症候群であることが示される方法である。

【0013】

上記Ig A抗₂-GP I抗体を検出する方法は、標識された抗Ig A抗体などを用いた、酵素結合免疫吸着アッセイ等の種々の既知のアッセイフォーマットなどの、任意の既知の方法によるものでありうる。

10

【0014】

一実施形態では、上記方法は、前記患者における抗カルジオリピン(aCL)抗体の存在または不在を決定するステップをさらに含み、前記患者における前記ドメイン4特異的Ig A抗₂-GP I抗体の存在、および抗カルジオリピン(aCL)抗体の不在によって、前記患者が急性アテローム硬化症候群であることが示される。

【0015】

上記ドメイン4エピトープは、ドメインの様々な異なった組合せおよびこれらの断片の形態で存在しうる。例えば、上記ドメイン4エピトープは、ドメイン5に隣接した既知のドメイン4断片抗原性配列からなるものでよい(Kasahara)。上記ドメイン4エピトープは、ドメイン3のすべてまたは部分を備えた完全なドメイン4+5配列の形態にあるものでもよく、ドメイン2のすべてまたは部分を備えた完全なドメイン3、4、および5配列の形態にあるものでもよく、もしくはドメイン4および5の隣接した断片の形態にはあるものでもよく、以下同様である。しかしながら、好ましい実施形態では、ドメイン1が完全に欠失している。

20

【0016】

本発明の他の態様は、本明細書全体を通して記載されている。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】組換え₂-GP IおよびDmによる、₂-GP Iに結合したAPS試料6635の競合阻害を示す図である。₂-GP Iでコーティングされたウェル中で、一定量の抗体を様々な濃度の阻害剤と混合した。組換え₂-GP IおよびDMを阻害剤として用いた。上側パネルは、Ig G抗体の阻害を測定したものである。下側パネルは、Ig A抗体の阻害を測定したものである。

30

【図2】組換え₂-GP Iおよび欠失変異体による、₂-GP Iに結合したACS-71由来のIg A抗₂-GP Iの競合阻害を示す図である。₂-GP Iでコーティングされたウェル中で、一定量の抗体を様々な濃度の阻害剤と混合した。組換え₂-GP Iおよび欠失変異体を阻害剤として用いた。

【図3】₂-GP Iの全配列および三次構造を示す図である。

【発明を実施するための形態】

40

【0018】

以下に続く説明において、分子生物学、免疫学、および医学分野で使用される多数の用語が広範に使用される。このような用語に与えられている範囲を含めた、本明細書および特許請求の範囲の、より明確で、かつ一貫した理解を与えるために、以下の非限定的な定義を示す。

【0019】

本開示で、「1つ(one、a、またはan)」という用語が使用される場合、別段の指示がない限り、これらは、「少なくとも1つ」または「1つまたは複数」を意味する。

【0020】

「抗体」という用語は、エピトープまたは抗原決定基に結合できる分子を指す。用語「

50

抗体」には、抗体全体、および一本鎖抗体を含めたこれらの抗原結合性断片が含まれる。このような抗体には、F a b、F a b' および F (a b')₂、F d、単鎖 F v (s c F v)、一本鎖抗体、ジスルフィド結合 F v (s d F v)、および V_L ドメインまたは V_H ドメインのいずれかを含む断片を含めた、ヒト抗原結合性抗体および抗体断片が含まれるが、これらに限定されない。上記抗体は、トリ、ならびに例えば、ヒト、マウス、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、およびウマなどの哺乳動物を含めた任意の動物源に由来するものでよい。

【 0 0 2 1 】

用語「抗原」は、抗体、または M H C 分子によって提示されている場合には T 細胞受容体 (T C R) が結合できる分子を指す。抗原は、さらに、免疫系によって認識されることが可能であり、ならびに / もしくは体液性免疫応答、および / または B および / または T リンパ球の活性化をもたらす細胞性免疫応答を誘導することが可能でありうる。抗原は、1 つまたは複数のエピトープ (B および T エピトープ) を有しうる。本明細書で使用される場合、抗原は、いくつかの個々の抗原の混合物でもありうる。

10

【 0 0 2 2 】

用語「抗原決定基」は、B または T リンパ球のいずれかによって特異的に認識される抗原の一部を指す。抗原決定基またはエピトープは、抗体または M H C 関連においては T 細胞受容体によって認識される、抗原の部分である。抗原決定基は、1 つまたは複数のエピトープを含む。

【 0 0 2 3 】

用語「自己抗原」は、自己抗体に結合するか、または細胞反応を誘導する、自己の構成成分を指す。

20

【 0 0 2 4 】

用語「自己抗体」は、自己タンパク質、糖質または核酸に対して産生された、免疫グロブリン、抗原特異的 B 細胞表面受容体 (表面免疫グロブリン) または抗原特異的 T 細胞受容体を指す。

【 0 0 2 5 】

用語「エピトープ」は、免疫系、より詳細には抗体 (例えば自己抗体)、B 細胞、または T 細胞によって認識される抗原の一部分を指し、したがって、抗体、B 細胞、または T 細胞が結合する特定のドメイン、領域、または分子構造を指す。抗原は、多数のエピトープからなる可能性があり、ハプテンは、通常、少数のエピトープを保持している可能性がある。

30

【 0 0 2 6 】

用語「野生型」は、天然に存在する供給源から単離された遺伝子または遺伝子産物を指す。野生型遺伝子は、ある集団で最も高頻度で観察される遺伝子であり、それゆえ、随意に、「正常」または「野生型」形態の遺伝子または遺伝子産物と呼ばれる。対照的に、用語「改変」または「変異体」は、野生型の遺伝子または遺伝子産物と比較した際に、配列および / または機能的特性の改変 (すなわち、変化した特徴、例えば低メチル化) を示す遺伝子または遺伝子産物を指す。天然に存在する変異体は単離されることが知られている。これらは、物理的および生物学的特性などの特徴が、野生型遺伝子または遺伝子産物と比較して変化しているという事実によって同定される。

40

【 0 0 2 7 】

用語「天然タンパク質」は、天然に存在する状態のタンパク質で見出されるアミノ酸のみを含むタンパク質を指す。天然タンパク質は、組換え手段によって産生されたものでも、天然に存在する供給源から単離されたものでもよい。

【 0 0 2 8 】

用語「断片」は、天然に存在するアミノ酸、天然には存在しないアミノ酸、または化学的に修飾されたアミノ酸を含むペプチド、ポリペプチド、または化合物を意味する。断片のサイズは、2 アミノ酸残基から、全アミノ酸配列から 1 アミノ酸を引いたものまでの範囲でありうる。

50

【0029】

用語「患者」は、トリ、ヒツジ、ウシ、反芻動物、ウサギ、ブタ、ウマ、イヌ、ネコ、齧歯動物、または、例えばヒトを含めた霊長類などの動物を指すが、これらに限定されない。通常、「患者 (s u b j e c t) 」および「患者 (p a t i e n t) 」という用語は、本明細書において、哺乳動物患者、特にヒト患者に関して同義的に使用される。

【0030】

用語「試料」は、最も広い意味で使用される。ある意味では、用語「試料」は、生物試料および環境試料に加えて、任意の供給源から得られた標本または培養物を含むことが意図されている。生物試料は、動物（ヒトを含む）から得られたものであり得、および骨髓、血液、血清、血小板、血漿、間質液、尿、脳脊髄液、核酸、DNA、組織、およびそれらの精製または濾過された形態を含むがこれらに限定されない、上記動物の体内で見出される生体物質または組成物を指す。

10

【0031】

用語「血清試料」は、血清を含む生物試料を指す。本発明の方法で使用するための血清試料は、他の成分、とりわけ血液成分を含んでもよいと理解されている。したがって、本発明の目的においては、全血試料、または部分的に分画または分離されているが依然として血清を含む血液試料も「血清試料」と考えられる。当業者ならば、例えば、従来の採血技法を用いることによって、容易に血清試料を取得できる。さらに、血清試料中の保存剤、抗凝血物質、または他の化学物質の存在は、IgA₂-GPI抗体の検出を妨害しないものであるべきである。

20

【0032】

用語「対照」または「対照試料」は、少なくとも1人の健康な献血者から採取された血清試料などの、1つまたは複数の試料を指す。対照が複数の試料を含む場合、IgA₂-GPI特異抗体レベルは、各試料で測定されたIgA₂-GPI特異抗体レベルの算術平均、中央値、最頻数、または他の適した統計的尺度で表すことができると理解されている。複数の対照試料をプールすることもでき、プールされた試料のIgA₂-GPI特異抗体レベルを測定し、患者の試料と比較することができる。

【0033】

本明細書で使用される場合、アテローム性動脈硬化症（動脈硬化症、アテローム性血管疾患、動脈閉塞性疾患とも呼ばれる）は、血管壁表面の粥腫（p l a q u e）蓄積および血管の炎症を特徴とする心臓血管疾患を指す。粥腫は、蓄積された細胞内および細胞外脂質、平滑筋細胞、結合組織、炎症細胞、およびグリコサミノグリカンからなる。炎症は、血管壁表面の脂質蓄積と併せて起こり、血管の炎症は、アテローム性動脈硬化疾患の過程の特徴を伴う。

30

【0034】

用語「急性アテローム硬化症候群」または「ASS」は、急性心筋梗塞、急性冠動脈症候群、「頸動脈試験」、および末梢動脈疾患を含めた、いくつかのタイプの心血管障害を指すが、これらに限定されない。

【0035】

IgA₂-GPIは、N末端から1～5に付番された5つの相同性ドメインで構成された血清タンパク質である。一次配列および予測されている三次配列を図3に示す。ドメイン1～4は、2本の内部ジスルフィド架橋を形成する4つの保存されたシステイン残基のフレームワークを特徴とするモチーフを含む、約60アミノ酸で構成されている。ドメイン5は、6つのシステインを有する82アミノ酸残基を含む点で、ドメイン1～4と異なっている。ドメイン5は、リン脂質結合部位を含む。

40

【0036】

N末端で始まり、ドメイン1をドメイン2に連結する短い配列（下線部）で終わる、図3に示すドメイン1のアミノ酸配列（配列番号2）は次の通りである。

G R T C P K P D D L P F S T V V P L K T F Y E P G E E I T Y S C K P G Y V S R G
G M R K F I C P L T G L W P I N T L K C T P R V

50

【0037】

ドメイン1をドメイン2に連結する短い配列（下線部）のN末端に始まり、ドメイン2をドメイン3に連結する短い配列（下線部）で終わる、図3に示すドメイン2のアミノ酸配列（配列番号3）は、次の通りである。

T P R V C P F A G I L E N G A V R Y T T F E Y P N T I S F S C N T G F Y L N G A
D S A K C T E E G K W S P E L P V C A P I I

【0038】

ドメイン2をドメイン3に連結する短い配列（下線部）のN末端に始まり、ドメイン3をドメイン4に連結する短い配列（下線部）で終わる、図3に示すドメイン3のアミノ酸配列（配列番号4）は、次の通りである。

A P I I C P P P S I P T F A T L R V Y K P S A G N N S L Y R D T A V F E C L P Q
H A M F G N D T I T C T T H G N W T K L P E C R E V K

【0039】

ドメイン4をドメイン3に連結する短い配列（下線部）のN末端に始まり、ドメイン4をドメイン5に連結する短い配列（下線部）で終わる、図3に示すドメイン4のアミノ酸配列（配列番号5）は、次の通りである。

R E V K C P F P S R P D N G F V N Y P A K P T L Y Y K D K A T F G C H D G Y S L
D G P E E I E C T K L G N W S A M P S C K A S

【0040】

ドメイン4をドメイン5に連結する短い配列（下線部）のN末端に始まり、C末端で終わる、図3に示すドメイン5のアミノ酸配列（配列番号6）は、次の通りである。

K A S C K V P V K K A T V V Y Q G E R V K I Q E K F K N G M L H G D K V S F F C
K N K E K K C S Y T E D A Q C I D G T I E V P K C F K E H S S L A F W K T D A S
D V K P C

【0041】

本明細書で使用される場合、用語「ドメインX」は、単独では、上記に特定された下線部のリンカー配列を含まないアミノ酸配列を有するポリペプチドを指すが、用語「ドメインX/Y」または「ドメインX+Y」が使用されている場合には、上記に特定された適切な下線部リンカー配列によって連結された2つのドメインのアミノ酸配列を有するポリペプチドを指すことが理解されよう。同様に、「リンカー配列を含まない配列番号AのドメインXアミノ酸配列」への言及は、上記に特定された下線部リンカー配列を含まない配列番号Aのアミノ酸のすべてを含むポリペプチドということと同じことを意味する。

【0042】

ドメイン欠失変異体を表す、用語「Dm」または「ドメイン欠失変異体」は、₂-GPIDメインの存在を示すのに数字を用い、一方、ダッシュは、そのドメインが欠失していることを表す。したがって、D--345は、ドメイン3、4、および5を含むが、ドメイン1および2を欠失している組換えタンパク質に与えられた名称である。

【0043】

本発明の₂-GPITタンパク質はその変異体であってもよい。別段の指示がない限り、用語「₂-GPIT」は、天然の₂-GPITタンパク質、およびそれらの変異体の両方を指す。本明細書で使用される場合、₂-GPIT変異体とは、天然₂-GPITタンパク質のアミノ酸配列と比較して、1つまたは複数のアミノ酸置換、欠失、および/または付加（内部付加および/または₂-GPIT融合タンパク質など）を有するアミノ酸配列を含むが、それにもかかわらず₂-GPITの免疫学的活性を保持している₂-GPITタンパク質である。そのような機能的または免疫学的に同等な変異体は、天然の生物学的変異として生じたもの（例えば、ポリペプチドの対立遺伝子変異体、ポリペプチド相同分子種、およびポリペプチドスプライス変異体）でもよく、または、例えば部位特異的変異誘発またはランダム変異誘発等の化学合成または修飾、変異誘発、などの既知の標準的な技法を用いて調製されたものでもよい。したがって、例えば、あるアミノ酸を、例えば電荷密度、親水性/疎水性度、サイズ、および立体配置に関して、₂-GPITタンパク

10

20

30

40

50

質またはそのエピトープの物理化学的性質を保持し、およびそれによって免疫学的構造を保存する別のアミノ酸で置換したものでよい。「付加」変異体には、単一アミノ酸または複数のアミノ酸の配列内挿入に加えて、N末端またはC末端融合も含まれ得る。欠失は、配列内のものでも、N末端またはC末端のトランケーションでもよい。

上記変異体は、1から3アミノ酸まで、5アミノ酸まで、10アミノ酸まで、15アミノ酸まで、20アミノ酸まで、25アミノ酸まで、50アミノ酸まで、75アミノ酸まで、またはは100アミノ酸まで、もしくは100超のアミノ酸までの置換、挿入、付加、および/または欠失を有するものでよく、その際、上記置換は、保存的なものでも、非保存的なものでも、またはこれらの組合せでもよい。さらに、本発明の₂-GPIタンパク質は、天然の₂-GPIタンパク質の、連続した少なくとも10アミノ酸残基、少なくとも12アミノ酸残基、少なくとも15アミノ酸残基、少なくとも20アミノ酸残基、少なくとも25アミノ酸残基、少なくとも30アミノ酸残基、少なくとも35アミノ酸残基、少なくとも40アミノ酸残基、または少なくとも50アミノ酸残基を含むものでよい。このような変異体は、天然の₂-GPIタンパク質と、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%同一であることが好ましい。さらに、上記₂-GPI変異体は、上記天然タンパク質の免疫学的活性の約1%超、約10%超、約25%超、約50%超、約60%超、約70%超、約80%超、約90%超、約95%超、または約100%超の活性を有する免疫学的活性を維持しているものでよい。

【0044】

₂-GPIタンパク質のアミノ酸配列への保存的改変は、通常、元の₂-GPIタンパク質のものと機能的および化学的に類似した特性を有するポリペプチドを産生する。対照的に、₂-GPIタンパク質の機能的および/または化学的特性の実質的な改変は、(a)置換領域の(二次、三次、および/または四次)構造、または(b)標的部位の分子の電荷量もしくは疎水性度の維持への影響が有意に異なる、₂-GPIタンパク質アミノ酸配列中の置換を選択することによって実現されうる。アミノ酸配列の改変は、当技術分野でよく知られている、化学的および生物学的なペプチドおよびタンパク質合成法によって実現できる。

【0045】

望ましいアミノ酸置換(保存的なものでも、非保存的なものでも)は、当業者ならば、そのような置換が必要となったときに決定できる。例えば、アミノ酸置換は、例えば₂-GPI特異抗体との結合相互作用等の₂-GPIタンパク質の生物活性を調節するのに、または試料中の他の分子との好ましくない非特異的結合相互作用を低減するのに重要な残基を特定するのに使用できる。適したアミノ酸置換には、AlaからVal、Leu、またはIleへの置換; ArgからLys、Gln、またはAsnへの置換; AsnからGlnへの置換; AspからGluへの置換; CysからSerまたはAlaへの置換; GlnからAsnへの置換; GluからAspへの置換; HisからAsn、Gln、Lys、またはArgへの置換; IleからLeu、Val、Met、Ala、Phe、またはノルロイシンへの置換; Leuからノルロイシン、Ile、Val、Met、Ala、またはPheへの置換; LysからArg、1,4-ジアミノ酪酸、Gln、またはAsnへの置換; MetからLeu、Phe、またはIleへの置換; PheからLeu、Val、Ile、Ala、またはTyrへの置換; ProからAlaへの置換; SerからThr、Ala、またはCysへの置換; ThrからSerへの置換; TrpからTyrまたはPheへの置換; TyrからTrp、Phe、Thr、またはSerへの置換; およびValからIle、Met、Leu、Phe、Ala、またはノルロイシンへの置換が含まれるが、これらに限定されない。置換するためのアミノ酸の選択は、その親水性指標および/または親水性によって導くこともできる。

【0046】

加えて、上記ポリペプチドは、相同なポリペプチドに融合させて、ホモ二量体を形成させても、または異種ポリペプチドに融合させてヘテロ二量体を形成させてもよい。異種ポ

10

20

30

40

50

リペプチドには、精製を容易にするためのCまたはN末端のポリヒスチジンなどの、₂-GPI融合ポリペプチドの検出および/または単離を可能にするエピトープ；触媒活性を有する酵素またはその一部；ロイシンジッパードメインなどの、オリゴマー形成を促進するポリペプチド；ならびに免疫グロブリン定常領域などの、安定性を増大させるポリペプチドが含まれるが、これらに限定されない。

【0047】

融合は、₂-GPIポリペプチドのアミノ末端でも、カルボキシル末端でも行うことができる。融合は、リンカーまたはアダプター分子のない直接的なものでもよく、もしくはリンカーまたはアダプター分子を介したものでもよい。リンカーまたはアダプター分子は、1または複数アミノ酸残基でよく、通常は、約20から約50アミノ酸残基である。リンカーまたはアダプター分子は、融合部分の分離を可能にするために、プロテアーゼの切断部位を有するように設計してもよい。上記融合ポリペプチドは、ひとたび構築されれば、本明細書に記載の方法に従ってさらに誘導体化できることが理解されよう。

10

【0048】

本発明の₂-GPIタンパク質は、アシル化（すなわちアセチル化またはホルミル化）、ピオチン化、カルボキシ化、脱アミノ化、グルタチオン化、グリコシル化、脂質化（すなわち、ファルネシル化、ゲラニルゲラニル化（geranylgeranylation）、プレニル化、ミリストイル化、パルミトイル化、またはステアロイル化）メチル化、リン酸化、硫酸化、フコシル化、およびユビキチン化などの、タンパク質の翻訳後修飾を含む、化学的または生物学的に修飾されたタンパク質である、₂-GPIの誘導体でもよい。別段の指示がない限り、用語「₂-GPIタンパク質」は、天然タンパク質と、それらの変異体および誘導体との両方を指す。タンパク質誘導体は、上記ポリペプチドに天然で結合する翻訳後修飾基とは型、数、または位置が異なる様式で修飾されたものでありうる。例えば、誘導体は、天然タンパク質と比較して、改変されたグリコシル化の数および/または型を有しうる。この結果得られる誘導体は、天然タンパク質より多数または少数のN結合型グリコシル化部位を含みうる。

20

【0049】

₂-GPIポリペプチドは、1つまたは複数の重合体の共有結合によって修飾されたものでもよい。通常、選択される重合体は、それが結合するタンパク質が生理的環境などの水溶液環境で沈殿しないように、水溶性のものである。上記重合体は、いかなる分子量のものでよく、分岐していても、分岐していなくてもよい。上記重合体は、通常、それぞれが約1kDaから約100kDaの間の平均分子量を有する。

30

【0050】

適した水溶性重合体またはこれらの混合物には、ポリアルキレングリコール（モノ（C₁~C₁₀）アルコキシ-、アリーロキシ-ポリエチレングリコール、ポリ（N-ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、またはポリプロピレンオキシド/エチレンオキシド共重合体など）、糖質ベースの重合体（デキストランまたはセルロースなど）、ポリオキシエチレン化ポリオール、およびポリビニルアルコールが含まれるが、これらに限定されない。共有結合した₂-GPIポリペプチド多量体を調製するのに使用できる二機能性架橋分子も、本発明に包含される。

40

【0051】

一般に、化学誘導体化は、活性化された重合体分子とタンパク質を反応させることによって、適した条件下で実行できる。ポリペプチドの化学的誘導体を調製する方法は、通常、（a）活性化された重合体分子（この重合体分子の反応性エステル誘導体またはアルデヒド誘導体など）とポリペプチドを、上記₂-GPIタンパク質が1つまたは複数の上記重合体分子と結合する条件下で反応させるステップと、（b）反応生成物を取得するステップとを含む。最適な反応条件は、選択された₂-GPIタンパク質と、使用される化学試薬に応じて変動しうるものであり、通常、実験的に決定される。ポリペプチドのPEG化は、アシル化、アルキル化、またはマイケル付加を含むがこれらに限定されない、当技術分野で既知の任意のPEG化反応を用いて実行できる。

50

【0052】

診断アッセイ

本発明で使用するのに適したイムノアッセイには、多くの異なったタイプがある。₂ - G P I 抗原と反応する、試料中の ₂ - G P I 特異抗体のレベルを検出するために、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A)、蛍光免疫吸着アッセイ (F I A)、化学結合免疫吸着アッセイ (C L I A)、ラジオイムノアッセイ (R I A)、免疫プロット、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、*i n s i t u*イムノアッセイ (例えば、コロイド金、酵素または放射性同位元素標識を用いる) ウェスタンプロット、沈降反応、凝集アッセイ (例えば、ゲル凝集アッセイ、赤血球凝集反応アッセイなど)、補体結合アッセイ、免疫蛍光測定法、プロテインAアッセイ、および免疫電気泳動アッセイなどの、既知のイムノアッセイのいずれを適合させてもよい。使用されうる様々なイムノアッセイに関する概説には、「*I m m u n o a s s a y H a n d b o o k*」、David Wild 編集、Stockton Press社、New York 所在、1994年を参照されたい。固相分離を用いた競合イムノアッセイまたは抗体を試験するためのイムノメトリックアッセイが、本発明での使用にとりわけ適している。「*I m m u n o a s s a y H a n d b o o k*」、第2章を参照されたい。

10

【0053】

本発明の例示的な一実施形態では、上記診断アッセイが、試料中の ₂ - G P I 特異抗体のレベルを検出するためのイムノメトリックアッセイである。上記イムノメトリックアッセイでは、上記 ₂ - G P I 抗原が、直接的に、または抗 ₂ - G P I 抗体などの捕捉物質を介して間接的に固体支持体に固定される。患者由来の血清試料などの、試料の分割量を上記固体支持体に添加して、固相表面の ₂ - G P I 抗原と共にインキュベートする。上記 ₂ - G P I 抗原と反応した、上記試料中に存在する自己抗体の定常領域を認識する二次抗体を添加する。上記患者がヒトである場合、この二次抗体は、抗ヒト免疫グロブリンである。I g A、I g G、またはI g M重鎖定常領域、またはこれらの組合せに特異的な二次抗体が利用できる。固相支持体を液相から分離した後、上記支持体相に検出可能なシグナルがあるかどうか検査する。上記固体支持体上のシグナルの存在は、上記試料中に存在している天然 ₂ - G P I タンパク質に対する自己抗体が上記固体支持体上の ₂ - G P I 抗原に結合していることを示す。正常患者由来の対照試料と比較した際の、光学濃度または放射標識されたシグナルの増大は、患者におけるA P Sの診断と相関する。

20

30

【0054】

固体支持体は、当業者には既知であり、反応トレー (例えばマイクロタイタープレート) のウェルの壁、試験管、ポリスチレンビーズ、磁気ビーズ、ニトロセルロースストリップ、膜、ラテックス粒子などのマイクロ粒子、ガラスまたはシリコンチップ、ヒツジ (または他の動物) の赤血球、およびD U R A C Y T E (登録商標) が含まれる。固相表面に核酸を固定するのに適した方法には、イオン性、疎水性、および共有結合性などの相互作用が含まれる。固体支持体は、本明細書で使用される場合、不溶性であるか、または後続の反応によって不溶性にできるいかなる物質も指す。固体支持体は、捕捉試薬を誘引および固定するその固有の能力に関して選択することができる。別法では、上記固相は、捕捉試薬を誘引および固定する能力を有する追加分子を保持できる。上記追加分子には、捕捉試薬自体に対して、または捕捉試薬に結合した荷電物質に対して反対に荷電されている荷電物質が含まれる。さらに別の代替手段として、上記分子は、固体支持体表面に固定されて (結合して) おり、および特異的な結合反応によって ₂ - G P I 抗原を固定する能力を有する任意の特異的結合部でありうる。上記分子は、アッセイ実施前またはアッセイ実施中に、固体支持体物質に ₂ - G P I 抗原を間接的に結合することを可能にする。

40

【0055】

上記シグナル発生システムは、1つまたは複数の成分から構成されており、それらのうち少なくとも1つは標識であり、上記標識は、結合標識および/または非結合標識の量、すなわち ₂ - G P I 抗原に結合している標識または結合していない標識の量に対する検出可能シグナルを発生する。上記標識は、シグナルを発生する分子、またはシグナルを発

50

生するように誘導されうる分子である。標識の例には、蛍光剤、酵素、化学発光剤、光増感剤、または懸濁可能粒子 (suspendable particle) が含まれる。上記シグナルは、酵素活性、発光、または吸光度を検出することによって、検出され、測定されうる。放射標識も使用でき、放射能のレベルはシンチレーションカウンターを用いて検出され、測定される。

【0056】

抗ヒト免疫グロブリンを標識するのに使用できる酵素の例には、 α -D-ガラクトシダーゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、およびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (「G6PDH」) が含まれる。抗ヒト免疫グロブリンを標識するのに使用できる蛍光剤の例には、フルオレセイン、イソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、*o*-フタルアルデヒド (phthaldehyde)、フルオレサミン、および Alexa Fluor (登録商標) 色素 (すなわち、スルホン化クマリン、ローダミン、キサンテン、およびシアニン色素) が含まれる。化学発光剤には、例えば、イソルミノールが含まれる。例えば、上記抗ヒト免疫グロブリンは、セイヨウワサビペルオキシダーゼまたはアルカリ性ホスファターゼのいずれかで酵素標識することができる。

10

【0057】

本発明の方法で使用するための α -2-GPI抗原反応性抗体は、周知の方法を用いて酵素に共有結合できる。多数の、既知の結合方法がある。例えば、アルカリホスファターゼおよびセイヨウワサビペルオキシダーゼは、グルタルアルデヒドを用いて抗体に結合することができる。セイヨウワサビペルオキシダーゼは、過ヨウ素酸法を用いて結合することもできる。酵素結合抗体の市販キットは、広範に入手可能である。酵素が結合した抗ヒトおよび抗マウス免疫グロブリン特異抗体は、複数の商業的供給源から入手可能である。

20

【0058】

酵素結合抗体の代替物としてビオチン標識抗体を用いてもよい。このような場合、結合抗体は、市販のストレプトアビジン-セイヨウワサビペルオキシダーゼ検出システムを用いて検出されるであろう。

【0059】

酵素標識抗体は、基質に応じて様々なシグナル源を産生する。シグナルの発生には反応混合物への基質の添加が関与する。一般的なペルオキシダーゼ基質には、ABTS (2, 2'-アジノビス (エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸))、OPD (O-フェニレンジアミン)、およびTMB (3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン) が含まれる。これらの基質は、過酸化水素の存在を必要とする。p-ニトロフェニルリン酸は、一般的に使用されているアルカリホスファターゼ基質である。インキュベーション時間中に、徐々に上記酵素が基質の一部を最終産物に変換する。インキュベーション時間の終わりに、酵素活性を停止する停止試薬を添加する。シグナル強度は、通常、分光光度計を介して光学濃度を測定することによって決定する。

30

【0060】

アルカリ性ホスファターゼ標識抗体も、蛍光分析によって測定できる。したがって、本発明のイムノアッセイでは、4-メチルウンベリフェリルリン酸 (4-UMP) 基質が使用できる。アルカリ性ホスファターゼは、4-UMPを脱リン酸化して、蛍光色素である4-メチルウンベリフェロン (4-MU) を形成した。入射光は365nmであり、放射光は448nmである。

40

【0061】

反応物中に存在する色、蛍光、発光、または放射能 (使用されるシグナル発生システムに応じる) の量は、試料中の、 α -2-GPI抗原と反応する自己抗体の量に比例する。光学濃度の定量は、フローサイトメータを含めた、分光光度法または蛍光定量法を用いて行うことができる。放射標識シグナルの定量は、シンチレーション計測を用いて行うことができる。

【0062】

50

別の例示的な実施形態では、上記アッセイが、 2 -GPI 特異的な自己抗体と同じエピトープに結合する1つまたは複数の 2 -GPI 特異抗体を利用する競合イムノアッセイである。上記アッセイでは、試料中の 2 -GPI 特異抗体および 2 -GPI 特異的自己抗体が、 2 -GPI 抗原への結合に関して競合する。通常、 2 -GPI 抗原に結合することが既知である一定量の標識抗体を、様々な濃度の、患者由来の試料と共にインキュベートする。 2 -GPI 特異抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルでもよい。

【0063】

本明細書中で上述の通り、 2 -GPI 特異抗体は蛍光剤、酵素、化学発光剤、光増感剤、懸濁可能粒子、または放射性同位元素によって標識され得る。インキュベーションの後に、結合している標識抗体を遊離抗体から分離する。使用されるシグナル発生システムに応じて、必要な場合には、標識抗体が反応する適切な基質を添加し、インキュベートする。その後、試料によって発生したシグナルを測定する。血清試料を添加する前および後の、または実験試料と対照試料間の光学濃度または放射能の低減は、試料中の自己抗体が 2 -GPI 抗原に結合したことを示す。正常患者由来の対照試料と比較した場合の光学濃度または放射標識シグナルの低減は、患者におけるAPSの診断と関連している。

10

【0064】

競合イムノアッセイの代替の例示的な実施形態では、2つの抗体を用いる間接法が提供される。 2 -GPI 抗原特異抗体は、それらが標識されていないことを例外として、上記に記載の通り、最初に添加される。それらを、様々な濃度の、患者からの試料と共にインキュベートする。その後、試料と第1の抗体との混合物に、一定量の第2の抗体を添加する。第2の抗体は、第1の抗体の重鎖定常領域を認識する。例えば、上記第2の抗体は、 2 -GPI 抗原と反応した、マウス免疫グロブリンの重鎖定常領域を認識する抗体(抗マウス免疫グロブリン)でよい。第2の抗体は、上述の通り、蛍光色素、ケミロフォア(chemilophore)、または放射性同位元素によって標識することができる。遊離状態の標識第2抗体を結合抗体から分離する。酵素標識抗体を使用する場合、酵素標識が反応する適切な基質を添加し、インキュベートする。対照試料との比較における、血清試料を添加する前および後の、光学濃度または放射能の低減は、血清試料中の自己抗体が 2 -GPI 抗原に結合したことを示す。正常患者由来の対照試料と比較した際の、光学濃度または放射能の低減は、患者におけるAPSの診断と関連している。

20

30

【0065】

一部の実施形態では、自動検出アッセイが利用される。イムノアッセイの自動化の方法には、それぞれが参照により本明細書に組み込まれている、米国特許第5,885,530号、第4,981,785号、第6,159,750号、および第5,358,691号に記載のものが含まれる。一部の実施形態では、結果の分析および提示も自動化される。例えば、一部の実施形態では、自己免疫疾患または慢性炎症性疾患のマーカーに対応する一連のタンパク質の存在または不在に基づいて、予後判定を生成するソフトウェアが利用される。

【0066】

一部の実施形態では、 2 -GPI 特異的な自己抗体のレベルは、他の生物学的マーカーと共に、心臓病を診断するためのパネルとして使用できる。上記パネルは、ASSと関連している複数のマーカーの同時解析を可能にする。例えば、パネルには、所与の治療に応答する可能性が高い患者または低い患者で、ASSと関連しているとして同定されたマーカーを含めることができる。パネルは、可能な最良の診断および予後判定を提供するために、患者に応じて、単独で分析しても、組み合わせて分析してもよい。パネル上に包含させるマーカーは、限定されるものではないが、以下の例示的な実施例に記載するものを含めた、任意の適した方法を用いた際の予測値に関するスクリーニングによって選択する。

40

【0067】

データ分析

50

本発明では、検出アッセイによって生成された生データを、臨床医にとって予測値を有するデータに転換するのに、コンピューターベースの分析プログラムを使用することもできる。臨床医は、任意の適した手段を用いて、予測データに容易にアクセスすることができる。臨床医は、患者の治療を最適化するために、その後直ちに、その情報を利用することができる。

【0068】

本発明は、アッセイを行う検査室、情報プロバイダー (i n f o r m a t i o n p r o v i d e s)、医療関係者および患者へ、およびそれらから、情報を受信し、処理し、かつ伝達できるいかなる方法も企図している。例えば、本発明の一部の実施形態では、試料 (例えば、生検、血清または尿試料) を患者から採取して、世界の任意の地域 (例えば、患者が在住する国とも、情報が最終的に使用される国とも異なる国) に所在するプロファイリングサービス (例えば、医療施設の臨床検査室、ゲノムプロファイリング会社など) に提出して、生データを作成する。上記試料が組織または他の生物試料を含む場合、患者は、試料を採取して、プロファイリングセンターに送ってもらうために医療センターに来院してもよく、または患者が自ら試料 (例えば尿試料) を収集して、プロファイリングセンターに直接送ってもよい。上記試料が以前に測定した生物情報を含む場合、患者がその情報をプロファイリングサービスに直接送ってもよい (例えば上記情報を含む情報カードをコンピューターでスキャンして、電子伝達システムを用いてそのデータをプロファイリングセンターのコンピューターに送ってもよい)。ひとたびプロファイリングサービスを受信されれば、上記試料が処理され、患者にとって望ましい診断情報または予後判定情報専用のプロフィールが作成される。

10

20

【0069】

その後、治療を行う臨床医が解釈するのに適した形式で、プロフィールデータを作成する。例えば、生の発現データを提供する代わりに、上記作成された形式は、特定の治療オプションの推薦と共に、患者に関する診断またはリスク評価 (例えば、HCCなどの肝臓疾患が特定の治療に好ましい反応を示す可能性) を表すものでもよい。データは、いかなる適した方法で臨床医に提示してもよい。例えば、一部の実施形態では、上記プロファイリングサービスが、臨床医用に印刷できる (例えば治療地点で) か、コンピューターモニター上で臨床医に提示できる報告を作成する。

【0070】

一部の実施形態では、上記情報を治療地点または地域施設で最初に分析する。その後、生データをさらに分析するため、および/または臨床医もしくは患者に有用な情報に生データを変換するために中央処理施設に送る。中央処理施設は、データ分析のプライバシー (すべてのデータが、中央施設で統一されたセキュリティプロトコルで保存される)、スピード、および均一性に関する利点を提供する。その後、中央処理施設は、患者を治療した後のデータの最終結果を制御することができる。例えば、電子伝達システムを用いて、中央施設は、データを臨床医、患者、または研究者に提供することができる。

30

【0071】

一部の実施形態では、患者は、電子伝達システムを用いて上記データに直接アクセスすることができる。患者は、結果に基づいて、さらなる治療介入またはカウンセリングを選択することができる。一部の実施形態では、上記データが研究使用に用いられる。例えば、特定の状態または疾患の重症度の有用な指標としてのマーカーの包含または除外をさらに最適化するのに、上記データを使用できる。

40

【実施例】

【0072】

α_2 -グリコプロテイン I (α_2 -GPI) を標的とする自己抗体は、アテローム硬化斑の成分であり、急性虚血症候群の患者で一般的に見出される。APS (抗リン脂質症候群) 患者由来、および急性アテローム硬化症候群を示す心臓血管疾患の患者由来の血清試料を、抗 α_2 -GPI ELISA アッセイおよび抗カルジオリピン (aCL) ELISA アッセイの両方で、IgG 抗体および IgA 抗体について分析した。使用した APS

50

試料のすべてが両アッセイで陽性であった。382人の心臓血管疾患の患者由来の血清試料も、同じアッセイで、IgG抗体およびIgA抗体について分析した。APS試料とは明らかに対照的に、心臓血管疾患の患者由来の試料の1%のみがIgA aCL陽性であり、1.6%がIgG aCL陽性であり、一方、35.6%がIgA抗₂-GPI陽性であり、1.6%のみがIgG抗₂-GPI陽性であったことが見出された。心臓血管疾患の患者から得られた29の血清試料の抗原特異性を評価した。ヒト₂-GPIの6つの異なった組換えドメイン欠失変異体(DM)および完全長ヒト₂-GPI(野生型)を競合阻害アッセイで使用して、抗₂-GPI ELISAアッセイで自己抗体が結合するのを阻害した。ドメイン欠失変異体D--345およびD--45は、IgA抗₂-GPIアッセイにおける結合を阻害したのは、これらの自己抗体が₂-GPI分子のドメイン4を認識することを示唆している。これらの結果は、アテローム性動脈硬化症患者由来のIgA抗₂-GPI自己抗体が、APS試料で見出されたIgA自己抗体とは異なることを実証した。

10

【実施例1】

【0073】

この実施例は、APS患者およびアテローム性動脈硬化症患者の抗体のドメイン特異性が相違しているため、APS患者が示す優勢な抗体プロファイル(カルジオリピンIgG陽性/₂-GPI IgG/IgA陽性)が、急性虚血疾患を有するアテローム性動脈硬化症患者が示す優勢なプロファイル(カルジオリピンIgG/IgA陰性/₂-GPI IgA陽性)とは異なっていることを実証する。一連の完全長₂-GPIおよび₂-GPI Dmを用いて、これらの構築物(construct)に対するIgG、IgA、およびIgM抗体に関して、競合阻害ELISAを用いることによって、APSを有する患者および様々なアテローム性動脈硬化症集団由来の多数の血清試料を試験した。IgG、IgA、およびIgM aCL抗体に関しても、すべての標本を試験した。この実験は、アテローム性動脈硬化症患者由来の29のIgA抗₂-GPI陽性試料のうち29が、₂-GPIのドメイン4を特異的に認識したことを実証した。

20

【0074】

材料および方法

組換え₂-GPI

用いた組換え₂-GPIおよび₂-GPIドメイン欠失変異体(DM)は、以前に記載されている通りである(Igarashi Mら、Blood 87(8):3262~3270(1996年))。簡潔には、Sf9昆虫細胞内で産生された高力価ウイルスストックを、TN5昆虫細胞に感染させた。各構築物は、培養培地からのタンパク質を精製するのに使用された6hisテールを含んでいた。ドメイン欠失変異体の命名法は、ドメインの存在を示すのに数字を用い、一方、ダッシュは、そのドメインが欠失していることを表す。したがって、D--345は、ドメイン3、4、および5を含むが、ドメイン1および2を欠失している組換えタンパク質に与えられた名称である。

30

【0075】

患者試料の選択

記載した各症候群の診断は、臨床症状、超音波、血管造影、または血管磁気共鳴検査に従って行った。患者は、専門治療センター(tertiary center)(大学病院)で連続的に登録した。感染性心内膜炎、骨壊死、腫瘍、脳出血、HIVもしくは梅毒トレポネーマによる感染、ホモシスチン尿症もしくは第V因子(ライデン)変異などの血栓症の既知遺伝的要因の存在、以前のAPS診断、または他の結合組織病(CTD)を有する患者は除外した。対照患者は、骨折または筋肉靭帯障害で整形外科に入院した患者であって、急性心筋梗塞、発作、または他の心臓状態を患っていない患者から募集した(Ranzolin Aら、Arg Bras Cardiol, 83(2):141~4; 137~140(2004年); Staub HLら、Arg Bras Neurop siquiat 61(3B):757~63(2003年))。

40

【0076】

50

様々なアテローム性動脈硬化症状態の個体由来の382の血清、および抗リン脂質症候群を有する個体由来の129の血清からなる合計511の保存標本を検査した。アテローム性動脈硬化症群には、末梢動脈障害(117)、急性冠動脈症候群(117)、および急性心筋梗塞(90)の個体からの血清が含まれていた。抗₂-GPI ELISAでIgGおよびIgAの両方に陽性であったAPS患者から10の試料、そして抗₂-GPI ELISAでIgAに陽性であったアテローム性動脈硬化症患者から29の試料を、ランダムに選択した。

【0077】

抗₂-GPIおよび抗カルジオリピンELISA

APS患者および心臓血管疾患の患者両方由来のすべての試料を、抗カルジオリピン(aCL)抗体および抗₂-GPI抗体の存在をELISAによって試験した。最初に、多価のaCLおよび抗₂-GPIスクリーニングELISA試験を用いて、IgG、IgA、またはIgM aCL抗体および₂-GPI抗体の存在に関して標本を試験した。この調査で使用されたすべてのELISAキットがINOVA Diagnostics社(INOVA Diagnostics社、San Diego, CA所在)で製造されたものであり、使用説明書に従って使用された。

10

【0078】

競合阻害ELISA

試験は、INOVA Diagnostics社製の適切な(IgGおよび/またはIgA)抗₂-GPI ELISAキットを用いて行った。最大結合の約80%を与えるのに必要な希釈率を決定するために、各血清を力価決定した。上記キットに提供されている試料希釈緩衝液中に試験阻害剤を希釈し、25 μ lの各希釈物または試料希釈液単独をウェルに添加した。血清試料を試料希釈緩衝液中に希釈し、定率の希釈物25 μ lをウェルに添加した。ウェルの内容物を混合し、プレートを室温で30分間インキュベートした。上記キットに提供されている洗浄緩衝液でウェルを3回洗浄し、50 μ lのHRP結合抗IgGまたはIgAを添加し、30分間インキュベートし、洗浄緩衝液で3回洗浄し、50 μ lの基質溶液を添加した。ウェルを室温で30分間インキュベートし、50 μ lの停止液を添加した。各ウェルのOD₄₅₀をAnthos Labtec社製HT2マイクロプレートリーダー(Salzburg, Austria所在)で測定した。阻害率は、 $[(\text{阻害剤なしの対照ウェルから得られた平均 } A_{450} - \text{バックグラウンドの } A_{450}) - (\text{阻害剤の存在下で得られた } A_{450} - \text{バックグラウンドの } A_{450})] / (\text{阻害剤なしの対照ウェルから得られた平均 } A_{450} - \text{バックグラウンドの } A_{450}) \times 100$ に従って決定した。

20

30

【0079】

結果

抗₂-GPIおよび抗カルジオリピン

抗₂-GPIアッセイおよび抗カルジオリピン(aCL)アッセイの両方で、IgGおよびIgA自己抗体があるかどうか、APS患者および心臓血管疾患の患者からの血清試料を分析した。APS試料の約80%が、多価のIgG/IgA/IgM aCLおよび₂-GPIスクリーニングアッセイ(表1)で陽性であった。

40

【0080】

【表 1】

表1: APS群および心臓血管群における、ELISA試験によるaCL抗体
および抗 β_2 -GPI抗体の頻度

総血清=511	APS患者 (n=129)	心臓血管患者 (n=382)
aCLスクリーニング(IgG/IgA/IgM)	78%	12%
抗 β_2 -GPIスクリーニング (IgG/IgA/IgM)	79%	46%
aCL IgG	64%	1%
aCL IgA	9%	1%
抗 β_2 -GPI IgG	43%	1%
抗 β_2 -GPI IgA	48%	33%

10

【0081】

APS血清の特異的アイソタイプ試験は、約64%がIgG、9%がIgA A C A抗体陽性である一方、43%がIgG、48%がIgA抗 β_2 -GPI陽性であったことを明らかにした。aCLおよび抗 β_2 -GPIアッセイの両方で、総(IgG/IgA/IgM)ならびに特異的なIgG抗体およびIgA抗体について、370人の心臓血管疾患の患者由来の血清試料を同様に試験した。APS試料とは明らかに対照的に、上記標本のそれぞれ64%および43%でIgG aCL抗体およびIgG抗 β_2 -GPI抗体が見出されたが、心臓血管疾患の患者由来の試料の1%のみで、IgG aCL抗体およびIgG抗 β_2 -GPI抗体が存在していたことが見出された。さらに衝撃的であったのは、IgA aCLおよびIgA抗 β_2 -GPIの反応性のパターンはAPS患者および心臓血管疾患の患者で類似していた(両方とも、IgA aCLが低レベルであり、IgA抗 β_2 -GPIが中程度のレベルであった)一方で、IgA抗 β_2 -GPIが心臓血管疾患群に存在している唯一の主要な抗体であったという観察結果であった。対照的に、APL患者は、中程度のレベルのIgG aCL、IgG抗 β_2 -GPI、およびIgA抗 β_2 -GPI抗体を有していた(表1)。

20

30

【0082】

APS患者由来のIgG抗 β_2 -GPI IおよびIgA抗 β_2 -GPI Iの両方によって認識される β_2 -GPIエピトープ

10人の異なったAPS患者由来のIgG自己抗体およびIgA自己抗体の両方の抗原特異性を決定するために、組換え β_2 -GPIおよび2つの欠失変異体を用いた。用量依存的様式で、これらの自己抗体が完全長 β_2 -GPIに結合するのを阻害する能力に関して、各組換え型の β_2 -GPIを試験した(表2、図1)。

【0083】

【表 2】

表2: 10の異なったAPS血清試料を用いた、記載の組換え β_2 -GPIおよび欠失変異体での競合阻害アッセイ

IgG						
抗体番号	D12345 ¹		D12---		D---45	
	最大値 ²	50% ³	最大値	50%	最大値	50%
6612	89	9.5	98	24.0	17.0	>125
6626	88	31.8	90	88.0	3.5	>125
6635	95	11.8	96	29.5	3.0	>125
6647	92	25.8	94	66.0	5.0	>125
6656	64	38.4	67	85.0	10.0	>125
6666	79	27.2	85	20.3	2.4	>125
6674	90	20.5	94	52.0	12.0	>125
7002	58	53.7	53	178.0	7.0	>125
7005	77	23.5	71	58.0	1.9	>125
7010	83	15.8	86	41.6	14.0	>125
IgA						
抗体番号	D12345		D12---		D---45	
	最大値	50%	最大値	50%	最大値	50%
6612	80	13.1	74	36	28	>125
6626	62	42.4	39	>125	61	>125
6635	57	44.7	67	29.6	0	>125
6647	68	30.7	58	66.4	0.7	>125
6656	74	24.3	42	>125	40	>125
6666	48	67.3	42	>125	11	>125
6674	85	39.9	88	39.9	4	>125
7002	29	116.3	21	>125	0	>125
7005	35	50.6	45	>125	40	>125
7010	63	16.7	59	50	12	>125

> = 試験された最も高い濃度

¹ = 構築物に含まれていたドメイン

² = 試験された濃度で観測された最大阻害

³ = 50%阻害を与える濃度(マイクロモル)

【0084】

ドメイン I を含む構築物のみが、IgG および IgA 自己抗体の両方を阻害した。表 2 で示した通り、10 人の患者全員由来の IgG および IgA 抗 β_2 -GPI 結合抗体の両方が、ドメイン 1 を含む両方の構築物によって阻害された。これらの試料はいずれも、ドメイン 1 を欠失した構築物によっては、試験された最も高い濃度でさえ、効果的に阻害されなかった。ドメイン 1 を含む変異体の ID₅₀ 値は、IgG 抗体では 1 ~ 50 μ M、IgA 抗体では 13 ~ 100 μ M の範囲であった。対照的に、ドメイン 1 を含んでいなかった変異体 (D---45) は、IgG 抗体も、IgA 抗体も、効果的に阻害しなかった。

【0085】

急性心臓血管疾患候群の患者由来の IgA 抗 β_2 -GPI によって認識される β_2 -GPI エピトープ

APS 血清および心臓血管疾患血清の β_2 -GPI および aCL プロフィール (表 1) の相違は、本発明者らに、心臓血管疾患の患者の IgA 抗 β_2 -GPI 抗体は、APS 患

者体内に存在するものとは異なっている可能性があり、 β_2 -GPIタンパク質上の異なったドメインを標的としているかもしれないことを示唆した。

【0086】

心臓血管疾患の患者のコホートから、IgA抗 β_2 -GPI抗体陽性であり、ならびにaCL IgG陰性、aCL IgM陰性、および1つの血清を例外としてaCL IgA陰性である29の試料を選択した。これらの血清の詳細な β_2 -GPIおよびaCLプロフィールを、表3に示す。

【0087】

【表 3】

表3:心臓血管患者から得た阻害試験用試料の抗aCLプロフィールおよび抗 β_2 -GPIプロフィール

試料	β_2 -GPI IgA単位	β_2 -GPI IgG単位 ²	β_2 -GPI IgM単位	aCL IgA単位	aCL IgG単位	aCL IgM単位
ACS-52	58.9	0	10.1	n.t.	n.t.	n.t.
ACS-53	20.7	0	4.0	n.t.	n.t.	n.t.
ACS-54	33.1	9.6	0	n.t.	n.t.	n.t.
ACS-58	86.4	0	5.3	n.t.	n.t.	n.t.
ACS-65	234.4	0	4.0	n.t.	n.t.	n.t.
ACS-67	38.7	0	0	n.t.	n.t.	n.t.
ACS-71	77.6	0	0	n.t.	n.t.	n.t.
ACS-74	154.8	0	5.7	n.t.	n.t.	n.t.
ACS-104	23.7	0	58.5	n.t.	n.t.	n.t.
ACS-136	32.0	64.4	0.2	n.t.	n.t.	n.t.
ACS-144	28.3	3.3	16.9	n.t.	n.t.	n.t.
CAS-5	65.4	0	2.8	n.t.	n.t.	n.t.
CAS-6	55.5	1.2	0	n.t.	n.t.	n.t.
CAS-8	61.2	0	0	n.t.	n.t.	n.t.
CAS-13	39.9	1.7	11.7	n.t.	n.t.	n.t.
CAS-15	130.1	0.1	0	n.t.	n.t.	n.t.
CAS-18	35.5	0	0	n.t.	n.t.	n.t.
CAS-28	60.5	0	0	n.t.	n.t.	n.t.
CAS-29	51.8	4.1	5.7	n.t.	n.t.	n.t.
MI-5	70.0	0	25.6	n.t.	n.t.	n.t.
MI-7	90.4	0	0	n.t.	n.t.	n.t.
MI-10	183.9	0	25.4	n.t.	n.t.	n.t.
MI-15	58.4	0	77.4	n.t.	n.t.	n.t.
MI-37	32.7	0	41.2	n.t.	n.t.	n.t.
MI-45	25.5	0	11.6	n.t.	n.t.	n.t.
PAD-30	27.6	0	0	n.t.	n.t.	n.t.
PAD-39	22.1	0	0	n.t.	n.t.	n.t.
PAD-42	45.5	0	0	27.9	n.t.	n.t.
PAD-101	26.4	3.0	25.4	n.t.	n.t.	n.t.

n. t. = aCLスクリーニングアッセイで陰性と判定された標本はアイソタイプ特異的アッセイで試験しなかった。

¹ = ACS: 急性冠動脈症候群。MI: 心筋梗塞。CAS: 頸動脈試験。
PAD: 末梢動脈疾患。

² = 負の値を有する β_2 -GPI結果(標準曲線の底部における外挿の結果生じる)には0の値を割り振った。

【 0 0 8 8 】

急性心臓症候群(11)、急性心筋梗塞(6)、頸動脈疾患(8)、および末梢動脈疾患(4)を含めた様々な心臓血管疾患状態の患者由来の29の異なる試料由来のIgA β_2 -GPI結合抗体の抗原特異性を決定するために、7つの異なる組換え β_2 -GPI変異体タンパク質を用いた。IgA抗体が完全長 β_2 -GPIに結合するのを阻害する能力について、各変異体の組換え β_2 -GPIタンパク質を用量依存的な様式で試験し

10

20

30

40

50

た(表4)。

【0089】

【表4】

表4: 心血管障害¹を有する患者由来の29の異なった血清試料を用いた、記載の組換えB2GPIおよび欠失変異体での競合阻害アッセイ

Ab#	12345 ²		12---		123--		1234-		---345		---45		----5	
	最大値 ³	50% ⁴	最大値	50%	最大値	50%	最大値	50%	最大値	50%	最大値	50%	最大値	50%
ACS-104	62	20	0	>125	13	>83	0	>63	79	30	76	24	10	>250
ACS-136	74	12	3	>125	0	>83	0	>63	72	6	76	26	3	>250
ACS-144	52	12	12	>125	12	>83	8	>63	63	6	68	7	9	>250
ACS-52	70	17	0	>125	14	>83	30	>63	86	6	87	2	21	>250
ACS-53	56	23	15	>125	12	>83	24	>83	76	10	80	14	10	>250
ACS-54	71	5	11	>125	0	>83	0	>63	67	3	85	2	3	>250
ACS-58	57	24	0	>125	7	>83	24	>63	84	20	90	16	2	>250
ACS-65	82	12	0	>125	18	>83	88	5	92	4	94	8	0	>250
ACS-67	65	21	8	>125	2	>83	49	>63	75	21	83	23	20	>250
ACS-71	72	12	18	>125	7	>83	13	>63	90	4	93	4	49	227
ACS-74	69	10	3	>125	2	>83	15	>63	90	5	91	1	29	>250
CAS-13	54	34	7	>125	0	>83	10	>63	74	17	72	33	15	>250
CAS-15	83	2	0	>125	1	>83	0	>63	92	2	91	17	11	>250
CAS-18	72	24	0	>125	13	>83	0	>63	85	31	82	46	0	>250
CAS-28	65	18	7	>125	22	>83	39	>63	84	26	84	29	0	>250
CAS-29	63	26	8	>125	17	>83	33	>63	76	36	75	28	0	>250
CAS-5	70	29	0	>125	19	>83	29	>63	90	6	84	20	0	>250
CAS-6	68	24	14	>125	14	>83	27	>63	78	6	77	17	15	>250
CAS-8	75	23	14	>125	0	>83	6	>63	88	6	87	17	0	>250
MI-10	74	14	8	>125	12	>83	64	43	90	13	89	4	0	>250
MI-15	71	16	6	>125	19	>83	25	>63	71	34	80	12	19	>250
MI-37	37	52	0	>125	0	>83	0	>63	50	7	58	16	2	>250
MI-45	60	27	5	>125	16	>83	20	>63	67	38	66	8	0	>250
MI-5	73	18	30	>125	0	>83	0	>63	90	2	58	5	0	>250
MI-7	85	2	0	>125	35	>83	48	55	76	21	90	8	56	80
PAD-101	27	>50	3	>125	0	>83	14	>63	67	51	72	55	6	>250
PAD-30	57	24	0	>125	19	>83	58	41	78	30	79	24	0	>250
PAD-39	59	19	14	>125	10	>83	54	46	75	30	77	24	0	>250
PAD-42	40	>50	9	>125	6	>83	9	>63	79	24	83	29	14	>250

> = 試験された最も高い濃度を超えている

¹ = ACS: 急性冠動脈症候群。MI: 心筋梗塞。CAS: 頸動脈試験。

PAD: 末梢動脈疾患。

² = 構築物に含まれていたドメイン。

³ = 試験された濃度で観測された最大阻害。

⁴ = 50%阻害を与える濃度(μM)。

【0090】

結果の一例を図2にグラフ表示する。完全長構築物を除けば、D - - 3 4 5、および D - - - 4 5 構築物のみがこれらのIgA抗体を阻害した。29の試料のうち4つは、はるかに少ない程度ではあるが、D 1 2 3 4 - 構築物によっても阻害された。これらの試料のうち1つのみが、D - - - - 5 構築物によっても阻害された。D - - 3 4 5 および D - -

10

20

30

40

50

- 45 変異体の ID_{50} 値は、1 ~ 55 μ M の範囲であった。対照的に、D12 - - - および D123 - - 変異体は、試験された 29 の試料のうちいずれの結合も効果的に阻害しなかった。

【0091】

考察

APS 患者で見出される IgG 自己抗体の抗原特異性は、 α_2 -GPI 分子のドメイン 1 を認識していることが以前に示されている (Iverson, GMら、PNAS 95 : 15542 ~ 15546 (1998年); Iverson, GMら、J. Immunol. 169 : 7097 ~ 7103 (2002年))。しかしながら、APS 患者からの IgA 自己抗体の抗原特異性は知られていなかった。本明細書で報告した阻害調査 (図 1、表 2) は、この報告で調査された 10 の APS 試料からなる一群の抗原特異性が、 α_2 -GPI 分子のドメイン 1 内に含まれているエピトープに対するものであることを明確に示している。したがって、APS 患者で見出された IgG 自己抗体および IgA 自己抗体の両方の抗原特異性が、ドメイン 1 である。

10

【0092】

この実験は、いくつかのタイプの ASS (急性心筋梗塞、急性冠動脈症候群、「頸動脈試験」、および末梢動脈疾患) である患者由来の IgA α_2 -GPI 結合抗体が、 α_2 -GPI 分子のドメイン 4 上のエピトープを認識することも示している (図 2 および表 3)。APS 患者由来の自己抗体が α_2 -GPI のドメイン 4 を認識することを示したとされる以前の研究 (Igarashi M.ら、Blood、87 (8) : 3262 ~ 70 (1996年); George J.ら、J. Immunol. 160 (8) : 3917 ~ 3923 (1998年)) とこれを混同するべきではない。これらの研究は、IgA ではなく、IgG 自己抗体の抗原特異性を研究するように設計されたものである。

20

【0093】

ドメイン 4 を含む Dm は、試験された様々な試料間で、同一ではないが類似したパターンで阻害した。例えば、4 つのみが D1234 - 構築物によって阻害された。これは、ドメイン 4 上に存在する、共通点はあるが識別可能なエピトープをこれらの抗体が認識していること示唆している。 α_2 -GPI の結晶構造から得られた最近の分子シミュレーションは、この可能性を支持している。この研究は、 α_2 -GPI のドメイン 4 における 2 つの不連続な抗原性配列の存在を示唆している (Kasahara H.ら、Int. Immunol. 17 : 1533 ~ 1542 (2005年))。ドメイン 4 は、異なったドメインを含む構築物内に存在している場合には、異なった立体配座状態を有している可能性がある。例えば、ドメイン 5 が欠失している場合には、少数の試料がドメイン 4 を認識したが、大多数は、ドメイン 5 が存在していた場合にのみ、ドメイン 4 を認識した。したがって、これらの抗体は、別のドメインの存在によって影響を受けるドメイン 4 上のエピトープを認識している可能性がある。この解釈も、上記シミュレーション実験によって支持された。

30

【0094】

以前に、ELISA によって測定する場合、抗 α_2 -GPI 自己抗体の結合には ELISA プレート上における α_2 -GPI の方向性が重要であることが示されている (George J.ら、J. Immunol. 160 (8) : 3917 ~ 3923 (1998年))。これは、これらの試料が、プラスチックディッシュ表面に吸着された場合には α_2 -GPI を認識するが、カルジオリピン表面に吸着された場合には α_2 -GPI に結合しないのは何故か説明できるであろう。ドメイン 5 を介したカルジオリピンへの α_2 -GPI の結合は、プラスチックに結合した場合とは異なった方向性を与えている可能性がある。ドメイン 5 を介した結合は、ドメイン 4 の利用可能性もしくはドメイン 4 の配置のいずれか、またはこれらの両方を改変している可能性がある。しかしながら、プラスチックに吸着された場合の α_2 -GPI 分子の方向性は、完全には理解されていない。ドメイン 4 が妨害されない、すなわち抗体にとって利用可能であり、かつこれらの抗体の結合を無くすほどにその立体配座を改変しない方向性で、十分な数の分子がプラスチックに吸着してい

40

50

ると予想できる。

【実施例 2】

【0095】

ドメイン 4 特異抗体を検出する ELISA アッセイを用い、ドメイン 4 / 5 混合抗原を用い、臨床的に特性分析されている 218 の血清を用いて、臨床試験を行った。コホートには、健康対照個体 (n = 30)、心臓ステントを有する患者 (無症候、n = 28; 症候性、n = 23)、および急性発作の患者 (虚血性発作および一過性脳虚血発作; 脳内出血なし; n = 137) が含まれていた。平均 IgA 抗体値は、健康対照者集団では 14.1 単位であり、これと比較して、ステントを有する患者では 26.5 単位、急性脳卒中の患者では 29.5 単位であった。(表 5)。

10

【0096】

【表 5】

表5:218の異なった血清試料を用いたELISAアッセイ

試験された血清の数	30	51	137
患者の診断	対照	ステント	急性脳卒中
IgA β_2 -GPIドメイン4 および5抗体の平均値	14.09	26.46	29.54

20

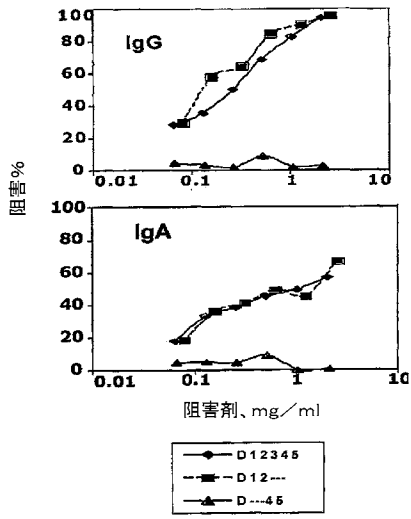
【0097】

上述した実施例は、上記組成物の好ましい実施形態をどのように作製および使用するかに関する完全な開示および説明を当業者に与えるために提供するものであって、本発明者らが、本発明者らの発明と考えているものの範囲を限定するものではない。上述した様式の変更形態 (当業者に明らかである、本発明を実行するための変更形態) は、以下の特許請求の範囲に包含されるものとする。本明細書で引用されているすべての出版物、特許、および特許出願を参照により本明細書に組み込む。

30

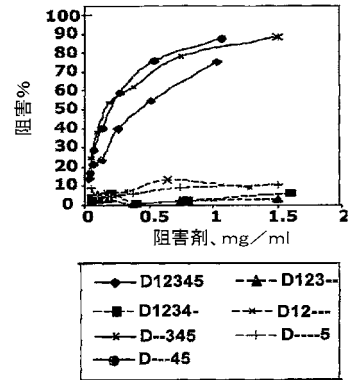
【 図 1 】

FIGURE 1



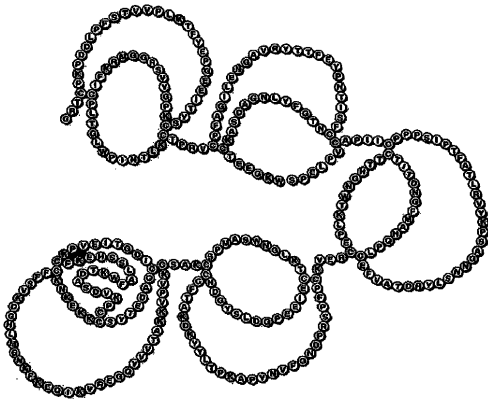
【 図 2 】

FIGURE 2



【 図 3 】

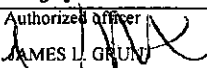
FIGURE 3



【配列表】

2009544971000001.xml

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US07/16853
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: G01N 33/53(2006.01),33/543(2006.01),33/564(2006.01) C07K 14/775(2006.01),16/18(2006.01) USPC: 435/7.1,7.92,7.93,7.95,69.3;436/506,518,71;530/359,387.9,391.3 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/7.1, 7.92, 7.93, 7.95, 69.3; 436/506, 518, 71; 530/359, 387.9, 391.3 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 practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LOPEZ et al. Anti-Beta2-Glycoprotein I and Antiphosphatidylserine Antibodies are Predictors of Arterial Thrombosis in Patients with Antiphospholipid Syndrome. American Journal of Clinical Pathology. 2004, Vol. 121, pages 142-149, see entire document.	1-11
Y	RANZOLIN et al. Anti-Beta2-Glycoprotein I Antibodies as Risk Factors for Acute Myocardial Infarction. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. August 2004, Vol. 83, No. 2, pages 141-144, see entire document.	1-11
Y	VERES et al. Antiphospholipid Antibodies in Acute Coronary Syndrome. Lupus. 2004, Vol. 13, pages 423-427, see entire document.	1-11
Y	IGARASHI et al. Human Beta2-Glycoprotein I as an Anticardiolipin Cofactor Determined Using Mutants Expressed by a Baculovirus System. Blood. 15 April 1996, Vol. 87, No. 8, pages 3262-3270, see entire document.	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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 application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" 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 29 August 2008 (29.08.2008)		Date of mailing of the international search report 07 OCT 2008
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer  JAMES L. GRUND Telephone No. 571-272-1600

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/16853

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BLANK et al. Prevention of Experimental Antiphospholipid Syndrome and Endothelial Cell Activation by Synthetic Peptides. Proceeding of the National Academy of Sciences USA. April 1999, Vol. 96, pages 5164-5168, see entire document.	1-11
Y	KOIKE et al. Beta2-Glycoprotein I-Anti-Beta2-Glycoprotein I Interaction. Journal of Autoimmunity. 2000, Vol. 15, pages 97-100, see entire document.	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/16853

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
EAST, DIALOG
search terms: IgA, antibod?, myocard?, atherosclero?, arteriosclero?, beta 2 glycoprotein

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 アイバーソン、 ジー . マイケル
アメリカ合衆国 92014 カリフォルニア州 デル・マー ボキータ ドライブ 13784

(72)発明者 ビンダー、 ウォルター エル .
アメリカ合衆国 92101 カリフォルニア州 サンディエゴ インディア ストリート 1240
ナンバー2108

(72)発明者 ノーマン、 ゲーリー エル .
アメリカ合衆国 92673 カリフォルニア州 サンクレメンテ コリーナ サリダ デル ソル 1920

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2009544971A5	公开(公告)日	2010-03-11
申请号	JP2009521844	申请日	2007-07-26
[标]申请(专利权)人(译)	Innovatech诊断公司		
申请(专利权)人(译)	伊诺诊断公司		
[标]发明人	アイバーソンジーマイケル ビンダーウォルターエル ノーマンゲーリーエル		
发明人	アイバーソン、ジー. マイケル ビンダー、ウォルター エル. ノーマン、ゲーリー エル.		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/564 G01N2333/705 G01N2800/323		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/543.545.A G01N33/543.ZNA		
代理人(译)	三好秀 伊藤雅一 原 裕子		
优先权	60/833757 2006-07-26 US 60/918225 2007-03-14 US		
其他公开文献	JP2009544971A		

摘要(译)

本发明属于自身免疫领域。更具体地，本发明涉及检测β2-糖蛋白I (β 2-GPI) 的结构域4的自身抗体作为动脉粥样硬化的指标。