

(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2007-532885

(P2007-532885A)

(43) 公表日 平成19年11月15日(2007.11.15)

(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 R  
**GO 1 N 33/543 (2006.01)** GO 1 N 33/543 597

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 41 頁)

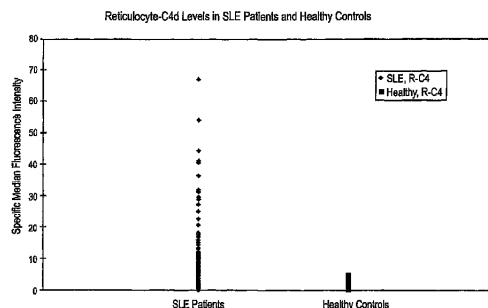
(21) 出願番号	特願2007-507524 (P2007-507524)	(71) 出願人	506339556 ユニバーシティ オブ ピッツバーグ アメリカ合衆国 ペンシルバニア 152 60, ピッツバーグ, サッカレー ア ンド オハラ ストリーツ, ジーエスシ ーシー 200
(86) (22) 出願日	平成17年4月8日 (2005.4.8)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成18年11月21日 (2006.11.21)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/011914	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 国際公開番号	W02005/108988		
(87) 国際公開日	平成17年11月17日 (2005.11.17)		
(31) 優先権主張番号	60/560, 986		
(32) 優先日	平成16年4月9日 (2004.4.9)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/579, 621		
(32) 優先日	平成16年6月14日 (2004.6.14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 急性炎症状態を検出するリアルタイム方法

(57) 【要約】

本発明は、特に活動に関して、全身性エリテマトーデスを含む炎症性疾患または炎症性状態を有する患者の診断および/またはモニタリングに関する。本開示は、網状赤血球上の補体経路成分のレベルを用いて、慢性の炎症性疾患あるいは炎症性状態の急性エピソードの発生を診断、モニタリング、あるいは予測することができるという驚くべき発見を提示する。本発明は、個体由来の網状赤血球上の補体経路成分のレベルを決定し、(b) この補体経路成分のレベルを補体経路成分のコントロールレベルと比較することによって、その個体における慢性の炎症性疾患あるいは炎症性状態の急性炎症性エピソードを診断あるいはモニタリングするための方法を提供する。



。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

個体における慢性の炎症性疾患または炎症性状態の急性炎症性エピソードを診断またはモニタリングするための方法であって、該方法は、

( a ) 該個体由来の網状赤血球における補体経路成分のレベルを決定する工程、および  
( b ) 該補体経路成分レベルを補体経路成分のコントロールレベルと比較する工程であって、該補体経路成分のコントロールレベルからの差は、該個体が該慢性の炎症性疾患または炎症性状態の急性炎症性エピソードを有することを示す、工程を包含する、方法。

**【請求項 2】**

1 より多くの前記補体経路成分のレベルが、決定され、そしてコントロールに対して比較される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記補体経路成分のレベルが、該補体経路成分に対して特異的な抗体を使用して決定される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記補体経路成分 C 4 d のレベルが決定される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記慢性の炎症性疾患または炎症性状態が、全身性エリテマトーデス ( S L E )、C 型肝炎感染、鎌状赤血球貧血、移植の合併症、および妊娠の合併症からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記慢性の炎症性疾患または炎症性状態が、S L E である、請求項 5 に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記補体経路成分 C 4 d のレベルが決定される、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記補体経路成分 C 4 d のレベルが、該補体成分 C 4 d に対して特異的な抗体を使用して決定される、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記 C 4 d 抗体が、標識されている、請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記 C 4 d 抗体が、フローサイトメトリー分析を使用して検出される、請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 11】**

個体における慢性の炎症性疾患または炎症性状態の急性炎症性エピソードを予測する方法であって、該方法は、

( a ) 該個体由来の網状赤血球における補体経路成分のレベルを決定する工程、および  
( b ) 該補体経路成分のレベルを補体経路成分のコントロールレベルと比較する工程であって、該補体経路成分のコントロールレベルからの差は、該個体が該慢性の炎症性疾患または炎症性状態の急性炎症性エピソードを有することを示す、工程を包含する、方法。

**【請求項 12】**

1 より多くの前記補体経路成分のレベルが、決定され、そしてコントロールに対して比較される、請求項 11 に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記補体経路成分のレベルが、該補体経路成分に対して特異的な抗体を使用して決定される、請求項 11 に記載の方法。

**【請求項 14】**

前記補体経路成分 C 4 d のレベルが、決定される、請求項 11 に記載の方法。

**【請求項 15】**

10

20

30

40

50

前記慢性の炎症性疾患または炎症性状態が、全身性エリテマトーデス（SLE）、C型肝炎感染、鎌状赤血球貧血、移植の合併症、および妊娠の合併症からなる群より選択される、請求項11に記載の方法。

【請求項16】

前記慢性の炎症性疾患または炎症性状態が、SLEである、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記補体経路成分C4dのレベルが決定される、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記補体経路成分C4dのレベルが、該補体経路成分C4dに対して特異的な抗体を使用して決定される、請求項17に記載の方法。

10

【請求項19】

前記C4d抗体が、標識されている、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記C4d抗体が、フローサイトメトリー分析を使用して検出される、請求項18に記載の方法。

【請求項21】

個体における慢性の炎症性疾患または炎症性状態の急性炎症性エピソードを診断、モニタリング、または予測するためのキットであって、該キットは、補体経路成分に対して特異的な抗体と、補体経路成分のコントロールレベルに対して該補体経路成分のレベルを比較するための手段とを備え、ここで、該補体経路成分のコントロールレベルからの差は、該個体が該慢性の炎症性疾患または炎症性状態の急性炎症性エピソードを有することを示す、キット。

20

【請求項22】

前記慢性の炎症性疾患または炎症性状態が、全身性エリテマトーデス（SLE）である、請求項21に記載のキット。

【請求項23】

前記抗体が、蛍光標識されている、請求項21に記載のキット。

【請求項24】

前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項21に記載のキット。

【請求項25】

個体における慢性の炎症性疾患または炎症性状態の急性炎症性エピソードを診断、モニタリング、または予測するためのコンピューター読み取り媒体であって、該コンピューター読み取り媒体は、

30

(a) 網状赤血球の表面に沈着する補体経路成分の決定に対応するデータを受容するためのコード；

(b) 個体の網状赤血球の表面上に沈着する補体経路成分についての参照値を検索するためのコード；

(c) 該(a)におけるデータを該(b)における参照値と比較するためのコードを含む、コンピューター読み取り媒体。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

(関連出願への相互参照)

本出願は、米国仮特許出願第60/560,986号(2004年4月9日出願)の利益を主張し、そして、米国仮特許出願第60/579,621号(2004年6月14日出願)の利益を主張する。上記仮特許出願の両方は、あらゆる目的のために、本明細書においてその全体が参考として援用される。

【0002】

(連邦政府による援助を受けた研究開発下でなされた発明に対する権利に関する記載)

本発明は、the National Institutes of Healthに

50

与えられた助成金番号 R O 1 H L - 0 7 4 3 3 5、R O 1 A R - 4 6 7 6 4 0 2、R O 1 A R - 4 6 5 8 8、N C R R / G C R C M O 1 - R R - 0 0 0 5 6、K 2 4 A R - 0 2 2 1 3、K 2 3 A R - 0 5 1 0 4 4 のもとで、政府の支援によってなされた。政府は、本発明に一定の権利を有する。

#### 【 0 0 0 3 】

( 発明の分野 )

本発明は、全身性エリテマトーデスを含む炎症性疾患あるいは炎症性状態を有する患者の診断および/またはモニタリングに関係し、特に疾患の急性段階の診断に関するものであって、本発明にはこの行為を達成するための方法およびキットが含まれる。本開示は、網状赤血球上の補体経路成分のレベルを用いて、慢性の炎症性疾患あるいは炎症性状態の急性エピソードの発現を診断、モニタリング、あるいは予測することができるという驚くべき発見を提示する。

10

#### 【 0 0 0 4 】

( 発明の背景 )

本発明は、炎症性疾患あるいは炎症性状態の急性エピソードを有する患者の診断および/またはモニタリングに関係する。一部の実施形態において、この炎症性疾患あるいは炎症性状態は、全身性エリテマトーデス ( S L E ) である。本発明はまた、S L E を含む炎症性疾患あるいは炎症性状態の急性エピソードの始まりを予測するための手段を提供する。

。

#### 【 背景技術 】

20

#### 【 0 0 0 5 】

炎症性疾患あるいは炎症性状態を有する患者の治療の際、疾患活動のモニタリングもまた、問題をはらんでいる。慢性の炎症性疾患あるいは炎症性状態は、しばしば、一連の発赤 ( f l a r e )、あるいは疾患の急性期に進行し、その後沈静化する。しかし、時間と共に、こうした発赤が不可逆的な器官損傷を導くことがあり得る。このような損傷を最小にするため、疾患発赤のより早期のより正確な検出は、適切な処置を促すだけでなく、不必要な介入の頻度を減らす。調査の観点から、個々の器官系において、あるいは一般検査として、「炎症の範囲」あるいは疾患活動を等しく説明する能力は、非常に価値ある検査手段となる。さらに、疾患活動の測定値を、治療試験における反応変数として用いることができる。このように、S L E を含めた炎症性疾患あるいは炎症性状態の急性段階を診断あるいは予測する信頼性の高い方法が必要とされている。本発明はこれら等の必要性を満たすものである。

30

#### 【 発明の開示 】

#### 【 課題を解決するための手段 】

#### 【 0 0 0 6 】

( 発明の概要 )

この開示は、( a ) 個体由来の網状赤血球上の補体経路成分のレベルを決定し、( b ) この補体経路成分のレベルを補体経路成分のコントロールレベルと比較することによって、その個体における慢性の炎症性疾患あるいは炎症性状態の急性炎症性エピソードを診断あるいはモニタリングするための方法を提供する。ここで補体経路成分のコントロールレベルとの差異は、その個体が慢性の炎症性疾患あるいは炎症性状態の急性炎症性エピソードを有していることを示す。1 より多くの補体成分のレベルを決定し、コントロールレベルと比較することができる。例えば、補体経路成分の比を決定し、コントロールとなる補体経路成分レベルの比と比較することができる。一部の実施形態では、補体経路成分に特異的な抗体を使用して、その補体経路成分のレベルを決定することができる。一実施形態では、補体経路成分 C 4 d のレベルが決定される。

40

#### 【 0 0 0 7 】

この開示する方法を使用して、例えば全身性エリテマトーデス ( S L E )、C 型肝炎感染、鎌状赤血球貧血、移植の合併症、ならびに妊娠の合併症など、複数の慢性の炎症性疾患あるいは炎症性状態の急性炎症状態を診断あるいはモニタリングすることができる。

50

## 【0008】

一実施形態では、SLEの急性エピソードが診断される。例えば、SLEの急性エピソードを診断あるいはモニタリングするために、網状赤血球上の補体経路成分C4dのレベルを決定してコントロール由来の網状赤血球上の補体成分C4dのレベルと比較することができる。補体成分C4dのレベルは、C4dに特異的な抗体を使用して決定することができる。標識したC4d抗体を使用することができ、一部の実施形態では、フローサイトメトリー分析を用いてこのC4d抗体を検出する。

## 【0009】

本開示はまた、(a) 個体由来の網状赤血球上の補体経路成分のレベルを決定し、(b) この補体経路成分のレベルを補体経路成分のコントロールレベルと比較することによって、その個体における慢性の炎症性疾患あるいは炎症性状態の急性炎症性エピソードの発生を予測するための方法を提供する。ここで補体経路成分のコントロールレベルとの差異は、その個体が、慢性の炎症性疾患あるいは炎症性状態の急性炎症性エピソードを有していることを示す。1より多くの補体成分のレベルを決定し、コントロールレベルと比較することができる。例えば、補体経路成分の比を決定し、コントロールとなる補体経路成分レベルの比と比較することができる。一部の実施形態では、補体経路成分に特異的な抗体を使用して、その補体経路成分のレベルを決定することができる。一実施形態では、補体経路成分C4dのレベルが測定される。

10

## 【0010】

この開示する方法を使用して、例えば全身性エリテマトーデス(SLE)、C型肝炎感染、鎌状赤血球貧血、移植の合併症、ならびに妊娠の合併症など、複数の慢性の炎症性疾患あるいは炎症性状態の急性炎症性状態の発生を予測することができる。

20

## 【0011】

一実施形態では、SLEの急性エピソードが予測される。例えば、SLEの急性エピソードを予測するために、網状赤血球上の補体経路成分C4dのレベルを決定してコントロール由来の網状赤血球上の補体成分C4dのレベルと比較することができる。補体成分C4dのレベルは、C4dに特異的な抗体を使用して決定することができる。標識したC4d抗体を使用することができ、一部の実施形態では、フローサイトメトリー分析を用いてこのC4d抗体を検出する。

## 【0012】

本開示は、個体における慢性の炎症性疾患あるいは炎症性状態の急性炎症性エピソードを診断、モニタリング、あるいは予測するためのキットについて記述し、これを可能にする。このキットは、補体経路成分に特異的な抗体および、この補体経路成分のレベルと補体経路成分のコントロールレベルとを比較するための手段を含むことができる。補体経路成分のコントロールレベルとの差異は、その個体が慢性の炎症性疾患あるいは炎症性状態の急性炎症性エピソードを有していることを示す。一部の実施形態では、SLEの急性炎症性エピソードが、診断、モニタリング、あるいは予測される。抗体は蛍光標識することができ、一部の実施形態では、モノクローナル抗体が使用される。

30

## 【0013】

本開示はまた、個体における慢性の炎症性疾患あるいは炎症性状態の急性炎症性エピソードを診断、モニタリング、あるいは予測するための、コンピューター読み取り媒体を提供する。このコンピューター読み取り媒体は、(a) 網状赤血球上の補体経路成分の決定に対応するデータを受け入れるためのコード、(b) 個体の網状赤血球上の補体経路成分に対する参照値を検索するためのコード、および(c) (a)のデータと(b)の参照値とを比較するためのコードを含むことができる。

40

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0014】

(発明の詳細な説明)

(序論)

本発明の方法によって、SLEを含む慢性の炎症性疾患あるいは炎症性状態の急性エピソード

50

ソードの診断および/またはモニタリングが可能となる。この開示は、網状赤血球上の補体経路成分のレベルを用いて、慢性の炎症性疾患あるいは炎症性状態の急性エピソードの発生を診断、モニタリング、あるいは予測することができるという驚くべき発見を提示する。慢性の炎症性疾患あるいは炎症性状態（例えばSLE）の急性エピソードは、重大な健康問題であるため、これらの状態を比較的正確かつ早期に診断する必要がある。同様に、炎症性疾患あるいは炎症性状態の急性エピソードの発生をモニタリングあるいは予測する能力は、非常に重要である。

**【0015】**

本発明は、網状赤血球上の補体経路成分のレベルの決定を包含する。一部の実施形態では、補体経路成分C4dが決定される。

10

**【0016】**

本発明の方法は一部、未成熟赤血球（即ち網状赤血球）の表面上に沈着するC4dのレベルが、慢性炎症性疾患であるSLEに起因する急性炎症性エピソードに対する診断マーカーとして役立つものであり得るといふ、発明者らの発見に基づく。

**【0017】**

慢性の炎症性疾患あるいは炎症性状態の急性エピソードの発生あるいは予測される発生を診断する際に、サンプル中の網状赤血球の補体経路成分のレベルを決定する。この決定したものを次に、慢性の炎症性疾患あるいは炎症性状態を有していない個体、あるいは慢性の炎症性疾患あるいは炎症性状態の急性期にない個体の網状赤血球上にある補体経路成分の量と比較する。例えば、C4dなどの補体経路成分のレベルは、SLE患者の網状赤血球上で決定することができる。決定したものは次に、SLEを有していない個体あるいはSLEの急性期にない個体の網状赤血球上にある補体経路成分のレベルと比較して、SLEの急性エピソードあるいは発赤の発生を診断、モニタリング、あるいは予測する。

20

**【0018】**

慢性の炎症性疾患あるいは炎症性状態の急性エピソードを有する患者の疾患活動をモニタリングする際に、同じ決定を患者の血液サンプルにて行い、続いて過去に同一の患者から採取したサンプル中の網状赤血球表面上に存在する補体経路成分の量の決定値と比較する。

**【0019】**

本発明の別の用途は、ヒト疾患の過程で補体活性化をモニタリングすることである。現在の技術水準にある方法は、可溶性の補体成分C3および/またはC4の血清濃度もしくは血漿濃度の測定に依存している。しかし、この方法には不適切な点があることが判明している。例えば、C3ならびにC4は親分子であり、補体カスケードの活性化への前駆体である。C3ならびにC4の肝臓合成ならびに肝臓外合成の増加は、補体カスケード活性化の過程でのC3ならびにC4の異化作用の増加と平衡を保つことができ、その結果血清濃度において変化が誤って導かれるかあるいは変化が欠如する。さらに、C4の遺伝的欠失がよく証明されており、この欠失は合成能の欠如に起因するC4の血清/血漿濃度の異常な低下に帰結するが、このC4の血清/血漿濃度の異常な低下は、補体活性化の過程でC4の消費が増加したことに起因すると誤って解釈され得る。この開示で記載される発明は、C3d、C4d、ならびに網状赤血球等のような循環血液細胞の表面に接着する他のものなど、補体活性化のタンパク質産物の測定を基礎としている。これによって、反応物に対する活性化産物のレベルをモニタリングし、先に記載した可溶性C3ならびにC4の測定に潜在する弱点を除くことが可能となる。このように、補体経路活性化を診断あるいはモニタリングするために、網状赤血球上の補体経路成分のレベルを測定し、補体経路成分のコントロールレベルと比較することができる。

30

40

**【0020】**

（定義）

この開示で使用する「炎症性疾患あるいは炎症性状態」は、個体において炎症の増大を引き起こす任意の免疫疾患あるいは免疫状態を指す。炎症性疾患あるいは炎症性状態はまた、個体において炎症の増加を引き起こす任意の感染症あるいは感染状態を指す。一部の

50

実施形態において、炎症性疾患あるいは炎症性状態は、「慢性の炎症性疾患あるいは炎症性状態」である。慢性の炎症性疾患あるいは炎症性状態は、数週間、数ヶ月、あるいはそれ以上の期間の後も消散しない炎症性状態である。慢性の炎症性状態は、急性炎症性状態に続くことがあり得るか、あるいは一部の疾患あるいは状態に関しては、急性の炎症性疾患あるいは炎症性状態が存在することなく発生し得る。炎症性疾患あるいは炎症性状態には以下が含まれる。：全身性エリテマトーデス（狼瘡あるいはSLE）、慢性関節リウマチ、脈管炎（ならびにヴェグナー肉芽腫症のようなその特殊なもの。）、強皮症、筋炎、血清病、移植片拒絶、鎌状赤血球貧血、痛風、子癩前症などの妊娠の合併症、多発性硬化症、心臓血管疾患、C型肝炎感染のような感染症、など。また、これらの疾患あるいは状態の各々を、慢性の炎症性疾患あるいは炎症性状態として記載することができる。

10

## 【0021】

この開示で使用される「急性炎症性エピソード」は、免疫反応の増大を指す。急性炎症の症状には、赤み、発熱、腫張、痛み、ならびに関節動作不全等の機能不全が含まれる。慢性の炎症性疾患あるいは炎症性状態の急性炎症性エピソードは、以下の点で慢性の炎症性疾患あるいは炎症性状態の典型的症状と異なる。急性炎症反応中に、肝臓は、血流内で検出される急性期タンパク質あるいは急性期反応物を合成することが多い。急性期反応物の存在によって、急性炎症性状態が体内で発生していることが示されるが、これらは特定の急性炎症性エピソードに関する診断的特徴ではない。急性期反応物には、C反応性タンパク質（CRP）； 1 アンチトリプシン； 1 アンチキモトリプシン； 2 マクログロブリン；ならびにフィブリノーゲン、フィブリン、プロトロンビン、トロンビン、第V因子ならびにプラスミノゲンなどの凝固因子；補体タンパク質、ならびに血清アミロイドタンパク質が含まれる。さらに、急性炎症性エピソードの過程で、例えば好中球ならびにマクロファージなどの局所的炎症性細胞が、多数のサイトカイン類を血流内に放出し、その最も顕著なものはIL-1、IL-6、IL-11、ならびにTNFである。

20

## 【0022】

「リアルタイム診断」は、炎症あるいは急性炎症症状が発生している間の急性炎症性エピソードの診断を指す。網状赤血球は赤血球に成熟する前のわずか1～2日間しか存在しないため、網状赤血球上のマーカーのモニタリングはリアルタイム診断を提供する。

## 【0023】

この開示で使用する「網状赤血球」は、未成熟な赤血球を指す。網状赤血球は通常、個体から血液サンプルを採取することによって得られる。一部の実施形態では、網状赤血球は個体の血液サンプルから単離される。

30

## 【0024】

この開示で使用する「補体経路あるいは補体系」は、高度に調節された様式で相互作用して多数の体液性免疫ならびに炎症のエフェクター機能を提供し、それによって細菌ならびに真菌感染に対する主要な防御機構として働く、30以上の機能的に関係するタンパク質の複合ネットワークを指す。このタンパク質系は、古典経路（抗体存在下）、あるいは第2経路（抗体非存在下）、およびレクチン経路という3つの別個の経路を介して、外来の生物による進入に対して作用する。活性化されると、各経路内のタンパク質は、反応を開始させた外来抗原を根絶するために意図された様々な機能を果たす複数分子複合体への経時的自己集合に関係するカスケードを形成する。補体経路の概説については、SimおよびTsiftoglou, Biochem. Soc. Trans. 32: 21-27 (2004)を参照する。

40

## 【0025】

古典経路は通常、外来の粒子に抗体が結合することによって誘発される。これは、C1、C4、C2と称される、古典経路独特のいくつかの成分から構成される。連続的に、C1qが抗原抗体複合体に結合してC1rおよびC1s（両方ともセリンプロテアーゼである。）が活性化され、活性化されたC1sがC4およびC2を切断して、それぞれC4aとC4b、ならびにC2aとC2bが生じる。フラグメントC4bおよびC2aは集合し

50

てC4b2aを形成し、これはタンパク質C3を切断してC3aとC3bにして、古典経路の活性化は完了する。フラグメントC4bおよびC3bは、第I因子によってさらに分解される。この因子はC4bを切断してC4dを作り、さらにC3bを切断してiC3b、続いてC3dを作る。このように、補体古典経路の活性化によって、C4d、iC3b、ならびにC3dなどの多数のフラグメントが、免疫複合体上あるいは他の標的表面上へ沈着することが可能となる。当該標的には、例えばリンパ球ならびに他の白血球、赤血球、ならびに血小板など、血液中を循環する細胞が含まれる。

#### 【0026】

第2補体経路の活性化は、C3b（あるいはC3i）が、例えば微生物の細胞壁あるいは他の表面成分に結合したときに開始される。次に、第2経路のタンパク質B因子が細胞に結合したC3bに結合してC3bBを形成する。次に、D因子がB因子を切断してBbおよびBaとし、C3bBbを作る。続いて、プロベルジンと呼ばれる血清タンパク質がBbに結合してC3bBbPを形成し、これはC3を分解してC3aとC3bにするC3転化酵素として機能する。

10

#### 【0027】

レクチン補体経路は、マンナン結合レクチンあるいはマンナン結合タンパク質(MBP)によって仲介される。MBPは、多数の微生物炭水化物にて認められるマンノース基に結合するタンパク質である。MBPは、古典補体経路におけるC1qと機能的に等価であるようである。レクチン経路の活性化は、MBPが微生物炭水化物のマンノース基に結合した時に開始される。次に、MASP1ならびにMASP2(古典経路におけるC1rならびにC1sと機能的に等価。)と呼ばれる、さらに2つのレクチン経路タンパク質がMBPに結合する。このMASP1/MASP2/MBL複合体は、古典補体経路のC1と類似する活性を持つ酵素を形成し、これはC4およびC2を切断し、C3を分解してC3aとC3bにするC3転化酵素であるC4bC2aを作ることができる。このC3転化酵素は、補体経路成分を切断し、活性化して膜攻撃複合体(MAC)を形成する。このMACは、細菌細胞壁に孔を形成し、細菌細胞を溶解させる。

20

#### 【0028】

この開示で使用する「補体経路成分」には、例えば、C1、C4、C2、C3などの、古典補体経路、第2補体経路、ならびにレクチン補体経路のタンパク質、およびこれらのフラグメント(例えばC1q、C1r、C1s、C4a、C4b、C2a、C2b、C4bC2a、C3a、C3b、C4c、C4d、iC3b、iC4b、C3d、C3i、C3dg)が含まれる。さらに、C5、C5b、C6、C7、C8、C9、C1inh、MASP1、MASP2、MBL、MAC、CR1、DAF、MCP、C4結合タンパク質(C4BP)、タンパク質H因子、B因子、C3bB、D因子、Bb、Ba、C3bBb、プロベルジン、C3bBb、CD59、C3aR、C5aR、C1qR、CR2、CR3、ならびにCR4、加えて、この開示に具体的に列挙されていない他の補体経路成分、受容体、およびリガンドが含まれる。

30

#### 【0029】

この開示で使用する「補体経路成分のコントロールレベル」は、一部の実施形態において、慢性の炎症性疾患あるいは炎症性状態に罹患していない個体に由来する細胞上の補体経路成分のレベルを指す。コントロールレベルもまた、個体の一集団を分析することによって決定することができる。他の実施形態では、補体経路成分のコントロールレベルは、慢性の炎症性疾患あるいは炎症性状態を有しているが、その疾患の急性期にはない個体に由来する。一部の実施形態において補体経路成分のコントロールレベルは、診断が求められる個体あるいは疾患をモニタリングされている個体と、同一の個体に由来するが、別の時点で得られる。また、補体経路成分のコントロールレベルは、コンピューター読み取り媒体にて、補体経路成分に関する参照値として使用することができる。

40

#### 【0030】

この開示で使用する「コントロールレベルとの差異」は、当業者が用いる統計分析法によって判定される、統計的に有意な差異を指す。コントロールレベルとの差異は、補体経

50

路成分のコントロールレベルと、診断あるいは他の情報が求められる個体に由来する補体経路成分のレベル（すなわち、実験レベル）との間の、統計的に有意な差異を指す。当業者は、多くの方法が、差異が統計的に有意であるか否かを判定するために利用可能であり、使用される特定の方法が本発明を制限するものではないことを、理解する。

#### 【0031】

この開示で使用する「全身性エリテマトーデス」、「SLE」、あるいは「狼瘡」は、多臓器が関与する始原型の自己免疫疾患である。この抗自己反応は、様々な核ならびに細胞質の細胞成分に対する自己抗体によって特徴づけられる。これらの自己抗体はそれぞれの抗原に結合し、循環して最終的には組織に沈着する免疫複合体を形成する。この免疫複合体の沈着とその結果生じる補体系の活性化が、慢性炎症ならびに組織損傷を引き起こす。

10

#### 【0032】

SLEは、一連の発赤あるいは疾患の急性期へと進行し、その後沈静する。SLE発赤の症状は、患者間で、また同一の患者においてさえも著しく異なるものであり、これには、倦怠感、発熱、対称性関節痛、ならびに光過敏性（短時間日光に当たった後、発疹を発症する）が含まれる。SLEの他の症状には、脱毛、粘膜の潰瘍、胸痛および滑膜炎を導く心臓ならびに肺内層の炎症、滑液の疼痛性炎症が含まれる。狼瘡では赤血球、血小板、ならびに白血球が標的となり得、貧血ならびに出血問題に帰着する。より重篤な場合、免疫複合体の沈着ならびに血管の慢性炎症が、腎臓の関与、場合によっては透析あるいは腎臓移植を必要とする腎不全を導くことがあり得る。血管は、SLEにおける自己免疫の反

20

#### 【0033】

この開示で使用する「全身性硬化症あるいは強皮症」は、炎症ならびに線維症、および血管、皮膚、消化管、肺、心臓、ならびに腎臓の変性変化によって特徴づけられる結合組織の慢性疾患である。強皮症は障害を起こし、かつ生存を脅かす疾患である。強皮症を有する患者の分類のための判断基準が開発されている（Masi AT, Rodnan GP, Medsger TA Jr, et al. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arth Rheum* 1980; 23: 581-590）。これらの判断基準は調査研究において多数の患者を記述するために意図されたもので、個々の患者を診断するためのものではない。主要な判断基準は、指に隣接する任意の部位における強皮症的皮膚変化（皮膚の肥厚）である。任意の2つあるいは3つのより副次的な判断基準 [強指症（指を含む皮膚肥厚）、指点食癬痕（digital pitting scar）、両基底肺間質線維症（bibasilar pulmonary interstitial fibrosis）] が追加されると、診断の感度は上昇する。しかし、明らかに強皮症を有する個体の10%近くがこれらの判断基準を満たさない（Medsger TA Jr. Comment on scleroderma criteria cooperative study. : Black CM, Myers AR, eds. *Current Topics in Rheumatology: Systemic Sclerosis*. New York: Gower Medical Publishing, 1985: 16-17）。

30

40

#### 【0034】

ある時点での強皮症患者の現状あるいはその患者の疾患の「重篤度」は、不可逆的な変化あるいは「損傷」と、潜在的に可逆的な変化あるいは「活動」とのいくつかの組み合わせを表す。疾患初期の炎症は、後の線維症ならびに癬痕を導く。もし炎症活動を正確に検出することができれば、早期の介入によって将来的な不可逆的損傷を予防することができる場合がある。しかし、臨床医が疾患活動から疾患損傷を区別するのは困難であることが多い。一部これは、活性の臨床的証拠が極度に繊細であり得るからである。加えて、信頼性の高い炎症の検査マーカーが存在しない。個々の患者、および臨床試験の両方において

50

、疾患の自然暦を評価する際、ならびに介入の有効性を測定する際、疾患損傷および疾患活動の横断的かつ縦断的検査が必須である。この障害の概要は、Medsger TA Jr. Systemic sclerosis (scleroderma): clinical aspects. Koopman WJ, ed. Arthritis and Allied Conditions. 13th ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1997: 1433 - 1464にて、確認することができる。

【0035】

この開示で使用される「肝炎」という語は、一般に、肝臓の炎症によって特徴づけられる疾患あるいは状態に関係する。「C型肝炎」という語は、より具体的に、C型肝炎ウイルス(HCV)による感染に関係する。C型肝炎ウイルスの宿主への進入は、通常、非経口的手段によるものであり、典型的には血液と血液とが接触することによってこの進入が成立する。多くの例において、HCVによる感染は慢性的なものであり、重篤な肝機能不全や死を導くことがあり得る。C型肝炎ウイルス感染の症状には、腹痛、食欲不振、肝硬変、自己免疫合併症、肝癌、クリオグロブリン血症、不安感、関節炎、腹水(胃領域における膨満)、霧視(blurred vision)、悪寒、暗色尿、性欲減退、うつ、眩暈感、皮膚乾燥、浮腫(手足ならびに脚部の腫脹)、過剰出血、ガス過剰、眼ならびに視角の異常(霧視あるいはドライアイ)、疲労、発熱、インフルエンザ様症状、胆石、灰色、黄色、白色、あるいは淡色の便、頭痛、肝臓痛(肝臓領域における疼痛あるいは不快感)、のぼせ、消化不良、関節の炎症、不眠症、過敏症、痒み、黄疸(眼および/または皮膚の黄変)、関節痛、腎臓疾患、扁平苔癬(皮膚疾患)、気分の変化あるいは動揺、物忘れ、精神的混乱、月経異常、筋肉疼痛、吐き気、神経障害、発疹/赤班、手掌紅斑、リウマチ様症状、熱あるいは寒冷過敏性、睡眠障害、治癒あるいは回復の遅延、日光過敏症(晩発性皮膚ポルフィリン症)、唾液腺炎(唾液腺の炎症)、疾患/インフルエンザに対する羅病性、発汗、眩暈、嘔吐、水分貯留、衰弱、体重増加、体重減少、が含まれるがこれらに限定されない。

【0036】

この開示で使用するHCV感染の「自己免疫合併症」は、患者体内の自己免疫反応の活性化に関係し、これはHCVの急性エピソードである。この反応は一般に肝臓に関係し、疲労、微熱、ならびに黄疸を引き起こすが、肝臓外組織に関係する場合もあり、他の症状：無月経(月経期の欠如)、血性の下痢(潰瘍性大腸炎に起因する。)、腹痛、関節炎、発疹、貧血、糸球体腎炎(腎疾患の一形態)、ドライアイ、角結膜炎、モーレン潰瘍、ならびに口渇、を引き起こす。

【0037】

この開示で使用する「クリオグロブリン血症」は、一般に、血中にクリオグロブリンという免疫グロブリンを有する状態を指す。クリオグロブリン血症もまた、HCVの急性エピソードである。低温で、これらのクリオグロブリンはゲルとなり、血管の炎症を引き起こす場合がある。

【0038】

また、HCV急性エピソードの診断は、特殊な治療法を用いるこの疾患の処置に関連し得る。この開示で使用する、C型肝炎感染に対する「特殊な治療」には、インターフェロン、リバビリン、ならびにPEGインターフェロンを含む抗ウイルス薬の投与が含まれるが、これらに限定されない。

【0039】

この開示で使用する「鎌状赤血球貧血」は、例えばヘモグロビンS(鎌状ヘモグロビン)ならびにHbC、HbD、HbO-Arabなどのヘモグロビタンパク質における異常によって引き起こされる遺伝病を指す。また、鎌状赤血球貧血という語には、鎌状赤血球 $b^0$ サラセミア、ヘモグロビンSC病、あるいは鎌状赤血球 $b^+$ サラセミアが含まれる。鎌状赤血球貧血は、変異の存在に関して患者のDNAを配列決定することによって診断することができる。鎌状赤血球貧血における赤血球は、円盤型で脆弱かつ柔軟性に欠ける

10

20

30

40

50

ものとなり、例えば関節痛ならびに他の骨疼痛、ならびに疲労、息切れ、心拍数増加、成長および成熟期遅延、感染症の罹患性、下肢の潰瘍（青年期ならびに成人にて）、黄疸、骨痛、腹痛発作、発熱など、この疾患の様々な症状を導く。

【0040】

鎌状赤血球貧血は、損傷した赤血球が分解した場合（溶血発作）、あるいは脾臓が肥大して赤血球を捕捉した場合、（脾性分画症性発症）、あるいはある種の感染によって骨髄が赤血球の産生を停止した場合（無形成性発症）に、生命を脅かすもの、あるいは急性のものとなることあり得る。発症が繰り返されることで、腎臓、肺、骨、眼、ならびに中枢神経系に損傷が引き起こされることがあり得る。また血管閉塞ならびに臓器損傷によって、急性疼痛性のエピソードが引き起こされることがあり得る。生存中のある時点でほぼ全ての患者に発生する、これらの疼痛性発症は、数時間あるいは数日間継続することがあり得、背中の骨、ならびに長骨、胸部に影響を及ぼす。

10

【0041】

この開示で使用する「移植手順」は、例えば心臓あるいは肺、腎臓、角膜、肝臓などの臓器、あるいは細胞の、供与者から受容者への移植を指す。好ましい実施形態において、供与者はヒトであり、かつ受容者はヒトである。一部の実施形態において移植処置とは骨髄移植であり、ここでは健康な骨髄が、供与者から、骨髄の機能を失った受容者、あるいは白血病などの血球細胞に関係する疾患を有する受容者に移植される。

【0042】

「移植の合併症」には、移植片拒絶、対宿主移植片病（GVHD）、ならびに感染が含まれ、移植手順の急性エピソードである。移植手順の合併症に伴う、網状赤血球上の補体経路成分の変化の同定は、より有効でより標的化した治療介入を導き得るか、あるいは移植手順の成果を予測するために利用され得る。

20

【0043】

この開示で使用する「妊娠」という語は、一般に、その体内に出産前の幼体を含んでいる状態に関係する。通常、妊娠は受胎から出産まで滞りなく進行する。しかし、妊娠には合併症を伴う場合があり、この合併症には以下の1つ以上が含まれるが、これらに限定されない。：胎児の出生時欠損、子宮外妊娠、出血、流産、羊水消失、妊娠性糖尿病、トキソプラズマ症、B群連鎖球菌関連、RH病、産科性胆汁うっ滞（cholestasis）、高血圧、子宮脱、つわり、妊娠性高血圧症、前置胎盤、胎児切迫、枯死卵、妊娠悪阻、異常分娩、類線維腫、ならびに子癇前症。これらの合併症は、網状赤血球上の補体経路成分のレベルを決定することによって診断、あるいはモニタリング、予測することのできる妊娠の急性エピソードである。この開示で使用する「子癇前症」あるいは「妊娠中毒症」あるいは「妊娠性高血圧」は、妊娠中の腫脹、血圧上昇、ならびに尿中タンパク質の発生を指す。子癇前症の症状には、以下が含まれるが、これらに限定されない。：浮腫、1週間に2ポンドを超える体重増加、頭痛、尿排出減少、悪心、吐き気、顔面膨張、高血圧、興奮、視力変化、腹痛。子癇前症は、全身性エリテマトーデス（「狼瘡」あるいは「SLE」とも呼ばれる。）ならびに抗リン脂質症候群（anti-phospholipid syndrome；「抗リン脂質症候群（antiphospholipid syndrome）」あるいは「APS」とも呼ばれる。）を含む、特定の自己免疫疾患に関連する。この開示で使用する「抗リン脂質症候群」あるいは「APS」は、身体がリン脂質を外來のものとして認識し、これらに対する抗体を産生する自己免疫疾患を指す。APSはしばしば、反復性の妊娠喪失を有する女性の約5人に1人に存在する、抗リン脂質抗体による妊娠中の胎児喪失に関係する。これの原因はわかっていないが、母体内で血塊ができることに起因する可能性がある。

30

40

【0044】

妊娠中の合併症は、特に狼瘡ならびにAPSなどの自己免疫疾患に伴うものは、類似した症状を示すものが多いので、診断が困難であることが多い。さらに、狼瘡妊娠に伴う合併症は特に、これらが漠然としたものでありかつ、複数の様態で疾患が患者に存在するため、他の妊娠の合併症と識別することが困難であることが多い。「抗体」は、免疫グロブ

50



ことができる。また、遺伝子導入マウスあるいは他の哺乳類などの他の生物体を使用して、ヒト化抗体あるいはヒト抗体を発現させることもできる（例えば米国特許第5,545,807号、同第5,545,806号、同第5,569,825号、同第5,625,126号、同第5,633,425号、同第5,661,016号、Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368:812-13 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14:845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826 (1996); ならびに Lonberg & Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995) を参照)。あるいは、ファージディスプレイ法を用いて、選択した抗原に特異的に結合する抗体ならびにヘテロマーFabフラグメントを同定することができる（例えば McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990); Marks et al., *Biotechnology* 10:779-783 (1992) を参照する）。また、二重特異性の（すなわち、2つの異なる抗原を認識することができる）抗体を作製することができる（例えば WO 93/08829、Traunecker et al., *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991); ならびに Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121:210 (1986) を参照）。また抗体は、ヘテロ結合体（例えば、2つの共有結合的に結合した抗体）、あるいは免疫毒素である

#### 【0048】

一実施形態において、抗体は「エフェクター」部分に結合している。エフェクター部分は多数の分子であることができ、これには診断検査にて使用するための放射活性標識あるいは蛍光標識などの標識部分が含まれる。

#### 【0049】

抗体に「特異的に（あるいは選択的に）結合する」、あるいは抗体に対して「特異的（あるいは選択的）免疫反応性がある」という語句は、タンパク質あるいはペプチドを指す場合に、しばしばタンパク質ならびに他の生物性物質の異種集合体において、そのタンパク質の存在について確定的な結合反応を指す。即ち、設定した免疫分析状態の下で、特異的な抗体は、バックグラウンドの2倍以上、より典型的にはバックグラウンドの10から100倍より大きく、特定のタンパク質に結合する。当該状態下での抗体への特異的な結合には、特定のタンパク質に対する特異性に関して選択された抗体が必要とされる。例えば、補体経路成分、あるいは白血球のマーカー、もしくはこれらの多型改変体、対立遺伝子、相同分子種ならびに保存的に改変された改変体、もしくはこれらのスプライシング改変体、もしくはこれらの部分に対して惹起されたポリクローナル抗体を選別して、補体経路成分あるいは白血球のマーカーに対して特異的な免疫反応性があり、他のタンパク質には特異的な免疫反応性がないポリクローナル抗体のみを得ることができる。他の分子と交差反応する抗体を除くことによって、この選別を達成し得る。様々な免疫アッセイ様式を用いて、特定のタンパク質に対して特異的な免疫反応性のある抗体を選別し得る。例えば、一タンパク質に対して特異的な免疫反応性のある抗体を選択するために、固相ELISA免疫アッセイは日常的に用いられている（特異的な免疫反応性を判定するのに使用することのできる免疫アッセイの様式ならびに条件の記述については、例えば Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988) を参照)。

#### 【0050】

「抗原」は、抗体によって認識され、結合される分子であり、例えばペプチド、炭水化物、有機分子、あるいは糖脂質ならびに糖タンパク質などのさらに複雑な分子がある。抗体結合の標的となる抗原の部分は抗原決定基であり、1つの抗原決定基に対応する小さな

官能基はハプテンと呼ばれる。

【0051】

「標識」は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、あるいは化学的な手段によって検出可能な組成物である。例えば、有用な標識には、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、蛍光色素、高電子密度試薬、酵素（例えばELISAにて一般的に使用されるもの。）、ビオチン、ジゴキシゲニン、あるいはハプテンならびにタンパク質（これらには、抗血清もしくはモノクローナル抗体を利用できる）が含まれる（例をあげると、例えば放射活性標識あるいは蛍光標識を抗体内に取り込ませることによって、補体経路成分あるいは白血球マーカーに対して特異的な抗体が検出可能となり、これらを使用して、標識した抗体に対して特異的な反応性を示す、補体経路成分あるいは白血球マーカーを検出することができる）。また

10

【0052】

「接触させる」あるいは「接触」という語は、この開示において、以下の語と交換可能なものとして使用される。：組み合わせる、加える、混合する、通過させる、共にインキュベートする、～上を流れる、その他。

【0053】

「免疫アッセイ」という語は、ある抗原に特異的に結合する抗体を使用するアッセイである。免疫アッセイは、抗原を単離、標的、および/または定量するために、特定の抗体の特異的結合特性を利用するということによって、特徴づけられる。

20

【0054】

両方の例において、「決定、あるいは決定する」ならびに「量 (quantity)」についていう場合、物質の量 (amount) あるいは量 (quantity) の両方が含まれることが意図される。例えばC4dとC3dなど、1つより多くの補体経路成分を測定する場合、「決定、あるいは決定する」ならびに「量」は、さらにまたはあるいは、例えばC4dのC3dに対する比など、第1の補体経路成分の第2の補体経路成分に対する比を意味する。

【0055】

(網状赤血球上の補体経路成分のレベルの決定)

本発明は、患者から得た血液サンプルをもとに、サンプル中の網状赤血球上の補体経路成分のレベルを決定するためのアッセイの実施に係る。例えばC4dレベルなど、補体経路成分のレベルに関するアッセイは、PCT/US02/28910にて開示されており、これは、あらゆる目的のため、参考として本開示において援用される。

30

【0056】

血液サンプルは患者から得、EDTA（エチレンジアミン四酢酸）で処理して成分の活性化を抑制する。サンプルは常温あるいは冷温状態で保存する。アッセイは48時間以内に実施することが好ましい。

【0057】

一部の実施形態では、FACSを用いて網状赤血球を単離する。この方法は、網状赤血球がより成熟した赤血球よりも高量のRNAを有するという観察結果に基づいている。「FACS」という語は、蛍光活性化細胞選別を指し、その細胞の対象とする特定の分子の含量に従って細胞を選別する技法である。対象とする分子は、ある種の細胞、あるいは細胞のある状態に対して特異的なものであることができる。対象となる分子は、蛍光色素を直接結合することによって、あるいは、蛍光標識した二次分子（例えば、蛍光標識され、かつその対象とする分子に特異的に結合する抗体あるいはレクチンなど）に結合させることによって、蛍光標識することができる。このように、網状赤血球に特異的なマーカーあるいはRNA量を用いて、血液サンプル中の他の細胞、特に成熟赤血球から網状赤血球を単離することができる。好ましい実施形態において、RNAは蛍光色素を用いる染色によって検出され、網状赤血球は蛍光に基づいて成熟赤血球から選別される。RNAを染色するための蛍光色素には、チアゾールオレンジ、ならびにオーラミンOが含まれ得る。別の

40

50

好ましい実施形態では、網状赤血球は、トランスフェリン受容体抗体への結合に基づいて単離あるいは検出される。網状赤血球を単離するための方法ならびに、網状赤血球のFACS単離にて使用することができるマーカーは、当業者に公知であり、かつRiley et al., J. Clin. Lab. Anal. 15: 267-294 (2001) (あらゆる目的のために参考として本開示において援用される)にて確認される。

#### 【0058】

また、網状赤血球は、例えば、トランスフェリン受容体など網状赤血球に特異的な細胞表面マーカーを使用することによって、FACS以外の方法を用いて単離することができる。概説すると、患者から血液サンプルを得、白血球を除去する。残った血液細胞を洗浄し、続いて、トランスフェリン受容体抗体でコーティングしたビーズと共にインキュベートする。これを洗浄して結合しない細胞を除去し、続いて自家血漿を加えてビーズから分離する。この方法は、Lach-Trifilieff et al., J. Immunol. 162: 7549-7554 (1999)にて開示されており、これは、あらゆる目的のために参考として本開示において援用される。また、網状赤血球は比濁法を用いて単離することができる。

10

#### 【0059】

補体経路成分のレベルの決定は、フローサイトメトリー、網状赤血球溶解物を使用するELISA、放射免疫アッセイ、比濁法など、多数の方法によって行われ得る。本発明の一実施形態で補体成分C4dのレベルの決定は、フローサイトメトリーを用いて行われ、2つの分子それぞれに対し特異的なポリクローナルあるいはモノクローナル抗体を使用する直接的あるいは間接的免疫蛍光法によって得られた測定値を用いる。C4dなどの補体成分に対する抗体は、例えばQuidel Corp.から、市販されている。

20

#### 【0060】

抗体を使用して補体経路成分のレベルを測定する方法は、当業者に公知である。例えば、CR1ならびにC4dに関するこの種のアッセイの開発は、Freysdottir, et al., J. Immunol. Meth. vol. 135, 2005 (1991)にて記載されている。そのアッセイは、CR1ならびに、赤血球上のタンパク質断片C4dおよびC3dに関するフローサイトメトリー分析であり、比較的高量あるいは比較的低量のCR1を有する個体の同定を可能にするものとして記載された。

#### 【0061】

(慢性の炎症性疾患あるいは炎症性状態の急性エピソードの診断あるいはモニタリング)

30

慢性の炎症性疾患あるいは炎症性状態の急性エピソードを有する患者の診断は、補体経路成分の決定値を、例えば正常個体、あるいは急性炎症状態が存在しない時の慢性の炎症性疾患あるいは炎症性状態を有する個体などのコントロール被験体の網状赤血球表面上に典型的に存在する、これらの実体の量に関する基準値あるいは基準値範囲と比較することによって達成される。炎症性疾患あるいは炎症性状態の急性エピソードの診断の実例を実施例1にて提供する。正常個体において、C4dは、SLEを有する個体と比較して、コントロール個体の網状赤血球の表面上に比較的低レベルで存在する。間接免疫蛍光法を用いるフローサイトメトリー測定を用いると、健常個体における網状赤血球上のC4dの蛍光強度中央値(MFI)は、0から4.68(中央値1.08、SD=0.81)の範囲であった。反対に、SLEを有する個体は、幅広いスペクトルの網状赤血球結合C4d(R-C4d)レベル(蛍光強度中央値(MFI)=5.05; SD=8.53; 範囲: 0から66.81)を有していた。網状赤血球C4dレベルは、個々のSLE患者ごとに著しく変動しており、網状赤血球C4dレベルの増加は、疾患活動の増大に伴うものであった。

40

#### 【0062】

本発明の方法の大きな特徴は、患者の疾患活動をモニタリングすることが可能な点である。赤血球の寿命は約120日であり、網状赤血球は、例えば骨髄を離れて約0~2日後の未成熟赤血球である。よって、このアッセイあるいは方法の大きな特徴は、目下発生し

50

ている、あるいは過去0～2日間あるいはせいぜい1週間以内に発生した炎症性疾患あるいは炎症性状態の活動を示す、もしくは反映するということである。また、この方法を用い、網状赤血球表面上の補体経路成分の増加を検出することによって、慢性の炎症性疾患あるいは炎症性状態の急性エピソードの発生を予測することが可能である。

#### 【0063】

(キット)

疾患活動を診断あるいはモニタリングあるいは予測するためのアッセイを行うためのキットは、本発明の一部である。上記キットは、この開示で記載する方法を実行するのに必要な任意の様々な試薬を利用する。免疫蛍光アッセイを用いる例として、キットは一般に、補体経路成分に対して特異的なモノクローナル抗体と蛍光部分との結合体を含有する。また、補体経路成分に対して特異的なポリクローナル抗体を利用することもできる。また、このキットは、特にフローサイトメトリーあるいはFACS法にて使用するために、網状赤血球を検出あるいは単離するための試薬を含むことができる。また、このキットは、例えば抗トランスフェリン抗体など、網状赤血球を単離するための抗体結合ビーズを含有することができる。また、このキットは、補体経路成分のコントロールレベルあるいは当該コントロールレベルを決定する手段を含有することができる。さらに、このキットは、例えば緩衝液、放射標識抗体、比色分析用試薬、ならびに使用説明書など、この種のアッセイを実行するのに必要な場合のある他の物を含有する。

10

#### 【0064】

これらの方法ならびにキットにて使用するための抗体は、公知である。例えば、抗C4d抗体は、San Diego, California (#A213)のQuidel Corp. から入手可能であり、Rogers, J., N. Cooper, et al., PNAS 89:10016-10020, 1992; Schwab, C. et al., Brain Res 707(2):196-199, 1996; Gemmell, C. J. Biomed Mater Res 37:474-480, 1997; ならびに Stoltzner, S. E., et al., Am J Path 156:489-499, 2000に全般的な記述がある。

20

#### 【0065】

あるいは、補体経路成分値の決定は、多数の、ELISAなどの標準測定法を用いて実行され得る。蛍光標識の代わりに、放射性標識ならびに比色標識など、他の種類の標識を使用し得る。当該他の種類のアッセイを用いる場合、キットは、放射性ヨウ素、アビジン、ビオチン、あるいはパーオキシダーゼのような酵素などの適切な標識を結合した、補体経路成分に特異的なモノクローナル抗体あるいはポリクローナル抗体を含有する。

30

#### 【0066】

一部の実施形態では、1つより多くの、網状赤血球上の補体経路成分の決定が行われ、この決定は、SLEの急性エピソードを含む急性炎症状態を診断あるいはモニタリングあるいは予測するために利用される。

#### 【0067】

(自動化およびコンピュータソフトウェア)

先に記載した、網状赤血球上の補体経路成分の決定、ならびに診断法ならびに疾患活動のモニタリング法あるいは予測法は、手作業で実行することができるが、便利上自動化システムおよび/または自動化装置を使用して実行されることが多く、ここで血液サンプルは自動的に分析されて必要な決定が行われ、例えばコントロールレベルなどの、基準値あるいは参照値との比較が、この目的に適したコンピュータソフトウェアを使用して自動的に行われる。

40

#### 【0068】

このように、一側面において本発明は、個体の慢性の炎症性疾患あるいは炎症性状態の急性エピソードを診断する、あるいはモニタリングするための方法を包含し、この方法は以下を包含する：(a)網状赤血球を含有する、個体に由来する血液サンプルにおいて、このサンプル中の網状赤血球表面上に沈着する補体経路成分を自動的に決定する工程、お

50

よび ( b ) 上記決定値を、網状赤血球上の、それぞれの補体経路成分に関する参照値と自動的に比較する工程。

【 0 0 6 9 】

例えば S L E の急性エピソードの診断などのための、本発明の方法にて使用するためのコンピュータソフトウェアあるいはコンピューター読み取り媒体は、以下を含有する。 :

( 1 ) : 以下を含む、コンピューター読み取り媒体 :

( a ) 網状赤血球表面に沈着する、例えば C 4 d などの補体経路成分の決定値に対応するデータを受け取るためのコード。 ;

( b ) 個体の網状赤血球表面に沈着する、例えば C 4 d などの補体経路成分の参照値を検索するためのコード。 ; ならびに

( c ) ( a ) のデータと ( b ) の参照値とを比較するためのコード。

【 0 0 7 0 】

本発明の実施形態では、1つ以上の参照値を、デジタルコンピューターに關係するメモリ内に保存し得る。補体経路成分のレベルの決定値に相應するデータを ( 例えば適切な分析機器等から ) 得た後、デジタルコンピューターは、補体経路成分のデータを1つ以上の適切な参照値と比較し得る。この比較が行われた後、デジタルコンピューターは、補体経路成分決定値に相應するデータが、例えば S L E などの慢性炎症疾患あるいは状態の急性エピソードに關係するか否かを自動的に判定し得る。

【 0 0 7 1 】

当業者は、急性 S L E エピソードを含む急性炎症性エピソードの診断のために、網状赤血球上の1つより多くの補体経路成分のレベルを分析するよう、コンピュータプログラムを改変することが可能であることを理解する。また当該分析を利用して、急性 S L E エピソードを含む急性炎症性エピソードの発生を予測することができる。

【 0 0 7 2 】

従って、本発明の一部の実施形態は、デジタルコンピューターが実行するコンピュータコードによって具体化される場合がある。デジタルコンピューターは、任意の、Windows ( 登録商標 ) ベースのオペレーションシステムのような標準的なあるいは専門のオペレーションシステムを使用する、超小型、小型、あるいは大型フレームのコンピューターである場合がある。コードは、任意の適切なコンピューター読み取り媒体上に保存され得る。コンピューター読み取り媒体の例には、磁気、電子、あるいは光学製の、ディスク、テープ、スティック、チップなど等が含まれる。またコードは、当業者によって、C、C++などの任意の適切なコンピュータプログラム言語で書き込まれ得る。

【 0 0 7 3 】

以下の実施例は、説明のみのために提供されるものであって、限定のためではない。当業者は、様々な重要でない変数が、本質的に同一の結果を得るために変更あるいは改変され得ることを、容易に理解する。

【 実施例 】

【 0 0 7 4 】

( 実施例 1 : S L E を有する患者は、網状赤血球表面上の C 4 d レベルが増加している。 )

全身性エリテマトーデス ( S L E ) は、予測不能な多臓器発赤 ( すなわちこの疾患の急性期 ) によって特徴づけされる疾患である。血清 C 3 ならびに C 4 、ならびに可溶性成分活性化産物の測定を S L E の過程のモニタリングに利用するのには、限界のあることが示されている。しかし、有意なレベルの C 4 由来のリガンドが S L E 患者の赤血球の表面上に沈着している。赤血球 C 4 d ( E - C 4 d ) の測定は、S L E に関する有用な診断検査であると判断され、そして所与の患者における E - C 4 d レベルの変動は、疾患活動の変化を反映するということが見出された。

【 0 0 7 5 】

網状赤血球は赤血球の最も未熟な形態であり ( 産生後 0 ~ 2 日目 ) 、疾患活性期に骨髓から現れた場合、直ちに、高レベルの C 4 由来の活性化産物に暴露され、これを獲得する

10

20

30

40

50

。故に、任意の時点で循環する網状赤血球表面上のC4由来活性化産物のレベルを検査することで、SLE患者の現在の、ならびに差し迫った疾患活動に対する即座の手掛かりが得られる。SLE患者(n=256)ならびに健常コントロール(n=116)の網状赤血球上のC4dを測定するため、二色フローサイトメトリー分析を実施した。図1のグラフならびに表1にて示した結果は、SLE患者では、網状赤血球結合C4d(R-C4d)が幅広い範囲で検出されたが(蛍光強度中央値(MFI)=5.05;SD=8.53;範囲:0から66.81)、他のADを有する患者(MFI=1.51;SD=1.35;範囲:0から6.90)あるいは健常コントロール(MFI=1.08;SD=0.81;範囲:0から4.68)ではそのようではなかったことを示していた。横断的に比較すると、SLE患者の平均R-C4dレベルは、他のADを有する患者(p<0.0001)あるいは健常コントロール(p<0.0001)よりも高かった。

【0076】

(表1:SLE患者、他の疾患を有する患者、ならびに健常コントロール由来の、R-C4蛍光強度中央値)

【0077】

【表1-1】

SLE患者番号	R-C4	他疾患患者番号	R-C4	コントロール番号	R-C4
1001	2.11	3002	0.98	2003	0.47
1002	3.81	3003	2.73	2005	1.97
1003	29.52	3014	0.31	2006	0.88
1004	17.76	3021	3.47	2007	2.86
1006	31.86	3022	1.8	2009	2.65
1007	2.08	3028	1.55	2010	1.52
1008	4.28	3029	1.97	2011	1.04
1009	2.32	3030	2.05	2013	0.73
1010	5.5	3031	6.34	2017	0.9
1011	2.51	3032	1.88	2021	0.15
1012	0.9	3034	1.26	2022	1.29
1013	11.58	3035	2.86	2025	0.59
1014	4.21	3036	1.26	2026	0.59
1015	9.04	3037	1.48	2037	0.66
1016	2.06	3038	1.36	2038	1.34
1017	0.7	3039	0.81	2039	1.4
1018	1.94	3040	1.07	2040	1.12
1021	0.72	3041	0.73	2041	1.11
1022	1.41	3042(13015)	0.06	2042	1.11
1023	8.99	3043	0.95	2043	0.99
1027	2.43	3044	1.55	2045	1.43
1030	0.26	3045	0.83	2046	0.74
1031	2.93	3046	0.51	2047	1.58
1032	4.47	3047	0.88	2048	1.75
1034	6.45	3048	1.07	2049	2.62
1035	3.66	3049	5.33	2050	0.76
1036	44.39	3050	-0.03	2051	0.64
1037	1.25	3051	2.42	2052	1.67
1038	27.21	3052	1.07	2053	4.68
1039	3.34	3053	0.81	2054	1.45
1041	1.86	3054	3.13	2055	1.01

【0078】

【表 1 - 2】

SLE患者番号	R-C4	他疾患患者番号	R-C4	コントロール番号	R-C4
1042	6.72	3055	2.08	2056	1.91
1043	-0.38	3056	1.06	2057	1.62
1044	2.77	3057	0.96	2058	2.24
1045	3.58	3058	1.72	2059	1.51
1047	2.32	3059	1.8	2060	1.41
1048	3.19	3060	4.59	2061	1.49
1050	15.11	3061	3.42	2062	1.09
1052	10.65	3062	0.59	2063	3.23
1053	24.9	3063	1.37	2064	0.36
1054	40.66	3064	1.44	2065	0.76
1055	9.47	3065	1.44	2066	3.32
1056	1.79	3066	1.72	2067	2.81
1057	3.81	3067	0.96	2068	1.74
1059	17.84	4001	0.77	2069	0.81
1060	0.84	4002	0.15	2070	0.15
1061	1.46	4006	0.29	2071	0.66
1062	5.28	4007	0.92	2072	0.21
1063	3.74	4011	0.18	2073	-0.31
1064	3.61	4013	0.35	2074	0.37
1065	3.53	4017	1.53	2075	1.34
1066	36.64	4020	2.52	2076	0.28
1067(1114)	3.04	4021	3.36	2077	0.73
1071	0.78	4025	5.7	2078	0.39
1072	3.39	4026	2.01	2079	1.72
1073	3.18	4027	0.62	2080	0.82
1074	1.05	4028	1.98	2081	-1.24
1075	2.5	4030	2.01	2082	1.11
1078	7.72	4033	0.18	2083	2.17
1079	2.98	4034	1.9	2084	0.93
1080	4.16	4035	0.2	2085	1.21
1082	4	4036(13053)	0.56	2086	2.01
1083	3.22	4037	0.63	2087	0.44
1084	6.5	4038	0.65	2088	0.44
1085	1.04	4039	1.45	2089	-0.05
1086	-0.2	4040	0.92	2090	1.92
1089	0.84	4041	1.93	2091	1.79
1090	25.02	4042	0.15	2092	0.99
1091	1.63	4043	0.85	2093	2.1
1092	0.86	4044	2.12	2094	0.34
1093	5.55	4045	1.87	2095	1.1
1094	6.41	4046	7.75	2096	2.92
1095	7.67	4047	1.3	2097	1.47
1096	9.62	4048	2.08	2098	0.73
1097	41.23	5001	1.58	2099	1.13
1098	-0.21	5004	0.37	2100	1.53
1099	-0.11	5005	0.47	2101	1.06
1100	3.16	5006	1.84	2102	0.73

10

20

30

40

【表 1 - 3】

SLE患者番号	R-C4	他疾患患者番号	R-C4	コントロール番号	R-C4
1101	66.81	5008	4.11	2103	-0.09
1102	29.17	5009	2.83	2104	0.72
1103	1.75	5010	0.37	2105	0.55
1104	1.5	5011	1.64	2106	0.26
1105	14.77	5012	1.21	2107	0.83
1106	1.9	5013	2.68	2108	0.38
1107	1.29	5014	1.72	2109	0.37
1108	1.37	5015	1.21	2110	0.25
1109	1.6	5016	0.66	2111	0.44
1110	10.96	5017	3.6	2112	0.37
1111	1.07	5018	8.45	2113	0.4
1115	0.93	5019	17.6	2114	1.26
1116	1.51	6001	2.47	2115	0.44
1117	-0.87	6002	1.71	2116	0.75
1118	16.92	6003	1.72	2117	0.57
1119	0.42	6004	1.93	2118	0.71
1120	0.01	6005	0.77	2119	0.54
1121	16.92	6008	1.89	2120	0.48
1122	0.53	6009	0.56	2121	0.26
1123	0.55	6011	0.75	2122	0.92
1124	20.73	6012	0.91	2123	0.85
1125	8.97	6013	1.66	2124	0.24
1126	3.58	6014	1.84	2125	0.51
1127	2.1	6015	3.29	2126	0.45
1128	1.34	6017	0.33	2127	1.34
1129	4.84	6018	2.16	2128	1.31
1130	5.76	6019	-0.31	2129	1.31
1131	2.58	6020	0.5	2130	1.7
1132	18.36	6021	0.54	2131	1.17
1133	2.79	6022	0.42	2132	1.5
1136	9.65	6023	0.77	2133	1.28
1137	7.08	6024	10.55	2134	1.07
1138	0.97	6025	1.14	2135	0.84
1139	1.26	6026	1.06	2136	0.76
1140	1.32	6027	1.7	2137	1.5
1141	1.03	6028	0.65	2139	0.56
1142	3.79	6029	2.22	2141	0.81
1143	0.21	6030	3.21	2142	0.67
1145	1.17	6031	1.03	2143	0.76
1146	3.05	6032	1.43	2144	0.54
1147	5.74	6033	0.35	2145	0.36
1148	8.46	6034	1.19	2146	0.03
1149	1.27	6035	1.25	2147	0.44
1150	9.03	6036	0.73	2029	0.67
1152	5.46	7001	1.2	2148	2.01
1153	10.17	7002	0.61	2149	0.55
1154	3.69	7003	0.33	2154	0.84

10

20

30

40

【 0 0 8 0 】

【表 1 - 4】

SLE患者番号	R-C4	他疾患患者番号	R-C4	コントロール番号	R-C4
1155	1.73	7004	0.61	2156	1.15
1156	1.25	7005	0.41	2152	0.32
1157	5.74	8013	0	2155	0.56
1159	2.29	8021	1.56	2153	0.65
1161	1.19	8035	1.82	2150	0.99
1162	1.03	10001	6.9	2151	-0.02
1163	3.14	10002	1.02	2157	0.98
1164	2.56	10003	0.1	2158	1.29
1165	1.12	15002	1.01	2160	1.41
1166	1.1	15003	1.9	2159	0.65
1167	2.29	15005	0.79	2161	1.09
1168	2.44	15006	0.46	2162	-0.08
1169	0.16	17002	4.72	2163	1.65
1170	2.19	17003	2.02	2164	1.4
1171	1.94	17004	0.97	2165	0.98
1172	2.51	18001	0.91	2166	0.37
1173	3.48	18002	2.77	2167	0.55
1174	0.7	19001	0.31	2168	0.47
1176	1.92	13001	3.87	2032(2169)	0.89
1177	1.02	13003	0.73	2170	1.4
1178	2.97	13007	1.37	2171	0.57
1179	0.52	13008	1.45	2172	1.25
1180	1.63	13010	2.51	2173	0.58
1181	2.44	13011	0.95	2174	1.99
1182	4.86	13012	0.68	2175	0.16
1183	8.72	13015	0.06	2176	1.44
1184	0.18	13016	3.96	2177	1.07
1185(13025)	3.61	13017	1.82	2178	1.38
1186	2.93	13018	1.34	2179	0.78
1187	1.06	13019	3.36	2180	0.71
1188	3.27	13020	0.36	2181	0.83
1189(13037)	10.76	13021(1144)	1.56	2182	0.09
1193	1.21	13022	0.6	2183	0.63
1194	17.05	13023	1.92	2184	1.53
1195	1.56	13024(1151)	1.55		
1196	1.32	13026	4.36		
1197	1.92	13027	0.63		
1198	1.8	13028	1.47		
1199	1.49	13029	1.05		
1200	1.98	13030(2044)	0.43		
1201	1.47	13031	4.35		
1202	1.97	13032	1.51		
1203	0.8	13033	1.43		

10

20

30

40

【 0 0 8 1 】

【表 1 - 5】

SLE患者番号	R-C4	他疾患患者番号	R-C4	コントロール番号	R-C4
1204	6.34	13034	0.77		
1205	-0.21	13035	1.29		
1206	1.18	13036	2.18		
1207	0.9	13038	0.58		
1208	2.6	13039	8.96		
1209	22.72	13040	1.03		
1210	9.66	13041(1160)	0.91		
1211	0.75	13042	21		
1212	2.73	13043	0.36		
1213	5.15	13044(1190)	1.18		
1214	1.97	13045	1.37		
1215	3.07	13046(1175)	1.29		
1216	0.97	13047	0.53		
1217	1.9	13048	0.6		
1218	31.39	13050	0.53		
1219	1.27	13051	0.19		
1220	0.08	13054	0.31		
1221	1.62	13056	0.77		
1222	3.23	13057	2.57		
1223	1.2	13058	1.96		
1224	2.46	13059	1.45		
1225	1.22	13060	0.98		
1226	0.32	13061	2.67		
1227	0.18	13062	0.39		
1228	0.44	13065	0.27		
1229	1.26	13066	0.3		
1230	2.71	13067	38.3		
1231	0.79	13069	1.28		
1232	2.64	13070	1.77		
1233	0.88	13071	2.54		
1234	0.96	13074	1.98		
1235	5.59	13075	2.56		

10

20

30

40

【 0 0 8 2 】

【表 1 - 6】

SLE患者番号	R-C4	他疾患患者番号	R-C4	コントロール番号	R-C4
1236	2.71	13076	1.93		
1237	0.82	13077	1.2		
1238	0.53	13078	1.15		
1239	5.07	13079	3.85		
1240	0.24	13080	1.17		
1241	0.4	13081	1.77		
1242	0.54	13082	9.84		
1243	2.13	13084	3.51		
1244	8.03	13085	0.67		
1245	9.55	13086	3.83		
1246	0.34	13087(1294)	2.22		
1247	0.56	13088	7.88		
1248	0.41	13089	0.38		
1249	2.46	13090	2.51		
1250(13052)	0.5	13091	0.13		
1251	3.29				
1252	1.26				
1253	4.65				
1254	0.99				
1255	2.26				
1256	0.39				
1257	7.2				
1258(13055)	15.81				
1259	0.87				
1260	-0.52				
1261	1.2				
1262	1.43				
1263	2.58				
1264	1.79				
1266	11.86				
1267	0.9				
1268	0.51				

10

20

30

40

【 0 0 8 3 】

【表 1 - 7】

SLE患者番号	R-C4	他疾患患者番号	R-C4	コントロール番号	R-C4
1269	2.69				
1270	4.12				
1271	5.09				
1272(13063)	0.75				
1273	0.36				
1274(13064)	4.88				
1275(13068)	1.17				
1276	0.92				
1277	1.18				
1278	3.08				
1280	0.47				
1281	0.57				
1282	13.38				
1283	5.31				
1284	1.48				
1285	0.83				
1286	54.27				
1287	0.99				
1288	1.33				
1289	2.01				
1290	6.56				
1291	1.83				
1292	5.51				
1293	1.01				
1295	1.54				
1296	4.14				
1297	2.31				
1298	1.8				
1299	0.41				
1300	0.88				
1302(13073)	0.91				
1303	1.58				

10

20

30

40

【 0 0 8 4 】

【表 1 - 8】

SLE患者番号	R-C4	他疾患患者番号	R-C4	コントロール番号	R-C4
1304	2.25				
1305	1.74				
1306	4.15				
1307	1.77				
1308	3.65				
1309	2.4				
1310(13049)	1.5				
1311	13.09				
1312	3.18				
1313	7.28				
1315	9.55				
1316	10.15				
1317	1.59				
1318	7.1				

10

20

図 2 は、SLE 患者個々の FACS データの例を提供する。C4d レベルは左図に示し、一致するアイソタイプコントロールを右図に示す。赤血球はペレット化させ、PBS で洗浄し、抗 C4d もしくはコントロール抗体による染色のために分注した。二色フローサイトメリー分析を実施して、SLE 患者の網状赤血球上の C4d を測定した。モノクローナル抗体 (mAb) を  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で赤血球に加えた。RNA 結合色素を加えて、赤血球から網状赤血球を判別した。細胞を 4 で 20 分間インキュベートし、冷却した PSCB + 0.2% アジ化ナトリウムで洗浄した。Jackson ImmunoResearch Laboratories から入手した、二次抗体となる、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) 結合ヤギ抗マウス IgG (#115-096-062) を、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で細胞に加えた。細胞はインキュベートして洗浄し、PSCB + 0.2% アジ化ナトリウム中に再懸濁して FACS Calibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) を使用するフローサイトメリーによって分析した。免疫グロブリンの細胞に対する非特異的な結合は、アイソタイプコントロール抗体 MOPC 21 (ATCC から入手。) を使用する同一の分析を並行して行うことで決定した。網状赤血球に対する抗 C4d 結合は、4 分割した図の右上部分にて示されている。3 人の SLE 患者からの結果を示し、C4d 染色された網状赤血球は 93%、47.8%、ならびに 14.5% である。コントロールは網状赤血球への抗体結合を示さず、これは C4d 抗体の結合が特異的なものであることを示している。

30

40

## 【0085】

この R-C4 レベルを他の SLE 診断法と比較した。結果を表 2 に示す。最も一般的に用いられている 2 つの方法は、全身性狼瘡疾患活動指数 (Systemic Lupus Disease Activity Index; SLEDAI) (Bombardier, et al., Arth Rheum 35:630-40 (1992)) ならびに全身性狼瘡活動指標 (Systemic Lupus Activity Measure; SLAM) (Liang, et al., Arth Rheum 32:1107-18 (1989)) である。SLEDAI には、9 つの器官系を代表する 24 の項目が含まれている。変数は、病歴、理学的検査、および検査室検査によって得る。各項目は、関係する器官の重篤度に基づいて 1 から 8 まで得点される。例えば、口腔潰瘍は 2 点とさ

50

れ、発作は8点とされる。SLEDAIに含まれる検査値には、白血球数、血小板数、尿検査、血清C3、C4、ならびに抗dsDNAが含まれる。合計最大得点は105となる。SLAMには、11の器官系を代表する32項目が含まれる。項目は、有無だけを得点するのではなく、重篤度に基づいて1点から3点まで段階分けされる。SLAMの合計最大得点は86となる。SLEDAIとSLAMの両方とも、確認された信頼性の高いものであって、時間経過に伴う変化に対する感度のあることが示されており(Liang, et al.)、調査手順ならびに臨床試験において幅広く利用されている。これらの指数は、SLEの疾患活動の新たに提唱される血漿マーカーあるいは炎症マーカーの価値を試験するのに、特に有用である。

【0086】

(表2: R-C4およびSLE疾患活動)

【0087】

【表2】

R-C4レベル	SLEDAI	p値	SLAM	p値
第1四分位(<1.1)	1.34		4.56	
第2四分位(1.1~2.2)	2.51	<b>0.030</b>	5.05	N.S.
第3四分位(2.2~4.5)	2.90	<b>0.00003</b>	6.02	<b>0.06</b>
第4四分位(>4.5)	4.32	<b>0.00003</b>	6.93	<b>0.002</b>

164人のSLE患者の統計分析によって、R-C4dレベルは、SLEDAIおよびSLAMを用いて判定する臨床的疾患活動に相関することが示された。例えば表2を参照。特に、R-C4d > 4.5の患者(最高四分位)は、R-C4d < 1.1の患者(最低四分位)と比較して、有意に高いSLEDAI(p = 0.00003)ならびにSLAM(p = 0.002)を有した。このように、C4由来のリガンドを保有する網状赤血球は、SLE疾患活動の「即時メッセンジャー」として役立ち、疾患の差し迫った発赤を予測することができる。

【0088】

(実施例2: 網状赤血球上のC4dレベルは、疾患の発赤を予測することができる)

また、予測検査によって、健常コントロールのR-C4dレベルは、時間経過によらず著しく安定しているが、個々のSLE患者内では、R-C4dレベルが著しく変動していたことが示された。さらに、疾患活動の増大がR-C4dの増加を伴っていた。

【0089】

患者DCは、50歳の白人女性で、1976年にSLEと診断された。彼女の疾患は、関節炎、頬の発疹、発熱、胸膜炎、白血球減少症、血小板減少症、+ANA、dsDNA、SSA、SSB、スミス、ならびに血清C4の恒常的低レベルによって発現した。2002年2月13日、彼女は最近疲労が始まったことを医院へ訴えた。彼女に他の症状はなく、理学的検査は正常であった。彼女の血清C3は正常で血清C4は低かったが、それまでの値と著しく異なるわけではなかった。彼女は健康な様子であったが、彼女の疲労の増大がウイルス感染に起因するのか、あるいはSLE発赤に起因するのかは、不明であった。彼女の定期検査値は、この判別を行うのに役に立たなかった。また、彼女は、RBCの最も若い分画上のC4dレベルが高く、これは目下補体が活性化されており、SLE発赤の可能性のあることを示唆していた。例えば図3を参照。2ヵ月後、この患者は医院を訪れ、疲労の悪化ならびに倦怠感と共に、重篤な関節痛および関節の腫脹を訴えた。これらはSLE発赤に一致する症状である。抗炎症剤を処置したにも係わらず、これは2002年7月10日の通院まで続いた。この面談時に、68%の彼女の網状赤血球がその表面に存在するC4dを有しており、彼女の赤血球の全ての分画が高レベルのC4dを有していた。これは狼瘡の目下の活動、ならびにそれまで(その前120日間)の活動を示している。より強力な治療を始めると、これに応じて彼女の関節痛ならびに疲労は顕著に改善さ

10

20

30

40

50

れた。2002年8月1日までに、彼女の気分は良くなり、26%の網状赤血球のみが表面C4dを有していた。このケースは、網状赤血球が、狼瘡疾患活動の即時メッセンジャーとして、あるいは炎症活動のリアルタイム診断のために、どれほど役立つものであるかを例証している。

#### 【0090】

(実施例3：R-C4dレベルとSLE疾患活動との相関、大規模調査)

(方法)

(調査参加者)

調査参加者は全て18歳以上であり、文書によるインフォームドコンセントが行われた。性別あるいは人種による排除は行わなかった。University of Pittsburgh Institutional Review Board (ピッツバーグ大学施設倫理委員会)は、この調査を承認した。 10

#### 【0091】

SLE患者：1982年(Tan EM et al., Arthritis Rheum, 25:1271-1277(1982))もしくは1997年(Hochberg MC, Arthritis Rheum, 40:1725(1997))のAmerican College of Rheumatology改定基準を満たすSLEの持続性患者を、University of Pittsburgh Lupus Diagnostic and Treatment Center (ピッツバーグ大学狼瘡診断治療センター)への定期通院の間に、この調査へ動員した。患者で妊娠している者は除いた。患者らの定期治療の一部として、全ての患者は、1人の医師(SMもしくはAK)による問診あるいは理学的検査を受けた。これらの医師は、網状赤血球/赤血球結合補体についての結果を知らされていなかった。疾患活動は、全身性狼瘡活動指標(SLAM)(Liang MH et al., Arthritis Rheum, 32:1107-1118(1989))および、全身性エリテマトーデス疾患活動指数(SLEDAI)(Bombardier C, et al., Arthritis Rheum, 35:630-640(1992))の、紅斑性狼瘡におけるエストロゲンの安全性の全国調査(SELENA)版を用いて、通院時に評価した。 20

#### 【0092】

他の疾患を有する患者：無作為に選んだ、11の他の、リウマチ性疾患、炎症・自己免疫疾患、あるいは血液学的疾患を有する患者を動員した、これには、強皮症(n=43)、筋炎(n=30)、シェーグレン症候群(n=16)、慢性関節リウマチ(n=32)、ヴェグナー肉芽腫症(n=5)、C型肝炎(n=3)、脈管炎(n=2)、原発性レイノー現象(n=4)、血友病(n=1)、乾癬性関節炎(n=2)、および抗リン脂質症候群(n=1)が含まれていた。診断は、University of Pittsburgh Medical Center (ピッツバーグ大学医療センター)にて、この患者らに治療に当たっている様々な外来患者施設の準専門医が確認した。 30

#### 【0093】

健常コントロール：健常コントロールは、ピッツバーグ大学内での宣伝紙配布を通じて動員された。彼らの健康状態を確認するため、参加者は、明白な医学的状態を問う短い質問紙に回答した。 40

#### 【0094】

(網状赤血球ならびに赤血球のフローサイトメトリー特性)

通院時に、各調査参加者について3mlの血液サンプルを、抗凝集剤としてEDTAを含有するVACUAINER(登録商標)試験管に採取し(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)、採取した同じ日に検査のために使用した。リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)で全血球を洗浄してPBSで稀釈し、間接免疫蛍光染色のために分注した。ヒトC4dに特異的なマウスモノクローナル抗体(C4のC4d含有フラグメントと反応する。Quidel, San Diego, CA)、あるいはアイソタイプが一致するコントロールMOPC21を、10µg/mlの濃度で細胞懸 50

濁液に加えた。フィコエリトリン (PE) 結合抗マウス IgG ヤギ F(ab')<sub>2</sub> (Cappel) を、10 μg/ml の濃度で使用した。抗体染色の後、細胞懸濁液を、網状赤血球同定のためのチアゾールオレンジ (Retic Count<sup>TM</sup> 試薬; Becton Dickinson) と共に、あるいはビヒクルコントロールとして PBS と共に、インキュベートした。染色された細胞を、FACSCalibur フローサイトメーターならびに Cell Quest ソフトウェア (両方とも Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) を使用するフローサイトメリーによって分析した。赤血球は、前方側方散乱特性に基づいて、電子工学的に選別した。網状赤血球は、前方側方散乱特性および Retic Count<sup>TM</sup> 染色陽性に基づいて、電子工学的に選別した。網状赤血球あるいは赤血球表面上の C4d レベルは、蛍光強度中央値比 (C4d 特異的蛍光中央値とアイソタイプコントロールの蛍光強度中央値との差: SMFI) として表した。

10

## 【0095】

(統計分析)

平均、中央値、標準偏差、ならびに範囲を含む記述統計値を、連続的データに関して計算し、頻度分布をカテゴリ変数に関して判定した。3つのグループの調査参加者 (SLE 患者、他の疾患を有する患者、ならびに健常コントロール) の、R-C4d および E-C4d における差を、クラスカル-ウォリス検定によって比較し、続いてウィルコクソンの順位和検定によって、2つの調査グループ間それぞれの統計的有意差を判定した。スピアマン順位相関法を用いて、R-C4d ならびに E-C4d の、SLAM ならびに SLENA-SLEDAI によって測定した疾患活動との関連性を判定した。ウィルコクソンの順位和検定を用いて、異なる R-C4d ならびに E-C4d レベルを有する SLE 患者の、第1四分位グループと他の四分位グループとの間の、SLAM あるいは SLENA-SLEDAI スコアの有意差を分析した。傾向に関する<sup>2</sup> 検定を用いて、四分位グループの R-C4d レベルと、SLE の特異的臨床的発現および血清学的発現の存在との間の関連性を評価した。様々な検定の統計的有意性を、Windows (登録商標) 用 Intercooled STATA 7.0 (College Station, TX) を使用する両側仮説検定で評価した。p < 0.05 での差異を有意とみなした。

20

## 【0096】

(結果)

(調査参加者の特性)

調査集団は、SLE 患者 156 人、健常コントロール 159 人、および他の免疫仲介疾患あるいは炎症疾患、血液疾患を有する患者 140 から構成された。SLE 参加者の平均年齢は 43.78 ± 12.18 であり、その 82.7% が白人系で、95.5% が女性であった。SLE 患者の他の人口統計的特性ならびに臨床的特性を表 3 に示す。このグループには、新規発症患者と長期にわたり疾患を有する患者との両方が含まれ、SLAM ならびに SLENA-SLEDAI スコアにて反映されているように、疾患活動は幅広く、関係する器官は広範囲にわたっている。健常コントロール参加者の平均年齢は 43.55 ± 13.45 であり、その 85% が白人系で、91% が女性であった。他の疾患グループの調査参加者は、平均年齢が 52.20 ± 13.81 であり、その 93% が白人系で、79.6% が女性であった。

30

40

## 【0097】

(表 3 全身性エリテマトーデスを有する患者 156 人の臨床的特性)

## 【0098】

【表 3】

特徴	SLEを有する患者 (n=156)	
年齢 <sup>a</sup> (歳)	43.78±/ 12.18 (18 - 80)	
人種(白人系の割合%)	82.7	
性別(女性の割合%)	95.5	
疾患の期間 <sup>a</sup> (年)	12.21 +/- 9.49 (0.01 - 47.06)	
頬の発疹 <sup>b</sup> (%)	53.2	
円盤状発疹 <sup>b</sup> (%)	14.1	10
光過敏性 <sup>b</sup> (%)	52.6	
口腔潰瘍 <sup>b</sup> (%)	55.8	
関節炎 <sup>b</sup> (%)	89.1	
漿膜炎 <sup>b</sup> (%)	49.4	
腎臓病 <sup>b</sup> (%)	25.8	
神経疾患(%)	7.7	
血液学的症状発現 <sup>b</sup> (%)	57.7	
貧血(%)	14.1	
白血球減少症(%)	42.3	20
血小板減少症(%)	20.5	
免疫学的検査 <sup>b</sup> (%)	80.6	
抗スミス(%) (n = 154)	13.6	
抗リン脂質抗体(%) (n = 154)	44.8	
抗核抗体(%)	96.2	
SS-A、SS-B、リウマチ因子など (n = 141)	36.6	
抗dsDNA <sup>b,c</sup> (%)	69.0 <sup>b</sup> ; 39.5 <sup>c</sup>	
レイノー現象 <sup>b</sup> (%)	43.2	30
SLAM <sup>a,d,e</sup>	5.79 +/- 3.75 (0 - 20)	
SELENA-SLEDAI <sup>a,d,e</sup>	2.82 +/- 2.91 (0 - 20)	
血清C3(正常値より低い%) <sup>c</sup>	39.4	
血清C4(正常値より低い%) <sup>c</sup>	51.0	
赤血球沈降速度 <sup>a</sup> (mm/時; n=151)	21.10 +/- 19.80 (0 - 117)	

<sup>a</sup> 平均値 ± S D、範囲として記した値。

<sup>b</sup> 個々の患者がSLEと診断されて以来、臨床的発現が存在していれば、臨床的発現を陽性とした。特に記載のない限り、記載したものの発現の陽性履歴を有する患者の割合(%)。 40

<sup>c</sup> 調査通院の時点での、抗dsDNA陽性の患者の割合(%)、もしくは血清C3あるいはC4が正常レベルより低い割合(%) (n = 155)。

<sup>d</sup> SLAM(全身性狼瘡活動指標)およびSELENA-SLEDAI(全身性エリテマトーデス疾患活動指数の、紅斑性狼瘡におけるエストロゲンの安全性の全国調査版)。

<sup>e</sup> 調査通院時点でのSLAMおよびSLEDAIスコア。

## 【0099】

(調査参加者における、網状赤血球上のC4dレベルの比較)

本発明者らが行った以前の研究(Manzi Set al., Arthritis Rheum., 50:3596-3604(2004))ならびに他の者が行った以前 50

の研究 (Tieley CA et al., Nature, 276:713-715 (1978); Atkinson JP et al., Complement, 5:65-76 (1988)) は、赤血球表面上に、補体活性化産物である C4d が存在することを示している。疾患活動の生物マーカーとしての R-C4d の潜在力を評価するため、本発明者らは最初に、網状赤血球上の C4d 沈着を実証する。2色フローサイトメリー分析を使用し、本発明者らは、健常個体、SLE 患者、ならびに他の疾患を有する患者の網状赤血球上に存在する C4d を試験して比較するための横断的研究をいった。初期の研究によって、全ての健常コントロールおよび大半の他の疾患を有する患者の、網状赤血球上にて検出することのできた C4d (R-C4d) は、変動があるものの一般には低レベルであることが示された (図 4 A および表 2)。反対に、多くの SLE 患者の網状赤血球上では、著しく高レベルの C4d が検出された (図 4 A)。R-C4d 特異的蛍光中央値レベルを全調査集団に関してまとめると、SLE 患者の平均 R-C4d 量 ( $5.50 \pm 9.01$ ; 範囲 0 - 66.81) は、健常コントロール ( $p < 0.0001$ ) あるいは他の疾患を有する患者 ( $p < 0.0001$ ) にて認められる値よりも、有意に高かった (表 4)。

10

## 【0100】

(表 4 SLE 患者、他の疾患を有する患者、ならびに健常コントロールにおける、網状赤血球結合 C4d レベルと赤血球結合 C4d レベル\* との比較)

## 【0101】

## 【表 4】

20

	R-C4d 平均値 $\pm$ SD (中央値; 範囲) p 値 <sup>a,b</sup>	E-C4d 平均値 $\pm$ SD (中央値; 範囲) p 値 <sup>a,b</sup>
SLE (n = 156)	5.50 $\pm$ 9.00 (2.30; 0 - 66.8)	18.36 $\pm$ 27.92 (9.58; 0.5 - 22.7)
他の疾患 (n = 140)	1.79 $\pm$ 2.12 (1.26; 0 - 17.6) <0.0001 <sup>a</sup>	7.21 $\pm$ 7.50 (4.93; 0.4 - 47) <0.0001 <sup>a</sup>
健常コントロール (n = 159)	1.4 $\pm$ 0.72 (0.85; 0 - 4.68) <0.0001 <sup>b</sup>	4.30 $\pm$ 3.51 (3.42; 0 - 27) <0.0001 <sup>b</sup>

30

\* 示したデータは、C4d 特異的蛍光強度中央値 (SMFI) を表す。

<sup>a</sup> ウィルコクソン順位和検定によって分析した、SLE 患者と他の疾患の患者との間の差異。

<sup>b</sup> ウィルコクソン順位和検定によって分析した、SLE 患者と健常コントロールとの間の差異。

## 【0102】

縦断的研究によって示されたように、健常コントロールならびに他の疾患の患者では、R-C4d レベルは比較的一定に留まっていた。図 4 B は、代表的な健常コントロールならびに他の疾患の患者それぞれから得られた結果をまとめてあり、数日、数ヶ月、ならびに数年に渡って R-C4d レベルはかなり類似していた。しかし、SLE 患者の内のかんりの割合の R-C4d レベルは、時間経過と共に著しく変動した (図 1 C ならびに 1 D)。

40

## 【0103】

(R-C4d レベルと SLE 疾患活動との相関)

広範囲に疾患活動を呈する本発明者らの SLE 患者集団によって、1 回の通院の間に、R-C4d の疾患活動を反映する能力を判定することができた。SELENA SLEDAI ( $r = 0.45$ ,  $p < 0.00001$ ) との相関は、SLAM ( $r = 0.23$ ,  $p = 0.003$ ) よりも高かったが、両方の疾患活動指数とも、R-C4d と有意に関連していた。さらなる分析のため、本発明者らは、最低レベルの R-C4d を有する最下位四分

50

位にある患者とともに、R - C 4 dレベルに従ってこのSLE調査研究参加者をランク付けして、4つの増加グループに分別した。調査通院時の各患者の疾患活動は、SELENA - SLEDAIおよびSLAM疾患活動指数を用いて判定した(表5)。また、狼瘡疾患活動を反映する可能性のある他の検査値(例えば抗dsDNA、全血算定、血清補体レベルなど)も、R - C 4 dの四分位との関係にて調べた。

【0104】

(表5 R - C 4 dと、E - C 4 dとSLE疾患活動との間の相関)

【0105】

【表5】

患者群 (n=39/群)	SLEDAI 平均値 +/- SD	p値	SLAM 平均値 +/- SD	p値	抗dsDNA 陽性(%)	貧血(%) (Hct <35)	血小板減少症 (%) (血小板数 <150000)
第1四分位 (R-C4d 0-1.12)	1.36 +/- 1.35		4.64 +/- 2.41		24	20	0
第2四分位 (R-C4d 1.12-2.31)	2.64 +/- 3.11	0.022 <sup>a</sup>	5.26 +/- 3.48	N.S. <sup>a</sup>	30	26	10
第3四分位 (R-C4d 2.31-4.85)	2.85 +/- 1.87	0.0001 <sup>b</sup>	6.20 +/- 4.28	N.S. <sup>b</sup>	54	33	15
第4四分位 (R-C4d 4.85-66.8)	4.34 +/- 3.84	0.00002 <sup>c</sup>	7.08 +/- 4.18	0.02 <sup>c</sup>	56	50	18
	<i>P</i> < 0.0001 <sup>d</sup>		<i>P</i> < 0.0001 <sup>d</sup>		<i>p</i> = 0.007 <sup>d</sup>	<i>p</i> = 0.025 <sup>d</sup>	<i>p</i> = 0.016 <sup>d</sup>
第1四分位 (E-C4d 0-5.1)	1.64 +/- 2.37		4.97 +/- 2.92		29	21	0
第2四分位 (E-C4d 5.1-9.6)	2.46 +/- 2.27	N.S. <sup>a</sup>	5.48 +/- 3.11	N.S. <sup>a</sup>	28	31	15
第3四分位 (E-C4d 9.6-17.9)	3.23 +/- 2.92	0.002 <sup>b</sup>	6.26 +/- 4.23	N.S. <sup>b</sup>	54	23	10
第4四分位 (E-C4d 17.9-227)	3.95 +/- 4.44	< 0.001 <sup>c</sup>	6.46 +/- 4.44	N.S. <sup>c</sup>	53	41	18
	<i>P</i> < 0.001 <sup>d</sup>		N.S. <sup>d</sup>		<i>P</i> = 0.02 <sup>d</sup>	<i>P</i> = 0.20 <sup>d</sup>	<i>P</i> = 0.059 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> 第1四分位対第2四分位；ウィルコクソン順位和検定

<sup>b</sup> 第1四分位対第3四分位；ウィルコクソン順位和検定

<sup>c</sup> 第1四分位対第4四分位；ウィルコクソン順位和検定

<sup>d</sup> 傾向に関する<sup>2</sup>乗検定によって分析した増加傾向の有意性

N . S . : 有意差なし

全てのSLE患者の疾患活動スコアをまとめると、ペアワイズ比較において、SELENA - SLEDAIスコアの中央値は、4つのグループ間で有意に異なっていた( $p = 0.022$ ;  $p = 0.0001$ ;  $p = 0.00002$ ) (表5)。また、SLAMスコア中央値も、4つのグループ間で異なっていたが、その差異は、最も高レベルのR - C 4 dを有する最高四分位のSLE患者と、最も低レベルのR - C 4 dを有する最低四分位のSLE患者との間でのみ、統計的に有意なものであった( $p < 0.02$ )。またR - C 4 dはまた、抗dsDNA ( $p = 0.007$ )、貧血 ( $p < 0.025$ )、ならびに血小板減少症 ( $p < 0.016$ )を含む特定の疾患変数に有意に相関することが認められた。

【0106】

比較すると、E - C 4 dは、R - C 4 d ( $r = 0.46$ ,  $p < 0.00001$ )ほど強くはないが、SELENA - SLEDAIと有意に関連していた( $r = 0.37$ ,  $p < 0.00001$ ) (表5)。

. 00001)。E - C 4 dはS L A Mとは有意に相関していなかった ( $r = 0.14$ 、 $p = 0.07$ )。E - C 4 dレベルに従って順位づけしたS L E患者の、疾患活動スコアをまとめ、この結果も表5に示す。

【0107】

(実施例3：R - C 4 dレベルとS L E疾患活動との相関、症例研究)

健常コントロールおよび他の疾患を有する患者のR - C 4 dレベルは低く、時間が経過しても安定していた(図4B)。反対に、S L Eを有する患者では3つのパターンが観察された。第1グループの患者のR - C 4 dは、安定して低レベルであった(図4C)。第2グループ患者のR - C 4 dレベルは最初の通院時には有意に上昇していたが、その後の通院時には減少していた(図4C)。第3グループ患者のR - C 4 dレベルは時間経過と共に(9~26ヶ月)変動した。

【0108】

次の4つの症例報告を提示し、R - C 4 dがS L Eの臨床過程に伴って変動する能力を実証する。これらの例示的な例において、R - C 4 d測定値を、S L Eを有する患者の臨床的治療において用いられる2つの「判断基準となる」研究室試験：2つの疾患活動指数であるS L A MおよびS L E D A Iによる血清C 4ならびにd s D N A抗体の力価、および全身性炎症の非特異的測定値であるE S Rと比較する。さらに、本発明者らは、E - C 4 dの有用性をR - C 4 dと比較する。

【0109】

症例A：患者J Nは19歳の白人女性であり、2002年4月にS L Eと診断された。彼女のS L Eは、炎症性関節炎、発疹、脱毛、口腔潰瘍、疲労、発熱、抗核抗体[1:320、均質型]、抗二本鎖DNA抗体[50;正常<2]、抗カルジオリピン抗体[IGG、29]の存在、およびE S Rの若干の上昇[28mm/時;正常0~20]として顕れていた。彼女は自分の薬物適用(ヒドロキシクロロキンおよびメトトレキサート)に従わず、2002年11月の最初の調査通院時に5mg/日のプレドニゾンを摂取したのみであった(図5A)。この通院時に、彼女は疲労を訴え、活発な関節炎と口腔潰瘍の形跡があった。彼女の研究室試験が示したのは、血清C 4が未検出[<10]、E S Rが若干の上昇[25mm/時]、ならびに抗d s D N A[50]であり、R - C 4レベル[11]およびE - C 4 dレベル[33]は両方とも上昇していた。この患者は、ヒドロキシクロロキンおよびメトトレキサートの適用を再開した。J Nは、2002年12月に、高熱と頭痛を伴って救急室に入り、この時、彼女の血清C 4は依然未検出でE S Rは20mm/時に減少していた。反対に、R - C 4 d[29]およびE - C 4 d[47]は両方とも顕著に上昇しており、これは疾患活動の増大を示唆している。抗d s D N Aは測定しなかった。彼女は入院した。感染に関する完全な評価は陰性であった。彼女は治療を変更することなく退院した。2003年1月10日、J Nは新たな蛋白尿、腎不全の発症、および全身症状悪化のため入院した。腎臓生検の後、糸球体間質性糸球体腎炎という診断が示された。この時点で、血清C 4は検出可能レベルまで上昇し「11」、抗d s D N A力価は10に減少した。両方の研究室試験とも狼瘡活動改善の可能性、あるいは活動変化のないことを示唆するものであった。反対に、この時点までに、E - C 4 d[79]とR - C 4 d[52]は顕著に上昇し、これは、臨床的印象および腎臓生検と一致して、疾患の拡大を示唆するものであった。3日間適用量1000mgのソルメドロール、続いて経口的にプレドニゾン、ヒドロキシクロロキン、およびマイコフェノレートモフェチル(C e l l C e p t)を用いる集中治療の後、J Nの状態は改善されて血清クレアチンレベルは減少し[1.2から0.7mg/dL]、発熱および関節痛は消散した。2003年1月29日までに、彼女のE - C 4 dは有意には変化しなかったが[79から77]、R - C 4 dレベルは52から24に減少した。反対に血清C 4は低いままであって有意には変化しなかった[12]。E - C 4 d[77]、E S R[42]は上昇し、かつC 4が異常[12]であったにもかかわらず、臨床的印象は改善されて、介入に対して応答し、これはR - C 4 dの顕著な減少と一致した。彼女へのプレドニゾン投与量を減らした。この印象は2003年3月31日に確認され、この時点でこの患者は症状がない状態に回復した。こ

10

20

30

40

50

の時点までに、R - C 4 d および E - C 4 d は、それぞれ 1 1 および 1 9 に減少した。しかし、C 4 は依然 1 5 と低く、抗 d s D N A は 1 0 に上昇していた。これは 1 月 1 0 日の発赤のピーク時に認められた値と同じであった。

【 0 1 1 0 】

症例 B : 患者 M H は 4 0 歳のアフリカ系アメリカ人女性であり、1 9 9 0 年に S L E と診断されたが薬物適用歴はなかった。彼女は耳感染および関節炎悪化のため、2 0 0 2 年 5 月の 1 回目の調査通院の 2、3 週間前に入院した。1 回目の調査通院時までに、彼女の症状は 4 0 m g / 日のプレドニゾンによって改善した。E - C 4 d の顕著な上昇 [ 9 0 ] および中程度に高い R - C 4 d レベル [ 2 9 ] を検出し、これは最近の発赤と一致する。治療に対する反応は、2 0 0 2 年 7 月の次の通院時に、E - C 4 d レベルおよび R - C 4 d レベルが有意に減少していたことによって確認された。2 0 0 3 年 4 月の 3 回目の調査通院時、M H は関節炎の悪化および皮膚発疹を体験していた。彼女は、これ以前の 2 ヶ月間、全ての薬物適用には従っていなかったと報告した。その時点で、彼女の R - C 4 d レベルはその前の通院時と比較して有意に上昇しており、これは彼女が発赤を報告したことに一致する。この発赤は、デポメドロール注射、続く経口メドロールによって処置され、成功した。彼女は、その後数ヶ月間、全ての症状が顕著に消散したと報告し、これは R - C 4 d レベルが正常範囲にあることと一致した ( 図 5 B )。

10

【 0 1 1 1 】

症例 C : 患者 C M は、1 9 9 7 年に S L E と診断された 3 8 歳のアフリカ系アメリカ人女性であり、円盤状病変、関節炎、および抗リン脂質抗体症候群が顕れていた。2 0 0 2 年 4 月、C M は、2 週間に渡る多発関節炎が顕れる発赤の病歴があったことを報告した。これは、メドロール用量パックで処置した。この患者は、2 0 0 2 年 5 月の 1 回目の調査通院時までに顕著に改善したと報告し、彼女はその後継続して無症状であった ( 図 5 C )。抗 d s D N A は依然陽性であり、かつ血清 C 4 は異常に低いにもかかわらず、R - C 4 d レベルは治療に反応して減少し、1 6 ヶ月の無症状期の間継続して低かった。

20

【 0 1 1 2 】

症例 D : 患者 M K は、1 9 8 5 年に S L E と診断された 3 8 歳の白人系女性であり、頬の発疹、光過敏性、関節炎および胸膜炎が顕れていた。2 0 ヶ月に渡る 5 回の調査通院の間、彼女は無症状のままであった。血清 C 4 レベルは異常、かつ抗 d s D N A 陽性は変動していたにもかかわらず、R - C 4 d レベルは正常なままであった ( 図 5 D )。

30

【 0 1 1 3 】

上記の発明は、明確な理解を目的とした説明および例示のために、一部詳細に記述したが、本発明の教示を考慮して、添付の特許請求の範囲の精神または範囲から逸脱しない一定の変更および改変が本発明になされ得ることは、当業者には容易に明白である。

【 0 1 1 4 】

本明細書中に引用される全ての出版物および特許出願は、それぞれ個々の出版物または特許出願が個々に詳細に参考として援用されることが示されるように、本明細書中に参考として援用される。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 1 5 】

【 図 1 】 図 1 は、S L E を有する患者ならびに健常コントロールに関する蛍光中央値をプロットするグラフを提供する。R - C 4 は、網状赤血球表面上の C 4 d レベルを指す。S L E 患者についての値を左側に示し、健常コントロールについての値を右側に示す。

40

【 図 2 】 図 2 は、3 個体の S L E 患者各々に由来する 2 色フローサイトメトリーデータを提供する。C 4 d レベルを右図に示し、一致するアイソタイプのコントロールを左図に示す。2 色フローサイトメトリーは、標識した抗 C 4 d 抗体 ( Y 軸 ) と標識した抗トランスフェリン受容体抗体 ( X 軸 ) とを使用して実行した。C 4 d 陽性の網状赤血球は、パネルの右上四分割区に示される。3 人の S L E 患者からの結果を示す。網状赤血球の 9 3 %、4 7 . 8 %、ならびに 1 4 . 5 % が C 4 d 染色を呈した。コントロール抗体は網状赤血球に結合せず、これはこの C 4 d 抗体結合が特異的なものであることを示す。

50

【図3】図3は、2002年2月(上段)、2002年7月(中段)、2002年8月(下段)の、3つの時点での、SLE患者由来の網状赤血球上のC4dレベルを示すデータを提供する。例えば赤血球ならびに網状赤血球などの未分画赤血球のC4d染色を左列に示す。中列は、それぞれの時点での、標識抗C4d抗体(Y軸)および標識抗トランスフェリン受容体抗体(X軸)を使用する2色フローサイトメトリーを示す。C4d陽性の網状赤血球は、パネルの右上四分割区に示される。右列は、それぞれの時点での、赤血球ならびに網状赤血球上のC4dレベルの比較を示す。赤血球と網状赤血球は密度勾配遠心法によって分離した。最も日数のたった細胞が分画1に最初に溶出される。網状赤血球は分画15に溶出する最も若い細胞と共に確認される。縦軸は細胞表面上のC4dレベルを示す。

10

【図4A】図4A-Dは、SLE患者では網状赤血球C4dレベルが著しく上昇しており、時間経過ともに変動することを示している。(A)SLE患者由来の網状赤血球は、他の疾患を有する患者あるいは健常コントロール由来の網状赤血球よりも、有意に高いレベルのC4dを有している。Y軸で示すのは、156人のSLE患者、140人の他の疾患の患者、ならびに159人の健常コントロールの網状赤血球についての、C4d特異的蛍光強度中央値である。(B)R-C4dレベルは、健常コントロールおよび他の疾患を有する患者では、時間が経過しても依然安定している。3回あるいは4回の異なる調査通院時に検査した、7人の健常コントロールならびに16人の非SLE自己免疫疾患患者(強皮症1名、炎症性筋障害7名、シェーグレン症候群1名、慢性関節リウマチ6名、ならびに抗リン脂質抗体症候群1名)の、R-C4dレベルを示す。(CおよびD)R-C4d

20

【図4B】図4A-Dは、SLE患者では網状赤血球C4dレベルが著しく上昇しており、時間経過ともに変動することを示している。(A)SLE患者由来の網状赤血球は、他の疾患を有する患者あるいは健常コントロール由来の網状赤血球よりも、有意に高いレベルのC4dを有している。Y軸で示すのは、156人のSLE患者、140人の他の疾患

30

【図4C】図4A-Dは、SLE患者では網状赤血球C4dレベルが著しく上昇しており、時間経過ともに変動することを示している。(A)SLE患者由来の網状赤血球は、他の疾患を有する患者あるいは健常コントロール由来の網状赤血球よりも、有意に高いレベルのC4dを有している。Y軸で示すのは、156人のSLE患者、140人の他の疾患

40

50

皮症 1 名、炎症性筋障害 7 名、シェーグレン症候群 1 名、慢性関節リウマチ 6 名、ならびに抗リン脂質抗体症候群 1 名) の、R - C 4 d レベルを示す。(C および D) R - C 4 d レベルは、S L E を有する患者のかなりの割合において変動する。3 回から 5 回までの異なる調査通院時に検査した、S L E を有する 6 4 人の患者の R - C 4 d レベルが示される。3 7 人の患者では、R - C 4 d は安定して低かった。9 人の患者では、R - C 4 d は最初の通院時に上昇していたがその後の通院時には減少した。R - C 4 d の著しい変動が 1 8 人の患者に認められた。図 5 A ~ D に示した症例研究のために、異なる R - C 4 d のパターンを有する代表的な患者を選択した。

【図 4 D】図 4 A - D は、S L E 患者では網状赤血球 C 4 d レベルが著しく上昇しており、時間経過ともに変動することを示している。(A) S L E 患者由来の網状赤血球は、他の疾患を有する患者あるいは健常コントロール由来の網状赤血球よりも、有意に高いレベルの C 4 d を有している。Y 軸で示すのは、1 5 6 人の S L E 患者、1 4 0 人の他の疾患の患者、ならびに 1 5 9 人の健常コントロールの網状赤血球についての、C 4 d 特異的蛍光強度中央値である。(B) R - C 4 d レベルは、健常コントロールおよび他の疾患を有する患者では、時間が経過しても依然安定している。3 回あるいは 4 回の異なる調査通院時に検査した、7 人の健常コントロールならびに 1 6 人の非 S L E 自己免疫疾患患者(強皮症 1 名、炎症性筋障害 7 名、シェーグレン症候群 1 名、慢性関節リウマチ 6 名、ならびに抗リン脂質抗体症候群 1 名) の、R - C 4 d レベルを示す。(C および D) R - C 4 d レベルは、S L E を有する患者のかなりの割合において変動する。3 回から 5 回までの異なる調査通院時に検査した、S L E を有する 6 4 人の患者の R - C 4 d レベルが示される。3 7 人の患者では、R - C 4 d は安定して低かった。9 人の患者では、R - C 4 d は最初の通院時に上昇していたがその後の通院時には減少した。R - C 4 d の著しい変動が 1 8 人の患者に認められた。図 5 A ~ D に示した症例研究のために、異なる R - C 4 d のパターンを有する代表的な患者を選択した。

【図 5 A】図 5 A ~ D は、R - C 4 d が変動し、S L E の臨床的過程を反映することを例証する。各々の代表的な S L E 患者由来の網状赤血球 C 4 d (R - C 4 d) ならびに赤血球 C 4 d (E - C 4 d) の経時的検査値を示す。グラフパネル内の各点近く々に示される数字は、C 4 d 特異的蛍光強度中央値である。付加的な病歴および他の検査結果に関しては実施例 4 を参照のこと。正常検査値は、血清 C 4 濃度が 2 0 ~ 5 9 m g / d L、E S R が 0 ~ 2 0 m m / 時、抗 - d s D N A は用いた検査の種類に応じて < 2 あるいは < 1 : 1 0 である。

【図 5 B】図 5 A ~ D は、R - C 4 d が変動し、S L E の臨床的過程を反映することを例証する。各々の代表的な S L E 患者由来の網状赤血球 C 4 d (R - C 4 d) ならびに赤血球 C 4 d (E - C 4 d) の経時的検査値を示す。グラフパネル内の各点近く々に示される数字は、C 4 d 特異的蛍光強度中央値である。付加的な病歴および他の検査結果に関しては実施例 4 を参照のこと。正常検査値は、血清 C 4 濃度が 2 0 ~ 5 9 m g / d L、E S R が 0 ~ 2 0 m m / 時、抗 - d s D N A は用いた検査の種類に応じて < 2 あるいは < 1 : 1 0 である。

【図 5 C】図 5 A ~ D は、R - C 4 d が変動し、S L E の臨床的過程を反映することを例証する。各々の代表的な S L E 患者由来の網状赤血球 C 4 d (R - C 4 d) ならびに赤血球 C 4 d (E - C 4 d) の経時的検査値を示す。グラフパネル内の各点近く々に示される数字は、C 4 d 特異的蛍光強度中央値である。付加的な病歴および他の検査結果に関しては実施例 4 を参照のこと。正常検査値は、血清 C 4 濃度が 2 0 ~ 5 9 m g / d L、E S R が 0 ~ 2 0 m m / 時、抗 - d s D N A は用いた検査の種類に応じて < 2 あるいは < 1 : 1 0 である。

【図 5 D】図 5 A ~ D は、R - C 4 d が変動し、S L E の臨床的過程を反映することを例証する。各々の代表的な S L E 患者由来の網状赤血球 C 4 d (R - C 4 d) ならびに赤血球 C 4 d (E - C 4 d) の経時的検査値を示す。グラフパネル内の各点近く々に示される数字は、C 4 d 特異的蛍光強度中央値である。付加的な病歴および他の検査結果に関しては実施例 4 を参照のこと。正常検査値は、血清 C 4 濃度が 2 0 ~ 5 9 m g / d L、E S R

10

20

30

40

50

が 0 ~ 20 mm / 時、抗 - d s D N A は用いた検査の種類に応じて < 2 あるいは < 1 : 1 0 である。

【 図 1 】

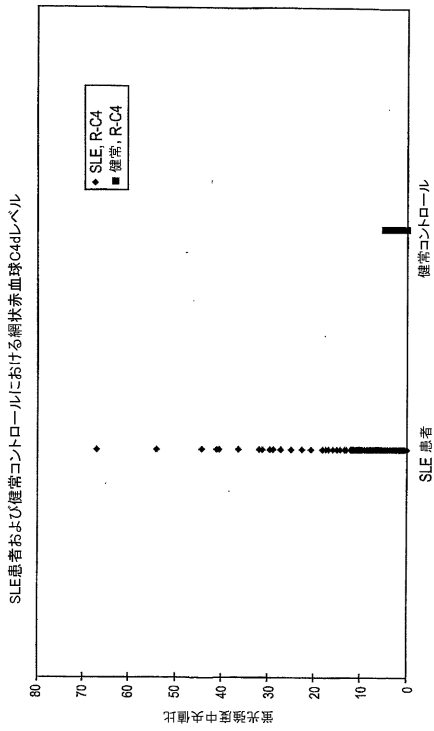


FIG. 1

【 図 2 】

網状赤血球上のC4dレベル:コントロール抗体 対 抗C4d抗体

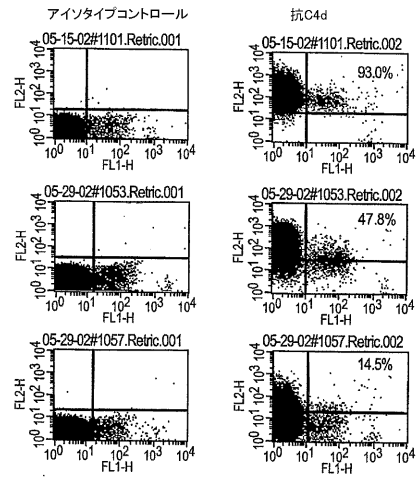


FIG. 2

【 図 3 】

SLE発赤を有する患者における網状赤血球C4dの経時レベル

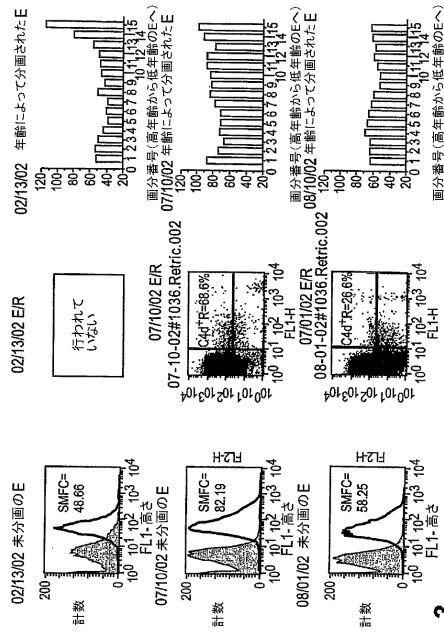


FIG. 3

【 図 4 A 】

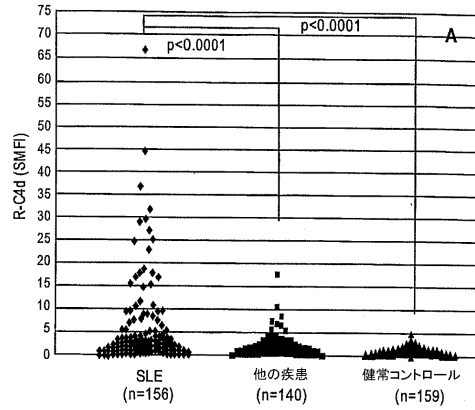


FIG. 4A

【 図 4 B 】

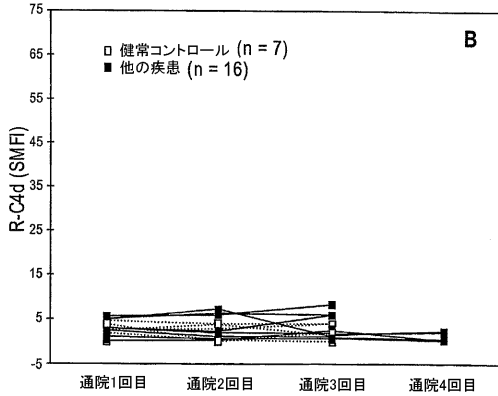


FIG. 4B

【 図 4 C 】

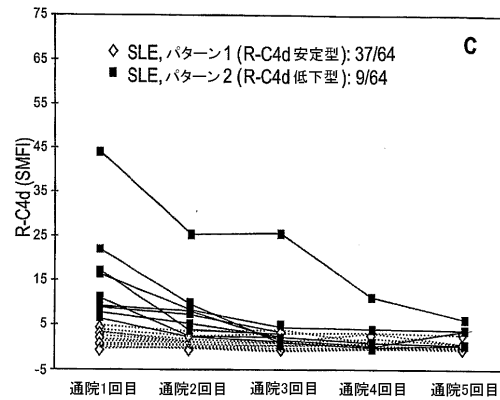


FIG. 4C

【 図 4 D 】

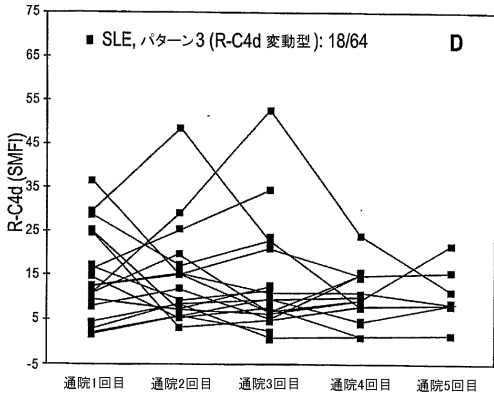


FIG. 4D

【 図 5 A 】

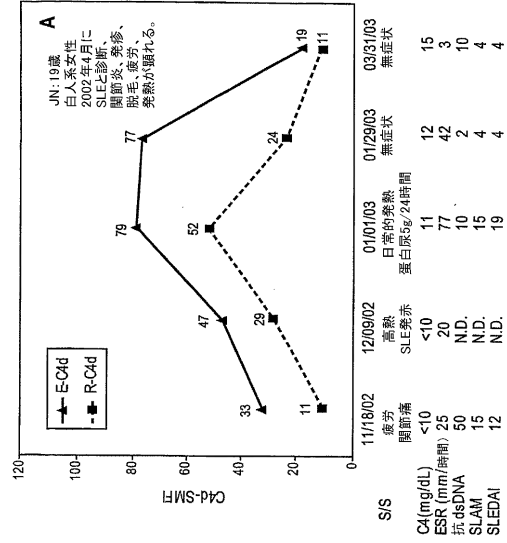


FIG. 5A

【 図 5 B 】

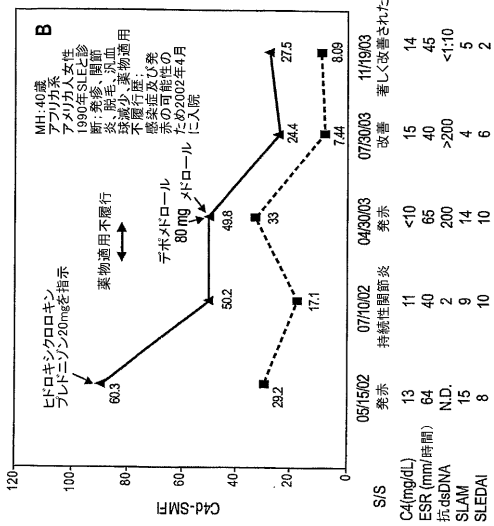


FIG. 5B

【 図 5 C 】

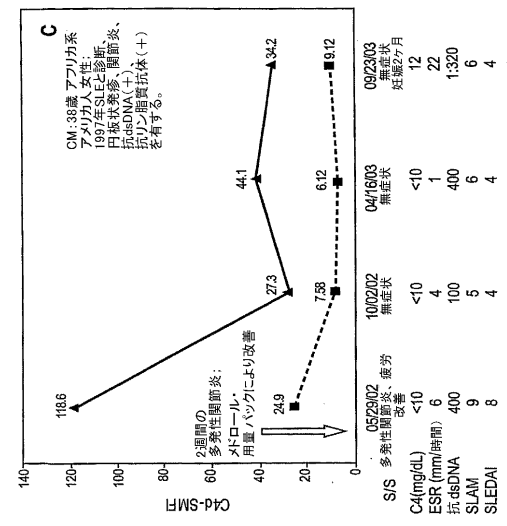


FIG. 5C

【 図 5 D 】

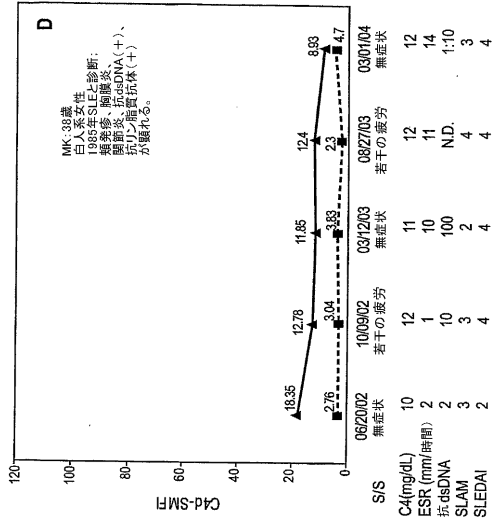


FIG. 5D

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US05/11914
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : G01N 33/53, 33/564, 33/566, 33/567 US CL : 435/7.1, 7.2, 7.92; 436/501, 506, 811 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/7.1, 7.2, 7.92; 436/501, 506, 811 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) MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, SCISEARCH, PUBMED		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 03/022223 A2 (UNIVERSITY OF PITTSBURGH) 20 March 2003 (20.03.03), see entire document.	1-25
Y	LACH-TRIFILIEFF et al. Complement Receptor 1 (CD35) on Human Reticulocytes: Normal Expression in Systemic Lupus Erythematosus and HIV-Infected Patients. The Journal of Immunology. Vol. 162, No. 12, June 1999 pages 7549-7554, see entire document.	1-25
A	TAUSK et al., The Expression of C3b Receptors in the differentiation of Discoid Lupus Erythematosus and Systemic Lupus Erythematosus, Arthritis and Rheumatism. June 1990, Vol. 33, No. 6, June 1990, pgs 888-892, see entire document.	1-25
A	YAMADA et al., Complement-activated oligodendroglia: a new pathogenic entity identified by immunostaining with antibodies to human complement proteins C3d and C4d. Neuroscience Letters. 1990, Vol. 112, pp. 161-166.	1-25
<input 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"
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X"
"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"
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z"
"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 19 October 2005 (19.10.2005)		Date of mailing of the international search report 16 DEC 2005
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. (703) 305-3230		Authorized officer Gary Counts <i>Rutha Lawrence for</i> Telephone No. (571) 272-1600

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

(72) 発明者 アハーン, ジョセフ エム.

アメリカ合衆国 ペンシルバニア 1 5 1 4 3, セウィックリー, ケピン ドライブ 2

(72) 発明者 マンツィ, スーザン エム.

アメリカ合衆国 ペンシルバニア 1 5 0 9 0, ウェクスフォード, マッターホルン  
ドライブ 2 4 8 6

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2007532885A5</a>	公开(公告)日	2008-05-01
申请号	JP2007507524	申请日	2005-04-08
[标]申请(专利权)人(译)	匹兹堡大学		
申请(专利权)人(译)	匹兹堡大学		
[标]发明人	アハーンジョセフエム マンツィスーザンエム		
发明人	アハーン, ジョセフ エム. マンツィ, スーザン エム.		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	C07K16/28 G01N33/564 G01N33/689 G01N33/6893 G01N2333/4716 G01N2800/104 Y10S436/811		
FI分类号	G01N33/53.R G01N33/543.597		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/560986 2004-04-09 US 60/579621 2004-06-14 US		
其他公开文献	JP2007532885A		

#### 摘要(译)

本发明涉及诊断和/或监测患有炎性疾病或病症的患者，特别是用于诊断疾病的急性期，包括用于进行该活性的方法和试剂盒。本公开内容提出了令人惊讶的发现，即网织红细胞上补体途径组分的水平可用于诊断，监测或预测慢性炎性疾病或病症的急性发作的发生。