

(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2018-506720

(P2018-506720A)

(43) 公表日 平成30年3月8日(2018.3.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53</b> (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 H O 4 5
C O 7 K 7/08 (2006.01)	C O 7 K 7/08 Z N A	
C O 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 30 頁)

(21) 出願番号	特願2017-541624 (P2017-541624)	(71) 出願人	591003013 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(86) (22) 出願日	平成28年2月8日 (2016.2.8)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(85) 翻訳文提出日	平成29年10月4日 (2017.10.4)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(86) 国際出願番号	PCT/EP2016/052610		T
(87) 国際公開番号	W02016/128348		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(87) 国際公開日	平成28年8月18日 (2016.8.18)		グレンツァーヘルストラッセ124
(31) 優先権主張番号	15155064.7	(74) 代理人	100140109 弁理士 小野 新次郎
(32) 優先日	平成27年2月13日 (2015.2.13)	(74) 代理人	100118902 弁理士 山本 修
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100106208 弁理士 宮前 徹
		(74) 代理人	100120112 弁理士 中西 基晴

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗CCPおよび抗PIK3CDを測定することによる関節リウマチの査定方法

## (57) 【要約】

本発明は、関節リウマチ (“RA”) の査定を補助する方法に関する。本方法は特に、関節リウマチの非存在または存在をインピットロで査定する際に使用される。本方法は、たとえば生化学マーカーを分析することにより実施され、試料において抗CCPおよび抗PIK3CDの濃度を測定し、そして決定した濃度を関節リウマチの非存在または存在に関連付けることを含む。本発明の方法におけるRAの査定をさらに改善するために、抗CCPおよび抗PIK3CDと共に1種類以上の追加マーカーのレベルを決定し、RAの非存在または存在に関連付けることができる。本発明は関節リウマチの診断における抗CCPおよび抗PIK3CDを含むマーカーパネルの使用にも関係し、本発明は本発明方法を実施するためのキットを教示する。さらに、本発明はまた、RAを他の自己免疫疾患、好ましくは変形性関節症(OA)から鑑別するための、抗CCPおよび抗PIK3CDを含むマーカーパネルの使用に関する。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

関節リウマチ（RA）の非存在または存在をインビトロで生化学マーカーにより査定するための、下記を含む方法：

a) 全血、血漿または血清試料において、少なくとも抗環状シトルリン化ペプチド（抗CCP）および抗PIK3CDの濃度をそれぞれ測定する；

b) (a)において抗CCPおよび抗PIK3CDについて測定した濃度値を組み合わせる；そして

c) 工程(b)において決定した組み合わせ数値をRAの非存在または存在と関連付ける；その際、基準集団から抗CCPおよび抗PIK3CDについて測定したカットオフ組み合わせ濃度値と比較して増大した組み合わせ数値は、RAの存在の指標となる。

10

## 【請求項 2】

試料がヒト対象に由来する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

その方法の工程(a)がイムノアッセイ法である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

抗CCPおよび抗PIK3CDを、それぞれ抗原としての1種類以上のCCPおよび/または抗原としての1種類以上のPIK3CDにより捕捉する、請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 5】

工程(b)の組み合わせ濃度値を、RA陽性患者を除外した、明らかに健康な者ならびに変形性関節症(OA)患者および他の自己免疫疾患患者からなる群から選択される患者を含む基準集団から得られたカットオフ値と比較する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

## 【請求項 6】

さらに、抗MCM3および抗PIK3CDからなる群から選択される少なくとも1種類の追加マーカーの測定を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 7】

関節リウマチ（RA）の重症度をインビトロで生化学マーカーにより査定するための、下記を含む方法：

a) 全血、血漿または血清試料において、少なくとも抗環状シトルリン化ペプチド（抗CCP）および抗PIK3CDの濃度をそれぞれ測定する；

b) (a)において抗CCPおよび抗PIK3CDについて測定した濃度値を組み合わせる；そして

c) (b)からの組み合わせ数値をRAの重症度に関連付ける；その際、基準集団から抗CCPおよび抗PIK3CDについて測定したカットオフ組み合わせ濃度値と比較してより高い組み合わせ数値は、その患者のRAの重症度の指標となる。

30

## 【請求項 8】

関節リウマチ（RA）をインビトロで生化学マーカーにより他の自己免疫疾患から鑑別するための、下記を含む方法：

a) 全血、血漿または血清試料において、少なくとも抗環状シトルリン化ペプチド（抗CCP）および抗PIK3CDの濃度をそれぞれ測定する；

b) (a)において抗CCPおよび抗PIK3CDについて測定した濃度値を組み合わせる；そして

c) (b)からの増大した組み合わせ数値により、RAを他の自己免疫疾患から鑑別する；その際、基準集団から抗CCPおよび抗PIK3CDについて測定したカットオフ組み合わせ濃度値と比較して増大した組み合わせ数値は、RAの存在の指標となる。

40

## 【請求項 9】

関節リウマチ（RA）の非存在または存在をインビトロで全血、血漿または血清試料から査定するための、少なくとも抗CCPおよび抗PIK3CDを含むマーカーパネルの使用；その際、基準集団から抗CCPおよび抗PIK3CDについて測定したカットオフ組

50

合わせ濃度値と比較して増大した、抗 C C P および抗 P I K 3 C D について測定した組み合わせ濃度は、R A の存在の指標となる。

【請求項 10】

マーカーパネルが、抗 C C P、抗 P I K 3 C D、ならびに抗 M C M 3 および抗 C a s p 8 からなる群から選択される少なくとも 1 種類の追加マーカーをさらに含む、請求項 9 に記載の使用。

【請求項 11】

マーカーパネルが、抗 C C P、抗 P I K 3 C D および抗 M C M 3 を含む、請求項 9 に記載の使用。

【請求項 12】

R A を他の自己免疫疾患、好ましくは他の関節疾患から鑑別するための、請求項 8 に記載の方法の使用。

【請求項 13】

他の関節疾患が変形性関節症 ( O A ) である、請求項 12 に記載の使用。

【請求項 14】

R A の非存在または存在の査定における、少なくとも抗 C C P および抗 P I K 3 C D を含むマーカーパネルについての最適化多変量カットオフの使用；その際、最適化多変量カットオフは抗 C C P および抗 P I K 3 C D について測定した濃度値を組み合わせることにより得られる。

【請求項 15】

抗 C C P および抗 P I K 3 C D をそれぞれ特異的に測定するために必要な試薬、ならびに場合により測定を実施するための補助試薬を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法を実施するためのキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、関節リウマチ (rheumatoid arthritis) (“ R A ”) の査定を補助する方法に関する。本方法は特に、関節リウマチの非存在または存在をインビトロで査定する際に使用される。本方法は、たとえば生化学マーカーを分析することにより実施され、試料において抗 C C P および抗 P I K 3 C D の濃度を測定し、そして決定した濃度を関節リウマチの非存在または存在に関連付けることを含む。本発明の方法における R A の査定をさらに改善するために、抗 C C P および抗 P I K 3 C D と共に 1 種類以上の追加マーカーのレベルを決定し、R A の非存在または存在に関連付けることができる。本発明は関節リウマチの診断における抗 C C P および抗 P I K 3 C D を含むマーカーパネルの使用にも関係し、本発明は本発明方法を実施するためのキットを教示する。さらに、本発明はまた、R A を他の自己免疫疾患、好ましくは変形性関節症 (osteoarthritis) ( O A ) から鑑別するための、抗 C C P および抗 P I K 3 C D を含むマーカーパネルの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

関節リウマチ (“ R A ”) は慢性、炎症性の全身疾患であり、その最も顕著な症状発現は罹患した関節、特に手足の関節に生じる。関節リウマチの発症は数週間から数カ月にかけて徐々に起きる可能性があり、あるいはその状態は急性様式で急激に表面化する可能性がある。

【0003】

R A は世界的に分布し、すべての人種に関係する。この疾患はいかなる年齢でも起きる可能性があるが、罹患率は年齢と共に増大し、ピーク発症率は 40 ~ 60 代である。北米人集団についての罹患率推定値は 0.3% から 1.5% にまで及ぶ。現在、米国だけで 2,500,000 人を超える人々が関節リウマチを伴うと診断されており、ある統計は 650 万 ~ 800 万人がこの疾患に潜在罹患していると指摘する。女性は男性より 2 ~ 3 倍

10

20

30

40

50

多く罹患する。

【0004】

関節リウマチの初期症状は関節の腫脹または圧痛を伴う関節痛など大部分が関節特異的であるが、かなり非特異的な症状発現、たとえば硬直、発熱、皮下結節および疲労も含まれる場合がある。きわめて特徴的なことは対称的な関節罹患である。手、足、膝および手首の関節が最も一般的に罹患し、最終的に股関節、肘関節および肩に波及する。疾患が進行するのに伴っていかなるタイプの動きも著しい痛みおよび困難を伴い、最終的には罹患関節の機能が失われる。より重篤な関節リウマチの症例は激痛および関節破壊に至る可能性がある。関節炎関連の関節破壊から生じる痛みおよび運動性喪失を軽減するために、毎年ほぼ300,000の骨および関節置換外科処置が行なわれている。

10

【0005】

RAを分類するために最も広く用いられていた方式は、RAの分類のための米国リウマチ学会(American College of Rheumatology) 1987改訂基準であった(Arnett, F. C., et al., Arthritis Rheum. 31 (1988) 315-324)。この慣例は、2010年、下記のリストにより説明される新たな方式を規定することによりACR/EULARに置き換えられた(Mjaavatten and Bykerk, Best Practice & Research Clinical Rheumatology, 2010から引用)：

RAに関するACR/EULAR 2010分類基準。6以上のスコアにより患者をRAと定義する。

20

【0006】

【表A】

関節 (0-5)	点数
大関節の1カ所	0
大関節の2-10カ所	1
小関節の1-3カ所 (大関節を計数しない)	2
小関節の4-10カ所 (大関節を計数しない)	3
>10カ所の関節 (最低1つの小関節)	5
血清反応 (0-3)	
陰性RFおよび陰性ACPA	0
低値陽性RFまたは低値陽性ACPA	2
高値陽性RFまたは高値陽性ACPA	3
罹患期間 (0-1)	
<6週間	0
≥6週間	1
急性期反応 (0-1)	
正常なCRPおよびESR	0
異常なCRPまたはESR	1

30

【0007】

患者は少なくとも1つの関節が明確な臨床的滑膜炎(腫脹)を伴うべきであり、その滑膜炎は他の疾患によってより良く説明されるものではない。ACR, 米国リウマチ学会(American College of Rheumatology); EULAR, 欧州リウマチ学会(European League Against Rheumatism); RF, リウマチ因子(rheumatoid factor); ACPA, 抗シトルリン化タンパク質抗体(anti-citrullinated protein antibody); CRP, C反応性タンパク質(C-reactive protein); ESR, 赤血球沈降速度(erythrocyte sedimentation rate)。

40

【0008】

一般的に受け入れられている(前記の基準を参照)、RA診断を補助する唯一の生化学マーカーは、血清中に検出されるリウマチ因子(RF)、すなわち抗CCP(前記においてACPAと呼ばれる)およびCRPである。

【0009】

50

R Aにおける組織変化は疾患特異的ではなく、関係する臓器によって大幅に左右される。初期の炎症性関節病変は滑膜に関係する。最も初期の変化は滑膜微細血管系に対する傷害であり、電子顕微鏡により記録される内腔の閉塞、内皮細胞の腫脹、および内皮細胞間のギャップを伴う。この病期は通常は表在性ライニング細胞層の軽度の増殖を伴う。2つの細胞タイプが滑膜ライニングを構成している：マクロファージの特徴をもつ骨髄由来のタイプA滑膜細胞、および間葉性タイプB滑膜細胞。両方の細胞タイプが滑膜過形成に関与し、これはこれら2つの細胞タイプ間のパラクリン（傍分泌）相互作用を示唆する。この病期の炎症は、うっ血、浮腫、およびフィブリン浸出を伴う。細胞浸潤は初期疾患において起き、最初は主にTリンパ球からなる。炎症の結果、滑膜は、血管および滑膜線維芽細胞の増殖により、また滑膜ライニング層の増倍および拡張により、肥厚性になる。

10

## 【0010】

肉芽組織は軟骨にまで広がり、パンヌスとして知られる。この組織は活発に侵襲し、関節周囲の骨、および滑膜と骨の境界にある軟骨を破壊し、びらん性R Aとして知られる。

R Aの関節症状発現は2つのカテゴリーに分けることができる：炎症性滑膜炎に関連する可逆性の徴候と症状、および滑膜炎により引き起こされる不可逆的構造損傷。この概念は、病期を決定して予後を判定するためだけでなく、医療処置または外科処置を選択するためにも有用である。一般的な患者における構造損傷は、通常は疾患の1年目と2年目の間のある時点で開始する(Van der Heijde, D. M., Br. J. Rheumatol. 34 (1995) 74-78)。滑膜炎は変動性パターンを伴う傾向があるが、構造損傷はそれ以前の滑膜炎の量の直線関数として進行する。

20

## 【0011】

R Aにおける初期事象の病因は依然として理解し難い。自己免疫的要素が現在では広く受け入れられているが、他の要因もなお論争されている。細菌またはウイルス感染の可能性が精力的に追及されてきた。単離、電子顕微鏡または分子生物学により感染因子とR Aを関連づけるすべての努力は失敗した。R Aの単一の主因があるのではなく、種々のメカニズムが初期の組織傷害をもたらし、滑膜炎を促進するという可能性がある。

## 【0012】

滑膜炎の臨床徴候は捕え難い可能性があり、しばしば主観的である。ほてって膨潤し、明らかに炎症している関節は、通常は炎症性滑膜炎の最も活発な時期に初めて見られる。軟骨減量および関節周囲骨のびらんは、構造損傷の特徴である。構造損傷に関係する臨床像は、進行性の機能的および解剖学的な劣化が目印となる。関節に対する構造損傷は不可逆的かつ相加的である。

30

## 【0013】

関節リウマチの効果的処置は、一般に薬物療法、運動、休憩、および適切な関節保護療法の組合わせを含む。個々の患者のための療法は、疾患の重症度および関係する関節により左右される。非ステロイド系抗炎症薬、コルチコステロイド、金塩、メトトレキセートおよび全身用免疫抑制薬が、炎症および関節破壊を低減するために広く用いられている。しかし、ステロイドおよび免疫抑制薬の使用は、毒性および潜在的に致命的状態に陥りやすいことの両方に関して重大なリスクおよび副作用をもつ。より最近になって、“生物製剤”をベースとする療法薬がR A療法に導入された。そのような療法薬は、たとえばTNF- $\alpha$ を指向する可溶性受容体または抗体であり、それらは炎症を有意に軽減する。生物製剤はきわめて有望ではあるが、高価であるため依然として使用は限定されている。

40

## 【0014】

縦断的な臨床試験および疫学試験からのデータは、処置のためのガイドラインを提供する。これらの試験は、1) 早期診断の必要性、2) 予後要因の同定、および3) 早期の攻撃的処置を強調する。早期の、好ましくは症状発現後の最初の数カ月以内の診断および処置は、不可逆的な関節損傷を防止するのに役立つ可能性がある。

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0015】

50

【非特許文献1】Arnett, F. C., et al., Arthritis Rheum. 31 (1988) 315-324

【非特許文献2】Mjaavatten and Bykerk, Best Practice & Research Clinical Rheumatology, 2010

【非特許文献3】Van der Heijde, D. M., Br. J. Rheumatol. 34 (1995) 74-78

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

よって、特に生化学的パラメーターに基づいて関節リウマチの査定を補助する方法に対するニーズがある。本発明は、関節リウマチの非存在または存在をインビトロで査定するためのそのような方法および試薬を提供する。本方法は、RAに罹患している患者における処置の有効性のモニタリングも補助するであろう。

10

【課題を解決するための手段】

【0017】

本発明は、関節リウマチ(RA)をインビトロで生化学マーカーにより査定するための方法であって、試料において抗CCPおよび抗PIK3CDの濃度を測定し、決定した濃度をRAの非存在または存在に関連付けることを含む方法に関する。

【0018】

さらに本発明は、関節リウマチ(RA)の重症度をインビトロで生化学マーカーにより査定するための方法であって、試料において抗CCPおよび抗PIK3CDの濃度を測定し、それらの濃度をRAの重症度に関連付けることを含む方法に関する。

20

【0019】

本発明はまた、関節リウマチ(RA)をインビトロで生化学マーカーにより他の自己免疫疾患から鑑別するための方法であって、試料において抗CCPおよび抗PIK3CDの濃度を測定し、組合わせ濃度値の増大により、RAを他の自己免疫疾患、好ましくは他の関節疾患から鑑別することを含む方法に関する。

【0020】

さらに、RAを他の自己免疫疾患、好ましくは他の関節疾患から鑑別する方法の使用を開示する。

さらに、関節リウマチ(RA)の非存在または存在をインビトロで試料から査定するための、抗CCPおよび抗PIK3CDを含むマーカーパネルの使用を開示する。

30

【0021】

さらに、RAの非存在または存在の査定における、少なくとも抗CCPおよび抗PIK3CDを含むマーカーパネルについての最適化多変量カットオフ(optimized multivariate cut-off)の使用を開示し、その際、最適化多変量カットオフは抗CCPおよび抗PIK3CDについて測定した濃度値を組み合わせることにより得られる。

【0022】

抗CCPおよび抗PIK3CDをそれぞれ特異的に測定するために必要な試薬、ならびに場合により測定を実施するための補助試薬を含む、本発明による方法を実施するためのキットも開示される。

【発明を実施するための形態】

40

【0023】

第1の好ましい態様において、本発明は、関節リウマチ(RA)の非存在または存在をインビトロで生化学マーカーにより査定するための、下記を含む方法に関する：a)全血、血漿または血清試料において、少なくとも抗環状シトルリン化ペプチド(抗CCP)および抗PIK3CDの濃度をそれぞれ測定する；b)(a)において抗CCPおよび抗PIK3CDについて測定した濃度値を組み合わせる；そしてc)工程(b)において決定した組合わせ数値をRAの非存在または存在と関連付ける；その際、基準集団から抗CCPおよび抗PIK3CDについて測定したカットオフ組合わせ濃度値と比較して増大した組合わせ数値は、RAの存在の指標となる。

【0024】

50

第2の好ましい態様において、本発明は、関節リウマチ（RA）の重症度をインビトロで生化学マーカーにより査定するための、下記を含む方法に関する：a）全血、血漿または血清試料において、少なくとも抗環状シトルリン化ペプチド（抗CCP）および抗PIK3CDの濃度をそれぞれ測定する；b）（a）において抗CCPおよび抗PIK3CDについて測定した濃度値を組み合わせる；そしてc）（b）からの組み合わせ数値をRAの重症度に関連付ける；その際、基準集団から抗CCPおよび抗PIK3CDについて測定したカットオフ組み合わせ濃度値と比較してより高い組み合わせ数値は、その患者のRAの重症度の指標となる。

【0025】

第3の好ましい態様において、本発明は、関節リウマチ（RA）をインビトロで生化学マーカーにより他の自己免疫疾患から鑑別するための、下記を含む方法に関する：a）全血、血漿または血清試料において、少なくとも抗環状シトルリン化ペプチド（抗CCP）および抗PIK3CDの濃度をそれぞれ測定する；b）（a）において抗CCPおよび抗PIK3CDについて測定した濃度値を組み合わせる；そしてc）（b）からの増大した組み合わせ数値により、RAを他の自己免疫疾患から鑑別する；その際、基準集団から抗CCPおよび抗PIK3CDについて測定したカットオフ組み合わせ濃度値と比較して増大した組み合わせ数値は、RAの存在の指標となる。好ましくは、1態様において他の自己免疫疾患は変形性関節症（OA）である。

10

【0026】

本明細書中で用いる下記の用語は、それぞれこのセクションにおいてそれに付随する意味をもつ。

20

冠詞“a”および“an”は、本明細書中で、その冠詞の目的語が1または1より多い（すなわち、少なくとも1である）ことを表わすために用いられる。たとえば、“a marker”は1つのマーカーまたは1より多いマーカーを意味する。

【0027】

本明細書中で用いる用語“マーカー”または“生化学マーカー”は、患者の検査試料を分析するためのターゲットとして用いられる分子を表わす。そのような分子ターゲットの例は、試料中に存在するタンパク質またはポリペプチドそのもの、および抗体である。本発明においてマーカーとして用いるタンパク質またはポリペプチドは、そのタンパク質のいずれかのバリエーション、およびそのタンパク質またはそのバリエーションのフラグメント、特に免疫学的に検出できるフラグメントを含むものとする。細胞により放出されるか、または細胞外マトリックス中に存在し、たとえば炎症に際して損傷を受けたタンパク質が、分解または開裂してそのようなフラグメントになる可能性があることを、当業者は認識しているであろう。あるマーカーは不活性な形態で合成され、それがその後タンパク質分解により活性化される可能性がある。当業者が認識しているように、タンパク質またはそのフラグメントは複合体の一部として存在する可能性もある。そのような複合体も、本発明の意味においてマーカーとして使用できる。マーカーポリペプチドのバリエーションは同じ遺伝子によりコードされるが、それらのPIもしくはMW、または両方が異なり（たとえば、オルタナティブmRNAもしくはpre-mRNAプロセッシング、たとえばオルタナティブスプライシング、または限定されたタンパク質分解の結果として）、さらに、またはその代わりに、差示的な翻訳後修飾（たとえば、グリコシル化、アシル化、および/またはリン酸化）から生じる可能性がある。

30

40

【0028】

本発明に従った前記のマーカーという用語は、試料中に存在する抗体にも関係する。RAの場合、これらの抗体は自己抗体、すなわち患者試料中の抗体であり、それらは患者自身の細胞中もしくは細胞上に存在するかまたはそれらの細胞により産生される抗原に結合する。

【0029】

本明細書中で用いる用語“試料”は、インビトロでの評価の目的で得られた生体試料を表わす。本発明の方法において、試料または患者試料は、好ましくはいずれかの体液を含

50

むことができる。好ましい検査試料には、血液、血清、血漿、尿、唾液、および滑液が含まれる。好ましい試料は全血、血清または血漿であり、血漿または血清が最も好ましい。さらに好ましいものはヒト対象からの試料である。

【0030】

当業者が認識しているように、そのような診断はいずれもインビトロで行なわれる。患者試料はその後、廃棄される。患者試料は単に本発明のインビトロ診断法のために用いられ、患者試料の材料が患者の体内へ戻されることはない。一般に、試料は液体試料である。

【0031】

用語“関節リウマチを査定する”は、本発明による方法が（他の変量、たとえばARAにより提示される基準（前記を参照）と共に）、医師が自身のRA診断を確立するのを補助するであろうということを示すために用いられる。好ましい態様において、この査定はRAの存在または非存在に関するものであろう。当業者が認識しているように、特定の疾患について100%の特異度と同時に100%の感度で診断する生化学マーカーはなく、むしろ生化学マーカーはある尤度または推定値で疾患の存在または非存在を査定するために用いられる。好ましくは、本発明による方法（単数または複数）はRAの存在または非存在を査定するのを補助する。さらなる好ましい態様において、本発明による方法（単数または複数）はRAの存在または非存在を検出するのを補助する。よりさらなる好ましい態様において、本発明による方法（単数または複数）はRAの存在または非存在を診断するのを補助する。

10

20

【0032】

当業者が認識しているように、マーカーレベルをRAの存在または非存在に関連付ける工程は種々の方法で実施および達成できる。一般に、基準集団を選択し、正常範囲を確立する。抗CCPおよび抗PIK3CDの両方について適宜な基準集団を用いて正常範囲を確立するのはルーティン実験にすぎない。正常範囲はある程度（限られた程度ではあるが）それが確立される基準集団により左右されることは一般に受け入れられている。理想的な基準集団は、数が多く（たとえば数百ないし数千）、年齢、性別、および場合により着目する他の変量が調和する。絶対値、たとえば特定の濃度に関する正常範囲は、採用するアッセイおよびそのアッセイを行なう際に用いる標準化によっても左右される。

30

【0033】

抗CCPおよび抗PIK3CDのレベルは、実施例のセクションに示すアッセイ法で測定および確認された。異なるアッセイが異なるカットオフ値をもたらす可能性があり、それは本発明の範囲から逸脱しないことを理解すべきである。

【0034】

シトルリン化ペプチドは、RAを伴う患者の血清中にみられるかなり重要な自己抗体についての抗原である。それらはこの数年間、幾つかの研究者グループによって集中的に研究されてきた（たとえば、WO 98/08946; WO 98/22503; WO 99/28344; WO 99/35167; WO 01/46222; およびWO 03/050542を参照）。最近、Schellekensおよび協同研究者ら（Schellekens, G. A. et al., Arthritis Rheum. 43 (2000) 155-163）は、特異的な環状シトルリン化ペプチド（CCP）に基づくELISA試験が、線状ペプチドを用いる同じアッセイと比較してRAの診断正確度に関して卓越した性能を示すと報告した。

40

【0035】

CCPに対する自己抗体、すなわち患者血清中を循環しているシトルリン化ポリペプチドと反応性である可能性が最も高く、インビトロアッセイにおいてCCPに結合する抗体は、“抗CCP”と呼ばれる。Venrojiらによる特許出願（WO 98/22503）には、あるシトルリン化ペプチドが記載され、環化は各ペプチドの反応性改善をもたらすことが示されている。具体例において、一般式HQCHESTXGRSRGRCSGS（SEQ ID NO: 8）（Xはシトルリンを表わす）のペプチドをシステイン残基間のジスルフィド結合により環化すると、対応する線状ペプチドペプチドに対する36%と比較して感度が63%に増大することが示されている。患者血清中の自己抗体は異なる環状ペプチドに

50

対してわずかに異なる反応性をもつので、アッセイをさらに改善するためにWO 98/22503にはペプチドの組み合わせが示唆されている。

【0036】

好ましい態様において、抗CCPをvan VenroijらによるWO 03/050542の記載に従って測定する。要約すると、一般式X-GおよびX-nonG(式中、Xはシトルリン、Gはグリシン、nonGはアミノ酸H、I、W、S、R、K、Y、M、F、V、P、Citのいずれかを表わす)のエピトープ部位を含むペプチドまたはそのアナログの組み合わせを用いて試料中の抗CCP抗体(抗CCP)のレベルを査定する。そのような査定に有用なペプチドはWO 03/050542に記載されている。当業者が容易に認識するように、抗CCPを測定するためのアッセイに用いる環状シトルリン化ペプチド抗原に関して、たとえば環状シトルリン化ペプチド配列の配列変更を生じるさらなる改善および改良が可能である。しかし、そのような改変は本発明の精神から逸脱しないであろう。

10

【0037】

CCPに結合する抗体、すなわち抗CCPは、血清学的アッセイで測定される。好ましくは、そのようなアッセイは、1種類以上のCCPを抗原として用い、CCP抗原への試料中に存在する抗CCP抗体の結合を適宜な手段で検出することにより設定される。

【0038】

MCM3タンパク質(ミニ染色体維持タンパク質3(minichromosome maintenance protein 3)), Swiss Prot ID: P25205 (EC = 3.6.4.12), SEQ ID NO: 5は、核局在化配列(nuclear localization sequence)を含む110kDのDNA依存性ATPaseである。MCM3タンパク質は、DNAを細胞周期当たり1回複製させる作用をするDNA複製開始前複合体(DNA pre-replication complex)の構成要素である。MCM3は構成性発現し、アセチル化により修飾される可能性がある。MCM3のアセチル化はDNA複製の開始を阻害する。MCM3はMCM5(CDC46)およびMCM3APタンパク質と相互作用すると報告されている。

20

【0039】

MCM3に対する自己抗体、すなわち患者血清中を循環しているミニ染色体維持タンパク質3(MCM3)ポリペプチドと反応する可能性が最も大きく、インビトロアッセイでMCM3に結合する抗体は、“抗MCM3”と呼ばれる。

【0040】

MCM3に結合する抗体、すなわち抗MCM3は、血清学的アッセイで測定される。好ましくは、そのようなアッセイは、1種類以上のMCM3を抗原として用い、MCM3抗原への試料中に存在する抗MCM3抗体の結合を適宜な手段で検出することにより設定される。

30

【0041】

カスパーゼ8(Caspase-8)(Casp8)タンパク質, Swiss Prot ID: Q14790 (EC: 3.4.22.61), SEQ ID NO: 6は、不活性プロ酵素として合成される55kDaの細胞質ゾルタンパク質である。Casp8の活性化は2工程タンパク質分解を伴う: Casp8が開裂して43kDaおよび12kDaのフラグメントを生成し、これがさらにプロセシングされて10kDaになり、次いでp43が次に開裂してp26を生成し、活性部位を含むp18が放出される。

40

【0042】

Casp8に対する自己抗体、すなわち患者血清中を循環しているカスパーゼ8(Casp8)ポリペプチドと反応する可能性が最も大きく、インビトロアッセイでCasp8に結合する抗体は、“抗Casp8”と呼ばれる。

【0043】

Casp8に結合する抗体、すなわち抗Casp8は、血清学的アッセイで測定される。好ましくは、そのようなアッセイは、1種類以上のCasp8を抗原として用い、Casp8抗原への試料中に存在する抗Casp8抗体の結合を適宜な手段で検出することにより設定される。

50

## 【 0 0 4 4 】

ホスファチジルイノシトール - 4 , 5 - ビスホスフェート 3 - キナーゼ触媒サブユニット P I 3 - キナーゼ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit PI3-Kinase) ( P I K 3 C D ) タンパク質 , S w i s s P r o t I D : O 0 0 3 2 9 , S E Q I D N O : 7 は、シグナル伝達における関与が示唆されている P I 3 脂質キナーゼ (PI3-lipid kinase) ( P I 3 - K ) のファミリーに属する。 P I 3 - K は 2 つのサブユニットからなる ; p 8 5 および p 1 1 0 。 p 8 5 サブユニットは P I 3 - K 活性を細胞膜へ局在化させ、これに対し p 1 1 0 サブユニットは P I 3 - K の触媒ドメインを含む。 p 1 1 0 の 4 つのイソ形が見出されている ; アルファ、ベータ、ガンマおよびデルタサブユニット。デルタイソ形は主に白血球に発現し、その S H 2 / S H 3 ドメインを介して、 p 8 5 および G T P 結合 R a s と相互作用することが示された。

10

## 【 0 0 4 5 】

P I K 3 C D に対する自己抗体、すなわち患者血清中を循環しているホスファチジルイノシトール - 4 , 5 - ビスホスフェート 3 - キナーゼ触媒サブユニット P I 3 - キナーゼ ( P I K 3 C D ) ポリペプチドと反応する可能性が最も大きく、インビトロアッセイで P I K 3 C D に結合する抗体は、“抗 P I K 3 C D ” と呼ばれる。

## 【 0 0 4 6 】

P I K 3 C D に結合する抗体、すなわち抗 P I K 3 C D は、血清学的アッセイで測定される。好ましくは、そのようなアッセイは、1種類以上の P I K 3 C D を抗原として用い、P I K 3 C D 抗原への試料中に存在する抗 P I K 3 C D 抗体の結合を適宜な手段で検出することにより設定される。

20

## 【 0 0 4 7 】

好ましい検出手段は、特異的結合アッセイ、特にイムノアッセイである。イムノアッセイは当業者に周知である。そのようなアッセイを実施するための方法ならびに実際の適用および操作は関連文献に概説されている。そのような関連文献の例は、Tijssen, P., In: Practice and theory of enzyme immunoassays, eds. R. H. Burdon and v. P. H. Knippenberg, Elsevier, Amsterdam (1990) 221-278、および Methods in Enzymology の各巻, eds. S.P. Colowick, N.O. Caplan and S.P., Academic Press, 免疫学的検出方法に関するもの、特に volume 70, 73, 74, 84, 92 および 121 である。

## 【 0 0 4 8 】

さらなる態様によれば、本発明による方法 ( 単数または複数 ) の工程 ( a ) はイムノアッセイ法により実施される。

30

本発明による方法 ( 単数または複数 ) 、好ましくはイムノアッセイ法 ( 単数または複数 ) において、抗 C C P は抗原としての 1 種類以上の C C P により捕捉される。

## 【 0 0 4 9 】

本発明による方法 ( 単数または複数 ) 、好ましくはイムノアッセイ法 ( 単数または複数 ) において、抗 C a s p 8 は抗原としての 1 種類以上の C a s p 8 により捕捉される。

本発明による方法 ( 単数または複数 ) 、好ましくはイムノアッセイ法 ( 単数または複数 ) において、抗 M C M 3 は抗原としての 1 種類以上の M C M 3 により捕捉される。

## 【 0 0 5 0 】

本発明による方法 ( 単数または複数 ) 、好ましくはイムノアッセイ法 ( 単数または複数 ) において、抗 P I K 3 C D は抗原としての 1 種類以上の P I K 3 C D により捕捉される。

40

## 【 0 0 5 1 】

1 態様において、1種類以上のキャプチャー抗原は、全長タンパク質またはそのタンパク質から選択されるポリペプチドフラグメントである。

好ましい態様において、キャプチャー抗原は C C P またはそのポリペプチドフラグメントである。

## 【 0 0 5 2 】

好ましい態様において、キャプチャー抗原は C a s p 8 またはそのポリペプチドフラグ

50

メントである。

好ましい態様において、キャプチャー抗原はM C M 3またはそのポリペプチドフラグメントである。

【0053】

好ましい態様において、キャプチャー抗原はP I K 3 C Dまたはそのポリペプチドフラグメントである。

さらなる態様において、ポリペプチドフラグメントは、そのタンパク質から選択される10~25 A Aの抗原性配列である。

【0054】

よりさらなる好ましい態様において、抗M C M 3に対する1種類以上のキャプチャー抗原はそれぞれS E Q I D N O : 5から選択される。

よりさらなる好ましい態様において、抗抗C a s p 8に対する1種類以上のキャプチャー抗原はそれぞれS E Q I D N O : 6から選択される。

【0055】

よりさらなる好ましい態様において、抗抗P I K 3 C Dに対する1種類以上のキャプチャー抗原はそれぞれS E Q I D N O : 7から選択される。

よりさらなる好ましい態様において、M C M 3キャプチャー抗原はペプチドP A T K K T I E R R Y S D L T ( Y 1 5 9 , S E Q I D N O : 1 ) である。

【0056】

よりさらなる好ましい態様において、C a s p 8キャプチャー抗原はペプチドN K S L L K I I N D Y E E F S ( Y 1 7 8 , S E Q I D N O : 2 ) である。

よりさらなる好ましい態様において、P I K 3 C Dキャプチャー抗原はペプチドD Q L K T G E R C L Y M W P S ( Y 4 4 0 , S E Q I D N O : 3 ) および/またはペプチドD Q L K T G E R S L Y M W P S ( Y 4 4 0 \* , S E Q I D N O : 4 ) である。

【0057】

本発明方法(単数または複数)によるある態様において、1種類以上のキャプチャー抗原を固定化する。さらに、1態様において、1種類以上のキャプチャー抗原を固体支持体上に、好ましくは粒子またはバイオチップの表面に固定化する。

【0058】

“固体支持体”は不溶性の官能化されたポリマー材料であり、それにライブラリーメンパーまたは試薬を付着または共有結合させて(しばしばリンカーを介して)固定化し、あるいはそれらを過剰の試薬、可溶性の反応副産物、または溶媒から容易に分離させることができる(濾過、遠心分離、洗浄など)。

【0059】

抗C C P、抗P I K 3 C D、抗C a s p 8および抗M C M 3について、試料中に含まれる(自己)抗体をそれぞれ測定することができる。

抗C C P抗体は均一アッセイ方式により、たとえばC C Pでコーティングしたラテックス粒子の凝集により検出できる。

【0060】

好ましくは、不均一イムノアッセイを用いて抗C C Pを測定する。そのような不均一測定は、固相にC C Pを直接または間接的にコーティングし、抗C C P抗体がC C Pに結合できる条件下で、抗C C P抗体を含むことが分かっているかまたはその疑いがある試料と共に固相をインキュベートし、そして結合した抗C C P抗体を直接または間接的に検出することに基づく。さらなるアッセイ方式は、いわゆる二重抗原架橋アッセイであり、その際、抗C C P測定の場合にはこのイムノアッセイの固相側と検出側の両方にC C Pを用い、患者試料中の自己抗体がこれらの“二重”抗原間に架橋を形成する。必要または適切な場合には、不均一イムノアッセイの実施中に洗浄工程を含める。

【0061】

本発明による1態様において、環状シトルリン化ペプチドに対する抗体(抗C C P)を免疫学的アッセイ、好ましくはE L I S Aまたは電気化学発光イムノアッセイ(electroch

10

20

30

40

50

emiluminescence immunoassay) (ECLIA) で測定する。

【0062】

本発明によれば、環状シトルリン化ペプチドに対する抗体(抗CCP)を、特定の1態様においては市販のE l e c s y s A n t i - C C Pアッセイで測定する。抗CPアッセイは、たとえばE l e c s y s 2010、MODULAR ANALYTICS E 170、cobas e 411、cobas e 601またはcobas e 602分析計(実施例2)で実施できる。本発明方法による特定の態様において、RA陽性についての抗CCPアッセイカットオフは5U/mLである。さらなる特定の態様において、RA陰性についての抗CCPアッセイカットオフは<5U/mLである。

【0063】

抗Casp8抗体は均一アッセイ方式により、たとえばCasp8でコーティングしたラテックス粒子の凝集により検出できる。

好ましくは、不均一イムノアッセイを用いて抗Casp8を測定する。そのような不均一測定は、固相にCasp8を直接または間接的にコーティングし、抗Casp8抗体がCasp8に結合できる条件下で、抗Casp8抗体を含むことが分かっているかまたはその疑いがある試料と共に固相をインキュベートし、そして結合した抗Casp8抗体を直接または間接的に検出することに基づく。さらなるアッセイ方式は、いわゆる二重抗原架橋アッセイであり、その際、抗Casp8測定の場合にはこのイムノアッセイの固相側と検出側の両方にCasp8を用い、患者試料中の自己抗体がこれらの“二重”抗原間に架橋を形成する。必要または適切な場合には、不均一イムノアッセイの実施中に洗浄工程を含める。

【0064】

本発明による1態様において、カスパーゼ-8に対する抗体(抗Casp8)を免疫学的アッセイ、好ましくはELISAまたは電気化学発光イムノアッセイ(ECLIA)で測定する。

【0065】

実施例1および表1ならびに本発明による方法に示す基準集団について、マーカー抗[Casp8]についてのカットオフ49.9U/mLを選択した。

特定の態様において、RA陽性についての抗Casp8アッセイカットオフは49.9U/mLである。さらなる特定の態様において、RA陰性についての抗Casp8アッセイカットオフは<49.9U/mLである。

【0066】

抗MCM3抗体は、均一アッセイ方式により、たとえばMCM3でコーティングしたラテックス粒子の凝集により検出できる。

好ましくは、不均一イムノアッセイを用いて抗MCM3を測定する。そのような不均一測定は、固相にMCM3を直接または間接的にコーティングし、抗MCM3抗体がMCM3に結合できる条件下で、抗MCM3抗体を含むことが分かっているかまたはその疑いがある試料と共に固相をインキュベートし、そして結合した抗MCM3抗体を直接または間接的に検出することに基づく。さらなるアッセイ方式は、いわゆる二重抗原架橋アッセイであり、その際、抗MCM3測定の場合にはこのイムノアッセイの固相側と検出側の両方にMCM3を用い、患者試料中の自己抗体がこれらの“二重”抗原間に架橋を形成する。必要または適切な場合には、不均一イムノアッセイの実施中に洗浄工程を含める。

【0067】

本発明による1態様において、ミニ染色体維持タンパク質3に対する抗体(抗MCM3)を免疫学的アッセイ、好ましくはELISAまたは電気化学発光イムノアッセイ(ECLIA)で測定する。

【0068】

実施例1および表1ならびに本発明による方法に示す基準集団について、マーカー抗MCM3についてのカットオフ15.1U/mLを選択した。

特定の態様において、RA陽性についての抗MCM3アッセイカットオフは15.1

10

20

30

40

50

U / m L である。さらなる特定の態様において、R A 陰性についての抗 M C M 3 アッセイカットオフは < 1 5 . 1 U / m L である。

【 0 0 6 9 】

抗 P I K 3 C D 抗体は、均一アッセイ方式により、たとえば P I K 3 C D でコーティングしたラテックス粒子の凝集により検出できる。

好ましくは、不均一イムノアッセイを用いて抗 P I K 3 C D を測定する。そのような不均一測定は、固相に P I K 3 C D を直接または間接的にコーティングし、抗 P I K 3 C D 抗体が P I K 3 C D に結合できる条件下で、抗 P I K 3 C D 抗体を含むことが分かっているかまたはその疑いがある試料と共に固相をインキュベートし、そして結合した抗 P I K 3 C D 抗体を直接または間接的に検出することに基づく。さらなるアッセイ方式は、いわゆる二重抗原架橋アッセイであり、その際、抗 P I K 3 C D 測定の場合にはこのイムノアッセイの固相側と検出側の両方に P I K 3 C D を用い、患者試料中の自己抗体がこれらの“二重”抗原間に架橋を形成する。必要または適切な場合には、不均一イムノアッセイの実施中に洗浄工程を含める。

【 0 0 7 0 】

本発明による 1 態様において、ホスファチジルイノシトール - 4 , 5 - ビスホスフェート 3 - キナーゼ触媒サブユニット P I 3 - キナーゼ ( P I K 3 C D ) を免疫学的アッセイ、好ましくは E L I S A または電気化学発光イムノアッセイ ( E C L I A ) で測定する。

【 0 0 7 1 】

実施例 1 および表 1 ならびに本発明による方法に示す基準集団について、マーカー抗 P I K 3 C D についてのカットオフ 1 5 . 1 U / m L を選択した。

特定の態様において、R A 陽性についての抗 P I K 3 C D アッセイカットオフは 1 5 . 1 U / m L である。さらなる特定の態様において、R A 陰性についての抗 P I K 3 C D アッセイカットオフは < 1 5 . 1 U / m L である。

【 0 0 7 2 】

診断に理想的なシナリオは、たとえば感染性疾患におけるように単一の事象またはプロセスがそれぞれの疾患を引き起こす状況であろう。他のすべての症例において、特に R A の症例のようにその疾患の病因が完全には理解されていない場合は、適性な診断はきわめて困難な可能性がある。したがって、R A の診断のためには一般に種々の臨床症状および生物学的マーカーを合わせて考慮する。マーカーは個別に測定することができ、あるいは本発明の好ましい態様においてはチップ ( バイオチップ ) またはビーズベースのアレイ技術を用いてそれらを同時に測定することができる。次いで、各マーカーについての個々のカットオフを用いてバイオマーカーの濃度を独立して解釈し、あるいは解釈のためにそれらを組み合わせる。

【 0 0 7 3 】

本発明の好ましい態様において、工程 ( b ) の組み合わせ濃度値を、R A 陽性患者を除外した、明らかに健康な者ならびに変形性関節症 ( O A ) 患者および他の自己免疫疾患患者からなる群から選択される患者を含む基準集団から得られたカットオフ値と比較する。

【 0 0 7 4 】

1 態様におけるマーカーパネルは、単一テストデバイス内で、たとえばチップまたはアレイフォーマットで組み合わせられる。本発明によるマーカーパネルは、ある態様において、バイオチップアレイ ( タンパク質アレイ ) 技術を用いて決定される。アレイはアドレス指定可能な個々のマーカーの集合体である。そのようなマーカーは空間的にアドレス指定可能である ; たとえば、マイクロタイタープレート内に収容され、または平面状の表面にプリントされ、各マーカーが別個の X および Y 座標に存在するアレイ。あるいは、タグ、ビーズ、ナノ粒子または物理的特性に基づいてマーカーをアドレス指定することができる。バイオチップアレイは当業者に既知の方法に従って作成できる ( たとえば、US 5,807,522; Robinson, W.H., et al., Nat. Med. 8 (2002) 295-301; Robinson, W.H., et al., Arthritis Rheum. 46 (2002) 885-893 を参照 ) 。本発明において用いるアレイは、多数

10

20

30

40

50

のアドレス指定可能なマーカーを用いるいずれかの免疫学的アッセイを表わす。バイオチップアレイ（当業者にはマイクロアレイとしても知られている）は小型化した形態のアレイである。

【0075】

用語“チップ”、“バイオチップ”、“ポリマーチップ”または“プロテインチップ”は互換性をもって用いられ、シリコンウェハー、ナイロンストリップ、プラスチックストリップ、またはスライドガラスの一部であってもよい共通の支持体上に配列された多数のプローブ、マーカーまたは生化学マーカーの集合体を表わす。

【0076】

“アレイ”、“マクロアレイ”または“マイクロアレイ”は、アレイを形成する支持体または固体表面、たとえばガラス、プラスチック、シリコンチップまたは他の材料上に付着または加工した、分子、マーカー、開口、マイクロコイル、検出器および/またはセンサーなどの物体の意図的に作成された集合体である。それらのアレイを用いて多数の、たとえば数十、数千または数百万の反応または結合のレベルを同時に測定できる。アレイは少数の、たとえば数個または1ダースの物体を収容することもできる。アレイ中の物体は互いに同一または異なる形態であってもよい。アレイは多様な形態をとることができる；たとえば、樹脂ビーズ、シリカチップ、または他の固体支持体に繋ぎ止めた、可溶性分子のライブラリー、固定化した分子のライブラリー、固定化した抗体のライブラリー、化合物のライブラリー。アレイは、アレイ上のパッドのサイズに応じてマクロアレイまたはマイクロアレイのいずれであってもよい。マクロアレイは一般に約300ミクロン以上のパッドサイズを含み、ゲルおよびプロットスキャナーによって容易にイメージングできる。マイクロアレイは一般に約300ミクロン未満のパッドサイズをもつであろう。

10

20

【0077】

ある態様において、本発明は、固定化したキャプチャー抗原CCP、ならびに抗PIK3CD、抗MCM3および抗Casp8からなる群から選択される少なくとも1種類またはそれより多い固定化したキャプチャー抗原を含むバイオチップアレイに関する。

【0078】

本発明はまた、ある態様において、抗CCP、ならびに抗PIK3CD、抗MCM3および抗Casp8からなる群から選択される少なくとも1種類またはそれより多いマーカーの濃度を特異的に決定する本発明による方法を実施するためのバイオチップアレイ、ならびに場合により測定を実施するための補助試薬を提供する。

30

【0079】

本発明はまた、ある態様において、抗CCP、ならびに抗PIK3CD、抗MCM3および抗Casp8からなる群から選択される少なくとも1種類またはそれより多いマーカーの濃度を特異的に決定する本発明による方法を実施するためのバイオチップアレイ、ならびに場合によりRAの存在または非存在を査定する際の補助試薬を提供する。

【0080】

実施例のセクションに示すように、2種類のマーカー抗CCPおよび抗Casp8の組み合わせだけでもRAについての診断正確度を有意に改善する。

本発明による方法において、少なくともバイオマーカー抗CCPおよび抗PIK3CDそれぞれの濃度を決定し、マーカーの組み合わせをRAの非存在または存在に関連付ける。

40

【0081】

当業者が認識しているように、調べている診断問題を改善するために2種類以上のマーカーの測定値を使用するための多数の方法がある。きわめて単純ではあるが、それにもかかわらずしばしば有効な方法では、調べた少なくとも1種類のマーカーについて試料が陽性であれば陽性結果と査定する。これは、たとえばエイズのような感染性疾患を診断する場合に当てはまるであろう。しかし、多くの場合、マーカーの組み合わせを評価する。

【0082】

好ましくは、マーカーパネルのマーカー、たとえば抗CCPおよび抗PIK3CDについて測定した数値を数学的に組み合わせ、その組み合わせ数値を根底にある診断問題に関連

50

付ける。マーカー値を当技術分野における適宜な数学的方法により組み合わせることができる。マーカーの組み合わせを疾患に関連付けるための周知の数学的方法は、下記のような方法を採用する：判別分析(discriminant analysis) ( D A ) ( すなわち、線形(linear-)、二次(quadratic-)、正側化(regularized-) D A )、カーネル法(Kernel Method) ( すなわち、S V M )、ノンパラメトリック法(Nonparametric Method) ( すなわち、k - 最近傍識別器(k-Nearest-Neighbor Classifiers))、P L S (Partial Least Squares) ( 部分的最小二乗 )、樹木モデル法(Tree-Based Method) ( すなわち、ロジック回帰(Logic Regression)、C A R T、ランダムフォレスト法(Random Forest Method)、ブースティング/バギング法(Boosting/Bagging Method))、一般化線形モデル(Generalized Linear Model) ( すなわち、ロジスティック回帰(Logic Regression))、主成分ベースの方法(Principal Components based Method) ( すなわち、S I M C A )、一般化加法モデル(Generalized Additive Model)、ファジィ論理ベースの方法(Fuzzy Logic based Method)、神経回路網および遺伝学的アルゴリズムをベースとする方法。本発明のマーカー組み合わせを評価するのに適した方法を選択する際に、当業者には何の問題も無いであろう。好ましくは、本発明のマーカー組み合わせを、たとえば R A の非存在または存在に関連付ける際に用いる方法は、D A ( すなわち、線形、二次、正側化判別分析 )、カーネル法 ( すなわち、S V M )、ノンパラメトリック法 ( すなわち、k - 最近傍識別器 )、P L S ( 部分的最小二乗 )、樹木モデル法 ( すなわち、ロジック回帰、C A R T、ランダムフォレスト法、ブースティング法 )、または一般化線形モデル ( すなわち、ロジスティック回帰 ) から選択される。これらの統計学的方法に関するは詳細は下記の参考文献中にある：Ruczinski, I., Kooperberg C., LeBlanc, M., Logic regression, J. of Computational and Graphical Statistics, 12 (2003) 475-511; Friedman, J. H. , Regularized Discriminant Analysis, J. of the American Statistical Association, Vol. 84 (1989) 165-175; Hastie, Trevor, Tibshirani, Robert, Friedman, Jerome, The Elements of Statistical Learning, Springer Series in Statistics, 2001; Breiman, L., Friedman, J. H., Olshen, R. A., Stone, C. J. (1984) Classification and regression trees, California: Wadsworth; Breiman, L., Random Forests, Machine Learning, 45 (2001) 5-32; Pepe, M. S., The Statistical Evaluation of Medical Tests for Classification and Prediction, Oxford Statistical Science Series, 28 (2003); およびDuda, R. O., Hart, P. E., Stork, D. G., Pattern Classification, Wiley Interscience, 2nd Edition (2001)。

10

20

30

#### 【 0 0 8 3 】

本発明方法による方法 ( 単数または複数 ) の好ましい態様において、工程 ( b ) で測定した濃度値を、判別分析、カーネル法、ノンパラメトリック法、部分的最小二乗、樹木モデル法、一般化線形モデル、主成分ベースの方法、一般化加法モデル、ファジィ論理ベースの方法、神経回路網および遺伝学的アルゴリズムをベースとする方法からなる群から選択されるメンバーの使用により数学的に組み合わせる。

#### 【 0 0 8 4 】

本発明の好ましい態様は、基礎となる生物学的マーカーの組み合わせについての最適化多変量カットオフを使用し、状態 A を状態 B から、たとえば罹患状態を健康な状態から識別することである。このタイプの分析において、マーカーはもはや独立したものではなく、マーカーパネルを形成する。抗 C C P および抗 P I K 3 C D の測定値を組み合わせることは、健康な対照と比較して、または同様に査定した変形性関節症 ( O A ) を伴う患者と比較して、R A についての診断正確度を実際に著しく改善することを確証できた。特に、O A を伴う患者と R A を伴う患者はそれぞれかなり異なる処置を必要とする可能性があるため、後の知見はきわめて重要である。

40

#### 【 0 0 8 5 】

診断方法の正確度は、その受信者動作特性(receiver-operating characteristic) ( R O C ) によって最も良く記述される ( 参照：特にZweig, M. H., and Campbell, G., Clin. Chem. 39 (1993) 561-577)。R O C グラフは、判定閾値を観察データの全範囲にわたって連続的に変動させることから得られるすべての感度 / 特異度の対をプロットしたもの

50

である。

【 0 0 8 6 】

試験室検査の臨床性能は、その診断正確度、すなわち対象を臨床関係サブグループに正しく分類する能力により左右される。診断正確度はその検査が被験対象の2つの異なる状態を正しく識別する能力の尺度となる。そのような状態は、たとえば健康な状態と疾患、または良性疾患と悪性疾患である。

【 0 0 8 7 】

それぞれの場合、ROCプロットは、判定閾値の全範囲について感度を1 - 特異度に対してプロットすることにより、2つの分布間のオーバーラップを表わす。y軸には、感度、または真陽性画分 $[(\text{真陽性検査結果の数}) / (\text{真陽性検査結果の数} + \text{偽陰性検査結果の数})]$ として定義がある。これは、ある疾患または状態の存在下での陽性度とも呼ばれている。それは罹患サブグループのみから計算される。x軸には偽陽性画分、または1 - 特異度 $[(\text{偽陽性結果の数}) / (\text{真陰性結果の数} + \text{偽陽性結果の数})]$ として定義がある。それは特異度の指標であり、完全に非罹患サブグループから計算される。真陽性と偽陽性の画分は2つの異なるサブグループから完全に別個に計算されるので、ROCプロットは試料における罹患率とは無関係である。ROCプロット上の各点は、特定の判定閾値に対応する感度 / 1 - 特異度の対を表わす。完全識別を伴う検査(結果の2分布にオーバーラップが無い)は上左角を通るプロットをもち、その際、真陽性画分は1.0、または100% (完全感度) であり、偽陽性画分は0 (完全特異度) である。識別無し(2グループについての結果が同一の分布)を伴う検査についての理論的プロットは、下左角から上右角までの45°の対角線である。大部分のプロットはこれら2極端の間にある(ROCプロットが45°の対角線より完全に下側にあれば、これは“陽性度”についての基準を“より大”から“より小”へ逆転させることによって容易に救済できる; 逆についても同様)。定量的には、プロットが上左角に近いほどその検査の全体的正確度はより高い。

10

20

【 0 0 8 8 】

試験室検査の診断正確度を定量するための簡便な目標のひとつは、その性能を単一の数字により表わすことである。最も一般的な包括的尺度はROCプロット下面積である。慣例により、この面積は常に $> 0.5$ である(そうでなければ、そうなるように判定規則を逆転することができる)。数値は1.0 (2グループの検査値の完全分離) と0.5 (2グループの検査値間に明らかな分布差が無い) の間の範囲にある。その面積は、プロットの特定期間、たとえば対角線に最も近い点または90%特異度における感度だけでなく、プロット全体によっても左右される。これはそのROCプロットが完全なもの(面積 = 1.0)にいかに近いかの定量的記述表現である。

30

【 0 0 8 9 】

好ましい態様において、本発明は、試料において少なくとも抗CCPおよび抗PIK3CDの濃度を測定し、そして決定した濃度を関節リウマチの存在または非存在に関連付けることによって、健康な対照および/またはOAに罹患している患者に対比した関節リウマチについての診断正確度を改善するための方法に関するものであり、この改善によって、抗CCPのみに基づく分類と比較してより多くの患者が、健康な対照および/またはOAに罹患している患者に対比してRAに罹患していると正しく分類される。抗CCPおよび抗PIK3CDを含むRAマーカーパネルは、RAに罹患している患者について疾患の重症度の査定にももちろん使用できる。

40

【 0 0 9 0 】

当業者が認識するように、RAの査定をさらに改善するために1以上の追加バイオマーカーを使用できる。RAの査定のためのマーカーパネルの鍵マーカーとして用いる抗CCPおよび抗PIK3CDのこの追加の可能性を説明するために、用語“少なくとも”を特許請求の範囲で用いた。言い換えると、RAの査定に際して1以上の追加マーカーについて測定したレベルを抗CCPおよび抗PIK3CDの測定値と組み合わせることができる。

【 0 0 9 1 】

50

抗CCPおよび抗PIK3CDと共に用いる1種類以上の追加マーカーは、RAマーカーパネル、すなわちRAの査定をさらに改良するのに適した一連のマーカーの一部であるとみなすことができる。RAマーカーパネル中のマーカーの総数は、好ましくは20マーカー未満、より好ましくは15マーカー未満、同様に好ましくは10マーカー未満であり、8以下のマーカーがよりいっそう好ましい。合計で3、4、5または6種類のマーカーを含むRAマーカーパネルが好ましい。

【0092】

好ましい態様において、よって本発明は、関節リウマチの非存在または存在をインビトロで生化学マーカーにより査定するための方法であって、試料において抗CCP、抗PIK3CDの濃度、およびさらに1種類以上の他のマーカーの濃度を測定し、そして抗CCP、抗PIK3CDの濃度、および1種類以上の追加マーカーの濃度をRAの非存在または存在に関連付けることを含む方法に関する。

10

【0093】

1種類以上の他のマーカーをいずれか既知または将来のRAマーカーと組み合わせてもよいことは認識されるであろう。マーカーは、RAを伴う患者を健康な対照と比較することにより診断正確度を査定した場合にこのマーカー単独についてのAUCが少なくとも0.65であれば、RAマーカーとして実際に適格である。

【0094】

好ましくは、ある態様において、1種類以上の他のマーカーは抗MCM3および抗PIK3CDからなる群から選択される。

20

関節リウマチの特徴は、パンヌスとしても知られる増殖しつつある滑膜組織の関節浸潤である。パンヌスの有意部分は血管からなり、それが増殖しつつある組織に栄養素を供給する。したがって、血管新生(angiogenesis)に関連する分子がRAにおいてもRAマーカーとしてだけでなく療法ターゲットとしても研究されている(Brenchley, P. E. C., Clin. Exp. Immunol. 121 (2000) 426-429)。これらのうち血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor) (= VEGF) がより詳細に評価された。VEGFは分泌型糖タンパク質であり、それは4つの異なるイソ型にスプライシングされる。これらのイソ型のうち2つは易拡散性であり、それに対し残りのイソ型はヘパリンに強固に結合し、大部分はヘパリン含有プロテオグリカンと会合した状態でみられる。VEGFは、内皮細胞、単球および骨芽細胞に対してケモカインとして作用し、最終的に新血管形成(neovascularization)および微小血管透過性増大をもたらす。VEGFはRA患者の滑液および血清中に検出されている(Lee, S. S., et al., Clin. Exp. Rheumatology 19 (2001) 321-324; Ballara, S., Arthritis Rheum. 44 (2001) 2055-2064)。好ましくは、血管新生のマーカーはVEGFである。

30

【0095】

最も顕著な関節組織は骨、軟骨および滑膜である。関節リウマチは破壊性疾患であるので、これらの組織が最も影響を受けるであろう。それらはRAの分野における潜在的な生物学的マーカーの供給源である可能性がある。原則として、これらのマーカーは各組織の破壊から生じるだけでなく、修復プロセスの脱調節および/または無効から生じる可能性もある。経験豊富な当業者は、骨、軟骨または滑膜の代謝のマーカーがこれらの組織の合成または破壊のいずれにも由来する可能性があることを理解するであろう。骨、軟骨および/または滑膜の代謝の各種マーカーは2つの異なるグループのタンパク質から記述することができる。それらは多数のタイプのコラーゲンから、または非コラーゲン性タンパク質から生じる。非コラーゲン性タンパク質はしばしば細胞外マトリックスの形成に参与する。これらのマーカーのうちあるものは、3種類すべての組織に種々の量で見出すことができる。

40

【0096】

好ましくは、RAマーカーパネルは少なくとも3種類のマーカーを含み、それには抗CCP、抗PIK3CD、ならびに抗MCM3および抗Casp8からなる群から選択される第3マーカーが含まれる。

50

## 【0097】

RAの査定に際しては、抗CCP、抗PIK3CD、抗MCM3および抗Casp8を含むマーカーパネルが好ましい。

RAマーカーのさらなる好ましいパネルは、抗CCP、抗PIK3CDおよび抗MCM3を含む。

## 【0098】

RAマーカーのさらなる好ましいパネルは、抗CCP、抗PIK3CDおよび抗Casp8を含む。

同様に好ましくは、少なくとも1種類の追加マーカーは、抗MCM3および抗Casp8からなる群から選択される。さらなる好ましい態様において、追加マーカーは抗MCM3である。さらなる好ましい態様において、追加マーカーは抗Casp8である。

10

## 【0099】

さらに前記に述べたように(参照:ARA規準)-著しい制限があるにもかかわらず-リウマチ因子(rheumatoid factor)(RF)は、RAの診断の確立を補助するための現在受け入れられている唯一の生化学マーカーである。本発明のマーカー組合わせがRAの診断を著しく改善し、RFアッセイを補足し、または最終的にはその代わりとなる可能性すらあることが、明らかに予想される。したがって、RAの診断における少なくとも抗CCPおよび抗PIK3CDを含むマーカーパネルの使用は、本発明のさらなる好ましい態様である。

## 【0100】

当業者が認識するように、1種類以上の追加マーカーを用いて診断正確度をさらに改善することができ、あるいは要求される場合には特異度を犠牲にして診断感度を高めること、またはその逆も可能である。ある診断領域では、たとえばHIV感染の検出においては、感度が最重要である。要求される高い感度は特異度を犠牲にして達成される可能性があり、その結果、偽陽性症例の数が増加する。他の場合には、たとえば簡単な例として血液型抗原を査定する際には、特異度が最高に重要である。

20

## 【0101】

さらなる好ましい態様は、RAの診断におけるマーカーパネルの使用に関するものであり、パネルは抗CCP、抗PIK3CD、ならびに抗MCM3および抗PIK3CDからなる群から選択される少なくとも1種類の追加マーカーを含む。

30

## 【0102】

好ましくは、ある態様は、関節リウマチ(RA)の非存在または存在をインビトロで全血、血漿または血清試料から査定するための、少なくとも抗CCPおよび抗PIK3CDを含むマーカーパネルの使用に関するものであり、その際、基準集団から抗CCPおよび抗PIK3CDについて測定したカットオフ組合わせ濃度値と比較して増大した、抗CCPおよび抗PIK3CDについて測定した組合わせ濃度値は、RAの存在の指標となる。

## 【0103】

さらなる態様において、マーカーパネルの使用はさらに、抗CCP、抗PIK3CD、ならびに抗MCM3および抗Casp8からなる群から選択される少なくとも1種類の追加マーカーを含む。好ましくは、マーカーパネルは抗CCP、抗PIK3CDおよび抗MCM3を含む。同様に好ましくは、マーカーパネルは抗CCP、抗PIK3CDおよび抗Casp8を含む。

40

## 【0104】

本発明による方法は、RAの重症度の査定においてもきわめて有用であろう。抗CCPのレベルが高いほど、および/または抗PIK3CDのレベルが高いほど、その疾患はより重篤である。今回使用できるようになったマーカー組合わせまたはマーカーパネルについて、たとえば疾患重症度の指標としての疾患スコアを開発することは、ルーティン実験にすぎないであろう。よって本発明による方法は、好ましくは疾患の重症度を査定するためにも使用される。

## 【0105】

50

本発明による方法は、RAを他の自己免疫疾患、好ましくは他の関節疾患から鑑別するためにもきわめて有用であり、よりいっそう好ましくは他の関節疾患は変形性関節症(OA)である。

【0106】

本発明はさらに、ある態様において、RAの非存在または存在の査定における、少なくとも抗CCPおよび抗PIK3CDを含むマーカーパネルについての最適化多変量カットオフの使用に関するものであり、その際、その最適化多変量カットオフは抗CCPおよび抗PIK3CDについて測定した濃度値を組み合わせることにより得られる。好ましくは、測定した濃度値を、判別分析、カーネル法、ノンパラメトリック法、部分的最小二乗、樹木モデル法、一般化線形モデル、主成分ベースの方法、一般化加法モデル、ファジィ論理ベースの方法、神経回路網および遺伝学的アルゴリズムをベースとする方法からなる群から選択されるメンバーの使用により数学的に組み合わせる。

10

【0107】

本発明の方法は、疾患の経過をモニタリングする際にもきわめて有用であろう。これは、患者試料において抗CCPおよび抗PIK3CDならびに場合により追加マーカーを種々の時点で測定し、これらの種々の時点でのマーカーの絶対および/または相対レベルを比較することによって、最も容易に達成される。よって、RAを伴う患者において疾患の経過をモニタリングするために本発明による方法を使用することがさらに好ましい。

【0108】

RAのためのいずれかの処置の有効性を査定する際に本発明がきわめて有用であろうということも認識される。処置の有効性は、マーカーレベルの変化により反映されるであろう。処置が目的効果をもつならば、抗CCPまたは抗PIK3CDの2マーカーレベルのうち少なくとも1つが低減するであろう。よって本発明による方法は、好ましくは処置の有効性を査定するためにも使用される。同じ現象、すなわち抗CCPまたは抗PIK3CDのうち少なくとも1つのマーカーレベルの低減は、RAにおける適正な薬物および最適な投薬の選択のために容易に適用できる。適正な薬物および/または最適な投薬の選択に際して本発明の方法を使用することも好ましい。

20

【0109】

本発明の方法は、RAの分野の新規薬物の選択および同定も可能にするであろう。この適用はさらなる好ましい態様である。

30

臨床試験のためにその抗CCPおよび抗PIK3CDのレベルが異なるサブグループの患者を臨床試験のために、および臨床試験において同定し、マーカーレベルのこの差異を治験薬物の有効性に関連付けるのが可能になったこともきわめて有利であろう。

【0110】

本発明はまた、この方法を実施するための、抗CCPおよび抗PIK3CDをそれぞれ特異的に測定するために必要な試薬を含むキットに関する。キットは場合により、抗CCPおよび抗PIK3CDの両方の測定を実施するための補助試薬を含むことができる。

【0111】

特定の態様において、キットは抗CCPおよび抗PIK3CDの濃度を特異的に測定するための試薬を含む。

40

好ましい態様において、キットは、測定すべき自己抗体に応じてそれぞれCCP、MCM3、Cas p 8およびPIK3CDからなる群から選択されるペプチドを含む。

【0112】

さらなる好ましい態様において、キット中のキャプチャー抗原は、測定すべき自己抗体に応じて、それぞれ抗MCM3の検出のためのペプチドPATKKTIERYSDLT(Y159, SEQ ID NO: 1)、抗Cas p 8の検出のためのペプチドNKSLLIKINDYEEFS(Y178, SEQ ID NO: 2)、ならびにPIK3CDの検出のためのペプチドDQLKTGERCLYMWPS(Y440, SEQ ID NO: 3)および/またはペプチドDQLKTGERSLYMWPS(Y440\*, SEQ ID NO: 4)からなる群から選択される。

50

## 【 0 1 1 3 】

さらなる好ましい態様において、特異的な捕捉ペプチドを固体支持体に固定化する。

本発明によるある態様において、固体支持体はビーズ、好ましくは磁性ビーズ、またはバイオチップ表面である。

## 【 0 1 1 4 】

本発明のさらなる任意選択的な特徴および態様は、以下の好ましい態様の記載に、好ましくは特許請求の範囲と関連づけてさらに詳細に記載されるであろう。それらにおいて、それぞれの任意選択的な特徴を個別に、および当業者が認識するようにいずれか任意の組み合わせで、具体的に示す。本発明の範囲はこれらの好ましい態様によって限定されない。

## 【 0 1 1 5 】

本発明の知見をまとめると、以下の態様が好ましい：

1. 関節リウマチ ( R A ) の非存在または存在をインビトロで生化学マーカーにより査定するための、下記を含む方法：

a ) 全血、血漿または血清試料において、少なくとも抗環状シトルリン化ペプチド ( 抗 C C P ) および抗 P I K 3 C D の濃度をそれぞれ測定する；

b ) ( a ) において抗 C C P および抗 P I K 3 C D について測定した濃度値を組み合わせる；そして

c ) 工程 ( b ) において決定した組み合わせ数値を R A の非存在または存在と関連付ける；その際、基準集団から抗 C C P および抗 P I K 3 C D について測定したカットオフ組み合わせ濃度値と比較して増大した組み合わせ数値は、R A の存在の指標となる。

## 【 0 1 1 6 】

2. 試料がヒト対象に由来する、請求項 1 に記載の方法。

3. その方法の工程 ( a ) がイムノアッセイ法である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

## 【 0 1 1 7 】

4. 抗 C C P および抗 P I K 3 C D を、それぞれ抗原としての 1 種類以上の C C P および / または抗原としての 1 種類以上の P I K 3 C D により捕捉する、請求項 3 に記載の方法。

## 【 0 1 1 8 】

5. 1 種類以上のキャプチャー抗原を固定化する、請求項 4 に記載の方法。

6. 1 種類以上のキャプチャー抗原を固体支持体、好ましくは粒子またはバイオチップの表面に固定化する、請求項 5 に記載の方法。

## 【 0 1 1 9 】

7. 1 種類以上のキャプチャー抗原が全長タンパク質またはそのタンパク質から選択されるポリペプチドフラグメントである、請求項 4 および 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【 0 1 2 0 】

8. ポリペプチドフラグメントがそのタンパク質から選択される 1 0 ~ 2 5 A A の抗原性配列である、請求項 7 に記載の方法。

9. マーカー抗 P I K 3 C D に対する 1 種類以上のキャプチャー抗原が S E Q I D N O : 7 から選択される、請求項 4 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【 0 1 2 1 】

1 0 . マーカー抗 P I K 3 C D に対する P I K 3 C D キャプチャー抗原がペプチド D Q L K T G E R C L Y M W P S ( Y 4 4 0 , S E Q I D N O : 3 ) および / またはペプチド D Q L K T G E R S L Y M W P S ( Y 4 4 0 \* , S E Q I D N O : 4 ) である、請求項 9 に記載の方法。

## 【 0 1 2 2 】

1 1 . 工程 ( b ) の組み合わせ濃度値を、R A 陽性患者を除外した、明らかに健康な者ならびに変形性関節症 ( O A ) 患者および他の自己免疫疾患患者からなる群から選択される患者を含む基準集団から得られたカットオフ値と比較する、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか

10

20

30

40

50

1 項に記載の方法。

【 0 1 2 3 】

1 2 . 工程 ( b ) で測定した濃度値を、判別分析、カーネル法、ノンパラメトリック法、部分的最小二乗、樹木モデル法、一般化線形モデル、主成分ベースの方法、一般化加法モデル、ファジィ論理ベースの方法、神経回路網および遺伝学的アルゴリズムをベースとする方法からなる群から選択されるメンバーの使用により数学的に組み合わせる、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【 0 1 2 4 】

1 3 . さらに、抗 M C M 3 および抗 C a s p 8 からなる群から選択される少なくとも 1 種類の追加マーカーの測定を含む、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

1 4 . 追加マーカーが抗 M C M である、請求項 1 3 に記載の方法。

【 0 1 2 5 】

1 5 . マーカー抗 M C M に対する M C M キャプチャー抗原がペプチド P A T K K T I E R R Y S D L T ( Y 1 5 9 , S E Q I D N O : 1 ) である、請求項 1 4 に記載の方法。

【 0 1 2 6 】

1 6 . 追加マーカーが抗 C a s p 8 である、請求項 1 3 に記載の方法。

1 7 . マーカー抗 C a s p 8 に対する C a s p 8 キャプチャー抗原がペプチド N K S L L K I I N D Y E E F S ( Y 1 7 8 , S E Q I D N O : 2 ) である、請求項 1 6 に記載の方法。

20

【 0 1 2 7 】

1 8 . 関節リウマチ ( R A ) の重症度をインビトロで生化学マーカーにより査定するための、下記を含む方法：

a ) 全血、血漿または血清試料において、少なくとも抗環状シトルリン化ペプチド ( 抗 C C P ) および抗 P I K 3 C D の濃度をそれぞれ測定する；

b ) ( a ) において抗 C C P および抗 P I K 3 C D について測定した濃度値を組み合わせる；そして

c ) ( b ) からの組み合わせ数値を R A の重症度に関連付ける；その際、基準集団から抗 C C P および抗 P I K 3 C D について測定したカットオフ組み合わせ濃度値と比較してより高い組み合わせ数値は、その患者の R A の重症度の指標となる。

30

【 0 1 2 8 】

1 9 . 関節リウマチ ( R A ) をインビトロで生化学マーカーにより他の自己免疫疾患から鑑別するための、下記を含む方法：

a ) 全血、血漿または血清試料において、少なくとも抗環状シトルリン化ペプチド ( 抗 C C P ) および抗 P I K 3 C D の濃度をそれぞれ測定する；

b ) ( a ) において抗 C C P および抗 P I K 3 C D について測定した濃度値を組み合わせる；そして

c ) ( b ) からの増大した組み合わせ数値により、R A を他の自己免疫疾患から鑑別する；その際、基準集団から抗 C C P および抗 P I K 3 C D について測定したカットオフ組み合わせ濃度値と比較して増大した組み合わせ数値は、R A の存在の指標となる。

40

【 0 1 2 9 】

2 0 . 他の自己免疫疾患が変形性関節症 ( O A ) である、請求項 1 9 に記載の方法。

2 1 . 関節リウマチ ( R A ) の非存在または存在をインビトロで全血、血漿または血清試料から査定するための、少なくとも抗 C C P および抗 P I K 3 C D を含むマーカーパネルの使用；その際、基準集団から抗 C C P および抗 P I K 3 C D について測定したカットオフ組み合わせ濃度値と比較して増大した、抗 C C P および抗 P I K 3 C D について測定した組み合わせ濃度値は、R A の存在の指標となる。

【 0 1 3 0 】

2 2 . マーカーパネルが、抗 C C P 、抗 P I K 3 C D 、ならびにさらに抗 M C M 3 および抗 C a s p 8 からなる群から選択される少なくとも 1 種類の追加マーカーを含む、請

50

求項 2 1 に記載の使用。

【 0 1 3 1 】

2 3 . マーカーパネルが、抗 C C P、抗 P I K 3 C D および抗 M C M 3 を含む、請求項 2 1 に記載の使用。

2 4 . マーカーパネルが、抗 C C P、抗 P I K 3 C D および抗 C a s p 8 を含む、請求項 2 1 に記載の使用。

【 0 1 3 2 】

2 5 . R A を他の自己免疫疾患、好ましくは他の関節疾患から鑑別するための、請求項 1 9 に記載の方法の使用。

2 6 . 他の関節疾患が変形性関節症 ( O A ) である、請求項 2 5 に記載の使用。

10

【 0 1 3 3 】

2 7 . R A の非存在または存在の査定における、少なくとも抗 C C P および抗 P I K 3 C D を含むマーカーパネルについての最適化多変量カットオフの使用；その際、最適化多変量カットオフは抗 C C P および抗 P I K 3 C D について測定した濃度値を組み合わせることにより得られる。

【 0 1 3 4 】

2 8 . 測定した濃度値を、判別分析、カーネル法、ノンパラメトリック法、部分的最小二乗、樹木モデル法、一般化線形モデル、主成分ベースの方法、一般化加法モデル、ファジィ論理ベースの方法、神経回路網および遺伝学的アルゴリズムをベースとする方法からなる群から選択されるメンバーの使用により数学的に組み合わせる、請求項 2 7 に記載の使用。

20

【 0 1 3 5 】

2 9 . 抗 C C P および抗 P I K 3 C D をそれぞれ特異的に測定するために必要な試薬、ならびに場合により測定を実施するための補助試薬を含む、請求項 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法を実施するためのキット。

【 0 1 3 6 】

本発明の理解を補助するために以下の例、参考文献、配列リストおよび図面を提示し、本発明の真の範囲の特許請求の範囲に述べる。記載した方法において、本発明の精神から逸脱することなく変更を行なうことができると解釈される。

【 0 1 3 7 】

30

配列の記載

SEQ ID NO : 1 抗 M C M 3 を捕捉するために用いた M C M 3 ペプチド P A T K K T I E R R Y S D L T ( Y 1 5 9 )

SEQ ID NO : 2 抗 C a s p 8 を捕捉するために用いた C a s p 8 ペプチド N K S L L K I I N D Y E E F S ( Y 1 7 8 )

SEQ ID NO : 3 抗 P I K 3 C D を捕捉するために用いた P I K 3 C D ペプチド D Q L K T G E R C L Y M W P S ( Y 4 4 0 )

SEQ ID NO : 4 抗 P I K 3 C D を捕捉するために用いた P I K 3 C D ペプチド D Q L K T G E R S L Y M W P S ( Y 4 4 0 \* )。SEQ ID NO : 4 においては、技術的理由で SEQ ID NO : 3 のシステイン ( C ) をセリン ( S ) により置き換えた

40

SEQ ID NO : 5 ミニ染色体維持タンパク質 3 ( M C M 3 ) ヒトタンパク質 , S w i s s P r o t ID : P 2 5 2 0 5

SEQ ID NO : 6 カスパーゼ - 8 ( C a s p 8 ) ヒトタンパク質 , S w i s s P r o t ID : Q 1 4 7 9 0

SEQ ID NO : 7 ホスファチジルイノシトール - 4 , 5 - ビスホスフェート 3 - キナーゼ触媒サブユニット P I 3 - キナーゼ ( P I K 3 C D ) ヒトタンパク質 , S w i s s P r o t ID : O 0 0 3 2 9

SEQ ID NO : 8 WO 98/22503 の抗 C C P ペプチド H Q C H Q E S T X G R S R G R C G R S G S , ここで、X はシトルリンを表わす；ペプチドを 2 つの システイン 残

50

基間のジスルフィド結合により環化した。

【実施例】

【0138】

実施例 1

被験集団

最大罹患期間15年の高い特徴を示すRA患者78人からの試料を欧州の5つのセンターにおいて2年間の追跡で採集した。53人のRA患者は抗CCP陰性であった。すべての患者がARA基準に従ってRA患者と診断され、ARA分類基準により分類したI I Iの機能状態にあった(Hochberg, M. C., et al., Arthritis Rheum. 35 (1992) 498-502)。すべての患者を詳細な症例報告書形式(case report form) (= C R F) で記録した。C R Fには、下記のが含まれていた：健康評価質問表(Health Assessment Questionnaire)、S F 3 6 質問表、腫脹した圧痛のある関節数(swollen and tender joint count)、ラーセンスコア(Larsen Score)、試験室パラメーター；関連外科処置、薬物療法、共存疾患、および共存疾患に対する薬物療法の臨床歴。標準措置に従って、毎年、X線撮影した。この試験に参加した被験者から得られたベースライン試料のみをこの分析に含めた。

10

【0139】

89人の対照被験者から得た試料も採集した。これらの対照からRA陽性被験者のみを除外し、ただし他の形態の関節炎は除外しなかった。この試験の焦点はRAを健康な被験者のみからではなく、他の関節疾患からも識別することであったので、脛大腿(tibiofemoral)または膝蓋大腿(patellofemoral)いずれかの膝のOAを伴う40人の患者を疾患対照として加えた。これらのOA患者について、臨床および試験室パラメーターを決定し、X線撮影によるケルグレン-ローレンススコア(Kellgren & Lawrence Score)を計算した(Kellgren, J. H., and Lawrence, J. S., Ann. Rheum. Dis. 16 (1957) 494-502)。

20

【0140】

被験集団についての人口統計データを表1に示す。

【0141】

【表1】

表1: 患者集団

集団	N	中央年齢	性別 (女/男)
RA- 抗CCP陽性	25	63	19/6
RA- 抗CCP陰性	53	63	36/17
OA	40	59	29/11
他の自己免疫疾患	49	51	23/26

30

【0142】

実施例 2

抗CCPアッセイ

試料中のCCP自己抗体を測定するために、E l e c s y s (登録商標) またはc o b a s (登録商標) e イムノアッセイ分析計(たとえば、E l e c s y s 2 0 1 0、M O D U L A R A N A L Y T I C S E 1 7 0、c o b a s e 4 1 1、c o b a s e 6 0 1またはc o b a s e 6 0 2) (注文No. 0 5 0 3 1 6 5 6 1 9 0) に使用するための市販の抗CCP電気化学発光イムノアッセイ(E C L I A) を選択した。

40

【0143】

このイムノアッセイは、ヒトの血清および血漿中の環状シトルリン化ペプチドに対するヒトIgG自己抗体のインビトロ半定量測定のためのものである。このアッセイの結果を、他の臨床および試験室所見と組み合わせて関節リウマチの診断に際して補助として用いるものとする。

【0144】

50

## 試験原理：

1 回目のインキュベーション：15  $\mu$ L の試料を、ビオチニル化された環状シトルリン化ペプチド、およびヒト IgG に対するルテニウム化（トリス（2, 2'-ビピリジル）ルテニウム（II）-錯体（Ru(bpy) $_3^{2+}$ ））モノクローナル抗体と共にインキュベートすると、CCP 特異的抗体が試料中に存在する場合は複合体が形成される。

## 【0145】

2 回目のインキュベーション：ストレプトアビジンコートしたマイクロ粒子を添加した後、複合体はビオチンとストレプトアビジンの相互作用により固相に結合した状態になる。

## 【0146】

反応混合物を測定セル中へ吸引し、そこでマイクロ粒子は電極表面に磁気捕獲される。結合していない基質を次いで ProCell / ProCell M で除去する。次いで電極に電圧を印加すると、化学発光放出が誘導され、それを光電子増倍管により測定する。

## 【0147】

2 点検量により計測器特異的に作成した検量曲線および試薬バーコードにより得られたマスター曲線により、結果を判定する。厳密なロット特異的キャリブレーション値が試験専用試薬のバーコードラベルにエンコードされている。

## 【0148】

分析計が自動的に各試料の被検体濃度 U / mL を計算する。

実施例 3

## マーカーの探査と検証

1 回目の実験で、ペプチドアレイ手法（JPT PepStar（商標））を用いて患者血清中の自己抗体を探査した。数百のタンパク質からのペプチド配列（自己抗体の潜在的ターゲット）を前記に挙げた試料集合体に問い合わせた。

## 【0149】

最良の鑑別候補を次いで同じ試料コホートにおいて、ただし確実な技術的検証を可能にするために、異なる手法（インパクトシステム (Impact system), 下記を参照, ならびに Hornauer et al., Laborwelt 4 (2004), 38-39 および Hornauer et al., Biospectrum Special Proteomics 10 (2004), 564 を参照)、および新たに合成 / 品質検査したペプチド配列を用いて検証した。

## 【0150】

インパクト手法はマルチパラメータ測定のためのシステムであり、10 種類の異なるマーカー候補を単一試料アリコートから調べることができる。検査すべきマーカーをインキュベーションチャンバー内の規定領域にスポットする。この場合、目的とするペプチド配列は、インパクトチップ上のストレプトアビジンコートしたスポット上に固定化するためにビオチニル化バージョンとして合成された。

## 【0151】

実施例 4

## RA の診断のためのマーカーパネルの同定

それぞれの自己抗体ターゲットを、表 2 に挙げるように短い配列範囲により表わした。それらのペプチドは、インパクトチップ上への固定化のためにビオチン - PEG 3 を N 末端に含み、無傷タンパク質内での状況を模倣するために C 末端のアミドで終止していた。技術的理由で、SEQ ID NO: 4 におけるようにシステイン (C) をセリン (S) により置き換えた。

## 【0152】

10

20

30

40

## 【表 2】

表 2: 検証したマーカー配列

マーカー	ペプチド配列	ペプチド名	注釈
抗 MCM3	PATKKTIERYSDLT	Y159	SEQ ID NO: 1
抗 Casp8	NKSLKIIINDYEEFS	Y178	SEQ ID NO: 2
抗 PIK3CD	DQLKTGERCLYMWPS	Y440	SEQ ID NO: 3
抗 PIK3CD	DQLKTGERSLYMWPS	Y440*	SEQ ID NO: 4

10

## 【0153】

3種類の新規マーカー候補を検証して、OAおよび他の自己免疫疾患からのRAの識別において表3に示すように良好な結果を得た。

参考として、現在ARA基準の一部を形成する唯一の生化学マーカーである抗CCP単独についての分類結果を提示する。

## 【0154】

表3に示すように、マーカー組合せ抗CCP+抗PIK3CD、およびさらに示したマーカー組合せも、RAをOAから鑑別することができ、かつRAをOAおよび他の自己免疫疾患に対しても鑑別することができる。

20

## 【0155】

本発明の目的は、OAを含めた対照に対比したRAの正しい診断を改善することであった。

実施例1および表1に従った被験集団について、マーカー抗[CCP]に対する5U/mLのカットオフを選択した。

## 【0156】

実施例1および表1に従った被験集団について、マーカー抗[Casp8]に対する49.9U/mLのカットオフを選択した。

実施例1および表1に従った被験集団について、マーカー抗[MCM3]に対する15.1U/mLのカットオフを選択した。

30

## 【0157】

実施例1および表1に従った被験集団について、マーカー抗[PIK3CD]に対する15.1U/mLのカットオフを選択した。

## 【0158】

【表 3】

表 3: 新規マーカーの診断性能

マーカー数	マーカーまたはマーカーパネル	RA 対 OA		RA 対 OA および他の自己免疫疾患	
		的中陽性/ 感度	的中陰性/ 特異度	的中陽性/ 感度	的中陰性/ 特異度
1	抗 CCP	31.7%	100%	31.7%	98.9%
2	抗 CCP, 抗 MCM3	39.2%	97.4%	39.2%	96.6%
2	抗 CCP, 抗 Casp8	40.5%	94.9%	40.5%	91.0%
2	抗 CCP, 抗 PIK3CD	38.0%	94.9%	38.0%	93.3%
3	抗 CCP, 抗 MCM3, 抗 Casp8	53.2%	89.8%	53.2%	84.3%
3	抗 CCP, 抗 MCM3, 抗 PIK3CD	51.9%	89.7%	51.9%	86.5%
3	抗 CCP, 抗 Casp8, 抗 PIK3CD	53.2%	82.1%	53.2%	78.7%
4	抗 CCP, 抗 MCM3, 抗 Casp8, 抗 PIK3CD	63.3%	82.1%	63.3%	74.2%

10

20

【配列表】

2018506720000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/052610
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/564 ADD.		
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) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, EMBL, CHEM ABS Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SCHELLEKENS G A ET AL: "THE DIAGNOSTIC PROPERTIES OF RHEUMATOID ARTHRITIS ANTIBODIES RECOGNIZING A CYCLIC CITRULLINATED PEPTIDE", ARTHRITIS & RHEUMATISM, WILEY, US, vol. 43, no. 1, 1 January 2000 (2000-01-01), pages 155-163, XP008018548, ISSN: 0004-3591, DOI: 10.1002/1529-0131(200001)43:1<155::AID-ANR20>3.0.CO;2-3 cited in the application whole document, in particular abstract ----- -/--	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<b>* Special categories of cited documents :</b>		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *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) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*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 *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 *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 *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
10 March 2016		22/03/2016
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Vanmontfort, D

2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/052610

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2007/039280 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]; FUEHLING IRIS [DE] 12 April 2007 (2007-04-12) whole document, in particular abstract and claims -----	1-15
A	WO 2005/085858 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]; WILD NORBERT [DE] 15 September 2005 (2005-09-15) whole document, in particular abstract and claims -----	1-15
A	WO 2005/064307 A2 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]; WILD NORBERT [DE] 14 July 2005 (2005-07-14) whole document, in particular abstract and claims -----	1-15
A	MARIEKE BAX ET AL: "The pathogenic potential of autoreactive antibodies in rheumatoid arthritis", SEMINARS IN IMMUNOPATHOLOGY, vol. 36, no. 3, 1 May 2014 (2014-05-01), pages 313-325, XP055206512, ISSN: 1863-2297, DOI: 10.1007/s00281-014-0429-5 whole document, in particular abstract and page 321 -----	1-15
A	WO 2008/064336 A2 (INIVITROGEN CORP [US]; MATTOON DAWN R [US]; SCHWEITZER BARRY [US]; ALC) 29 May 2008 (2008-05-29) claims 15-24; Tables 2, 8 and 9 -----	1-15
A	WO 2009/036768 A2 (LUNDBECK & CO AS H [DK]; BANG-ANDERSEN BENNY [DK]; PEARSON JOHN NICHOL) 26 March 2009 (2009-03-26) claims 1-22 -----	1-15

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/052610

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 2007039280	A1	12-04-2007	CA 2623167 A1	12-04-2007
			CN 101283278 A	08-10-2008
			EP 1934612 A1	25-06-2008
			JP 2009510464 A	12-03-2009
			US 2007148704 A1	28-06-2007
			WO 2007039280 A1	12-04-2007
			-----	
WO 2005085858	A1	15-09-2005	AT 409314 T	15-10-2008
			CA 2552420 A1	15-09-2005
			DK 1721162 T3	15-12-2008
			EP 1721162 A1	15-11-2006
			EP 1980855 A1	15-10-2008
			ES 2314621 T3	16-03-2009
			JP 4495208 B2	30-06-2010
			JP 2007524100 A	23-08-2007
			PT 1721162 E	03-12-2008
			SI 1721162 T1	28-02-2009
			US 2007298518 A1	27-12-2007
			US 2011129861 A1	02-06-2011
			WO 2005085858 A1	15-09-2005
			-----	
WO 2005064307	A2	14-07-2005	AT 458201 T	15-03-2010
			CA 2546312 A1	14-07-2005
			CY 1111229 T1	11-06-2015
			DE 602004010432 T2	04-12-2008
			DK 1882946 T3	31-05-2010
			EP 1700129 A2	13-09-2006
			EP 1882946 A2	30-01-2008
			ES 2297521 T3	01-05-2008
			ES 2340328 T3	01-06-2010
			JP 4495168 B2	30-06-2010
			JP 2007515647 A	14-06-2007
			PT 1882946 E	21-04-2010
			SI 1882946 T1	30-06-2010
			US 2007264673 A1	15-11-2007
			WO 2005064307 A2	14-07-2005
-----				
WO 2008064336	A2	29-05-2008	EP 2089712 A2	19-08-2009
			JP 2010510528 A	02-04-2010
			US 2008254482 A1	16-10-2008
			US 2012004130 A1	05-01-2012
			WO 2008064336 A2	29-05-2008
-----				
WO 2009036768	A2	26-03-2009	NONE	
-----				

## フロントページの続き

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

(72)発明者 アンドレス, ヘルベルト

ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク, カペレンヴィーゼ 3 9

(72)発明者 ヴァイザー, シュテファン

ドイツ国 8 2 4 1 8 ゼーハウゼン, アム・フュクゼー 1 6

(72)発明者 カール, ヨハン

ドイツ国 8 2 3 8 0 パイツェンベルク, ベルト - シュラッツルセア - シュトラーセ 7

(72)発明者 クーネルト, ウルスラ

ドイツ国 8 1 3 7 1 ミュンヘン, アルラムシュトラーセ 3 1

(72)発明者 グルッブ, フロリアン

ドイツ国 8 2 3 9 3 イッフェルドルフ, アウフ・デア・ライテン 1 9

Fターム(参考) 4H045 AA10 AA30 BA10 BA17 CA40 EA50

专利名称(译)	通过测量抗CCP抗体和抗PIK3 CD评估关节炎瘤的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2018506720A</a>	公开(公告)日	2018-03-08
申请号	JP2017541624	申请日	2016-02-08
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	アンドレスヘルベルト ヴァイザーシュテファン カールヨハン クーネルトウルスラ グループフロリアン		
发明人	アンドレス,ヘルベルト ヴァイザー,シュテファン カール,ヨハン クーネルト,ウルスラ グループ,フロリアン		
IPC分类号	G01N33/53 C07K7/08 C07K14/47		
CPC分类号	G01N33/564 G01N33/563 G01N33/58 G01N2333/91215 G01N2800/102		
FI分类号	G01N33/53.D C07K7/08.ZNA C07K14/47		
F-TERM分类号	4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA17 4H045/CA40 4H045/EA50		
代理人(译)	山本修 宮前徹 中西 基晴		
优先权	2015155064 2015-02-13 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

本发明涉及一种辅助评估类风湿性关节炎 (“RA”) 的方法。该方法特别用于评估体外类风湿性关节炎的存在或不存在。该方法可例如通过分析生化标志物，其包括在样品中测得的抗CCP和抗PIK3CD的浓度，并且不存在或类风湿性关节炎的存在的确定的浓度相关来进行。为了进一步改善本发明方法中RA的评估，可以与抗CCP抗体和抗PIK3 CD一起测定一种或多种另外的标志物水平，并且与RA的存在或不存在有关。本发明还涉及包含抗CCP抗体和抗PIK3CD的标记物组在诊断类风湿性关节炎中的用途，本发明教导了用于实施本发明方法的试剂盒。此外，本发明还涉及包含抗CCP和抗PIK3CD的标记物组件用于区分RA与其他自身免疫疾病，优选骨关节炎 (OA) 的用途。系统技术领域

(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2018-506720 (P2018-506720A) 平成30年3月8日 (2018.3.8)
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考) 4H045
GO 1 N 33/53 C O 7 K 7/08 C O 7 K 14/47	GO 1 N 33/53 C O 7 K 7/08 C O 7 K 14/47	D Z N A
(21) 出願番号	特願2017-541624 (P2017-541624)	(71) 出願人
(86) (22) 出願日	平成28年2月8日 (2016.2.8)	エフ・ホフマン・ラ ロシュ アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成29年10月4日 (2017.10.4)	F. HOFFMANN-LA ROCHE
(86) 国際出願番号	PCT/EP2016/052610	E AKTIENGESELLSCHAFT
(87) 国際公開番号	W02016/128348	T
(87) 国際公開日	平成28年8月18日 (2016.8.18)	スイス・シーエイチ・4070パーゼル・
(31) 優先権主張番号	15155064.7	グレンツァーヘルストラッツセ124
(32) 優先日	平成27年2月13日 (2015.2.13)	100140109
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	弁理士 小野 新次郎
		100118902
		弁理士 山本 修
		100106208
		弁理士 宮前 徹
		100120112
		弁理士 中西 基晴
		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗CCPおよび抗PIK3CDを測定することによる関節リウマチの査定方法