

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6453299号
(P6453299)

(45) 発行日 平成31年1月16日(2019.1.16)

(24) 登録日 平成30年12月21日(2018.12.21)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 Z
GO 1 N 33/564 (2006.01)	GO 1 N 33/564 A
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 9 7

請求項の数 15 (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2016-501804 (P2016-501804)	(73) 特許権者	515242869
(86) (22) 出願日	平成26年3月13日 (2014.3.13)		エグザゲン ダイアグノスティクス, イン
(65) 公表番号	特表2016-516996 (P2016-516996A)		コーポレイテッド
(43) 公表日	平成28年6月9日 (2016.6.9)		アメリカ合衆国, ニューメキシコ州 87
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/025264		106, アルバカーキ, スイート 209
(87) 国際公開番号	W02014/151238		, 801 ユニバーシティー ブルーパー
(87) 国際公開日	平成26年9月25日 (2014.9.25)		ル エスイー
審査請求日	平成29年1月23日 (2017.1.23)	(74) 代理人	100114775
(31) 優先権主張番号	61/792, 284		弁理士 高岡 亮一
(32) 優先日	平成25年3月15日 (2013.3.15)	(74) 代理人	100121511
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 小田 直
		(74) 代理人	100202751
			弁理士 岩堀 明代
		(74) 代理人	100191086
			弁理士 高橋 香元

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 全身性エリテマトーデスを治療および診断するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

SLE のリスクのある対象における SLE の可能性を診断するための方法であって、

(a) EC4d マーカー、BC4d マーカー、抗スミス (抗 Sm) 抗体、および二本鎖 DNA 抗体 (抗 dsDNA) のそれぞれのマーカーの個別の量がそのマーカーの所定値以下である場合に、SLE のリスクのある対象者が SLE に関して陰性であることを決定し

(b) 前記 (a) で SLE に関して陰性であると決定された SLE のリスクのある対象から得る生物学的サンプル中の

(I) 赤血球 C4d (EC4d) マーカー、

(II) B 細胞 C4d (BC4d) マーカー、および

(III) 抗核抗体 (ANA)、

である一次マーカーのそれぞれの量に基づいて SLE リスクスコアを算出すること、
を含み、

前記リスクスコアが、前記対象が SLE を有する可能性を示す、方法。

【請求項2】

前記方法が、さらに前記対象から得る生物学的サンプル中の SS-B (La) マーカー、Sc1-70 マーカー、Jo-1 マーカー、および CENP マーカーからなる群から選択される 1 種類以上の除外マーカーの量を決定することを含み、前記 SLE リスクスコアの算出が、前記一次マーカーおよび 1 種類以上の前記除外マーカーのそれぞれの量に基づ

いてS L Eリスクスコアを計算することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記方法が、2種類以上の前記除外マーカの量を決定することを含み、前記リスクスコアの算出が、前記一次マーカおよび2種類以上の前記除外マーカのそれぞれの量に基づいて前記S L Eリスクスコアを計算することを含む、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記方法が、3種類以上の前記除外マーカの量を測定することを含み、前記リスクスコアの算出が、前記一次マーカおよび3種類以上の前記除外マーカのそれぞれの量に基づいて前記S L Eリスクスコアを計算することを含む、請求項2に記載の方法。

【請求項5】

前記方法が、4種類すべての前記除外マーカの量を決定することを含み、前記リスクスコアの算出が、前記一次マーカおよび4種類以上の前記除外マーカのそれぞれの量に基づいて前記S L Eリスクスコアを計算することを含む、請求項2に記載の方法。

【請求項6】

前記方法が、さらに対象から得る生物学的サンプル中のM C Vマーカの量を決定することを含み、前記S L Eリスクスコアの算出が、前記一次マーカ、1種類以上の前記除外マーカ、および前記M C Vマーカのそれぞれの量に基づいてS L Eリスクスコアを計算することを含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記S L Eリスクスコアの算出が、1種類以上の前記一次マーカの量を1つ以上の変換分析によって調整することを含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

1つ以上の前記変換分析がロジスティック回帰分析を含み、前記ロジスティック回帰分析は、

(i) 前記一次マーカのそれぞれの量を調整して、各一次マーカの重み付きスコアを作成することと、

(i i) 各一次マーカの前記重み付きスコアを組み合わせる前記S L Eリスクスコアを作成することと、

を含む、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記S L Eリスクスコアの算出が、1種類以上の前記除外マーカの量を1つ以上の変換分析によって調整することを含む、請求項2～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

前記S L Eリスクスコアの算出が、4種類すべての前記除外マーカの量を1つ以上の変換分析によって調整することを含む、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

1つ以上の前記変換分析がロジスティック回帰分析を含み、前記ロジスティック回帰分析は、

(i) 前記一次マーカのそれぞれの量および1種類以上の前記除外マーカのそれぞれの量を調整して前記一次マーカおよび1種類以上の前記除外マーカに重み付きスコアを作成することと、

(i i) 前記各一次マーカおよび1種類以上の前記除外マーカの前記重み付きスコアを組み合わせる前記S L Eリスクスコアを作成することと、

を含む、請求項9または10に記載の方法。

【請求項12】

前記S L Eリスクスコアが、

(a) 蛍光活性化セルソーティング(F A C S) によって決定されたE C 4 dおよびB C 4 dの正味の平均蛍光強度の自然対数を決定することと、

(b) A N A が所定の閾値に基づいて陰性(値が0)、中等度陽性(値が1)、または強陽性(値が2) であるかを決定することと、

10

20

30

40

50

(c) 前記除外マーカーのいずれかが所定の閾値を超えて陽性(値が1)であるか、または前記除外マーカーのいずれも所定の閾値を超えずにすべてが陰性(値が0)であるかを決定することと、

(d) (a) ~ (c) で決定された値を組み合わせることでSLEリスクスコアを得ることと、
 によって計算される、請求項2 ~ 11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

前記BC4dマーカー量の決定が、Bリンパ球の表面上のBC4dの量を測定することを含み、前記EC4dマーカー量の決定が、赤血球の表面上のEC4dの量を測定することを含む、請求項1 ~ 12のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項14】

前記BC4dマーカー量の決定が、細胞またはBリンパ球を含む組織抽出物中のBC4dの量を決定することを含み、前記EC4dマーカー量の決定が、細胞または赤血球を含む組織抽出物中のEC4dの量を決定することを含む、請求項1 ~ 12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

前記BC4dマーカーの量および前記EC4dマーカーの量が、C4dに特異的な抗体を用いて決定される、請求項1 ~ 14のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

関連案件の相互参照

本出願は、2013年3月15日に出願した米国特許仮出願第61/792,284号の優先権を主張し、その全体が参考として本明細書に援用される。

【背景技術】

【0002】

全身性エリテマトーデス(SLE)は自己免疫疾患であり、血液中の異常な自己抗体の産生を特徴とする。これらの自己抗体はそれぞれの抗原と結合して、免疫複合体を形成し、これらは循環して最終的に組織に沈着する。この免疫複合体沈着は慢性炎症および組織損傷を引き起こす。

30

【0003】

狼瘡を生じる異常な自己免疫の正確な理由は知られていない。受け継がれる遺伝子、ウイルス、紫外線、および薬剤がすべて何らかの役割を演じている可能性がある。遺伝的要因により自己免疫を発症する傾向は高まり、狼瘡、関節リウマチ、および免疫性甲状腺障害などの自己免疫疾患は、一般集団よりも狼瘡を有する患者の血縁者でより多く起こる。科学者によっては、狼瘡における免疫系はウイルスまたは紫外線のような外部因子によって、より容易に刺激されると考えている。時に狼瘡の症状は、太陽に短期間晒されるだけで引き起こされるか、又は悪化することがある。

【0004】

SLEを有する患者は、広範な様々な症状および異なる組合せの臓器病変を有することがあり、1つの検査だけでSLEの診断を確定することはできない。医師がSLEの診断精度を改善する手助けをするため、11項目の基準が米国リウマチ学会によって確立された。これらの11項目の基準は、SLEを有する患者に認められる様々な症状と密接に関連する。患者がこれらの基準の4項目以上を有するとき、SLEの診断が強く示唆される。しかし、SLEを有することが疑われる患者でも、確定診断するための十分な基準を決して示さないことがある。別の患者は、わずか数ヶ月または数年の観察で十分な基準を示す。とはいえ、ある種の状況ではこれらの従来基準のいくつかしか有さない患者にもSLEの診断がなされ得る。これらの患者では、何人かは後になって他の基準を示すことがあるが、多くの者は示さない。SLEの診断に通常用いられる11項目の基準は：

40

1 - 顔面の頬を覆う頬部発疹または「蝶型」発疹

50

- 2 - 円板状皮膚発疹 : 癬痕の原因となり得る斑状発赤
 - 3 - 光過敏症 : 太陽光線暴露に反応した皮膚発疹
 - 4 - 粘膜潰瘍 : 口腔、鼻腔、または咽喉の内膜の潰瘍
 - 5 - 関節炎 : 四肢の2つ以上の腫脹した圧痛関節
 - 6 - 胸膜炎 / 心膜炎 : 心臓または肺周辺の内膜組織の炎症、通常は呼吸時の胸痛と関連
 - 7 - 腎臓の異常 : 異常な量の尿タンパク質、または円柱と呼ばれる細胞要素の集塊
 - 8 - 脳の炎症 : 発作(けいれん)および/または精神異常として出現
 - 9 - 血球数異常 : 白血球、赤血球、または血小板の減少
 - 10 - 免疫学的障害 : 免疫検査異常には、抗dsDNA抗体、抗Sm(スミス)抗体、梅毒の血液検査偽陽性、抗カルジオリピン抗体、ループスアンチコアグラント、またはLE細胞検査陽性が挙げられる
 - 11 - 抗核抗体 : ANA抗体検査陽性
- である。

【0005】

これらの基準は、狼瘡を他の関連する自己免疫疾患から区別するこれらの特徴の有効なリマインダーとしての役目を果たすが、誤りがちであることは避けられない。基準の有無の決定は、しばしば解釈を必要とする。徴候または症状の有無を決定するために大まかな基準が適用されれば、実際には狼瘡を有しない場合でも、患者が狼瘡を有するものとして容易に診断できる。同様にSLEにおける臨床所見の範囲は11項目の基準に記載されているよりもかなり広く、各所見は患者ごとに活動性および重篤度のレベルが変わり得る。SLEの症状が疾患の経過に従って絶えず変化することも、困難な診断をさらに複雑にする。これまで罹患していなかった器官で新しい症状が時間とともに起こり得る。従来、狼瘡の確定的な検査がないため、狼瘡はしばしば誤診断される。

【0006】

疾患活動性のモニタリングも狼瘡を有する患者を治療する上で問題が多い。狼瘡は、一連の発赤または疾患の急性期で進行するが、その後に寛解期が続く。発赤の症状は、患者間および同一患者においてさえかなり異なり、これには、倦怠感、発熱、対称性の関節痛、および光過敏症(短期間の太陽暴露後の発赤の発症)が含まれる。狼瘡の他の症状には、脱毛、粘膜の潰瘍、胸痛を引き起こす心臓および肺の内膜の炎症が含まれる。

【0007】

赤血球、血小板、および白血球は狼瘡で標的にされることがあり、貧血および出血障害を引き起こす。さらに重度では、血管における免疫複合体沈着および慢性炎症は、腎障害、そして時には透析または腎臓移植を必要とする腎不全を引き起こし得る。血管は狼瘡における自己免疫反応の主な標的であるため、期外収縮発作および心疾患はまれではない。しかし時間とともにこれらの再燃は不可逆的な臓器損傷を引き起こし得る。

【発明の概要】

【0008】

第一の態様では、本発明は全身性エリテマトーデス(SLE)のリスクのある対象を治療するための方法であって、

(a) SLEを有するリスクのある対象から得る生物学的サンプル中の下記の一次マーカーのそれぞれの量に基づいて対象のSLEリスクスコアを算出することと、

(I) 赤血球C4d(EC4d)マーカー、

(II) B細胞C4d(BC4d)マーカー、および

(III) 抗核抗体(ANA)、

ここで当該対象はSLEを有するリスクがあり、なおかつ当該対象はEC4dマーカー、BC4dマーカー、抗スミス(抗Sm)抗体、および二本鎖DNA抗体(抗dsDNA)の個別の量に基づいてSLEに関して陰性であり、

(b) SLEリスクスコアに少なくとも部分的に基づいて、SLEまたは別の疾患のために対象を治療することと、を含む方法を提供する。

【0009】

別の態様では、本発明はSLEのリスクのある対象がSLEを有する可能性を診断するための方法であって、

(a) EC4dマーカー、BC4dマーカー、抗スミス(抗Sm)抗体、および二本鎖DNA抗体(抗dsDNA)の個別の量に基づいてSLEのリスクのある対象がSLEに関して陰性であることを決定することと、

(b) SLEを有するリスクのある対象から得る生物学的サンプル中の下記の一次マーカーのそれぞれの量に基づいてSLEリスクスコアを算出することと、を含み、

(I) 赤血球C4d(EC4d)マーカー、

(II) B細胞C4d(BC4d)マーカー、および

(III) 抗核抗体(ANA)、

当該リスクスコアが、当該対象がSLEを有する可能性を示す、方法を提供する。

【0010】

本方法の一つの実施形態では、本方法は、さらに、対象から得る生物学的サンプル中のSS-B(La)マーカー、Scl-70マーカー、Jo-1マーカー、およびCENPマーカーからなる群から選択される1、2、3、または4種類すべての除外マーカーの量を測定することを含み、SLEリスクスコアの算出は、一次マーカーおよび1種類以上の除外マーカーのそれぞれの量に基づいてSLEリスクスコアを計算することを含む。

【0011】

別の実施形態では、本方法は、さらに、対象から得る生物学的サンプル中のMCVマーカーの量を決定することを含み、SLEリスクスコアの算出は、一次マーカー、1種類以上の除外マーカー、およびMCVマーカーのそれぞれの量に基づいてSLEリスクスコアを計算することを含む。

【0012】

さらなる実施形態では、SLEリスクスコアの算出は、一次マーカーの1種類以上の量を1つ以上の変換分析によって調整することを含む。一つのそのような実施形態では、1つ以上の変換分析はロジスティック回帰分析を含み、ロジスティック回帰分析は、(i)一次マーカーのそれぞれの量を調整して、各一次マーカーの重み付きスコアを作成することと、(ii)各一次マーカーの重み付きスコアを組み合わせることでSLEリスクスコアを作成することを含む。

【0013】

別の実施形態では、SLEリスクスコアの算出は、1、2、3、または4種類すべての除外マーカーの量を1つ以上の変換分析によって調整することを含む。一つのそのような実施形態では、1つ以上の変換分析はロジスティック回帰分析を含み、ロジスティック回帰分析は、(i)一次マーカーのそれぞれの量および1、2、3、または4種類すべての除外マーカーのそれぞれの量を調整し、一次マーカーおよび1、2、3、または4種類すべての除外マーカーの重み付きスコアを作成することと、(ii)各一次マーカーおよび1、2、3、または4種類すべての除外マーカーの重み付きスコアを組み合わせることでSLEリスクスコアを作成することを含む。

【0014】

さらなる実施形態では、SLEリスクスコアは、(a)蛍光活性化セルソーティング(FACS)によって測定したEC4dおよびBC4dの正味の平均蛍光強度の自然対数を決定すること、(b)ANAが所定の閾値に基づいて陰性(値が0)、中等度陽性(値が1)、または強陽性(値が2)であるかを決定すること、(c)除外マーカーのいずれかが所定の閾値を超えて陽性(値が1)であるか、または除外マーカーのいずれも所定の閾値を超えずにすべてが陰性(値が0)であるかを決定すること、および(d)(a)~(c)で決定された値を組み合わせることでSLEリスクスコアを得ることによって計算される。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】本発明の方法の実施形態を説明する、2つの検出階層を含む細胞をベースとした補体活性化産物の血液サンプル中の量に基づくSLE診断のためのフローチャートである

10

20

30

40

50

。【図2】抗dsDNA陰性対象のインデックススコアを示すグラフである。RA：関節リウマチ、PM/DM：多発性筋炎/皮膚筋炎、Scl：強皮症、SS：シェーグレン症候群、NHV：健常ボランティア。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明の詳細な説明

本明細書に引用されるすべての参照は、参考文献によって組み込まれる。本明細書で開示されるすべての実施形態は、文脈で明確に示されない限り、本発明の同一または異なる態様における1つ以上の他の実施形態と組み合わせることができる。

10

【0017】

文脈で明確に要求されない限り、説明および請求項の全体を通して、用語「含む (comprise)」、「含んでいる (comprising)」および類似用語は、排他的または網羅的な意味とは反対の包括的な意味で理解されるべきであり、すなわち「限定されずに、含む」の意味である。単数または複数を用いる用語は、それぞれ複数または単数も含む。さらに用語「本明細書で (herein)」、「前述 (above)」、および「後述 (below)」ならびに同様の意味の用語は、本出願で使用されるとき、本出願を全体として言及し、本出願の特定部分に対するものではない。本明細書で使用されるとき、単数形「一つの (a)」、「(a)」、および「本 (the)」は、文脈で明確に示されない限り、複数の指示対象を含む。本明細書で使用されるとき、「および (and)」は、明確に記載されていない限り、「または (or)」と交換可能で使用される。

20

【0018】

本開示の実施形態の説明は、網羅的でないか、または開示された正確な形式に開示を限定しないと意図される。本開示の具体的な実施形態または実施例は、説明を目的として本明細書で説明され、関連技術における当業者が認識するように、様々な同等な変更は本開示の範囲内で可能である。例えば、方法の段階または機能は所定の順序で提示されるが、代替の実施形態が異なる順序で機能を行うことができ、または機能はほとんど同時に行われ得る。本明細書で示される本開示の教示は、必要に応じて他の処理または方法に適用できる。本明細書に記載される種々の実施形態を組み合わせ、さらなる実施形態を提供することができる。

30

【0019】

第一の態様では、本発明は全身性エリテマトーデス (SLE) のリスクのある対象を治療するための方法であって、

(a) SLEを有するリスクのある対象から得る生物学的サンプル中の下記の一次マーカーのそれぞれの量に基づいて対象のSLEリスクスコア (本明細書では「インデックススコア」ともいう) を算出することと、

(I) 赤血球C4d (EC4d) マーカー、

(II) B細胞C4d (BC4d) マーカー、および

(III) 抗核抗体 (ANA)、

ここで当該対象はSLEを有するリスクがあり、なおかつ当該対象はEC4dマーカー、BC4dマーカー、抗スミス (抗Sm) 抗体、および二本鎖DNA抗体 (抗dsDNA) の個別の量に基づいてSLEに関して陰性であり、

40

(b) SLEリスクスコアに少なくとも部分的に基づいてSLEまたは別の疾患のために対象を治療することと、を含む、方法を提供する。

【0020】

第二の態様では、本発明はSLEのリスクのある対象におけるSLEの可能性を診断するための方法であって、

(a) EC4dマーカー、BC4dマーカー、抗スミス (抗Sm) 抗体、および二本鎖DNA抗体 (抗dsDNA) の個別の量に基づいてSLEのリスクのある対象がSLEに

50

関して陰性であることを決定することと、

(b) SLEを有するリスクのある対象から得る生物学的サンプル中の下記の一次マーカーのそれぞれの量に基づいてSLEリスクスコアを算出することと、を含み、

(I) 赤血球C4d (EC4d) マーカー、

(II) B細胞C4d (BC4d) マーカー、および

(III) 抗核抗体 (ANA)、

ここで当該リスクスコアが、当該対象がSLEを有する可能性を示す、方法を提供する。

【0021】

本発明の方法は、従来技術の方法と比べて全身性エリテマトーデス (SLE) の診断および治療に改善をもたらす。いずれかの態様の一つの実施形態では、本方法はさらに対象から得る生物学的サンプル中のシェーグレン症候群B型抗原 (SS-B (La)) マーカー、Sc1-70マーカー (トポイソメラーゼI)、Jo-1マーカー、およびセントロメアBタンパク質 (CENP) マーカーからなる群から選択される1種類以上 (例、1、2、3、または4種類すべて) の除外マーカーの量を決定することを含み、SLEリスクスコアの算出は、一次マーカーおよび1種類以上の除外マーカーのそれぞれの量に基づいてSLEリスクスコアを計算することを含む。この実施形態では、SLE診断の特異性が従来技術の方法と比べて大きく改善される。

10

【0022】

マーカーは1種類以上の除外マーカーに対する生物学的サンプル中の抗体などの任意の適切なマーカーであり得る。例えば、Jo-1マーカーは抗Jo-1抗体であることができ、SS-B (La) マーカーは抗SS-B (La) 抗体であることができ、Sc1-70マーカーは抗Sc1-70抗体であることができ、およびCENPマーカーは抗CENP抗体であることができる。さらなる実施形態では、除外マーカーはさらに抗MCV抗体などのMCV (変異シトルリン化ビメンチン) マーカーを含み得る。

20

【0023】

種々の組織サンプル中のこれらのマーカーのそれぞれの量および正常な量を測定するためのプローブおよびアッセイは従来技術の当業者に知られており、そのような測定をするためのキットが幅広い様々な製造元から入手でき、これには、限定されないが、後述の実施例で言及されるものが含まれる。

【0024】

いずれかの態様の別の実施形態では、SLEリスクスコアの算出は、一次マーカーの1種類以上の量を1つ以上の変換分析によって調整することを含む。限定されないが、ロジスティック回帰分析を含むそのような任意の変換分析を、使用できる。そのような実施形態では、ロジスティック回帰分析は、(i) 一次マーカーのそれぞれの量を調整して各一次マーカーの重み付きスコアを作成することと、(ii) 各一次マーカーの重み付きスコアを組み合わせることでSLEリスクスコアを作成することとを含むことができる。

30

【0025】

別の実施形態では、SLEリスクスコアの算出は、1種類以上の一次マーカーの量および1種類以上 (1、2、3、または4種類すべて) の除外マーカーの量を1つ以上の変換分析によって調整することを含む。そのような実施形態では、1つ以上の変換分析は、(i) 一次マーカーのそれぞれの量および1種類以上の除外マーカーのそれぞれの量を調整して、一次マーカーおよび1種類以上の除外マーカーの重み付きスコアを作成することと、(ii) 各一次マーカーおよび1種類以上の除外マーカーの重み付きスコアを組み合わせることでSLEリスクスコアを作成することとを含むロジスティック回帰分析を含むことができる。

40

【数1】

$$Index = -5.2626 + 0.9877 \times ANAComp + [0.2955 \times \log(EC4d) + 1.0260 \times \log(BC4d)] - 2.4944 \times SpecComp$$

【0026】

そのような実施形態では、平均蛍光強度 (例えば、フローサイトメーターからのアウト

50

プット)を(E C 4 d)および(B C 4 d)について測定して、対数をとる。「 A N A 2 0 」は、陽性率を指し、サンプル 1 m L あたりの A N A 単位の閾値を超える場合は A N A 2 0 = 1 であり、1 m L あたりの単位が閾値より下では A N A 2 0 = 0 である。従来技術の当業者によって理解されるように、マーカーを「陽性」かそうでないか決定するための「閾値」は製造業者/アッセイによって異なるべきでないが、従来技術の当業者によって容易に決定され得る。「除外」は、アッセイがいずれかの「除外」マーカーについて陽性である場合に 1、すべての「除外」マーカーが陰性の場合に 0 として決定される。

【 0 0 2 7 】

一つの実施形態では、S L E リスクスコアは、(a) E C 4 d および B C 4 d について正味の平均蛍光強度(蛍光活性化セルソーティング(F A C S)によって測定)の自然対数を決定すること、(b) A N A が所定の閾値(キット製造業者または最終使用者によって定められた閾値など)に基づいて陰性(値が 0)、中等度陽性(値が 1)、または強陽性(値が 2)であるかを決定すること、(c) 除外マーカーのいずれかが所定の閾値を超えて陽性(値が 1)であるか、または除外マーカーのいずれも所定の閾値を超えずにすべてが陰性(値が 0)であるかを決定すること、および(d) (a) ~ (c) で決定された値を組み合わせて S L E リスクスコアを作成することによって計算でき、任意で 1 つ以上の変換分析によって 1 種類以上のマーカーの量を調整することを含む。

【 0 0 2 8 】

さらなる実施形態では、B C 4 d マーカー量の決定は B リンパ球の表面上の B C 4 d の量を決定することを含み、E C 4 d マーカー量の測定は赤血球の表面上の E C 4 d の量を決定することを含む。例えば、B C 4 d マーカー量の決定は、細胞中または B リンパ球を含む組織抽出物中の B C 4 d の量を決定することを含むことができ、E C 4 d マーカー量の決定は、細胞中または赤血球を含む組織抽出物中の E C 4 d の量を決定することを含むことができる。さらなる実施形態では、B C 4 d マーカーの量および E C 4 d マーカーの量は従来技術で知られているような C 4 d に特異的な抗体を使用して決定される。

【 0 0 2 9 】

本発明は、個別マーカーの量を用いる最初の評価に基づいて陰性と考えられる全身性エリテマトーデス(S L E)を有するリスクのある対象を診断および治療するための改良された方法を提供する。

【 0 0 3 0 】

対象は好ましくはヒト対象(成人または小児)である。S L E は血液中の異常な自己抗体の産生を特徴とする自己免疫疾患である。これらの自己抗体はそれぞれの抗原と結合して免疫複合体を形成し、循環して最終的に組織に沈着する。S L E のリスクのある対象は、限定されないが、倦怠感、発熱、慢性炎症、組織損傷；顔面の頬を覆う頬部発疹または「蝶型」発疹；円板状皮膚発疹、すなわち癩痕の原因となり得る斑状発赤；光過敏症、すなわち太陽光線暴露に反応した皮膚発疹；粘膜潰瘍、すなわち口腔、鼻腔、または咽喉の内膜の潰瘍；関節炎、すなわち四肢の 2 つ以上の腫脹した圧痛関節；胸膜炎/心膜炎、すなわち心臓または肺周辺の内膜組織の炎症、呼吸時の胸痛；脱毛；腎臓の異常、すなわち異常な量の尿タンパク質または円柱と呼ばれる細胞要素の集塊；脳の炎症、すなわち発作(けいれん)および/または精神異常として出現する；血球数異常；免疫学的障害；なら

【 0 0 3 1 】

本明細書で使用されるとき、「生物学的サンプル」は、対象の体から得られる。対象から得られる適切な生物学的サンプルはいずれも使用できる。本発明の方法の使用に特に適したサンプルは血液サンプル、限定されないが腎バイオプシーを含むバイオプシーサンプルである。一つの実施形態では、血清学的マーカー(A N A、C E N P、J o - 1、L a / S S - B、および S c 1 - 7 0 マーカーなど)は血液サンプルから得られるが、一方 E C 4 d、P C 4 d、E C R 1、および/または B C 4 d マーカーは循環中の血液細胞に沈着されている。

【 0 0 3 2 】

血液サンプルは、補体活性を阻害するために、好ましくはEDTA（エチレンジアミン四酢酸）で処理する。サンプルは室温で維持できるか、または4℃で保存できる。いくつかの実施形態では、全血サンプルは異なる成分に分画化できる。例えば、一つの実施形態では、赤血球は分画遠心分離によってサンプル中の他の細胞型から分離される。赤血球に結合した補体活性化産物（例、EC4dおよびECR1）の分析は、分離された赤血球で実施できる。いくつかの実施形態では、白血球は血液サンプルの他の成分から分離される。例えば、白血球（パフィーコート）は、遠心分離によって血漿および赤血球から分離できる。白血球の各型（例、リンパ球、単球など）は、細胞型に特異的な既知細胞表面マーカーに対する抗体の利用によって分離できる。白血球の細胞表面マーカーに対する抗体は、従来技術の当業者に知られている。例えば、細胞表面マーカーCD3、CD4、CD8、およびCD19に特異的なモノクローナル抗体が市販されており、リンパ球を選択するために使用できる。BC4dのような白血球の表面上に認められる補体活性化産物の分析は、分離された白血球分画で実施できる。血小板分画を他の血液成分から得て、PC4dなどの血小板結合補体活性化産物の分析ができる。血小板分離は従来技術で知られている方法で実施でき、分画遠心分離または血小板に特異的な抗体（例、CD42b）を用いた免疫沈降が含まれる。

10

【0033】

特定のバイオマーカーの量（例、数量または量）は、従来技術の当業者に知られている様々な方法を用いてサンプル中で決定できる。このような方法には、限定されないが、フローサイトメトリー、赤血球、血小板、または白血球の溶解物（例、リンパ球溶解物）を用いたELISA、およびラジオイムノアッセイが含まれる。一つの実施形態では、C4dの量の決定は、各分子に特異的なポリクローナルまたはモノクローナル抗体を用いた直接的または間接的免疫蛍光によって測定が実施されるフローサイトメトリー法を使用して行われる。これらの各分子は別々のサンプル（例、赤血球特異的分画、白血球特異的分画、または血小板特異的分画）または1つのサンプル（例、全血）を用いて測定できる。

20

【0034】

本明細書で使用されるとき、「変換分析」は任意の適切な数学的操作であることができ、限定されないが、一般化モデル（例、ロジスティック回帰、一般加法モデル）、多変量解析（例、判別分析、主成分分析、因子分析）、および時間事象「生存」分析が含まれる。

30

【0035】

本明細書の教示に基づいて従来技術の当業者によって理解されるように、重み付き係数は様々な技法によって決定することができ、幅広く変動し得る。適切な重み付き係数を決定する一つの例では、患者の2群、例えばSLEを有する群および有さない群、で認められるマーカー量を用いて多変量ロジスティック回帰（MLR）を行う。MLRで使用できる変数（マーカー）の選択にはいくつかの方法があり、これによって、選択されないマーカーはモデルから排除され、モデルに残った各予測的マーカーに対する重み付き係数を決定する。次にこれらの重み付き係数に、例えばサンプル中のマーカー量（限定されないが、重量/容量、重量/重量、重量/沈降細胞数などの任意の適切な単位で表示される）を乗じて、例えば合計すると、SLEリスクスコアを算出することができる。

40

【0036】

一つの限定されない実施形態では、インデックススコア（例えば、ANAおよび除外マーカー）を構成するいくつかの成分は、所定の閾値/カットオフ値（例えば、ANA成分は0、1、または2の値を有することができ、除外マーカーは0または1の値を有することができ）と関連することができる。このような状況では、インデックスはANAまたは除外マーカーの閾値判定限界での分析誤差によって、陽性から陰性（またはこの逆）に変動する可能性があり得る。そのため、いくつかの実施形態では、インデックススコアを決めるために使用される成分を、閾値/カットオフ値（例、ANAおよび/または除外マーカー）を用いて評価して、閾値の20%以内である（従って、インデックスの陽性または陰性に影響する可能性がある）場合に、当該インデックスについて「不確かな結果」を

50

定義することができる。この実施形態では、スコアは不確かとして注記されるべきである。

【0037】

本明細書で使用されるとき、「組み合わせる」は閾値と比べることができる一つのスコアが得られるようにマーカーを組み合わせる任意の数学的操作（加減乗除、およびこれらの組み合わせ）を含む。これらの方法では、マーカーの量は適切な重み付き係数を用いて調整できる。

【0038】

本方法は、測定したSLEリスクスコアと標準SLEリスクスコアの比較を使用することができる。任意の適切な比較標準を用いることができ、これには限定されないが、正常者またはSLEを有する対象の集団のSLEリスクスコアの所定の量または範囲、または本明細書で説明されるそれ以外の量又は範囲が含まれる。本明細書で使用されるとき、「所定の量」または「所定の範囲」は、コントロール対象（すなわち健常者）またはSLEのような自己免疫疾患もしくは非SLE自己免疫障害に罹患した対象の集団で測定された特定のSLEリスクスコアの数値または量（例、絶対値または濃度）から決定することができる値または値の範囲を意味する。SLEリスクスコアの所定の量または所定の範囲は、最大の統計学的有意性を達成するSLEリスクスコア値の値または範囲を計算することによって選択できる。いくつかの実施形態では、所定の量はコントロール/正常対象の集団から得るSLEリスクスコアの分散に基づくことができる。例えば、所定の量は正常範囲SLEリスクスコアをより少なくとも2、3、4、または5標準偏差上であることができる。SLEリスクスコアの所定の量または所定の範囲は、その量または範囲内のSLEリスクスコアを有する患者の50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%超がSLEを有するSLEリスクスコアの量または範囲を計算することによっても決定することができる。

【0039】

本明細書で使用されるとき、「診断する/診断」はSLEの存在または性質を特定することを意味する。診断方法は、その感度および特異性が異なる。診断アッセイの「感度」は、検査が陽性である疾患患者の割合である（「真の陽性」率）。アッセイで検出されない疾患患者は「偽陰性」である。疾患がなく、アッセイで検査陰性の対象は「真の陰性」という。診断アッセイの「特異性」は、1から偽陽性率を引いた値であり、「偽陽性」率は検査陽性であるが疾患を有さない対象の比率として定められる。特定の診断方法は状態の確定診断を提供しないかもしれないが、この方法が診断の助けとなる陽性の指標を提供すれば十分である。

【0040】

SLEリスクスコアに少なくとも一部基づいてSLEまたは別の疾患について対象を「治療する」とは、SLEリスクスコアに基づいてSLEを有する可能性があるものと特定されたこれらの対象が、主治医または他の医療従事者によって適切であるとみなされてSLEのために治療されることを意味する。このような治療には、限定されないが、免疫抑制剤（例、シクロホスファミド、コルチコステロイドなど）および/または疾患修飾性抗リウマチ剤（DMARD、例、メトトレキサート、アザチオプリン、レフルノミド、ベリムマブ、ならびにプラキニルおよびヒドロキシクロロキンなどの抗マラリア剤）が含まれる。疾患修飾性抗リウマチ剤（DMARD）は、疾患過程である再燃の発生を減少させて、ステロイド使用の必要性を低下させるために予防的に用いられ、再燃が生じた場合はコルチコステロイドで治療される。

【0041】

本明細書で説明されるように本発明のすべての態様の方法は、手作業で実施でき、または自動化システムもしくはコンピュータと連結されて使用できる。例えば、本方法は自動化システムを用いて実施でき、自動化システムでは、対象の血液サンプルを分析して、特定のバイオマーカーの量を決定し、所定の量または所定の範囲との比較を、この目的に適したソフトウェアによって自動的に実行する。本発明の方法に使用するためのコンピュー

10

20

30

40

50

タソフトウェアまたはコンピュータ読み取り可能メディアには、(a)赤血球またはリンパ球(例B細胞)の表面上に沈着した補体成分C4dの決定に対応するデータを受け取る、および生物学的サンプルにおけるこのようなサンプルであるANA、SSB(La)マーカー、Scl-70マーカー、Jo-1マーカー、CENPマーカー、および/または抗dsDNA抗体の量に対応するデータを受け取るためのコード、(b)個別のこのような細胞の表面上に沈着した補体成分C4dの所定量を回収する、およびこのような実例であるANA、SSB(La)マーカー、Scl-70マーカー、Jo-1マーカー、CENPマーカー、および/または抗dsDNA抗体の所定量を回収するためのコード、ならびに(c)(a)のデータを(b)の所定の量と比べて正確なSLE診断ができるか、または他のバイオマーカーの追加測定が必要かどうか決定するためのコード、を含むコンピュータ読み取り可能メディアが含まれる。

10

【0042】

本発明の特定の実施形態では、バイオマーカー量の1つ以上の所定の量または所定の範囲はデジタルコンピュータに関連するメモリに保存できる。そのようなサンプルである補体C4d、ANA、SS-B(La)マーカー、Scl-70マーカー、Jo-1マーカー、CENPマーカー、および/または抗dsDNA抗体の決定に対応するデータが(適切な分析装置から)得られた後、デジタルコンピュータは測定したバイオマーカーデータを1つ以上の適切な所定の量または所定の範囲と比較できる。比較が実施された後、デジタルコンピュータはデータがSLEの診断を示すかどうか自動的に計算できる。

【0043】

20

従って、本発明のいくつかの実施形態はデジタルコンピュータによって実行されるコンピュータコードによって具体化される。デジタルコンピュータは、Windows(登録商標)をベースとしたオペレーションシステムなどの標準的または専門的オペレーションシステムを用いたマイクロ、ミニ、または大型コンピュータであることができる。コードは、任意の適切なコンピュータ読み取り可能メディアに保存できる。コンピュータ読み取り可能メディアの例には磁気、電子、または光ディスク、テープ、スティック、チップなどが含まれる。コードは従来の通常な技術の当業者によって、C、C++などを含む適切なコンピュータプログラム言語で書くことができる。

【0044】

このため、本発明はさらに、サンプル中のマーカー量を測定するための装置に本発明のいずれかの態様または実施形態の方法を実行させるための使用説明書のセットを含む、非一時的コンピュータ読み取り可能ストレージメディアを含む。さらなる態様では、本発明は、血液サンプルのようなサンプル中の列挙されたマーカーの量を測定するための装置に連結されたコンピュータ上で本発明の方法を自動的に実行するための非一時的コンピュータ読み取り可能ストレージメディアを提供する。本明細書で使用される場合、「コンピュータ読み取り可能メディア」は、CPUによって読み取り可能な磁気ディスク、光ディスク、有機メモリ、および他の任意の揮発性(例、ランダムアクセスメモリ(「RAM」))または非揮発性(リードオンリーメモリ(「ROM」))大容量ストレージシステムを含む。コンピュータ読み取り可能メディアは連携または相互接続したコンピュータ読み取り可能メディアを含み、これは処理システムのみが存在するか、または処理システムに対してローカルもしくはリモートであり得る複数の相互接続した処理システム間で分配される。限定されないが、フローサイトメトリー装置およびELISAを実施する装置を含む、マーカーの量を測定するのに適切な任意の装置を使用することができる。

30

40

【0045】

本発明はまた、SLEを診断するためのキットおよびテストの組み合わせを提供する。一つの実施形態では、本発明はC4dの量のための第一テスト、BD4dの量のための第二テスト、SS-B(La)マーカー、Scl-70マーカー、Jo-1マーカー、およびCENPマーカーの1種類以上(1、2、3、または4種類すべて)の量のための第三テスト、ANAの量のための第四テスト、および抗dsDNA抗体の量のための第五テストのうち少なくとも3テスト(すなわち3、4、および5テストすべて)を含むSLE

50

の診断のために有効なテストの組み合わせを含む。特定のバイオマーカーの量を測定するためのキットまたはテストには、本明細書で説明される方法に従って測定を実施するための様々な試薬が含まれる。例えば、一つの実施形態では、キットまたはテストにはバイオマーカーそれぞれの免疫蛍光測定を実施するための試薬が含まれ、列挙された標的に特異的な1種類以上のマーカーに特異的なモノクローナル抗体と蛍光部分の共役体などが含まれる。さらに本キットには、例えば緩衝液、放射性物質標識抗体、比色試薬、全血から異なる細胞分画を分離するための説明書、およびバイオマーカーの特定の所定量に基づいてSLEを診断するための説明書が、このタイプのアッセイを実施する上で必要な他の材料として含まれる。

【0046】

別の実施形態では、本キットまたはテストは、ELISAまたはラジオイムノアッセイのような、バイオマーカーのそれぞれについて他の標準アッセイを実施するための試薬を含む。このような実施形態では、本キットまたはテストは放射性ヨウ素、アビジン、ビオチン、またはペルオキダーゼのような酵素などの適切な標識と共役体化された、列挙された標的に特異的なモノクローナル抗体または他のマーカーを含む。さらに本キットは緩衝剤、抗体共役体化酵素の基質、全血から異なる細胞分画を分離するための説明書、およびバイオマーカーの特定の所定量に基づいてSLEを診断するための説明書を含む。

【0047】

本明細書で説明される実施例および実施形態は説明の目的のためだけであり、これを踏まえた様々な改良または変更は従来技術の当業者に示唆され、本出願の精神および範囲内および添付の請求項の範囲内に含まれるものと理解される。本明細書に引用されるすべての参照文献、刊行物、特許、および特許出願は、すべての目的のためにそれらの全体として参照によって組み込まれる。

【0048】

実施例

諸言

全身性エリテマトーデス(SLE)は、自己抗体媒介組織損傷および生命を脅かす可能性がある多臓器不全を引き起こす慢性自己免疫疾患である(1)。この異成分からなる炎症性疾患は米国で161,000から322,000名の成人に罹患しており、女性が男性よりも9倍多く罹患している(2)。さらに有病率は白人に比べてアフリカ系アメリカ人およびヒスパニック系で高く、社会人口統計学的背景が予後不良を予測的に示している(3)。SLEの所見は多様であり、発疹、関節炎、貧血、血小板減少症、漿膜炎、腎炎、発作、および精神異常が含まれる。これらの症状は異成分からなり、非特異的、進行的であり、しばしば他の疾患と類似した症状であるため、SLEの診断は複雑であり、医師にとって困難となり得る。SLEの診断は、患者の病歴、現在の症状、および臨床検査の組み合わせに依存する。1982年に公表された改訂版米国リウマチ学会基準(4)は患者がSLEを有するものとして分類するために11項のうち4項目の存在を要求しているが、臨床診療におけるこれらの基準の利用は統一されていない(5)。SLEの診断を支援するために一般的に使用されている標準的な臨床検査の中で、主なものは抗核抗体(ANA)および抗二本鎖DNA(抗dsDNA)抗体である(6)。それでもANAおよび抗dsDNA抗体には限度があり、これらの血清学的マーカーはいずれもSLEを診断する上で適切なバランスの感度および/または特異性を提供しない。補体活性化がSLEの発病の中心であること(7)、赤血球およびB細胞に沈着した細胞結合C4dフラグメントがSLEの診断を容易にすることができる(8~11)ことは十分認識されている。さらに、疾患の活動性にCB-CAPが関与する可能性が報告によって確立されており(12,13)、治療にあたる医師がSLE患者を管理するのをこれらの測定が支援する可能性がある。

【0049】

本発明者らは、大規模な多施設横断試験においてSLEの診断に対するCB-CAPの関与をすでに確立し(14)、本発明者らのデータによって赤血球、B細胞、血小板上の

10

20

30

40

50

過剰なC4d補体沈着、または赤血球上の低いCR1発現が、SLEでは他の疾患と比べて一般的に7倍異なることが確認された(14)。しかし、これらのマーカーの発現の有意な重なりがSLEと他のリウマチ疾患の間で認められ、これによって個別CB-CAPSのいずれも、適切なバランスの臨床感度と特異性を単独で達成しないことが示された(15)。この試験では、抗dsDNAは感度がないが(29.5%)、なおも特異的マーカー(>95%)であり、一方ANAは、感度はあるが特異性に乏しいマーカーであった。本発明者らは抗dsDNAの高い特異性(低い偽陽性率)を頼りにして、CB-CAPSのANAおよび抗MCVの診断価値が増加するか否かを評価した。抗dsDNA陰性者では、対数標準化したEC4dおよびBC4dマーカーの段階的追加によって、十分な特異性を維持しつつ、感度が有意に増加した。抗MCVによってさらに寄与される特異性の増加は、関節リウマチ(RA)に依存し(RAに対する特異性は抗MCVなしでは87.7%であるのに対してMCVと併せると97.4%であった)、全体的なSLE感度を高める、より最適なカットオフの選択を可能にした。ANA、EC4d、BC4dの重み付けされた合計を抗MCVと一緒に組み合わせるインデックススコア(>0)は、SLEに対して感度があり(71.6%)、特異的(90.1%)であった。結局、抗DNAとインデックススコアの組み合わせは、抗DNA単独と比較して臨床感度を29.5%から80.0%に改善した。この臨床感度の50.5%の改善は、特異性が96.1%から86.5%へと9.6%低下したことよりも大きく価値がある。さらに抗dsDNAおよびANAの組み合わせと比べたとき、抗dsDNAとインデックススコアの組み合わせによって、特異性が30.3%改善し(59.0%対89.3%)、感度の低下は10%のみ(89.0%対79.0%)であった。

10

20

【0050】

しかし、我々の診断方法の特異性はRAを有する患者に対して高いが、強皮症、皮膚筋炎、血管炎、およびシェーグレン症候群を含む他の疾患に対する特異性は75%より有意に低く、従って臨床診療における本診断方法の価値はおそらく限定された。

【0051】

方法

臨床試験計画およびバリデーション計画

多変量インデックスの性能特性を、2010年5月から8月(コホート1)および2011年6月から2013年9月(コホート2)に登録した対象の2群のコホートで確立した。

30

【0052】

試験設計および計画

2つの独立した試験(コホート1および2)は多施設横断試験であり、対象の1回の受診が必要であった。診断の方法論の性能特性を評価するために経過観察の受診は要求されなかった。対象のインフォームドコンセントを得た後、下記の処置を実施した。

- ・ありとあらゆるリウマチ状態の診断に関連する対象の病歴を得、組み入れ/除外基準およびこれらの状態の診断に関する詳細を検討した。

- ・診断の日付をSLEおよび他のリウマチ状態について記録し、適合した具体的なSLE診断基準を文書で記録した(SLE分類のための改訂ARC基準)(Tan et al., 1982; Hochberg, 1997)。

40

- ・対象の人口統計学的データを記録した(誕生日、性別、人種/民族)。

- ・試験紙による尿妊娠検査を妊娠可能なすべての女性に実施した。

- ・CB-CAPS(EC4dおよびBC4d)、ANA、抗dsDNA、抗MCV、およびENA抗体の分析用に患者の血液を約15mL採取し、血液サンプルは空腹または非空腹のいずれかの条件で得た。サンプルは7.5mLのEDTA採血管(薄紫色キャップ)1本、および発送前に遠心分離を必要とするSST採血管(濃赤色キャップ)1本で構成された。すべての生物学的サンプルは試験施設からExagen Diagnosticsに(提供された輸送キットを用いて)翌日到着で送られた。CB-CAPSはサンプル採取から48時間以内で分析されるべきであるため(分析前の変数プロジェクトID25

50

945参照)、サンプルは土曜日には受け付けず、従って対象は月曜日から木曜日でのみ登録された(木曜日の出荷期限時刻は午前10:00であった)。

・血液を採取して、施設からExagen Diagnostics (San Diego、基幹施設)に発送した。分析検査室における盲検性を維持するため、対象の診断を開示するCRFおよび対象の任意の情報を、Exagen臨床プロジェクト管理者にファックス送信して、一方、分析用の血液サンプルは、記入済みの対象の個別の依頼書を添付して、分析検査室に直接送付された。これらの検査の結果は、試験の実施中は治験責任医師が利用できないようにされた。検体は対象の番号およびイニシャルによってのみ特定され、分析検査室には対象の特定の診断が知らされなかった。臨床チームのみが試験を通して患者の診断にアクセスできた。

10

・赤血球およびBリンパ球を分離、洗浄して、C4dに特異的なモノクローナル抗体および/またはポリクローナル抗体を用いて蛍光標識し、および本発明者らの臨床検査室でバリデートされたアッセイを用いてフローサイトメトリーによって分析した。平均蛍光強度を、各細胞表面マーカーの発現量の指標として使用して、dsDNA、ANA、抗MCV、およびENAに対する抗体を、インビトロ診断薬としてFDAによって承認された固相イムノアッセイを用いて測定した。製造業者のカットオフを、抗MCV以外のすべてのELISAに使用した。

【0053】

試験集団の選択

組み入れ基準:

20

- ・読む、理解する、そしてインフォームドコンセント書式に署名できる
- ・年齢が18歳以上
- ・同意を得て血液サンプルを採取することができる
- ・リウマチ状態を有する対象は、次の2つの分類の一つに該当しなければならない。
- ・SLEの分類に関する改訂ACR基準に従ってSLEと診断される

表1にSLEの分類に関する基準を示す。

【表1】

表1 SLEに関するACR基準

Criteria
頬部発疹: 頬隆起部を覆う平坦または隆起した固定紅斑
円板状発疹: 付着性角化落屑および毛孔性角栓を有する紅斑性の円形隆起斑: 萎縮性瘢痕を生じることがある
光過敏症: 紫外線への暴露による発疹
口腔潰瘍: 医師による観察で、口腔および鼻咽喉潰瘍を含む
関節炎: 圧痛、腫脹、または滲出液を伴う2か所以上の末梢関節の非びらん性関節炎
漿膜炎: ECGもしくは摩擦音、または浸出液の証拠によって実証された胸膜炎または心膜炎
腎障害: タンパク尿 > 0.5 g/日または細胞円柱 3+
神経障害: 他の原因がない発作または精神異常
血液障害: 原因薬剤がない、溶血性貧血または白血球減少症 (< 4000個/L) またはリンパ球減少症 (< 1500個/L) または血小板減少症 (< 100,000個/L)
免疫障害: 抗dsDNA、抗-Smおよび/または抗リン脂質
抗核抗体: ANAを誘発することが知られている薬剤の非存在下での、任意の時点での免疫蛍光または同等のアッセイによるANAの異常な力価

30

40

・病歴のいずれかの時点で十分に立証された11項目の基準の4項目以上のいずれかの組み合わせがあれば、患者がSLEを有している可能性がある。

・次のリウマチ障害の1つを有すると診断される:

抗リン脂質症候群 (APS)、線維筋痛症 (ANA陽性患者のみ)、全身性硬化症、関節リウマチ、多発性筋炎、皮膚筋炎、ウェグナー肉芽腫症、結節性多発動脈炎、クリオグロブリン血管炎、白血球破砕性血管炎、他の免疫学的血管炎、原発性シェーグレン症候群

・さらに約200名の健常者ボランティア(除外規定参照)を登録した。

50

【 0 0 5 4 】

除外基準

健常ボランティアのみに適用：心血管、精神、神経、胃腸管（例、胃または十二指腸潰瘍、炎症性大腸炎、G I 出血歴）、代謝、肺（例、喘息、C O P D）、腎臓（腎不全を含む）、肝臓、血液、免疫、内分泌の病的状態（例、甲状腺機能低下、糖尿病）、活動性感染症、または慢性感染症（B型肝炎またはC型肝炎またはH I V）の病歴、新生物疾患、および/または減量手術の既往を含む、治験責任医師の判断に基づく臨床的に重要な同時期の病的状態

- ・原発性免疫不全症候群の明白なまたは検査による証拠
- ・妊婦または授乳中の女性

10

【 0 0 5 5 】

試験方法

米国内の約15か所の参加施設から集めた約300名のS L E、300名の非S L E リウマチ疾患、および200名の健常者からなる合計800名の被験者に基づくデータを、被験者の2つのコホートのために計画した。参加施設はバランスのとれたサンプルを確保するためにS L Eを有する被験者および他のリウマチ状態を有する対象を同じ人数採用するように促された。C B - C A P S および他の血清学的マーカー用に各対象から血液を採取した。

【 0 0 5 6 】

試験依頼者に提出されたすべてのデータおよび血液サンプルは、対象のI D番号を使用して厳密に名前が伏せられた。各施設には2桁の場所番号が割り当てられ、各施設は第二I D番号を割り当てられた。各施設はその場所での試験番号および関連する対象の名前のリストを維持する責任を有した。すべての対象の識別子は解説文書から除かれ、すべての血液サンプルは被験者I D番号およびイニシャルによってのみ識別された。さらに試験依頼者の臨床検査室には、すべての被験者の診断が隠された。

20

【 0 0 5 7 】

統計分析

統計分析をRソフトウェアのバージョン2.15.0を用いて実施した。統計分析は、受信者動作特性（R O C）曲線下面積（S L E 対健常対象を除く非S L E 患者）、ならびに診断感度および特異性の計算を利用した。受信者動作特性を、それぞれのマーカー（単変量分析）に関して必要に応じて使用し、またインデックス値の決定後に多変量ロジスティック回帰式のアウトプットとして使用した。性能の評価として感度および特異性を計算した。報告された性能統計値（感度、特異性）、R O C A U C は一つ抜き交差検証によって計算した。

30

【 0 0 5 8 】

臨床成績

全304名のS L E 患者、および他のリウマチ疾患を有する285名の患者（女性が87.8%、平均年齢48歳）が分析に適格であった。他のリウマチ疾患を有する285名の群には、R A（患者161名、女性85%、平均年齢59歳）、全身性硬化症（患者35名、女性80%、平均年齢53歳）、多発性筋炎/皮膚筋炎（P M / D M：患者27名、女性81%、平均年齢56歳）、原発性シェーグレン症候群（患者33名、女性94%、平均年齢56歳）、他の種々なリウマチ疾患を有する患者29名（女性83%、平均年齢55歳）（多発性血管炎を有する肉芽腫症[5名]、線維筋痛症[13名]、血管炎[10名]、抗リン脂質症候群[1名]）が含まれた。また全部で205名の健常者（女性66%、平均年齢41歳）も登録した（表2）。

40

【表 2】

表 2 : 2つのコホートにおける患者の分布

	コホート		合計
	1	2	
SLE	210	94	304
RA	120	41	161
シェーグレン 症候群	9	24	33
強皮症	21	14	35
PM/DM	16	11	27
他の疾患	12	17	29
健常者	205	0	205
合計	593	201	794

10

【0059】

患者304名の特性を表3に示す。

【表 3】

表 3 : 登録した SLE 患者 304 名の特性

	N (%)	
性別 (女性)	277	(91%)
人種		
白人	124	(41%)
アフリカ系アメリカ人	92	(30%)
アジア人	22	(7%)
ヒスパニック系	61	(20%)
その他	5	(2%)
頬部発疹	141	(46%)
円板状発疹	44	(14%)
光過敏症	118	(39%)
口腔潰瘍	97	(32%)
関節炎	232	(76%)
漿膜炎:	91	(30%)
胸膜炎	63	(21%)
心膜炎	41	(13%)
腎障害:	133	(44%)
尿タンパク > 0.5 g/日	123	(40%)
3+細胞円柱	15	(5%)
神経障害:	22	(7%)
発作	20	(7%)
他の原因のない精神病	4	(1%)
血清学的障害:	161	(53%)
溶血性贫血	16	(5%)
白血球減少症 (< 4000 個/L)	79	(26%)
リンパ球減少症 (< 1500 個/L)	84	(28%)
血小板減少症 (< 100,000 個/L)	40	(13%)
免疫障害:	249	(82%)
抗 dsDNA	206	(68%)
抗 Sm	71	(23%)
抗リン脂質	76	(25%)
抗核抗体	293	(96%)

10

20

30

【0060】

SLE 診断法で使用されるマーカーの単変量分析

血清学的マーカー (ANA、抗-dsDNA、抗MCV、SS-B/La、CENP、Sc1-70、スミス) および CB-CAP を、登録したすべての対象で決定した (n = 794)。ANA (20 単位) は感度のよいマーカーであった (陽性 91.7%、試験した SLE 患者 279 名) が、他のリウマチ疾患に対してかなり非特異的であった (52.3%) (表 4)。

40

【0061】

SLE 患者 304 名のうち、これらの SLE 患者の計 101 名が固相アッセイによる抗 dsDNA 検査陽性であり (33.2%)、97 例の検査結果が Crithidia Luciliae 間接免疫蛍光アッセイ (INOVO Diagnostcs) を用いて陽性が確認され、このため 31.9% (97/304) の最終感度を得た。計 11 名の非 SLE 対象 (RA が 6 名、強皮症が 2 名、血管炎が 2 名、健常者が 1 名) が、ELISA

50

による抗dsDNA検査陽性(>301単位)であったが、これらのうち3名(RAが2名、強皮症が1名)はCrithidiaアッセイによって陽性が確認されず、そのため他の疾患に対して97.2%(277/285)および健常者に対して99.5%(204/205)の特異性を得た。抗スミスは感度が不良であった(14%)が、SLEの非常に特異的なマーカーであった(100%)。または、抗MCV(カットオフ70単位)、SS-B/La(>10単位)、Scl-70(>10単位)、およびJo-1(>10単位)はそれぞれ、関節リウマチ、シェーグレン症候群、強皮症、およびPM/DM患者に特異的であった(表4)

【表4】

表4：単変量分析によるマーカー性能

	SLE	RA	シェーグレン症候群	Scl*	PM/DM	その他	NHV
ANA≥20単位	91.7% (279)	3% (51)	88% (29)	66% (23)	7% (24)	31% (9)	9% (19)
dsDNA>301単位 Crithidiaで確認	32% (97)	2% (4)	0% (0)	3% (1)	0% (0)	7% (2)	0% (1)
抗Sm>10単位	14% (42)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
抗MCV>70単位	3% (8)	47% (76)	9% (3)	6% (2)	4% (1)	3% (1)	0% (1)
Jo1>10単位	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	15% (4)	0% (0)	0% (0)
Scl-70>10単位	0% (0)	0% (0)	3% (1)	20% (7)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
SS-B/La>10単位	9% (27)	1% (1)	39% (13)	3% (1)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
CENP>10単位	2% (6)	3% (5)	3% (1)	17% (6)	0% (0)	0% (0)	1% (2)

*Scl：強皮症

【0062】

表5に示すように、EC4dおよびBC4dの量はSLEでは他の疾患または正常対象よりも7倍高かった。75単位を超えるEC4dまたは200単位を超えるBC4d量が、SLEに対して非常に特異的であった。他の疾患を有する対象では285名中2名のみ(RAが1名、血管炎が1名)が、それぞれ75および200単位を超えるEC4dまたはBC4d量を示した(特異性99.3%)。または、SLE患者の計48名(16%)が高いEC4dまたはBC4dを示した。

また、12MFIを超えるEC4d量は、SLEとNHVを区別するのに97%特異的であり、一方48単位を超えるBC4d量は96%特異的であった。

【表5】

表5：EC4dおよびBC4dの量

	SLE	RA	シェーグレン症候群	Scl*	PM/DM	その他	NHV
EC4d 正味MFI	21 ± 3	8 ± 1	10 ± 2	7 ± 1	8 ± 1	7 ± 1	5 ± 1
EC4d>12単位	54.6%	10.6%	21.2%	11.4%	14.8%	17.2%	2.4%
EC4d>75単位	2.3%	0.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
BC4d 正味MFI	106 ± 6	32 ± 2	26 ± 4	32 ± 5	27 ± 4	46 ± 19	23 ± 3
BC4d>48単位	62.2%	14.3%	12.1%	17.1%	3.7%	10.3%	4.4%
BC4d>200単位	14.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	3.4%	0.0%

*Scl：強皮症 結果は平均値±平均値の標準誤差として表示する

【0063】

多変量インデックスアッセイ - 分析後のデータ整理

10

20

30

40

50

使用した診断方法論では二階層法を用いた。第一階層では、抗dsDNA陽性(>301単位、C r i t h i d i aによって確認)、または抗Sm陽性(>10単位、製造業者のカットオフ、SLEの基準)、または高いEC4d(>75単位)、またはBC4d(>200単位)は、SLEを示唆する。第一階層で陰性の対象で決定される第二階層では、重み付きインデックススコアは、ANA成分(ANA 20単位、60単位)、CBCAPS成分(対数標準化したEC4d+BC4d)、ならびに抗MCV(>70単位、RAマーカー)、またはSS-B/La(>10単位、シェーグレン疾患マーカー)、またはCENP/Sc1-70(>10単位、強皮症マーカー)、またはJo-1(>10単位、多発性筋炎/皮膚筋炎)の陽性率からなる特異性成分を累加する。インデックス>0はSLEを示唆し、二階層の組み合わせが全体の性能特性の結果となる。図1は、使用した二階層診断方法論を要約する。

10

【0064】

第一階層：性能特性

登録した対象794名のうち、これらの計150名が第一階層マーカーの少なくとも1つに対して陽性の試験結果であった(C r i t h i d i aによって確認されたdsDNA>301単位、または抗Sm>10単位、またはEC4d>75単位、またはBC4d>200単位)。これらの対象150名のうち、140名がSLEを有し(感度46.1%、140/304)、一方これらの9名は他のリウマチ疾患を有した(RAが5名、全身性硬化症が1名、血管炎が2名、APSが1名、正常1名を含む)(96.8%の特異性、276/285)。健常対象を区別する特異性は99.5%(204/205)であった(表6)。

20

【表6】

表6：第一階層における陽性

	第一階層陽性	割合
SLE	140 / 304	46.1%
RA	5 / 161	3.1%
シェーグレン 症候群	0 / 33	0.0%
強皮症	1 / 35	2.9%
PM/DM	0 / 27	0.0%
他の疾患	3 / 29	10.3%
NHV	1 / 205	0.5%

30

【0065】

第一階層で陽性のSLE患者140名のうち、全体でこれらの48名(34.3%)がEC4d>75単位またはBC4d>200単位で陽性の試験結果であった。これによって、第一階層で試験結果が陰性であった全645名(SLEが165名、他の疾患が276名、健常者が204名)を、第二階層でロジスティック回帰によって分析した。

【0066】

第二階層性能特性

SLE(n=165)および他の疾患(n=111)を有する患者でのロジスティック回帰分析は、ELISAによるANAの陽性率(ANA成分)を、対数標準化したEC4dおよびBC4d量(CBCAPS成分)ならびに抗MCV(>70単位)、SS-B/La(>10単位)、CENP(>10単位)、Sc1-70(>10単位)、またはJo-1(>10単位)の陽性率の複合抗体特異性成分とともに使用した。

40

【0067】

多変量ロジスティック回帰のANA成分は2つの閾値を使用した。これは陰性ANA(ANA<20単位、この場合ANA成分に0の値を割り当てた)、中等度陽性(ANA20~60単位、この場合ANA成分に1の値を割り当てた)、および強陽性(ANA>6

50

0 単位、この場合ANA成分に2の値を割り当てた)から構成された。抗体特異性成分の陽性率は、他の疾患を有する対象の40.2%(111/276対象)と比べてSLEでは9.1%(15/164陽性)であった。3名の正常対象だけが第二階層の特異性成分が陽性であった。

【表7】

表7：第二階層の対象における特異性成分の陽性率

	第二階層陽性	割合
SLE	15 / 164	9.1%
RA	74 / 156	47.4%
シェーグレン症候群	17 / 33	51.5%
強皮症	15 / 34	44.1%
PM/DM	4 / 27	14.8%
他の疾患	1 / 26	3.8%
NHV	3 / 204	1.5%

10

【0068】

表8は第二階層における多変量ロジスティック回帰の推定値を明らかにしている。推定値は健常者を除くSLEおよび非SLE対象を用いて計算した。

20

【表8】

表8：ロジスティック回帰推定値

	推定値	P 値
(切片)	-5.2626±0.6790	<0.001
ANA成分	0.9877±0.1585	<0.001
LOG(EC4d)	0.2955±0.2040	0.148
LOG(BC4d)	1.0260±0.1936	<0.001
特異性成分	-2.4944±0.3507	<0.001

30

【0069】

ロジスティック回帰モデルのアウトプットに対応するインデックス方程式は次の通りである。

方程式1 第一階層陰性患者におけるインデックス方程式

【数2】

$$Index = -5.2626 + 0.9877 \times ANAComp + [0.2955 \times \log(EC4d) + 1.0260 \times \log(BC4d)] - 2.4944 \times SpecComp$$

【0070】

40

ANA成分(ANAComp)：ANA<20単位の場合、ANA成分は0の値を割り当てられた。ANAが中等度陽性(ANA20~60単位)の場合、ANA成分は1の値を割り当てられた。ANAが強陽性(60)の場合、ANA成分は2の値を割り当てられた。

特異性成分(Spec.Comp)：特異性成分のすべてのマーカー部分(抗MCV>70単位、SS-B/La>10単位、CENP>10単位、Scl-70>10単位、またはJo-1>10単位)がそれぞれのカットオフ値より下である場合、結果を0として入力した。反対に、特異性成分のマーカーのいずれかがそれぞれのカットオフを超える場合、結果を1と入力した。logはEC4dおよびBC4dの正味MFIの自然対数に対応する。

50

【0071】

インデックス計算の例を表9に示す。

【表9】

表9：インデックスの計算

分析試料	結果	成分インデックス	インデックス計算	解釈
ANA成分	ANA: 30単位	ANA成分=1		
CBCAPS成分	EC4d=15単位 BC4d=60単位	logEC4d=2.708; logBC4d=4.094 CBCAPS成分: 0.2955 x 2.708 + 1.0265 x 4.094 = 5.001	= -5.2626 + 0.9877 x 1 + 5.001 - 2.4944 x 1 = -1.77	Index < 0; SLEの示唆なし
特異性成分	SSB-La: 2単位 (0) CENP: 20単位 (1) 抗MCV: 150単位 (1) Jo-1: 0単位 (0) Scl-70 2単位 (0)	0 + 1 + 1 + 0 + 0 = 0 > 0 特異性変数=1		

10

【0072】

インデックススコアは他の疾患では - 1 . 7 4 (中央値) (IQ範囲: - 2 . 5 4 ; - 0 . 9 0)、SLEでは0 . 4 7 (中央値) (IQ範囲: - 0 . 6 4 ; 1 . 7 9)であった(図2)。NHVでは - 1 . 4 6 (中央値) (IQ範囲: - 1 . 1 7 ; 1 . 8 6)であった。表10はSLEおよび対照群(非SLEおよびNHV)で認められたインデックス値の中央値を明らかにする。感度は63 . 6%、他の疾患に対する特異性は、患者に関して88 . 8% (245 / 276)および健常対象に対して97 . 5% (199 / 204)であった。- 2 . 5単位でカットオフを設定すると、SLEに対する98 . 7%の感度および他のリウマチ疾患に対する24 . 9%特異性(健常者に対して5 . 8%特異性)が得られた。または+ 2 . 5単位でカットオフを設定すると、SLEに対して50 . 0%の感度および他のリウマチ疾患に対して96 . 1%の特異性が得られる(健常者に対して100%特異性)。

20

30

【表10】

表10：第二階層におけるインデックス値

	N	25% パーセントイル	中央値	75% パーセントイル	インデックス > 0
SLE	165	-0.64	0.47	1.79	63.6% (105 / 165)
RA	156	-3.25	-2.17	-1.09	5.1% (8 / 156)
シェーグレン症候群	33	-2.12	-1.31	0.13	30.3% (10 / 33)
強皮症	34	-1.94	-1.62	-1.13	5.9% (2 / 34)
PM/DM	27	-1.78	-1.14	0.07	25.9% (7 / 27)
他の疾患	26	-2.08	-1.62	-1.16	15.4% (4 / 26)
NHV	204	-2.07	-1.67	-1.38	2.5% (5 / 204)

40

【0073】

全体的な性能特性 - 2階層組み合わせ

第一階層とインデックススコア(カットオフゼロを使用)の組み合わせにより、SLEについて80 . 3% (244 / 304)の感度、およびSLEと他のリウマチ疾患を区別する85 . 5% (236 / 276)の特異性を得た。SLEを健常対象と区別する特異性は97 . 1% (199 / 205)であった。組み合わせた2階層分析の結果を表11に示

50

す。

【表 1 1】

表 1 1 : 全体的な性能 組み合わせた二階層法

	全人数	第一階層 % (N)	第二階層人数	第二階層 % (N)	全陽性	合計 %
SLE	304	45.7% (139/304)	165	63.6% (105/165)	244	80.3% (244/304)
RA	161	3.1% (5/161)	156	5.1% (8/156)	13	8.1% (13/161)
シェーグレン症候群	33	0.0% (0/33)	33	30.3% (10/33)	10	30.3% (10/33)
強皮症	35	2.9% (1/35)	34	5.9% (2/34)	3	8.6% (3/35)
PM/DM	27	0.0% (0/27)	27	25.9% (7/27)	7	25.9% (7/27)
他の疾患	29	10.3% (3/29)	26	15.4% (4/26)	7	24.1% (7/29)
NHV	205	0.5% (1/205)	204	2.5% (5/204)	6	2.9% (6/205)

10

【 0 0 7 4】

基本モデルへの C B C A P S および特異性成分の段階的追加

二階層法の性能特性を、C B C A P (E C 4 d および B C 4 d) および特異性成分を加えずに得た性能特性 (基本モデル) と比較した。基本モデルは第一階層の抗 d s D N A および抗 S m、ならびに第二階層の A N A 成分による二階層分析から構成した。C B C A P S および特異性成分の段階的追加を表 1 2 に示す。表 1 3 に示すように、C B C A P および特異性成分の追加により、性能特性および基本モデルが改善され、0 . 8 9 4 の A U C を生じ、8 0 % の感度、および他の疾患と S L E を区別する 8 6 % の特異性を得た。抗体特異性成分は R A、原発性シェーグレン症候群、P M / D M、および全身性硬化症に関する診断方法論の特異性を最大にする。S L E と正常対象を区別する特異性は、基本モデルで 9 0 . 2 %、C B C A P S を加えたモデルで 9 4 . 1 %、および全モデルで 9 7 . 1 % であった。

20

【表 1 2】

表 1 2 : モデルの比較

	第一階層	第二階層
基本モデル	抗 d s D N A > 3 0 1 単位 ; 抗 S m > 1 0 単位	A N A 成分
基本モデル + C B C A P S	抗 d s D N A > 3 0 1 単位 ; 抗 S m > 1 0 単位 ; E C 4 d > 7 5 単位 ; B C 4 d > 2 0 0 単位	A N A 成分 C B C A P S 成分
基本モデル + C B C A P S + 特異性成分	抗 d s D N A > 3 0 1 単位 ; 抗 S m > 1 0 単位 ; E C 4 d > 7 5 単位 ; B C 4 d > 2 0 0 単位	A N A 成分 C B C A P S 成分 抗体特異性成分

30

【表 1 3】

表 1 3 : C B C A P S および特異性成分の段階的追加

	N	基本モデル ANA, ds DNA, 抗 S m	基本モ デル + C B C A P S	基本モデル + C B C A P S + 特異 性成分	基本モデルとの 差
特異性 原発性シェー グレン症候群	33	12%	52%	70%	57.6%
特異性 全身性硬化症	35	34%	57%	91%	57.1%
特異性 PM/DM	27	26%	59%	74%	48.1%
特異性 関節リウマチ	161	68%	78%	92%	23.6%
特異性 他の疾患	29	69%	76%	76%	6.9%
全特異性(非 S L E)	285	54%	70%	86%	32.3%
全感度 (S L E)	304	89%	84%	80%	-8.6%
A U C	589	0.718	0.859	0.894	0.176

10

【 0 0 7 5】

コホート分析および従来法との比較

2つのコホート間の感度の差(コホート1 = 81% 対コホート2 = 79%)は統計学的に有意でなかった(p = 0.652)(全体感度 = 80%)。また、SLEを他の疾患から区別する特異性の差も統計学的に有意でなかった(コホート1 = 87% 対コホート2 = 84%、p = 0.485)(全体特異性 = 86%)。また、本発明者らは、本二階層法の性能特性を従来のアッセイの特性と比較した(表14)。結合組織疾患に特異的な血清学的マーカー(SS-B/La、Scl-70、CENP、Jo-1)の追加によって、診断方法論の特異性が64%から79%に改善する。(組み合わせたデータセット: p = 0.024)。

20

【表 1 4】

表 1 4 : 性能特性比較

		コホート1	コホート2	組み合わせ
従来	感度 SLE:	80% (169/210)	82% (77/94)	81%
	特異性 非SLE:	86% (153/178)	74%	(246/304)
	RA:	92% (110/120)	(79/107)	81%
	結合組織:	74% (34/46)	93% (38/41)	(232/285)
	他の疾患:	75% (9/12)	55% (27/49)	92%
				82% (14/17)
				64% (61/95)
				79% (23/29)
本二階層法	感度 SLE:	81% (170/210)	79% (74/94)	80%
	特異性 非SLE:	87% (155/178)	84%	(244/304)
	RA:	90% (108/120)	(90/107)	86%
	結合組織:	83% (38/46)	98% (40/41)	(245/285)
	他の疾患:	75% (9/12)	76% (37/49)	92%
				76% (13/17)
				79% (75/95)
				76% (22/29)

30

40

【 0 0 7 6】

インデックスの分析再現性

インデックスの日間再現性もまた、SLEを有する患者11名から得る全19サンプルについて決定した。複数回インデックス決定を行う患者では、1週間隔で血液を採取した。これらの患者は臨床バリデーション試験(コホート1およびコホート2)の対象ではなかった。ANA、CBCAPS、および抗体特異性成分の複合インデックスを3日連続で連続3回測定した。表15に日間変動を明らかにする。

【表 15】

表 15 インデックスの分析変動

患者番号	受診	1日目	2日目	3日目	4日目	平均	標準偏差
CL001-001-01	1	-0.74	-0.85	-0.53	-0.70	-0.70	0.13
CL001-001-02	2	-0.82	-0.65	-0.62	-0.77	-0.72	0.10
CL001-002-01	1	1.48	1.32	1.31	1.22	1.33	0.11
CL001-002-02	2	0.89	1.25	0.92	0.73	0.95	0.22
CL001-003-02	1	2.54	2.56	2.70	2.53	2.58	0.08
CL001-004-01	1	0.90	1.28	1.33	0.82	1.08	0.26
CL001-004-02	2	0.39	0.39	0.25	0.23	0.31	0.08
CL001-004-03	3	0.31	0.34	0.26	0.04	0.24	0.14
CL001-005-01	5	0.09	0.27	0.19	0.28	0.21	0.09
CL001-005-03	2	0.42	0.25	0.44	0.32	0.36	0.09
CL001-006-01	1	0.75	0.30	0.69	0.67	0.60	0.21
CL001-006-03	2	0.78	0.86	0.73	0.35	0.68	0.23
CL001-007-01	1	2.36	2.42	2.33	2.36	2.37	0.04
CL001-008-01	1	-1.12	-1.10	-1.18	-1.23	-1.16	0.06
CL001-008-02	2	-0.82	-1.18	-1.19	-0.98	-1.04	0.18
CL001-009-02	1	-1.56	-1.48	-1.46	-1.68	-1.54	0.10
CL001-010-02	2	-0.51	-0.44	-0.44	-0.49	-0.47	0.03
CL001-011-01	1	2.96	2.74	2.91	2.95	2.89	0.10
CL001-011-02	2	2.91	2.95	2.97	3.03	2.96	0.05
CL001-001-01	1	-0.74	-0.85	-0.53	-0.70	-0.70	0.13

10

20

【0077】

標準偏差の中央値は0.12(0.03~0.26の範囲)であった。

【0078】

不確かな結果の定義

不確かなANAおよび特異性成分に基づく不確かなインデックス結果

インデックススコア(ANAおよび抗体特異性成分)を構成する3成分のうち2成分はカットオフと関連することから(ANA成分は0、1、2の値を有し得る、抗体特異性成分は0または1の値を有し得る)、インデックスは、ANA(20単位、60単位)、または特異性成分を形成する各マーカー(抗MCV[70単位]、SS-B/La[10単位]、CENP[10単位]、Jo-1[10単位]、もしくはSc1-70[10単位])に関する医学的判定限界での分析誤差に基づいて陽性から陰性(またはこの逆)に変わる可能性がある。例えば、表16に示すように、10単位の判定限界でのSS-B/Laの2単位の差(9単位対11単位)に基づいて、インデックスが-1.0(ケース2、SS-B/La=9単位、特異性成分=0)から+1.5(ケース1、SS-B/La=11単位、特異性成分=1)に変化し得る。

30

【表 1 6】

表 1 6 インデックススコアにおけるマーカー量の影響

	ANA	特異性成分	CBCAPS成分	インデックス
ケース 1	ANA=100単位 ANA成分=2	MCV=5単位 SS-B=9単位 CENP=1単位; SCL-70=2単位; Jo-1=0 特異性成分=0	EC4d=15単位 BC4d=50単位 CBCAPS成分=4.814	=-5.2626 + 0.9877 x 2 + 4.814 + -2.4944 x 0 = + 1.5 示唆
ケース 2	ANA=100単位 ANA成分=2	MCV=5単位 SS-B=11単位 CENP=1単位; SCL-70=2単位; Jo-1=0 特異性成分=1	EC4d=15単位 BC4d=50単位 CBCAPS成分=4.814	=-5.2626 + 0.9877 x 2 + 4.814 + -2.4944 x 1 = -1.0 示唆なし

10

【 0 0 7 9 】

このことから、ANAおよび/または特異性成分を形成するマーカーがカットオフ値近辺である（従ってインデックスの陽性または陰性におそらく影響を及ぼすことができる）場合、インデックスについて不確かな結果を定義しなければならない。本発明者らは、ANA量が16から24単位の範囲（20単位のカットオフで20%CV）、または48から72単位の範囲（60単位のカットオフで20%CV）のときに不確かなANA成分を定義した。または、抗MCV量が56から84単位の範囲（70単位のカットオフで20%CV）のとき、またはSS-B/La、CENP、Scl-70、およびJo-1が8から12単位の範囲（10単位のカットオフで20%CV）のときに不確かな抗体特異性成分を定義した。

20

【 0 0 8 0 】

表 1 7 に示すように、陽性から陰性へのインデックス値の変動はまた、インデックス方程式中のCBCAPS成分に大きく依存する。インデックスに関する不確かな結果に基づく決定則を確立した。登録した対象794名中、計39名（4.9%）が不確かな結果を示した。

【表 1 7】

表 1 7 不確かさの定義に及ぼすCBCAPS成分の影響

	16 < ANA 単位	16 ≤ ANA ≤ 24	24 < ANA < 48	48 ≤ ANA ≤ 72	ANA > 72 単位
特異性成分 = 0	不確かでない	CBCAPS成分が4.2749～5.2626のとき、不確か	不確かでない	CBCAPS成分が3.2872～4.2749のとき、不確か	不確かでない
特異性成分 不確か	CBCAPS成分が5.2626～7.757のとき、不確か	CBCAPS成分が4.2749～7.757のとき、不確か	CBCAPS成分が4.2749～6.7693のとき、不確か	CBCAPS成分が3.2872～6.7693のとき、不確か	CBCAPS成分が3.2872～5.7816のとき、不確か
特異性成分 = 1	不確かでない	CBCAPS成分が6.7693～7.757のとき、不確か	不確かでない	CBCAPS成分が5.7816～6.7693のとき、不確か	不確かでない

30

40

【 0 0 8 1 】

方法

FACS測定

赤血球およびBリンパ球に沈着したC4d（EC4dおよびBC4d）を、バリデートされたFACSアッセイを用いて測定した。

【 0 0 8 2 】

EC4d：全血（50μL）をダルベッコリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、5分間遠心

50

分離 (800 g) して赤血球ペレットを1%正常ヤギ血清溶液 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) 500 μ l に浮遊させた。続いて10 μ l の赤血球浮遊液をヒトC4dに対する精製マウスモノクローナル抗体 (マウス抗ヒトC4d、Quidel Inc, San Diego) で染色、または非特異的マウス抗ヒトIgG1 抗体 (MOPC-12、BD Biosciences, San Jose, CA) を用いて4 で45分間染色した。ついでサンプルを前述のように洗浄した。赤血球ペレットをフルオレセインイソチオシアネート (FITC、Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) と共役体化したヤギ抗マウス抗体を含む溶液 (25 μ l) に4 (暗所) で45分間浮遊させた。染色、洗浄して、冷却した1%正常ヤギ血清溶液250 μ l に浮遊させた後、赤血球を細胞表面上に沈着したC4d検出のためにFACS分析した。

10

【0083】

BC4d量：塩化アンモニウムをベースとした試薬 (BD Pharm Lyse, BD Bioscience, San Jose, CA) および遠心分離 (800 gで5分間) を用いた全血 (700 μ l) から赤血球の溶解後、細胞ペレットを1%正常ヤギ血清溶液500 μ l に浮遊させて、前述のようにモノクローナルC4d抗体を用いて染色した (2~8 で45分間)。続いて、25 μ l の細胞浮遊液を前述のヒトC4dに対する精製マウスモノクローナル抗体または非特異的マウス抗ヒトIgG 抗体を用いて4 で45分間染色した。細胞表面C4d染色をヤギ抗マウスフルオレセインイソチオシアネート (FITC) 抗体を用いて検出した (2~8 で45分間、暗所)。R-フィコエリトリン (R-PE) と共役体化したヒトCD19 (CD19はB細胞分化および成熟のすべての段階で発現される95 kDaのI型膜貫通糖タンパク質と反応する) に対するモノクローナル抗体を使用して、Bリンパ球に特異的なC4d補体活性化由来フラグメントを検出した。

20

【0084】

すべてのFACS分析はベックマンコールターFC500サイトメーターおよびCXPSソフトウェア (Beckman Coulter, Brea CA) を使用した。アイソタイプバックブランドコントロールおよび各補体タンパク質 (C4d) の平均蛍光強度 (MFI) を得て、ついで特異的なMFI結果から非特異的なMFIを減じて正味のMFIを決定した。低、中、および高強度のEC4d量について日間 (5連続日) 変動係数の中央値を、リウマチ疾患を有する44名の患者の血液を用いて確立したところ、EC4dについて3.3~9.6%の範囲であった。BC4dでは、リウマチ疾患を有する患者34名における低、中、および高強度の日間変動係数は5.3~12.1%の範囲であった。すべてのFACS実験には、フローサイトメーターの適切な校正、補正、および直線性を確立するコントロールが含まれた。

30

【0085】

ANA、dsDNA、および抗MCVのELISA測定

ANA、抗dsDNA、および抗変異シトルリン化ビメンチン抗体 [抗MCV、抗シトルリン化ペプチド抗体] (16) は酵素結合イムノソルベントアッセイ (ELISA) を用いて測定した。使用したすべてのELISA法は、インビトロ診断で使用するために安全および有効なものとして米国食品医薬品局によって承認されている。ANAおよび抗dsDNAはINOVA Diagnostics (INOVA, San Diego, CA) から入手し、抗MCVはOrgentec Diagnostika (Germany) から入手した。すべての方法の日内および日間変動係数を、我々の臨床検査室で確立したところ、20%未満であった。すべてのELISA試験に、適切な陽性および陰性コントロールを含めた。

40

【0086】

CENP、Jo-1、La/SS-B、Ro/SS-A、SCL-70、スミスの蛍光酵素イムノアッセイ測定

50

血清または血漿におけるSS-A/Ro(60kDa、52kDa)、SS-B/La、セントロメアB(CENP)、Scl-70(抗トポイソメラーゼI)、Jo-1、およびスミス抗核IgG抗体の定性的測定を、Phadia 250装置(ThermoFisher, Uppsala, Sweden)でEliA IgG法を用いて実施した。各分析物について、製造業者によって推奨されるカットオフを使用した。分析の繰り返し精度および再現性は、我々の臨床検査室においてすべての分析物で20%未満であった。

【0087】

統計分析

統計分析をRソフトウェアのバージョン2.15.0を用いて実施した。受信者動作曲線を、各マーカー(単変数分析)に関して必要であれば用い、およびインデックス値の決定後にも、多変量ロジスティック回帰式のアウトプットとして使用した。性能の測定として、感度および特異性(1-偽陽性率)を計算した。報告された性能の統計値(感度、特異性)、ROC AUCはk分割交差検証の10回繰り返し(k=10)(報告結果は平均値)を用いて計算した。さらに性能特性を他の3つのバリデーション法(データ提示なし)によって計算したところ、すべてが報告した性能と非常に類似した結果であった。追加のバリデーションモデルは、一つ抜き交差検証、分割サンプルの平均検証(訓練用に3分の2、検証用に3分の1)、および疑似検証(再代入としても知られている)であった。適用できる場合、一連の検証は疾患による階層化によって得た((書籍)Clinical Prediction Models: A Practical Approach to Development, Validation and Updating. Ewout W. Steyerberg. 2009)。

【0088】

参考文献

- (1) Rahman A, Isenberg DA. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2008; 358(9):929-939.
- (2) Helmick CG, Felson DT, Lawrence RC, Gabriel S, Hirsch R, Kwoh CK et al. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part I. *Arthritis Rheum* 2008; 58(1):15-25.
- (3) Bastian HM, Roseman JM, McGwin G, Jr., Alarcon GS, Friedman AW, Fessler BJ et al. Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups. XII. Risk factors for lupus nephritis after diagnosis. *Lupus* 2002; 11(3):152-160.
- (4) Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25(11):1271-1277.
- (5) Smith EL, Shmerling RH. The American College of Rheumatology criteria for the classification of systemic lupus erythematosus: strengths, weaknesses, and opportunities for improvement. *Lupus* 1999; 8(8):586-595.
- (6) Egner W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. *J Clin Pathol* 2000; 53(6):424-432.
- (7) Manderson AP, Botto M, Walport MJ. The role of complement in the development of systemic lupus erythematosus. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:431-456.
- (8) Manzi S, Navratil JS, Ruffing MJ, Liu CC, Danchenko N, Nilson SE et al. Measurement of erythrocyte C4d and complement receptor 1 in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2004; 50(11):3596-3604.
- (9) Navratil JS, Manzi S, Kao AH, Krishnaswami S, Liu CC, Ruffing MJ et al. Platelet C4d is highly specific for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2006; 54(2):670-674.
- (10) Yang DH, Chang DM, Lai JH, Lin FH, Chen CH. Usefulness of erythrocyte-bound C4d as a biomarker to predict disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2009; 48(9):1083-1087.

(11) Liu CC, Kao AH, Hawkins DM, Manzi S, Sattar A, Wilson N et al. Lymphocyte-bound complement activation products as biomarkers for diagnosis of systemic lupus erythematosus. Clin Transl Sci 2009; 2(4):300-308.

(12) Kao AH, Navratil JS, Ruffing MJ, Liu cc, Hawkins D, Mc kinnon KM et al. Erythrocyte C3d and C4d for monitoring disease activity in systemic lupus erythematosus. Arthritis and Rheumatism 62[3], 837-844. 2010.

(13) Batal I, Liang K, Bastacky S, Kiss LP, McHale T, Wilson NL et al. Prospective assessment of C4d deposits on circulating cells and renal tissues in lupus nephritis: a pilot study. Lupus 21[1], 13-26. 2012.

(14) Kalunian KC, Chatham WW, Massarotti EM, Reyes-Thomas J, Harris C, Furie RA et al. Measurements of cell bound complement activation products enhance diagnostic performance in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2012

10

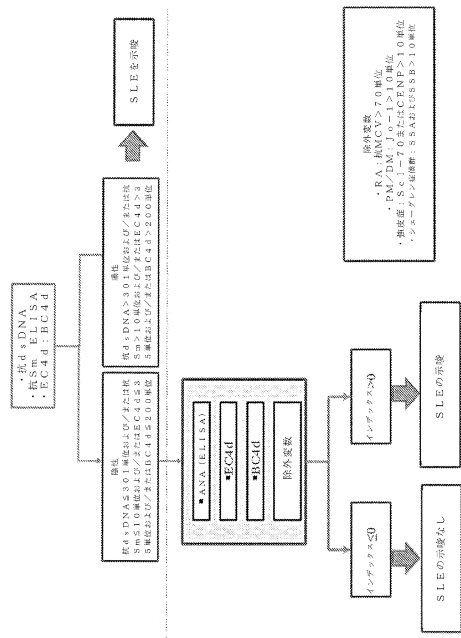
(15) Singh V, Mahoney JA, Petri M. Erythrocyte C4d and complement receptor 1 in systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 2008; 35(10):1989-1993.

(16) Bang H, Egerer K, Gauliard A, Luthke K, Rudolph PE, Fredenhagen G et al. Mutation and citrullination modifies vimentin to a novel autoantigen for rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2007; 56(8):2503-2511.

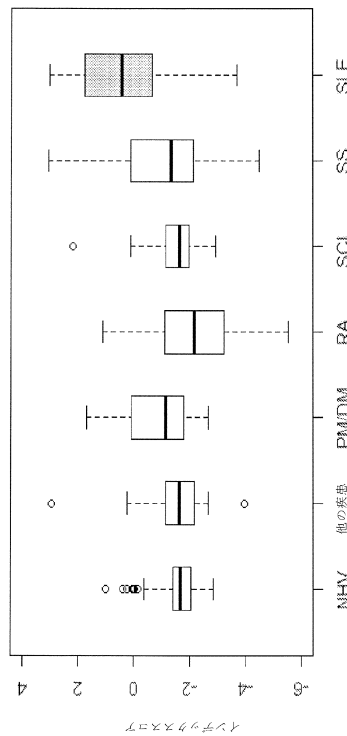
(17) Steyerberg E, Ewout W. Clinical prediction models: a practical approach to development, validation and updating. 2009. Springer-Verlag.

20

【 図 1 】



【 図 2 】



フロントページの続き

(72)発明者 ダーヴィユークス, ティエリー
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 92117, サンディエゴ, 3009 カミニート アレ
ーソ

(72)発明者 バーケン, デーレン
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 92081, ビスタ, 1261 リバティー ウェイ

審査官 海野 佳子

(56)参考文献 国際公開第2012/109592(WO, A1)

Kenneth C. Kalunian, W. Winn Chatham, Elena M. Massarotti, et al., Measurement of Cell
-Bound Complement Activation Products Enhances Diagnostic Performance in Systemic Lupu
s Erthematosus, Arthritis & Rheumatism, 米国, 2012年, vol. 64, no. 12, pp 4040-404
7

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS(STN)

专利名称(译)	治疗和诊断系统性红斑狼疮的方法		
公开(公告)号	JP6453299B2	公开(公告)日	2019-01-16
申请号	JP2016501804	申请日	2014-03-13
申请(专利权)人(译)	Eguzagen诊断公司		
当前申请(专利权)人(译)	Eguzagen诊断公司		
[标]发明人	ダーヴィユークステイエリー バーケンデーレン		
发明人	ダーヴィユークス, テイエリー バーケン, デーレン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/48 G01N33/564 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/48.Z G01N33/564.A G01N33/543.597		
代理人(译)	Iwahori明代		
优先权	61/792284 2013-03-15 US		
其他公开文献	JP2016516996A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

系统性红斑狼疮包括基于红细胞C4d (EC4d) 标记物, B细胞C4d (BC4d) 标记物, 抗核抗体 (ANA) 和任选排除标记物的相应量计算受试者的SLE风险评分。公开了用于诊断, 预后和治疗SLE的方法和试剂。【选择图】无

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特許公報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6453299号 (P6453299)
(45) 発行日 平成31年1月16日 (2019. 1. 16)	(24) 登録日 平成30年12月21日 (2018. 12. 21)	
(51) Int. Cl.	F I	
G O 1 N 33/53 (2006. 01)	G O 1 N 33/53	D
G O 1 N 33/48 (2006. 01)	G O 1 N 33/48	Z
G O 1 N 33/564 (2006. 01)	G O 1 N 33/564	A
G O 1 N 33/543 (2006. 01)	G O 1 N 33/543	5 9 7
請求項の数 15 (全 29 頁)		
(21) 出願番号 特願2016-501804 (P2016-501804)	(73) 特許権者 515242869	
(86) (22) 出願日 平成26年3月13日 (2014. 3. 13)	エグザゲン ダイアグノスティクス、イン	
(65) 公表番号 特表2016-516996 (P2016-516996A)	コーポレイテッド	
(43) 公表日 平成28年6月9日 (2016. 6. 9)	アメリカ合衆国、ニューメキシコ州 87	
(86) 国際出願番号 PCT/US2014/025264	106、アルバカーキ、スイート 209	
(87) 国際公開番号 W02014/151238	、801 ユニバーシティー ブルーハー	
(87) 国際公開日 平成26年9月25日 (2014. 9. 25)	ル エスイー	
審査請求日 平成29年1月23日 (2017. 1. 23)	(74) 代理人 100114775	
(31) 優先権主張番号 61/782, 284	弁理士 高岡 亮一	
(32) 優先日 平成25年3月15日 (2013. 3. 15)	(74) 代理人 100121511	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	弁理士 小田 直	
	(74) 代理人 100202751	
	弁理士 岩堀 明代	
	(74) 代理人 100191086	
	弁理士 高橋 香元	
	最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 全身性エリテマトーデスを治療および診断するための方法		