

(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2013-527437

(P2013-527437A)

(43) 公表日 平成25年6月27日(2013.6.27)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	2GO41
GO 1 N 33/564 (2006.01)	GO 1 N 33/564 B	4HO45
GO 1 N 30/88 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	
GO 1 N 27/62 (2006.01)	GO 1 N 30/88 J	
CO 7 K 16/18 (2006.01)	GO 1 N 27/62 V	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-504499 (P2013-504499)
 (86) (22) 出願日 平成23年4月7日 (2011.4.7)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年12月11日 (2012.12.11)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2011/059226
 (87) 国際公開番号 W02011/129382
 (87) 国際公開日 平成23年10月20日 (2011.10.20)
 (31) 優先権主張番号 61/325,027
 (32) 優先日 平成22年4月16日 (2010.4.16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 512264057
 アボットジャパン株式会社
 千葉県松戸市松飛台278
 (74) 代理人 110001173
 特許業務法人川口国際特許事務所
 (72) 発明者 吉村 徹
 千葉県松戸市松飛台278
 (72) 発明者 千葉 陵太郎
 千葉県松戸市松飛台278
 Fターム(参考) 2G041 FA12
 4H045 AA11 AA30 CA40 DA75 EA20
 EA50 FA71

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 関節リウマチを診断する方法および試薬

(57) 【要約】

対象からの試験サンプル中のCCCL8タンパク質濃度の測定を用いて関節リウマチ(RA)を診断する方法が開示される。RAの指標としてのCCCL8の試験は、臨床的評価、画像、またはリウマチ因子(RF)などの他のRAマーカーを含む、他のRA指標の試験と組み合わせ得る。CCCL8の試験は、RAを、他の疾患または状態から識別すること、RAの重症度を評価することを使用され得る。関連の診断用試薬、キット、医薬組成物、および関節リウマチを治療する治療剤候補物質を特定する方法もまた記載される。

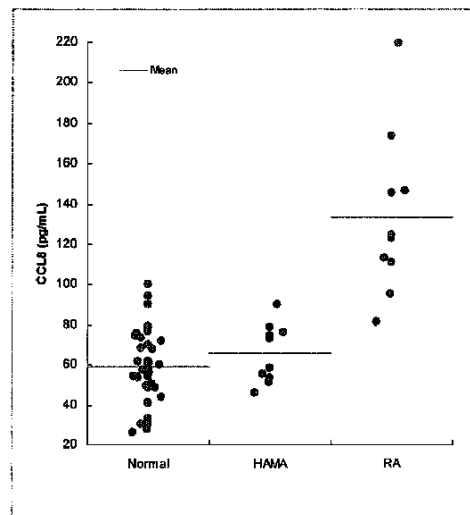


FIG. 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象から得た試験サンプル中の C C L 8 タンパク質の濃度を測定することを含む、対象における関節リウマチを診断する方法であって、試験サンプル中の C C L 8 タンパク質の濃度が、対象における関節リウマチの存在または非存在を指し示す前記方法。

【請求項 2】

対象に関節リウマチの臨床指標が存在する前に、関節リウマチの存在または非存在が決定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

試験サンプル中の C C L 8 タンパク質の濃度が、抗 C C L 8 抗体を使用して測定される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

10

【請求項 4】

試験サンプルが、血漿または血清のサンプルである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 5】

試験サンプル中の 1 種以上の関節リウマチマーカーの濃度を測定することをさらに含み、前記マーカーが、C R P、a - C C P、C A R F I g G、M M P - 3 およびリウマチ因子からなる群から選択され、試験サンプル中の 1 種以上の前記マーカーの濃度が、対象における関節リウマチの存在または非存在をさらに指し示す、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 6】

試験サンプル中の C C L 8 タンパク質の濃度が、質量分析法、高速液体クロマトグラフィーおよび二次元電気泳動法からなる群から選択される方法を使用して測定される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

20

【請求項 7】

対象から得た試験サンプル中の上昇した C C L 8 タンパク質濃度の存在または非存在を決定することを含む、対象における関節リウマチの重症度を決定する方法であって、上昇した C C L 8 タンパク質濃度の存在が、対象の関節リウマチが重度であることを指し示す前記方法。

【請求項 8】

試験サンプル中の C C L 8 タンパク質の濃度が、抗 C C L 8 抗体を使用して測定される、請求項 7 に記載の方法。

30

【請求項 9】

試験サンプルが、血漿または血清のサンプルである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

試験サンプル中の 1 種以上の関節リウマチマーカーの濃度を測定することをさらに含み、前記マーカーが、C R P、a - C C P、C A R F I g G、M M P - 3 およびリウマチ因子からなる群から選択され、試験サンプル中の 1 種以上の前記マーカーの濃度が、対象における関節リウマチの存在または非存在をさらに指し示す、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 11】

試験サンプル中の C C L 8 タンパク質の濃度が、質量分析法、高速液体クロマトグラフィーおよび二次元電気泳動法からなる群から選択される方法を使用して測定される、請求項 7 に記載の方法。

40

【請求項 12】

抗 C C L 8 抗体またはこの断片、および C R P、a - C C P、C A R F I g G、M M P - 3 およびリウマチ因子からなる群から選択される少なくとも 1 種の関節リウマチマーカーに対する抗体を含む、関節リウマチの診断用試薬。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の診断用試薬を含むキット。

【請求項 14】

関節リウマチを治療するための治療剤候補物質を特定する方法であって、

50

- a 試験物質を、関節リウマチの動物モデルである動物対象に投与する工程と、
- b 動物対象から得た試験サンプル中の C C L 8 タンパク質の濃度を測定する工程と、
- c 前記試験サンプル中の前記 C C L 8 タンパク質の濃度が、前記試験物質を投与されていない比較用の動物対象からの試験サンプル中の C C L 8 タンパク質の濃度よりも低い場合に、前記試験物質を、関節リウマチを治療する治療剤候補物質として選択する工程とを含む前記方法。

【請求項 15】

対象における関節リウマチの診断のための診断用試薬としての、抗 C C L 8 抗体またはこの断片の使用。

【請求項 16】

対象における関節リウマチの治療のための医薬組成物の有効成分としての、抗 C C L 8 抗体またはこの断片の使用。

【請求項 17】

対象における関節リウマチの診断のための試薬の製造における、抗 C C L 8 抗体またはこの断片の使用。

【請求項 18】

対象における関節リウマチの治療のための医薬組成物の製造における、抗 C C L 8 抗体またはこの断片の使用。

【請求項 19】

対象における関節リウマチの治療の効果をモニタリングする方法であって、

- a 治療前に対象から得た第 1 の試験サンプル中の第 1 の C C L 8 タンパク質濃度を測定する工程と、
- b 治療開始後に対象から得た第 2 の試験サンプル中の第 2 の C C L 8 タンパク質濃度を測定する工程と、
- c 第 1 の C C L 8 タンパク質濃度と第 2 の C C L 8 タンパク質濃度とを比較する工程とを含み、第 1 の C C L 8 タンパク質濃度より低い第 2 の C C L 8 タンパク質濃度が、対象における治療の治療効果を指し示す前記方法。

【請求項 20】

第 1 および第 2 の試験サンプル中の C C L 8 タンパク質濃度が、抗 C C L 8 抗体を使用して測定される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

試験サンプルが、血漿または血清のサンプルである、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 22】

試験サンプル中の C C L 8 タンパク質の濃度が、質量分析法、高速液体クロマトグラフィーおよび二次元電気泳動法からなる群から選択される方法を使用して測定される、請求項 19 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、疾患のバイオマーカーに関し、より詳細には関節リウマチの新規のバイオマーカー、このマーカーの使用を伴う診断法を含む関連の方法、およびこのバイオマーカーを含む試薬および治療用組成物にも関する。

【背景技術】

【0002】

関節リウマチ (R A) は、世界人口の約 1 % が罹患している重大な慢性自己免疫疾患である。女性は男性より 3 倍多く罹患する。 R A は、最初に関節を攻撃し、炎症性滑膜炎が関節軟骨を破壊して強直を起こすことが多い。 R A は、肺、心膜、胸膜および強膜を含む他の組織をびまん性炎症に巻き込む場合がある。 R A は、損傷も大きく痛みもあり、可動性および全身機能の実質的な消失へと導くことが多い。

【発明の概要】

10

20

30

40

50

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

R A の診断は一般に、初期には臨床徴候および症状に基づくが、R A の臨床指標が他の複数の一般的な疾患および状態と同じであるため、臨床的評価は通常、X線所見により、およびリウマチ因子(R F)などの公知のマーカーについての血液検査により補完される。このため、臨床徴候および症状の観察からR A が疑われるとき、R F の存在についての検査などの血液検査は、一般に診断の確認を補助するのに使用されている。しかしながら、公知のマーカーは必ずしも、非常に高いR A への感受性およびR A に対する特異性でR A を検出するとは限らない。例えば特にR A 1年目の早期の段階の間は、患者の約15 - 20%はR F に抗体陽転(seroconvert)せず、そのためR A 1年目の患者へのR F 検査は、偽陰性の結果を出す。その上、R F は、R A に対して100%特異的ではなく、健常者の約10%の中にも存在し、特にシェーグレン症候群だけではなく、慢性肝炎、任意の慢性ウイルス感染症、白血病、皮膚筋炎、感染性単核症、全身性硬化症、全身性エリトマトーデスなどの他の炎症性疾患または状態を有する人々の中にも存在する。こうした人々についてのR F 検査は、相当な数の偽陽性結果を出す。血清学的R A マーカーは、抗C C P (環状シトルリン化ペプチド)検査および抗M C V (変異したシトルリン化ビメンチンに対する抗体)アッセイにおいて検査される、抗環状シトルリン化タンパク質抗体(A C P A)を含んでおり、これもまた、R A に関して、相当な数の偽陽性および/または偽陽性結果を生じる。R A の陽性診断がこの疾患の経過中できるだけ早く確認され得るために、R A への感受性および特異性が改善されたR A マーカーが求められる。

10

20

【課題を解決するための手段】

【0004】

本開示は、対象からの血液サンプル中のC C L - 8 (ケモカインc - cモチーフリガンド8)タンパク質の濃度が、高レベルの感受性および特異性を有する、対象における関節リウマチの存在の陽性指標であることを開示する。その上、C C L 8の血中濃度は、対象のこの疾患の重症度と正の相関関連があり、例えば、上昇したC C L 8の血中濃度は、関節リウマチの重症症例を指し示すほどである。

【0005】

したがって、一態様において、本開示は、対象において関節リウマチを診断する方法を提供し、対象から得た試験サンプル中のC C L 8タンパク質の濃度を測定することを含み、この試験サンプル中のC C L 8タンパク質の濃度が対象における関節リウマチの存在または非存在を指し示す。関節リウマチの存在または非存在は、関節リウマチの臨床指標が対象に存在する以前に決定され得る。試験サンプル中のC C L 8タンパク質の濃度は、例えば抗C C L 8抗体を用いて測定され得る。試験サンプルは、血漿または血清のサンプルを含む血液サンプルとすることができる。方法は、サンプル中の1種以上の付加的な関節リウマチマーカーの濃度を測定することをさらに含むことができ、試験サンプル中の付加的な各マーカーの濃度が、対象における関節リウマチの存在または非存在をさらに指し示す。こうしたマーカーは、例えばC R P、a - C C P、C A R F I g G、M M P - 3およびリウマチ因子を含む。

30

【0006】

もう1つの態様において、本開示は、対象の関節リウマチの重症度を決定する方法を提供し、対象から得た試験サンプル中の、上昇したC C L 8タンパク質濃度の存在または非存在を決定することを含み、上昇したC C L 8タンパク質濃度の存在は、その対象の関節リウマチが重度であることを指し示す。方法は、1種以上の関節リウマチマーカーの濃度を測定することをさらに含み、このマーカーは、C R P、a - C C P、C A R F I g G、M M P - 3およびリウマチ因子からなる群から選択され、試験サンプル中の1種以上のマーカーの濃度が、対象における関節リウマチの存在または非存在を指し示す。

40

【0007】

もう1つの態様において、本開示は、抗C C L 8抗体またはこの断片およびC R P、a - C C P、C A R F I g G、M M P - 3およびリウマチ因子からなる群から選択される

50

少なくとも1種の関節リウマチマーカーに対する抗体を含む関節リウマチ診断試薬を提供する。診断用試薬は、診断キットに含めることができる。

【0008】

もう一つの態様において、本開示は、関節リウマチを治療するための治療剤候補物質を特定する方法を提供し、a)試験物質を、関節リウマチの動物モデルである動物対象に投与する工程、b)動物対象から得た試験サンプル中のCC L 8タンパク質の濃度を測定する工程、およびc)この試験サンプル中のCC L 8タンパク質の濃度が、この試験物質を投与されていない比較用の動物対象からの試験サンプル中のCC L 8タンパク質の濃度よりも低い場合に、この試験物質を関節リウマチ治療の治療剤候補物質として選択する工程を含む。

10

【0009】

もう一つの態様において、本開示は、対象における関節リウマチの診断のための診断試薬としての、抗CC L 8抗体またはこの断片の使用を包含する。

【0010】

もう一つの態様において、本開示は、対象における関節リウマチの治療のための医薬組成物の有効成分としての、抗CC L 8抗体またはこの断片の使用を包含する。

【0011】

もう一つの態様において、本開示は、対象における関節リウマチの診断のための試薬の製造における、抗CC L 8抗体またはこの断片の使用を包含する。

【0012】

もう一つの態様において、本開示は、対象における関節リウマチの治療のための医薬組成物の製造における、抗CC L 8抗体またはこの断片の使用を包含する。

20

【0013】

もう一つの態様において、本開示は、対象における関節リウマチの治療の効果をモニタリングする方法を提供し、a)治療前に対象から得た第1の試験サンプル中の第1のCC L 8タンパク質濃度を測定する工程、b)治療開始後に対象から得た第2の試験サンプル中の第2のCC L 8タンパク質濃度を測定する工程、およびc)第1のCC L 8タンパク質濃度と、第2のCC L 8タンパク質濃度とを比較する工程を含み、第1のCC L 8タンパク質濃度よりも低い第2のCC L 8タンパク質濃度が、対象における治療の治療効果を指し示す。

30

【0014】

上記いずれの方法においても、試験サンプル中のCC L 8タンパク質の濃度は、例えば抗CC L 8抗体を使用して測定され得る。上記いずれの方法においても、試験サンプル(複数可)は、血漿または血清のサンプルを含む血液サンプルとすることができる。上記いずれの方法においても、CC L 8タンパク質の濃度は、質量分析法、高速液体クロマトグラフィーおよび二次元電気泳動法からなる群から選択される方法を使用して測定され得る。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】正常個体、ヒト抗マウス抗体反応(HAMA)を示す個体、および関節リウマチ(RA)診断陽性の個体からの血液の血清サンプルにおいて測定したCC L 8の濃度の散布図である。

40

【図2】RA被験者において認められた上昇したCC L 8濃度の真陽性率対、正常およびHAMA被験者において認められた上昇したCC L 8濃度の偽陽性率の、受信者動作特性(ROC)プロットである。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本開示は、CC L 8(ケモカインc-cモチーフフリガンド8)の血中濃度が、対象に関節リウマチ(RA)が存在するという陽性指標であり、偽陽性率が低いという、驚くべき知見を記載する。CC L 8タンパク質は、造血幹細胞移植後の移植片対宿主病のマーカー

50

として認められてはいるものの (Blood 111, 4403 - 4412 頁 (2008)、WO 2009001545 (A1))、CCl8 が RA に対して何らかの関係を担うことは今まで開示されておらず、または実証されてもいない。このため、例えば本開示は、対象で RA の臨床徴候が現れる前であっても、既定のカットオフを上回る対象の CCl8 タンパク質の血中濃度が RA 存在診断検査の基準として使用され得ることを提供する。さらに、対象の CCl8 タンパク質の血中濃度は、対象の RA 疾患の重症度と正に相関しており、上昇した CCl8 血中濃度が、対象の RA が重症例であることを指し示す。試験サンプル中の CCl8 の濃度を測定するのに使用され得る方法は、例えばイムノアッセイ法であるが、他の方法も使用され得る。関連の方法、試薬および組成物も記載される。

【0017】

A. 定義

この章で使用される章の表題、および本明細書における全開示は、限定的であることを意図していない。

【0018】

本明細書で使用するとき、単数形の「a」、「an」および「the」は、文脈上明らかに逆の記載がない限り、複数形の表現を含む。本明細書における数字の範囲の詳述において、同精度で間に各数字が入ることが明らかに意図される。例えば 6 - 9 という範囲について、数字の 7 および 8 は、6 および 9 に加えて意図されており、6.0 - 7.0 という範囲について、数字の 6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9 および 7.0 が明らかに意図される。

【0019】

a) 抗体

本明細書で使用するとき、「抗体」という用語は、免疫グロブリン遺伝子、または免疫グロブリン遺伝子の断片により実質的にコードされた 1 種以上のポリペプチドからなるタンパク質を表し、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体およびこれらの断片、ならびに免疫グロブリン遺伝子配列から操作された分子を包含する。認められている免疫グロブリン遺伝子は、 α 、 β 、 γ 、 δ および μ の定常部の遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子を含む。軽鎖は、 κ または λ のいずれかとして分類される。重鎖は、 μ 、 δ 、 γ または α として分類され、免疫グロブリンの綱をそれぞれ Ig G、Ig M、Ig A、Ig D および Ig E と規定する。

【0020】

b) 検出可能な標識

本明細書で使用するとき、「検出可能な標識」という用語は、結合している分子 (単数) または分子 (複数) の状態の変化である、光学的、電気的または他の物理的な指標を介して測定可能な信号を生じる任意の部分を表す。こうした物理的指標は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電磁氣的、放射化学的および化学的な手段を包含し、蛍光発光、化学蛍光発光、化学ルミネセンスなどであるがこれらに限定されない。好ましい検出可能な標識は、本明細書の下 B 章において述べた式 I の構造を有するアクリジニウム - 9 - カルボキシイミド、また同様に本明細書の下 B 章において述べた式 II の構造を有するアクリジニウム - 9 - カルボキシレートアリアルエステルなどのアクリジニウム化合物を含む。

【0021】

c) マーカー

本明細書において互換的に使用される用語「マーカー」または「バイオマーカー」とは、対象から得た試験サンプルを分析する標的として使用される任意の分子を表し、タンパク質またはポリペプチド自体を包含し、試験サンプル中に存在するタンパク質またはポリペプチドに対する抗体も包含する。マーカーとして使用されるタンパク質またはポリペプチドは、任意の、これらの変異体および断片、特に免疫学的に検出可能な断片を含む。例えば、マーカーポリペプチドの変異体は、同じ遺伝子によりコードされるが、選択的スプライシングなどの選択的処理および / または翻訳後の改変 (例えばグリコシル化、アシル

10

20

30

40

50

化および/またはリン酸化)の差の結果として、等電点もしくは分子量または双方において異なり得ることが理解される。細胞タンパク質は、炎症などの疾患過程の結果として損傷され得、断片化されることがあり、このため、本開示によるマーカーとして使用されるタンパク質またはポリペプチドはこれらの断片を含むことがさらに理解される。さらに、特定のマーカーは、不活性形態において合成され得、続いてタンパク質分解により活性形態に転換されることが認められる。タンパク質またはこれらの断片は、錯体の部分としても生じ得る。本開示によるマーカーとして使用されるタンパク質またはポリペプチドは、こうした錯体も含む。

【0022】

d) 対象

本明細書で使用するとき、「対象」および「患者」という用語は、その対象が任意の形態の治療を受けているか、または今は試験段階であるかの別なく、互換的に使用される。本明細書で使用するとき、「対象(単数)」および「対象(複数)」という用語は、哺乳類(例えばウシ、ブタ、ラクダ、リヤマ、ウマ、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ラットおよびマウス、非ヒト霊長類(例えばカニクイザル、チンパンジーなどのサル)およびヒト)を含むがこれらに限定されない任意の脊椎動物を表す。好ましくは、対象はヒトである。

【0023】

e) 試験サンプル

本明細書で使用するとき、「試験サンプル」という用語は、一般に、興味のある分析対象物含有しているかどうか試験される、および/または含有していると疑われている生体物質を表す。生体物質は、任意の生物源から抽出され得るが、興味のある分析対象物質含有しているような生体液であることが好ましい。生体物質の例は、ふん便、全血、血清、血漿、赤血球、血小板、間質液、唾液、眼球液、脳脊髄液、汗、尿、腹水、粘液、鼻汁、痰、滑液、膿液、月経、羊水、精液、汚物などを含むがこれらに限定されない。好ましくは、試験サンプルは、血清または血漿のサンプルである。

【0024】

試験サンプルは、生体源から得たまま直接使用してもよく、またはサンプルの性質を変更するために前処理した後使用してもよい。例えば、こうした前処理は、血液から血漿を調製すること、粘性流体を希釈することなどを含むことができる。前処理の方法は、濾過、沈殿、希釈、蒸留、混合、濃縮、干渉成分の不活性化、試薬の添加、溶解などを含むこともできる。このような前処理方法が試験サンプルについて用いられる場合、こうした前処理法は、興味のある分析対象物質が、非処理の試験サンプル(例えば、即ち、任意のこれらの前処理法(複数可)の対象外である試験サンプル)中の濃度に比例した濃度で試験サンプル中に残るようにする。

【0025】

B. 方法

本開示による方法は、対象において関節リウマチを診断する方法を含み、対象から得た試験サンプル中のCCP8タンパク質の濃度が測定することによる。試験サンプルは、例えば針刺しなどの一般に使用される任意の静脈切開法を使用して患者から得る、全血、血清または血漿のサンプルであり、検査後に廃棄される。CCP8タンパク質によって示されるRAへの高レベルの特異性および感受性は、RA診断への単独使用が支持されるが、この診断法は一般に、少なくともその対象の臨床的評価、および可能であればX線と共に使用、あるいは、CRP、a-CCP、CARF IgG、MMP-3およびリウマチ因子(RF)を含む他のRAマーカーの存在のためのインビトロ検査と共に使用されることが理解される。本明細書に記載の方法は、関節リウマチの任意の臨床指標が対象中に存在することが指摘される前に、RAの存在または非存在を決定するのに使用され得る。しかしながら、100%の特異性および100%の感受性を有するRA診断用の生化学的マーカーは無い。したがって、各生化学的マーカーは、RAが対象中に存在するかないかを一定レベルの可能性で決定するのに使用され得ることが理解される。このため、本開示に

10

20

30

40

50

よる方法は、R Aの存在または非存在の決定を補助する付加的なツールを提供する。この方法は例えば、変形性関節症などの、同種の臨床徴候および症状を伴う他の疾患または状態からR Aを識別するのに特に有用であり得る。

【0026】

一般に認められたR Aの臨床指標は、米国リウマチ学会により、R A分類基準改定版として明記されたものを含む(Arnett, F. C.ら、Arthritis Rheum 31(1988)315-324頁、「ARA criteria」)。ARA基準は、患者が少なくとも次の基準の4項目を満たしているときにR Aであることを提供し、基準1-4は、少なくとも6週間存在しなければならない。1)少なくとも1時間の朝の硬直、2)3つ以上の関節領域の炎症、3)手関節の炎症、4)対称性関節炎、5)リウマトイド結節、6)血清リウマトイド因子(「RF」)、および7)X線所見の変化。このARA基準は、およそ90%の感受性および特異性を明示した。本開示によるこの診断法は、したがって、内科医がR Aの確実な診断、例えば患者におけるR Aの存在または非存在を確立するのを援助する。

10

【0027】

CCl8タンパク質の濃度は、試験サンプル中のタンパク質またはペプチドの分析対象物質の濃度を決定する、公知の任意の特異的結合法に従って測定され得、当技術分野で周知である任意のイムノアッセイ法を含む。イムノアッセイは、興味ある分析対象物質に特異的に結合するパートナーとして、例えばCCl8タンパク質、即ち抗CCl8抗体を含む、抗体の使用を伴う。移植片対宿主病(GVHD)のマーカーとしてのCCl8タンパク質のイムノアッセイは、例えばT. HorieおよびY. Kokaï、Blood 111、4403-4412頁、(2008)、WO2009001545(A1)および2008年6月23日に出版された欧州特許出願公開第20088764208号に記載されており、これらの開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。適当なイムノアッセイ法は、広範囲の任意の構成で実施され得る。イムノアッセイに関する総説は、METHODS IN CELL BIOLOGY VOLUME 37「ANTIBODIES IN CELL BIOLOGY」、Asai編、Academic Press, Inc.、ニューヨーク(1933)、およびBASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY 7版、StitesおよびTerr編(1991)で取得でき、これはその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

20

30

【0028】

この方法は、CCl8タンパク質濃度を、R Aの存在または非存在に相関させることを含み、任意のいくつかの異なる方法において実行可能である。例えば、基準集団、一般には正常集団、即ちR Aの診断を有していない人の集団が選ばれ、基準集団からの有用な統計的特性を決定し、使用することができる。例えば、CCl8タンパク質濃度に対する正常値の平均、範囲および標準偏差が、基準集団において確立される。正常値の平均、範囲および標準偏差は、使用される基準集団に部分的に依存し、用いられる具体的なアッセイ技法およびアッセイを実施するときに使用する標準化にも部分的に依存する。平均、範囲および標準偏差は、閾値または「カットオフ」の濃度として、所定のCCl8タンパク質濃度を確立するのに使用され得、所定値を上回るとは、対象にR Aが存在することを指し示し、所定値を下回るとは対象にR Aが存在しないことを指し示す。例えば、カットオフ値は、(正常群から得られた)平均値+2標準偏差となり得る。アッセイが異なれば、導かれるカットオフ値も異なることが理解される。

40

【0029】

本明細書に記載の任意の方法において、試験サンプル中のCCl8タンパク質濃度は、質量分析法、高速液体クロマトグラフィーおよび二次元電気泳動法を含む多様な技術をさらに用いて測定され得る。

【0030】

本明細書に記載の任意の方法は、C反応性タンパク質(CRP)、a-CCP, CARF IgG、マトリックスメタロプロテアーゼ1(MMP-1)、マトリックスメタロプ

50

ロテアーゼ3 (MMP-3)、血清アミロイドA (SAA)、リウマチ因子 (RF)、S100、オステオポンチン、ヒアルロン酸 (HA)、sCD14、血管形成マーカー、および骨、軟骨または関節滑膜の代謝の生成物などであるがこれらに限定されない1種以上の付加的な、公知またはこれまで記載されていないRAマーカーの測定値と、有利にも組み合わせることができる。このため、CCl8タンパク質および1種以上の付加的なマーカー、またはこれらの特異的結合パートナーは、RAマーカーパネル中で組み合わせられる。RAマーカーの付加的な各陽性試験は、陽性試験結果についてより高い信頼度をもたらし得ることが理解される。このため、例えば、対象での上昇したRF濃度、即ち所定のRFカットオフを上回るRF濃度は、所定のCCl8カットオフを上回る対象中のCCl8タンパク質濃度との組合せで、この対象へのRA陽性診断において、マーカー濃度単独のうち的一方の場合よりも一層高い信頼度をもたらし得る。このため、この方法は、サンプル中でCCl8タンパク質および少なくとも1種の付加的なRAマーカーの濃度を測定することにより、健常者の対照および/または骨関節炎などの他の状態に罹っている患者に対するRA診断の精度も改善し、CCl8タンパク質または他の任意の1種のRAマーカー単独に基づく識別に比べて、より多くの患者がRAに罹っていると正しく特定される。少なくともCCl8タンパク質および少なくとも1種の付加的なRAマーカーを含むRAマーカーパネルは、対象のRAの重症度を評価するのにも使用され得る。

10

20

30

40

50

【0031】

本明細書において上記したように、CCl8タンパク質および1種以上の付加的なRAマーカーは、RAマーカーパネル、即ちRA評価を改善するために組み合わせ使用される2種以上のマーカーの部分とすることができる。任意の数のマーカーがRAマーカーパネルにおいて使用され得るが、有用なマーカーパネルは、例えば20種以下のマーカー、15種以下のマーカー、10種以下のマーカーまたは8種以下のマーカーを含む。典型的なパネルは、合計で3種、4種、5種または6種のマーカーを含む。

【0032】

任意の1種のマーカーの感受性および特異性を判定するのに便利な方法は、受信者運用特性 (ROC) 分析法である。ROC分析法の一例が、下の実施例2において提供される。ROCプロットから生成された曲線下面積 (AUC) は、有用な尺度である。AUC値は、異なる2グループを完全に区別する分類指標を指し示す1.0から、2グループ間の区別を提供できない分類指標を指し示す0.5までの範囲にまで及ぶ。1.0に近いAUC値は、したがって、極めて強力な分類指標を指し示す。RAマーカーと言われているある1種のマーカーの診断精度は、RAではないと分かっている患者を対照にして、RAを有する患者に対するROC曲線をプロットすることにより決定され得る。こうしたプロットから導き出された0.65超のAUC値を有するマーカーが、RAマーカーである。

【0033】

本開示は、対象の関節リウマチの重症度を決定する方法も包含し、対象から得た試験サンプル中の上昇したCCl8タンパク質濃度の存在または非存在を決定することを含み、上昇したCCl8タンパク質濃度の存在は、対象の関節リウマチが重度であることを指し示す。上昇した濃度は、例えば、本明細書に前記したように確立された既定の閾値、即ちカットオフ値を上回る任意の濃度であってもよいが、重度な疾患については、例えば臨床の指標または他のRAマーカーによって判定された重度のRA疾患の存在により特徴づけられる基準集団に基づく。例えば、各対象の、RA疾患の重症度と相関する疾患スコアまたは指数を決定し、次いで、所定のカットオフを上回る重症度スコアまたは指数を有する個体の集団を使用して、重度のRA疾患を識別するためのCCl8カットオフを確立することができる。

【0034】

本開示は、RAを治療するための治療剤候補物質を特定する方法も包含する。例えば、ある試験物質は、RAの動物モデルである動物対象に投与され得る。ヒトとの関連について予測性の記録のある関節リウマチ (RA) の動物モデルは、ラットにおけるアジュバント誘発関節炎 (AIA)、ラットおよびマウスにおけるコラーゲン誘発関節炎 (CIA)

(例えばラットアジュバント関節炎、ラットII型コラーゲン関節炎、マウスII型コラーゲン関節炎)、およびいくつかの種における抗原誘発関節炎を含む。これらの型において活性であることが知られている治療剤は、例えばコルチコステロイド、メトトレキサート、非ステロイド性抗炎症薬、シクロスポリンA、レフルノミドインターロイキン-1レセプター拮抗薬(IL-1ra)および可溶性TNFレセプターを含む。動物対象に治療剤を投与した後、サンプル、例えば血液、血清または血漿サンプルをその動物から得て、試験サンプル中のCCl8タンパク質の濃度を測定する。この試験サンプル中のCCl8タンパク質濃度が、この試験物質を投与されなかった比較用の動物対象からの試験サンプル中のCCl8タンパク質濃度よりも低い場合に、この試験物質は、RAを治療するための治療剤候補物質として特定または選択される。

10

【0035】

もう1つの態様において、本開示は、対象における任意のRA治療の効果をモニタリングする方法を提供する。RA治療は、薬剤、物理的療法および外科手術を含む。方法は、こうした任意の治療の効果を評価するために使用され得るが、薬剤、即ちRA治療用として知られている医薬組成物、およびこれまでRA治療用としての記載がない医薬組成物の有効性を決定することを第一に意図される。こうした医薬組成物は、イブプロフェンおよびナプロキセンなどの店頭薬の非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)、ならびにセレブレックス(Celebrex)、バイオックス(Vioxx)を含むCOX-2阻害薬などの処方箋により購入できる一層強力なNSAIDを含むNSAID; プレドニゾンおよびメチルプレドニゾンなどのコルチコステロイドを含むステロイド; メトトレキサート、レフルノミド、ヒドロキシクロロキン、スルファサラジンおよびミノサイクリンを含むがこれらに限定されない疾患修飾性抗リウマチ薬(DMARD); アザチオプリン、シクロスポリンおよびシクロホスファミドを含むがこれらに限定されない免疫抑制薬; エタネルセプト、インフリキシマブおよびアダリムマブを含むがこれらに限定されないTNF-阻害薬; ならびにアナキンラ(キネレット(Kineret))、アバタセプト(オレンシア(Orencia))およびリツキシマブ(リツキサン(Rituxan))を含むがこれらに限定されない他の医薬組成物を含むが、これらに限定されない。任意の医薬組成物の投与および/または他の治療の前に、第1のCCl8タンパク質濃度が、治療前に対象から得た第1の試験サンプルから決定される。第2のCCl8タンパク質濃度が、治療開始後、例えば一定の日、週間、月の後に対象から得た第2の試験サンプルにおいて測定され、第1のCCl8タンパク質濃度と第2のCCl8濃度とが比較される。第2のCCl8タンパク質濃度が第1のCCl8タンパク質濃度よりも低い場合、それは、この治療が対象において治療効果を有したことを指し示す。

20

30

【0036】

本明細書で開示の方法によるイムノアッセイにおいてCCl8タンパク質および他のRAマーカーを検出するのに使用される、任意の抗CCl8抗体、および他の任意のRAマーカーに対する任意の抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、親和性成熟抗体または抗体断片であり得る。

【0037】

モノクローナル抗体が分析対象物質/抗原に極めて特異的である一方、ポリクローナル抗体は、分析対象物質/抗原をできるだけ多く固定する捕捉(第1)抗体として使用されることが好ましい。分析対象物質/抗原への結合特異性が本来高いモノクローナル抗体はそこで、検出(第2)抗体として使用されることが好ましい。いずれの場合も、捕捉抗体および検出抗体は、検出抗体により認識されるエピトープを伴った捕捉抗体による妨害または阻害を避けるために、分析対象物質上の2種類の非オーバーラッピングエピトープを認識すると好ましい。捕捉抗体および検出抗体は、分析対象物質上の異なるエピトープへ、一方が他方の結合を阻害することなく、同時に結合できることが好ましい。

40

【0038】

ポリクローナル抗体は、免疫原を、適当な非ヒト哺乳類(例えばマウスまたはウサギ)中へ注射すること(例えば皮下注射または筋肉内注射)によって生じる。一般に、免疫原

50

は、標的抗原に対して相対的に高い親和性を有する、力価の高い抗体の産出を誘発するは
ずである。

【0039】

所望であれば、抗原は、当技術分野で周知の接合技術により、担体タンパク質へ接合さ
れ得る。一般に使用される担体は、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、サイ
ログロブリン、ウシ血清アルブミン(BSA)および破傷風トキソイドを含む。接合体は
、次いで、動物を免役化するのに使用される。

【0040】

抗体は、次いで、動物から採取した血液サンプルから得る。ポリクローナル抗体を産出
するのに使用される技術は、論文中に広範に記載されている(例えばLangoneら編
、「Methods of Enzymology, Production of Antiserum With Small Doses of Immunogen: Mu
ltiple Intradermal Injections」、Acad. Press、(1981)を参照されたい。)動物により産生されたポリクローナル抗体は、例
えば、標的抗原が結合している基質に結合することにより、および標的抗原が結合してい
る基質からの溶出により、さらに精製される。ポリクローナル抗体ならびにモノクロー
ナル抗体の精製および/または濃縮の、免疫学の技術分野で一般的な多様な技法は、当業者
であれば知ることになる(例えばColiganら、(1991)Unit 9「Current Protocols In Immunology」、Wiley Int
erscienceを参照されたい。)

10

20

【0041】

多くの用途にとって、モノクローナル抗体(mAb)が好ましい。mAbを分泌するハ
イブリドマの産生に使用される一般的な方法は、周知である(KohlerおよびMilstein、(1975)Nature、256:495頁)。手短に言えば、ケーラ
ーおよびミルシュタインによって記載されているように、この技術は、メラノーマ、奇形
腫もしくは子宮頸がん、神経膠腫または肺がん(サンプルは外科検体から得た)の5人の
別々のがん患者の、局所流入領域リンパ節からリンパ球を単離する工程と、その細胞をプ
ールする工程と、その細胞をSHFP-1と融合させる工程とを伴った。ハイブリドマ
を、がん細胞株に結合する抗体の産生についてスクリーニングした。mAb間での特異性
の確認は、興味あるmAbの素反応パターンを決定する常套のスクリーニング技術(酵素
結合免疫吸着検定法、即ち「ELISA」など)を用いて達成され得る。

30

【0042】

本発明で使用するとき、「抗体」という用語は、抗原結合抗体断片、例えば単鎖の抗体
(scFvまたは他の抗体)を包含し、これはファージディスプレイ技術を使用して産生
/スクリーニングされ得る。細菌(バクテリオファージまたはファージ)に感染させるウ
イルスの表面上に抗体断片を発現する能力は、例えば 10^{10} 個の非結合クローンよりも
大きいライブラリーから、1個の結合抗体断片を単離することを可能にする。ファージの
表面上で抗体断片を発現する(ファージディスプレイ)ために、抗体断片の遺伝子は、フ
ァージ表面タンパク質(例えばpIII)をコードする遺伝子中へ挿入され、抗体断片-
pIII融合タンパク質が、ファージ表面上にディスプレイされる(McCafferty
ら、(1990)Nature、348:552-554頁、およびHoogenboomら、(1991)Nucleic Acids Res. 19号:4133-413
7頁)。

40

【0043】

ファージの表面上の抗体断片は機能的であるので、ファージを有する抗原結合抗体断片
は、抗原アフィニティークロマトグラフィーにより、非結合ファージから分離され得る
(McCaffertyら、(1990)Nature、348:552-554頁)。抗体断片の親和性に依りて、20倍-10000000倍の濃縮係数が、1ラウンドの親和性
スクリーニングで得られる。しかしながら、溶出したファージを有する細菌に感染させる
ことにより、さらに多くのファージが成長し得、もう1ラウンドのスクリーニングにさら

50

される。こうして、1ラウンドで1000倍の濃縮は、2ラウンドのスクリーニングで1000000倍となり得る(McCaffertyら、(1990)Nature、348:552-554頁)。このため、濃縮率が低い場合でも(Marksら、(1991)J.Mol.Biol.222:581-554頁)、複数ラウンドの親和性スクリーニングは、希少なファージの単離へと導くことができる。抗原上のファージ抗体ライブラリーのスクリーニングが濃縮を生じさせるため、クローンの大多数は、わずか3から4ラウンドのスクリーニングの後に抗原に結合する。このため、抗原に結合するために、相対的に少数のクローン(数100個)のみが分析されればよい。

【0044】

ヒト抗体は、ファージ上に、極めて大きく多様なV遺伝子レパートリーをディスプレイすることで、予備免疫なしに産生され得る(Marksら、(1991)J.Mol.Biol.222:581-597頁)。一実施形態において、ヒトの末梢性血液リンパ球中に存在する天然型VHおよびVLレパートリーは、PCRにより、免疫されていない供与体から単離される。V遺伝子レパートリーは、30000000のファージ抗体(Id)のライブラリーを創るべくファージベクターへとクローンされ得るscFv遺伝子レパートリーを創るために、PCRを用いてランダムに共にスプライシングされ得る。1つの「未処理の」ファージ抗体ライブラリーから、結合している抗体断片は、17種超の異なる抗原に対して単離され、ハプテン、多糖類およびタンパク質を含む(Marksら、(1991)J.Mol.Biol.222:581-597頁; Marksら(1993)Bio/Technology.10:779-783頁; Griffithsら、(1993)EMBO J.12:725-734頁; Clacksonら、(1991)Nature.352:624-628頁)。抗体は、ヒトチログロブリン、免疫グロブリン、腫瘍壊死因子およびCEAを含む自己タンパク質に対して産生された(Griffithsら、(1993)EMBO J.12:725-734頁)。抗体断片は、スクリーニングに使用される抗原に対して極めて特異的であり、親和性を1nMから100nMの範囲で有する(Marksら、(1991)J.Mol.Biol.222:581-597頁; Griffithsら、(1993)EMBO J.12:725-734頁)。ファージ抗体ライブラリーが一層大きければ、一層多い抗原比率で、結合親和性が一層高い抗体を、一層多く単離することになる。

【0045】

抗体は、いくつかの任意の民間会社(例えばBerkeley Antibody Laboratories、Bethyl Laboratories、Anawa、Eurogeneticなど)によって調製され得ることを、当業者であれば容易に理解するであろう。

【0046】

CCL8および他の任意のRAマーカーに対する抗体は、固相にも結合され得、固相は、抗体に結合するのに十分な表面親和性を有する任意の適当な材料であり得る。捕捉抗体は、吸着によって固相に付着され得、これは疎水力によって保持される。代わって一方、固相の表面は、支持体への捕捉抗体の共有結合を起こす化学的プロセスにより活性化され得る。固相は、磁気粒子、微小粒子、ビーズ、試験管、マイクロタイプレート、キュベット、膜、スキャフォールド分子、水晶、フィルム、濾紙、ディスクまたはチップなどの任意のいくつかの形態をとることができる。

【0047】

本開示の方法により使用される任意のイムノアッセイは、検出可能な標識に結合した抗体を用いてもよい。検出可能な標識は、分光器による、光化学的、生化学的、免疫化学的、電氣的、光学的または化学的手段によって検出可能である部分を有する、任意の化合物または組成物を含むことができる。こうした標識は、例えば酵素、オリゴヌクレオチド、ナノ粒子化学発光団、発蛍光団、蛍光消光剤、化学発光消光剤またはビオチンを含む。このため、例えば光学信号を用いるイムノアッセイにおいて、光学信号は、化学発光、蛍光、リン光、電気化学発光、紫外線吸収、可視吸収、赤外吸収、屈折、表面プラズモン共

10

20

30

40

50

鳴における変化に起因する分析対象物質濃度として測定される。電気信号を用いるイムノアッセイにおいて、電気信号は、電流、抵抗、電位、質量対電荷比またはイオン計数に起因する分析対象物質濃度として測定される。状態変化信号を用いるイムノアッセイにおいて、状態変化信号は、寸法、可溶性、質量または共振における変化に起因する分析対象物質濃度として測定される。

【0048】

本開示による有用な標識は、磁気ビーズ（例えばダイナビーズ（Dyna beads（商標））、蛍光染料（例えばフルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、緑色蛍光タンパク質）など（例えば、米国オレゴン州ユージーン「Molecular Probes」を参照されたい。）、アクリジニウム（例えばアクリジニウム-9-カルボキシアミド）、フェナントリジニウム、ジオキセタン、ルミノールなどの化学発光化合物、放射性標識（例えば³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴Cまたは³²P）、酵素（例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータガラクトシダーゼおよびELISAにおいて一般に使用される酵素）などの触媒、ならびにコロイド金（例えば直径サイズ範囲40-80nmの金粒子は緑色光を高効率で散乱させる）または着色されたガラスもしくはプラスチック（例えばポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど）ビーズなどの比色分析標識を含む。こうした標識の使用を教示する特許は、米国特許第3817837号、第3850752号、第3939350号、第3996345号、第4277437号、第4275149号および第4366241号を含む。

10

【0049】

C. 診断用試薬、キットおよび医薬組成物

本開示は、試験サンプル中のCCL8タンパク質濃度を測定するための抗CCL8抗体を含む診断用試薬を含んだキットなどの、本明細書で開示された方法を実施するためのキットも企画する。キットは、他の任意のRAマーカーに対する抗体などの、付加的なRAマーカーを測定するための1種以上の付加的な診断用試薬を含むことができる。キットは、1種以上の別の組成物としての、または場合によって試薬の相容性を可能にする混合物としての試薬を保持する、1個または複数個の容器を伴うパッケージを一般に含む。検査キットは、緩衝剤（複数可）、希釈剤（複数可）、標準物質（複数可）、標識などの、利用者の立場から所望であり得る他の材料（複数可）、および/またはサンプルの処理、洗浄、またはこのアッセイの他の任意のステップを実行するのに有用な、他の任意の材料も含むことができる。検査キットは、RA診断の精度を向上させるためのRAマーカーパネルとして使用するために、マイクロタイタープレートなどの固相に結合する抗CCL8抗体、および同様に固相に結合する少なくとも1種の付加的なRAマーカーを含むことができる。本開示による検査キットは、CCL8タンパク質および少なくとも1種の他のRAマーカーを検出する、1種以上のイムノアッセイを実施するための説明書を含むことが好ましい。本開示のキットに含められた説明書は、包装材料に貼付され得、またはパッケージ挿入物として含まれ得る。一般に説明書は、文書による、または印刷された材料であるが、こうした物に限定されない。このような説明書を貯え、エンドユーザーに説明書を伝達できる任意の媒体が、本開示により企画される。こうした媒体は、電子記憶媒体（例えば磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ）、光学媒体（例えばCD-ROM）などであるがこれらに限定されない。本明細書で使用するとき、「説明書」という用語は、説明書を提供するインターネットサイトのアドレスを含むことができる。

20

30

40

【0050】

抗CCL8抗体またはその断片（複数可）は、対象中のCCL8タンパク質活性を減少または除去するために、対象のRA治療用の医薬組成物において、またはこうした組成物の製造において、有効成分としても使用され得る。医薬組成物は、治療有効量の抗CCL8抗体を、医薬として許容可能な担体または賦形剤と共に含有できる。抗CCL8抗体は、例えば、イブプロフェンおよびナプロキセンなどの店頭薬の非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）、ならびにセレブレックス（Celebrex）、バイオックス（Vioxx）を含むCOX-2阻害薬などの処方箋により購入できる一層強力なNSAIDを含む

50

NSAID；プレドニゾンおよびメチルプレドニゾンなどのコルチコステロイドを含むステロイド；メトトレキサート、レフルノミド、ヒドロキシクロロキン、スルファサラジンおよびミノサイクリンを含むがこれらに限定されない疾患修飾性抗リウマチ薬（DMARD）；アザチオプリン、シクロスポリンおよびシクロホスファミドを含むがこれらに限定されない免疫抑制薬；エタネルセプト、インフリキシマブおよびアダリムマブを含むがこれらに限定されないTNF-阻害薬；ならびにアナキンラ（キネレット（Kineret））、アバタセプト（オレンシア（Orencia））およびリツキシマブ（リツキサン（Rituxan））を含むがこれらに限定されない他の医薬組成物などのこれらに限定されない、RA治療に使用される治療有効量の他の有効成分と、組み合わせられ得る。本明細書で使用するとき、「医薬として許容可能な担体」または「医薬として許容可能な賦形剤」は、生理的に適合する任意および全ての溶剤、分散媒、剤皮、抗菌剤および抗真菌剤、等張化剤および吸収遅延剤を含む。医薬として許容可能な担体および賦形剤の例は、1種以上の、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、ブドウ糖、グリセロール、エタノールなど、ならびにこれらの組合せを含む。多くの場合、組成物中に等張化剤を含むと有用であり、例えば糖、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール、または塩化ナトリウムなどである。抗体または抗体の部分の貯蔵寿命または有効性を強化する、湿潤剤もしくは乳化剤、保存剤または緩衝剤などの、湿潤または微量の補助物質などの医薬として許容可能な物質も含まれ得る。場合によって分解剤が含まれてもよく、架橋したポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸、またはアルギン酸ナトリウムなどの、これらの塩などである。賦形剤に加え、医薬組成物は、1種以上の次の物を含むことができ、血清アルブミン、緩衝剤、結着剤、甘味剤および他の芳香剤などの担体タンパク質；着色剤ならびにポリエチレングリコールである。

10

20

30

40

50

【0051】

医薬組成物は、例えば液体、半固体および固体の剤形を含む多様な任意の形態をとることができ、液体溶液（例えば注射用および注入用の溶液）、分散液または懸濁液、錠剤、丸剤、粉剤、リポソームおよび座剤などである。好ましい剤形は、意図された投与方法および治療用途による。組成物は、例えば注射用または注入用の溶液の形態とすることができ、他の抗体によるヒトの受動免疫化で使用される物に類似した組成物などである。投与は、非経口（例えば静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内）とすることができる。溶液形態の抗CCl8抗体（単数）もしくは抗体（複数）は、静脈内への注入もしくは注射、または筋肉内もしくは皮下への注射により投与され得る。医薬組成物の他の適当な投与経路は、直腸、経皮、膻、経粘膜または腸への投与を含むがこれらに限定されない。

【0052】

治療用組成物は、製造および保管の条件下、一般に無菌で安定でなければならない。組成物は、溶液、ミクロエマルジョン、分散液、リポソームまたは高い薬物濃度に適した、他の秩序構造として配合され得る。注射用の無菌溶液は、活性化合物（即ち抗体または抗体断片）を、必要に応じて上に挙げた1種以上の成分の組合せと共に、必要とされる量で、適当な溶剤へ組み入れ、次いで濾過殺菌することにより調製され得る。一般に、分散液は、活性化合物を、基本の分散媒および上に挙げた物からの、必要とされる他の成分を含む無菌の媒体中へと組み入れることで調製される。注射用の無菌溶液を調製するための無菌粉末薬の場合、好ましい調製方法は、有効成分の粉末に加えて、予め無菌濾過したこの溶液からの任意の所望の付加的な成分を産出する、真空乾燥および凍結乾燥である。溶液の適切な流動性は、例えば、レシチンなどの剤皮の使用により、分散液の場合には必要とされる粒径の維持により、および界面活性剤の使用により、保持され得る。注射用組成物の吸収延長は、吸収を遅延させる作用剤、例えばモノステアレート塩およびゼラチンを組成物中に含めることにより、もたらされ得る。

【0053】

抗CCl8抗体および抗体断片は、当技術分野で公知の多様な方法により投与され得るが、多くの治療投与にとって、静脈内の注射または注入による投与が好ましい。当業者に理解されるように、投与の経路および/または方法は、所望の結果により様々である。特

定の実施形態において、活性化合物は、急速な放出から化合物を守る、埋込剤、貼付剤を含む放出調整配合物などの担体、およびマイクロカプセル化学送達システムと一緒に調製されてもよい。生分解性の生体適合性ポリマーが使用され得、エチレンビニルアセテート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ乳酸などである。こうした配合物の多くの調製方法は、特許権を有する、または一般に当業者に公知である。(例えば、「Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems」、J. R. Robinson編、ニューヨーク、Marcel Dekker, Inc.、1978を参照されたい。)

RA治療用の抗CCL8抗体または抗体断片は、経口で投与され得、例えば、不活性希釈剤または同化性食用担体を伴う。化合物(および所望であれば他の成分)は、硬質または軟質のシェルのゼラチンカプセルに封入されてもよく、錠剤、口内錠、トローチ剤、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ、オブラートなどへと圧縮されてもよい。非経口投与以外で抗CCL8抗体または抗体断片を投与するために、化合物を、その不活性化を防ぐ材料で覆う、またはこれと同時に投与することが必要であり得る。

【0054】

本明細書で前記したように、RA治療用の付加的な活性化合物は、医薬組成物中に組み入れられ得る。特定の実施形態において、本発明の抗体または抗体断片は、1種以上の付加的なRAマーカーに対する、1種以上の抗体などの、1種以上の有効成分と共に同時配合および/または同時投与される。例えば、抗CCL8抗体または抗体断片は、RFなどのRAマーカーまたは本明細書に記載の他の任意のRAマーカーに対する1種以上の付加的な抗体と同時配合および/または同時投与されてもよい。さらに、1種以上の抗CCL8抗体は、本明細書で前記した、2種以上の認可されたRA治療用の治療剤と組み合わせて使用されてもよい。こうした組合せ治療は、投与される治療剤各々をより少ない投与量で利用し、このため様々な単剤治療に関連して起こり得る毒性または合併症を退けることができ、有利である。

【0055】

本明細書で使用するとき、「治療有効量」という用語は、投与される対象に効果をもたらす抗体または抗体断片の量を意味する。正確な投与量は、当業者によって確かめられる。当技術分野で公知のように、年齢、体重、性別、食餌、投与時刻、薬物相互作用および状態の重症度に基づく調整が必要であり得、当業者による常套の実験法により確かめられる。治療有効量はまた、抗体または抗体断片の治療上利益のある効果が、任意の毒性または有害な作用を超える量である。「予防有効量」は、所望の予防結果を達成するのに必要な、投与量においておよび一定の期間において、有効である量を表す。一般に、予防投与量は、対象に、疾患の初期段階以前または初期段階に使用されるので、予防有効量は、治療有効量よりも少量である。

【0056】

薬剤投与計画は、所望の最適反応(例えば治療上または予防上の反応)を提供するよう適合させることができる。例えば、ボラスを1回投与してもよく、いくつかに分けた用量を経時的に投与してもよく、または投与量は、治療状態の緊急性が指し示すのに比例して増減してもよい。投与容易性および投与量均一性のために、非経口組成物を、投与単位形態に配合すると特に有利である。本明細書で使用される投与単位形態は、検査される哺乳類対象への単位投与量として適合する、物理的に分離した単位を表し、各単位は、必要とされる医薬担体と共同して所望の治療効果を出すよう計算された活性化合物の既定量を含む。本発明の投与単位形態についての詳細は、(a)活性化合物の特有の特性、および達成されるべき特定の治療上または予防上の効果、ならびに(b)個体における感受性を治療するための活性化合物などの配合の技術分野に本来ある限界によって指示され、直接的にそれに依存する。

【0057】

医薬組成物の任意の抗体または抗体成分の治療有効量または予防有効量の好例となる非制限的な範囲は、0.1 - 20 mg/kgであり、より好ましくは1 - 10 mg/kgで

10

20

30

40

50

ある。投薬量の値は、緩和されるべき状態のタイプおよび重症度により変わり得ることに留意すべきである。任意の具体的な対象のために、特定の薬剤投与計画が、個々の必要性、および組成物の投与を実行または監督する人の専門的判断に従って時間と共に適合されるべきであること、ならびに本明細書で述べられた投与量範囲は例示に過ぎず、請求された組成物の範囲および実施を限定することが意図されていないことも、さらに理解されるべきである。

【実施例】

【0058】

D. 本開示の方法の適用

例として、限定することなく、本開示の実施例が今付与される。

10

【0059】

[実施例1]

CCL8 血清濃度と関節リウマチ診断との相関

59個のヒト血清検体を、ProMedDx LLC (マサチューセッツ州ノートン) から取得した。59個のうち、39個は正常な被験者から、10個はマウス由来抗体の治療的投与によってヒト抗マウス抗体 (HAMMA) を呈した患者から、10個は関節リウマチ (RA) の陽性診断を有する被験者からであった。各検体について、CCL8 タンパク質の濃度を、株式会社免疫生物研究所 (日本) からの CCL8 イムノアッセイキット (RUO) を使用して、キットの添付書の指示に従い測定した。表1は、各RA被験者において得たCCL8の濃度を列挙し、(a)においては連続希釈法を使用し、(b)においては異好抗体干渉を阻害または減少させるためにHBRを伴わせた。

20

【0060】

【表1】

表1: RA被験者におけるCCL8濃度

	CCL8 濃度 (pg/mL) (a)	HBR添加における CCL8濃度 (pg/mL) (b)	b/a 比
RF-c01	95	93	98%
RF-c02	174	177	102%
RF-c03	147	149	101%
RF-c04	219	211	96%
RF-c05	125	124	100%
RF-c06	111	136	122%
RF-c07	123	149	121%
RF-c08	81	89	110%
RF-c09	145	151	104%
RF-c10	113	120	106%

30

平均値 106%

40

【0061】

図1は、血清サンプルにおいて測定した各個体のCCL8のタンパク質濃度の散布図で、正常個体からの結果を左にプロットし、HAMMA反応を呈している個体の結果を中央にプロットし、RA陽性診断を有する個体の結果を右にプロットしてある。各対象群で、平均は、水平な青線で示されている。図1に示すように、RA対象におけるCCL8の平均濃度は、正常な被験者またはHAMMA被験者のいずれよりも有意に高かった。94 pg/mLのカットオフ (正常者からの平均CCL8濃度 + 2SD) を使用したところ、RA患者の90% (9/10) が、カットオフを上回る、上昇したCCL8濃度を示した (連続希釈法を使用して決定した)。このように、CCL8は、相当少ない数の検体を検査した

50

にもかかわらず、R A 検出において高い陽性率を示した。

【 0 0 6 2 】

[実施例 2]

関節リウマチの検出における、C C L 8 血清濃度の低い偽陽性率および低い偽陰性率
図 2 は、正常および H A M A の被験者において上昇した C C L 8 濃度を偽陽性と観察した率に対して、R A 被験者において上昇した C C L 8 濃度を真陽性と観察した率の、受信者動作特性 (R O C) プロットである。プロットを横切るグレーの対角線は、C C L 8 濃度が、R A 被験者と、正常または H A M A 被験者とを全く識別されないであろうという最悪可能性予測法から予期されたプロットを指し示す。最良可能性予測法は、R O C 空間の左上隅、即ち座標 (0 , 1) にある点を生じさせると予期され、1 0 0 % 感受性 (偽陰性なし) および 1 0 0 % 特異性 (偽陽性なし) を表す。このように、実際のデータのプロットから導き出された 1 . 0 値に近似する曲線下面積 (A U C) は、最良可能性予測法を表している。図 2 で分かる通り、A U C は 0 . 9 9 0 であり、上昇した C C L 8 濃度 (即ち 9 4 p g / m L のカットオフを上回る C C L 8 タンパク質の値) が極めて強力な R A 予測分類指標であることを示す。

10

【 0 0 6 3 】

本明細書において適当に例示的に記載された本開示は、本明細書に具体的に開示されていない任意の要素 (単数) または要素 (複数) 、限定 (単数) または限定 (複数) の非存在においても実施され得る。したがって、例えば本明細書の各例において、「を含む」「本質的に構成される」および「から構成される」という用語のいずれもが、他の 2 つの用語のいずれでも置き換えられ得る。用いられた用語および表現は、記載のために使用しているのであって限定のためではなく、こうした用語および表現の使用において、示され、および記載された特徴またはこれらの部分の等価物を排除する意図はなく、多様な修正が、請求された本開示の範囲内で可能であることが認められる。したがって本開示は、好ましい実施形態により、および場合によって特徴により、具体的に開示されているが、本明細書で開示された概念の修正および変形にも当業者は依存してもよく、このような修正および変形は、添付の特許請求の範囲によって定義された本発明の範囲内であるとみなされると理解されるべきである。

20

【 0 0 6 4 】

本明細書で挙げた全ての特許および出版物は、本開示が関係する当業者のレベルを示している。全ての特許および出版物は、個々の出版物が具体的および個々に参照により組み込まれたことを示しているのと同程度にまで、参照により本明細書に組み込まれる。

30

【 図 1 】

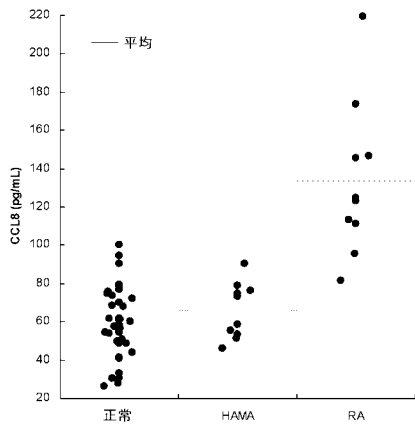
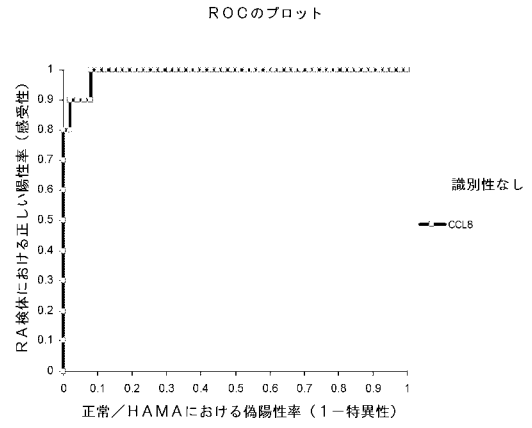


FIG. 1

【 図 2 】



AUC=0.990

FIG. 2

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/059226

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int.Cl. G01N33/564 (2006.01) i, G01N33/53 (2006.01) i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Int.Cl. G01N33/564, G01N33/53		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2011 Registered utility model specifications of Japan 1996-2011 Published registered utility model applications of Japan 1994-2011		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)] JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Pierer M et al, Chemokine secretion of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts stimulated by	1-3, 6-8, 11, 15-20, 22
Y	Toll-like receptor 2 ligands, J Immunol,	5, 10, 12-13
A	2004.01.15, 172 (2), 1256-1265	4, 9, 21
X	Haringman JJ et al, Chemokine and chemokine receptor expression in paired peripheral blood	1-3, 6-8, 11, 15-20, 22
Y	mononuclear cells and synovial tissue of patients	5, 10, 12-13
A	with rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and reactive arthritis, Ann Rheum Dis, 2006.03, 65 (3), 294-300	4, 9, 21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "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	
14.06.2011	28.06.2011	
Name and mailing address of the ISA/JP	Authorized officer	2J 3316
Japan Patent Office	Yuki Akasaka	
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone No. +81-3-3581-1101 Ext. 3252	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP2011/059226
--

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2008/037420 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH) 2008.04.03, the whole document & JP 2010-506147	5, 10, 12-13
A	A & US 2009/0270272 A1 & EP 2074428 A & CA 2663730 A & CN 101523218 A	4, 9, 21
A	Jorg H. W. Distler et al, The induction of matrix metalloproteinase and cytokine expression in synovial fibroblasts stimulated with immune cell microparticles, Proc Natl Acad Sci U S A, 2005.02.22, 102(8), 2892-2897	1-13, 15-21
A	WO 2008/128987 A1 (PROBIODRUG AG) 2008.10.30, the whole document & JP 2010-524899 A & US 2008/0262065 A1 & EP 2142515 A	1-13, 15-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/059226

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 14
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
See PCT Rule 67.1.(iv).: Claim 14 involving the methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods. Specifically, administering a test substance to an animal subject involves such methods.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N 27/447	(2006.01)	C 0 7 K 16/18		
		G 0 1 N 27/26	3 1 5 H	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, T M), 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, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, I D, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO , NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

专利名称(译)	用于诊断类风湿性关节炎的方法和试剂		
公开(公告)号	JP2013527437A	公开(公告)日	2013-06-27
申请号	JP2013504499	申请日	2011-04-07
[标]申请(专利权)人(译)	雅培日本		
申请(专利权)人(译)	雅培日本有限公司		
[标]发明人	吉村 徹 千葉 陵太郎		
发明人	吉村 徹 千葉 陵太郎		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/564 G01N30/88 G01N27/62 C07K16/18 G01N27/447		
CPC分类号	G01N33/6863 G01N33/6803 G01N33/6854 G01N2800/102		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/564.B G01N33/53.N G01N30/88.J G01N27/62.V C07K16/18 G01N27/26.315.H		
F-TERM分类号	2G041/FA12 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA71		
优先权	61/325027 2010-04-16 US		
其他公开文献	JP2013527437A5 JP5786020B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了一种通过测量来自受试者的测试样品中CCL8蛋白质浓度来诊断类风湿性关节炎 (RA) 的方法。作为RA指标的CCL 8试验可与其他RA指标测试结合，包括其他RA标志物，如临床评估，图像或类风湿因子 (RF)。CCL 8的检查可用于区分RA与其他疾病或病症，并评估RA的严重程度。还描述了鉴定用于治疗类风湿性关节炎的相关诊断试剂，试剂盒，药物组合物和治疗候选物质的方法。

