

(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2018-517151  
(P2018-517151A)

(43) 公表日 平成30年6月28日(2018.6.28)

(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	4 B O 6 3
GO 1 N 33/573 (2006.01)	GO 1 N 33/573 A	4 H O 4 5
C 1 2 Q 1/06 (2006.01)	C 1 2 Q 1/06 Z N A	
C O 7 K 7/08 (2006.01)	C O 7 K 7/08	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 62 頁)

(21) 出願番号 特願2018-511342 (P2018-511342)  
 (86) (22) 出願日 平成28年5月12日 (2016. 5. 12)  
 (85) 翻訳文提出日 平成30年1月5日 (2018. 1. 5)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/032077  
 (87) 国際公開番号 W02016/183310  
 (87) 国際公開日 平成28年11月17日 (2016. 11. 17)  
 (31) 優先権主張番号 62/160, 320  
 (32) 優先日 平成27年5月12日 (2015. 5. 12)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 62/162, 295  
 (32) 優先日 平成27年5月15日 (2015. 5. 15)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 310022017  
 ザ ジェネラル ホスピタル コーポレー  
 ション ドゥーイング ビジネス アズ  
 マサチューセッツ ジェネラル ホスピタ  
 ル  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボ  
 ストン フルーツ ストリート 55  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100102118  
 弁理士 春名 雅夫  
 (74) 代理人 100160923  
 弁理士 山口 裕孝  
 (74) 代理人 100119507  
 弁理士 刑部 俊

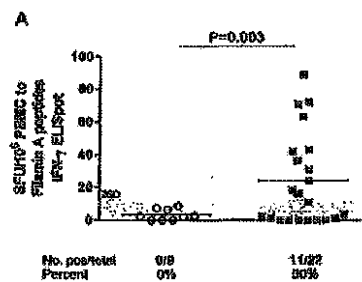
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 関節リウマチの診断のための自己抗原

(57) 【要約】

対象において関節リウマチを診断する方法であって、対象がN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼおよび/またはフィラミンAに対して免疫学的に反応性であるかどうかを決定する段階を含み、適当な対照と比較した、N-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼまたはフィラミンAの1つまたは複数に対する対象の免疫学的反応性が、対象が関節リウマチを患っていることを示す方法が、本願に開示されている。この方法で使用するための、特定のアッセイおよびキットの例も開示されている。

FIG. 5A T Cell Response



**【特許請求の範囲】****【請求項1】**

対象において関節リウマチを診断する方法であって、対象がフィラミンAおよびN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つまたは複数に対して免疫学的に反応性であるかどうかを決定する段階を含み、適当な対照と比較した、フィラミンAおよびN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つまたは複数に対する対象の免疫学的反応性が、対象が関節リウマチを患っていることを示す、方法。

**【請求項2】**

決定する段階が、フィラミンAおよびN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つまたは複数に対する免疫学的反応性に関して対象から取得された生物学的サンプルを評価することによる、請求項1記載の方法。

10

**【請求項3】**

免疫学的反応性を決定する段階が、以下のステップ：

(a) フィラミンAおよびN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つもしくは複数の、総タンパク質またはタンパク質フラグメントを用いて、インビトロで対象の末梢血単核細胞（PBMC）または対象の滑液単核細胞（SFMC）を刺激すること；

(b) インビトロでのT細胞の増殖または細胞培養上清へのIFN- $\gamma$ の分泌を測定すること；ならびに

(c) T細胞の増殖またはIFN- $\gamma$ の分泌が、適当な対照のそれより有意に増加していると測定される場合に、対象がフィラミンAおよびN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つまたは複数に対して反応性のT細胞を有すると判定すること

20

を含む、フィラミンAおよびN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つまたは複数に対して反応性のT細胞の存在を検出することによる、請求項1～2のいずれか一項記載の方法。

**【請求項4】**

ステップ(b)がインビトロでのT細胞の増殖を測定することであり、T細胞の増殖が、適当な対照のそれより有意に増加していると測定される場合に、対象がフィラミンAおよびN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つまたは複数に対して反応性のT細胞を有すると判定される、請求項3記載の方法。

**【請求項5】**

ステップ(b)がT細胞による細胞培養上清へのIFN- $\gamma$ の分泌を測定することであり、IFN- $\gamma$ の分泌が、適当な対照のそれより有意に増加していると測定される場合に、対象がフィラミンAおよびN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つまたは複数に対して反応性のT細胞を有すると判定される、請求項3記載の方法。

30

**【請求項6】**

免疫学的反応性を決定する段階が、

その抗体とフィラミンAまたはN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの免疫複合体の形成が可能な条件下でフィラミンAタンパク質もしくはそのポリペプチドフラグメントおよび/またはN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼタンパク質もしくはそのポリペプチドフラグメントとサンプルを接触させて、免疫複合体の存在または非存在を検出することにより、フィラミンAおよびN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つまたは複数の特異的に認識する自己抗体の産生をもたらすフィラミンAおよびN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つまたは複数に対するB細胞応答を対象が有するかどうかを決定すること

40

を含み、免疫複合体の存在が、対象がフィラミンAおよび/またはN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼに対するB細胞応答を示すことを示し、免疫複合体の非存在が、対象がフィラミンAおよび/またはN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼに対するB細胞応答を示さないことを示す、請求項1～5のいずれか一項記載の方法。

**【請求項7】**

アッセイが、酵素連結免疫吸着アッセイ（ELISA）、凝集試験、直接免疫蛍光アッセイ

50

、間接免疫蛍光アッセイ、または免疫プロットアッセイである、請求項6記載の方法。

【請求項 8】

フィラミンAのポリペプチドフラグメントが、アミノ酸配列：  
NPAEFVVNTSNAGAG (SEQ ID NO: 1)

またはその抗原性部分を含む、請求項3～7のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9】

N-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼのポリペプチドフラグメントが、アミノ酸配列：

FEPFFMMIATPAPH (SEQ ID NO: 2)

またはその抗原性部分を含む、請求項3～8のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項 10】

対象が、リウマチ因子、抗シトルリン化タンパク質抗体（ACPA）および1つまたは複数のHLA-DR対立遺伝子の1つまたは複数について試験されている、またはさらに試験される、請求項1～9のいずれか一項記載の方法。

【請求項 11】

HLA-DR対立遺伝子が、HLA-DRB1\*0101および/またはHLA-DRB1\*0401である、請求項10記載の方法。

【請求項 12】

対象が、関節リウマチの危険がある、または関節リウマチを患っている可能性がある、請求項1～11のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項 13】

非ステロイド抗炎症薬（NSAID）、ステロイド、疾患修飾抗リウマチ薬（DMARD）、および生物製剤の1つまたは複数で対象を処置する段階をさらに含む、請求項1～12のいずれか一項記載の方法。

【請求項 14】

フィラミンAおよび/またはN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つまたは複数の潜在的抗原および/または潜在のエピトープ、ならびに

フィラミンAおよびN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つまたは複数の潜在的抗原および/または潜在のエピトープに結合するサンプル中の抗体の存在を検出するためのアッセイを実行するための試薬

30

を含む、キット。

【請求項 15】

フィラミンAの潜在的抗原および/または潜在のエピトープが、アミノ酸配列  
NPAEFVVNTSNAGAG (SEQ ID NO: 1)

またはその抗原性部分を含む、請求項14記載のキット。

【請求項 16】

N-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの潜在的抗原および/または潜在のエピトープが、アミノ酸配列

FEPFFMMIATPAPH (SEQ ID NO: 2)

またはその抗原性部分を含む、請求項14記載のキット。

40

【請求項 17】

アッセイが、酵素連結免疫吸着アッセイ（ELISA）である、請求項14～16のいずれか一項記載のキット。

【請求項 18】

アッセイが、ウェスタンプロットである、請求項14～16のいずれか一項記載のキット。

【請求項 19】

関節リウマチを患った対象の特定に使用するための、請求項1～18のいずれか一項記載のキットまたは方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

## 【 0 0 0 1 】

本発明は、疾患に関連する自己抗原に対する液性および細胞性自己免疫応答を用いた診断の分野に関する。特に、関節リウマチの自己抗原バイオマーカーに関する。

## 【 0 0 0 2 】

関連出願の相互参照

本願は、35 U.S.C. § 119(e)の下で2015年5月12日に出願された米国仮出願第60/160,320号および2015年5月15日に出願された同第62/162,295号の恩典を主張し、それらの内容の全体を参照により本明細書に組み入れる。

## 【 0 0 0 3 】

政府の支援

本発明は、National Institutes of Health (NIH) から授与された助成金第P41 GM104603号、同第S10 RR020946号、同第S10 OD010724号および同第R01 AI110175号ならびにNIH National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) から授与された助成金第HHSN268201000031C号の下で政府の支援を受けてなされたものである。政府は本発明に関して一定の権利を有している。

## 【 背景技術 】

## 【 0 0 0 4 】

背景

関節リウマチ (RA) は、主な関節に影響する原因不明の慢性自己免疫疾患である。1974年にMcDevittによって最初に報告されたように、ヒト白血球抗原-抗原D関連 (HLA-DR) 分子が、自己免疫疾患において中心的な役割を果たしている (1)。HLA-DR分子は、関節リウマチ (RA) およびライム関節炎 (LA) を含む慢性炎症型の関節炎における免疫応答の標的である滑膜組織 (ST) において高度に発現される (2,3)。これらの疾患に関して最も良く知られている遺伝的危険因子は、特定のHLA-DR対立遺伝子である (4)。HLA-DR分子は、外来または自己ペプチドをCD4+ T細胞に提示し、それらを活性化させる (5)。活性化後、T細胞は、B細胞が同じ抗原に対する持続的、高力価の抗体を産生するのに必要な補助を提供し得る。RAにおいて、HLA-DRB1\*0101および0401対立遺伝子 (6,7) を含む10種のHLA-DR対立遺伝子が、最も高い危険を有している。これらの対立遺伝子は、HLA-DR分子のP4ポケットを裏打ちするRA共通エピトープと呼ばれる類似のアミノ酸配列をコードしている。RAに特異的な抗シトルリン化タンパク質抗体 (ACPA) は、この共通エピトープを有する患者において有意に高い頻度で出現する (8~13)。

## 【 0 0 0 5 】

RAおよびLAの両方において、滑膜組織は、顕著な滑膜肥大、血管増殖、単核細胞浸潤ならびに滑膜細胞および浸潤細胞におけるHLA-DR分子の高発現を示す (2,3)。この組織は、多数の樹状細胞およびマクロファージを含む炎症細胞の豊富な混合物を含む滑液 (SF) 中に浸っており；後者もまたHLA-DR分子を高発現している (28,29)。しかし、RAにおいて滑膜組織内でHLA-DR分子によって提示される具体的な自己ペプチドのレパートリーは知られていない。したがって、RA患者の滑膜組織、滑液および末梢血単核細胞においてHLA-DRによって提示される自己抗原および病原性T細胞エピトープを同定するという要望は満たされていない。

## 【 発明の概要 】

## 【 0 0 0 6 】

要旨

本発明の局面は、対象において関節リウマチを診断する方法であって、対象がフィラミンAおよびN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つまたは複数に対して免疫学的に反応性であるかどうかを決定する段階を含み、適当な対照と比較した、フィラミンAおよびN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つまたは複数に対する対象の免疫学的反応性が、対象が関節リウマチを患っていることを示す方法に関する。

## 【 0 0 0 7 】

1つの態様において、決定する段階は、フィラミンAおよびN-アセチルグルコサミン-6-

10

20

30

40

50

スルファターゼの1つまたは複数に対する免疫学的反応性に関して対象から取得した生物学的サンプルを評価することによる。

【0008】

上記局面の1つの態様において、免疫学的反応性を決定する段階は、以下のステップ：

(a) フィラミンAおよびN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つもしくは複数の、総タンパク質またはタンパク質フラグメントを用いて、インビトロで対象の末梢血単核細胞（PBMC）または対象の滑液単核細胞（SFMC）を刺激すること；

(b) インビトロでのT細胞の増殖または細胞培養上清へのIFN- $\gamma$ の分泌を測定すること；  
ならびに

(c) T細胞の増殖またはIFN- $\gamma$ の分泌が、適当な対照のそれより有意に増加していると測定される場合に、対象がフィラミンAおよびN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つまたは複数に対して反応性のT細胞を有すると判定すること

を含む、フィラミンAおよびN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つまたは複数に対して反応性のT細胞の存在を検出することによる。

【0009】

1つの態様において、ステップ(b)はインビトロでのT細胞の増殖を測定することであり、T細胞の増殖が、適当な対照のそれより有意に増加していると測定される場合に、対象がフィラミンAおよびN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つまたは複数に対し

て反応性のT細胞を有すると判定される。1つの態様において、ステップ(b)は、T細胞による細胞培養上清へのIFN- $\gamma$ の分泌を測定することであり、IFN- $\gamma$ の分泌が、適当な対照のそれより有意に増加していると測定される場合に、対象がフィラミンAおよびN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つまたは複数に対して反応性のT細胞を有すると判定される。

【0010】

1つの態様において、免疫学的反応性を決定する段階は、

その抗体とフィラミンAまたはN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの免疫複合体の形成が可能な条件下でフィラミンAタンパク質もしくはそのポリペプチドフラグメントおよび/またはN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼタンパク質もしくはそのポリペプチドフラグメントとサンプルを接触させて、免疫複合体の存在または非存在を検出することにより、フィラミンAおよびN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つまたは複数

を特異的に認識する自己抗体の産生をもたらすフィラミンAおよびN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼに対するB細胞応答を示すことを示し、免疫複合体の非存在は、対象がフィラミンAおよび/またはN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼに対するB細胞応答を示さないことを示す。

【0011】

1つの態様において、アッセイは、酵素連結免疫吸着アッセイ（ELISA）、凝集試験、直接免疫蛍光アッセイ、間接免疫蛍光アッセイ、または免疫プロットアッセイである。

【0012】

上記局面の1つの態様において、フィラミンAのポリペプチドフラグメントは、アミノ酸配列：

NPAEFVVNTSNAGAG (SEQ ID NO: 1)

またはその抗原性部分を含む。

【0013】

1つの態様において、N-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼのポリペプチドフラグメントは、アミノ酸配列：

FEPFFMMIATPAPH (SEQ ID NO: 2)

またはその抗原性部分を含む。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 4 】

上記局面の1つの態様において、対象は、リウマチ因子、抗シトルリン化タンパク質抗体（ACPA）および1つまたは複数のHLA-DR対立遺伝子の1つまたは複数について試験されている、またはさらに試験される。1つの態様において、HLA-DR対立遺伝子は、HLA-DRB1\*0101および/またはHLA-DRB1\*0401である。1つの態様において、対象は、関節リウマチの危険がある、または関節リウマチを患っている可能性のある対象である。

## 【 0 0 1 5 】

本明細書に記載される様々な方法の1つの態様において、この方法はさらに、非ステロイド抗炎症薬（NSAID）、ステロイド、疾患修飾抗リウマチ薬（DMARD）、および生物製剤の1つまたは複数で対象を処置する段階を含む。

10

## 【 0 0 1 6 】

1つの局面において、フィラミンAおよび/またはN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つまたは複数の潜在的抗原および/または潜在のエピトープ、ならびにフィラミンAおよび/またはN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つまたは複数の潜在的抗原および/または潜在のエピトープに結合するサンプル中の抗体の存在を検出するためのアッセイを実行するための試薬を含むキットが本明細書に記載されている。

## 【 0 0 1 7 】

1つの態様において、フィラミンAの潜在的抗原および/または潜在のエピトープは、アミノ酸配列：

NPAEFVVNTSNAGAG (SEQ ID NO: 1)

20

またはその抗原性部分を含む。1つの態様において、N-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの潜在的抗原および/または潜在のエピトープは、アミノ酸配列：

FEPFFMMIATPAPH (SEQ ID NO: 2)

またはその抗原性部分を含む。

## 【 0 0 1 8 】

上記局面の1つの態様において、アッセイは、酵素連結免疫吸着アッセイ（ELISA）である。1つの態様において、アッセイは、ウェスタンブロットである。

## 【 0 0 1 9 】

本発明の別の局面は、関節リウマチを患った対象の特定に使用するための上記キットまたは方法に関する。

30

## 【 0 0 2 0 】

定義

それ以外のことに言及されていない限りまたは文脈から暗示されていない限り、以下の用語およびフレーズは、以下に提供される意味を含む。それ以外のことに明示的に言及されていない限りまたは文脈から明らかでない限り、以下の用語およびフレーズは、その用語またはフレーズがその属する技術の分野において獲得した意味を排除しない。定義は、個々の態様の説明を補助するために提供されるものであり、特許請求の範囲に記載の発明を限定することは意図されておらず、発明の範囲は特許請求の範囲によってのみ限定される。さらに、それ以外のことが文脈によって要求されない限り、単数形の用語は複数形を包含し、複数形の用語は単数形を包含する。

40

## 【 0 0 2 1 】

本明細書で使用される場合、「診断する（diagnose）」または「診断（diagnosis）」または「診断（diagnosing）」は、状態または疾患または障害の性質または正体の決定、対象における疾患および/または障害の検出および/または分類を表す。診断は、疾患の重篤度に関する決定によって達成され得る。この用語はまた、疾患を有することが既知の患者において疾患の状態（進行、退行、安定化、処置に対する応答等）を評価（assessing）または評価（evaluating）することを含む。本発明における診断は、慢性炎症性関節炎、例えば関節リウマチの診断に関する。診断は、鑑別診断であり得る。本明細書で使用される場合、「鑑別診断」は、臨床データ、例えば本明細書に記載される方法から得られる結果の分析に基づき、類似の症状を有する2つまたはそれ以上の疾患（例えば、RA、骨

50

関節炎、全身性エリテマトーデス、ライム関節炎、反応性関節炎、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎)のいずれが、患者が罹患しているものなのかの決定を表す。

【0022】

本明細書で使用される場合、「生物学的サンプル」という用語は、インビトロ評価のために取得されるサンプルを表す。生物学的サンプルは、抗体および/または免疫細胞を含むと考えられる任意のサンプルであり得る。サンプルは、具体的にその障害の影響を受けている身体の一部から取得され得る、例えば、具体的に対象の炎症もしくは病理部位(例えば、滑液、滑膜組織、滑液単核細胞(SFMC)、髄液等)から取得され得る、またはより全身的なサンプルであり得る(例えば、末梢血、末梢血単核細胞(PBMC)、全血もしくは抗凝固剤、例えばヘパリン、エチレンジアミン四酢酸で前処置された全血、血漿もしくは血清)。サンプルは、例えば血液から血漿を調製する、粘性の液体を希釈する等、使用前に前処置され得、処置方法はまた、干渉成分の分離、ろ過、蒸留、濃縮、不活性化および試薬の添加を伴い得る。

10

【0023】

本明細書で使用される場合、「免疫学的に反応性」または「免疫反応性」は、適当な対象または細胞において特異的な免疫応答(例えば、T細胞反応、B細胞応答)を誘導するおよび特異的な抗体に結合する本発明の分子(例えば、総タンパク質またはそのポリペプチドフラグメント)の能力と定義される。免疫学的反応性は、本明細書に記載される方法によって対象から取得された免疫学的細胞および/または抗体を含む生物学的サンプルにおいてアッセイされ得る。

20

【0024】

本明細書で使用される場合、「自己抗原(autoantigen/self-antigen)」は、異常な状況では対象のリンパ球または抗体によってもはや対象の一部とは認識されず、したがってそれが外来物質であるものとして免疫系による攻撃を受ける、対象内で通常見出される任意の物質である。自己抗原は、天然に存在する分子、例えば、通常その対象自身によって産生および使用され、対象において自己免疫疾患(例えば、RA)を引き起こす可能性のある免疫応答を誘発するタンパク質(例えば、GNS、フィラミンA)であり得る。

【0025】

「抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、抗原上の特定のエピトープを「特異的に認識」することができるおよび/またはエピトープに「特異的に結合」することができる免疫グロブリン分子を表す。抗体は、天然源または組み換え源由来のインタクトな免疫グロブリンであり得、かつインタクトな免疫グロブリンの免疫反応性部分であり得る。抗体は典型的に、免疫グロブリン分子である。

30

【0026】

本明細書で使用される場合、「自己抗体」は、「自己抗原」またはその「抗原性エピトープ」に対するおよびそれらに特異的に結合する、対象の免疫系によって産生される抗体を意味する。

【0027】

本明細書で使用される場合、「エピトープ」という用語は、T細胞もしくは抗体が認識および結合することができる(それに相当する抗体結合領域はパラトープと称され得る)、および/または免疫応答を誘発することができる任意の分子の一部分を表す。一般に、エピトープは、分子の化学的に活性な表面グループ、例えばアミノ酸からなり、特定の三次元構造の特徴および特定の電荷の特徴を有する。本明細書で使用される場合、「免疫原性エピトープ」は、当技術分野で公知の任意の方法によって決定されるように、対象において免疫応答を引き起こすポリペプチドの一部分と定義される。本明細書で使用される場合、「抗原性エピトープ」は、当技術分野で公知の任意の方法によって決定されるように、特定の抗体またはT細胞受容体が特定の抗原を特異的に認識するおよび特定の抗原に特異的に結合することを表す。それは、タンパク質(例えば、GNS、フィラミンA)の一部分であり得、一部分と定義される。本明細書で使用される場合、「抗原性部分」は、抗原性エピトープを含むGNSおよびフィラミンAの一部分を表す。

40

50

## 【0028】

「特異的に結合する」および/または「特異的に認識する」は、本明細書で使用される場合、標的分子に対する結合分子の親和性が非標的分子に対するその結合分子の親和性と比較して高いことを表す。標的分子に特異的に結合する結合分子は、非標的分子を実質的に認識しないまたは非標的分子に実質的に結合しない、例えば、抗体が別の分子に「特異的に結合する」および/または別の分子を「特異的に認識する」ことは、この相互作用がその分子構造、例えば抗原性エピトープの結合特異性の存在に依存することを意味する。例えば、抗体は、非特異的結合および/またはバックグラウンド結合を引き起こす無差別的結合の代わりに、タンパク質分子、例えばGNS、フィラミンAの抗原性エピトープ、および/またはそのポリペプチドフラグメントに特異的に結合する。本明細書で使用される場合、「非特異的結合」および「バックグラウンド結合」は、特異的構造（例えば、特異的な抗原性エピトープ）の存在に依存しない相互作用を表す。

10

## 【0029】

本明細書で使用される場合、「免疫アッセイ」は、標的分子に特異的に結合することができる抗体を使用して標的分子を検出および定量する任意の結合アッセイを表す。

## 【0030】

本明細書で使用される場合、「適当な対照」は、その分子の異常なレベルを特徴とする疾患または障害に罹患していない対象から得られる1つまたは複数の生物学的サンプルおよびその中でのその分子の測定を表す。適当な対照の例は、RAに罹患していない対象由来の生物学的サンプルであり得る。本発明に関する場合、適当な陰性対照サンプルは、本明細書に記載される方法を用いて試験されたときに、T細胞反応性について陽性ではないならば/またはGNS、フィラミンAおよび/もしくはそれらのポリペプチドフラグメントに対する自己抗体の存在を示さないであろう。

20

## 【0031】

「疾患」、「障害」または「状態」という用語は、本明細書で言い換え可能に使用され、身体もしくはいくつかの臓器の状態に何らかの変化があること、機能の発揮と干渉することもしくはそれを妨害することおよび/または不快感、機能障害、苦痛もしくは死等の症状を罹患した人もしくはその人に接触した人々に与えることを表す。疾患または障害はまた、不調 (distemper)、病気 (ailing)、病気 (ailment)、疲弊 (malady)、障害 (disorder)、病気 (sickness)、病気 (illness)、不快感 (complaint) または病気 (affectation) に関連し得る。

30

## 【0032】

本明細書で使用される場合、「処置する (treat)」、「処置 (treatment)」、「処置する (treating)」または「改善」という用語は、その目的が慢性炎症性関節炎 (例えば、関節リウマチ)、それに付随する状態および/または症状の進行または重篤度を好転させる、緩和する、改善する、阻害する、鈍化させるまたは停止させることである治療的処置を表す。「処置」という用語は、RAの少なくとも1つの有害な作用または症状の減少または緩和を含む。処置は通常、1つまたは複数の症状または臨床マーカー (例えば、GNS、フィラミンAまたは環状シトルリン化ペプチド (抗CCP) および/またはリウマチ因子の1つまたは複数に対する抗体) が減少する場合に「有効」である。あるいは、または加えて、処置は、疾患の進行が減少または停止する場合に「有効」である。すなわち、「処置」は、処置の非存在下で予想されるものと比較した、症状またはマーカーの改善だけでなく症状の進行または悪化の停止または少なくとも鈍化も含む。したがって慢性炎症性関節炎、例えばRAの場合、「有効な処置」は、例えば、本明細書に記載される方法によって決定される場合、処置前に観察されるものとの比較で、炎症、腫れおよび関節痛、骨変形を減少させ得、ならば/またはGNS、フィラミンAおよび/もしくはそれらのポリペプチドに対するTもしくはB細胞反応性を減少させ得、ならば/またはGNS、フィラミンAおよび/もしくはそれらのポリペプチドに対する自己抗体を減少させ得る。有益または望ましい臨床結果は、1つもしくは複数の症状の緩和、疾患の規模の縮小、疾患の安定化 (すなわち、悪化しない) 状態、疾患の進行の遅延もしくは鈍化、疾患状態の改善もしくは緩和、寛解

40

50

(部分的か完全かによらず)、および/または死亡率の低下を含むがこれらに限定されない。例えば、処置は、その状態が安定化する場合に有効とみなされる。疾患の「処置」という用語はまた、(緩和処置を含む)その疾患の症状または副作用からの解放の提供を含む。

#### 【0033】

本明細書で使用される場合、「対象」、「患者」、「個体」等の用語は、言い換え可能に使用され、脊椎動物、好ましくは哺乳類、より好ましくは霊長類、さらにより好ましくはヒトを表す。哺乳類は、非限定的に、ヒト、霊長類、げっ歯類、野良動物、養殖動物、競技用動物およびペットを含む、野生または家畜動物を含む。霊長類は、例えば、チンパンジー、カニクイザル、クモザルおよびマカク、例えばアカゲザルを含む。げっ歯類は、例えば、マウス、ラット、ウッドチャック、フェレット、ウサギおよびハムスターを含む。家畜および狩猟動物は、例えば、ウシ、ウマ、ブタ、シカ、バイソン、バッファロー、猫種、例えばイエネコ、および犬種、例えばイヌ、キツネ、オオカミ、鳥類種、例えばニワトリ、エミュ、ダチョウならびに魚類、例えばマス、ナマズおよびサケを含む。「個体」、「患者」および「対象」という用語は、本明細書で言い換え可能に使用される。1つの態様において、対象は、雄性である。別の態様において、対象は、雌性である。

10

#### 【0034】

好ましくは、対象は哺乳類である。哺乳類は、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマまたはウシであり得るが、これらの例に限定されない。ヒト以外の哺乳類は、RAに関連する状態または障害の動物モデルである対象として使用される利点を有する。そのようなモデルは、当技術分野で公知であり、(71)に記載されている。加えて、本明細書に記載される組成物および方法は、家畜動物および/またはペットを診断するために使用され得る。

20

#### 【0035】

対象は、以前に慢性炎症および/または自己免疫疾患(例えば、RA)に罹患していると診断されたもしくは判定されたまたはそれらについて医学的監視下にある対象であり得る。対象は、RAと診断され現在処置を受けている、または処置、観察、現在の治療的処置の調整もしくは修正を模索されている、または例えば家族歴からRAを発症する危険がある、RAに関連する対立遺伝子もしくは遺伝子型(例えば、HLA-DRB1\*0101およびDRB1\*0401、HLA-A-DRB1\*0405およびDRB1\*0408)を有している対象であり得る。対象は、自己免疫疾患(例えば、RA)の1つまたは複数の症状(例えば、関節の腫れ、関節痛)を示し得る。対象は、RA関連因子に関して他のアッセイで試験され陽性であった者であり得る。そのような因子は、リウマチ因子、抗シトルリン化タンパク質抗体(ACPA)、RAに関連するHLA-DR対立遺伝子の1つもしくは複数、または他の自己抗原を含む。対象は、自己免疫疾患の1つまたは複数の症状を欠く者であり得る。対象は、他のRA関連因子(リウマチ因子、抗シトルリン化タンパク質抗体(ACPA)、HLA-DR対立遺伝子の1つまたは複数、および他の自己抗原)について試験され陰性であると判定された者であり得る。

30

#### 【0036】

本明細書で使用される場合、「タンパク質」、「ペプチド」および「ポリペプチド」という用語は、言い換え可能に使用され、隣接する残基のアルファ・アミノ基とカルボキシ基の間の結合によって相互に接続されたひとつながりのアミノ酸残基を表す。「タンパク質」、「ペプチド」および「ポリペプチド」という用語は、その大きさまたは機能によらず、修飾アミノ酸(例えば、リン酸化、糖化、グリコシル化等)およびアミノ酸アナログを含むアミノ酸のポリマーを表す。「タンパク質」および「ポリペプチド」は多くの場合、比較的長いポリペプチドを表すために使用され、一方「ペプチド」という用語は多くの場合、小さなポリペプチドを表すために使用されるが、当技術分野におけるこれらの用語の用法は重複している。「タンパク質」、「ペプチド」および「ポリペプチド」という用語は、遺伝子産物およびそのフラグメントを表す場合、本明細書で言い換え可能に使用される。

40

#### 【0037】

50

「統計的に有意」または「有意」という用語は、統計的有意性を表し、通常、2標準偏差（2SD）またはそれ以上の相違を意味する。

【0038】

細胞生物学および分子生物学における共通用語の定義は、「The Merck Manual of Diagnosis and Therapy」、第19版、Merck Research Laboratories発行、2006年（ISBN 0-911 910-19-0）；Robert S. Porterら（編）、The Encyclopedia of Molecular Biology、Blackwell Science Ltd.発行、1994年（ISBN 0-632-02182-9）；Immunology by Werner Luttmann、Elsevier発行、2006年において見出され得る。分子生物学における共通用語の定義は、Benjamin Lewin、Genes X、Jones & Bartlett Publishing発行、2009年（ISBN-10:07 63766321）；Kendrewら（編）、Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference、VCH Publishers, Inc.発行、1995年（ISBN 1-56081-569-8）およびCurrent Protocols in Protein Sciences 2009、Wiley Intersciences、Coliganら編においても見出され得る。

10

【0039】

それ以外のことが示されていない限り、本発明は、例えば、すべてそれらの全体が参照により本明細書に組み入れられる、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual（第3版）、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA（2001）；Davisら、Basic Methods in Molecular Biology、Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA（1995）；Current Protocols in Protein Science (CPPS) (John E. Coliganら編, John Wiley and Sons, Inc.)、Current Protocols in Cell Biology (PCB) (Juan S. Bonifacinoら編, John Wiley and Sons Inc.)およびCulture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique by R. Ian Freshney、発行: Wiley-Liss; 第5版(2005)、Animal Cell Culture Methods (Methods in Cell Biology, 第57巻, Jennie P. Mather and David Barnes, Academic Press編, 第1版, 1998)に記載される標準的な手順を用いて実施された。

20

【0040】

本開示の実施または試験の際には本明細書に記載されているのと同様または同等の方法および材料を使用することができるが、以下には適当な方法および材料が記載されている。「例えば (e.g.)」という略語は、ラテン語の *exempli gratia* に由来し、本明細書において非限定的な例を示すために使用される。したがって、「例えば (e.g.)」という略語は、「例えば (for example)」という用語と同義である。

30

【0041】

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用される場合、「一つの (a)」、「一つの (an)」および「その (the)」という単数形は、文脈がそれ以外のことを明確に示していない限り、複数の参照を包含する。したがって、例えば、「方法 (the method)」の参照は、1つもしくは複数の方法、ならびに / または本明細書に記載されるおよび / もしくは本開示を読んだ当業者に明らかとなるタイプの段階等を包含する。

【0042】

本願および特許請求の範囲において、単数形の使用は、それ以外のことが具体的に示されていない限り、複数を含む。加えて、「または、もしくは」の使用は、それ以外のことが示されていない限り、「および / または、および / もしくは、ならびに / または、ならびに / もしくは」を意味する。さらに、「含む (including)」という用語ならびに「含む (includes)」および「含まれる (included)」等の他の形態の使用は、非限定である。また、「要素 (element)」または「成分 (component)」等の用語は、それ以外のことが具体的に示されていない限り、1の単位を含む要素および成分ならびに2以上の単位を含む要素および成分の両方を包含する。

40

【図面の簡単な説明】

【0043】

(図1A) RAまたはライム関節炎 (LA) 患者の滑膜組織 (ST)、滑液単核細胞 (SFMC) または末梢血単核細胞 (PBMC) 中で同定されたHLA-DR提示ペプチドおよびそれらのソー

50

スタンパク質における重複度を示している。このベン図は、個々のRAもしくはLA患者またはRAおよび/もしくはLA集団全体のST、SFMCまたはPBMCで同定された共通ペプチドまたはソースタンパク質の数を示している。RA2またはLA5患者において同定された(図1A)共通ペプチド。すべてのペプチド比較は、独自ソフトウェアを用い、コンセンサス一致、非冗長の同定ペプチドに基づいて行った。集団間で一致したソースタンパク質のコンセンサスは、Microsoft Accessクエリーを用いてソースタンパク質のアクセッション番号を照合することによってひとまとめにした。

(図1B) RAまたはライム関節炎(LA)患者の滑膜組織(ST)、滑液単核細胞(SFMC)または末梢血単核細胞(PBMC)中で同定されたHLA-DR提示ペプチドおよびそれらのソースタンパク質における重複度を示している。このベン図は、個々のRAもしくはLA患者またはRAおよび/もしくはLA集団全体のST、SFMCまたはPBMCで同定された共通ペプチドまたはソースタンパク質の数を示している。RA2またはLA5患者において同定された(図1B)共通ソースタンパク質。すべてのペプチド比較は、独自ソフトウェアを用い、コンセンサス一致、非冗長の同定ペプチドに基づいて行った。集団間で一致したソースタンパク質のコンセンサスは、Microsoft Accessクエリーを用いてソースタンパク質のアクセッション番号を照合することによってひとまとめにした。

(図1C) RAまたはライム関節炎(LA)患者の滑膜組織(ST)、滑液単核細胞(SFMC)または末梢血単核細胞(PBMC)中で同定されたHLA-DR提示ペプチドおよびそれらのソースタンパク質における重複度を示している。このベン図は、個々のRAもしくはLA患者またはRAおよび/もしくはLA集団全体のST、SFMCまたはPBMCで同定された共通ペプチドまたはソースタンパク質の数を示している。RA、LA、またはRAおよびLA集団において同定された(図1C)共通ペプチド。すべてのペプチド比較は、独自ソフトウェアを用い、コンセンサス一致、非冗長の同定ペプチドに基づいて行った。集団間で一致したソースタンパク質のコンセンサスは、Microsoft Accessクエリーを用いてソースタンパク質のアクセッション番号を照合することによってひとまとめにした。

(図1D) RAまたはライム関節炎(LA)患者の滑膜組織(ST)、滑液単核細胞(SFMC)または末梢血単核細胞(PBMC)中で同定されたHLA-DR提示ペプチドおよびそれらのソースタンパク質における重複度を示している。このベン図は、個々のRAもしくはLA患者またはRAおよび/もしくはLA集団全体のST、SFMCまたはPBMCで同定された共通ペプチドまたはソースタンパク質の数を示している。RA、LA、またはRAおよびLA集団において同定された(図1D)共通ソースタンパク質。すべてのペプチド比較は、独自ソフトウェアを用い、コンセンサス一致、非冗長の同定ペプチドに基づいて行った。集団間で一致したソースタンパク質のコンセンサスは、Microsoft Accessクエリーを用いてソースタンパク質のアクセッション番号を照合することによってひとまとめにした。

(図2A) 多量、高精度ペプチドフラグメントイオンが、配列全体を網羅することができ、かつアスパラギンの脱アミドをアルギニンのシトルリン化から明確に区別できることを示している。(図2A)患者RA3の滑膜組織から回収されたMHCクラスII提示ペプチドの混合物の分析における、LTQ-Orbitrap XL MSによるイオントラップを用いて記録されたCID MS2スペクトル。このスペクトルは、ソースタンパク質B6V6K3 MHCクラスI抗原(フラグメント)由来の修飾型ペプチド:

<sup>27</sup>VNDTQFVRFSDAASPRG<sup>44</sup> (SEQ ID NO: 5)

に割り当てられた。第2および第8残基の間では配列を定義するフラグメントイオンが観察されなかったが、R8におけるアルギニンからシトルリンへの変換の翻訳後修飾が、2つのタンパク質データベース検索プログラムによって割り当てられた。注釈: ° H2Oの喪失; \* NH3の喪失。

(図2B-1) 多量、高精度ペプチドフラグメントイオンが、配列全体を網羅することができ、かつアスパラギンの脱アミドをアルギニンのシトルリン化から明確に区別できることを示している。(図2B) Q Exactive plus MSを用いて記録された同一成分のHCD MS2スペクトルにより、ペプチド配列に対する翻訳後修飾として、N2におけるアスパラギン脱アミドが明確に割り当てられた。注釈: ° H2Oの喪失; \* NH3の喪失。

10

20

30

40

50

(図2B-2) 多量、高精度ペプチドフラグメントイオンが、配列全体を網羅することができ、かつアスパラギンの脱アミドをアルギニンのシトルリン化から明確に区別できることを示している。(図2B) Q Exactive plus MSを用いて記録された同一成分のHCD MS 2スペクトルにより、ペプチド配列に対する翻訳後修飾として、N2におけるアスパラギン脱アミドが明確に割り当てられた。注釈：° H2Oの喪失；\* NH3の喪失。

(図3A-1) RAまたはLA患者において免疫原性であることが同定されたHLA-DR提示ペプチドのタンデム質量スペクトルを示している。(図3A) 内皮細胞成長因子由来の

<sup>340</sup>LGRFERMLAAQGVDPG<sup>355</sup> (SEQ ID NO: 6)

が、OMSSAによってLA1 STから同定された(22)。注釈：° H2Oの喪失；\* NH3の喪失。

(図3A-2) RAまたはLA患者において免疫原性であることが同定されたHLA-DR提示ペプチドのタンデム質量スペクトルを示している。(図3A) 内皮細胞成長因子由来の

<sup>340</sup>LGRFERMLAAQGVDPG<sup>355</sup> (SEQ ID NO: 6)

が、OMSSAによってLA1 STから同定された(22)。注釈：° H2Oの喪失；\* NH3の喪失。

(図3B-1) RAまたはLA患者において免疫原性であることが同定されたHLA-DR提示ペプチドのタンデム質量スペクトルを示している。

(図3B) アポリポタンパク質B-100由来の

<sup>655</sup>IEGNLIFDPNNYLPK<sup>669</sup> (SEQ ID NO: 7)

がMascotおよびX!Tandemによって共通してLA5 STから同定された(23)。注釈：° H2Oの喪失；\* NH3の喪失。

(図3B-2) RAまたはLA患者において免疫原性であることが同定されたHLA-DR提示ペプチドのタンデム質量スペクトルを示している。

(図3B) アポリポタンパク質B-100由来の

<sup>655</sup>IEGNLIFDPNNYLPK<sup>669</sup> (SEQ ID NO: 7)

がMascotおよびX!Tandemによって共通してLA5 STから同定された(23)。

(図3C-1) RAまたはLA患者において免疫原性であることが同定されたHLA-DR提示ペプチドのタンデム質量スペクトルを示している。注釈：° H2Oの喪失；\* NH3の喪失。

(図3C) マトリクスメタロプロテイナーゼ-10(ストロメライシン2)由来の

<sup>208</sup>GTNLFLVAAHELGH<sup>222</sup> (SEQ ID NO: 8)

が、MascotによってLA4 STから同定された(24)。注釈：° H2Oの喪失；\* NH3の喪失。

(図3C-2) RAまたはLA患者において免疫原性であることが同定されたHLA-DR提示ペプチドのタンデム質量スペクトルを示している。

(図3C) マトリクスメタロプロテイナーゼ-10(ストロメライシン2)由来の

<sup>208</sup>GTNLFLVAAHELGH<sup>222</sup> (SEQ ID NO: 8)

が、MascotによってLA4 STから同定された(24)。注釈：° H2Oの喪失；\* NH3の喪失。

(図3D) RAまたはLA患者において免疫原性であることが同定されたHLA-DR提示ペプチドのタンデム質量スペクトルを示している。

(図3D) アネキシンA2由来の

<sup>285</sup>DKVLIRIMVSRSEVD<sup>299</sup> (SEQ ID NO: 9)

が、Mascot、OMSSAおよびX!Tandemによって共通してRA1 STから同定された(25)。注釈：° H2Oの喪失；\* NH3の喪失。

(図3E-1) RAまたはLA患者において免疫原性であることが同定されたHLA-DR提示ペプチドのタンデム質量スペクトルを示している。

(図3E) フィラミンA由来の

<sup>2446</sup>NPAEFVVNTSNAGAG<sup>2460</sup> (SEQ ID NO: 1)

が、Mascot、OMSSAおよびX!Tandemによって共通してRA2 STから同定され(同じペプチドが、Mascot、OMSSAおよびX!Tandemによって共通してRA2 PBからも同定された)(26)。注釈：° H2Oの喪失；\* NH3の喪失。

(図3E-2) RAまたはLA患者において免疫原性であることが同定されたHLA-DR提示ペプチドのタンデム質量スペクトルを示している。

(図3E) フィラミンA由来の

10

20

30

40

50

<sup>2446</sup>NPAEFVVNTSNAGAG<sup>2460</sup> (SEQ ID NO: 1)

が、Mascot、OMSSAおよびX!Tandemによって共通してRA2 STから同定され（同じペプチドが、Mascot、OMSSAおよびX!Tandemによって共通してRA2 PBからも同定された）(26)。注釈：° H2Oの喪失；\* NH3の喪失。

(図3F-1) RAまたはLA患者において免疫原性であることが同定されたHLA-DR提示ペプチドのタンデム質量スペクトルを示している。

(図3F) N-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼ由来の

<sup>222</sup>FEPFFMMIATPAPH<sup>235</sup> (SEQ ID NO: 2)

が、Mascot、OMSSAおよびX!Tandemによって共通してRA2 STから同定された(26)。注釈：° H2Oの喪失；\* NH3の喪失。

10

(図3F-2) RAまたはLA患者において免疫原性であることが同定されたHLA-DR提示ペプチドのタンデム質量スペクトルを示している。

(図3F) N-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼ由来の

<sup>222</sup>FEPFFMMIATPAPH<sup>235</sup> (SEQ ID NO: 2)

が、Mascot、OMSSAおよびX!Tandemによって共通してRA2 STから同定された(26)。注釈：° H2Oの喪失；\* NH3の喪失。

20

(図4) 臨床的特徴、患者例RA2から同定されたHLA-DR提示ペプチドおよびソースタンパク質の数を示している。患者の滑膜組織から同定された89個のHLA-DR提示ペプチドのうち1個およびある女性の末梢血から同定された15個のHLA-DR提示ペプチドのうち1個が、IFN $\gamma$ を誘導するようその患者のPBMCを誘導した。これらの反応性ペプチドは、それぞれタンパク質GNSおよびフィラミンA由来であった。

(図5) 図5A~5Bは、フィラミンAに対するTおよびB細胞の自己反応性を示すプロットである。(図5A) 健常対照(HC)対象またはRA患者由来のPBMCを、フィラミンAペプチドおよび無差別HLA-DR結合体(無差別T細胞エピトープ)であると予想される3つのさらなるフィラミンAペプチドに対するT細胞の自己反応性について試験した。各アッセイはまた、陽性対照(PHA)および陰性対照(ペプチドなし)を含み、T細胞の反応性を、IFN $\gamma$ 酵素連結免疫スポット(ELISpot)アッセイを用いて測定した。10<sup>5</sup>あたりのスポット形成単位(SFU)を計算した。陽性応答は、健常対照対象の平均SFU/10<sup>6</sup>細胞を3標準偏差上回るもの(灰色影付き領域より上の部分)と定義した。(図5B) HC対象、RA患者またはライム関節炎(LA)患者の血清におけるIgG抗フィラミンAのレベルを、酵素連結免疫吸着アッセイ(ELISA)によって測定した。プレートに、組み換えヒトフィラミンAでコーティングし、そのウェルを、各試験対象由来の血清サンプルと共にインキュベートした。対照として、ウェルをまた、組み換えIgG抗フィラミンA(陽性対照)または緩衝液(陰性対照)と共にインキュベートした。結合したIgG抗フィラミン抗体を、セイヨウワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ヒトIgGおよびその後TMB基質を用いて検出した。影付き灰色領域は、HC対象の平均を3標準偏差上回るものに対応する。各患者グループにおける陽性応答率が、グラフの下に示されている。P値は、対応のないt検定を用いて計算した。水平線は、各データセットの平均を示している。この疾患関連自己抗原を同定するために使用された方法は、参考文献(22,30)に記載されている。

30

(図6) 図6A~6Bは、N-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼに対するTおよびB細胞の自己反応性を示すプロットである。(図6A) 健常対照(HC)対象またはRA患者由来のPBMCを、RA患者の滑膜組織から同定されたGNSペプチドおよび無差別HLA-DR結合体(無差別T細胞エピトープ)であると予想される3つのさらなるGNSペプチドに対するT細胞の自己反応性について試験した。各アッセイはまた、陽性対照(PHA)および陰性対照(ペプチドなし)を含み、T細胞の反応性を、IFN $\gamma$ 酵素連結免疫スポット(ELISpot)アッセイを用いて測定した。10<sup>5</sup>あたりのスポット形成単位(SFU)を計算した。陽性応答は、健常対照対象の平均SFU/10<sup>6</sup>細胞を3標準偏差上回るもの(灰色影付き領域より上の部分)と定義した。(図6B) HC対象、RA患者またはライム関節炎(LA)患者の血清におけるIgG抗GNSのレベルを、酵素連結免疫吸着アッセイ(ELISA)によって測定した。プレートに、組み換えヒトGNSでコーティングし、そのウェルを、各試験対象由来の血清サンプルと共にイ

40

50

ンキュベートした。対照として、ウェルをまた、組み換えIgG抗GNS（陽性対照）または緩衝液（陰性対照）と共にインキュベートした。結合したIgG抗GNS抗体を、セイヨウワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ヒトIgGおよびその後TMB基質を用いて検出した。影付き灰色領域は、HC対象の平均を3標準偏差上回るものに対応する。各患者グループにおける陽性応答率が、グラフの下に示されている。P値は、対応のないt検定を用いて計算した。水平線は、各データセットの平均を示している。この疾患関連自己抗原を同定するために使用された方法は、参考文献（22,30）に記載されている。

（図7）サンドイッチELISAによって決定されたGNSタンパク質の血清レベルを示している。陽性は、正常対照の平均よりも $>3SD$ 以上（影付き領域より上の部分）で計算した。HC、健常対照；SLE、全身性エリテマトーデス；他のA、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、骨関節炎；LA、ライム関節炎；RA、関節リウマチ。RA患者の13%が、高い血清GNSタンパク質レベルを有していた。

10

（図8）サンドイッチELISAによって決定されたフィラミンAタンパク質の血清レベルを示している。陽性は、正常対照の平均よりも $>3SD$ 以上（影付き領域より上の部分）で計算した。HC、健常対照；SLE、全身性エリテマトーデス；他のA、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、骨関節炎；LA、ライム関節炎；RA、関節リウマチ。RA患者の24%が、高い血清フィラミンAタンパク質レベルを有していた。

（図9）ヒトGNSのアミノ酸配列（Genbankアクセッション番号NP\_002067.1）（SEQ ID NO:3）を示している。

（図10-1）ヒトフィラミンAのアミノ酸配列（Genbankアクセッション番号NP\_001104026.1を参照のこと）（SEQ ID NO:4）を示している。

20

（図10-2）ヒトフィラミンAのアミノ酸配列（Genbankアクセッション番号NP\_001104026.1を参照のこと）（SEQ ID NO:4）を示している。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0044】

#### 詳細な説明

本発明の局面は、リソソーム酵素であるN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼ（GNS）およびアクチン結合タンパク質であるフィラミンAが、関節リウマチ患者の部分集団において自己抗原性であるという発見に関連する。GNSおよびフィラミンAは、RA患者におけるT細胞および/またはB細胞応答の標的である。これは、RA患者由来の末梢血単核細胞（PBMC）または滑液単核細胞（SFMC）がGNSおよびフィラミンAの自己抗原性ペプチドによって刺激されることを実証することによって示された。これはまた、RA患者が、GNSおよびフィラミンAに特異的に結合する抗体を有することを実証することによって示された。これらの発見は、GNSおよびフィラミンAならびにそれらの免疫原性ポリペプチドを、対象における免疫反応性を判定するために使用することができ、その免疫反応性がRA疾患の指標となることを示している。

30

##### 【0045】

本発明の1つの局面は、対象がフィラミンAおよび/またはN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼに対する免疫学的反応性を示すかどうかを決定することによる、対象において関節リウマチを診断する方法に関する。適当な対照と比較した、フィラミンAおよびN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つまたは複数に対する対象の免疫学的反応性は、対象が関節リウマチを患っていることを示す。

40

##### 【0046】

そのタンパク質に対する対象の免疫反応性は、例えば、抗体または免疫細胞（例えば、T細胞）を含む生物学的サンプルを対象から取得し、次いでその生物学的サンプルを自己抗原免疫反応性についてアッセイすることによって決定される。分子（例えば、タンパク質）に対する免疫反応性は、全長分子またはその1つもしくは複数の代表的フラグメントもしくはエピトープを用いて決定され得る。対象によって示される免疫学的反応性は、T細胞反応性またはB細胞反応性であり得る（例えば、フィラミンAおよび/またはN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼに特異的に結合する抗体を有する）。対象のT細胞およ

50

びB細胞反応性は、当技術分野で公知の様々な方法によって決定され得る。

【0047】

典型的に、T細胞反応性は、全長分子の抗原性フラグメントによって示される。B細胞反応性は、全長タンパク質を用いて決定され得るが、いくつかの態様において、より短いフラグメントが使用され得る。当技術分野で公知の任意の方法が、免疫学的反応性を同定するために使用され得る。

【0048】

本発明の1つの局面は、対象においてフィラミンAおよび/もしくはN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼタンパク質またはそれらのポリペプチドフラグメントに特異的に結合する抗体の存在を同定することによる、対象において関節リウマチを診断する方法に関する。このアッセイは、対象から取得された生物学的サンプルと全長タンパク質またはその代表的フラグメント（試験抗原と称される）を、抗体およびポリペプチドの免疫複合体の形成が可能な条件下で接触させ、次いで免疫複合体の存在についてアッセイすることを含む。抗体・抗原複合体の存在を検出する様々な方法、例えばELISA、凝集試験、直接免疫蛍光アッセイ、間接免疫蛍光アッセイ、放射免疫アッセイ、および免疫プロットアッセイが、当技術分野で利用可能であり、これらは本明細書に記載される方法において使用するのに適している。様々な免疫アッセイ形式が、特定のタンパク質に対して特異的に免疫反応する抗体を選択するために使用され得る（例えば、特異的な免疫反応性を決定するために使用することができる免疫アッセイ形式および条件の詳細について、Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988)を参照のこと）。1つの態様において、アッセイは、その標識の検出を通じて複合体の検出を容易にするために使用される、検出可能な標識を用いるものである。試験サンプルに存在する標識は、陽性対照に存在するおよび/または陰性対照に存在しない標識と比較される。適当な対照は、当業者によって決定され得る。1つの態様において、陰性対照は、例えば健常な対象から取得される同タイプの生物学的サンプルである。1つの態様において、陰性対照は、対象が免疫反応性を示さないタンパク質を用いて、その対象の同じサンプルで行われる。

10

20

【0049】

バックグラウンド（例えば、陰性対照におけるレベル）を超える有意なレベルの抗体複合体の検出を示す反応性は、陽性の結果を示す。1つの態様において、反応性は、標識の検出によって判定される。1つの態様において、対照の（例えば、健常対照対象の）サンプルの平均を 3標準偏差（SD）上回る反応性の測定は、陽性の結果とみなされる。1つの態様において、バックグラウンド（健常対照対象から取得されたサンプルのシグナル）を少なくとも2倍上回る結果が、陽性を示す。1つの態様において、より高いレベルの検出が、陽性の結果を示すために使用される（例えば、バックグラウンドを少なくとも3倍、4倍または5倍上回るもの）。

30

【0050】

本発明の1つの局面は、対象においてGNSおよび/またはフィラミンAに対して特異的に反応するT細胞の存在を同定することによる、対象において関節リウマチを診断する方法に関する。これは典型的に、対象からT細胞を含む生物学的サンプルを取得し、その生物学的サンプル中の細胞をフィラミンAおよび/またはN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つまたは複数のポリペプチドフラグメント（試験フラグメントとも称される）に暴露し、そして試験フラグメントに対する応答、例えば刺激または増殖についてアッセイすることにより達成される。1つの態様において、（例えば、生物学的サンプル中のまたは生物学的サンプルから取得された）対象の末梢血単核細胞（PBMC）または滑液単核細胞（SFMC）が、インビトロで、刺激を促進する条件下で試験抗原と接触される。次いで細胞は、刺激を示す応答について観察される。1つの態様において、刺激を示すインビトロでのT細胞増殖または上清へのサイトカイン産生（例えば、IFN- $\gamma$ ）が、観察される。適当な対照サンプルのそれを実質的に上回る応答（例えば、T細胞増殖またはサイトカイン分泌）の同定は、刺激が起こったことを示す。T細胞活性化を示す1つまたは複数のサイトカインのレベルが、T細胞活性化の指標として細胞の上清において観察され得る。1つのそ

40

50

のようなサイトカインは、IFN- $\gamma$  である。他の観察されるサイトカインは、非限定的に、IL-17、IL-12およびIL-10を含む。そのようなサイトカインの1つまたは複数のレベルが観察され得る。IFN- $\gamma$ 、IL-17および/もしくはIL-12の有意な増加、ならびに/またはIL-10レベルの有意な減少が、活性化を示す。

【0051】

刺激の検出は、サンプルが試験抗原に対して免疫学的に反応性である免疫学的細胞を含むことを示し、このことはさらに、サンプルを採取された対象が、試験抗原に対して免疫学的に反応性であることを示す。言い換えれば、陽性のアッセイ結果は、試験抗原が対象における自己抗原であること、および対象が関節リウマチを患っていることを示す。この方法において使用される典型的なアッセイは、T細胞増殖アッセイ、例えば<sup>3</sup>H-チミジン取り込みアッセイ、CFSE希釈またはELISPOTならびにT細胞反応性アッセイである。T細胞反応性を決定する方法は、当技術分野で周知であり、例えば、US5750356Aに記載されている。

10

【0052】

バックグラウンド（例えば、陰性対照におけるそれ）を上回る有意なレベルの刺激の検出を示す反応性は、陽性の結果を表すものと捉えられる。1つの態様において、健常対照対象のサンプルの平均を 3標準偏差（SD）上回る刺激の測定は、陽性の結果とみなされる。1つの態様において、バックグラウンド（健常対照対象から取得されたサンプルのシグナル）を少なくとも2倍上回る結果が、陽性を示す。1つの態様において、より高いレベルの刺激が、陽性の結果を示すために使用される（例えば、バックグラウンドよりも少なくとも3倍、4倍または5倍上回るもの）。

20

【0053】

本明細書に記載される方法において使用される試験抗原は、非限定的に、全長GNS、フィラミンAおよび/またはそれらのポリペプチドフラグメントを含む。

【0054】

GNSは、ヘパリン、ヘパラン硫酸およびケラタン硫酸の異化に関与するリソソーム酵素である。本明細書に開示される方法およびキットのGNSは、全長GNSタンパク質、そのポリペプチドフラグメント、その誘導体またはその抗原性部分であり得る。GNSポリペプチドは、哺乳類GNSであり得る。GNSはまた、全長GNSまたはそのポリペプチドフラグメントのアイソフォームであり得る。いくつかの態様において、本明細書に開示される方法およびキットのGNSは、図9に示されるアミノ酸配列（SEQ ID NO:3）を有するヒトGNS由来であり得る。（その全体が本明細書に組み入れられる、Genbankアクセッション番号NP\_002067.1を参照のこと。）

30

【0055】

いくつかの態様において、本明細書に記載される方法およびキットのGNSは、SEQ ID NO:3のアミノ酸配列を有するヒト全長GNSを含むまたはそれ由来のポリペプチドフラグメントであり得る。ポリペプチドフラグメントは、SEQ ID NO:3のGNSの免疫学的反応性の少なくとも約70%、80%、90%、100%または100%超を有する、SEQ ID NO:3の少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20またはそれ以上の連続するアミノ酸の全長GNSのフラグメントを表す。いくつかの態様において、ポリペプチドフラグメントは、アミノ酸：

40

FEPFFMMIATPAPH (SEQ ID NO: 2)

を含む。免疫学的反応性は、GNSに対するT細胞反応性またはB細胞応答によって決定され得、本明細書に記載されるアッセイによって当業者によりアッセイされ得る。T細胞反応性のアッセイの例は、非限定的に、GNSに応じて対象のPBMCまたはSFMCにおいて誘導される、インビトロT細胞増殖の測定、インビトロIFN- $\gamma$  分泌の測定を含む。B細胞応答のアッセイの例は、非限定的に、生物学的サンプルにおける、GNSを特異的に認識するおよび/またはGNSに特異的に結合する自己抗体の検出および/または測定を含む。

50

## 【 0 0 5 6 】

使用されるGNSまたはそのフラグメントは、ヒトGNSであり得る。GNSおよびヒト起源の他のアイソフォームおよび多くの動物のそれらのポリペプチドおよびコード核酸配列は、例えばNCBIウェブサイトから、公的に入手可能である。

## 【 0 0 5 7 】

使用されるGNSまたはそのフラグメントは、ヒトGNSの哺乳類ホモログまたはそのポリペプチドフラグメントであり得る。いくつかの態様において、GNSポリペプチドは、SEQ ID NO:3のアミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%または少なくとも99%同一のアミノ酸を有し、かつSEQ ID NO:3のGNSの免疫学的反応性の少なくとも約70%、80%、90%、100%または100%超を有する。いくつかの態様において、GNSポリペプチドは、SEQ ID NO:3のアミノ酸配列に対して少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%または少なくとも99%のアミノ酸配列相同性を有するアミノ酸配列を有し、かつSEQ ID NO:3のGNSの免疫学的反応性の少なくとも約70%、80%、90%、100%または100%超を有する。いくつかの態様において、GNSは、SEQ ID NO:3のGNSの免疫学的反応性の少なくとも約70%、80%、90%、100%または100%超を有する、SEQ ID NO:3の少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20の連続するアミノ酸のSEQ ID NO:3のポリペプチドフラグメントである。

## 【 0 0 5 8 】

参照配列に対する特定のポリペプチド配列のパーセント(%)アミノ酸配列同一性は、2つの配列のアラインメントを行い、必要に応じて最大のパーセント配列同一性を達成するようギャップを導入した後に、配列同一性の一部として保存的置換を考慮せずに見出される同一アミノ酸残基の比率と定義される。参照配列に対する特定のポリペプチド配列のパーセント(%)アミノ酸配列相同性は、2つの配列のアラインメントを行い、必要に応じて最大のパーセント相同性を達成するようギャップを導入した後に見出される同一または高度に類似するアミノ酸残基の比率と定義される。アミノ酸配列の非同一体としては、GNSまたはフィラミンAの免疫学的反応性に影響しない保存的置換、欠失または付加を含む。高度に類似するアミノ酸は、例えば、当技術分野で公知の保存的置換を含み得る。パーセント同一性および/または相同性は、当技術分野で公知のアラインメント方法を用いて計算され得る、例えば、配列のアラインメントは、公衆利用可能なソフトウェア、例えばBLAST、Align、ClustalW2を用いて実施され得る。当業者は、アラインメントに適したパラメータを決定することができるが、BLASTのデフォルトパラメータが具体的に想定されている。

## 【 0 0 5 9 】

フィラミンA、アルファ(フィラミンA)は、アクチンフィラメントを架橋し、アクチンフィラメントを膜の糖タンパク質に連結するアクチン結合タンパク質である。コードされるタンパク質は、細胞形状および遊走の変化に影響する細胞骨格の再モデリングに関与する。このタンパク質は、インテグリン、膜貫通レポーター複合体および二次メッセンジャーと相互作用する。本明細書に開示される方法およびキットのフィラミンAは、全長フィラミンAタンパク質、そのポリペプチドフラグメント、その誘導體またはその抗原性部分であり得る。使用されるフィラミンAまたはそのフラグメントは、ヒトフィラミンAであり得る。

## 【 0 0 6 0 】

フィラミンAポリペプチドは、哺乳類フィラミンAであり得る。フィラミンAはまた、全長フィラミンAまたはそのポリペプチドフラグメントのアイソフォームであり得る。いくつかの態様において、本明細書に開示される方法およびキットのフィラミンAは、図10に示されるアミノ酸配列(SEQ ID NO:4)を有するヒトフィラミンA由来であり得る。その全体が本明細書に組み入れられる、Genbankアクセッション番号NP\_001104026.1を参照のこと。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 1 】

いくつかの態様において、本明細書に記載される方法およびキットのフィラミンAは、SEQ ID NO:4のアミノ酸配列を有するヒト全長フィラミンAを含むまたはそれ由来のポリペプチドフラグメントであり得る。ポリペプチドフラグメントは、SEQ ID NO:4のフィラミンAの免疫学的反応性の少なくとも約70%、80%、90%、100%または100%超を有する、SEQ ID NO:4の少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20の連続するアミノ酸の全長フィラミンAのフラグメントを表す。いくつかの態様において、ポリペプチドフラグメントは、アミノ酸配列：

NPAEFVVNTSNAGAG (SEQ ID NO: 1)

を含む。免疫学的反応性は、当技術分野で公知のアッセイによって当業者によりフィラミンAに対するT細胞反応性またはB細胞応答によって決定され得、そのいくつかが本明細書に記載されている。T細胞反応性のアッセイの例は、非限定的に、フィラミンAに応じて（例えば、免疫原性ポリペプチドフラグメントを用いて）対象のPBMCまたはSFMCにおいて誘導される、インビトロでのT細胞増殖の測定、インビトロでのIFN- $\gamma$ 分泌の測定を含む。B細胞応答のアッセイの例は、非限定的に、生物学的サンプルにおける、フィラミンAを特異的に認識するおよび/またはフィラミンAに特異的に結合する自己抗体の検出および/または測定を含む。T細胞反応性のアッセイの例は、非限定的に、インビトロでのフィラミンAによる対象のPBMCまたはSFMCによるT細胞増殖およびIFN- $\gamma$ 分泌の測定を含む。

## 【 0 0 6 2 】

いくつかの態様において、ヒトフィラミンAまたはそのポリペプチドフラグメントが使用される。フィラミンAおよびヒト起源の他のアイソフォームならびに多くの動物のそれらのポリペプチドおよびコード核酸配列は、例えばNCBIウェブサイトから、公衆利用可能であり、当技術分野で周知である。

## 【 0 0 6 3 】

いくつかの態様において、本明細書に記載される方法およびキットのフィラミンAは、ヒトフィラミンAの哺乳類ホモログまたはそのポリペプチドフラグメントである。いくつかの態様において、フィラミンAポリペプチドは、SEQ ID NO:4のアミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%または少なくとも99%同一のアミノ酸配列を有し、かつSEQ ID NO:4のフィラミンAの免疫学的反応性の少なくとも約70%、80%、90%、100%または100%超を有する。いくつかの態様において、フィラミンAポリペプチドは、SEQ ID NO:4のアミノ酸配列に対して少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%または少なくとも99%のアミノ酸配列相同性を有するアミノ酸を有し、かつSEQ ID NO:4のフィラミンAの免疫学的反応性の少なくとも約70%、80%、90%、100%または100%超を有する。いくつかの態様において、フィラミンAは、SEQ ID NO:4のフィラミンAの免疫学的反応性の少なくとも約70%、80%、90%、100%または100%超を有する、SEQ ID NO:4の少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20の連続するアミノ酸のSEQ ID NO:4の機能的フラグメントである。

## 【 0 0 6 4 】

完全長タンパク質またはタンパク質フラグメントが、本明細書に記載されるアッセイにおいて使用され得る。タンパク質/フラグメントの組み合わせが異なる自己抗原を表し得る場合、全長タンパク質およびタンパク質フラグメントの組み合わせもまた使用され得る（例えば、同一アッセイにおいてGNSおよびフィラミンA反応性の1つもしくは複数を試験する、または同一患者において並行して試験する）。個々の方法において使用される適当なポリペプチドまたはそのフラグメントは、当業者によって決定され得る。タンパク質またはフラグメントは、組み換えであり得、精製され得、単離され得、天然に存在し得または合成により製造され得る。核酸、タンパク質、細胞またはベクターを表すのに使用され

る「組み換え」という用語は、核酸、タンパク質、ベクターまたはそれらを含む細胞が、異種核酸もしくはタンパク質の導入またはネイティブ核酸もしくはタンパク質の変更によって改変されていること、またはその細胞がそのように改変された細胞由来であることを示す。（「異なる生物に由来する」ことを意味する）「異種」という用語は、多くの場合、移入されるタンパク質がレシピエントとは異なる細胞型または異なる種から当初得られたものであるという事実を表す。典型的に、タンパク質自体は移入されず、そのタンパク質をコードする遺伝物質（多くの場合、相補的DNAまたはcDNA）がレシピエント細胞に添加される。組み換えポリペプチドを作製および単離する方法は、当業者に公知であり、組み換え遺伝学およびタンパク質発現の分野における通常の技術を用いて実施され得る。標準的な組み換え方法については、Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1989); Deutscher, *Methods in Enzymology* 182:83-9 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, NY (1982)を参照のこと。

10

20

30

40

50

**【 0 0 6 5 】**

全長タンパク質または全長タンパク質由来のタンパク質フラグメントのいずれかが、対象において本明細書に開示されるタンパク質に対する免疫反応性を同定するために使用され得る。本明細書に記載されるアッセイにおいて使用される個々の分子（例えば、全長タンパク質、その代表的フラグメントまたは全長およびフラグメントの組み合わせ）は、アッセイの説明の中で「試験抗原」と称される。全長タンパク質のどのフラグメントをアッセイにおいて使用するかは、当業者によって決定され得る。典型的に、同一タンパク質由来のフラグメントのカクテルが、そのタンパク質に対する対象の反応性の決定のために使用される。その長さに依存して、異なるタンパク質フラグメントの数が、当業者によって決定および最適化され得る。1つの態様において、2つまたはそれ以上のタンパク質フラグメントが使用される。1つの態様において、3つまたはそれ以上、4、5、6、7、8、9もしくは10またはそれ以上のタンパク質フラグメントが使用される。1つの態様において、タンパク質フラグメントは、少なくとも8アミノ酸長（例えば、8、9、10、11、12、13、14、15アミノ酸）である。

**【 0 0 6 6 】**

本明細書に記載される方法において使用するために、特定のタンパク質フラグメント、例えば、HLA-DRによる提示が期待されるもの、が同定され得る。そのようなタンパク質フラグメントは、実施例に記載される方法によって、および当業者が利用可能な様々なソフトウェアプログラムによっても同定され得る（Lin et al. *BMC Immunology* 2008, 9: 8）。1つの態様において、TEPITOPE 2000（Sturniolo et al., 1999 *Nature Biotechnology*, 17: 555-561）が使用される。Immune Epitope DatabaseおよびAnalysis Resource（<http://www.iedb.org/>）によって提供される、自由にアクセス可能な他のオンラインプログラムも利用可能である。

**【 0 0 6 7 】**

フィラミンAの具体的なタンパク質フラグメントの例は、非限定的に、**NPAEFVVNTSNAGAG (SEQ ID NO: 1)**を含む。

**【 0 0 6 8 】**

GNSの具体的なタンパク質フラグメントの例は、非限定的に、**FEPFFMMIATPAPH (SEQ ID NO: 2)**を含む。

**【 0 0 6 9 】**

GNSおよびフィラミンAの一方または両方に対する反応性は、単一の対象においてアッセイされ得る。1つの態様において、GNSおよびフィラミンAの両方に対する反応性は、1体の対象においてアッセイされる。1つの態様において、可能性がある他の自己抗原に対する対象の反応性もまた、本明細書に記載されるアッセイと組み合わせて考慮される。1つのそのような自己抗原は、環状シトルリン化ペプチド（CCP）である。変異シトルリン化ピ

メンチン（MCVアッセイ）、フィラグリン由来ペプチド（CCPアッセイ）およびウイルスシトルリン化ペプチド（VCPアッセイ）を用いる、抗シトルリン化タンパク質抗体（ACPA）を検出するための様々なアッセイが、当技術分野で公知である。抗CCPおよび/または他の疾患診断マーカーに対する対象の反応性の決定方法は、当技術分野で公知である。非限定的な例は、CCPおよび血清アミロイドA（SAA）を測定することによりRAを評価する方法を開示するWO 2005/085858を含む。WO 2005/064307およびUS 2007/0264673は、CCPおよびIL-6を測定することによってRAを評価する。WO 2005/029091およびUS 2006/094056は、ヒトから体液をサンプル採取し、CCPの検出により疑われる診断を行う炎症/自己免疫疾患、例えばRAを診断、処置または評価する方法を提供する。US 2007/0148704およびWO 2007/039280は、RAの診断におけるバイオマーカーとしてのCCPおよび抗体の使用を開示している。WO 2006/008183は、RAの様々なバイオマーカーを開示している。

10

#### 【0070】

##### RAの症状

関節リウマチを患っている可能性がある対象は、本明細書に記載される方法によって試験され得る。対象は、この方法を実施する前に、関節リウマチの1つまたは複数の症状を示し得る。関節リウマチ（RA）は、身体の免疫系に関節組織を攻撃させ、関節裏張りに炎症を生じさせる自己免疫疾患である。関節の炎症は、RAの最初の兆候である。RAの初期症状は、影響を受けた関節の腫れ、脆弱化、熱、痛みおよび特に朝の強ばりを含む。朝の強ばりは、少なくとも1時間持続し得る。RAに関連する痛みは、炎症部位で誘導される。RAの他の症状の非限定的な例は、皮膚におけるリウマチ結節の存在、倦怠感、関節の変形および影響を受けた関節の可動範囲の減少、目および口の渇きを含む。RAに関連する初期症状はまた、他の自己免疫関連疾患、例えばループスを患った患者においても、または関節炎の他の形態、例えば骨関節炎においても、または疼痛症候群、線維筋痛においても見られる。したがって、本発明のいくつかの態様において、対象は、RAおよび/または当技術分野で公知の他の自己免疫関連疾患発病、例えば腱滑膜炎、骨粗しょう症、手根管症候群の症状を示す。

20

#### 【0071】

##### 対象における関節リウマチの診断

固有の試験またはRAに特徴的な特性はない。そうではなく、診断は、兆候および症状のパターンを認識することによって行われる。早期段階のRAを患っている対象を同定するための、したがって疾患の診断を補助する症状に基づく分類基準は、当技術分野で公知であり、例えば、1987 American College of Rheumatology (ACR)基準(72)ならびに最近のACRおよびEuropean League Against Rheumatism (EULAR)による2010基準(73)に示されている。

30

#### 【0072】

RAの診断方法は、罹患した関節のX線、MRIおよび/または超音波画像化ならびに血液/血清学的試験を含む。RAの診断のために行われる当技術分野で公知の血液/血清学的試験の非限定的な例は、赤血球沈降速度（ESR）、リウマチ因子（RF）、抗環状シトルリン化ペプチド（抗CCP）、抗核抗体（ANA）、尿酸、対象の血液中の赤血球および白血球、C反応性タンパク質（CRP）の数を測定する全血数、の測定を含む。RAにおいて、HLA-DRB1\*0101および0401対立遺伝子（6,7）を含む10種のHLA-DR対立遺伝子が、最も高い危険を有している。したがって、いくつかの態様において、対象は、リウマチ因子（RF）の1つまたは複数、抗シトルリン化タンパク質抗体（ACPA）およびHLA-DR対立遺伝子の1つまたは複数について試験されているまたはさらに試験される。試験され得るHLA-DR対立遺伝子の非限定的な例は、HLA-DRB1\*0101、HLA-DRB1\*0401を含む。

40

#### 【0073】

いくつかの態様において、本明細書に記載されるタンパク質の1つまたは複数に対する免疫反応性の同定が、RAの診断において使用され得る。いくつかの態様において、本明細書に開示される方法は、RA患者を特定するために使用され得る。いくつかの態様において、本明細書に開示される方法は、RAの鑑別診断のために使用され得る。タンパク質の1つ

50

または複数に対する対象の免疫反応性は、当業者に利用可能な様々な方法により、本明細書に開示される適当な生物学的サンプルを用いてインビトロで決定され得る。

【0074】

本明細書に示されている発見は、GNSおよびフィラミンAに対する反応性が状態（例えば、RAおよび関連症状）の診断のためのバイオマーカーとして使用できることを示している。より詳細に、対象の免疫反応性（例えば、自己抗原反応性T細胞および/または抗自己抗原抗体）が、その状態の指標となる。したがって、本発明の別の局面は、対象がGNSまたはフィラミンAの1つまたは複数に対して免疫学的に反応性であるかどうかを本明細書に記載される方法によって決定することによる、対象において状態（例えば、RA）を診断する方法に関する。この決定は、対象に存在する状態の他のそのような症状、例えば、対象における関節炎症状もしくは対象における神経学的症状、または対象における心臓症状の存在と組み合わせて行われ得る。適当な対照と比較した、対象の免疫学的反応性の決定は、対照がその状態を有しているまたはその状態を発症する可能性があることを示す。その状態は、さらなるタンパク質、例えば、シトルリン化タンパク質に対する抗体（ACPA）、抗核抗体（ANA）、抗好中球細胞質抗体（ANCA）に対する免疫学的反応性の決定ならびにリウマチ因子の存在ならびに当業者に公知および上記の他の診断試験によってさらに確認され得る。

10

【0075】

様々なアッセイが、試験抗原に結合する血清サンプル中に存在する抗体を同定するために使用され得る（例えば、ELISA、凝集試験、直接免疫蛍光アッセイ、間接免疫蛍光アッセイ、ウェスタンブロット、免疫ブロットアッセイ）。例えば、アッセイは、組み換え試験抗原（全長またはペプチドフラグメント）を用いる免疫ブロットであり得る。

20

【0076】

本明細書に記載される方法はまた、リウマチ因子、ACPAおよび/またはANAの決定を含み得る。例えば、本明細書に開示される試験抗原は、Sure-Vue（登録商標）RF（Fishersci）、RFscan（商標）Card Test Kit（BD Biosciences）、Anti-Rheumatoid Factor IgM ELISA Kit（abcam）、AVITEX（登録商標）-RF（Omega diagnostics）Citrullinated Protein Antibodies IgG ELISA Kit（Omega diagnostics）、Anti-CCP EIA（Bio-Rad）、BioPlex（登録商標）2200 Anti-CCP（Bio-Rad）、CCPoint（登録商標）（Eurodiagnostica）、DIASTAT（登録商標）anti-nuclear antibody（ANA）test（Eurodiagnostica）、DIASTAT PR3-ANCA（登録商標）（Eurodiagnostica）等のアッセイに含められ得るまたはそれらのアッセイと組み合わせて使用され得る。タンパク質フィラミンAもしくはGNSまたはそれらのフラグメントが、そのようなキットに含められ得る。

30

【0077】

PBMCおよびSFMC中の試験抗原反応性T細胞は、多くのアッセイを用いて評価され得る。例えば、PBMCおよびSFMC中の反応性T細胞は、組み換えHLA-DR分子および試験抗原エピートープを含む四量体試薬を用いて評価され得る。

【0078】

試験抗原は、そのペプチドの免疫反応性または免疫刺激性がT細胞の活性化および/または抗体の結合を可能にする程度に十分保持される限り、天然に存在するまたはアナログもしくは誘導体アミノ酸を含み得る。したがって、当技術分野で公知のように、いくつかのアミノ酸が、ネイティブタンパク質またはポリペプチドフラグメントに添加され得るまたはそれらから差し引かれ得る。加えて、ネイティブヒトタンパク質またはポリペプチドフラグメントのいくつかのアミノ酸が、他の種に存在するアミノ酸で置換され得るまたは当技術分野で公知のようにして置換され得る。アミノ酸残基間のアミノ酸置換交換グループおよび実験に基づく類似性は、標準的な教科書、例えばSchulz et al., Principles of Protein Structure, 14-16 (Springer-Verlag, New York, 1979)において見出され得る。本来の三次元構造が失われる前に許容され得る置換の数には限界がある。典型的に、三次元構造の保存は、アミノ酸配列が50%を超えて変化する場合に失われるであろう。例えば、Chothia & Lesk, Relation between the divergence of sequence & structure in p

40

50

roteins, 5 EMBO J. 823 (1986)を参照のこと。どのアミノ酸変化が表現型に影響しないかに関する手引きは、Bowie et al., 247 Science 1306 (1990)において見出される。機能に必須のアミノ酸は、当技術分野で公知の方法、例えば、部位特異的変異誘発またはアラニンスキャン変異誘発によって同定され得る。Cunningham et al., 244 Science 1081 (1989)。後者の手順は、分子内の各残基に単一のアラニン変異を導入する。次いで、生じた変異分子が、生物学的活性、例えば抗体結合および/またはT細胞刺激について試験される。リガンド・受容体結合に重要な部位はまた、構造分析、例えば結晶解析、核磁気共鳴または光親和性標識によって決定され得る。Smith et al., 224 J. Mol. Biol. 899 (1992); de Vos et al., 255 Science 306 (1992)。

【0079】

本明細書に記載される自己抗原の遺伝子およびコードされるタンパク質は、配列決定されており、多くの場所で利用可能となっている。さらに、これらの遺伝子は、ヒト、チンパンジー、ラットおよびゼブラフィッシュで保存されている。したがって、これらのペプチドは、非ヒト供給源または適当な配列情報由来のものを含み得る。本発明の1つの局面において、試験ペプチドは、慢性炎症性関節炎（例えば、RA）に関連するHLA-DR分子によって提示されると予想される。

【0080】

上記のように、一般に、アミノ酸置換は、保存的になされるべきである、すなわち、置換アミノ酸は、そのポリペプチドの二次構造および水性が実質的に変化しないとペプチド化学の当業者が考えるよう、類似の特性を有するアミノ酸と置き換えられるべきである。一般に、以下のアミノ酸グループが、保存的变化を表す：(1)アラニン、プロリン、グリシン、グルタミン、アスパラギン、グルタミン酸、アスパラギン酸、セリン、スレオニン；(2)システイン、セリン、チロシン、スレオニン；(3)バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、アラニン、フェニルアラニン；(4)リジン、アルギニン、ヒスチジン；および(5)フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、ヒスチジン。本発明の範囲に含まれる変種はまた、またはあるいは、そのペプチドの刺激特性、抗体結合、三次構造に対して最小限の影響しか有さないアミノ酸の欠失または付加を含む他の修飾を含み得る。したがって、例えば、タンパク質フラグメント内の保存的置換は、特定のアッセイ（例えば、T細胞反応性または免疫アッセイ）が（例えばRAを患っている）対象の診断に関する証拠を提供するよう意図した通り機能するよう、その機能的活性が有意義な程度保持される条件でなされ得る。

【0081】

さらに、ペプチドは、多くの場合、20種の「天然」アミノ酸以外のアミノ酸を含む。さらに、末端アミノ酸を含む多くのアミノ酸は、自然プロセス、例えばプロセッシングおよび他の翻訳後修飾によって、または当技術分野で周知の化学修飾技術によって修飾され得る。公知の修飾は、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合付加、ヘム部分の共有結合付加、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合付加、脂質または脂質誘導体の共有結合付加、ホスファチジルイノシトールの共有結合付加、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、ガンマカルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨード化、メチル化、ミリスチル化、酸化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化（selenoylation）、硫酸化、タンパク質へのアミノ酸のトランスファー-RNA媒介付加、例えばアルギニル化、およびユビキチン化を含むがこれらに限定されない。

【0082】

そのような修飾は、当業者に周知であり、科学文献に非常に詳しく記載されている。いくつかの特に一般的な修飾、例えば、グリコシル化、脂質付加、硫酸化、グルタミン酸残基のガンマカルボキシル化、ヒドロキシル化およびADP-リボシル化は、最も基本的な文献、例えばCreighton, PROTEINS - STRUCTURE & MOLECULAR PROPERTIES (2nd ed., W.H. Freeman & Co., New York, 1993)に記載されている。この主題に関して、多くの詳細なレビ

10

20

30

40

50

ュー、例えば、Wold, POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, 1-12 (Johnson, ed., Academic Press, New York, 1983); Seifter et al. 182 Meth. Enzymol. 626 (1990); Rattan et al., 663 Ann. N.Y. Acad. Sci. 48 (1992)が利用可能である。したがって、本発明のペプチドはまた、置換アミノ酸残基がその遺伝子コードによりコードされるものでない誘導体またはアナログを包含する。

#### 【0083】

さらに、試験抗原の「誘導体」は、通常そのタンパク質の一部ではない付加的な化学的部分を含む。自己抗原の共有結合修飾は、本発明の範囲に含まれる。そのような修飾は、抗体の標的アミノ酸残基を、選択された側鎖または末端残基と反応することができる有機誘導体化剤と反応させることによってその分子に導入され得る。例えば、当技術分野で周知の二官能性剤を用いた誘導体化は、抗体またはフラグメントを水不溶性支持マトリクスまたは他の高分子キャリアに架橋させるのに有用である。誘導体はまた、例えば放射性ヨウ素(125I、131I)、炭素(14C)、硫黄(35S)、トリチウム(3H)等で標識される、放射標識ペプチド; ペプチドとビオチンまたはアビジン、酵素、例えばセイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコアミラーゼ、カルボン酸アンヒドラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、リゾチーム、リンゴ酸デヒドロゲナーゼまたはグルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼとのコンジュゲート; およびモノクローナル抗体と生物発光剤(例えば、ルシフェラーゼ)、化学発光剤(例えば、アクリジンエステル)または蛍光剤(例えば、フィコピリタンパク質)のコンジュゲートも含む。

#### 【0084】

本発明により同定される自己抗原の構造アナログは、本明細書に示される教示および手引きに基づき公知の方法段階によって提供される。タンパク質の三次元構造の把握は、それらがどのようにして機能するかを理解する上で重要である。現在、(配列データベースに数千の公知のタンパク質配列が存在するのに対して)数百のタンパク質の三次元構造が、タンパク質構造データベースにおいて利用可能となっている。これらの構造の分析は、それらが識別可能なモチーフクラスに分類されることを示す。したがって、既知の構造の関連タンパク質に対するそのタンパク質の相同性に基づきタンパク質の三次元構造をモデル化することが可能である。比較的低い配列相同性を有する2つのタンパク質が非常に似た三次元構造またはモチーフを有し得る多くの例も知られている。

#### 【0085】

核磁気共鳴(NMR)により最大約15 kDaのタンパク質の三次元構造を決定することが可能である。この技術は、純粋なタンパク質の濃縮された溶液しか必要としない。結晶体または同形誘導体は必要とされない。多くのタンパク質の構造が、この方法によって決定されている。NMR構造決定の詳細は、当技術分野で周知である。例えば、Wuthrich, NMR of Proteins & Nucleic Acids (Wiley, N.Y., 1986); Wuthrich, 243 Science 45 (1989); Clore et al., 24 Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol. 479 (1989); Cooke et al., 8 Bioassays 52 (1988)を参照のこと。

#### 【0086】

したがって、本発明にしたがい、そのトポグラフィの構造的理解に基づき自己抗原(ペプチドまたはエピトープ)の少なくとも一部分の構造アナログに到達するために、NMRスペクトルデータの使用がコンピュータモデリングと組み合わせられ得る。この情報を用いて、当業者は、その分子の予想される診断用途の要求、例えばより高い結合特異性または親和性、が達成されるようその結合親和性または結合力が調整されたペプチドを作製できる回転ベースのアミノ酸置換によって、自己抗原の構造アナログを達成し得る。

#### 【0087】

本明細書に記載される方法はさらに、試験で陽性であった対象に対して治療を提示するために使用され得る。本明細書に提供される、RAのバイオマーカーとしてのGNSおよび/またはフィラミンAの同定は、慢性炎症性関節炎と戦う上での臨床医の備蓄品への重要な補強であり、臨床医が治療指針を選択するのを支援する。例えば、RAと診断されたとき、

10

20

30

40

50

非ステロイド抗炎症薬（NSAID）（例えば、イブプロフェン、ナプロキセンナトリウム）もしくはステロイド（例えば、コルチコステロイド薬、例えばプレドニゾン）または疾患修飾抗リウマチ薬（DMARD）、例えばヒドロキシクロロキン、スルファサルジンもしくはメトトレキサートが処方され得る。さらにまたはあるいは、抗TNF療法（例えば、HUMIRA（登録商標）（アダリムマブ）、ENBREL（登録商標）（エタネルセプト））が、有益であり得る。他の非限定的な例は、Orencia（登録商標）（アバタセプト）、Kineret（登録商標）（アナキンラ）、セルトリズマブ（登録商標）（Cimzia）、Simponi（登録商標）（ゴリムマブ）、Remicade（登録商標）（インフリキシマブ）、Actemra（登録商標）（トシリズマブ）およびXelijanz（登録商標）（トファシチニブ）。GNSおよび/またはフィラミンA特異的療法、例えばGNSおよび/またはフィラミンAの標的化、例えばGNSおよび/またはフィラミンA結合抗体も有益であり得ることも想定される。1つの態様において、対象は、自己抗原に対して免疫反応性であると指摘された後に、1つまたは複数の治療を提供される。したがって、本発明の別の局面は、RAと診断された対象を処置する方法に関する。この方法は、本明細書に記載される方法の1つまたは複数により対象をその疾患について診断する段階、その後に対象をその状態について処置する段階を含む。診断はさらに、対象を、典型的には二次的なRA症状と共に見られる他の症状、例えば神経学的状態または心臓状態について評価する段階を含み得る。本発明のいくつかの態様において、本明細書に開示される自己抗原に対する免疫反応性を決定する方法は、治療的処置の前、その間および/またはその後実施され得、したがって処置の効果の評価を補助し得るおよび/または疾患の進行を監視し得る。

10

20

**【0088】**

本発明の別の局面は、慢性炎症性関節炎等の状態にある対象を特定するためのキットに関する。このキットは、GNS、フィラミンAまたはそれらの一部分もしくはフラグメントの1つまたは複数、例えば合成ペプチド、フラグメントまたはそれらのエピトープのセット、および試験抗原（GNSおよび/またはフィラミンAに結合する対象由来のサンプル中の抗体）に対する対象の免疫反応性の存在を検出することができるアッセイを実施するために必要とされる試薬を含む。このキットは、本明細書に記載される任意の様々なアッセイ用に設計され得る。1つの態様において、このキットのアッセイは、当技術分野で周知の成分である、酵素連結免疫吸着アッセイ（ELISA）または免疫プロットである。ペプチドは、合成され得るまたは天然源もしくは組み換え源から入手され得、これらは各々当技術分野で周知である。キットはさらに、当技術分野で公知の他の自己抗原、例えば本明細書に記載されるもの（例えば、シトルリン化タンパク質/ペプチド、例えばシトルリン化フィラグリン、フィブリノゲン、フィブロネクチン、 $\alpha$ -エノラーゼ、II型コラーゲン、ヒストン、ピメンチンまたはそれらのフラグメント/エピトープ）を含み得る。あるいは、キットはさらに、緩衝液、酵素および反応または分析を行うための容器を含み得る。キットの様々な試薬は、別々に、または便利なように1つの容器、例えばバイアル、試験管、フラスコ、ボトルもしくは注射器にまとめて提供され得る。成分は、この方法を実施するために適切に小分けされ得る。キットはさらに、1つまたは複数の陽性および/または陰性対照を含み得る。抗原またはキットの他の成分は、検出可能なマーカーによって標識され得る。

30

40

**【0089】**

それ以外のことが本明細書で定義されていない限り、本願において使用される科学技術用語は、当業者に広く理解されている意味を有する。さらに、それ以外のことが文脈により要求されない限り、単数形用語は、複数を包含し、複数の用語は単数を包含する。

**【0090】**

本発明は、本明細書に開示される特定の方法、プロトコルおよび試薬等に限定されず、それらは変更され得ることが理解されるべきである。本明細書で使用される用語は、個々の態様を説明する目的を有するにすぎず、本発明の範囲を限定することは意図されておらず、それはもっぱら特許請求の範囲によって定義される。

**【0091】**

50

実施例以外ではまたはそれ以外のことが示されていない限り、本明細書で使用される成分または反応条件の量を表すすべての数値は、すべての例において、「約」という用語によって修飾されることが理解されるべきである。「約」という用語は、本発明を説明するために百分率と共に使用される場合、 $\pm 1\%$ を意味する。

【0092】

1つの局面において、本発明は、それが必須であるかどうかによらず特定されていない成分を含む余地がある（「含む（comprising）」）、本発明に必須である本明細書に記載される組成物、方法およびそれらの各々の成分に関する。いくつかの態様において、この組成物、方法またはそれらの各々の成分の説明に含まれる他の成分は、本発明の基本的かつ新規の特徴に実質的に影響しないものに限定される（「から本質的になる（consisting essentially of）」）。これは、本明細書において記載される方法内の段階ならびに組成物および成分に等しく適用される。他の態様において、本明細書に記載される本発明、組成物、方法およびそれらの各々の成分は、その成分、組成物または方法にとって必須の要素であるとみなされないあらゆる要素に排他的であることが意図される（「からなる（consisting of）」）。

10

【0093】

特定されているすべての特許、特許出願および刊行物は、解説および開示の目的で、例えば、本発明に関連して使用され得るそのような刊行物に記載の方法論を解説および開示する目的で、明示的に参照により本明細書に組み入れられる。これらの刊行物は、単に、本願出願日以前の開示物として提供されるにすぎない。これに関するいかなる事情も、本発明者らが先行発明が存在するためまたは任意の他の理由でそのような開示よりも前の日付を主張する資格を有さないことの承認であるとみなされるべきではない。これらの文献の日付に関する言及または内容に関する表示はすべて、出願人が入手し得た情報に基づいており、これらの文献の日付または内容の正確性に関する承認をなすものではない。

20

【0094】

本明細書に記載される様々な局面の態様が、以下の番号を付された項で定義され得る。

1 .

対象において関節リウマチを診断する方法であって、対象がフィラミンAおよびN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つまたは複数に対して免疫学的に反応性であるかどうかを決定する段階を含み、適当な対照と比較した、フィラミンAおよびN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つまたは複数に対する対象の免疫学的反応性が、対象が関節リウマチを患っていることを示す、方法。

30

2 .

決定する段階が、フィラミンAおよびN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つまたは複数に対する免疫学的反応性に関して対象から取得された生物学的サンプルを評価することによる、項1記載の方法。

3 .

免疫学的反応性を決定する段階が、以下のステップ：

(a) フィラミンAおよびN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つもしくは複数の、総タンパク質またはタンパク質フラグメントを用いて、インビトロで対象の末梢血単核細胞（PBMC）または対象の滑液単核細胞（SFMC）を刺激すること；

40

(b) インビトロでのT細胞の増殖または細胞培養上清へのIFN- $\gamma$ の分泌を測定すること；ならびに

(c) T細胞の増殖またはIFN- $\gamma$ の分泌が、適当な対照のそれより有意に増加していると測定される場合に、対象がフィラミンAおよびN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つまたは複数に対して反応性のT細胞を有すると判定すること

を含む、フィラミンAおよびN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つまたは複数に対して反応性のT細胞の存在を検出することによる、項1~2のいずれか一項記載の方法

。

4 .

50

ステップ(b)がインビトロでのT細胞の増殖を測定することであり、T細胞の増殖が、適当な対照のそれより有意に増加していると測定される場合に、対象がフィラミンAおよびN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つまたは複数に対して反応性のT細胞を有すると判定される、項3記載の方法。

5 .

ステップ(b)がT細胞による細胞培養上清へのIFN- $\gamma$ の分泌を測定することであり、IFN- $\gamma$ の分泌が、適当な対照のそれより有意に増加していると測定される場合に、対象がフィラミンAおよびN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つまたは複数に対して反応性のT細胞を有すると判定される、項3記載の方法。

6 .

免疫学的反応性を決定する段階が、

その抗体とフィラミンAまたはN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの免疫複合体の形成が可能な条件下でフィラミンAタンパク質もしくはそのポリペプチドフラグメントおよび/またはN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼタンパク質もしくはそのポリペプチドフラグメントとサンプルを接触させて、免疫複合体の存在または非存在を検出することにより、フィラミンAおよびN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つまたは複数の特異的に認識する自己抗体の産生をもたらすフィラミンAおよびN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つまたは複数に対するB細胞応答を対象が有するかどうかを決定すること

を含み、免疫複合体の存在が、対象がフィラミンAおよび/またはN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼに対するB細胞応答を示すことを示し、免疫複合体の非存在が、対象がフィラミンAおよび/またはN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼに対するB細胞応答を示さないことを示す、項1~5のいずれか一項記載の方法。

7 .

アッセイが、酵素連結免疫吸着アッセイ(ELISA)、凝集試験、直接免疫蛍光アッセイ、間接免疫蛍光アッセイ、または免疫プロットアッセイである、項6記載の方法。

8 .

フィラミンAのポリペプチドフラグメントが、アミノ酸配列：

NPAEFVVNTSNAGAG (SEQ ID NO: 1)

またはその抗原性部分を含む、項3~7のいずれか一項記載の方法。

9 .

N-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼのポリペプチドフラグメントが、アミノ酸配列：

FEPFFMMIATPAPH (SEQ ID NO: 2)

またはその抗原性部分を含む、項3~8のいずれか一項記載の方法。

10 .

対象が、リウマチ因子、抗シトルリン化タンパク質抗体(ACPA)および1つまたは複数のHLA-DR対立遺伝子の1つまたは複数について試験されている、またはさらに試験される、項1~9のいずれか一項記載の方法。

11 .

HLA-DR対立遺伝子が、HLA-DRB1\*0101および/またはHLA-DRB1\*0401である、項10記載の方法。

12 .

対象は、関節リウマチの危険がある、または関節リウマチを患っている可能性がある、項1~11のいずれか一項記載の方法。

13 .

非ステロイド抗炎症薬(NSAID)、ステロイド、疾患修飾抗リウマチ薬(DMARD)、および生物製剤の1つまたは複数で対象を処置する段階をさらに含む、項1~12のいずれか一項記載の方法。

14 .

10

20

30

40

50

フィラミンAおよび/またはN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つまたは複数の潜在的抗原および/または潜在のエピトープ、ならびに

フィラミンAおよびN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの1つまたは複数の潜在的抗原および/または潜在のエピトープに結合するサンプル中の抗体の存在を検出するためのアッセイを実行するための試薬を含む、キット。

15.

フィラミンAの潜在的抗原および/または潜在のエピトープが、アミノ酸配列：  
NPAEFVVNTSNAGAG (SEQ ID NO: 1)

またはその抗原性部分を含む、項14記載のキット。

16.

N-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼの潜在的抗原および/または潜在のエピトープが、アミノ酸配列：

FEPFFMMIATPAPH (SEQ ID NO: 2)

またはその抗原性部分を含む、項14記載のキット。

17.

アッセイが、酵素連結免疫吸着アッセイ (ELISA) である、項14~16のいずれか一項記載のキット。

18.

アッセイが、ウェスタンブロットである、項14~16のいずれか一項記載のキット。

19.

関節リウマチを患った対象の特定に使用するための、項1~18のいずれか一項記載のキットまたは方法。

【0095】

本発明は、以下の実施例によってさらに説明されているが、これらはさらなる限定であるとみなされるべきでない。

【実施例】

【0096】

以下の実施例は、本発明のいくつかの態様および局面を説明している。本発明の趣旨または範囲を変更することなく様々な改変、付加、置換等を行うことが可能であり、そのような改変およびバリエーションも、添付の特許請求の範囲で定義される本発明の範囲内に包含されることが、当業者に明らかであろう。本明細書に記載される技術は、以下の実施例によってさらに説明されるが、これらはさらなる限定であるとみなされるべきでない。

【0097】

実施例1

背景

自己抗原の同定は、自己免疫疾患、例えば関節リウマチ (RA) における大いなる挑戦である。この課題に取り組むために、患者の滑膜組織、関節液、または末梢血 (PB) においてHLA-DR提示ペプチドを同定する発見ベースのプロテオミクスと、同定されたペプチドおよびそれらのソースタンパク質の免疫原性を決定する橋渡し研究 (translational research) を組み合わせた新しい方法が、本明細書に記載されている。このアプローチを用いて、最近、ライム関節炎 (LA) における標的またはTおよびB細胞応答として内皮細胞成長因子が同定され (22)、LAおよびRAの両方におけるそのような標的としてアネキシンA2が同定された (26)。

【0098】

目的

RA患者においてTおよびB細胞応答を誘導する新しい疾患関連自己抗原を同定すること。

【0099】

方法

HLA-DR提示自己ペプチドを、RA患者の組織または体液からタンデム質量分析によって単

10

20

30

40

50

離および同定し、合成し、適合患者の末梢血単核細胞（PBMC）とのT細胞自己反応性について試験した。次に、免疫反応性ペプチドまたはそれらのソースタンパク質を、IFN-g ELISpotアッセイによってT細胞自己反応性について、および我々のRA患者の大集団および対照対象由来の細胞および血清を用いたELISAによって自己抗体応答について試験した。すべてのRA患者が、RAに関する2010 ACR/EULARの基準を満たしていた。

【0100】

#### 結果

RA患者において、ある女性の滑膜組織から同定された89個のHLA-DR提示ペプチドのうち1個、およびある女性のPBから同定された15個のHLA-DR提示ペプチドのうち1個が、IFN-gを分泌するよう、ある女性のPBMCを誘導した。これらの反応性ペプチドは、それぞれ、リソソーム酵素であるタンパク質N-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼ（GNS）およびアクチン結合タンパク質であるフィラミンA（フィラミンA）由来であった。25名のRA患者のうち8名（32%）が10名の健常対照（HC）の平均値を $>3SD$ 上回るGNSに対するT細胞反応性を示し（ $p=0.004$ ）、25名の患者のうち13名（52%）がフィラミンAに対するT細胞反応性を示す（ $p=0.002$ ）ことが見出された。加えて、92名のRA患者のうち35%が50名のHCの平均値を $>3SD$ 上回るGNSに対する上昇した自己抗体応答を示し（ $p<0.0001$ ）、患者の32%がフィラミンAに対する高い自己抗体応答を示した（ $p<0.0001$ ）。

10

【0101】

92名の患者のうち、52名（56%）がこれらの自己抗原のうち1つに対する応答を示し、この症例患者を含む10名（11%）が両方の自己抗原に対する反応性を示した。RA患者と比較すると、全身性エリテマトーデス（SLE）、乾癬性関節炎、脊椎関節炎、ライム関節炎または骨関節炎を含む他のリウマチ疾患を患った94名の患者のいずれも、GNSに対するB細胞反応性を示さず（各例において、 $p<0.0001$ ）、3名のSLE患者（ $p=0.003$ ）および1名の乾癬性関節炎患者（ $p<0.0001$ ）のみがフィラミンAに対する応答を示したが、これらはカットオフ値をわずかに上回る程度であった。

20

【0102】

#### 結論

このアプローチは、自己免疫形態の関節炎に関連する新規の自己抗原を同定するのに効果的な方法である。この方法を用いて、2つのこれまで認識されていなかった自己抗原を同定し、その各々は、RA患者の約1/3でTおよびB細胞応答の標的であるが、他のタイプの関節炎の患者ではまれである。これらの発見は、これらの新たに認識された自己抗体についての試験がRAにおいて診断用途を有し得ることを示唆している。

30

【0103】

#### 実施例2

高感度、ナノフローLC-MS/MSベースのペプチド配列決定（31）の登場により、個々の患者の組織または細胞においてHLA-DR分子により提示されるペプチドを同定することが可能になった。1992年に、Huntらが初めて、LC-MS/MSを使用して腫瘍組織培養系においてクラスI主要組織適合遺伝子複合体（MHC）分子を同定した（32）。彼らはこの急速に成長する分野を先導し続け、MHC提示ペプチドの同定が主として細胞株を用いて広く行われている（33~41）。さらに、質量分析技術およびバイオインフォマティクスの発展は、MHC提示分子の同定効率および精度を向上させた（42,43）。

40

【0104】

次のステップとして、いくつかの研究機関は、混合細胞株の臨床サンプルにおいてクラスII HLADR提示ペプチドの直接分析を行った（44~49）。以前の研究で、4名の患者のSTから患者あたり57~104個の非冗長HLA-DR提示自己ペプチドが、RA患者から2個、LA患者から2個、同定された（30）。しかし、多量の滑膜組織は、患者が外科手術、例えば滑膜切除または関節置換を受けた際にしか入手することができず、これが通常疾患の後期で見られる重篤な末期段階に、患者の分析を制限している。

【0105】

本研究では、研究対象の患者の数を、RAが5名、LAが8名の13名に増やした。さらに、HL

50

A-DR提示ペプチドは、個々の患者において、STからだけでなく、滑液単核細胞（SFMC）および末梢血単核細胞（PBMC）からも同定でき、これにより多数の患者というだけでなく、疾患のより早期とみられる患者の分析も可能であることが実証された。加えて、新型の質量分析器の感度向上およびスペクトル対ペプチド照合用のコンピュータプログラムの改善により、各サンプルからより多数のHLA-DR提示ペプチドが同定された。本研究では、18個の新しいST、PBMCおよびSFMCサンプルを分析し、かつ以前のLC-MS/MSデータを再分析してSFMCおよびPBMCサンプル由来の新規データと比較した。

#### 【 0 1 0 6 】

まとめると、13名の患者に由来する22個のサンプルから、我々は、870個のソースタンパク質由来の1,593個の非冗長HLA-DR提示自己ペプチドを同定した。この経験は、LC-MS/MSが、現時点で、個々の患者から取得された混合細胞集団を含む組織および体液において多数のHLADR提示自己ペプチドを同定する感度および特異性を有していることを示している。ペプチドを合成し、適合患者のPBMCを用いて試験した後、これらのペプチドの中に、LAにおいて、ソースタンパク質である内皮細胞成長因子（ECGF）（22）、アポリポタンパク質B-100（apoB-100）（23）、マトリクスメタロプロテイナーゼ-10（MMP-10）（24）由来；RAおよびLAの両方において、アネキシンA2（25）由来；ならびにRAにおいて、N-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼおよびフィラミンA（26）由来の新規の免疫原性T細胞エピトープが含まれることが決定された。さらに、これらのエピトープまたはそれらのソースタンパク質は、多くの患者においてTおよびB細胞応答の標的であることが示された（22～26）。

10

20

#### 【 0 1 0 7 】

##### 結果

患者 - 5名のRA患者はすべて女性であり、年齢37～70歳であり（表1）、これはRAに関する性別のかたよりを反映している分布である。5名の患者のうちの3名が、古典的、血清陰性RAを有していた。彼女らは、RA共通エピトープをコードするHLA-DRB1\*0101または0401対立遺伝子を有しており、これら3名の患者はACPAを有し、2名はリウマチ因子（RF）を有していた。残りの2名のRA患者は、慢性血清陰性RAを有していた。彼女らは共通エピトープ対立遺伝子を有しておらず、彼女らの試験はACPAおよびRFについて陰性であった。4名の患者で、疾患発症から3～66年後に関節鏡視下滑膜切除術または関節置換手術を行った際に、腰および膝からSTが取得された。1名の患者（RA2）では、3つすべての部位（ST、SFMCおよびPBMC）由来のサンプルが利用可能であり、患者RA4では、SFMCおよびPBMCサンプルが、診断時、疾患修飾抗リウマチ薬（DMARD）治療前に収集された（STは収集されなかった）。

30

#### 【 0 1 0 8 】

8名の抗生物質難治性LA患者は、4名の十代の男子、3名の成人男性および1名の女性を含んでいた（表1）。8名の患者のうちの4名が、難治性LA患者において出現率が上昇することが知られているHLA-DR\*0101、0401または1501対立遺伝子を有していた（58）。8名の患者のすべてが、2ヶ月間、経口抗生物質で処置され、7名は、1ヶ月間、IV抗生物質も投与され、7名はその後メトトレキサートを投与された。滑膜炎の不完全な解消のため、8名の患者は、関節炎の発症から6ヶ月～4年後に影響を受けた膝の関節鏡視下滑膜切除術を受け、その手術の間にSTサンプルが取得された。加えて、SFMCサンプルが4名の患者で、PBMCが2名の患者で利用可能であった。

40

#### 【 0 1 0 9 】

（表1）臨床的特徴、滑膜組織、滑液、または末梢血中の各患者のHLA-DR分子から同定されたMS/MSスペクトル、ペプチド照合、デコイヒット、非冗長ペプチドおよびソースタンパク質の数

患者	関節リウマチ					ライム関節炎							
	R&L	R&2	R&3	R&4	R&5	L&1	L&2	L&3	L&4	L&5	L&6	L&7	L&8
性別	F	F	F	F	F	M	M	M	M	F	M	M	M
年齢 (歳)	70	37	45	63	68	12	43	12	38	51	13	16	15
関節炎期間 (年)	66	3	7	1	2	1.5	3.5	0.5	1.6	4	0.33	0.53	0.75
抗シトルリン化タンパク質抗体	陰性	陽性	陽性	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
リウマチ因子	陰性	陽性	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
HLA-DR*B1遺伝子型	D&A2/	D&21/D&02	D&101/	D&031/	D&011/	D&101/	D&011/	D&011/	D&101/	D&101/	D&101/	D&101/	D&101/
HLA-DR*B1遺伝子型	L104	G101/G102	G101/	L101	L101	G101/	L101/	L101/	L101/	L101/	G101/G102	G101/L102	G101/L101
滑膜組織、以下の数													
MS/MSスペクトル	3547 <sup>1</sup>	1713 <sup>1</sup>	5457 <sup>4,5</sup>	10120 <sup>2</sup>		10375 <sup>1</sup>	2277 <sup>1</sup>	1864 <sup>1</sup>	3837 <sup>1</sup>	11940 <sup>2</sup>	14141 <sup>2</sup>	5391 <sup>2</sup>	9195 <sup>3</sup>
スペクトル対ペプチド一致	1031	1213	537	2538		1852	1682	656	3515	2521	2473	621	4445
コンセンサス一致ペプチド	248	782	197	471		143	282	135	481	215	389	86	312
デコイヒット	1	0	0	1		0	0	0	0	0	0	0	1
コンセンサス非デコイ非冗長ペプチド	95	54	61	172		68	95	37	267	113	135	26	84
1つのみのプログラムによって同定された免疫応答について試験されたペプチド	18	0				12	2	16	18	12			
免疫原性ペプチド	1	2				1	0	0	1	1			
ソースタンパク質	80	78	45	126		51	79	42	116	109	36	70	84
滑液単核細胞、以下の数													
MS/MSスペクトル数		20979 <sup>2</sup>	5126 <sup>3</sup>					14244 <sup>2</sup>			13050 <sup>2</sup>		
スペクトル対ペプチド一致		2461	254					3584			1388		
コンセンサス一致ペプチド		50	51					2			167		
デコイヒット		1	0					0			0		
コンセンサス非デコイ非冗長ペプチド		35	32					2			61		
1つのみのプログラムによって同定された免疫応答について試験されたペプチド											16		
免疫原性ペプチド		0	0					0			0		
ソースタンパク質		14	23					2			48		
末梢血単核細胞、以下の数													
MS/MSスペクトル		32531 <sup>2</sup>	8127 <sup>4</sup>								26146 <sup>2</sup>		
スペクトル対ペプチド一致		1897	372								1521		
コンセンサス一致ペプチド		22	60								15		
デコイヒット		0	0								0		
コンセンサス非デコイ非冗長ペプチド		14	32								11		
1つのみのプログラムによって同定された免疫応答について試験されたペプチド													
免疫原性ペプチド		1	1								0		
ソースタンパク質		11	24								9		

10

20

<sup>1</sup>Sciex QSTAR質量分析器、<sup>2</sup>Thermo LTQ-Orbitrap XL質量分析器、<sup>3</sup>Agilent 6550 Q-TOF質量分析器および<sup>4</sup>Thermo Q Exactive plus質量分析器を用いて取得されたLC-MS/MSデータ  
組織細胞溶解産物からの第2回免疫精製からの残留物

N/A 利用可能でない、NYD まだ行われていない

【 0 1 1 0 】

HLA-DR提示自己ペプチドから同定されたペプチドおよびソースタンパク質の数 - 全体として、13名の患者由来のST、SFMCまたはPBMCの22個のサンプルから単離されたインビボHLA-DR提示ペプチドからサンプルあたり1,647~40,390個のMS/MSスペクトルが生成された(表1)。3つの異なるMS/MSスペクトル検索エンジン(Mascot、OMSSAおよびX!Tandem)を用いて、サンプルあたり161~29,993のスペクトル対ペプチド一致が得られた。コンセンサス一致(すなわち、2つの検索プログラム)によって同定されたペプチドが、表1に報告されている。これらのペプチドのスペクトルを手作業で調査し、免疫学的アッセイに含める上での優先度を付与し、この数は、サンプルあたり2~2,363個ペプチドの範囲であった。表1に記載されているように、1つのみのプログラムによって高スコアを割り当てられたペプチドMS/MSスペクトルの専門家による手作業の調査により、免疫学的アッセイへの参加リストに90個のペプチドが追加された。

30

【 0 1 1 1 】

このストリンジェンシーレベルで、12個の各STサンプルにおいて59~801個の非デコイ、非冗長HLA-DR提示自己ペプチドを同定し、これらのペプチドは、42~493個の異なるソースタンパク質由来であった(表1)。6つのSFMCおよび4つのPBMCサンプルについてもこれと同じ方法を用いて、SFMCから患者あたり2~49個のソースタンパク質由来の2~71個の非冗長ペプチドを同定し、PBMCから患者あたり7~24個のソースタンパク質由来の7~34個の非冗長ペプチドを同定した。MHCクラスII HLA-DR提示ペプチドの長さは、7~27アミノ酸の範囲であり、このペプチドの典型的な長さは、13~17アミノ酸であった。まとめると、全3つの部位から、1,593個の非冗長HLA-DR提示自己ペプチドが同定され、これらは870個のソースタンパク質由来であった。

40

【 0 1 1 2 】

50

この研究の橋渡し部分において、すべての非冗長ペプチドを合成し、適合患者のPBMCとの反応性について試験した。現時点で、この段階は、3名のRA患者および5名のLA患者について完了している（表1）。患者RA1由来のSTにおいて1つの免疫原性HLA-DR提示ペプチドを同定し、患者RA2由来のSTにおいて1つの免疫原性ペプチドを同定した（25,26）。この患者において、3つの異なる分析でSTおよびPBMCの両方からさらなるペプチドも見出された。同様に、5名のLA患者の中で、3体の患者（LA1、LA4およびLA5）の各々において少なくとも1つの特有の免疫原性HLA-DR提示ペプチドを同定した（22~24）。6つの免疫原性ペプチドのうち4つを、コンセンサス一致によって同定し、2つを、1つのみのプログラムによって同定された配列の手作業による調査によって同定した。

#### 【0113】

HLA-DR提示自己ペプチドの同定における異なるLC-MS/MS機器からの結果の比較 - 7年間の本研究期間の間に、より新しい高感度LC-MS/MS機器が研究機関で利用可能となった。したがって、この研究の中で、HLA-DR提示ペプチドサンプルを、4つのタイプのLC-MS/MS機器によって分析した（表2）。LAまたはRA患者のSTから同定された特有のコンセンサスペプチドの平均数は、QSTARを用いて239個、LTQ-Orbitrap XLを用いて313個、6550 Q-TOFを用いて571個、およびQ Exactive plus MSを用いて2,226個であった。患者のSFMCからの平均数は、LTQ-Orbitrap XLを用いて51個、6550 Q-TOFを用いて6個、およびQ Exactive plus MSを用いて70個であった。患者のPBMCからの平均数は、LTQ-Orbitrap XLを用いて15個、およびQ Exactive plus MSを用いて50個であった。したがって、この研究の間にLC-MS/MS機器の感度およびデータ運用能力が改善されたため、同定されたHLA-DR提示ペプチドの数が順調に増加した。

#### 【0114】

（表2）4つの異なる質量分析器によって生成および同定されたスペクトルの比較

10

20

	滑膜組織	滑液	末梢血
QSTAR	N=4*		
# MS/MSスペクトル†	1815		
# スペクトル対ペプチド一致	1033		
# コンセンサス一致ペプチド	239		
# デコイヒット	0		
# 非デコイ非冗長ペプチド	95		
# ソースタンパク質	70		
LTQ-Orbitrap XL	N=7	N=4	N=3
# MS/MSスペクトル	9756	16106	19379
# スペクトル対ペプチド一致	2246	1670	1498
# コンセンサス一致ペプチド	313	51	15
# デコイヒット	0	0	0
# 非デコイ非冗長ペプチド	121	31	11
# ソースタンパク質	93	24	9
5550 Funnel Q-TOF	N=3	N=1	
# MS/MSスペクトル	19633	1000	
# スペクトル対ペプチド一致	13106	120	
# コンセンサス一致ペプチド	571	6	
# デコイヒット	3	0	
# 非デコイ非冗長ペプチド	202	5	
# ソースタンパク質	141	5	
Q Exactive plus	N=1	N=3	N=2
# MS/MSスペクトル	10936	6125	4922
# スペクトル対ペプチド一致	9927	255	267
# コンセンサス一致ペプチド	2226	70	50
# デコイヒット	3	0	0
# 非デコイ非冗長ペプチド	765	38	30
# ソースタンパク質	479	28	18

10

20

\* 分析した異なるサンプルの数。初回通過分析のデータのみが含まれている。

† 示されている数値はすべて、分析したサンプルの数に基づく同定されたスペクトルの平均数を示している。

30

【 0 1 1 5 】

ST、SFMCおよびPBMCにおけるHLA-DR提示ペプチドおよびソースタンパク質レパートリーの比較 - IPIデータベースを用いてRA1、RA2、LA1およびLA2のSTから同定されたHLA-DR提示ペプチドが、参考文献(30)に示されている。LA2由来のSFMCサンプルならびにRA2由来のSFMCおよびPBMCサンプルをこの研究で分析したので、UniProtデータベースを用いて再分析された4つの以前のサンプルからの元のデータを、今回分析された3つのサンプル部位で見出されたHLA-DR提示ペプチドレパートリーの比較のために本明細書に含めた。各々RAまたはLAを患った1名の患者(RA2およびLA5)において、3つすべての区画(ST、SFMCおよびPBMC)由来のサンプルが利用可能であり、これによりこれらの3つの部位の間でのペプチド提示の重複の程度をこれらの患者の各々において決定することができた(図1A)。患者RA2において、SFMCで同定されたHLA-DR提示ペプチドの53%およびPBMCで見出されたこれらの53%が、STにおけるそれらと共通していたが、3つすべての部位で同定されたのは6%のみであった。これらのペプチドの由来となったソースタンパク質の分析は、同様の出現率を示した(図1B)。比較すると、患者LA5は、PBMCとSTの間(36%)よりもSFMCとSTの間(21%)でより低い共通ペプチド率であり、SFMCとSTの間のソースタンパク質の重複度(16%)は、PBMCとSTの間(22%)と近かった。重複度を、5名のRA患者または8名のLA患者から入手可能なサンプルタイプの対の間で比較したところ、同様の結果が見出された。全体として、SFMCで同定されたペプチドの半分以上が、STにおいても見出された(図1C)。RAにおいて、PBMCで同定されたペプチドの約半分はSTにおいても見出されたが、

40

50

より多くのペプチドがSTにおいて同定されたLAでは、PBMCペプチドの約4分の1のみがSTにおいても見出された。SFMCまたはPBMCとSTで同じであるソースタンパク質の比率はペプチドよりも低い傾向があった(図1D)。したがって、両方の疾患において、SFMCまたはPBMC中のHLA-DR提示ペプチドはSTで提示されたペプチドをある程度反映するものであったが、さらなるペプチドも明らかにした。

#### 【0116】

HLA-DR提示ペプチドのソースタンパク質 - コンセンサスペプチドの完全なリストを、各患者の各部位から少なくとも2つの検索エンジンによって同定し、非冗長HLA-DR提示ペプチドおよびそれらのソースタンパク質を、方法に記載されるようにして同定した。疾患に関係なく、少なくとも4名の患者において見出されたST由来のペプチドの最も一般的なソースタンパク質が、表3にアルファベット順で列挙されている。これらのペプチドは(出現率の順に)、カテプシンS、コラーゲン-1(I)鎖、シンテニン1、セリンカルボキシペプチダーゼCPVL(推定)、アルブミン、プロ低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質1、アポリポタンパク質A2、補体C3、シトクロムcオキシダーゼサブユニット5B(ミトコンドリア)、フィラミンA、単球分化抗原CD14およびストロメライシン1由来であった。複数のSFMCおよびPBMCサンプルを分析したので、これらの部位からのリストは、4名の患者ではなく少なくとも2名の患者において同定されたソースタンパク質を示している。SFMCにおいて、このリストは、ケラチン(II型細胞骨格1)およびヌクレアーゼ感受性エレメント結合タンパク質1を含んでいた。ケラチンは、SFMCおよびPBMCの両方において共通して同定された。ケラチンのタイプおよびサンプルが処理の間にタンパク質分解に供されなかったという事実から、これらのペプチドがサンプル取扱上生じた物質である可能性は低かった。

10

20

#### 【0117】

(表3) RAおよびLA患者の3つの部位から同定されたHLA-DR提示ペプチドにおける最も豊富なソースタンパク質

滑膜組織\*

タンパク質名	アクセッション RA# LA#	タンパク質名	アクセッション RA# LA#
アルブミン	P02788 2 5	フィラミンA	P21333 2 4
アルファ-1B-糖タンパク質	P04217 1 3	フルクトースニリン酸アルドラーゼA	P04075 2 2
アルファ-2-マクログロブリン	P01023 2 3	ヘモベキシン	P02792 1 2
アルファ-エノラーゼ	P06733 1 3	HLAクラスI組織適合性抗原、A-2アルファ鎖	P01692 2 2
アンジオテンシノーゲン	P01019 1 3	インターアルファトリプシン阻害因子重鎖H4	Q14824 1 3
アネキシン A2	P07355 1 3	レグマイン	Q99536 1 3
アポリポタンパク質A-II	P02652 3 3	リソソーム関連膜糖タンパク質1	P11279 2 4
C4b結合タンパク質アルファ鎖	P04003 1 3	マクロファージンマンノース受容体3	Q5V5X2 1 3
カルレチキュリン	P27797 1 3	単球分化抗原CD14	P08571 2 4
カテプシンS	P25774 3 5	オルファクトメジン様タンパク質2B	Q685L6 2 4
カペオリン1	Q63135 1 3	ペリリピン3	Q63664 2 4
コンドロアドヘリン	Q15335 1 3	ホスファチジルコリンステロールアシルトランスフェラーゼ	P04182 2 2
凝固因子XIII A鎖	P00488 2 2	ホスホグリセリン酸キナーゼ1	P08558 3 3
コフィリン1	P23528 2 3	プレキシンドメイン含有タンパク質2	Q8UK71 3 2
コラーゲンアルファ-1(3)鎖	P02452 3 5	プロフィリン1	P07737 2 3
コラーゲンアルファ-1(3)鎖	P12107 2 2	プロ低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質1	Q87854 3 4
コラーゲンアルファ-2(3)鎖	P08123 2 3	プロテオグリカン4	Q93854 1 3
コラーゲンアルファ-2(3)鎖	P05997 2 3	Rho GPD解離阻害因子2	P52566 1 4
補体C1qサブコンポーネントサブユニットB	P02746 3 4	80Sリソソームタンパク質L30	P62988 3 3
補体C1sサブコンポーネント	P03871 1 4	80Sリソソームタンパク質L6	Q02878 2 2
補体 C3	P01024 3 3	セリンカルボキシペプチダーゼCPVL (推定)	Q843G5 3 4
補体 C5	P01031 1 4	SPARC様タンパク質1	Q14515 2 4
C反応性タンパク質	P02741 2 3	スタビリン1	Q9NY15 2 3
シトクロムcオキシダーゼサブユニット5B、ミトコンドリア	P10606 2 4	ストロメラysin1	P08254 2 4
シトクロムcオキシダーゼサブユニット5A、ミトコンドリア	P10176 2 2	シンテンin1	Q69563 2 6
テコリン	P07585 1 4	タリン1	Q8V490 2 5
精巢上体分泌タンパク質E1	P01916 1 3	血管細胞接着タンパク質1	P19320 2 4
ER-ゴルジ中間区画タンパク質1	Q989X5 1 3	ビトロネクチン	P04004 2 3
フィブリノゲンベータ鎖	P02675 3 2		

10

滑液\*

タンパク質名	アクセッション RA# LA#	タンパク質名	アクセッション RA# LA#
アルブミン	P02788 1 1	セラチン、I型細胞骨格9	P35527 1 1
アルファ-2-マクログロブリン	P01023 1 1	セラチン、II型細胞骨格1	P04264 1 2
アネキシン A2	P06733 1 1	リソソームアルファマンノシダーゼ	Q00754 1 1
C4b結合タンパク質アルファ鎖	P04003 1 1	MHCクラスI抗原	P01689 1 1
カテプシンS	P25774 1 1	MHCクラスII抗原	P04239 1 1
コフィリン1	P23528 1 1	スクラアーゼ感受性エレメント結合タンパク質1	P67809 1 1
補体 C3	P01024 1 1	プラスミノゲン	P00747 1 1
フィブリノゲンアルファ鎖	P02671 1 1	プレキシンドメイン含有タンパク質2	Q8UK71 1 1
フィコリン1	Q69892 2 2	ストロメラysin1	P08254 1 1
グルタチオン-S-トランスフェラーゼP	P09211 1 1	T細胞表面糖タンパク質CD4	P01730 1 1
ヘモグロビンサブユニットアルファ	P68965 1 1	To11様受容体2	Q60303 1 1
ヒストンH1	Q82538 2 2		

20

末梢血\*

タンパク質名	アクセッション RA# LA#	タンパク質名	アクセッション RA# LA#
アルファ-1-抗トリプシン	P01008 2 2	セラチン、I型細胞骨格9	P35527 1 2
インターアルファトリプシン阻害因子重鎖H4	Q14824 1 1	セラチン、II型細胞骨格1	P04264 1 1
セラチン、I型細胞骨格10	P13645 1 1	スクラアーゼ感受性エレメント結合タンパク質1	P67809 1 1

30

「RA#」および「LA#」のカラムの数字は、各々のソースタンパク質を同定した患者の番号を示している。

\* 12名の患者のうちの少なくとも4名のSTにおいて同定されたソースタンパク質

† 試験した6名の患者のうちの少なくとも2名のSFにおいて同定されたソースタンパク質

‡ 試験した4名の患者のうちの少なくとも2名のPBにおいて同定されたソースタンパク質

【0118】

大部分のRA患者において、同定されたHLA-DR提示ペプチドは、RAにおける潜在的自己抗原となると考えられるソースタンパク質由来であった。これらは、軟骨糖タンパク質39、様々なタイプのコラーゲン、エノラーゼ、フィブリノゲン、フィブロンネクチン、免疫グロブリンおよびビメンチンを含んでいた(表4)。興味深いことに、これらのソースタンパク質由来のHLA-DR提示ペプチドは、LA患者においても共通して同定された。

【0119】

(表4) RAにおいて自己抗原となることが知られているまたはそのように考えられているRAおよびLAの両方において見出されたソースタンパク質\*

40

	関節リウマチ 患者	ライム関節炎 患者
軟骨糖タンパク質39	RA2	LA1/LA8
コラーゲン	型 I, a-1 RA1/RA3	LA3/LA5/LA6/LA7/LA8
	型 I, a-2 RA2†/RA3	LA3/LA5/LA8
	型 IV, a-1	LA8
	型 V, a-1 RA5	LA3/LA8
	型 V, a-2 RA2, RA3	LA5/LA7/LA8
	型 VI, a-1	LA8
	型 VI, a-3 RA3	LA3/LA5/LA7/LA8
	型 XI, a-1 RA2/RA3	LA5/LA8
	型 XII, a-1 RA3/RA5	LA1/LA5/LA8
	型 XIV, a-1 RA2	LA3/LA4/LA5/LA6/LA7/LA8
	型 XV, a-1 RA3	LA7/LA8
エノラーゼ	RA4‡/RA5	LA2/LA5†/LA6/LA7/LA8
フィブリノゲン	アルファ RA2†/RA3/RA5	LA3/LA4/LA5/LA7†/LA8†
	ベータ RA2/RA3/RA5	LA1/LA4/LA6/LA7‡/LA8
	ガンマ RA2‡/RA3/RA4‡	LA2/LA4/LA5/LA7†/LA8
フィブロネクチン	RA1/RA2/RA3/RA5	LA1/LA2/LA3/LA4/LA5/LA6/LA7†/LA8
免疫グロブリン	RA2/RA3	LA1/LA3/LA4/LA8
ビメンチン	RA1/RA2/RA3/RA5	LA1/LA3/LA7/LA8†

10

20

\* それ以外のことが示されていない限り、これらのソースタンパク質由来のペプチドは、滑膜組織のみで同定された。

† 滑膜組織および滑液において同定されたこのソースタンパク質由来のペプチド

‡ 滑液においてのみ同定されたこのソースタンパク質由来のペプチド

‡ 滑膜組織、滑液、および末梢血において同定されたこのソースタンパク質由来のペプチド

【 0 1 2 0 】

シトルリン化HLA-DR提示ペプチドの検索 - タンパク質のシトルリン化は、RAにおける重要な翻訳後修飾であると考えられている。RA共通エピトープ対立遺伝子とACPA陽性RAの間の強い関連は、HLA-DR分子によるシトルリン化ペプチドの結合および提示に起因するという仮説がたてられている(11)。したがって、アルギニンがシトルリンに変化した際に0.984 D増加する(NH2 対 OH)この翻訳後修飾の証拠についてMS/MSスペクトルを注意深く検索した。検索アルゴリズムは、不完全なフラグメントイオン群を有するいくつかの観察されたMS/MSスペクトルをシトルリンペプチドに割り当てた。しかし、各例において、手作業による調査および標的化タンデム質量分析は、このペプチド修飾が実際にはアスパラギンからアスパラギン酸またはグルタミンからグルタミン酸への加水分解に対応することを明確に定義する完全な配列情報を提供した。

30

【 0 1 2 1 】

例えば、もともと患者RA3のSTにおいて検出されたソースタンパク質B6V6K3 MHCクラスI抗原(フラグメント)における残基27~44に対応するペプチド: VNDTQFVRFSDAASPRG (SEQ ID NO: 5)

40

のR8におけるアルギニンからシトルリンへの変換は、LTQ-Orbitrap XL MSで取得されたLC-MS/MSデータの分析の中で2つのタンパク質データベース検索プログラムによってシトルリン化ペプチドと指定された。しかし、アルギニンからシトルリンへの変換およびアスパラギンからアスパラギン酸への加水分解は元素組成に同じ変化を、したがって同じペプチド質量シフトをもたらすので、その分子量変化および部分配列カバレッジは、決定的とみなされるべきでない。この例では、図2Aに示されるMS/MSスペクトルのシグナルを、LTQ-Orbitrap XL MSの低解像度イオントラップを用いて記録したが、配列決定的なフラグメン

50

トイオン系列は不完全であり、不明瞭さが残った。m/z 589.9のフラグメントイオンは、0.5 Da誤差許容範囲内で、アルギニンからシトルリンへの修飾およびアスパラギンからアスパラギン酸への加水分解の修飾の両方のy11イオンと一致した。したがって、2つのデータベース検索が同じ結果であったとしても、これらのデータに基づきこれらの2つの翻訳後修飾を区別することは、実際には可能でなかった。後に、我々がQ Exactive plus MSにおいて標的化タンデムMSを適用する機会を得たときに、高精度、多量の特徴的なフラグメントイオンの完全な系列がその修飾をN2におけるアスパラギン脱アミド化に明確に割り当てた(図2B)。同様の結果が、不完全なイオン系列を含む低解像度MS/MSスペクトルに基づく他のシトルリン化の仮割当ての各々についても得られた。

#### 【0122】

免疫原性ペプチドおよびソースタンパク質の同定 - サンプル試験を完了した8名の患者のうち5名において、各患者から同定したペプチドから1~2つの免疫原性ペプチド(T細胞エピトープ)を同定した。これらのペプチドまたはそれらのソースタンパク質を、多くの患者由来のPBMCまたは血清サンプルを用いて反応性について試験し、RAまたはLA患者の10~50%が各免疫原性ペプチドまたはそのソースタンパク質に対するTおよび/またはB細胞反応性を有することが見出された。各々個々の自己抗原の免疫学的データおよび鍵となるMS/MSデータは、それらの内容の全体が本明細書に組み入れられる、参考文献(22~26)に示されている。ここで、全質量スペクトルデータセットを統合し利用可能とするために、MS/MSスペクトルにおいて示された割当てに対応する各患者から同定されたペプチドの完全なリストを提示する。免疫原性であることが見出されたペプチドは、LAにおいて内皮細胞成長因子(EGF)(22)、アポリポタンパク質B-100(apoB-100)(23)、マトリクスメタロプロテイナーゼ-10(MMP-10)(24)のソースタンパク質由来、RAおよびLAの両方においてアネキシンA2(25)由来、およびRAにおいてN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼおよびフィラミンA(26)由来であった。MS/MSスペクトルおよびこれらの自己抗原について決定されたペプチド配列が、図3に示されている。

#### 【0123】

フィラミンA由来の免疫原性HLA-DR提示ペプチドがSTおよびPBMCの両方で同定され、EGF、apoB-100、アネキシンA2およびN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼ由来のペプチドがSTのみで同定された。アネキシンA2は、RA患者の約10%を含む様々なリウマチ疾患において自己抗原となることが以前に示されているが(59)、LAにおける自己抗原としてはこれまで同定されていなかった(25)。同様に、LAにおける他の3つの自己抗原(EGF、MMP-10およびapoB-100)もRAにおける2つ(N-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼおよびフィラミンA)もいずれも、これらの疾患における自己抗原として以前に同定されていなかった。さらに、この調査前に免疫原性であることが報告されていたこのグループのタンパク質について、正確なエピトープは以前に決定されていなかった。

#### 【0124】

14名の抗生物質難治性LA患者において、STが、自己抗体応答との組織病理学的相関のために利用可能であった。内皮細胞成長因子との自己抗体反応性は、閉塞性細小血管病巣と強く相関し(36)、抗apoB-100自己抗体は内皮細胞の数および活性化の増大ならびに滑膜線維芽細胞増殖の促進と相関し(23)、抗MMP-10自己抗体は、滑膜表層厚の増加および滑膜線維芽細胞の数の増加を含む細胞増殖の尺度と相関し(24)、抗アネキシンA2自己抗体は、滑膜線維芽細胞増殖の亢進と相関した(25)。このように、T細胞エピトープの同定により、病態生理学的結果と相関するB細胞応答が同定された。

#### 【0125】

#### 考察

本研究において、多数のHLA-DR提示ペプチドが、RAまたはLA患者のST、SFMCまたはPBMCの臨床サンプルから直接同定された。このアプローチに内在する課題は、多数の単一細胞型を分析のために増殖させ収集することができる組織培養系においてHLA-DR提示ペプチドを同定するというただでさえ困難な作業によって示されるものを上回っている。にもかかわらず、本明細書で報告されている臨床サンプルからの直接同定を実現した組織培養研究

10

20

30

40

50

からすばらしい成功が収められた。最初にタンデム質量分析を使用して、十分に定義された組織培養系においてMHC分子を同定し(32)、そのような分析において、細胞あたり $2 \times 10^5$ 個のMHC分子を発現する少なくとも $5 \times 10^8$ 個の細胞を、最低サンプル要件とみなした(43)。Huntグループおよび他のグループからの最新の報告では引き続き、非常に多数のMHCまたはHLA結合ペプチドを非常に効率的に同定できるようこの戦略を改善および検証している。これらの研究は、様々な腫瘍タイプにおいて、MHCクラスIおよびクラスIIの両方の抗原性ペプチドを同定し、HLA提示ペプチドの生成の根底にあるメカニズムを証明した(37~39)。しかし、組織培養系におけるHLA-DR提示ペプチドのレパートリーは、組織培養培地中のソースタンパク質由来の多くのペプチドを含んでいる(40,41)。したがってそれは、我々が見出したように(30)、臨床サンプルの直接分析とは全く異なるものである。これまでに、インビボ提示ペプチドは、患者の脾臓(44)、結腸(45)、腎臓(46)、プールされた気管支肺胞洗浄液(47)、甲状腺(48)または胸腺(49)において同定されている。これらの研究は、平均して、サンプルあたり約20~40個のペプチドしか同定せず、いくつかの例においては、ペプチドを同定するために、異なる患者由来のサンプルがプールされる必要があった。重要な例外は、患者および健常対照の血漿から免疫沈降された可溶性HLA複合体によって提示された、いくつかの癌関連ペプチドを含む、数千のペプチドの同定であった(33)。QSTAR質量分析器を用いてサンプルが分析された各々RAまたはLAを患った2名の患者の以前の研究において、各STサンプルで>80個の非冗長ペプチドが同定された(30)。比較のために、我々の最新の患者から得られたサンプルに同じタイプの戦略を適用すると、Q Exactive plus MSの使用により、実質的増加である、801個の非冗長ペプチドが同定された。近年、感度が向上し、データ分析ツールも改良されているが、LC-MS/MSによるHLA-DR提示ペプチドの同定は依然として技術的に困難である。第一に、すべてのHLA-DR複合体が、そのサンプルから量的に回収されるのではない。加えて、単離されたペプチドのいくつかは、低いイオン化効率を有するおよび/またはMS/MS分析では選択されず、かつ低いシグナル強度、不完全な成分分解および/または普通でないPTMの存在から、すべてのスペクトルが、検索エンジンによって割り当てられ得るわけではない。しかし、本明細書に示されるように、MS/MS機器および検索アルゴリズムの性能は、向上し続けている(60)。

#### 【0126】

本研究において、現在利用可能なより高い感度を、STだけでなく、個々の患者において決定することができるインビボHLA-DR提示ペプチドのさらなる供給源としてSFMCおよびPBMCを分析することによって利用することができた。同定されたペプチドの実数は、SFMCにおいてSTと同程度であり、PBMCではそれより少なかったが、多くの固有のペプチドが、SFMCまたはPBMCにおいてのみ同定された。予想通り、STにおいて同定されたペプチドの数は、SFMCまたはPBMCにおけるそれらよりも多かった。しかし、SFMCにおいて同定されたペプチドの67%はSTにおいても見出され、PBMCにおいて同定されたペプチドの55%はSTにおいても見出された。したがって、SFMCおよびPBMCの分析は、各々、STレパートリーへのウィンドウを提供したが、STにおいては見出されなかった抗原性ペプチドももたらした。本明細書のデータは、2つ以上の部位由来の組織または体液を分析することによって個々の患者におけるより完全な像を得ることができることを示している。分析スキームへのSFMCおよび/またはPBMCの追加は、3つの利点を有する。第1に、複数の部位由来のサンプルを分析することによって個々の患者のより完全な像を得ることができる。第2に、STは通常、多くの場合疾患の後期に、外科手術を受けた患者からしか得ることができないので、SFMCおよび/またはPBMCの利用は、免疫応答がより堅調であり得る疾患の早期に、患者の評価を行えるようにする。第3に、STが通常入手可能でない場合、関節炎の慢性炎症形態における免疫応答の標的であるSTにおける現象について少なくとも一部の情報を得られる可能性がある。したがって、SFMCまたはPBMCの試験は、より広範囲の患者を疾患の早期段階で試験し、個々の患者における免疫応答についての情報量を増やす可能性を開く。

#### 【0127】

RA患者において、ピメンチン、エノラーゼ、フィブリノゲンおよびコラーゲンを含む、

10

20

30

40

50

RAにおける自己抗原であることが以前に報告されている多くのソースタンパク質からHLA-DR提示ペプチドを同定した。興味深いことに、これらの同じソースタンパク質の多くに由来するペプチドが、LA患者の関節において高頻度で見出され、それらは免疫原性であることが知られていない。RAにおいて、アルギニンの酵素的翻訳後修飾により生じる非標準アミノ酸であるシトルリンを含む多くのタンパク質、例えばビメンチン、エノラーゼ、フィブリノゲン、コラーゲン、フィブロネクチン、カルレティキュリン等が同定された(11,61-67)。ACPAとして知られている、これらまたは他のシトルリン化タンパク質に対する抗体は、特に、HLA-DR分子のB1鎖の70~74位における高度に相同なアミノ酸配列(Q K/R RA A)であるRA共通ペプチド(11~13)をコードするHLA-DR対立遺伝子を有する患者において、RAと強く相関する。これらの残基は、P4アンカーポケットに寄与し、それを全体として正電荷にする。シトルリン(中性R基)を含む疾患関連ペプチドは、アルギニン(正荷電R基)を含む非修飾アナログと比較して、P4ポケットにおいてHLA共通エピートープに対して高い親和性を有することが知られており、このシトルリン化ペプチドは、DR4-IEトランスジェニックマウスにおいてT細胞の活性化を誘導することが報告されている(11)。そのため、本実施例ではMS/MSスペクトルを、アルギニンからシトルリンへの変換を含み得るペプチドの証拠について注意深く調査した。我々の検索アルゴリズムは、様々なペプチドを、シトルリン残基を含む形態と指定した。しかし、最初に取得したスペクトルおよび、本研究において用いられた最先端機器であるQ Exactive plus MSにおいて記録された標的化タンデム質量スペクトルのより細かな手作業による調査は、これらのペプチドの各々において、1ダルトンの増加が実際にはアスパラギンにおける脱アミド化に起因するものであったと決定した。この検索アルゴリズムは、それらは同じペプチド質量をもたらすものであり、初期MS/MSスペクトルは問題の残基間に特徴的なピークを欠く不完全なフラグメントイオン系列を含んでいたという理由から、これらの2つの異なる翻訳後修飾の間を正確に区別しなかった。生物学的プロセスの産物であるということに加えて、アスパラギンの脱アミドはまた、MHC分子からペプチドを溶出させるために使用された極限条件である高温および/または低pHへのサンプルの暴露によっても生じ得(68)、したがってこの修飾は、いくつかの例においては、サンプル処理の間に生じた人工物であり得る。シトルリン化タンパク質のライブラリは、RA患者の滑膜組織/滑液のLC-MS/MS分析を通じてコンパイルされた(69,70)。このインベントリにしたがう我々のLC-MS/MSデータの手作業による調査は、いかなるシトルリン化HLA-DR提示ペプチドも検出しなかった。

10

20

30

40

50

#### 【0128】

結論として、本明細書に開示されるデータは、LC-MS/MSが現時点で、慢性関節炎を患った個々の患者のST、SFMC、およびPBMCの臨床サンプルから直接的に多量のHLA-DR提示ペプチドを同定するのに十分な感度を有することを示している。本研究において、個々の患者の組織または体液からのHLA-DR提示ペプチドの発見ベースのLC-MS/MS同定が、新規の自己免疫応答を同定する上での橋渡しとなった。RA患者において同定された3つの自己抗原のうち、以前に報告されていたのは1つのみであり、LA患者において同定された4つの自己抗原のすべてが新規であった。免疫原性T細胞エピートープから始まる自己抗原の同定の主な優位点は、それが多くの場合、持続的な高力価の自己抗体を生成する多くの患者においてより広く適用可能なTおよびB細胞応答の調査に向けられていること、およびこれらの応答が病態生理学的結果と相関することである。さらに、任意の患者から容易に取得できるPBMCからのインビボHLA-DR提示ペプチドの同定は、任意の免疫系疾患を患った患者における潜在的に病原性の免疫応答の同定のための正確な、個別のアプローチを提供する。

#### 【0129】

##### 材料および方法

研究用患者 - 本研究は、Massachusetts General HospitalのHuman Investigations Committeeによって承認され、すべての参加者から書面上のインフォームドコンセントを得た。5名のRA患者が、関節リウマチの診断のためのAmerican College of Rheumatology/European League against Rheumatism (ACR/EULAR)定義の2010年度基準に合致し(50)、8名のLA患者が、ライム病の診断のためのCenters for Disease Control and Preventionの

基準に合致した(51)。全8名のLA患者は、2ヶ月の適切な経口抗生物質治療および1ヶ月のIV抗生物質治療の開始後3ヶ月間の持続的な関節炎と定義される(52)、抗生物質難治性LAを患っていた。LA患者において、滑膜組織を、治療のための関節鏡視下滑膜切除術の際に取得し、RA患者においては、組織を、滑膜切除術または関節置換手術の際に回収した。6名の患者で十分量のSFMCが分析に利用可能であり、4名の患者でPBMCが利用可能であった。

#### 【0130】

ST、SFMCおよびPBMCの調製 - 注記されているものを除くすべての試薬を、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から購入した。STサンプル(8~10g)を、その内容の全体が本明細書に組み入れられる、以前に参考文献(30)に記載されたプロトコルを用いて調製した。ヘパリン処理SFMCおよびPBMC(約 $3 \sim 8 \times 10^7$ 細胞)を、Ficoll-Hypaque (MP Biomedicals) 分離によって取得し、分析まで液体窒素中で保管した。精製の日、SFMCおよびPBMCサンプルを、37℃の水槽に2分間静置することによってすばやく解凍した。細胞を、 $800 \times g$ で10分間遠心分離することによってリン酸緩衝生理食塩水(PBS) (Life Technologies) 中で2回洗浄した。そのペレットを、10 mL溶解緩衝液: 150 mM塩化ナトリウム、20 mMトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン・HCl (pH 8.0)、5 mMエチレンジアミン四酢酸ナトリウム溶液、0.04%アジ化ナトリウム、1 mM 4-(2-アミノエチル)ベンゼンスルホニルフロリド・HCl、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ロイペプチン、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ペプスタチンA、5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ アプロチニンおよび1% 3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネートで再懸濁した。SFMCおよびPBMCからのHLA-DR複合体の免疫親和性精製を、以前に参考文献(30)に滑膜組織サンプルについて記載されていたプロトコルを用いて実施した。

10

20

#### 【0131】

LC-MS/MS - 高性能LC-MS/MSを、 $C_{18}$  ZipTip (Millipore, Billerica, MA) を用いて脱塩処理した後の精製されたHLA-DR提示ペプチドに対して行った。各質量分析器において使用された方法を以下に記載する。

#### 【0132】

LTQ-Orbitrap XL質量分析器 - nanoAcquity UPLCシステム (Waters Corp., Milford, MA) を、TriVersaを通じてLTQ-Orbitrap XL MS (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA) に接続した。

#### 【0133】

NanoMateイオン源 (Advion, Ithaca, NY) - ペプチド濃縮は、捕捉カラム ( $180 \mu\text{m} \times 20 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$  100 Symmetry  $C_{18}$ , Waters Corp) を用いて $15 \mu\text{L}/\text{分}$ の流速で1分間行い、分離は、キャピラリーカラム ( $150 \mu\text{m} \times 10 \text{ cm}$ ,  $1.7 \mu\text{m}$  130 BEH  $C_{18}$ , Waters Corp) を用いて達成した。緩衝液Aは、水中に1%アセトニトリル (ACN) および0.1%ギ酸を含み、緩衝液Bは、ACN中に1%水および0.1%ギ酸を含むものであった。52分間にわたる2%~40%の緩衝液Bの直線勾配を、 $0.5 \mu\text{L}/\text{分}$ の流速で使用した。

30

#### 【0134】

キャピラリー電圧を、NanoMateを用いて1.7 kVに設定し、キャピラリー温度を120℃に設定した。質量スペクトルを、およそ1.2秒/スペクトルのスキャン速度、60,000の解像度 ( $m/z$  300でのその最大高の半分のピーク幅) で $m/z$  300~2000の範囲を記録した。8000 N Lのシグナル強度しきい値を有する質量スペクトルにおける5つの最も豊富で多価の種について、タンデムMSを実施した。CIDにおける標準化衝突エネルギーを35%に設定し、衝突ガスとしてヘリウムを使用した。MS/MSスペクトルは、LTQ XLリニアイオントラップを用いて記録した。すべてのスペクトルをプロファイルモードで記録した。各サンプルにつき2~5回のLC-MS/MSを実施し、各サンプルのすべてのRAWファイルを、Proteome Discoverer 1.3ソフトウェア (ThermoFisher Scientific) を用いて1つのMascot汎用ファイルに結合した。

40

#### 【0135】

Q Exactive plus質量分析器 - nanoAcquity UPLCシステムを、TriVersa NanoMateイオン源を通じてQ Exactive plus MS (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA) に接続し

50

た。LTQ-Orbitrap XL MSにおいて使用されたのと同じペプチド濃縮および分離カラム、HPLC溶媒および勾配、ならびにNanoMateキャピラリー電圧および温度を、Q Exactive plus MSに適用した。調査MSスキャンを、70,000の解像度 ( $m/z$  300)、 $m/z$  400~2000の範囲で記録した。15個の最も豊富な多価イオンを、17,500の解像度、1.5  $m/z$ の分離幅および27%の標準化衝突エネルギーでのより高エネルギーの衝突誘導解離 (HCD) MS/MSのために選択した。すべてのスペクトルをプロファイルモードで記録した。各サンプルにつき1回のLC-MS/MSを実施し、各サンプルのRAWファイルを、Proteome Discoverer 1.3ソフトウェア (ThermoFisher Scientific) を用いてMascot汎用ファイルに変換した。

#### 【0136】

6550 iFunnel QTOF LC/MS - 2つの1260 HPLCシステムを、チップキューブインターフェース (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を通じて6550 iFunnel QTOF MSに接続した。Polaris-HR-3C18チップを、ペプチド濃縮および分離に使用した。濃縮カラムにおける流速は2  $\mu$ L/分に設定し、サンプル流出容積は4  $\mu$ Lに設定した。サンプル分離のために、Waters UPLCシステムにおいて使用したのと同じ溶媒を用いて、緩衝液Bの勾配 (0.1分間かけて2%から5%へ、74.9分間かけて5%から20%へ、10分間かけて20%から40%へ、10分間かけて40%から90%へ、90%緩衝液Bで5分間保持、2%緩衝液Bに戻し、10分間保持) を、0.3  $\mu$ L/分の流速で使用した。キャピラリー電圧は1.7~1.95kVに設定し、ガス温度は225 に設定した。調査用質量スペクトルは、8スペクトル/秒の取得率で、 $m/z$  295~1700の範囲を記録した。タンデム質量スペクトルは、3スペクトル/秒の取得率で、 $m/z$  50~1700の範囲を記録した。前駆イオンの単離は、1.3  $m/z$ の狭い単離ウィンドウで実施した。タンデムMSを、5000カウントのシグナル強度しきい値または0.001%の相対しきい値を有する質量スペクトルにおいて20個の最も豊富な多価の種について実施した。CIDの衝突エネルギーを、2価前駆イオンについては式  $[3.1x(m/z)/100+1]$  を、3価およびそれより多価の前駆イオンについては  $[3.6x(m/z)/100-4.8]$  を用いて設定した。1つのタンデムスペクトルを記録した後にアクティブ排除を使用状態にし、0.15分後に解放した。すべてのスペクトルを、セントロイドモードで記録した。各サンプルにつき1~2回のLC-MS/MSを行い、各サンプルのすべてのデータファイルを、MassHunter Qualitative Analysis B.05.00 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を用いて1つのMascot汎用ファイルに結合した。

#### 【0137】

タンパク質データベース検索 - 以前の研究において、International Protein Index (IPI) データベース (72,155個のタンパク質配列) を使用して、(本明細書では、患者RA1、RA2、LA1およびLA2として特定されている) 各々RAまたはLAを患った2名の患者由来のSTサンプルからHLA-DR提示ペプチドを同定した (30)。IPIデータベースは現在閉鎖されもはや維持されていないので、これらの4名の患者由来のサンプルについて得られたスペクトルを、UniProtタンパク質データベース (95,500エントリー、2010年8月) を用いて再分析し、その知見を我々の以前の研究報告 (30) と比較した。UniProtデータベースを用いて同定されたペプチドの約96~98%が、以前にIPIデータベースを用いて割り当てられたそれらと同じであった。LA2由来のSFMCサンプルならびにRA2由来のSFMCおよびPBMCサンプルが本研究における分析に利用可能であったので、ST、SFMCおよびPBMCにおけるHLA-DR提示ペプチドレパートリーの比較のために、RA1、RA2、LA1およびLA2のST由来の再分析されたLC-MS/MSデータを本明細書に含めた。本研究において、各サンプル由来のMascot汎用ファイルをデコイデータベースと連結されたUniProtヒトデータベースに対して検索することによって、HLA-DR提示自己ペプチドを同定した。デコイデータベースは、Perl script decoy.pl (Matrix Science) を用いてデータベース内の各タンパク質配列を無作為化することによって作成した。Mascot 2.4.0 (Matrix Science)、OMSSA Browser 2.1.1 (NCBI) およびX!Tandem tandem-win-12-10-01-1 (The Global Proteome Machine Organization www.thegpm.org) を、データベース検索に使用した。我々のデータベースへのペプチド配列の登録のために、コンセンサス一致 (>2つの検索エンジンによる配列の割当て) または2名の専門家による評価により受け入れ可能と判断された1つのみのプログラムによる

一致を必要とした。システインのシステニル化、グルタミンおよびアスパラギンの脱アミド、アミノ末端グルタミンおよびグルタミン酸からのピログルタミン酸、ならびにメチオニンの酸化を、すべての検索における修飾変数に指定した。S-システニル化ペプチドが、MHCクラスIおよびクラスII提示ペプチドにおいて(53~56)および我々の以前の研究において(30)同定された。加えて、アルギニンからシトルリンへの変換を、翻訳後修飾変数として含め、アルギニン対シトルリンに対応する分子量の相違を示すピーク( = 0.98402 Da)を、データベースの各アルギニン残基について検索した。

【0138】

LTQ-Orbitrap XL MSを用いて取得したデータについては、前駆イオン誤差許容範囲を0.01 Daに設定し、フラグメントイオン誤差許容範囲を0.5 Daに設定し、Q Exactive plus MSを用いて取得したデータについては、前駆イオン誤差許容範囲を10 ppmに設定し、フラグメントイオン誤差許容範囲を20 mmuに設定し、6550 iFunnel QTOF MSを用いて取得したデータについては、前駆イオン誤差許容範囲を20 ppmに設定し、フラグメントイオン誤差許容範囲を50 mmuに設定した。すべてのタンパク質データベース検索において「酵素なし」を指定した。Mascotスコアカットオフを 20に設定し、OMSSA e-valueカットオフを 0.01に設定し、X!Tandem e-valueカットオフを 10に設定した。加えて、少なくとも2つの検索プログラムによるペプチドのコンセンサス同定を、Microsoft Accessクエリーを用いて関連付けた。研究の間に、UniProtヒトタンパク質データベースは継続的に更新された。本明細書に示されているUniProtデータベースを用いて取得された結果を検証するため、最近のRA患者由来のPBMCサンプルから取得されたスペクトルを、Swiss-Protタンパク質データベース(20,100エントリー、2016年1月)を用いて再分析し、更新されたデータベースを用いて同定されたペプチドの93%が、本明細書で使用されたUniProtデータベースを用いて割り当てられたそれらと同じであった。

【0139】

冗長ペプチド配列の除去 - 同じソースタンパク質由来の内因性HLA-DR提示ペプチドはしばしば、異なるペプチド長で重複配列を含んでいる。例えば、HPタンパク質(アクセッションQ6PEJ8)由来の

<sup>116</sup>DHLKYVMLPVA<sup>126</sup> (SEQ ID NO: 10), <sup>116</sup>DHLKYVMLPVAD<sup>127</sup> (SEQ ID NO: 11), および

<sup>116</sup>DHLKYVMLPVADQ<sup>128</sup> (SEQ ID NO: 12)

はすべて、LA8のSTから同定され、

<sup>116</sup>DHLKYVMLPVA<sup>126</sup> (SEQ ID NO: 13) および <sup>116</sup>DHLKYVMLPVAD<sup>127</sup> (SEQ ID NO: 14)

は、

<sup>116</sup>DHLKYVMLPVADQ<sup>128</sup> (SEQ ID NO: 15)

の冗長ペプチドとみなされた。この問題に対処するため、同定されたコンセンサスペプチドのリストを、中心配列に重複するアミノ酸配列を有する冗長ペプチドを照合し除外する自家製ソフトウェアに入力した。少なくとも6連続する重複アミノ酸残基を有するペプチド配列を、冗長とみなし、最長のアミノ酸配列を有するペプチドをソフトウェアプログラムから出力した。このソフトウェアを、異なるサンプル間でコンセンサスペプチドを比較するためにも使用した。少なくとも6連続する重複アミノ酸残基を有するペプチド配列を、コンセンサスとみなした。

【0140】

ソースタンパク質の同定 - 少なくとも2つのタンパク質データベース検索エンジンによって同定されたコンセンサスペプチドおよびその同定が手作業による調査に近かった単一のプログラムによって指定されたペプチドのすべてを、UniProtヒトタンパク質データベースに対してペプチド配列をスクリーニングする自家製の別のソフトウェアプログラムに入力した(デコイ配列を含めず)。スクリーニングされたペプチド配列を含むソースタンパク質のアクセッション番号のすべてが、Microsoft Excelにおいてセミコロンでアクセッション番号をつなぐテキスト文字列として表されている。この検索は、多くの同定されたペプチドが、2つ以上のソースタンパク質に由来し得ること、異なるサンプル間でコン

センサソースタンパク質が、Microsoft Accessクエリーを用いてタンパク質アクセッション番号を含むテキスト文字列を照合することによって相関付けられたことを示した。この質量スペクトルプロテオミクスデータは、PRIDEパートナーレポジトリを通じて、データセット識別子PXD003051でProteomeXchange Consortium (57) に登録された。

【0141】

ペプチドおよびソースタンパク質の免疫原性の決定 - このプロトコルの橋渡し部分で、LC-MS/MSによって同定されたすべての非冗長ペプチドを合成し、ELISpotアッセイを用いて適合患者のPBMCに対して評価した。次に免疫原性ペプチドを、ELISpotアッセイによってT細胞反応性について試験し、そのペプチドのソースタンパク質を、多くの患者および対照対象においてELISAによってB細胞応答についてアッセイした。現時点で、ペプチドの免疫原性の決定は、3名のRAおよび5名のLA患者において完了している(22~26)。さらなるそのような分析が継続中である。

10

【0142】

統計 - すべてのp値は、両側である。0.05のp値を統計的に有意とみなした。

【0143】

実施例3 - 対象において自己抗原である可能性があるGNSおよび/またはフィラミンAペプチドを用いてELISpotアッセイを実施することができる

酵素連結免疫吸着スポット(ELISpot)アッセイを、ELISpot<sup>Plus</sup> for human IFN- $\gamma$  キット(Mabtech Inc., #3420-2AW-Plus)を用いて実施する。簡単に説明すると、Ficoll-Hypaque密度遠心分離を用いて回収され液体窒素中で保管されているPBMCをすばやく解凍し、丸底96ウェルプレート(Costar, #3799)に、200  $\mu$ lの完全培地(RPMI-1640、2mMグルタミン、100ユニット/mlペニシリン、100  $\mu$ g/mlストレプトマイシン、10mM HEPES(すべてInvitrogen製)および10%ヒトAB血清(Cellgrow))中ウェルあたり $2 \times 10^5$ 個となるようプレATINGする。全長タンパク質またはそれより短いペプチドフラグメントを、複製ウェルに1  $\mu$ Mの濃度で添加する。陽性および陰性対照は、それぞれ、1%PHA(Invitrogen, #10576-015)および抗原なしからなる。37  $^{\circ}$ Cおよび5%CO<sub>2</sub>下で5日後、細胞を、IFN- $\gamma$  捕捉抗体で事前にコーティングしておいたELISPOTプレート(Mabtech)に移し、一晚インキュベートする。すべてのその後の段階を、製造元のプロトコルに詳細に示されているように行う。ウェルの画像を、ImmunoSpotシリーズ3B分析装置を用いて撮影し、ImmunoSpot 5.0アカデミックソフトウェア(Cellular Technology Limited)を用いてスポットを計数する。

20

30

【0144】

実施例4 - 対象において自己抗原である可能性があるGNSおよび/またはフィラミンAペプチドを用いてELISAアッセイを実施することができる

血清抗ペプチド抗体ELISA: EasyWash ELISAプレート(CoStar)を、100  $\mu$ lのPBS中に溶解された0.5  $\mu$ g/mlキャリアフリー、組み換えヒトGNSおよび/またはフィラミンA全長タンパク質またはペプチドフラグメントでコーティングし、4  $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートする。すべてのその後の段階を、200rpmに設定されたプラットフォームシェーカー上のプレートで、室温にて行う。次の日に、プレートをPBST(リン酸緩衝生理食塩水および0.05% Tween-20)で3回洗浄し、次いで200  $\mu$ lのブロッキング緩衝液(PBST中5%脱脂粉乳)と共に1時間インキュベートする。その後、ウェルをPBSTで3回洗浄し、ブロッキング緩衝液で1/100希釈された100  $\mu$ lの各患者の血清サンプルを個々のウェルに添加し、1時間インキュベートする。プレート内標準化に使用するために、対照として、8名の健常対象由来の血清を各プレートに添加する。PBSTによる3回のさらなる洗浄の後、ブロッキング緩衝液で1:7500希釈された100  $\mu$ lのセイヨウワサビペルオキシダーゼに結合されたヤギ抗ヒトIgG(KPL #074-1006)を各ウェルに添加し、1時間インキュベートする。次いでプレートをPBSTで3回、その後にPBSで3回洗浄し、100  $\mu$ lの基質3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンおよび0.01%過酸化水素の1:1混合物(TMB基質試薬キット、#555214)(BD Biosciences)と共にインキュベートする。3分後に反応を、100  $\mu$ lの2N硫酸(LabChem Inc., #LC25790-2)を用いて停止する。各ウェルの吸光度値(OD<sub>450</sub>)を、マイクロプレートリーダー(Bio

40

50

-Rad、モデル550)を用いて決定した。

【0145】

滑液自己抗原サンドイッチELISA: EasyWash ELISAプレートを、50  $\mu$ lのPBS中に希釈した(5  $\mu$ g/ml)捕捉抗体、ヤギ抗ヒト自己抗原(ヒトGNSおよび/またはフィラミンA全長タンパク質またはペプチドフラグメント)でコーティングし、4℃で一晩インキュベートする。すべてのその後の段階を、室温で行う。次の日に、プレートをPBSで3回洗浄し、ブロッキング緩衝液と共に30分間インキュベートする。その後、プレートをPBSで3回洗浄し、100  $\mu$ lのブロッキング緩衝液で1:10希釈した各患者の滑液サンプルを個々のウェルに添加し、2時間インキュベートする。結果を定量するために、ブロッキング緩衝液で連続希釈した組み換えヒト自己抗原も、標準曲線の作成のために各プレートに添加する。プレートを3回洗浄した後、ウェルを、150  $\mu$ lのブロッキング緩衝液で満たし、穏やかにボルテックスし、再度PBSで3回洗浄してすべての非結合タンパク質を確実に除去する。次いでプレートを、50  $\mu$ lのブロッキング緩衝液で希釈された(5 ng/ml)マウス抗ヒト自己抗原抗体と共に2時間インキュベートする。プレートを再度PBSで洗浄し、50  $\mu$ lのブロッキング緩衝液中に希釈された(1:1000)検出抗体である、セイヨウワサビペルオキシダーゼに結合されたヤギ抗マウスIgG(Santa Cruz、#SC-2005)をプレートに添加し、1時間インキュベートする。プレートをPBSで3回洗浄した後、100  $\mu$ lのTMBを約6分間添加し、次いで反応を、100  $\mu$ lの2N硫酸を用いて停止する。プレートを上記のようにして読み取る。

10

【0146】

実施例5 - 対象において自己抗原である可能性があるGNSおよび/またはフィラミンAペプチドを用いて免疫プロットを実施することができる

20

自己抗原(例えば、ヒトGNSおよび/またはフィラミンA全長タンパク質またはペプチドフラグメント、例えばヒト組み換え自己抗原)12  $\mu$ gを、10%mini-PROTEAN TGXゲル(Bio-Rad)で電気泳動し、その後にニトロセルロース膜に転写する。すべてのその後の段階を、攪拌しながら室温で行う。膜を切断して小片にし、8チャンネルリザーバイナー(Costar、#4878)に各々設置し、1.5mlブロッキング緩衝液(20mM Tris、500mM塩化ナトリウム中5%脱脂粉乳、0.1% Tween-20; pH 7.5)中で1時間インキュベートする。その後、小片をリンス緩衝液(20mM Tris、500mM塩化ナトリウム中0.1% Tween-20; pH 7.5)を用いて1分間隔で3回洗浄し、各々個々の小片を、ブロッキング緩衝液で1:100希釈された患者の血清と共に1時間インキュベートする。小片を再度リンス緩衝液で3回洗浄し、ブロッキング緩衝液で1:2000希釈されたアルカリホスファターゼに結合されたヤギ抗ヒトIgG抗体(KPL、#4751-1006)と共に1時間インキュベートする。小片をリンス緩衝液で3回、さらに20mM Tris、500mM塩化ナトリウム; pH 7.5で3回洗浄する。バンドを、NBT/BCIP基質溶液(Roche Diagnostics GmbH、#11681451001)と共に3~5分間インキュベートすることによって可視化し、その後に小片を等量の水で洗浄して反応を停止させる。バンドが、イメージアッセイに含めた既定の陽性対照サンプルより濃い場合に、陽性とみなす。

30

【0147】

参考文献

1. McDevitt, H. O. and Bodmer, W. F. HL-A, immune-response genes, and disease *Lancet* **1974**, *1*, 1269-1275.
2. Takemura, S., Braun, A., Crowson, C., Kurtin, P. J., Cofield, R. H., O'Fallon, W. M., Goronzy, J. J. and Weyand, C. M. Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis *J Immunol* **2001**, *167*, 1072-1080.
3. Steere, A. C., Duray, P. H. and Butcher, E. C. Spirochetal antigens and lymphoid cell surface markers in Lyme synovitis. Comparison with rheumatoid synovium and tonsillar lymphoid tissue *Arthritis Rheum* **1988**, *31*, 487-495. 10
4. Plenge, R. M. Rheumatoid arthritis genetics: 2009 update *Curr Rheumatol Rep* **2009**, *11*, 351-356.
5. Stefanova, I., Dorfman, J. R., Tsukamoto, M. and Germain, R. N. On the role of self- recognition in T cell responses to foreign antigen *Immunol Rev* **2003**, *191*, 97-106.
6. Gregersen, P. K., Silver, J. and Winchester, R. J. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* **1987**, *30*, 1205-1213. 20

7. Holoshitz, J. The rheumatoid arthritis HLA-DRB1 shared epitope *Curr Opin Rheumatol* **2010**, *22*, 293-298.
8. Berglin, E., Johansson, T., Sundin, U., Jidell, E., Wadell, G., Hallmans, G. and Rantapaa-Dahlqvist, S. Radiological outcome in rheumatoid arthritis is predicted by presence of antibodies against cyclic citrullinated peptide before and at disease onset, and by IgA-RF at disease onset *Ann Rheum Dis* **2006**, *65*, 453-458.
9. de Vries-Bouwstra, J. K., Goekoop-Ruiterman, Y. P., Verpoort, K. N., Schreuder, G. M., Ewals, J. A., Terwiel, J. P., Roday, H. K., Kerstens, P. J., Toes, R. E., de Vries, R. R., Breedveld, F. C., Dijkmans, B. A., Huizinga, T. W. and Allaart, C. F. Progression of joint damage in early rheumatoid arthritis: association with HLA-DRB1, rheumatoid factor, and anti-citrullinated protein antibodies in relation to different treatment strategies *Arthritis Rheum* **2008**, *58*, 1293-1298. 10
10. Pratesi, F., Petit Teixeira, E., Sidney, J., Michou, L., Puxeddu, I., Sette, A., Cornelis, F. and Migliorini, P. HLA shared epitope and ACPA: just a marker or an active player? *Autoimmun Rev* **2013**, *12*, 1182-1187. 20
11. Hill, J. A., Southwood, S., Sette, A., Jevnikar, A. M., Bell, D. A. and Cairns, E. Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1\*0401 MHC class II molecule *J Immunol* **2003**, *171*, 538-541.
12. Snir, O., Widhe, M., von Spee, C., Lindberg, J., Padyukov, L., Lundberg, K., Engstrom, A., Venables, P. J., Lundeberg, J., Holmdahl, R., Klareskog, L. and Malmstrom, V. Multiple antibody reactivities to citrullinated antigens in sera from patients with rheumatoid arthritis: association with HLA-DRB1 alleles *Ann Rheum Dis* **2009**, *68*, 736-743.
13. Huizinga, T. W., Amos, C. I., van der Helm-van Mil, A. H., Chen, W., van Gaalen, F. A., Jawaheer, D., Schreuder, G. M., Wener, M., Breedveld, F. C., Ahmad, N., Lum, R. F., de Vries, R. R., Gregersen, P. K., Toes, R. E. and Criswell, L. A. Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins *Arthritis Rheum* **2005**, *52*, 3433-3438. 30
14. Steere, A. C. Lyme disease *N Engl J Med* **2001**, *345*, 115-125.
15. Steere, A. C., Schoen, R. T. and Taylor, E. The clinical evolution of Lyme arthritis *Ann Intern Med* **1987**, *107*, 725-731.
16. Steere, A. C., Levin, R. E., Molloy, P. J., Kalish, R. A., Abraham, J. H., 3rd, Liu, N. Y. and Schmid, C. H. Treatment of Lyme arthritis *Arthritis Rheum* **1994**, *37*, 878-888. 40
17. Steere, A. C. and Angelis, S. M. Therapy for Lyme arthritis: strategies for the treatment of antibiotic-refractory arthritis *Arthritis Rheum* **2006**, *54*, 3079-3086.

18. Shin, J. J., Glickstein, L. J. and Steere, A. C. High levels of inflammatory chemokines and cytokines in joint fluid and synovial tissue throughout the course of antibiotic-refractory Lyme arthritis *Arthritis Rheum* **2007**, *56*, 1325-1335.
19. Strle, K., Shin, J. J., Glickstein, L. J. and Steere, A. C. Association of a Toll-like receptor 1 polymorphism with heightened Th1 inflammatory responses and antibiotic-refractory Lyme arthritis *Arthritis Rheum* **2012**, *64*, 1497-1507.
20. Shen, S., Shin, J. J., Strle, K., McHugh, G., Li, X., Glickstein, L. J., Drouin, E. E. and Steere, A. C. Treg cell numbers and function in patients with antibiotic-refractory or antibiotic-responsive Lyme arthritis *Arthritis Rheum* **2010**, *62*, 2127-2137. 10
21. Vudattu, N. K., Strle, K., Steere, A. C. and Drouin, E. E. Dysregulation of CD4+CD25(high) T cells in the synovial fluid of patients with antibiotic-refractory Lyme arthritis *Arthritis Rheum* **2013**, *65*, 1643-1653.
22. Drouin, E. E., Seward, R. J., Strle, K., McHugh, G., Katchar, K., Londono, D., Yao, C., Costello, C. E. and Steere, A. C. A novel human autoantigen, endothelial cell growth factor, is a target of T and B cell responses in patients with Lyme disease *Arthritis Rheum* **2013**, *65*, 186-196. 20
23. Crowley, J. T., Drouin, E. E., Pianta, A., Strle, K., Wang, Q., Costello, C. E. and Steere, A. C. A highly expressed human protein, apolipoprotein B-100, serves as an autoantigen in a subgroup of patients with Lyme disease *J Infect Dis* **2015**, doi 10.1093/infdis/jiv1310. 20
24. Crowley, J. T., Strle, K., Drouin, E. E., Pianta, A., Arvikar, S. L., Wang, Q., Costello, C. E. and Steere, A. C. Matrix metalloproteinase-10 is a target of T and B cell responses that correlate with synovial pathology in patients with antibiotic-refractory Lyme arthritis. *J Autoimmun.* **2016**, *69*, 24-37.
25. Pianta, A., Drouin, E. E., Crowley, J. T., Arvikar, S., Strle, K., Costello, C. E. and Steere, A. C. Annexin A2 is a target of T and B cell responses associated with synovial fibroblast proliferation in patients with antibiotic-refractory Lyme arthritis. *Clin Immunol* **2015**, *160*, 336-341. 30
26. Pianta, A., Drouin, E. E., Wang, Q., Arvikar, S., Costello, C. E. and Steere, A. C. Identification of *N*-acetylglucosamine-6-sulfatase and filamin A as novel targets of autoimmune T and B cell responses in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **2015**, *74S*, 112.
27. Steere, A. C., Klitz, W., Drouin, E. E., Falk, B. A., Kwok, W. W., Nepom, G. T. and Baxter-Lowe, L. A. Antibiotic-refractory Lyme arthritis is associated with HLA-DR molecules that bind a *Borrelia burgdorferi* peptide *J Exp Med* **2006**, *203*, 961-971.
28. Moret, F. M., Hack, C. E., van der Wurff-Jacobs, K. M., de Jager, W., Radstake, T. R., Lafeber, F. P. and van Roon, J. A. Intra-articular CD1c-expressing myeloid dendritic cells from rheumatoid arthritis patients express a unique set of T cell-attracting chemokines and spontaneously induce Th1, Th17 and Th2 cell activity *Arthritis Res Ther* **2013**, *15*, R155. 40

29. Katchar, K., Drouin, E. E. and Steere, A. C. Natural killer cells and natural killer T cells in Lyme arthritis *Arthritis Res Ther* **2013**, *15*, R183.
30. Seward, R. J., Drouin, E. E., Steere, A. C. and Costello, C. E. Peptides presented by HLA-DR molecules in synovia of patients with rheumatoid arthritis or antibiotic-refractory Lyme arthritis *Mol Cell Proteomics* **2011**, *10*, M110 002477.
31. Biemann, K. Appendix 5. Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions) *Methods Enzymol* **1990**, *193*, 886-887.
32. Hunt, D. F., Henderson, R. A., Shabanowitz, J., Sakaguchi, K., Michel, H., Sevilir, N., Cox, A. L., Appella, E. and Engelhard, V. H. Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry *Science* **1992**, *255*, 1261-1263. 10
33. Bassani-Sternberg, M., Barnea, E., Beer, I., Avivi, I., Katz, T. and Admon, A. Soluble plasma HLA peptidome as a potential source for cancer biomarkers *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107*, 18769-18776.
34. Alvarez-Navarro, C., Cragnolini, J. J., Dos Santos, H. G., Barnea, E., Admon, A., Morreale, A. and Lopez de Castro, J. A. Novel HLA-B27-restricted epitopes from *Chlamydia trachomatis* generated upon endogenous processing of bacterial proteins suggest a role of molecular mimicry in reactive arthritis *J Biol Chem* **2013**, *288*, 25810-25825. 20
35. Bassani-Sternberg, M., Pletscher-Frankild, S., Jensen, L. J. and Mann, M. Mass spectrometry of human leukocyte antigen class I peptidomes reveals strong effects of protein abundance and turnover on antigen presentation *Mol Cell Proteomics* **2015**, *14*, 658-673.
36. Londono, D., Cadavid, D., Drouin, E. E., Strle, K., McHugh, G., Aversa, J. M. and Steere, A. C. Antibodies to endothelial cell growth factor and obliterative microvascular lesions in the synovium of patients with antibiotic-refractory lyme arthritis *Arthritis & Rheumatology* **2014**, *66*, 2124-2133.
37. Cobbold, M., De La Pena, H., Norris, A., Polefrone, J. M., Qian, J., English, A. M., Cummings, K. L., Penny, S., Turner, J. E., Cottine, J., Abelin, J. G., Malaker, S. A., Zarling, A. L., Huang, H. W., Goodyear, O., Freeman, S. D., Shabanowitz, J., Pratt, G., Craddock, C., Williams, M. E., Hunt, D. F. and Engelhard, V. H. MHC class I-associated phosphopeptides are the targets of memory-like immunity in leukemia *Sci Transl Med* **2013**, *5*, 203ra125. 30
38. Li, Y., Depontieu, F. R., Sidney, J., Salay, T. M., Engelhard, V. H., Hunt, D. F., Sette, A., Topalian, S. L. and Mariuzza, R. A. Structural basis for the presentation of tumor-associated MHC class II-restricted phosphopeptides to CD4+ T cells *J Mol Biol* **2010**, *399*, 596-603.
39. Guasp, P., Alvarez-Navarro, C., Gomez-Molina, P., Martin-Esteban, A., Marcilla, M., Barnea, E., Admon, A. and Lopez de Castro, J. A. The Peptidome of Behcet's Disease-Associated HLA-B\*51:01 Includes Two Subpeptidomes Differentially Shaped by Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 *Arthritis & Rheumatology* **2016**, *68*, 505-515. 40

40. Chicz, R. M., Urban, R. G., Gorga, J. C., Vignali, D. A., Lane, W. S. and Strominger, J. L. Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles *J Exp Med* **1993**, *178*, 27-47.
41. Lippolis, J. D., White, F. M., Marto, J. A., Luckey, C. J., Bullock, T. N., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. and Engelhard, V. H. Analysis of MHC class II antigen processing by quantitation of peptides that constitute nested sets *J Immunol* **2002**, *169*, 5089-5097.
42. Caron, E., Espona, L., Kowalewski, D. J., Schuster, H., Ternette, N., Alpizar, A., Schittenhelm, R. B., Ramarathinam, S. H., Lindestam Arlehamn, C. S., Chiek Koh, C., Gillet, L. C., Rabsteyn, A., Navarro, P., Kim, S., Lam, H., Sturm, T., Marcilla, M., Sette, A., Campbell, D. S., Deutsch, E. W., Moritz, R. L., Purcell, A. W., Rammensee, H. G., Stevanovic, S. and Aebersold, R. An open-source computational and data resource to analyze digital maps of immunopeptidomes *Elife* **2015**, *4*, doi: 10.7554/eLife.07661.
43. Caron, E., Kowalewski, D. J., Chiek Koh, C., Sturm, T., Schuster, H. and Aebersold, R. Analysis of Major Histocompatibility Complex (MHC) Immunopeptidomes Using Mass Spectrometry *Mol Cell Proteomics* **2015**, *14*, 3105-3117.
44. Gordon, R. D., Young, J. A., Rayner, S., Luke, R. W., Crowther, M. L., Wordsworth, P., Bell, J., Hassall, G., Evans, J., Hinchliffe, S. A. and et al. Purification and characterization of endogenous peptides extracted from HLA-DR isolated from the spleen of a patient with rheumatoid arthritis *Eur J Immunol* **1995**, *25*, 1473-1476.
45. Oshitani, N., Hato, F., Kitagawa, S., Maeda, K., Higuchi, K., Matsumoto, T. and Arakawa, T. Analysis of intestinal HLA-DR bound peptides and dysregulated immune responses to enteric flora in the pathogenesis of inflammatory bowel disease *Int J Mol Med* **2003**, *11*, 99-104.
46. Dengjel, J., Nastke, M. D., Gouttefangeas, C., Gitsioudis, G., Schoor, O., Altenberend, F., Muller, M., Kramer, B., Missiou, A., Sauter, M., Hennenlotter, J., Wernet, D., Stenzl, A., Rammensee, H. G., Klingel, K. and Stevanovic, S. Unexpected abundance of HLA class II presented peptides in primary renal cell carcinomas *Clin Cancer Res* **2006**, *12*, 4163-4170.
47. Wahlstrom, J., Dengjel, J., Persson, B., Duyar, H., Rammensee, H. G., Stevanovic, S., Eklund, A., Weissert, R. and Grunewald, J. Identification of HLA-DR-bound peptides presented by human bronchoalveolar lavage cells in sarcoidosis *J Clin Invest* **2007**, *117*, 3576-3582.
48. Muixi, L., Carrascal, M., Alvarez, I., Daura, X., Marti, M., Armengol, M. P., Pinilla, C., Abian, J., Pujol-Borrell, R. and Jaraquemada, D. Thyroglobulin peptides associate *in vivo* to HLA-DR in autoimmune thyroid glands *J Immunol* **2008**, *181*, 795-807.
49. Collado, J. A., Alvarez, I., Ciudad, M. T., Espinosa, G., Canals, F., Pujol-Borrell, R., Carrascal, M., Abian, J. and Jaraquemada, D. Composition of the HLA-DR-associated human thymus peptidome *Eur J Immunol* **2013**, *43*, 2273-2282.

50. Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A. J., Funovits, J., Felson, D. T., Bingham, C. O., 3rd, Birnbaum, N. S., Burmester, G. R., Bykerk, V. P., Cohen, M. D., Combe, B., Costenbader, K. H., Dougados, M., Emery, P., Ferraccioli, G., Hazes, J. M., Hobbs, K., Huizinga, T. W., Kavanaugh, A., Kay, J., Kvien, T. K., Laing, T., Mease, P., Menard, H. A., Moreland, L. W., Naden, R. L., Pincus, T., Smolen, J. S., Stanislawska-Biernat, E., Symmons, D., Tak, P. P., Upchurch, K. S., Vencovsky, J., Wolfe, F. and Hawker, G. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative *Arthritis Rheum* **2010**, *62*, 2569-2581. 10

51. Wharton, M., Chorba, T. L., Vogt, R. L., Morse, D. L. and Buehler, J. W. Case definitions for public health surveillance *MMWR Recomm Rep* **1990**, *39*, 1-43.

52. Steere, A. C. and Glickstein, L. Elucidation of Lyme arthritis *Nat Rev Immunol* **2004**, *4*, 143-152.

53. Chen, W., Yewdell, J. W., Levine, R. L. and Bennink, J. R. Modification of cysteine residues *in vitro* and *in vivo* affects the immunogenicity and antigenicity of major histocompatibility complex class I-restricted viral determinants *J Exp Med* **1999**, *189*, 1757-1764.

54. Haque, M. A., Hawes, J. W. and Blum, J. S. Cysteinylation of MHC class II ligands: peptide endocytosis and reduction within APC influences T cell recognition *J Immunol* **2001**, *166*, 4543-4551. 20

55. Meadows, L., Wang, W., den Haan, J. M., Blokland, E., Reinhardus, C., Drijfhout, J. W., Shabanowitz, J., Pierce, R., Agulnik, A. I., Bishop, C. E., Hunt, D. F., Goulmy, E. and Engelhard, V. H. The HLA-A\*0201-restricted H-Y antigen contains a posttranslationally modified cysteine that significantly affects T cell recognition *Immunity* **1997**, *6*, 273-281.

56. Pierce, R. A., Field, E. D., den Haan, J. M., Caldwell, J. A., White, F. M., Marto, J. A., Wang, W., Frost, L. M., Blokland, E., Reinhardus, C., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Goulmy, E. and Engelhard, V. H. Cutting edge: the HLA-A\*0101-restricted HY minor histocompatibility antigen originates from DFFRY and contains a cysteinylated cysteine residue as identified by a novel mass spectrometric technique *J Immunol* **1999**, *163*, 6360-6364. 30

57. Vizcaino, J. A., Deutsch, E. W., Wang, R., Csordas, A., Reisinger, F., Rios, D., Dianes, J. A., Sun, Z., Farrah, T., Bandeira, N., Binz, P. A., Xenarios, I., Eisenacher, M., Mayer, G., Gatto, L., Campos, A., Chalkley, R. J., Kraus, H. J., Albar, J. P., Martinez-Bartolome, S., Apweiler, R., Omenn, G. S., Martens, L., Jones, A. R. and Hermjakob, H. ProteomeXchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination *Nat Biotechnol* **2014**, *32*, 223-226.

58. Behera, A. K., Hildebrand, E., Szafranski, J., Hung, H. H., Grodzinsky, A. J., Lafyatis, R., Koch, A. E., Kalish, R., Perides, G., Steere, A. C. and Hu, L. T. Role of aggrecanase 1 in Lyme arthritis *Arthritis Rheum* **2006**, *54*, 3319-3329. 40

59. Salle, V., Maziere, J. C., Smail, A., Cevallos, R., Maziere, C., Fuentes, V., Tramier, B., Makdassi, R., Choukroun, G., Vittecoq, O., Goeb, V. and Ducroix, J. P. Anti-annexin II antibodies in systemic autoimmune diseases and antiphospholipid syndrome *J Clin Immunol* **2008**, *28*, 291-297.
60. Zhang, B., Pirmoradian, M., Chernobrovkin, A. and Zubarev, R. A. DeMix workflow for efficient identification of cofragmented peptides in high resolution data-dependent tandem mass spectrometry *Mol Cell Proteomics* **2014**, *13*, 3211-3223.
61. Vossenaar, E. R., Despres, N., Lapointe, E., van der Heijden, A., Lora, M., Senshu, T., van Venrooij, W. J. and Menard, H. A. Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin *Arthritis Res Ther* **2004**, *6*, R142-150. 10
62. Kinloch, A., Tatzer, V., Wait, R., Peston, D., Lundberg, K., Donatien, P., Moyes, D., Taylor, P. C. and Venables, P. J. Identification of citrullinated alpha-enolase as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis *Arthritis Res Ther* **2005**, *7*, R1421-1429.
63. Takizawa, Y., Suzuki, A., Sawada, T., Ohsaka, M., Inoue, T., Yamada, R. and Yamamoto, K. Citrullinated fibrinogen detected as a soluble citrullinated autoantigen in rheumatoid arthritis synovial fluids *Ann Rheum Dis* **2006**, *65*, 1013-1020. 20
64. Burkhardt, H., Sehnert, B., Bockermann, R., Engstrom, A., Kalden, J. R. and Holmdahl, R. Humoral immune response to citrullinated collagen type II determinants in early rheumatoid arthritis *Eur J Immunol* **2005**, *35*, 1643-1652.
65. van Beers, J. J., Willemze, A., Stammen-Vogelzangs, J., Drijfhout, J. W., Toes, R. E. and Pruijn, G. J. Anti-citrullinated fibronectin antibodies in rheumatoid arthritis are associated with human leukocyte antigen-DRB1 shared epitope alleles *Arthritis Res Ther* **2012**, *14*, R35.
66. Ling, S., Cline, E. N., Haug, T. S., Fox, D. A. and Holoshitz, J. Citrullinated calreticulin potentiates rheumatoid arthritis shared epitope signaling *Arthritis Rheum* **2013**, *65*, 618-626. 30
67. Spengler, J., Lugonja, B., Ytterberg, A. J., Zubarev, R. A., Creese, A. J., Pearson, M. J., Grant, M. M., Milward, M., Lundberg, K., Buckley, C. D., Filer, A., Raza, K., Cooper, P. R., Chapple, I. L. and Scheel-Toellner, D. Release of Active Peptidyl Arginine Deiminases by Neutrophils Can Explain Production of Extracellular Citrullinated Autoantigens in Rheumatoid Arthritis Synovial Fluid *Arthritis & Rheumatology* **2015**, *67*, 3135-3145.
68. Pace, A. L., Wong, R. L., Zhang, Y. T., Kao, Y. H. and Wang, Y. J. Asparagine deamidation dependence on buffer type, pH, and temperature *J Pharm Sci* **2013**, *102*, 1712- 1723.
69. van Beers, J. J., Schwarte, C. M., Stammen-Vogelzangs, J., Oosterink, E., Bozic, B. and Pruijn, G. J. The rheumatoid arthritis synovial fluid citrullinome reveals novel citrullinated epitopes in apolipoprotein E, myeloid nuclear differentiation antigen, and beta-actin *Arthritis Rheum* **2013**, *65*, 69-80. 40

70. Ytterberg, A. J., Joshua, V., Reynisdottir, G., Tarasova, N. K., Rutishauser, D., Ossipova, E., Haj Hensvold, A., Eklund, A., Skold, C. M., Grunewald, J., Malmstrom, V., Jakobsson, P. J., Ronnelid, J., Padyukov, L., Zubarev, R. A., Klareskog, L. and Catrina, A. I. Shared immunological targets in the lungs and joints of patients with rheumatoid arthritis: identification and validation *Ann Rheum Dis* **2015**, *74*, 1772-1777.

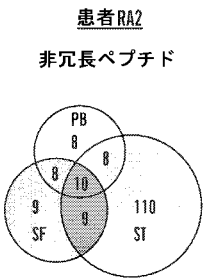
71. Asquith DL, Miller AM, McInnes IB, Liew FY. Animal models of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*. 2009 Aug;39(8):2040-4.

72. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988, 31: 315-324.

73. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:1580–1588.

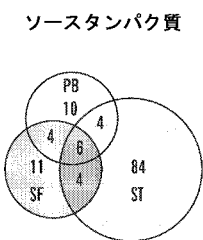
10

【 図 1 A 】



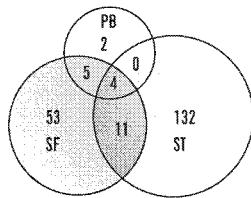
**重複**  
53%のSFがSTと共通  
53%のPBがSTと共通  
全3部位で6%共通

【 図 1 B 】

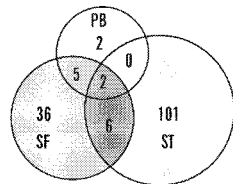


**重複**  
40%のSFがSTと共通  
42%のPBがSTと共通  
全3部位で5%共通

患者LA5

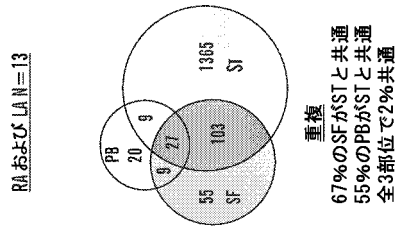


**重複**  
21%のSFがSTと共通  
36%のPBがSTと共通  
全3部位で2%共通

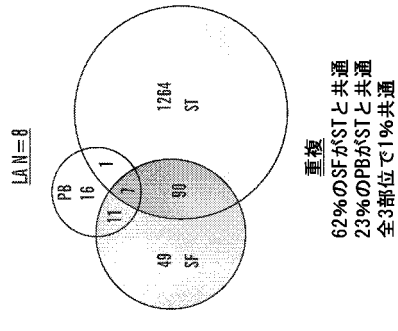


**重複**  
16%のSFがSTと共通  
22%のPBがSTと共通  
全3部位で1%共通

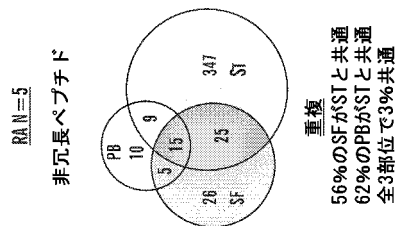
【 図 1 C 】



**重複**  
67%のSFがSTと共通  
55%のPBがSTと共通  
全3部位で2%共通



**重複**  
62%のSFがSTと共通  
23%のPBがSTと共通  
全3部位で1%共通



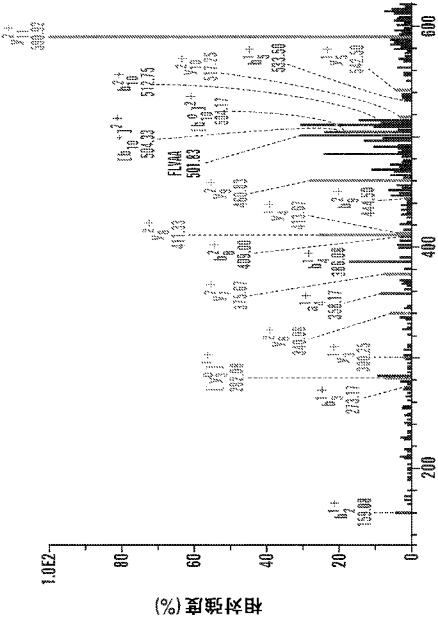
**重複**  
56%のSFがSTと共通  
62%のPBがSTと共通  
全3部位で3%共通



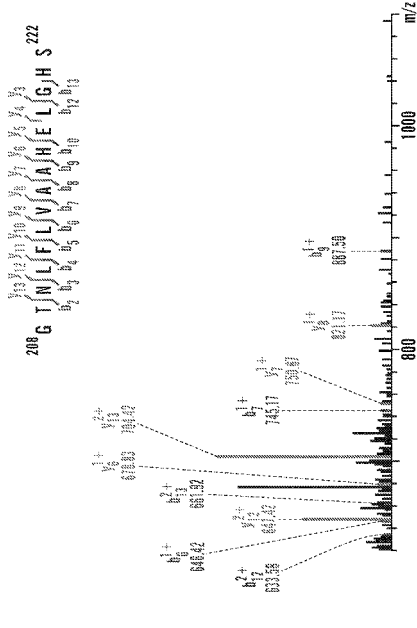


マトリクスメタプロポテイナーゼ10

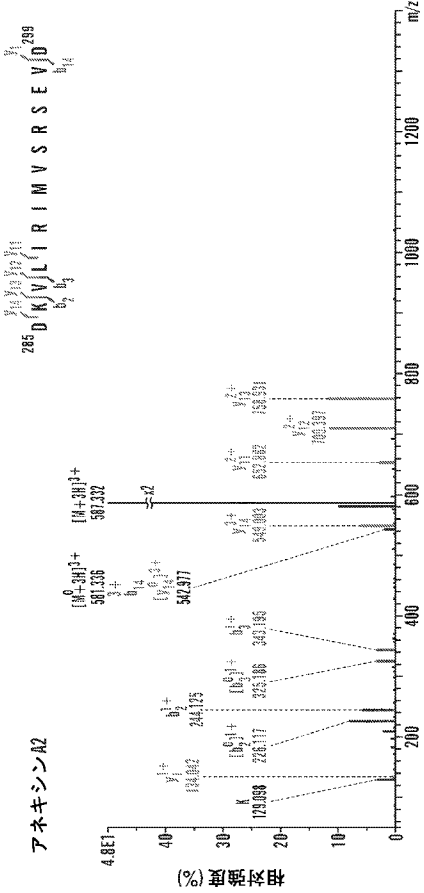
【図 3 C - 1】



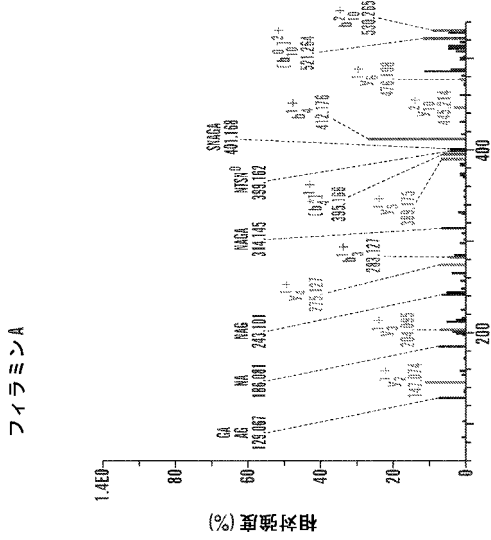
【図 3 C - 2】



【図 3 D】



【図 3 E - 1】



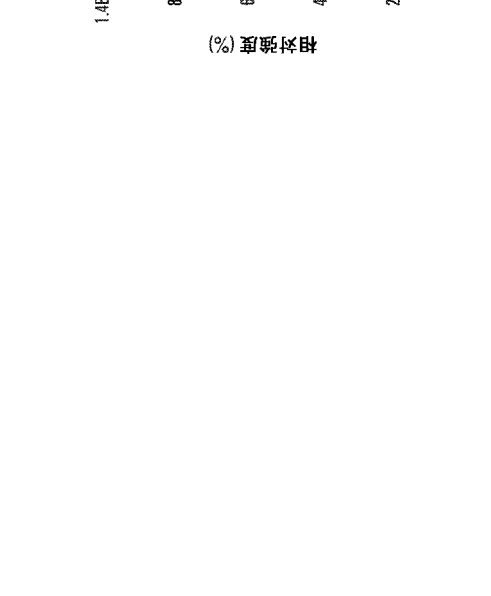
アネキシニンA2

【図 3 D】

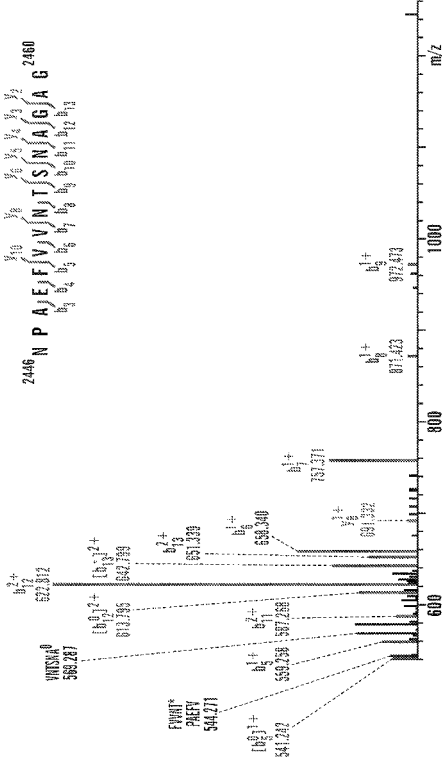


ピラミンA

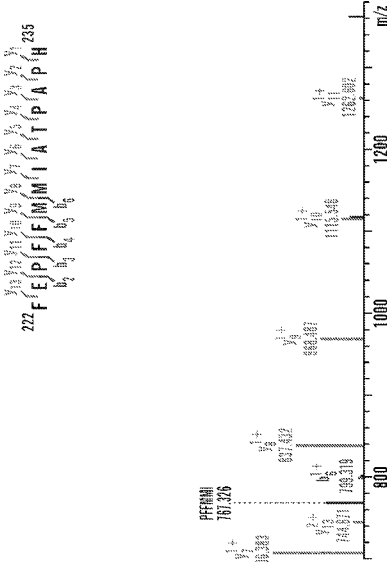
【図 3 E - 1】



【 図 3 E - 2 】

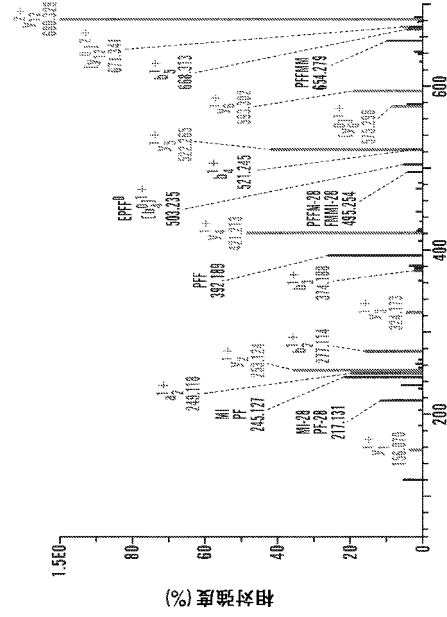


【 図 3 F - 2 】



【 図 3 F - 1 】

N-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼ

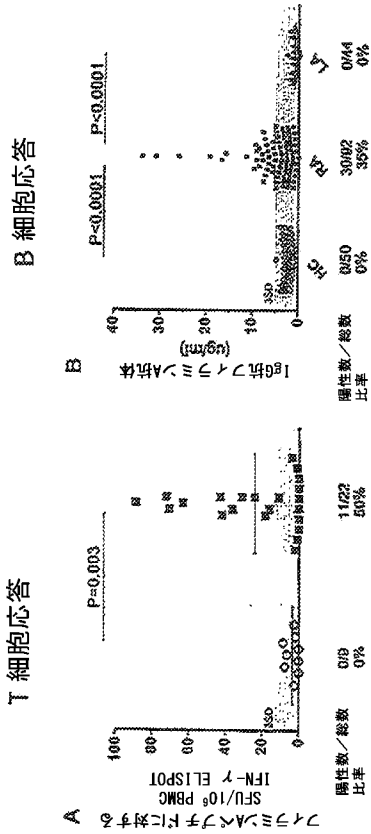


【 図 4 】

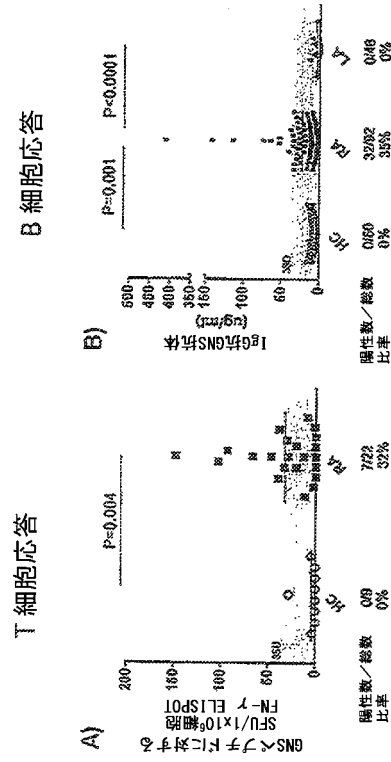
症例患者	RA2
性別	F
年齢 (歳)	37
関節炎期間 (年)	3
リウマチ因子	陽性
ACPA*	陽性
HLA-DR 遺伝子型	0101/0401
滑膜組織	
# HLA-DRペプチド	89
# ソースタンパク質	86
# 反応性ペプチド	1 (GNS)
滑液	
# HLA-DRペプチド	19
# ソースタンパク質	13
# 反応性ペプチド	0
末梢血	
# HLA-DRペプチド	15
# ソースタンパク質	11
# 反応性ペプチド	1 (FLNA)

\*抗シトルリルリタンパク質抗体: # GNS、  
N-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼ; FLNA、フィラミンAの数

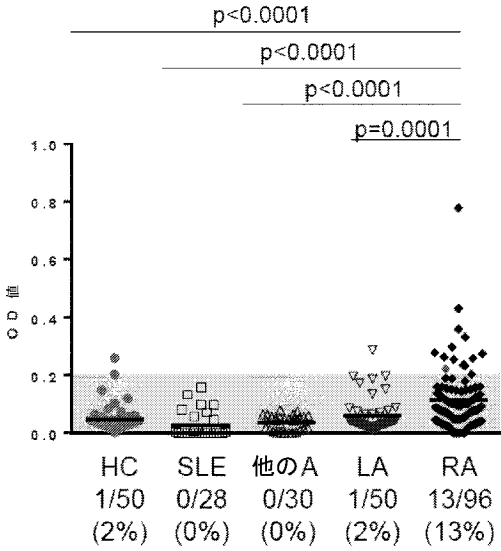
【 図 5 】



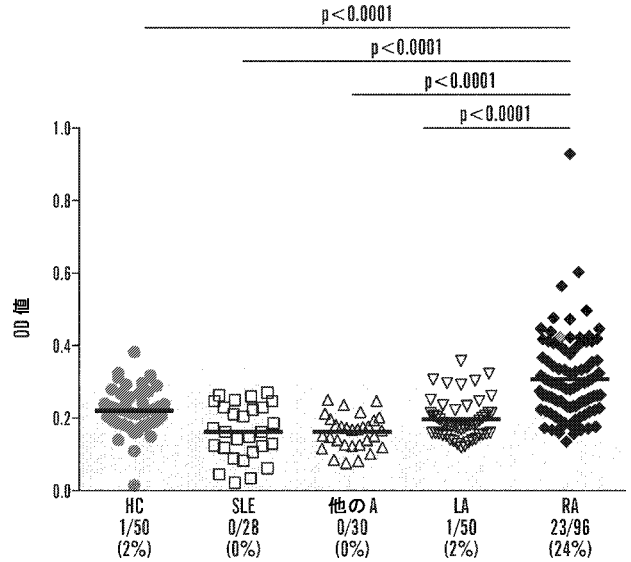
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【  9 】

1 MRLPLAPGR LRRGSRHLPL SCSPALLLIV LGGCLGVFGV AAGTRRPVVV LLTDDQDDEV  
 61 LGGMTPLKKT KALIGEMGMT FSSAVVPSAL CPCSASILT GKYPHNHHVV NNTLEGNCS  
 121 KSWQKIQEPN TFPAILRSMC GYQTFEAGKY LNEYGAPDAG GLEHVPLGWS YWVALEKNSK  
 181 YYNYTSLNG KARKHGENYS VDYLTDLVAN VSLDFLDYKS NFEFFMMIA TPAPHSPWTA  
 241 APQYQKAFQN VFAPRNKNFN IHGTNKHHLI ROAKTPTMNS SIQFLDNFR KRWQTLSSVD  
 301 DLVEKLVKRL EFTGELNNTY IFYTSNNGYH TGQFSLPIDK RQLYEEDIKV PLLVRGPGIK  
 361 PNQTSKMLVA NIDLGPITLD IAGYDLNKIQ.MDGMSSLPL RGASNLTWRS DVLVEYQGEG  
 421 RNVDTPTCS LSPGVSQCFP DCVCEDAYNN TYACVRTMSA LWNLYQCEFD DQEVFEVYV  
 481 LTADPDQITN IAKTIDPELL GKMNVRMLMML QSCSGPTCRT PGVFDPGYRF DPRLMSFNRG  
 541 SVRTRFRFSKHL LL

【  1 0 - 1 】

1 MSSHRSRAGQ SAAGAAGGG VTRDAEMPA TEKDLAEDAP WKKIQNTTFT RWCNEHLKCV  
 61 SKRIANLQTD LSDGLRLIAL LEVLSQKKMH RKNQRPTFR QMQLNENSVVA LEFLDRESIK  
 121 LVSDSKAIV DGNLKLILGL IWTLLIHSI SMPMWDEEED EEAKKQTPKQ RLLGWIQNKL  
 181 PQLPITNFR DWQSGRALGA LVDSACPLC PDWDSWDASK PVTNAREAMQ QADDWLGIPQ  
 241 VITPEEIVDP NVDEHSVMTY LSOFPKALIK PGAPLRPKLN PKKARAYGPG IEPTGNMVKK  
 301 RAEFTVTRS AGQGEVLVYV EDPAGHQEEA KYTANNDKNR TFSWYVYVEV TGTHKVTVLV  
 361 AGQHIKSPF EVVYDKSQGD ASKVTAGQPG LEPSGNIANK TTYFEIFTAG AGTGEVEVI  
 421 QDPMGQKGTV EPQLEARGDS TYRCSYQPTM EGVHTVHTV AGVPIRSPY TVTVGQACNP  
 481 SACRAVGRGL QPKGVYKET ADFKYTKGA GSELKVTVK GPKGEERVKQ KDLDGQVYGF  
 541 EYYPVMPGTY IVTITWGGQN IGRSPFEVKV GTECGNQKVR AWGPGLEGGV VGSADFVVE  
 601 AIGDDVGTGL FSVEGSPQAK IECDDKGDGS CDVRYWPQEA GEYAVHVLN SEDIRLSPFM  
 661 ADIRDAPODF HPDRVKARGP GLEKTGVAVN KPAEFTVDK HGGKAPLRVQ VQDNEGGPVE  
 721 ALVKDNGNGT YSCSYVPRKP VKHTAMVSWG GVSIPNSPFR VNVGAGSHPN KVKVYGPVVA  
 781 KTLKKAHEPT YFTVDCAEAG QGDVSGIKC APGVVWPAEA DIDFDIIRND NDTFTVKYTP  
 841 RGAGSYTIMV LFADQATPTS PIRVKVEPSH DASKVKAEGP GLSRTGVELG KPTHFTVNAK  
 901 AAGKGLDVQ FSGLTKGDV RDVDIHDHD NTTYVKTTPV QQGPVGVNVT YGGDPIKSP  
 961 FSVAVVPSLD LSKIVSGLG EKVDVKGDKQE FTVSKSGAGG QGKIVASKVY PSGAAVPCVY  
 1021 EPLGADNSV VRFPREEG YEVEYTDGV VPGSPFPLE AVAPKPSKV KAFGPGIQQG  
 1081 SAGSPARFTI DTKGAGTGL GUYVEGPCEA QLECLDNGDG TCSVSVVYTE PGDYNINILF  
 1141 ADTHIPGSPF KAHVVPFCFDA SKVKCSGPGI ERATAGEVGO FQVDCSSAGS AELTIEICSE  
 1201 AGLPAEVIQ DHGDTGHTIT YIPLCPGAT VTIKYGQPV PNFPKLOVE FAVDTSGVQC  
 1261 YGPGIEGQGV FREATITQGG PHVKARVANP SGNLITETVQ DRGDMYKVE  
 1321 YTPYEEGLHS VDVTYDGSVP PSSPFPVPT EGCDDPSRVV HGPQISGTT NKPKNFTVET  
 1381 RGAGTGGLGL AVEGPEAKM SCMDNKGDCS SVEYIPYEAQ TYSLNVYTYGG HQVPGSPFKY

【  1 0 - 2 】

1441 PVHVDVTASK VKCSGGLSP GMVRANLPOS FQVDTSKAGV APLQVKVQGP KGLIVERVDVV  
 1501 DNADGTQTVN YVPSREGPYS ISVLYGDEEV PRSPFKVKVL PTHDASKVA SGPGLINTTG  
 1561 PASLPVEFTI DAKDAGEGLL AVQITDPEGK PKKTHIQDNH DGYTYVAVVP DVTGRYTI  
 1621 KYGGDEIPFS PYRRAVPTG DASKCTVTVS IGGHGLGAGI GPTIQIGEET VITVDTKAAG  
 1681 KGKVTCTVCT PDGSEVDVDV VENEDGTFDI FYTAPQPKY VICVRFGEH VPNSPFQVTA  
 1741 LAGDQPSVQP PLSQQQLAPQ YTYAQQGQQT WAPERPLGV NGLDVTSLRP FDLVIFPTIK  
 1801 KGEITGEVRM PSGKVAOPTI TDNKDGTTV RYAPSEAGLH EMDIRYDMMH IPGSPLQFV  
 1861 DYVNCGHVTA YPGLTHGVV NKPATFTVNT KDAGEGGLS AIEGSKAEI SCTDNQDGTIC  
 1921 SVSYLPVLPG DYSILVKYNE QHVPGSPFTA RVTGDSMRM SHLVKGSAAAD IPINSETDL  
 1981 SLTATVAPP SGRPEPCLLK RLRNGHVGIS FVPKETGEHL VHVKKNGQHV ASSPIPVVIS  
 2041 QSEIGDASRV RVSGQGLHEG HTEFEAFII DTRDAGYGGI SLSIEGRRSKV DIINTELEDG  
 2101 TCRVYCPTE PGNYIINIKF ADQHPGSPF SVKYTGEGRV KESITRRRRA PSVANVGSHC  
 2161 DLSLKIPEIS IQDMTAQVTS PSGKTHEAEI VEGENHTYCI RVPVPAEMGTH TVSVKYKQHQ  
 2221 VPGSPFQTV GPLGEGGAHK VRAGGFLER AEAGVPAEFS IWTREAGAGG LAIAVEGPK  
 2281 AEISFEDRKD GSCGVAVVWQ EPGDYEVSVK FNEEHPDSP FVVPVAPSPG DARRLTVSSL  
 2341 QESGLKVNQP ASFANSLNGA KGAIKAKVHS PSGALEECYV TEIDQDKYAV RFIPIRENGVY  
 2401 LIDVKFNGTH IPGSPFKIRV GEPGHGGDPG LVSAYGAGLE GGVGTGPAEF VVNTSNAGAG  
 2461 ALSVTIDGPP KVKMDCQEQP EGYRVTYTPM APGYSYLISIK YGSPYHIGGS PFKAKVTGPR  
 2521 LVSNSHLHET SSVFVDSLTK ATCAPQHAGP GPGPADASKV VAKGLGLSKA YVGQKSSFTV  
 2581 DCSKAGNNML LVGVHGPRT PCEEILVKHVG SRLYSVSYLL KDKGEYTLVU KWGDHEHIPGS  
 2641 PYRVVVV

【手続補正書】

【提出日】平成30年1月11日(2018.1.11)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2018517151000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 16/32077
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C12Q 1/06 (2016.01) CPC - C12N 9/16; A61K 38/00; A23K 1/1653 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) IPC(8): C12Q 1/06 (2016.01) CPC: C12N 9/16; A61K 38/00; A23K 1/1653 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 435/39 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Google patents, Google scholar, Google scholar, PatBase, Proquest Dialog diagnose/determine/identify; rheumatoid arthritis; immunologic/reactive; antigen/epitope; flamin-A/Actin-binding protein/FLNA/N-acetylglucosamine-6-sulfatase/glucosamine (N-acetyl)-6-sulfatase; T-cell//lymphocyte; IFN-gamma; stimulate/secretate		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2013/0302329 A1 (TRUSTEES OF BOSTON UNIVERSITY et al.) 14 November 2013 (14.11.2013) para [0010]; para [0053]; para [0028]; claim 1; para [0035]; para [0036]; para [0013]; para [0038]; claim 14; para [0066]; para [0100]	1-5, 14-18
Y	US 2005/0130117 A1 (DAVIS et al.) 16 June 2005 (16.06.2005) Abstract; para [0097]; para [0030]	1-5
Y	US 2015/0010631 A1 (COUR PHARMACEUTICALS DEVELOPMENT COMPANY) 8 January 2015 (08.01.2015) para [0035]; para [0033]; para [0108]; Table 5; Table 1; SED ID NO: 3513; SEQ ID NO: 3447; para [0169]	14-18
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 29 August 2016 (29.08.2016)		Date of mailing of the international search report 27 SEP 2016
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/32077

**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.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
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.: 6-13, 19  
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

(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

(74)代理人 100142929  
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707  
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 スティア アレン シー .  
アメリカ合衆国 0 2 4 8 1 マサチューセッツ州 ウェルズリー シェルバーン ロード 1 5

(72)発明者 ドルアン エリース イー .  
アメリカ合衆国 0 2 1 8 0 マサチューセッツ州 ボストン メイン ストリート 1 2 2 ユ  
ニット 4 0 1

Fターム(参考) 4B063 QA19 QQ03 QQ08 QQ30 QR77 QS33 QX01  
4H045 AA50 BA16 BA17 DA86 EA50 FA10

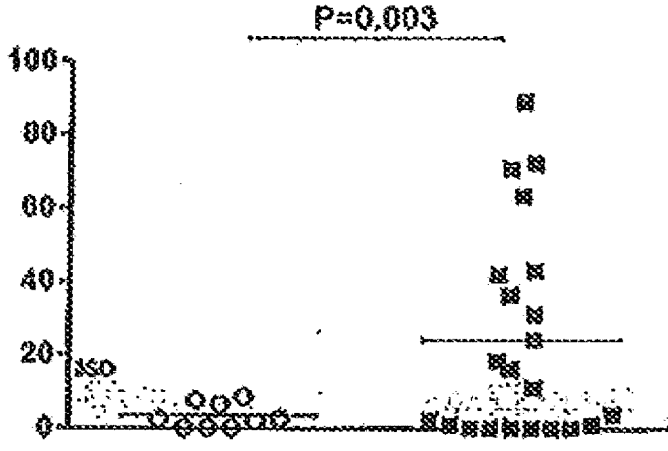
【要約の続き】

# T 細胞応答

A

フィラミンAペプチドに対する

SFU/10<sup>6</sup> PBMC  
IFN- $\gamma$  ELISPOT



陽性数/総数  
比率

0/8  
0%

11/22  
50%

专利名称(译)	自身抗原用于诊断类风湿性关节炎		
公开(公告)号	<a href="#">JP2018517151A</a>	公开(公告)日	2018-06-28
申请号	JP2018511342	申请日	2016-05-12
[标]申请(专利权)人(译)	总医院集团开展业务，作为马萨诸塞州总医院		
申请(专利权)人(译)	总医院集团开展业务，作为马萨诸塞州总医院		
[标]发明人	スティアアレンシー ドルアンエリースイー		
发明人	スティア アレン シー. ドルアン エリース イー.		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/573 C12Q1/06 C07K7/08		
CPC分类号	G01N33/564 G01N33/56972 G01N2333/47 G01N2333/914 G01N2800/102 G01N33/502 G01N33/505 G01N33/6866 G01N2333/4706 G01N2333/57 G01N2800/24		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/573.A C12Q1/06.ZNA C07K7/08		
F-TERM分类号	4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ30 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QX01 4H045 /AA50 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA10		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	62/160320 2015-05-12 US 62/162295 2015-05-15 US		
其他公开文献	JP6663000B2 JP2018517151A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

一种在受试者中诊断类风湿性关节炎的方法，包括以下步骤：通过适当的对照来确定所述受试者是否对N-乙酰氨基葡萄糖-6-硫酸酯酶和/或纤维蛋白A具有免疫应答。本文公开了一种方法，其中与之相比，受试者对一种或多种N-乙酰氨基葡萄糖-6-硫酸酯酶或纤维蛋白A的免疫反应性表明受试者患有类风湿性关节炎。..还公开了用于该方法的具体测定和试剂盒实例。

FIG. 5A

T Cell Response

